



HAL
open science

Etude de nouvelles fonctions de la protéine checkpoint kinase 1 (Chk1) au cours de la différenciation myéloïde normale et leucémique

Laure David

► **To cite this version:**

Laure David. Etude de nouvelles fonctions de la protéine checkpoint kinase 1 (Chk1) au cours de la différenciation myéloïde normale et leucémique. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30179 . tel-01589348

HAL Id: tel-01589348

<https://theses.hal.science/tel-01589348v1>

Submitted on 18 Sep 2017

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Laure DAVID

le 11 octobre 2016

Titre :

Étude de nouvelles fonctions de la protéine Checkpoint kinase 1 (Chk1) au cours de la différenciation myéloïde normale et leucémique

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :

CRCT - INSERM UMR 1037 - CNRS ERL 5294 - UPS

Directeur/trice(s) de Thèse :

Monsieur le Dr. Stéphane MANENTI

Madame la Dr. Christine DIDIER

Jury :

Monsieur le Pr. Bernard PAYRASTRE, président du jury

Madame la Dr. Isabelle PLO, rapportrice

Monsieur le Dr. Jean-François PEYRON, rapporteur

Monsieur le Dr. Philippe PASERO, rapporteur

Monsieur le Dr. Stéphane MANENTI

Madame la Dr. Christine DIDIER

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Isabelle PLO, le Dr. Jean-François PEYRON, le Dr. Philippe PASERO et le Pr. Bernard PAYRASTRE pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse, et d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Un grand merci à Stéphane pour m'avoir accueillie dans cette équipe et pour m'avoir fait confiance pour mener ce projet de thèse. Merci pour ton encadrement, j'ai appris tellement de choses grâce à nos réunions Chk1 !

Je remercie aussi tout particulièrement Christine, ma co-directrice de thèse. Merci pour ton aide, ta disponibilité et l'attention que tu as pu me consacrer au quotidien. Merci aussi pour ton optimisme sans faille et ta bonne humeur indéfectible !

A toute l'équipe 8 au sens large, à toute l'équipe 2 et à toute l'équipe 11 de l'I2MC avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler pour ces projets, et grâce à qui j'ai beaucoup appris.

A tous les amis que j'ai pu rencontrer lors de ma thèse : Mathilde, Justine, Maëlle, Gaby, Quentin, Estelle, Clément, Thomas, Ada, Pauline, Renaud, Srdana, Nico, Lucille, Marine... Merci, on a quand même bien rigolé !

A tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidée et ont permis la réalisation de ce travail. Merci pour votre aide et votre patience !

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX	15
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. Déroulement et régulation du cycle cellulaire	19
A. Déroulement d'un cycle cellulaire normal	19
1. Les Cyclin Dependant Kinases (CDK)	19
2. Régulation des complexes CDK-cycline	20
2.1. La phosphorylation des CDK.....	20
2.2. La déphosphorylation des CDK par les phosphatases CDC25	21
3. Les différentes phases du cycle cellulaire	22
3.1. La phase G1	22
3.2. La phase S	23
3.3. La phase G2	27
3.4. La mitose	27
4. Kinases impliquées dans la progression dans le cycle cellulaire.....	30
4.1. Les kinases Polo Like Kinase (Plk)	30
4.2. Les kinases Aurora	31
4.3. Les kinases Pim	32
4.4. Les kinases p90 RSK	33
B. Régulation du cycle cellulaire	34
1. Les points de contrôle du cycle cellulaire	35
2. Activation de la voie de détection et de réparation des dommages de l'ADN.....	35
II. Importance de la protéine checkpoint kinase 1 dans la régulation du cycle cellulaire ...	38
A. Découverte et structure de Chk1	38

1. Découverte de Chk1	38
2. Description de Chk1	39
3. Mise en évidence des fonctions de Chk1	40
B. Régulation de l'activité de Chk1	41
1. Régulation de Chk1 par phosphorylation.....	41
1.1 Phosphorylation de Chk1 sur les résidus sérine 317/345 par ATR	41
a. Mise en évidence de la phosphorylation de Chk1 par ATR.....	41
b. Voie de signalisation ATR – Chk1	42
c. Phosphorylation de Chk1 par ATR et activation en réponse à des dommages de l'ADN.....	44
d. Phosphorylation par ATR et localisation de Chk1	44
1.2. Autophosphorylation de Chk1 sur le résidu sérine 296.....	45
1.3. Phosphorylation de Chk1 sur les résidus sérine 286 et sérine 301 par les CDK45	
1.4. Phosphorylation sur la sérine 280.....	46
2. Modèle d'activation de Chk1 par phosphorylation	47
3. Activation par clivage	49
C. Régulation négative de l'activité de Chk1.....	49
1. Répression par un variant d'épissage	50
2. Mécanismes de déphosphorylation de Chk1	50
3. Mécanismes d'inactivation de la Claspine (par déphosphorylation ou dégradation)	
.....	50
D. Régulation spatiale de Chk1	51
E. Régulation du niveau d'expression Chk1	52
1. Régulation transcriptionnelle de Chk1.....	52
2. Régulation de l'ARNm de Chk1	53
3. Régulation de la stabilité de Chk1 au niveau protéique	54
F. Rôles de Chk1 dans la régulation du cycle cellulaire	56

1. Le point de contrôle à la transition G1/S	56
2. Rôles de Chk1 dans la régulation de la réplication : le point de contrôle intra-S....	57
2.1. Lors de dommages de l'ADN	57
a. Arrêt de la réplication.....	57
b. Stabilisation des fourches bloquées.....	58
c. Mise en place d'une réplication trans-lésionnelle	58
d. Réparation des dommages de l'ADN	58
2.2. En condition non perturbée	60
3. Activation du point de contrôle G2/M	60
4. Contrôle de l'entrée en mitose	64
5. Le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique	65
G. Autres rôles de Chk1 au cours d'un cycle cellulaire	67
1. Rôle transcriptionnel	67
2. Rôle au niveau de la régulation de l'apoptose.....	68
III. Rôle de Chk1 au cours de l'hématopoïèse normale.....	69
A. Définition de l'hématopoïèse	70
1. Généralités	70
2. Déroulement de l'hématopoïèse	70
2.1. La cellule souche hématopoïétique	70
2.2. Maturation des progéniteurs et des précurseurs	71
3. Régulation de l'hématopoïèse	72
B. Evidences de l'importance de Chk1 au cours de la différenciation hématopoïétique	73
C. Différenciation mégacaryocytaire	75
1. Généralités	75
2. Signalisation cellulaire induite par la TPO.....	75
3. Les étapes de la différenciation mégacaryocytaire	79

4.1. L'étape de maturation nucléaire	80
4.2. La maturation cytoplasmique	81
4.3. La formation des proplaquettes puis des plaquettes	82
4. Evolution des marqueurs de surface antigéniques mégacaryocytaires au cours de la différenciation	83
5. Régulation de la différenciation mégacaryocytaire par des facteurs de transcription	84
6. Kinases impliquées dans le déroulement de la différenciation mégacaryocytaire .	86
6.1. Les kinases Aurora	86
6.2. La kinase BubR1.....	87
6.3. Les kinases Plk	87
6.4. Les kinases Pim	88
6.5. La kinase ATR.....	89
6.6. Les kinases RSK.....	89
IV. Rôles de Chk1 dans la tumorigenèse et dans les cancers	90
A. Généralités.....	90
1. Dérégulation de Chk1 dans les cancers.....	91
1.1. Amplifications.....	91
1.2. Variations du niveau d'expression	92
2. Importance de Chk1 dans la tumorigenèse	92
2.1. Importance des acteurs des points de contrôle du cycle cellulaire dans l'initiation tumorale.....	93
2.2. Rôle des voies de détection et de réparation des dommages dans la progression tumorale.....	93
2.3. Importance de Chk1 dans la réponse aux traitements chimiothérapeutiques : bases scientifiques justifiant l'utilisation d'inhibiteurs de Chk1 dans les chimiothérapies.....	95

3. Conséquences de l'inhibition de Chk1 sur le devenir des cellules tumorales	98
3.1. Abolition des points de contrôle des dommages de l'ADN	98
a. Contexte p53 muté.....	98
b. Contexte p53 non muté	99
3.2. Déstabilisation de la réplication	99
3.3. Défaut de réparation des dommages de l'ADN	100
3.4. Inhibition de Chk1 et abolition des points de contrôle mitotiques	101
3.6. Inhibition de Chk1 et modification du transcriptome.....	101
4. Utilisation d'inhibiteurs de Chk1 dans les protocoles de traitements.....	102
4.1. Développement des inhibiteurs	102
4.2. Les inhibiteurs de Chk1 en essai clinique	103
4.3. Efficacité des inhibiteurs de Chk1	105
a. L'efficacité des inhibiteurs de Chk1 est conditionnée par son niveau d'expression	105
b. L'efficacité des inhibiteurs de Chk1 est conditionnée par son niveau d'activation	106
B. Rôles de Chk1 dans la pathogénicité des LAM	107
1. Définition des LAM	107
1.1 Généralités	107
1.2. Origine de la leucémogénèse	107
1.3. Modèles moléculaires de la leucémogénèse	109
1.4. Aspects cliniques	112
a. Diagnostic et pronostic.....	112
b. Prise en charge thérapeutique.....	112
2. Chk1 et LAM	113
2.1. Utilisation d'inhibiteurs de Chk1 en monothérapie.....	113

2.2. Utilisation d'inhibiteurs de Chk1 en combinaison avec un agent génotoxique	114
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	117
PARTIE 2 : RESULTATS	119
I. Rôle de Chk1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire.....	121
A. Contexte scientifique	121
B. Matériel et méthodes	123
1. Modèles cellulaires de différenciation mégacaryocytaire.....	123
2. Méthodes d'évaluation de la progression de la différenciation mégacaryocytaire	123
3. Méthode d'évaluation de la formation de proplaquettes à partir d'explants de	
moelle osseuse de souris	124
C. Résultats.....	125
D. Discussion.....	145
II. Chk1 : marqueur pronostic et cible thérapeutique dans les LAM	149
A. Contexte scientifique	149
B. Matériel et méthodes	151
1. Modèle cellulaire.....	151
2. Mesure du potentiel clonogénique des cellules primaires de LAM.....	151
3. Mesure des paramètres de la réplication par la technique de « DNA spreading »	
151	
C. Résultats.....	153
D. Discussion.....	159
PARTIE 3 : DISCUSSION GENERALE.....	165
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171
ANNEXES.....	203

Liste des partenaires potentiels de P-Chk1 sérine 280 identifiés par spectrométrie de masse	203
Liste des partenaires potentiels de Chk1 identifiés par spectrométrie de masse	210
Article issu du second axe de thèse : CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML	217

LISTE DES ABBREVIATIONS

53BP1 : p53 binding protein 1	DDK : DBF4-dependent kinase
APC/C : anaphase promoting complex / cyclosome	DMS : Système de Démarcation des Membranes
AraC : Aracytine	DNMT3 : DNA methyltransferase 3 alpha
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	E4F1 : viral E4 and E1A transcription factor
ATR : ATM and Rad3 Related	ECT2 : Epithelial Cell-Transforming sequence 2
ATRIP : ATR Interacting Protein	Eme1 : Essential Meiotic structure-specific Endonuclease 1
Bcl-2 : B cell leukemia/lymphoma 2	EPO : Erythropoïétine
BFU-E : Burst Forming Unit-Erythroid	ERK1/2 : Extracellular Regulated Kinase
BRCA1/2 : breast cancer 1/2	ETS : E26 transformation-specific
BUBR1 : Bub1-related kinase	ETV : ETS variant
CDC20 : Cell division cycle protein 20	FANC : Fanconi Anemia Complementation
CDC25 : cell division cycle 25	Fbx6 : F-box protein 6
CDC45 : cell division cycle 45	Fli1 : Friend leukemia integration 1
CDK : cyclin dependant kinase	FLT3-ITD : fms related tyrosine kinase 3 – internal tandem duplication
CEBPA : CCAAT/Enhancer-Binding Protein A	Fog1 : Friend of GATA1
CFU : Colony Forming Unit	GADD45a : Growth Arrest and DNA Damage inducible 45 alpha
CFU-L : Colony Forming Unit-Leukemia	GATA1/2 : Globin Transcription factor 1/2
Chk1/2 : Checkpoint kinase 1/2	G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
CIP2A : CONSTANS interacting protein 2a	GEMM : Granulocyte Erythrocyte Macrophage et Megacaryocyte
CKI : cyclin dependant kinase inhibitor	GM : Granulocyte et Macrophage
CLP : Progéniteur Lymphoïde Commun	GMP : Progéniteur Myélomonocytaire
CMP : Progéniteur Myéloïde Commun	IDH : Isocitrate deshydrogenase
CRAPome : Contaminant Repository for Affinity Purification	IL : Interleukine
CRM1 : Chromosomal Maintenance 1	IMS : Système de Membranes Invaginées
CSH : Cellule Souche Hematopoïétique	JAK1/2 : Janus Kinase 1/2
CSL : Cellule Souche Leucémique	KA1 : Kinase Associated 1
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4	
Cul : Cullin	
DDB1 : DNA-Binding Protein 1	

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde
 LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
 LFQ : Label-Free Quantification
 MAPKinase : Mitogen Activated Protein Kinase
 MCC : Mitotic Checkpoint Complex
 MCM : Minichromosome Maintenance Complex
 M-CSF : Monocyte-Colony Stimulating Factor
 MEK : Mitogen Extracellular regulated Kinase
 MEP : Progéniteur Erythrocytaire et Mégacaryocytaire
 mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
 NES : Nuclear export Signal
 NF-E2 : Nuclear Factor Erythroïd 2
 NF-κB : nuclear factor kappa B
 NLS : Nuclear Localisation Signal
 ORI : Origine de Replication
 PARP : Poly-(ADP-ribose) polymerase
 P90 RSK : protéines kinases Ras/mitogen-activated kinase/90kDa
 PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
 Pim : Proviral Insertion in Moloney Murine leukemia
 PI(3)K : phosphatidyl-inositol-3-OH kinase
 Plk : Polo-Like Kinase
 PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
 PP2 : serine/threonine protein phosphatase 2
 PRC1 : Protein Regulating Cytokinesis 1
 Pten : Phosphatase and TENsin homolog
 Rb : retinoblastoma protein
 RFC : Replication Factor C
 RPA : Replication Protein A
 RUNX1 : Runt-Related transcription factor 1
 SAC : Spindle Assembly Checkpoint
 SCF : Stem Cell Factor
 SCFbetaTrCP : Skp-Cullin-Fbox β-Transducin repeat-containing protein
 SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor-1
 SMC1 : Structural maintenance of chromosomes 1
 STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
 Tipin : Timeless-Interacting Protein
 TLK1 : Tousled-Like Kinase 1
 TLX1 : T cell leukemia homeobox protein-1
 TopBP1 : Topoisomérase Binding Protein 1
 TP53 : tumor protein p53
 TPO : Thrombopoïétine
 TRAPP : transport protein particle
 USP7 : Ubiquitin Specific Peptidase 7
 ZEB1 : zinc finger E-box binding homeobox 1

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Modèle d'activation des complexes CDK-cyclines par les phosphatases CDC25.	21
Figure 2 : Représentation schématique de la régulation du cycle cellulaire par les complexes CDK/cyclines	22
Figure 3 : Formation et activation des origines de réplication	25
Figure 4: Phases de la mitose et de la cytokinèse dans une cellule animale.	29
Figure 5: Représentation schématique de la distribution des microtubules et des chromosomes durant la mitose et la cytokinèse.	30
Figure 6: Représentation schématique de la cascade de détection et de réparation des dommages de l'ADN	37
Figure 7: Alignement des séquences de Chk1 chez l'homme, la souris, la poule et le xénope.	39
Figure 8 : Structure de la protéine Chk1 humaine, et de ses sites de phosphorylation.....	40
Figure 9: Activation de Chk1 en réponse à des dommages de l'ADN.....	43
Figure 10: Modèle d'activation de Chk1 par phosphorylation	47
Figure 11: Modèle moléculaire de régulation de Chk1.....	48
Figure 12: Les réponses cellulaires mises en œuvre par l'activation de Chk1.....	59
Figure 13: La régulation du point de contrôle G2/M par Chk1... ..	61
Figure 14: Mécanismes d'inhibition des phosphatases CDC25 par Chk1... ..	62
Figure 15 : Schéma récapitulatif des fonctions de Chk1 et ses substrats durant la mitose. ...	67
Figure 16: Résumé des cibles et des fonctions de Chk1 au cours de l'interphase et de la mitose	69
Figure 17: Représentation schématique du modèle classique de l'hématopoïèse normale... ..	72
Figure 18: La signalisation induite par la TPO.	78
Figure 19: Schéma de la différenciation mégacaryocytaire et de la formation des plaquettes.	80
Figure 20: Les marqueurs de différenciation du lignage mégacaryocytaire.....	84
Figure 21: Les caractéristiques des cancers.	91
Figure 22: Des rôles différents de la voie de signalisation ATR-Chk1 au cours de la tumorigenèse.	94
Figure 23: L'intérêt de l'utilisation d'inhibiteurs d'ATR ou de Chk1 dans les traitements anticancéreux.....	96

Figure 24 : Le niveau de CDC25A est prédictif de la sensibilité aux inhibiteurs d'ATR.....	97
Figure 25 : Conséquence de l'inhibition de Chk1 dans des cellules mutées pour p53.....	99
Figure 26: Origine de la CSL.....	109
Figure 27: Chk1 est impliquée dans la progression de la différenciation mégacaryocytaire.....	127
Figure 28: Chk1 est phosphorylée précocement sur le résidu sérine 280 au cours de la différenciation mégacaryocytaire.	130
Figure 29: Les kinases p90 RSK et les kinases Pim sont responsables de la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280.	133
Figure 30 : Plk1 est une cible de P-Chk1 sérine 280.....	136
Figure 31 :Immunoprécipitations de Chk1 phosphorylée en sérine 280 et de Chk1 total pour rechercher tous leurs partenaires potentiels par spectrométrie de masse	138
Figure 32: RUNX1 est une cible de P-Chk1 sérine 280.....	141
Figure 33: Chk1 n'est pas impliquée dans la formation de proplaquettes.....	143
Figure 34 : Le niveau d'expression protéique de Chk1 est corrélé au niveau d'expression de l'ARNm et est hétérogène entre les échantillons de patients atteints de LAM.	154
Figure 35: Des niveaux élevés de Chk1 favorisent la résistance des cellules leucémiques au traitement par l'AraC.	156
Figure 36: Un niveau d'expression de Chk1 élevé favorise le potentiel clonogène des cellules leucémiques.	158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Récapitulatif des inhibiteurs de Chk1 développés à ce jour.	103
Tableau 2: Liste des inhibiteurs de Chk1 actuellement en essai clinique.....	105
Tableau 3 : Altérations génétiques retrouvées dans les LAM	111
Tableau 4 : Régulateurs de la différenciation mégacaryocytaire	139
Tableau 5 : Protéines impliquées dans la progression en mitose.....	139
Tableau 6 : Protéines impliquées dans la réplication	140

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Déroulement et régulation du cycle cellulaire

A. Déroulement d'un cycle cellulaire normal

L'aptitude à se reproduire constitue l'une des caractéristiques des êtres vivants. La perpétuation de la vie repose sur la reproduction des cellules, ou division cellulaire. Dans le cas d'un organisme unicellulaire, la division cellulaire permet de reproduire l'individu en entier. Dans le cas d'un organisme pluricellulaire, la division cellulaire permet le développement d'un individu à partir d'une cellule unique : le zygote. Elle permet aussi le renouvellement constant des cellules afin de garantir l'homéostasie tissulaire. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques contenues dans la moelle osseuse produisent constamment de nouvelles cellules sanguines de façon à garantir des taux de globules rouges, de globules blancs et de plaquettes sanguines constants.

Le processus de division cellulaire fait partie du cycle cellulaire, qui décrit la vie d'une cellule depuis sa formation à partir d'une cellule mère jusqu'à sa division en deux cellules filles. Un cycle de division cellulaire, chez les eucaryotes, est constitué de 4 phases : G1, S, G2, et mitose. La progression d'une cellule dans les différentes phases du cycle cellulaire est permise grâce à l'activité de protéines kinases sérines/thréonines: les kinases dépendantes des cyclines, ou CDK (cyclin dépendant kinase) (Malumbres and Barbacid, 2009). Leur nom vient du fait que l'activité des CDK nécessite leur liaison à une sous-unité régulatrice, appelée cycline, dont l'expression est régulée finement lors de la progression dans le cycle cellulaire.

1. Les Cyclin Dépendant Kinases (CDK)

Chez les mammifères, il existe 13 CDKs et 25 cyclines, dont 3 CDKs interphasiques (CDK2, CDK4 et CDK6) et une CDK mitotique (CDK1, aussi appelée CDC2). 10 cyclines (de types A, B, D et E) sont impliquées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire (Viallard et al., 2001).

Certains complexes CDK-cyclines spécifiques sont responsables de la progression à travers les différentes étapes du cycle. Les signaux mitogéniques sont initiés par l'expression des cyclines

de type D (D1, D2 et D3), qui s'associent préférentiellement avec les CDK4 et CDK6, conduisant à leur activation durant la phase G1. L'activation de ces complexes conduit à l'expression de la cycline de type E (E1 et E2). Les cyclines E vont se lier à CDK2 et l'activer ; ce complexe est nécessaire pour la transition entre la phase G1 et la phase S. CDK2 est ensuite activée par les cyclines A durant les étapes tardives de la phase S, afin d'assurer la transition entre la réplication, la phase G2 et la mitose. Enfin, CDK1 est activée par les cyclines A à la fin de la phase réplivative pour faciliter l'entrée en phase G2. Puis les cyclines de type A sont dégradées pour permettre la formation des complexes CDK1-cyclines B, qui vont permettre la bonne progression en mitose.

2. Régulation des complexes CDK-cycline

La régulation de la quantité et de l'activité des complexes CDK-cyclines contrôle la vitesse de la progression du cycle. Les CDK ont un niveau d'expression constant au cours du cycle. Ainsi, la régulation des complexes CDK-cycline s'effectue à plusieurs niveaux, via le niveau d'expression de la cycline, la liaison à des CKI (cyclin dependant kinase inhibitor), la liaison entre la CDK et la cycline et le statut de phosphorylation des CDK (Crosby, 2007; Lim and Kaldis, 2013). Seul ce dernier aspect sera développé ici.

2.1. La phosphorylation des CDK

La liaison à la cycline est nécessaire à l'activation des CDK, mais n'est pas suffisante. Elle permet de rendre la CDK accessible à l'action du complexe CAK (CDK Activating Kinase) qui la phosphoryle alors sur un résidu thréonine (thr 161 pour CDK1, thr 160 pour CDK2 et thr 172 pour CDK4) (Bockstaele et al., 2009; Ganuza et al., 2012; Kaldis, 1999). Cette phosphorylation rend la CDK pleinement active ; elle permet aussi une stabilisation du complexe CDK-cycline. (Pavletich, 1999).

Si les phosphorylations en thr160, thr161 et thr 172 sont activatrices, la phosphorylation des résidus thr14 et tyr15 de CDK1 et de CDK2 par les kinases Wee1, Mik1 ou Myt 1 sont inhibitrices (Chow et al., 2011). Pour être active, une CDK doit donc être déphosphorylée sur ces résidus, par les phosphatases de la famille des CDC25, qui sont des phosphatases à double

spécificité (tyrosine et thréonine) (Figure 1)(Kristjánsdóttir and Rudolph, 2004; Sebastian et al., 1993).

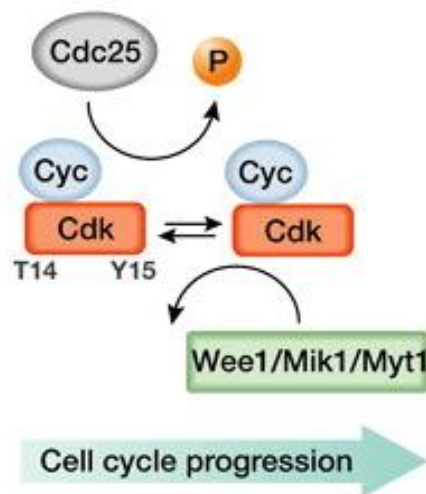


Figure 1: Modèle d'activation des complexes CDK-cyclines par les phosphatases CDC25. L'activation des CDK par les phosphatases CDC25. Les CDK sont maintenues dans un état inactif par phosphorylation par des protéines kinases de la famille de Wee1, Mik1 ou Myt1. L'étape limitante pour leur activation est leur déphosphorylation par les phosphatases CDC25 (Donzelli and Draetta, 2003).

2.2. La déphosphorylation des CDK par les phosphatases CDC25

Les cellules de mammifère ont 3 isoformes de CDC25 : CDC25A, CDC25B et CDC25C. Il semblerait que les 3 CDC25 soient capables d'agir à différents moments au cours du cycle cellulaire, pour activer des complexes CDK-cyclines spécifiques. Ainsi, bien que le rôle le plus connu de CDC25A soit à la transition G1/S et durant la phase S via la déphosphorylation des complexes CDK2-cycline A et CDK2-cycline E, cette phosphatase semble aussi avoir une activité en mitose (Blomberg and Hoffmann, 1999; Hoffmann et al., 1994; Mailand et al., 2002; Molinari et al., 2000) ; à l'inverse, CDC25B et CDC25C, connues pour leur activité en mitose avec la déphosphorylation des complexes CDK1/cycline B, pourraient jouer un rôle durant l'entrée en phase S (Garner-Hamrick and Fisher, 1998; Turowski et al., 2003). Les phosphatases CDC25 apparaissent comme des régulateurs majeurs des différentes transitions du cycle cellulaire, puisque leur invalidation ou leur surexpression conduit à des anomalies dans la progression du cycle cellulaire, et leur coopération conduit à une bonne activation temporelle des complexes CDK-cyclines (figure 2) (Aressy and Ducommun, 2008; Nilsson and Hoffmann, 2000). Malgré tout, des modèles de souris déficientes pour CDC25B et CDC25C sont

capables de se développer et de vivre, même si les femelles sont stériles, ce qui suggère que CDC25A peut contrôler seule la progression dans le cycle cellulaire (Ferguson et al., 2005; Mailand et al., 2002). A l'inverse, l'inactivation de CDC25A est létale chez la souris, ce qui signifie que CDC25B et CDC25C ne peuvent pas compenser l'absence de CDC25A. Ces résultats suggèrent que ces phosphatases ne sont que partiellement redondantes (Ray et al., 2007).

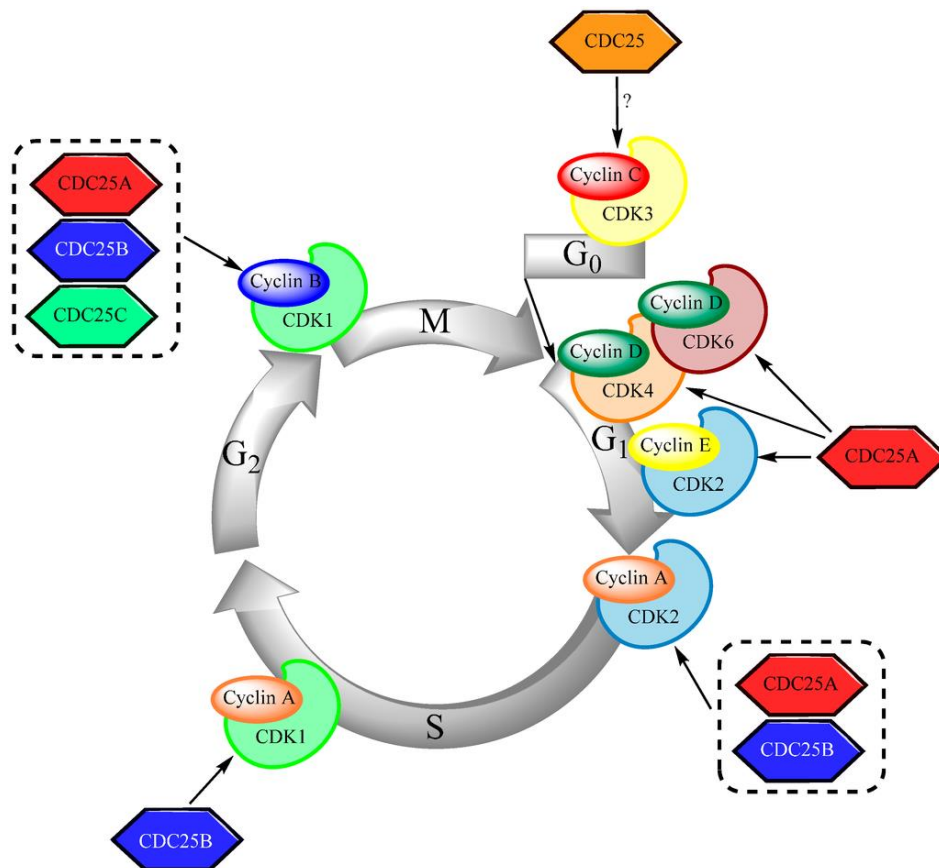


Figure 2 : Représentation schématisée de la régulation du cycle cellulaire par les complexes CDK/cyclines, eux-mêmes contrôlés par les phosphatases CDC25 (Brenner et al., 2014).

3. Les différentes phases du cycle cellulaire

3.1. La phase G1

La phase G1 (le G est tiré de l'anglais gap, signifiant pause) est une phase durant laquelle les cellules ne sont pas dans le processus de division cellulaire. Durant la phase G1, la cellule en

état de prolifération se prépare à la division cellulaire en produisant les protéines nécessaires au bon déroulement de la division, et en contrôlant l'intégrité de son matériel génétique. Si la cellule est de taille suffisante, et si son ADN ne comporte pas de lésions, alors elle va passer en phase S.

3.2. La phase S

La phase S est la phase de synthèse de l'ADN, pendant laquelle les chromosomes se répliquent. Le bon déroulement de cette phase est conditionné par la préparation de la cellule durant les phases précédentes du cycle cellulaire. Ainsi, dès la fin de la mitose et durant la phase G1, la mise en place de la machinerie de réplication commence sur des sites particuliers, appelés origines de réplication (ORI). L'hexamère ORC (Origin Recognition Complex) reconnaît la séquence particulière de l'origine de réplication, et s'y attache. Il va alors servir de plateforme de recrutement. Ceci permet le chargement d'un complexe d'hélicases, les MCM2-7 (Minichromosome Maintenance Complex). Ceci constitue la formation du complexe de pré-réplication. A cette étape, l'origine de réplication est dite « licensed », ou prête à être activée (Remus et al., 2009).

A la transition G1/S, le complexe de pré-réplication est activé, on parle alors de complexe de pré-initiation. Cette activation est due à 2 kinases, CDK et DDK (DBF4-dependent kinase), qui vont faciliter le recrutement de CDC45 et du complexe GINS, pour former le complexe CMG. Le complexe CMG stimule alors l'activité des hélicases MCM (Zou and Stillman, 2000). Mais le complexe de pré-réplication nécessite d'autres facteurs avant de constituer un réplisome, c'est-à-dire un complexe protéique situé au niveau des fourches de réplication, qui permet la réplication de l'ADN (Fragkos et al., 2015). Parmi ces facteurs, les plus importants sont l'hélicase RecQL4, Treslin/TICRR, et la protéine associée à la topoisomérase TopBP1 (Topoisomérase Binding Protein I (Gambus et al., 2006) . Une topoisomérase est une protéine chargée de diminuer la tension de l'ADN liée à la torsion importante qui a lieu lors du déroulement de la double hélice. Treslin est une protéine interagissant avec TopBP1, de façon dépendante de CDK2. Ces protéines collaborent ensuite pour permettre la liaison de CDC45 au niveau des origines de réplication (Guo et al., 2015). A ce moment, l'origine est dite

« activée », et les MCM vont dérouler la double hélice d'ADN en brisant les liaisons hydrogènes entre les bases azotées. Elles génèrent ainsi de l'ADN simple brin (ADNsb), qui est recouvert par une protéine affine pour l'ADN, RPA (Replication Protein A) rendant ainsi les brins parentaux disponibles pour servir de matrice. Ceci permet aux polymérase répliquatives associées à leur facteur de processivité PCNA (proliferating cell nuclear antigen) d'accéder à la matrice d'ADN. Les ADN polymérase catalysent l'élongation de l'ADN, au niveau des fourches de réplication. Ces étapes sont résumées sur la figure 3.

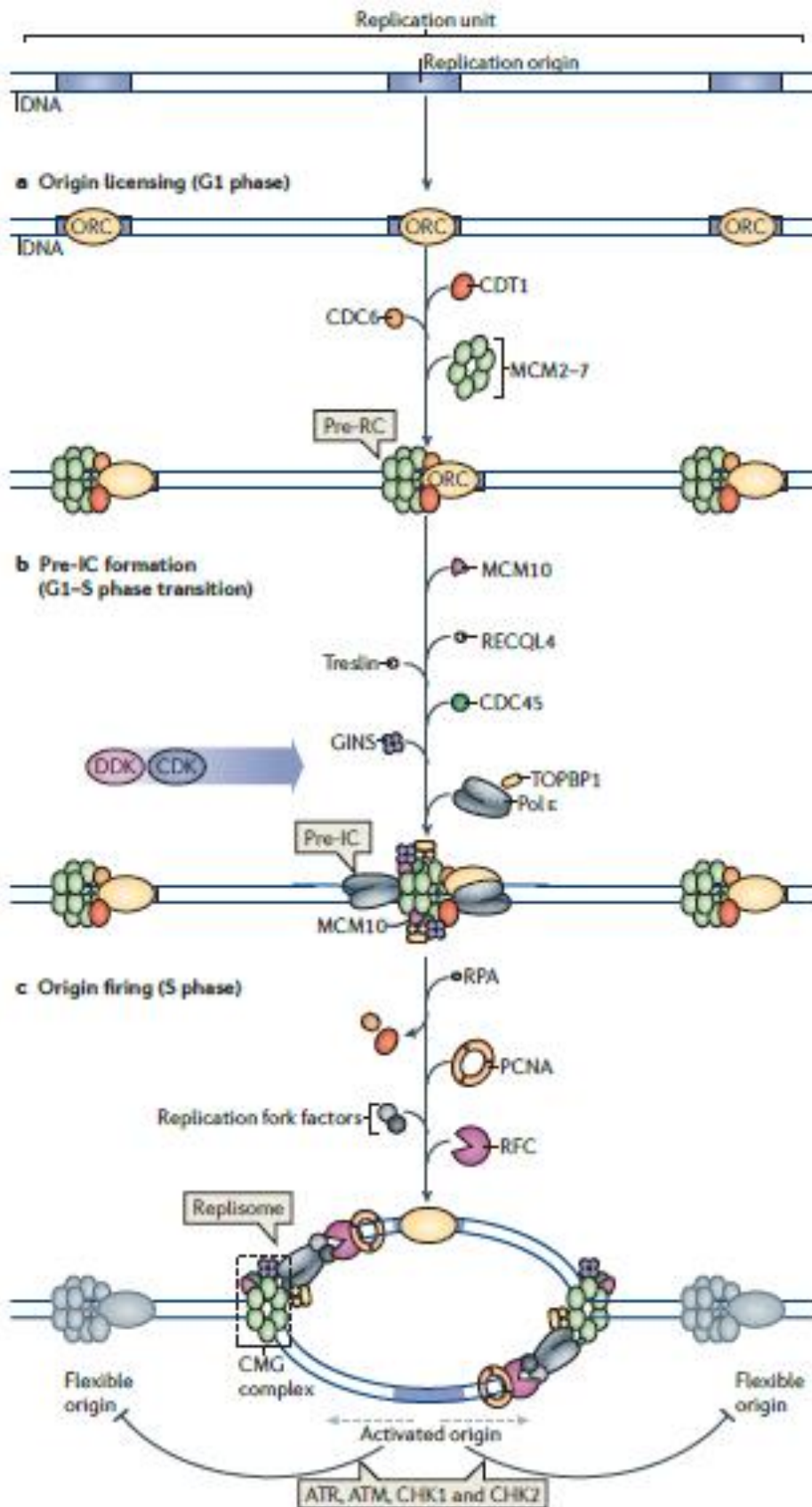


Figure 3 : Formation et activation des origines de répliation (Fragkos et al., 2015)

La terminaison de la réplication est établie lorsque deux fourches de réplication se rencontrent. Les réplisomes sont alors dissociés de la chromatine par des mécanismes encore peu connus.

La phase de réplication de l'ADN est particulièrement cruciale, car elle conditionne la transmission aux cellules filles de l'intégralité de l'information génétique rigoureusement à l'identique. La réplication doit être complète et non redondante à chaque cycle cellulaire.

De ce fait, durant la phase S, l'activation des ORI est régie par un programme temporel qui contrôle le fait que toutes les ORI ne s'activent pas en même temps, mais de manière séquentielle et ordonnée tout au long de la phase S ; on parle de « timing » de réplication (Dimitrova and Gilbert, 1999). Le timing de réplication est imposé par différents facteurs, notamment l'accès limité à CDC45 au niveau de la chromatine (Fragkos et al., 2015; Hayles et al., 1994).

D'autre part, le nombre d'ORI actives est bien moins élevé que le nombre de complexes de pré-réplication qui se sont constitués. Lorsque la réplication a lieu dans des conditions normales, seulement 10% des origines sont actives, les autres origines sont dites « dormantes », et seront donc répliquées de manière passive (Dimitrova and Gilbert, 1999). Ces origines dormantes vont être activées dans des situations où le bon déroulement de la réplication est compromis. En effet, l'avancée des ADN polymérase répliquatives peut être perturbée ou compromise par la dérégulation de facteurs de la réplication, ou par la présence d'obstacles de diverses natures (Blow et al., 2011; Woodward et al., 2006). On dit alors que la cellule subit un état de stress répliatif. Le terme de stress répliatif se réfère à toute situation qui engendre le ralentissement ou l'arrêt de la réplication, et qui génère de longues séquences d'ADN simple brin (ADNsb) du fait du découplage entre les ADN polymérase de la fourche qui sont bloquées et le complexe hélicase MCM qui lui continue sa route. (Gelot et al., 2015; Zeman and Cimprich, 2014).

En conséquence, le stress répliatif peut mener à des effondrements de fourches de réplication, provoquant de l'instabilité génétique, c'est-à-dire le risque de non-conformité des cellules-filles par rapport à la cellule mère. L'état de stress répliatif est d'ailleurs retrouvé dans les étapes précoces de la tumorigénèse (Bartkova et al., 2005; Burrell et al., 2013; Gorgoulis et al., 2005). Cependant, ces perturbations de la réplication sont prises en charge

par des voies de signalisation de détection et de réparation des dommages de l'ADN. Ces mécanismes préviennent l'instabilité génétique. Enfin, une fois la réplication de l'ADN terminée, la phase G2 commence.

3.3. La phase G2

Cette phase permet à la cellule de se préparer à la mitose, notamment via la réplication des centrosomes. Un centrosome, ou centre organisateur des microtubules, est un organite non membraneux qui permet l'organisation de l'assemblage des microtubules, qui sont des fibres du cytosquelette, et ce tout au long du cycle cellulaire (Krämer et al., 2004a). Cette phase se termine en passant le point de contrôle G2. Ces 3 phases constituent l'interphase qui représente généralement 90% de la durée du cycle.

3.4. La mitose

La mitose constitue la phase la plus courte du cycle cellulaire ; elle dure environ 1 heure. Elle est composée de 5 phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (figure 4). La cytokinèse chevauche les dernières étapes de la mitose et la termine.

En prophase, le cytosquelette cellulaire se désorganise, la cellule prend un aspect sphérique. Dans le même temps, le fuseau de division, ou fuseau mitotique commence à se former au niveau des centrosomes. Il s'agit d'un ensemble de fibres constituées de microtubules associées à des protéines qui s'assemblent et se prolongent entre les deux centrosomes. Ce fuseau repousse les 2 centrosomes aux pôles opposés de la cellule. Dans le noyau, les chromosomes se condensent et l'enveloppe nucléaire commence sa fragmentation.

En prométaphase, l'enveloppe nucléaire achève sa fragmentation. Les centrosomes se trouvent aux pôles opposés de la cellule. Les fibres du fuseau mitotique envahissent le contenu du noyau et interagissent avec les chromosomes qui sont maintenant condensés. Chacune des 2 chromatides des chromosomes possède une région spécialisée appelée kinétochore, située dans la région du centromère. Ces kinétochores vont être attachés par des

fibres de microtubules, les microtubules kinétochoriens. En parallèle, d'autres fibres de microtubules, les microtubules polaires, rayonnent des pôles vers l'équateur sans s'attacher à des kinétochores. Chaque microtubule polaire interagit avec une fibre de microtubule polaire située en vis-à-vis au niveau du pôle opposé, afin de préparer l'allongement de la cellule à une étape ultérieure.

En métaphase, les microtubules kinétochoriens alignent les chromosomes au niveau de la plaque équatoriale, le plan à égale distance des 2 pôles de la cellule. Pour chaque chromosome, les kinétochores des chromatides sœurs font face à un pôle différent.

Durant l'anaphase, le centromère dédoublé de chaque chromosome se sépare en deux, libérant les chromatides sœurs. Elles deviennent des chromosomes à part entière qui se dirigent vers les pôles opposés de la cellule par raccourcissement des microtubules kinétochoriens. Dans le même temps, les deux pôles de la cellule s'éloignent l'un de l'autre par l'allongement des microtubules polaires. A la fin de l'anaphase, les deux pôles de la cellule contiennent un jeu complet et équivalent de chromosomes.

Durant la télophase, des noyaux fils commencent à se former aux pôles, tandis que les noyaux commencent à perdre leur organisation spatiale compacte, et les nucléoles réapparaissent. Le cytoplasme est aussi réparti entre les 2 pôles.

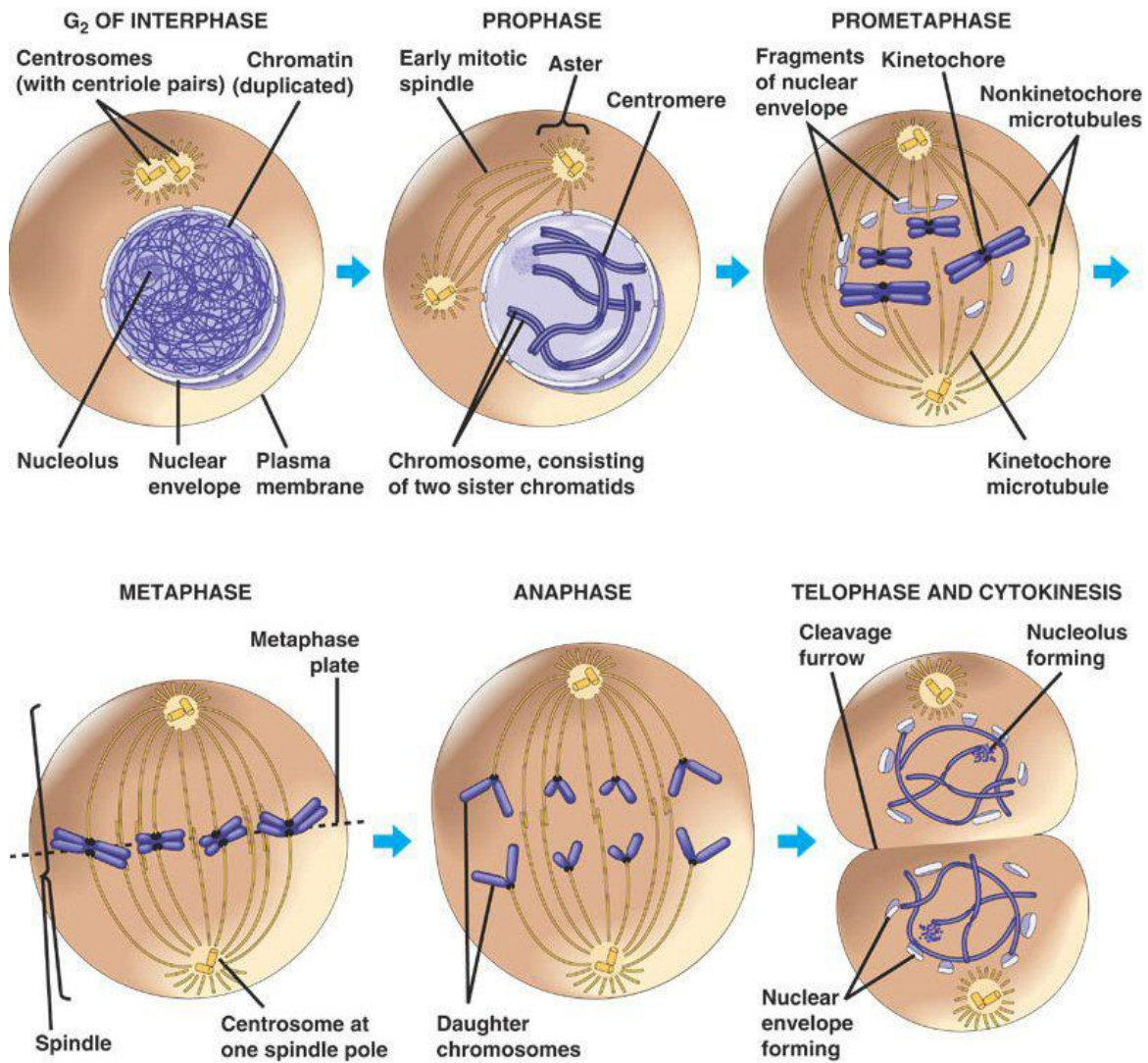


Figure 4: Phases de la mitose et de la cytokinèse dans une cellule animale.

La mitose se termine avec la cytokinèse. Cette ultime étape de la division cellulaire consiste en la séparation physique du cytoplasme d'une cellule en deux cellules distinctes. Elle débute par l'apparition du sillon de division qui se produit là où était située la plaque équatoriale. Le sillon de division est dans un plan perpendiculaire à celui du fuseau central. Sur la face cytoplasmique du sillon de division, un anneau contractile s'assemble, fait de microfilaments d'actine associés à des molécules de myosine non musculaire de type II C. La position de l'anneau est déterminée par le fuseau central, et est finement régulée. La myosine se déplace sur l'actine, ce qui provoque la contraction de l'anneau, le diamètre de celui-ci diminue jusqu'à ce que la cellule mère se divise. Il s'agit de l'étape d'abscission, donnant naissance à deux cellules filles identiques, complètes et séparées (figure 5).

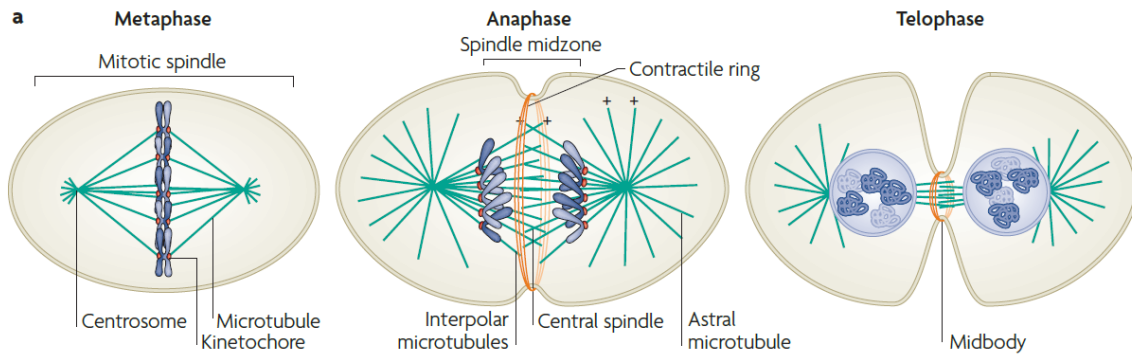


Figure 5: Représentation schématique de la distribution des microtubules et des chromosomes durant la mitose et la cytokinèse. En métaphase, les chromosomes s'alignent au niveau de la plaque métaphasique, puis, durant l'anaphase, ils migrent aux pôles opposés de la cellule alors que se met en place l'anneau contractile d'actine. En télophase, l'anneau contractile d'actine comprime le fuseau central pour former le midbody (Glotzer, 2009).

4. Kinases impliquées dans la progression dans le cycle cellulaire

Il existe des grandes familles de kinases favorisant la progression dans ce cycle cellulaire ; pour les besoins de l'étude nous détaillerons ici le rôle des kinases Plk (Polo-Like Kinases), des kinases Aurora, des kinases Pim, et des kinases p90RSK pour lesquelles des rôles importants au cours du cycle cellulaire ont été décrits.

4.1. Les kinases Polo Like Kinase (Plk)

Les kinases Plk constituent une famille de 5 protéines chez les Mammifères. Chez l'homme, Plk1 est responsable de nombreuses fonctions au cours du cycle cellulaire, et notamment au cours de la mitose : l'entrée en mitose (Seki et al., 2008), la condensation des chromosomes (Abe et al., 2011), la maturation des centrosomes (Lane and Nigg, 1996), l'assemblage et la fonctionnalité du fuseau mitotique (Golsteyn et al., 1995; Sumara et al., 2004), la mise en place de l'ancrage du fuseau kinétochorien (Elowe et al., 2007; Lénárt et al., 2007), la progression de la métaphase à l'anaphase (Sumara et al., 2002) et la cytokinèse (Brennan et al., 2007;

Burkard et al., 2007; Neef et al., 2007; Petronczki et al., 2007). A ce titre, l'activité et la localisation de Plk1 sont régulés au cours du cycle cellulaire et en particulier durant la mitose. En effet, son niveau d'expression augmente à partir de la fin de la phase S, et son activité maximale est atteinte lors de la mitose. Sa dégradation débute en fin de mitose et se poursuit durant la phase G1. Durant la phase G2, Plk1 est localisée au niveau du noyau, et elle est adressée au niveau des centrosomes à la fin de cette étape. Durant la mitose, Plk1 est retrouvée au niveau des centrosomes et des kinétochores, où elle persiste jusqu'à sa dégradation. Elle est aussi retrouvée au niveau du midbody associé à l'anneau contractile d'actine en fin de mitose (van de Weerd and Medema, 2006).

Plk1 a aussi des rôles durant la phase S où elle favorise la réplication de l'ADN (Wu and Liu, 2008) et est impliquée dans les mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN (Chabaliere-Taste et al., 2016). Du fait de toutes ces fonctions, Plk1 interagit avec de nombreuses autres protéines majeures du cycle cellulaire, notamment CDK1, et les kinases Aurora (Archambault et al., 2015).

4.2. Les kinases Aurora

Les kinases Aurora sont des sérines/thréonines kinases impliquées dans la régulation de nombreux processus mitotiques et méiotiques. Les mammifères possèdent 3 kinases Aurora : Aurora A, Aurora B et Aurora C. Cette dernière n'est pas ubiquitaire et joue un rôle mineur en mitose (Goldenson and Crispino, 2015).

Aurora A joue un rôle dans la maturation des centrosomes, dans la promotion de la destruction de l'enveloppe nucléaire en début de mitose, dans l'assemblage du fuseau bipolaire et dans la séparation des chromatides (Cicenas, 2016; Goldenson and Crispino, 2015). Aurora A a aussi un rôle lors de la cytokinèse (Reboutier et al., 2015).

Aurora B se concentre au niveau des centromères entre la prophase et la prométaphase. Elle est retrouvée au niveau du sillon de division en anaphase. Elle est impliquée dans la condensation des chromosomes mitotiques, le point de contrôle d'assemblage du fuseau

mitotique et joue également un rôle au cours de la cytokinèse lors de l'abscission (Cicenas, 2016; Goldenson and Crispino, 2015, 2015; Weiderhold et al., 2016).

4.3. Les kinases Pim

Les protéines kinases Proviral Insertion in Moloney Murine leukemia (Pim) sont des sérines/thréonines kinases. La famille des Pim est composée de 3 isoformes : Pim 1, Pim2 et Pim 3, qui sont très conservées au cours de l'évolution. Contrairement à la plupart des autres protéines kinases dont l'activation nécessite la phosphorylation préalable du domaine catalytique, l'activité des Pim kinases est constitutive. Ceci supporte l'idée que ces kinases seraient essentiellement régulées par la transcription de leur ARN messager et par la stabilisation de la protéine, c'est-à-dire par un équilibre entre leur synthèse et leur dégradation. Ces protéines sont régulées au niveau transcriptionnel par les facteurs de transcription STAT, dans la voie de signalisation JAK/STAT et NF- κ B (Zhu et al., 2002).

Les membres de la famille Pim sont ubiquitaires dans l'organisme, néanmoins des différences de niveaux d'expression ont été rapporté dans la littérature. En particulier, l'expression de Pim1, Pim2 et même Pim3 est très importante dans les cellules hématopoïétiques saines ou cancéreuses (Brault et al., 2010)

Elles jouent des rôles essentiels notamment dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire (Mondello et al., 2014; Narlik-Grassow et al., 2014). Elles ont notamment un rôle important dans le compartiment hématopoïétique. En effet, l'inactivation de Pim1 induit un défaut de repeuplement hématopoïétique, qui n'est pas observé avec l'inactivation de Pim2 ou Pim3. De plus, la surexpression de Pim1 améliore la capacité des cellules souches hématopoïétiques à reconstituer un tissu hématopoïétique dans des souris irradiées (An et al., 2013a, 2013b).

Par ailleurs, dans les cellules progénitrices cardiaques, les kinases Pim permettent la ségrégation asymétrique des chromatides; dans ce contexte, elles permettent l'autorenouvellement des cellules souches par division asymétrique (Sundararaman et al., 2012).

Les kinases Pim favorisent la progression dans le cycle cellulaire. Elles semblent agir lors de la transition G1/S par le biais de la phosphorylation inhibitrice de p27 et p21 qui sont toutes les deux des protéines inhibitrices de CDK induisant l'arrêt du cycle cellulaire, mais aussi par la phosphorylation de la phosphatase CDC25A activant ainsi la progression du cycle en phase S. La transition G2/M est également favorisée par la phosphorylation de la phosphatase CDC25C et par l'inactivation de son inhibiteur C-TAK1 par Pim1 (Bachmann et al., 2004; Morishita et al., 2008).

D'autre part elles semblent avoir également des rôles en mitose. La surexpression de Pim 1 dans les cellules épithéliales prostatiques provoque des défauts dans la progression de la mitose. Ces cellules ne présentent plus de point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique malgré la présence de microtubules désordonnés et une amplification des centrosomes. Ceci s'accompagne d'une mauvaise ségrégation des chromosomes, avec la génération de cellules aneuploïdes et polyploïdes (Roh et al., 2003).

Enfin les kinases Pim sont observées aux pôles des fuseaux mitotiques où elles auraient un rôle dans la progression de la mitose (Bhattacharya et al., 2002).

4.4. Les kinases p90 RSK

Les protéines kinases Ras/mitogen-activated kinase/90kDa (p90 RSK) font partie de la voie de signalisation des MAPKinases (Mitogen Activated Protein). Cette cascade de signalisation est activée par phosphorylations successives, en réponse à de nombreux facteurs extracellulaires. Ceux-ci entraînent la phosphorylation des kinases ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinase) par une MAPKinase kinase nommée MEK (Mitogen Extracellular regulated Kinase), elle-même située en aval de Raf et Ras. Les kinases RSK font partie des substrats d'ERK1/2. La famille des kinases RSK contient 4 membres : RSK1, 2, 3 et 4, toutes sont des sérines thréonine kinases ubiquitaires partiellement redondantes et impliquées dans les grandes fonctions biologiques (survie cellulaire et prolifération notamment). (Lara et al., 2013). En particulier, les kinases RSK ont un rôle sur la progression dans le cycle cellulaire. En effet, les kinases RSK permettent l'expression transcriptionnelle de la cycline D1, et de p21. P21 est en outre une cible de RSK1 et RSK2, et sa phosphorylation permet la progression de la phase G1 (Doehn et al., 2009; Fujita

et al., 2003; Smith et al., 2005). De plus, l'activation des kinases RSK est suffisante pour permettre la transition G2/M dans les oocytes de Xénope (Gross et al., 2001).

Les kinases RSK semblent aussi avoir un rôle dans la mise en place des complexes de réplication durant la phase G1. Plus, précisément, leur inactivation est nécessaire et suffisante pour le recrutement de CDC25 à la chromatine au moment de la formation du complexe de pré-initiation en phase G1, dans l'œuf d'étoile de mer (Tachibana et al., 2010).

Par ailleurs, les kinases RSK ont des rôles en mitose. Tout d'abord, il apparaît que la kinase RSK2 participe à l'activation du Spindle Assembly Checkpoint (SAC), point de contrôle mitotique présenté plus loin. En effet, RSK2 est localisée au niveau des kinétochores et son invalidation empêche l'arrêt en métaphase consécutif à des mauvais appariements chromosomiques, de même qu'elle empêche la localisation au kinétochores des protéines du SAC telles que Mad1 et Mad2 (Vigneron et al., 2010). D'autre part, la kinase Plk1 est capable d'inhiber l'activité des kinases RSK durant la mitose via l'inactivation des kinases MEK, ce qui permet une régulation fine de sa progression mitotique (Li et al., 2012b). Enfin, RSK1 est impliquée dans les mécanismes mis en jeu lors de la cytokinèse. En effet, l'invalidation de RSK1 dans les cellules Hela entraîne l'accumulation de cellules binuclées. Ces cellules sont formées à cause d'un défaut de formation du fuseau de division, au début de la cytokinèse, lié à une mauvaise localisation de RhoA et de la protéine Anillin. De plus, l'invalidation de la kinase RSK1 entraîne un défaut de formation des microtubules au niveau du sillon de division (Nam et al., 2014).

B. Régulation du cycle cellulaire

L'ADN contenu dans chacune de nos cellules est constamment soumis à des stress exogènes et endogènes susceptibles de créer des dommages. Afin de garantir une transmission équitable du matériel génétique et cytoplasmique lors de la division cellulaire, le cycle cellulaire est régulé par des mécanismes internes et externes au niveau de points de contrôle bien précis.

1. Les points de contrôle du cycle cellulaire

Un point de contrôle représente un moment critique du cycle cellulaire au cours duquel un stimulus dicte l'arrêt ou la poursuite de la progression dans le cycle. On peut distinguer le point de contrôle à la transition G1/S, le point de contrôle intra-S, le point de contrôle à la transition G2/M, et le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (Bartek and Lukas, 2007).

L'activation d'un point de contrôle suite à l'apparition de lésions au niveau de l'ADN entraîne le ralentissement voire un arrêt de la progression dans le cycle, ce qui permet de limiter le risque de transmettre des mutations géniques aux cellules filles, et augmente les chances de survie de la cellule mère (Hartwell and Weinert, 1989).

2. Activation de la voie de détection et de réparation des dommages de l'ADN

La présence d'un dommage de l'ADN est reconnue par des protéines senseurs. Elles vont conduire au recrutement de protéines médiatrices du signal. Puis ce signal est amplifié au niveau des protéines transductrices et effectrices, et provoque diverses réponses cellulaires (Jackson and Bartek, 2009).

Après cassure de l'ADN, les kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad3 Related) de la famille des PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) sont les senseurs qui initient la cascade de détection et de réparation des dommages de l'ADN. La kinase ATM est activée après cassure de l'ADN, et notamment suite à des cassures double brin de l'ADN, alors que l'activation de la kinase ATR est consécutive à des cassures simple brin de l'ADN mais aussi à des blocages de fourches de réplication ou une vitesse de réplication inadaptée, même sans cassure de l'ADN. Comme de nombreux stress cellulaires entraînent à la fois des cassures et des ralentissements ou des blocages de fourches réplcatives, les kinases ATM et ATR

coopèrent dans de nombreuses réponses cellulaires au sein des points de contrôle (Abraham, 2001; Niida and Nakanishi, 2006).

Dans des cellules non stressées, ATM est présent sous une forme inactive homodimérique, dans laquelle le domaine kinase est bloqué par un domaine de la protéine à proximité de la sérine 1981. Suite à une cassure double brin de l'ADN, ATM subit un changement de conformation qui entraîne son autophosphorylation sur le résidu 1981 et la dissociation des homodimères. ATM se retrouve donc activé sous forme monomérique, et peut phosphoryler ses substrats nucleoplasmiques (comme p53) ou au niveau du site de cassure (comme NBS1, BRCA1 ou SMC1). Le changement de conformation qui initie l'activation d'ATM ne nécessite pas la liaison d'ATM au site de cassure, mais est le résultat d'un changement de structure de la chromatine qui est détecté par ATM à distance de la lésion (Bakkenist and Kastan, 2003).

Une fois activé, ATM doit se rendre à proximité de ses substrats, notamment au niveau de la cassure de l'ADN. Le recrutement d'ATM au niveau du site de la cassure dépend notamment de la phosphorylation de l'histone H2AX en position γ (correspondant à la sérine 139), au niveau de la lésion, et de part et d'autre, sur plusieurs mégabases. γ H2AX constitue une plateforme de recrutement permettant la formation de complexes protéiques nécessaires à l'arrêt de la progression dans le cycle cellulaire et à la réparation des dommages (Kastan and Lim, 2000).

L'activation d'ATR au niveau du point de contrôle de phase S passe par son recrutement sur l'ADNsb, via son interaction avec son co-facteur ATRIP (ATR Interacting Protein) et RPA (Replication Protein A) (Liu et al., 2011). ATR est indispensable à la survie cellulaire, même en absence de dommages de l'ADN (Brown and Baltimore, 2000). De façon plus générale, ATR est activée en réponse à tout type de stress qui a des répercussions sur la vitesse des fourches de réplication (condition d'hypoxie, inhibiteurs de la réplication de l'ADN, irradiations ultra-violettes, agents alkylants, etc...), et pourrait compenser en partie ATM (Murga et al., 2009). ATR est complexée avec ATRIP, en condition non stressée ou en condition de cassures simples brins de l'ADN (Cortez et al., 2001). Cependant, lors de lésion simple de l'ADN, les extrémités simples brins vont être protégées par la fixation de protéines RPA qui vont stimuler la fixation d'ATRIP au niveau de la cassure, permettant ainsi à ATR de se trouver à proximité de ses substrats au niveau de la cassure (Ball et al., 2005; Zou and Elledge, 2003).

La transduction du signal en aval d'ATM et d'ATR se fait grâce à l'activation de protéines médiatrices, respectivement la kinase Chk2 (Checkpoint kinase 2) et Chk1 (Checkpoint kinase 1). Ces kinases vont alors phosphoryler leurs nombreux substrats responsables de l'amplification du signal et de nombreuses réponses cellulaires, soit des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de la cassure, ou dans l'initiation de la mort cellulaire (figure 6).

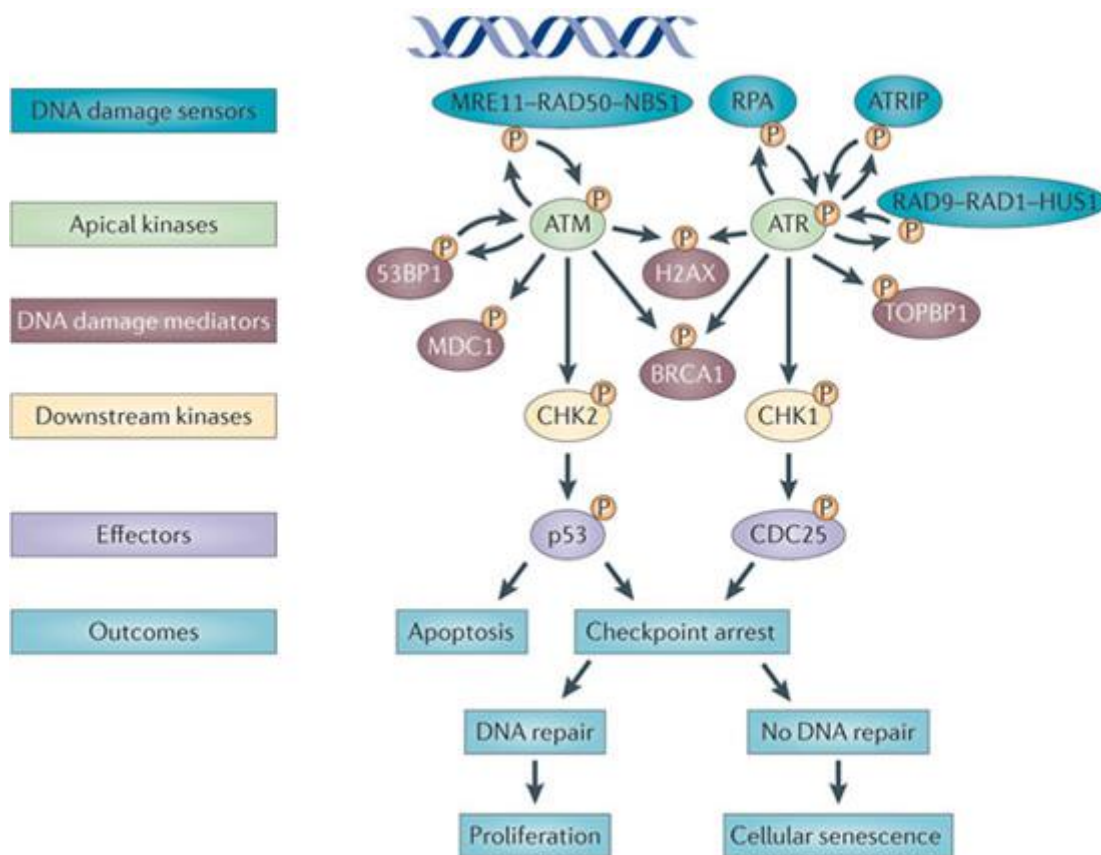


Figure 6: Représentation schématique de la cascade de détection et de réparation des dommages de l'ADN (Sulli et al., 2012).

Ainsi, lorsqu'une cellule est engagée dans le cycle cellulaire, elle progresse dans le cycle jusqu'à la formation de deux cellules filles. Mais les mécanismes de détections des lésions de l'ADN peuvent entraîner un délai transitoire dans cette progression à la fin de la phase G1, pendant la phase S, à la fin de la phase G2, ou même un arrêt prolongé en G1 ou G2, avant l'entrée en phase S ou mitose respectivement. Ces mécanismes passent en partie par l'inactivation des phosphatases CDC25 et des complexes CDK-cyclines, par séquestration ou

dégradation, et sont indispensables au maintien de la stabilité génétique (Donzelli and Draetta, 2003).

II. Importance de la protéine checkpoint kinase 1 dans la régulation du cycle cellulaire

Comme nous l'avons vu, la progression dans le cycle cellulaire est régulée très finement par un ensemble de points de contrôle. Un acteur majeur du cycle cellulaire participe à la mise en place et la terminaison de tous ces points de contrôle, la protéine Checkpoint kinase 1, ou Chk1 (Zhang et al., 2005, 2009b).

A. Découverte et structure de Chk1

1. Découverte de Chk1

Les premiers travaux qui aboutissent à la découverte de Chk1 ont été réalisés chez *Saccharomyces cerevisiae*, par l'équipe de Weinert et Hartwell, et ont permis de montrer qu'un certain nombre de mutants étaient plus sensibles aux radiations ionisantes que les levures sauvages, ceux dont les mutations touchaient les gènes RAD. Cette sensibilité s'accompagnait d'une absence d'arrêt du cycle au point de contrôle G2 –M (Weinert and Hartwell, 1988).

Des travaux chez *S. pombe* ont permis d'identifier des gènes codant pour des acteurs des points de contrôle du cycle cellulaire. Un de ces gènes identifiés, *Rad27*, code pour une protéine sérine – thréonine kinase responsable de l'arrêt de cycle en réponse aux dommages de l'ADN (Enoch et al., 1992; al-Khodairy and Carr, 1992; al-Khodairy et al., 1994; Walworth et al., 1993).

En 1997, des protéines homologues de Rad27/Chk1 ont été identifiées chez la drosophile (nommée grape dans cet organisme), la souris et l'homme. Il s'avère que Chk1 est présente chez tous les eucaryotes et très conservées entre les espèces (Figure 7) (Flaggs et al., 1997; Fogarty et al., 1997; Sanchez et al., 1997).

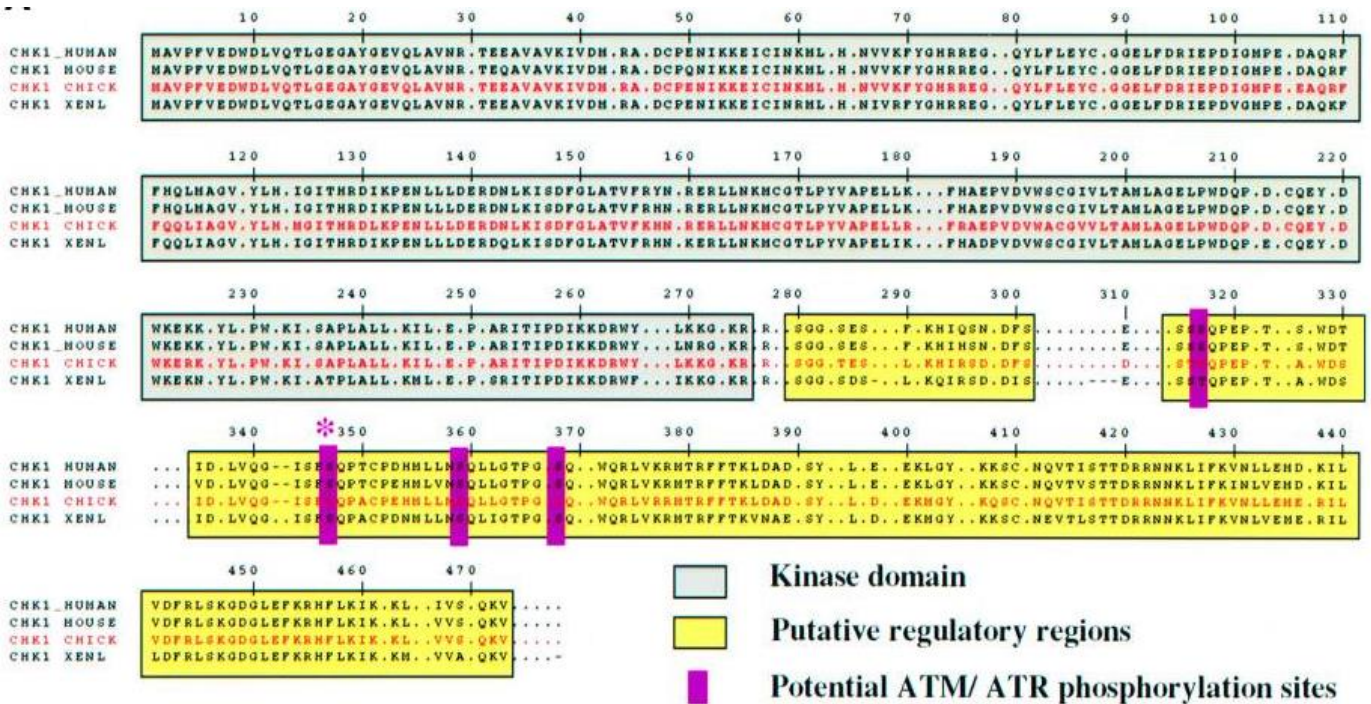


Figure 7: Alignement des séquences de Chk1 chez l'homme, la souris, la poule et le xénope (Zachos et al., 2003a).

2. Description de Chk1

La protéine Chk1 humaine pleine taille est constituée de 476 acides aminés, pour un poids moléculaire de 56 kDa (Sanchez et al., 1997). Elle contient un domaine kinase très conservé entre les espèces, du côté N-terminal (résidus 1-265) contenant le domaine catalytique et le domaine de fixation à l'ATP, et un domaine régulateur du côté C-terminal, moins conservé. Ce domaine contient les sites de phosphorylation de Chk1, qui vont moduler son activité ou sa localisation (Chen et al., 2000). Il contient aussi les séquences d'export nucléaire (NES) entre les résidus 371 et 381 et de localisation nucléaire (NLS), ainsi qu'un domaine KA1 (Kinase Associated 1) (Dunaway et al., 2005; Gong et al., 2015; Reinhardt et al., 2010; Wang et al., 2012a). Enfin, comme la plupart des protéines qui interagissent avec PCNA, Chk1 possède un

domaine de fixation à PCNA, appelé PIP box, au niveau C-terminal de la protéine, dans la région située dans le NES, entre les résidus 374 et 381 (figure 8) (Scorah et al., 2008).

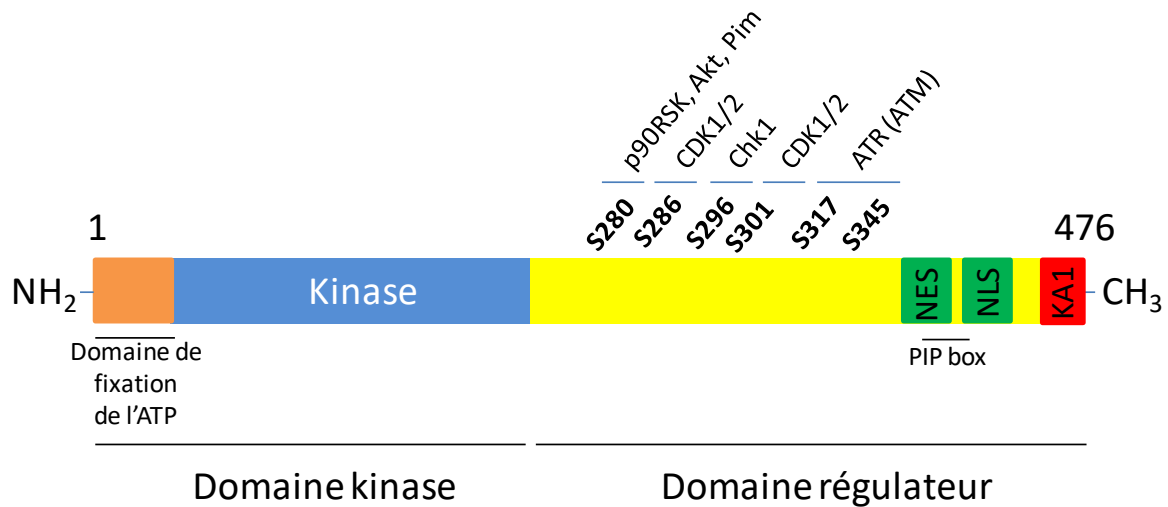


Figure 8 : Structure de la protéine Chk1 humaine, et de ses sites de phosphorylation (adapté de Zhang and Hunter, 2014).

3. Mise en évidence des fonctions de Chk1

La mise en place de modèles de souris knock-out pour Chk1 a permis de montrer que l'invalidation génique de Chk1 chez la souris provoque des défauts de prolifération cellulaire majeurs, associés à une mortalité des cellules souches embryonnaires et une mortalité embryonnaire très précoce, avant le jour E 6.5 (Liu et al., 2000; Takai et al., 2000). Grâce à des modèles de souris dans lesquelles Chk1 est invalidée de façon conditionnelle, il a de plus été montré que son invalidation dans des tissus adultes en prolifération conduit à une apoptose cellulaire massive. Les souris hétérozygotes conditionnelles pour Chk1 présentent un nombre accru de cellules en phase S et de dommages de l'ADN. De plus, les épithéliums mammaires de ces souris présentent une mauvaise progression dans le cycle cellulaire. En effet, ces cellules qui sont encore en phase S, présentent un phénotype correspondant à un début de mitose. Ainsi, Chk1 apparaît comme ayant 3 rôles majeurs au cours du cycle cellulaire : le contrôle du bon déroulement de la réplication et de la réponse aux dommages de l'ADN, le

contrôle de l'intégrité de l'ADN durant la phase G2 et le contrôle de l'entrée en mitose le cas échéant (Lam et al., 2004).

Ces résultats ont été confirmés dans la lignée cellulaire de poulet DT40, dans laquelle Chk1 est essentielle pour le maintien du point de contrôle de la réplication et du point de contrôle G2/M (Zachos et al., 2003b).

B. Régulation de l'activité de Chk1

1. Régulation de Chk1 par phosphorylation

Le niveau d'activation basal de Chk1 au cours d'un cycle cellulaire non perturbé est faible ; il augmente considérablement lors de l'apparition de dommages de l'ADN, grâce à la phosphorylation de Chk1 par ATR au niveau des résidus sérine 317/345 (Capasso et al., 2002; Katsuragi and Sagata, 2004; Zhao and Piwnica-Worms, 2001).

1.1 Phosphorylation de Chk1 sur les résidus sérine 317/345 par ATR

a. Mise en évidence de la phosphorylation de Chk1 par ATR

En 1996, les travaux de Walworth et Bernards montrent pour la première fois que l'induction de dommages de l'ADN entraîne une phosphorylation de Chk1 chez *S. pombe* (Walworth and Bernards, 1996). Des observations similaires ont ensuite été décrites chez l'homme et chez le Xénope (Sanchez et al., 1997). De plus, il a été montré que la phosphorylation de Chk1 diminue avec la concentration en caféine (Kumagai et al., 1998). La caféine inhibant l'activité d'ATR et d'ATM mais pas celle de Chk1, Chk1 est alors proposée comme une cible potentielle d'ATR/ATM (Moser et al., 2000). La phosphorylation de Chk1 par ATR sur les résidus sérine 317 et sérine 345 (ou en sérine 344 chez le Xénope) a ensuite été démontrée

expérimentalement (Capasso et al., 2002; Liu et al., 2000; Lopez-Girona et al., 2001; Walker et al., 2009; Zhao and Piwnica-Worms, 2001) La phosphorylation de Chk1 par ATR est conservée entre la levure, le xénope et l'homme (Chen and Sanchez, 2004; Guo et al., 2000; Lopez-Girona et al., 2001). Cependant, le site correspondant à la sérine 317 des mammifères chez la levure (T323) n'est pas nécessaire pour l'activation de Chk1 au niveau du point de contrôle G2-M (Gatei et al., 2003a; Zhao and Piwnica-Worms, 2001). Chk1 peut aussi être phosphorylée dans une moindre mesure par la kinase ATM (Gatei et al., 2003b).

b. Voie de signalisation ATR – Chk1

La cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de Chk1 a depuis été largement étudiée (Elledge, 1996; O'Connell and Cimprich, 2005; O'Connell et al., 2000; Zhou and Elledge, 2000). Suite à une lésion simple brin de l'ADN, les complexes 9-1-1 (Rad9, Rad1, et Hus1) sont chargés sur ces sites de cassures par RFC (Replication Factor C, ou Rad17). Indépendamment, les protéines RPA viennent se fixer aux extrémités simples brins de part et d'autre de la cassure. Elles servent ensuite de plateforme pour la fixation d'ATRIP, qui permet le recrutement d'ATR. TopBP1 est aussi recruté à ce niveau, où il colocalise avec ATR au niveau de foyers des dommages de l'ADN, et favorise la phosphorylation de nombreux substrats (Chk1, Nbs1, Smc1, H2AX...) dont Chk1 (Figure 9) (Nam and Cortez, 2011; Toledo et al., 2011).

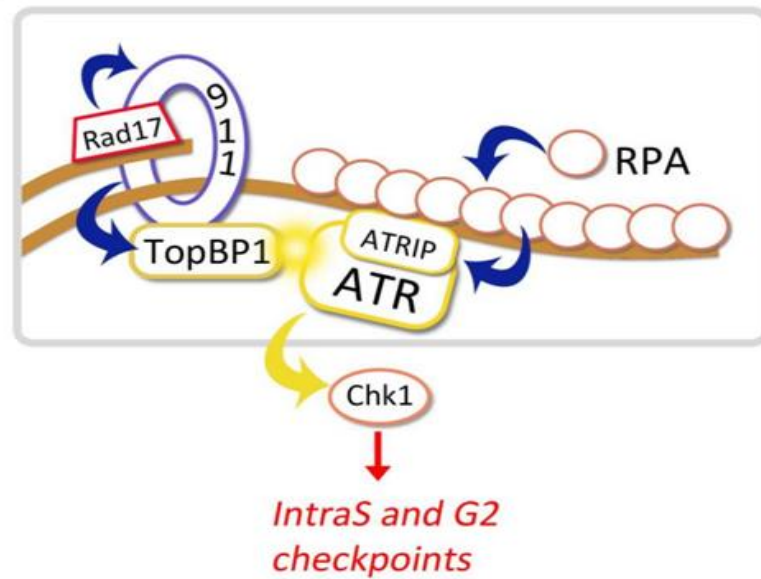


Figure 9: Activation de Chk1 en réponse à des dommages de l'ADN. L'apparition d'ADN simple brin entraîne le recrutement de RPA, qui se fixe ensuite à ATRIP et permet le recrutement du complexe ATR/ATRIP à la chromatine. Dans le même temps, RFC (Rad17) permet le recrutement du complexe 9-1-1, qui recrute TopBP1 et permet son rapprochement d'ATR et favorise son activation, ce qui permet l'activation de Chk1 (Toledo et al., 2011).

Trois médiateurs additionnels interviennent dans la signalisation du point de contrôle de phase S : Timeless, son co-facteur Tipin (Timeless-Interacting Protein), et la Claspine (Niida and Nakanishi, 2006). Il a été montré que ce complexe est nécessaire pour la phosphorylation de Chk1 par ATR en réponse aux UV et au traitement par l'hydroxyurée. Le complexe Timeless/Tipin s'associe avec RPA via Tipin, ce qui permet la stabilisation de la Claspine. (Cimprich and Cortez, 2008; Unsal-Kaçmaz et al., 2007; Yoshizawa-Sugata and Masai, 2007). La Claspine demeure répartie dans tout le noyau pendant et après la résolution des dommages de l'ADN, et elle se lie à Chk1 lors de la mise en place du point de contrôle des dommages de l'ADN, via TopBP1 qui permet l'interaction entre ces 2 partenaires (Liu et al., 2006b). Une fois la Claspine et Chk1 associées, la Claspine va servir de protéine adaptatrice pour faciliter la phosphorylation de Chk1 par ATR (Chini and Chen, 2003, 2004).

De nombreuses autres protéines telles que BRCA1, MCPH1 ou p300/CBP semblent importantes pour l'activation maximale de Chk1 par phosphorylation, durant la réponse aux dommages de l'ADN (Draga et al., 2015; Sato et al., 2012; Yarden et al., 2002).

c. Phosphorylation de Chk1 par ATR et activation en réponse à des dommages de l'ADN

La phosphorylation de Chk1 par ATR est indispensable pour la mise en place des points de contrôle en réponse aux dommages de l'ADN. En effet, lorsque Chk1 est mutée de manière à remplacer la sérine 345 ou la sérine 317 en alanine, et devient de ce fait non phosphorylable, les cellules présentent des défauts au niveau du point de contrôle G2/M, ainsi qu'une sensibilité accrue au stress réplicatif (Capasso et al., 2002).

De manière intéressante, ces 2 sites de phosphorylation par ATR ne jouent pas le même rôle dans l'activation de Chk1 (Niida et al., 2007; Walker et al., 2009; Wilsker et al., 2008). La phosphorylation en sérine 317 favorise la phosphorylation en sérine 345 par ATR et l'initiation de l'activation de Chk1, alors que la phosphorylation en sérine 345 permet la mise en place du point de contrôle. Autrement dit, la mutation sur la sérine 317 n'entraîne qu'une diminution de l'activité catalytique de Chk1, contrairement à celle sur la sérine 345 qui provoque une perte totale de son activité catalytique et une diminution de la viabilité cellulaire (Walker et al., 2009; Wilsker et al., 2008).

d. Phosphorylation par ATR et localisation de Chk1

Un autre aspect sur lequel jouent les phosphorylations sur les résidus 317 et 345 est la localisation subcellulaire de Chk1. En effet, une fois activée, Chk1 va être dissociée de la chromatine et va s'accumuler au niveau du nucléole où elle va phosphoryler ses substrats au niveau de la chromatine soluble. Chk1 va aussi être exportée hors du noyau pour interagir avec ses cibles au niveau cytoplasmique (Smits et al., 2006). La mutation sur la sérine 345 entraîne un défaut d'export de Chk1 dans le cytoplasme, même si la protéine mutée garde la capacité d'être dissociée de la chromatine suite à un stress génotoxique. A l'inverse, la mutation sur la sérine 317 bloque la dissociation chromatinienne de Chk1, mais n'empêche pas le Chk1 nucléaire soluble d'être exporté hors du noyau et de se retrouver dans le cytoplasme (Niida et al., 2007).

Bien que l'activation de Chk1 soit initiée par la phosphorylation d'ATR, le marqueur le plus fiable de l'activité catalytique de Chk1 en réponse à des dommages de l'ADN est son autophosphorylation sur le résidu sérine 296 (Goto et al., 2015).

1.2. Autophosphorylation de Chk1 sur le résidu sérine 296

Cette autophosphorylation est dépendante des phosphorylations en sérine 317 et sérine 345 par ATR, et elle est régulée par un mécanisme intra-moléculaire (Okita et al., 2012). Une fois phosphorylée sur le résidu sérine 296, Chk1 s'associe à des protéines 14-3-3 qui vont faciliter ses fonctions en servant de plateforme de recrutement pour ses substrats. L'association de Chk1 et de la protéine 14-3-3 est notamment indispensable pour la phosphorylation de CDC25A sur la sérine 76 (Goto et al., 2015; Kasahara et al., 2010). La phosphorylation de Chk1 sur la sérine 296 semble aussi entraîner une déphosphorylation des résidus sérine 317 et sérine 345, ainsi qu'une diffusion de Chk1 dans tout le nucléoplasme (Kasahara et al., 2010).

Les phosphorylations successives de Chk1 sur les résidus sérine 317/345, puis sur la sérine 296 permettent son activation dans la voie canonique de réponse aux dommages de l'ADN. Cependant, Chk1 possède d'autres sites de phosphorylation qui entraînent aussi une modulation de son activité dans d'autres contextes cellulaires.

1.3. Phosphorylation de Chk1 sur les résidus sérine 286 et sérine 301 par les CDK

Chk1 possède aussi des sites de phosphorylation par la kinase CDK1, sur les résidus sérine 286 et sérine 301, au cours de la mitose, en particulier durant la transition métaphase – anaphase. Ces phosphorylations permettraient la progression en mitose (Shiromizu et al., 2006). Ces résidus sérine 286 et sérine 301 sont aussi phosphorylés par CDK2 en réponse à des dommages de l'ADN, et permettent de réguler l'activation du point de contrôle associé (Ikegami et al., 2008).

1.4. Phosphorylation sur la sérine 280

Enfin, Chk1 possède un site de phosphorylation sur le résidu sérine 280, dont les fonctions restent controversées.

En effet, les travaux de Puc et al décrivent un rôle de la phosphorylation de Chk1 sur le résidu sérine 280 dans un modèle de cellules déficientes pour la phosphatase Pten (Phosphatase and TENsin homolog) dans lesquelles la kinase Akt est massivement suractivée. Puc et al. montrent que ces cellules présentent un défaut d'activation du point de contrôle G2/M en réponse à des radiations ionisantes. Cette altération est due à une phosphorylation de Chk1 sur le résidu sérine 280 par la kinase Akt, ce qui entraîne la fixation covalente d'une molécule d'ubiquitine sur Chk1 et sa rétention dans le cytoplasme, et de ce fait l'inhibition de ses fonctions (Puc et al., 2005).

Par ailleurs, les travaux de Li et al. décrivent une phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280 par les protéines Ras/mitogen-activated kinase/90kDa (p90 RSK), en réponse à une stimulation sérique. Dans ce contexte, la phosphorylation de Chk1 par p90RSK entraîne un recrutement de Chk1 au niveau du noyau. La forme mutante non phosphorylable de Chk1 (S280A) ne subit pas ce changement de localisation, alors qu'il est exacerbé pour un mutant de Chk1 phosphomimétique (S280 E). Ces résultats montrent que p90 RSK facilite l'accumulation nucléaire de Chk1 via la phosphorylation sur la sérine 280, et que cette voie de signalisation est importante pour la localisation de Chk1 durant la prolifération cellulaire (Li et al., 2012a). De plus, cette phosphorylation par p90 RSK renforce les fonctions de point de contrôle G2/M de Chk1 en réponse aux UV, ou lors de traitement de cellules de mélanomes par des agents chimiothérapeutiques (Li et al., 2012a; Ray-David et al., 2013).

Enfin, il a récemment été montré dans mon équipe d'accueil que les kinases Pim phosphorylent Chk1 sur le résidu sérine S280 dans des lignées leucémiques exprimant le récepteur FLT3 muté (FLT3-ITD). FLT3 - ITD est un récepteur tyrosine kinase muté impliqué dans la résistance à la mort cellulaire en réponse à des traitements chimio-thérapeutiques. Néanmoins, dans ces modèles cellulaires leucémiques, la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280 n'a pas d'impact sur la localisation subcellulaire de la kinase mais exacerbe ses

fonctions de mise en place du point de contrôle G2/M en réponse aux dommages à l'ADN (Yuan et al., 2014a).

2. Modèle d'activation de Chk1 par phosphorylation

La conformation de Chk1 conditionne l'accessibilité de ces sites de phosphorylation et d'autophosphorylation. En absence de dommages de l'ADN, Chk1 adopte une conformation dite "fermée" grâce à une interaction intramoléculaire entre les parties C-terminale et N-terminale de la protéine. La partie C-terminale masque alors le domaine kinase de Chk1. Cette conformation permet de stabiliser la protéine, mais aussi de bloquer l'accessibilité au site catalytique de ses substrats (Katsuragi and Sagata, 2004). Le fait que Chk1 soit en conformation fermée lorsqu'elle est inactive permet de prévenir la mise en place inappropriée du point de contrôle G2/M, ce qui aurait pour conséquence de bloquer le cycle cellulaire, et donc la prolifération, et d'affecter la viabilité des cellules (Wang et al., 2012b).

A l'inverse, lorsque Chk1 est active, elle adopte alors une conformation dite « ouverte » rendant le site catalytique de la protéine accessible aux substrats, et permettant la mise en place du point de contrôle (Figure 10) (Chen et al., 2000).

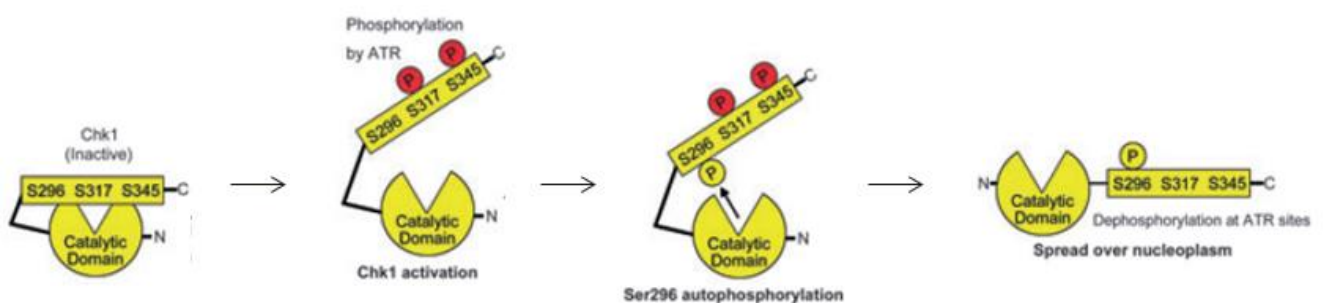


Figure 10: Modèle d'activation de Chk1 par phosphorylation. La phosphorylation de Chk1 par ATR conduit à une ouverture de la protéine et à son autophosphorylation (Goto et al., 2012).

La conformation de la partie distale du domaine N-terminal de Chk1 joue un rôle primordial dans l'activation de Chk1. En effet, la phosphorylation sur la sérine 317 est nécessaire mais pas suffisante pour induire la phosphorylation maximale sur la sérine 345, car la partie N-terminale de la kinase limite la phosphorylation sur ce résidu par ATR. En réponse à des

dommages de l'ADN, un changement de conformation de la partie N-terminale liée à la phosphorylation de la sérine 317 par ATR permet d'ouvrir Chk1, ce qui facilite sa phosphorylation en sérine 345 (Wang et al., 2012b).

La partie C-terminale de Chk1 a aussi un rôle important dans l'activabilité de la kinase. En effet, des formes mutées de Chk1 ne contenant pas une portion de la partie C-terminale sont biologiquement inertes (Kosoy and O'Connell, 2008). A contrario, certaines mutations ponctuelles de cette partie du domaine C-terminal rendent la protéine constitutivement active. Il apparaît que cette région possède un domaine KA1 (Kinase Associated 1), qui correspond à un petit repliement protéique retrouvé dans de nombreuses protéines kinases. La mutation de ce domaine KA1 entraîne une activation constitutive de Chk1, ce qui montre l'importance de KA1 dans la répression de l'activité de Chk1 dans des conditions cellulaires non perturbées, en bloquant le domaine catalytique (Gong et al., 2015). De plus, le domaine KA1 permet l'association de Chk1 avec des phosphatases de type PP2C qui interagissent par le biais d'un motif PPI (Protein Phosphatase-Interacting) et qui sont aussi responsables de l'inhibition de son activité. En revanche, la phosphorylation de Chk1 sur le résidu 345 crée un site de fixation pour la protéine 14-3-3, fixation qui provoque la dissociation de l'interaction entre KA1 et le domaine kinase de Chk1, et permet son activité catalytique (Figure 11) (Gong et al., 2015).

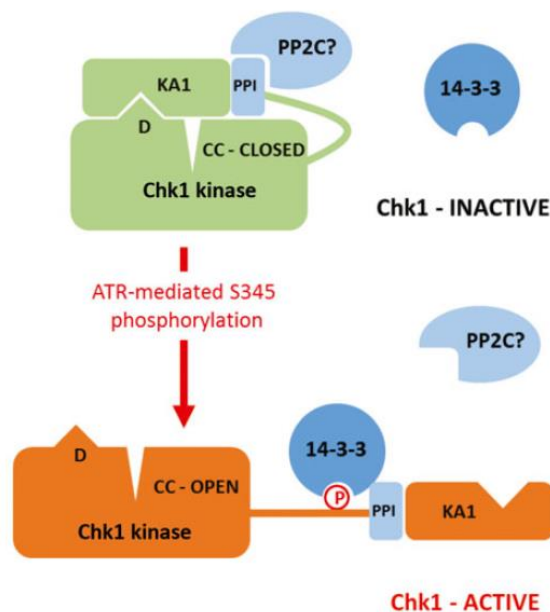


Figure 11: Modèle moléculaire de régulation de Chk1 (Smits and Gillespie, 2015).

Chk1 possède aussi un résidu leucine 449 très conservé, qui semble important pour l'interaction intramoléculaire de la protéine qui la maintient en conformation fermée. En effet, la mutation de ce résidu en arginine, ou la phosphorylation de Chk1 par ATR, perturbent cette liaison, entraînant l'ouverture de la protéine (Han et al., 2016).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le domaine C-terminal est à la fois un régulateur positif et négatif de Chk1 (Chen et al., 2000; Katsuragi and Sagata, 2004; Kosoy and O'Connell, 2008).

3. Activation par clivage

L'activité de Chk1 peut être augmentée par son clivage par les caspases 3 ou les caspases 7, dans un contexte de mort cellulaire programmée, au niveau des résidus Asp-299 et Asp-351. Ces clivages entraînent la perte de la partie N-terminale de Chk1, ce qui provoque activation constitutive (Matsuura et al., 2008; Okita et al., 2013).

C. Régulation négative de l'activité de Chk1

L'activité de Chk1 doit être finement contrôlée afin que la voie de détection et de réparation des dommages ne soit pas constitutivement active. Par ailleurs, une fois la réparation de l'ADN effectuée, l'activation du point de contrôle doit être levée, afin de permettre à la cellule de reprendre sa progression dans le cycle cellulaire normalement. Ainsi, des mécanismes existent qui permettent la régulation de l'activité de Chk1 (Calonge and O'Connell, 2008), via sa répression par un variant d'épissage, sa déphosphorylation, sa dégradation, l'inactivation de son cofacteur la Claspin ou sa dégradation.

1. Répression par un variant d'épissage

La régulation de l'activité de Chk1 passe aussi par un variant d'épissage de Chk1 qui est tronqué au niveau du domaine de fixation à l'ATP du côté N-terminal, nommé Chk1-S. Ce répresseur endogène de Chk1 est présent dans les cellules et en condition non stressée, il va interagir avec Chk1 pleine taille, ce qui va réprimer l'activité de Chk1 et permettre la transition G2/M. En cas de dommages de l'ADN, la phosphorylation de Chk1 va dissocier l'interaction entre Chk1 et Chk1-S, ce qui va permettre la libération de Chk1 actif. Ainsi, ce variant d'épissage permet une régulation de Chk1 très fine et réversible très rapidement (Pabla et al., 2012).

2. Mécanismes de déphosphorylation de Chk1

De nombreuses phosphatases sont impliquées dans l'inactivation des voies de réponse aux dommages de l'ADN (Harris and Bunz, 2010). Parmi elles, la phosphatase Wip1 (aussi appelée PPM-1) joue un rôle majeur en ce sens, car elle est capable de déphosphoryler de nombreuses protéines majeures, telles que ATR, Chk1, Chk2, p53, MDM2 ou encore γ H2AX (Macurek et al., 2013).

Par ailleurs, la phosphorylation de Chk1 en sérine 345 par ATR est contrebalancée par la déphosphorylation de ce site par la phosphatase PP2A. (Leung-Pineda et al., 2006) et la protéine phosphatase PP1 (den Elzen and O'Connell, 2004; den Elzen et al., 2004). De plus, cette déphosphorylation est conditionnée par l'activité de Chk1, de manière à maintenir un faible niveau d'activité de Chk1 en condition basale, tout en permettant une réponse rapide en cas de stress génotoxique (Leung-Pineda et al., 2006).

3. Mécanismes d'inactivation de la Claspine (par déphosphorylation ou dégradation)

Chez le xénope, durant l'activation des voies de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN, la Claspine est phosphorylée sur la thréonine 906. Cette phosphorylation crée un site

d'interaction avec Plx1, l'homologue de Plk1 chez le xénope. Cette interaction permet la phosphorylation de la Claspine par Plx1 sur le résidu sérine 934, ce qui entraîne la dissociation chromatinienne de la Claspine, et de fait, Chk1 n'est plus activé par phosphorylation. Ces résultats montrent un rôle important de Plx1 dans la terminaison du point de contrôle des dommages de l'ADN, ainsi que dans le cas de réparation incomplète des lésions (Yoo et al., 2004).

La Claspine est stabilisée durant la phase S, et est dégradée lors de l'entrée de la cellule en mitose. Cette dégradation est due à une interaction avec le complexe SCFbetaTrCP, qui conduit à son ubiquitination et sa dégradation. La dégradation de la Claspine délimite la période d'activation de Chk1 par ATR (Bennett and Clarke, 2006; Mailand et al., 2006; Peschiaroli et al., 2006). L'association de la Claspine avec le complexe SCFbetaTrCP est permise par Plk1, qui contrôle la dégradation de la Claspine. Plk1 est ainsi un acteur majeur de la terminaison du point de contrôle (Freire et al., 2006; Mamely et al., 2006).

D. Régulation spatiale de Chk1

Lorsque Chk1 est inactive, sa localisation varie selon le type cellulaire, elle peut être pancellulaire, seulement nucléaire, ou majoritairement cytoplasmique comme cela est constaté dans les cellules leucémiques. Dans tous les cas, elle est systématiquement retrouvée au niveau de la chromatine à hauteur de 20% dans les cellules non perturbées (González Besteiro and Gottifredi, 2015). Chk1 possède deux motifs très conservés au niveau C-terminal (CM1 et CM2) qui fonctionnent comme un signal d'export nucléaire (NES) et un signal de localisation nucléaire (NLS), respectivement (Wang et al., 2012c).

Après activation par ATR, Chk1 se dissocie de la chromatine et est retrouvée dans le noyau, au niveau du nucléoplasme soluble pour ensuite être exportée dans le cytoplasme grâce à la protéine exportin 1 ou CRM1 (Chromosomal Maintenance 1) (Bekker-Jensen et al., 2006; Fukuda et al., 1997; Smits et al., 2006). Lorsque Chk1 est phosphorylée sur la sérine 345, elle interagit avec la protéine 14-3-3, qui module sa localisation. En particulier, cette interaction entraîne l'accumulation de Chk1 au niveau du noyau, en bloquant le signal d'export nucléaire

dépendant de CRM1 (Dunaway et al., 2005; Jiang et al., 2003). Cependant, de façon générale, les mécanismes qui régulent la mobilisation de Chk1 dans la cellule demeurent peu connus.

Par ailleurs, Chk1 est phosphorylée sur les résidus sérine 317 et sérine 345, et a une localisation bien précise durant la mitose en condition non perturbée. En effet, dès la prophase, la kinase est présente et phosphorylée au niveau des centrosomes. Puis, durant la prométaphase et la métaphase, Chk1 et sa fraction phosphorylée sur le résidu sérine 317 se retrouvent au niveau des bras des chromosomes, formant une structure appelée l'étage péri-chromosomal, couche de protéines nucléaires et nucléolaires formée autour des chromosomes après la disparition de l'enveloppe nucléaire, dont les fonctions sont peu connues. En anaphase, Chk1 phosphorylée sur les résidus sérine 317 et 345 se retrouve au niveau du fuseau de division (Peddibhotla et al., 2009; Wilsker et al., 2008). Lors de la cytokinèse, Chk1 est localisée au niveau du midbody (Peddibhotla et al., 2009).

Ces résultats mettent en évidence la complexité des mécanismes qui adaptent la localisation cellulaire de Chk1 lors de la mise en place des points de contrôle ou lors de la progression normale dans le cycle cellulaire, assurant ainsi la viabilité cellulaire.

E. Régulation du niveau d'expression Chk1

Kaneko et al. se sont intéressés au niveau d'expression de Chk1 au cours du cycle cellulaire dans des fibroblastes humains. Leur travail a permis d'établir que Chk1 est peu exprimée au cours de la phase G1, puis que son expression augmente jusqu'à être fortement exprimée au cours des phases S, G2 et M du cycle cellulaire (Kaneko et al., 1999). Ainsi, le niveau d'expression de Chk1 est très finement régulé au cours du cycle cellulaire. Ces mécanismes de régulation ont lieu au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel.

1. Régulation transcriptionnelle de Chk1

Le facteur de transcription E4F1 est connu pour être un régulateur des promoteurs viraux E4 et E1A, mais il contrôle aussi directement l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et dans la régulation du cycle cellulaire. En particulier, l'inactivation de E4F1 dans des fibroblastes embryonnaires murins résulte en des défauts au niveau des points de contrôle des dommages de l'ADN avec une diminution de l'expression transcriptionnelle de Chk1 (Rodier et al., 2015).

Dans le cancer de la prostate, 2 membres de la famille des facteurs de transcription ETS, ERG et ETV1, inhibent directement l'expression de Chk1, qui est une de leurs cibles majeures (Lunardi et al., 2015).

D'autre part, la protéine p53 est un régulateur transcriptionnel négatif direct de Chk1. Par ailleurs, la stabilisation de p53 conduit à la répression de la transcription génique de *CHEK1* de manière indirecte, par un mécanisme peu connu impliquant la protéine p21 et une de ses cibles, la protéine Rb (Bargiela-Iparraguirre et al., 2016; Gottifredi et al., 2001).

Il a aussi été montré que dans les leucémies aiguës lymphoïdes, le facteur de transcription oncogénique TLK1 (T cell leukemia homeobox protein-1) régule négativement et directement l'expression génique de Chk1 et d'autres gènes clés dans le point de contrôle mitotique (De Keersmaecker et al., 2010).

Dans les cancers pour lesquels le facteur de transcription c-Myc est surexprimé (les lymphomes de type B, les neuroblastomes, certains cancers de sein et du poumon), il favorise de manière indirecte l'expression génique et protéique de Chk1 (Hoglund et al., 2011; Wang et al., 2013).

Dans les lymphocytes, E2F2 est responsable de la répression transcriptionnelle de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, dont Chk1 (Laresgoiti et al., 2013).

Dans les ostéoblastes, le facteur de transcription Fos, appartenant à la famille AP-1, stimule la transcription de Chk1 en réponse à un état de stress répliatif (Schulze et al., 2014).

2. Régulation de l'ARNm de Chk1

Elle est principalement due à l'interférence entre l'ARNm de Chk1 et des microARN (miRNA), qui conduisent à la dégradation de l'ARNm de Chk1.

Ainsi, dans les cancers du col de l'utérus, il a été montré que la diminution du miR-424 entraîne une augmentation de l'expression protéique de Chk1, miR-424 apparaissant donc comme un régulateur post-transcriptionnel négatif de Chk1 (Xu et al., 2013).

Lors du développement post-natal des cardiomyocytes, il a été constaté une surexpression des microARN de la famille des miR-15, associée à une binucléation des cellules musculaires et une augmentation de l'expression protéique d'un grand nombre d'acteurs du cycle cellulaire, dont Chk1 (Porrello et al., 2011).

Par ailleurs, l'activation du facteur de transcription p53 favorise l'expression de miR-16 et miR-26a, 2 microARN dont les cibles majeures et directes sont Chk1 et Wee1. Ainsi, l'activation de p53 conduit à la diminution de l'expression protéique de Chk1 et Wee1 ce qui permet au mécanisme de point de contrôle médié par p53 de prendre le relais de la signalisation médiée par Chk1 (Lezina et al., 2013).

3. Régulation de la stabilité de Chk1 au niveau protéique

La dégradation de Chk1 a lieu à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, et fait suite à sa polyubiquitinylation de la lysine 436 par des complexes SCF (Skp-Cullin-Fbox), complexes E3 ligases contenant des protéines adaptatrices telles que la Cullin1 (Cul1) dans le noyau et la Cullin4A (CulA4) dans le cytoplasme (Zhang et al., 2005, 2009b).

La phosphorylation de Chk1 en serine 345 entraîne sa dégradation. Ainsi, lorsqu'elle est phosphorylée par ATR, la demi-vie de Chk1 est diminuée à 4h contre 5h lorsqu'elle n'est pas activée, ce qui permet la terminaison du point de contrôle et la reprise de la progression du cycle (Merry et al., 2010; Zhang et al., 2005, 2009b). Le délai entre l'activation de Chk1 par phosphorylation et sa dégradation est déterminé par le fait que la protéine n'est une cible pour les ubiquitines ligases que lorsqu'elle est dissociée de la chromatine. De plus, dans le cancer du sein, il a été montré que l'activation de Chk1 en sérine 345 expose la partie C-terminale de la protéine à la protéine Fbx6, impliquée dans la reconnaissance spécifique de

Chk1 au sein du complexe SCF. La reconnaissance de Chk1 par Fbx6 entraîne sa polyubiquitination et sa dégradation cytoplasmique (Zhang et al., 2009b).

Par ailleurs, le renouvellement de Chk1 durant la phase S est régulé par la formation des complexes entre Chk1 et Cul1 nucléaire et Chk1 et Cul4A cytoplasmique (Zhang et al., 2006b). De plus, lors de dommages de l'ADN, Chk1 interagit avec la protéine DNA-Binding Protein 1 (DDB1). DDB1 appartient à un complexe E3 ligase, et son interaction avec Chk1 favorise l'ubiquitination de Chk1 (Leung-Pineda et al., 2009). A l'inverse, la protéine Metnase, qui est une protéine histone méthyltransferase aussi impliquée dans la réparation de l'ADN, entraîne une diminution de l'interaction de Chk1 et DDB1 en cas de cassures double brins et de blocages de fourches. Ainsi, Metnase stabilise Chk1 dans un contexte d'activation de point de contrôle G2/M (Williamson et al., 2014).

La stabilité de Chk1 est aussi régulée par la protéine ubiquitine hydrolase Ubiquitin Specific Peptidase 7 (USP7). USP7 est un régulateur positif de nombreuses protéines impliquées dans les voies de détection et de réparation des dommages de l'ADN. En particulier, elle est capable de déubiquityniler Chk1 directement, par clivage de la chaîne de polyubiquitine et elle permet ainsi de stabiliser la protéine Chk1 (Alonso-de Vega et al., 2014). Dans le cancer du sein, les cellules radiorésistantes présentent un niveau d'activation élevé d'ATM, qui entraîne la stabilisation du facteur de transcription ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1). ZEB1 interagit avec USP7 et le stabilise, ce qui conduit à la stabilisation de Chk1 par déubiquitynilation (Zhang et al., 2014).

Le facteur de transcription E4F1, qui est aussi une ubiquitine E3 ligase atypique, du moins pour p53 (Le Cam et al., 2006), régule aussi la stabilité de Chk1 au niveau protéique. En effet, les cellules déficientes en E4F1 accumulent des dommages de l'ADN, et présentent des défauts dans la progression en phase S et en mitose. Ce phénotype est réversé par l'expression de Chk1 ectopique. Ceci est dû au fait qu'E4F1 interagit avec Chk1 et la protège de la dégradation (Grote et al., 2015).

Enfin, un autre mode de régulation de Chk1 a été décrit récemment et passerait par un processus d'autophagie particulier, médié par des protéines chaperonnes comme hsp70. Ainsi, l'activation de Chk1 par ATR conduit à sa dégradation par les lysosomes par un processus de recyclage des composants cellulaires, ce qui permet de limiter l'accumulation de Chk1 actif,

et favorise la terminaison du point de contrôle et une reprise de la progression dans le cycle cellulaire (Park et al., 2015).

F. Rôles de Chk1 dans la régulation du cycle cellulaire

1. Le point de contrôle à la transition G1/S

Lorsqu'une cellule subit un dommage au niveau de l'ADN en phase G1, les mécanismes de contrôle passent par les voies ATM/Chk2 et ATR/Chk1. Ces voies conduisent à la phosphorylation de p53 sur les résidus sérine 15 et sérine 20 soit directement par ATM et ATR, soit par Chk1 ou Chk2. Ces phosphorylations jouent sur la stabilité de p53 car elles empêchent sa dégradation par l'ubiquitine ligase MDM2, qui se lie à p53 lorsque le point de contrôle est inactif et qui assure son renouvellement rapide. Dans le même temps, Mdm2 est aussi ciblée par ATM, ATR, Chk1 et Chk2 ce qui conduit à son inactivation (Chehab et al., 2000). P53 peut aussi être phosphorylée par Chk1 et Chk2 sur la sérine 15, la thréonine 18, la sérine 20, et la sérine 37 ce qui conduit à son activation (Ou et al., 2005; Shieh et al., 2000). Les cibles transcriptionnelles de p53 sont des protéines qui vont permettre l'arrêt du cycle, telles que la protéine p21, qui inhibe les complexes CDK2-cycline E, causant un arrêt en phase G1. Ceci a pour conséquence non seulement d'empêcher l'initiation de la réplication de l'ADN mais aussi de conserver la voie de signalisation Rb/E2F active pour limiter la croissance cellulaire et ainsi contribuer à maintenir les cellules en phase G1. Ainsi, le point de contrôle G1 est régi par les protéines p53 et Rb, protéines mutées dans plus de 50% des cancers (Bartek et al., 1997; Sherr and McCormick, 2002).

A la fin de la phase G1, une autre voie de signalisation peut médier un arrêt du cycle. En effet, dans des conditions où la cellule ne subit pas de stress, Chk1 phosphoryle modérément CDC25A sur les résidus sérine 76 et sérine 124, ce qui conduit à sa dégradation et au maintien de son niveau d'expression approprié (Sørensen et al., 2003 ; Zhao et al., 2002). En cas de détection de dommage de l'ADN, l'activité de Chk1 et Chk2 augmente, donc la proportion de CDC25A phosphorylée est plus importante et son niveau d'expression diminue d'autant,

entraînant l'inhibition des complexes CDK2-cycline E. Ce mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire est indépendant de celui médié par p53, et il est plus rapide à mettre en place car il ne nécessite pas la transcription de nouvelles protéines. Il intervient donc dans un premier temps, avant que le point de contrôle démarré par p53 ne prenne le relais au bout de quelques heures (Donzelli and Draetta, 2003; Falck et al., 2001; Kastan and Bartek, 2004).

2. Rôles de Chk1 dans la régulation de la réplication : le point de contrôle intra-S

En aval d'ATR, Chk1 est le principal effecteur du point de contrôle de phase S, en particulier lors de stress répliatif. (Bartek et al., 2004). En effet, les cellules déficientes en Chk1 subissent une entrée en mitose prématurée, avec une phase S non terminée (Lopes et al., 2001). Ainsi, l'activation de la voie ATR/ Chk1 est garante de la stabilité génétique. En effet, son activation va permettre la stabilisation, la réparation, et le redémarrage des fourches bloquées (Nam and Cortez, 2011; Segurado and Tercero, 2009). Par ailleurs, il contrôle la bonne progression de la réplication de l'ADN en conditions non stressées (González Besteiro and Gottifredi, 2015).

2.1. Lors de dommages de l'ADN

a. Arrêt de la réplication

Le point de contrôle de phase S, via Chk1, cause l'inhibition transitoire de l'activation de nouvelles origines de réplication (Heffernan et al., 2002). En effet, Chk1 est capable de phosphoryler CDC25A sur les résidus sérine 124 et thréonine 507, ce qui conduit à sa séquestration par les protéines 14-3-3, ainsi que sur la sérine 76, ce qui conduit à son ubiquitination et sa dégradation (Hassepass et al., 2003; Mailand et al., 2000; Sørensen et al., 2003). La diminution de CDC25A entraîne une diminution de l'activation de CDK1 et CDK2, ce qui bloque le chargement de CDC45 sur la chromatine (Arata et al., 2000; González Besteiro

and Gottifredi, 2015; Zou and Stillman, 1998). Chk1 est aussi capable de phosphoryler CDC45 (Liu et al., 2006a). Ainsi, Chk1 empêche l'activation de nouvelles origines de réplication lors d'un état de stress répliatif ou en cas de dommages de l'ADN (Lopes et al., 2001).

b. Stabilisation des fourches bloquées

Chk1 permet le maintien de la structure des fourches de réplication bloquées et évite leur effondrement. En effet, lorsque la réplication est inhibée dans des conditions où Chk1 est inhibé ou invalidé, la proportion de fourches bloquées capables de redémarrer est faible (Feijoo et al., 2001; Paulsen and Cimprich, 2007; Zachos et al., 2003b). L'inactivation irréversible de ces fourches de réplication bloquées semble être la conséquence de l'action de nucléases telles que Mus81 qui induisent des changements de structures de l'ADN. Chk1 protège les fourches bloquées de l'activité de telles nucléases (Forment et al., 2011). De plus, la stabilisation des fourches bloquées par Chk1 favorise la bonne reprise de la progression du cycle cellulaire (Zachos et al., 2005).

c. Mise en place d'une réplication trans-lésionnelle

Chk1 permet la progression de la réplication en cas de stress répliatif, indépendamment de son activité catalytique, et indépendamment de son interaction avec ATR ou la Claspin. En effet, ce rôle de Chk1 passe par son motif d'interaction avec le facteur de processivité PCNA, qui est requis pour sa dissociation de la chromatine après détection de lésion de l'ADN (Scorah et al., 2008; Speroni et al., 2012). Cette dissociation de Chk1 de la chromatine permet le recrutement de l'ADN polymérase spécialisée, Pol η . Pol η est responsable de la synthèse de l'ADN translésionnelle en réponse à des lésions dues à des rayonnements ultra violets notamment (Speroni et al., 2012; Yamada et al., 2013).

d. Réparation des dommages de l'ADN

Enfin, en cas de lésions, Chk1 initie la mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN en activant par phosphorylation ces substrats tels que Metnase (Hromas et al., 2012) ou FANCE (Wang et al., 2007). La phosphorylation de FANCE par Chk1 est nécessaire pour la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN médiée par la voie de signalisation BRCA/FA (Fanconi Anemia) (Chen et al., 2009). De plus, Chk1 est nécessaire à la réparation par recombinaison homologue. Dans ce cas, le recrutement de Rad51 au niveau de l'ADN est médié par BRCA2, dans un processus impliquant la phosphorylation de ces 2 protéines par Chk1 (Bahassi et al., 2008; Montano et al., 2013; Sørensen et al., 2005). Enfin, Chk1 cible les kinases DNA-PK, qui forment avec Ku70-Ku80 un complexe important pour la réparation des cassures doubles-brins de l'ADN (Godelock et al., 2003).

Un schéma représentant les principales fonctions de Chk1 au niveau du point de contrôle de la réplication en réponse à des dommages de l'ADN est présenté dans la figure 12.

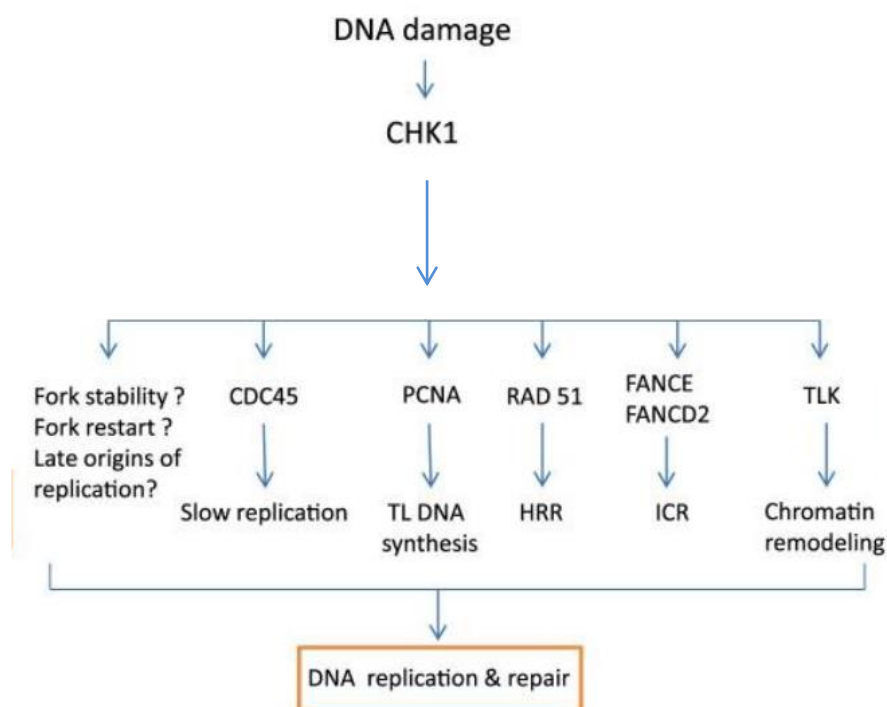


Figure 12: Les réponses cellulaires mises en œuvre par l'activation de Chk1. Chk1 phosphoryle de nombreux substrats pour médier un ralentissement de la réplication, une stabilisation des fourches bloquées, favoriser la stabilisation des fourches bloquées, et activer les mécanismes de réparation (Patil et al., 2013).

2.2. En condition non perturbée

Chk1 en aval d'ATR est aussi nécessaire à la bonne organisation de la réplication indépendamment de tout dommage de l'ADN (Petermann and Caldecott, 2006; Petermann et al., 2006; Shechter et al., 2004). En effet, son inhibition entraîne une augmentation du nombre de fourches actives par dérégulation de CDK2, ce qui engendre un état de stress répliatif, associé à des blocages de fourches (Feijoo et al., 2001; Maya-Mendoza et al., 2007; Syljuåsen et al., 2005). Ces fourches bloquées vont être prises en charge par des complexes d'endonucléases Mus81/Eme1/SLX4, qui vont générer des cassures doubles brins de l'ADN (Forment et al., 2011; Técher et al., 2016). L'activation de ce complexe d'endonucléases se fait par la voie Plk1 – Aurora A, elle-même activée par l'ubiquitine ligase E3 RNF4. Ainsi, l'effondrement des fourches de réplication qui a lieu suite à l'inhibition d'ATR est un processus complexe qui permet la résolution de la lésion liée à la persistance des blocages de fourche (Ragland et al., 2013).

Par ailleurs, l'inhibition de Chk1 conduit à un ralentissement de la vitesse des fourches répliatives (Petermann et al., 2010). De la même manière, ATR et Claspin sont aussi requises pour coordonner la réplication, dans un contexte de réplication normale (Petermann et al., 2008). Une des cibles de Chk1 dans ce contexte est la protéine Treslin. Treslin est une protéine associée à TopBP1, lorsqu'elle est phosphorylée par les CDK. Ce complexe permet l'initiation de la réplication en chargeant CDC45 sur les hélicases répliatives. De façon intéressante, Chk1 est capable de s'associer à Treslin et de la phosphoryler, ce qui empêche la phosphorylation de Treslin par les CDK, et limite donc le nombre d'origines actives (Guo et al., 2015). Chk1, sous l'action d'ATR et de Claspin, régule aussi CDC25A, limitant la vitesse de réplication (Sørensen et al., 2004).

3. Activation du point de contrôle G2/M

Le point de contrôle G2/M empêche les cellules d'entrer en mitose lorsqu'elles subissent des dommages au niveau de l'ADN durant la phase G2, ou lorsqu'elles ont progressé jusqu'à la phase G2 malgré la persistance de lésions non réparées depuis la phase G1 ou la phase S. Ainsi,

une cellule peut être bloquée au point de contrôle G2/M du fait de sa réplication incomplète ou inappropriée.

Chez *S. pombe*, la surexpression de Chk1 seule suffit pour entraîner un arrêt du cycle en G2-M, ce qui suggère que Chk1 est la protéine majeure de ce point de contrôle (Walworth et al., 1993). Des mutants n'exprimant ni Wee1 ni CDC25C sont viables mais sont déficients pour le point de contrôle G2-M en réponse aux dommages de l'ADN, et même consécutivement à une surexpression de Chk1. Ces résultats semblent indiquer que ces 2 protéines sont des cibles de Chk1 au niveau du point de contrôle G2 – M, chez *S. pombe* (Raleigh and O'Connell, 2000).

Ainsi, Chk1 permet l'arrêt du cycle en G2 via la phosphorylation de Wee1, ce qui stabilise cette tyrosine kinase et conduit à la phosphorylation inhibitrice de CDK1 sur le résidu tyrosine 15 (O'Connell et al., 1997; Rhind et al., 1997). Par ailleurs, Chk1 phosphoryle les phosphatases CDC25, ce qui conduit à leur inactivation et concourt également à l'inactivation de CDK1 (Figure 13).

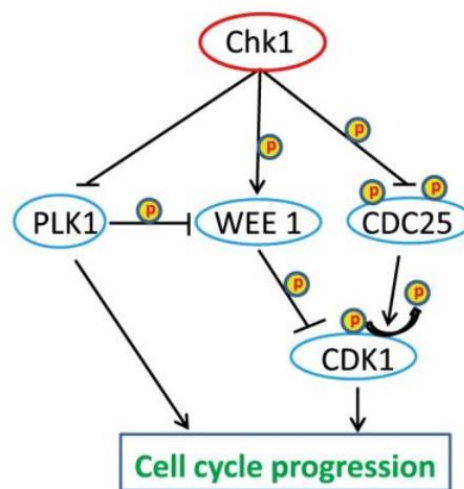


Figure 13: La régulation du point de contrôle G2/M par Chk1. Chk1 régule négativement Plk1, et phosphoryle Wee1, ces 2 actions bloquant l'activation de CDK1. Chk1 conduit par ailleurs à l'inhibition des phosphatases CDC25 (Patil et al., 2013)

CDC25C est phosphorylé en serine 216 par Chk1, ce qui entraîne sa liaison à la protéine 14-3-3. Cette liaison conduit à la séquestration de CDC25C dans le cytoplasme, empêchant ainsi les interactions avec ses substrats (Donzelli and Draetta, 2003; Thanasoula et al., 2012). CDC25A quant à elle est une protéine à la demi-vie très courte, dont la dégradation est catalysée par les ubiquitines ligases APC/C et SCF (Skp1, Cullin, F-box proteins). En réponse aux dommages

de l'ADN, Chk1 et Chk2 phosphorylent CDC25A sur la sérine 76 et sur la sérine 124. Cela entraîne son association à β -TrCP (β -Transducin repeat-containing protein), un composant du complexe ubiquitine ligase SCF. Ainsi, après détection de dommage de l'ADN ou d'anomalies de la réplication, le point de contrôle de phase S conduit à l'inactivation ou la dégradation des CDC25, et donc à l'arrêt du cycle (Hasepass et al., 2003; Mailand et al., 2000). Chk1 régule également CDC25B en le phosphorylant sur les résidus sérine 309 et sérine 361. Ceci limite la progression cellulaire en mitose (Figure 14) (Löffler et al., 2006).

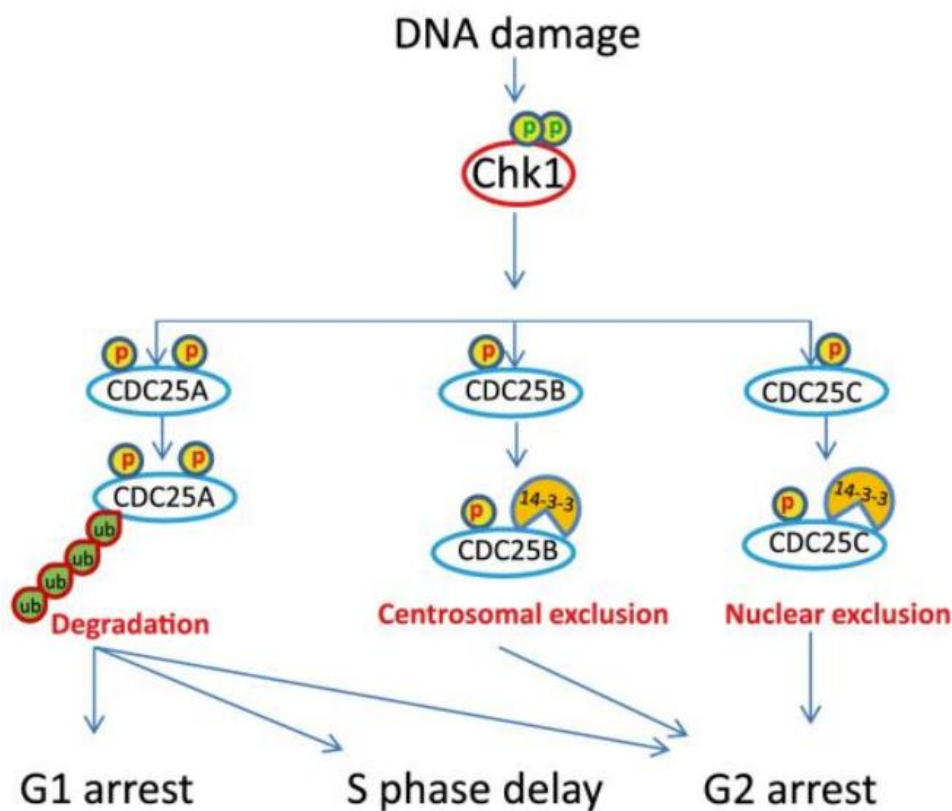


Figure 14: Mécanismes d'inhibition des phosphatases CDC25 par Chk1. La phosphorylation de CDC25A par Chk1 entraîne sa dégradation, et de CDC25B et CDC25C leur séquestration cytoplasmique (Patil et al., 2013).

Par ailleurs, le point de contrôle G2/M est partiellement activé par des programmes de transcription régulés positivement par BRCA1 et p53, et qui entraînent l'expression de protéines bloquant le cycle cellulaire, telles que p21, GADD45a (Growth Arrest and DNA Damage inducible 45 alpha), ou la protéine 14-3-3 (Taylor and Stark, 2001).

Enfin, de façon plus marginale et indépendamment de p53, l'arrêt du cycle peut être médié par la voie p38 – MAPK – MK2 – CDC25B (Manke et al., 2005; Reinhardt et al., 2007). P 38 phosphoryle CDC25B sur les résidus sérine 309 et sérine 361, et CDC25C sur le résidu sérine 216 dans des cellules traitées par des rayonnements ultra-violet, ce qui conduit à leur association avec les protéines 14-3-3 et à leur dégradation (Bulavin et al., 2001; Goldstone et al., 2001).

Toutes ces voies de signalisation visent le complexe CDK1/cycline B, dont l'activité permet la progression en mitose. De plus, les phosphatases CDC25, qui activent CDK1, sont aussi inhibées, de même que d'autres protéines activatrices des complexes CDK1– Cycline B ou de CDC25C, comme par exemple Plk1 ou Plk3.

Une partie de ces mécanismes pourraient avoir lieu au niveau du centrosome. En effet, cet organelle est étudié depuis peu comme prenant une place importante dans la médiation de l'arrêt du cycle consécutif à l'activation du point de contrôle G2/M. Un grand nombre d'acteurs du cycle cellulaire ont d'ailleurs été retrouvés à ce niveau (Wang et al., 2009).

Il a ainsi été montré que des lésions de l'ADN conduisent à une duplication des centrosomes dans des cellules lymphoblastiques humaines, duplication qui n'a plus lieu lorsque les cellules sont traitées par des inhibiteurs d'ATR. Ces résultats et d'autres permettent de montrer que la duplication des centrosomes dépend de l'activité catalytique de Chk1, après phosphorylation par ATR lors de dommage de l'ADN. Le mécanisme par lequel Chk1 agit au niveau du centrosome est peu connu. Il pourrait être indirect, via l'arrêt du cycle imposé par le point de contrôle, ou direct, via l'activation de substrats au centrosome (Bourke et al., 2007). La duplication normale des centrosomes étant contrôlée par CDK2, un des mécanismes d'amplification des centrosomes en réponse à des dommages de l'ADN pourrait passer par la phosphorylation activatrice de CDK2 par Chk1 (Bourke et al., 2010).

D'autre part, Chk1 pourrait être localisé au niveau des centrosomes en interphase, bien que ce résultat démontré par immunofluorescence soit remis en cause du fait de la faible spécificité de l'anticorps utilisé pour l'étude (Matsuyama et al., 2011). L'inhibition de Chk1 entraîne de façon précoce une séparation des centrosomes, et une activation de CDK1 associé au centrosome, ce qui conduit à une entrée en mitose prématurée. Ces résultats suggèrent que Chk1 associé au centrosome protège la population centrosomale de CDK1 d'une

activation inappropriée par CDC25B cytosolique, contribuant à contrôler la bonne progression dans le cycle cellulaire (Krämer et al., 2004b; Löffler et al., 2006). D'autre part, au niveau du centrosome, Chk1 phosphoryle CDC25B sur les résidus sérine 230 et sérine 563, ce qui a pour conséquence de réguler négativement l'entrée en mitose (Schmitt et al., 2006). Cette fonction de Chk1 est rendue possible grâce à la protéine Che-1, qui permet la localisation correcte de Chk1 au centrosome (Sorino et al., 2013).

4. Contrôle de l'entrée en mitose

L'entrée prématurée en mitose entraîne l'activation des caspases 3 et 9 du fait du relargage de cytochrome C dans le cytosol, et consécutivement la cellule meurt par catastrophe mitotique (Nakanishi et al., 2010). C'est la raison pour laquelle il est primordial de contrôler l'entrée et le bon déroulement de la mitose, et Chk1 contribue fortement à ces mécanismes de contrôle de plusieurs façons. Chk1 phosphoryle CDC25B pendant l'interphase, pour limiter son activité au centrosome, et donc bloquer l'entrée de la cellule en mitose tant que la réplication est incomplète (Schmitt et al., 2006). De la même manière, Chk1 phosphoryle Aurora B durant la phase S en cas de stress réplicatif, pour réprimer son activation et prévenir l'entrée en mitose (Zuazua-Villar et al., 2014). De plus, suite à des dommages de l'ADN, Chk1 conduit à l'inhibition de Aurora A durant l'interphase. Comme Aurora A est responsable de l'activation de CDK1 en fin de phase G2 via la phosphorylation de CDC25 B sur la sérine 353 au niveau du centrosome, son inhibition prévient l'entrée en mitose (Cazales et al., 2005; Krystyniak et al., 2006). Enfin, en cas de dommages de l'ADN, l'entrée en mitose est aussi ralentie par la déphosphorylation de Plk1 par la phosphatase PP2A, par un mécanisme impliquant la voie de signalisation ATR – Chk1 (Lee et al., 2010; Smits et al., 2000).

Chk1 régule aussi CDC25B durant la mitose, ce qui permet de coordonner l'enchaînement des événements mitotiques, et notamment une bonne condensation chromatinienne avant la séparation des chromatides (Löffler et al., 2006).

5. Le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique

En prométaphase, l'attachement des microtubules à la partie externe du kinétochore est un élément primordial dans la ségrégation des chromosomes. Un attachement défectueux peut entraîner des erreurs de ségrégation, pouvant générer des cellules filles aneuploïdes. Il existe un point de contrôle permettant à la cellule de contrôler cette étape avant de poursuivre en anaphase. Il s'agit du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique, ou « spindle assembly checkpoint » (SAC) (Musacchio and Salmon, 2007).

En métaphase, les chromatides sœur sont reliées entre elles par un complexe de protéines, les cohésines. Ces cohésines doivent être clivées par la séparase pour permettre la séparation des chromatides en anaphase. Les protéines du SAC régulent l'activité de la séparase. Pour cela, elles vont séquestrer Cdc20, un co-facteur de l'ubiquitine ligase APC/C inhibant ainsi son activité. Or, l'APC/C permet la polyubiquitination de la sécurine et de la cycline B et leur dégradation. La sécurine est un inhibiteur stoechiométrique de la séparase, et sa dégradation permet la libération de la séparase et le clivage des cohésines, ce qui permet la progression en mitose (Jia et al., 2013; Lara-Gonzalez et al., 2012). De plus, la dégradation de la cycline B inactive CDK1, là encore aboutissant à une progression vers la fin de la mitose. Les protéines du SAC responsables de la séquestration de Cdc20 forment un complexe appelé Mitotic Checkpoint Complex (MCC) (van der Waal et al., 2012). Le MCC est composé de MAD2, BUBR1, BUB3 et Cdc20. Les kinétochores servent de plateforme pour catalyser la formation du complexe MCC (Foley and Kapoor, 2013; Varma et al., 2013).

Au niveau du kinétochore, Aurora B a un rôle de senseur de tension qui permet de déceler les attachements défectueux, car la tension au niveau des centromères joue sur l'accessibilité de la chromatine et des microtubules à Aurora B, et donc joue sur son niveau d'activation. Dans le cas où un attachement est défectueux, Aurora B accède à la chromatine et à ses substrats kinétochoriens, ce qui permet son activation, le recrutement et l'activation du SAC (Kelly and Funabiki, 2009). Aurora A est aussi nécessaire au maintien du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (Wysong et al., 2009).

En cas d'entrée en mitose avec une réplication incomplète ou des dommages persistants de l'ADN, l'axe ATR-Chk1 instaure un arrêt du cycle au niveau du point de contrôle du fuseau

mitotique (Krishnan et al., 2004). Pour ce faire, il inhibe la ségrégation des chromosomes en empêchant le clivage des cohésines par la séparase, et parallèlement, il empêche l'élongation du fuseau mitotique (Zhang et al., 2009a).

De plus, Chk1 contrôle l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique, pour prévenir l'apparition de mauvaise ségrégation des chromosomes en anaphase (Peddibhotla et al., 2009). L'inhibition de l'activité de Chk1 entraîne une mauvaise répartition des chromosomes au niveau du plan équatorial, associée à une mauvaise localisation de protéines telles que MAD1 ou BubR1 au niveau des centromères et des kinétochores, et à une diminution de la phosphorylation de Aurora B sur le résidu sérine 331. Ainsi, il apparaît que Chk1 phosphoryle Aurora B durant la prométaphase, et que cette activation d'Aurora B est nécessaire pour coordonner le recrutement de MAD1 et BubR1 au niveau du kinétochore, ce qui empêche l'activation du complexe APC/C (Petsalaki and Zachos, 2013; Petsalaki et al., 2011; Zachos et al., 2007). Chk1 est aussi important pour l'adressage correct d'Aurora B (Peddibhotla et al., 2009; Zachos et al., 2007).

Chk1 permet par ailleurs la transition métaphase – anaphase, en régulant positivement l'expression de Cdc20 et MAD2 et leur localisation subcellulaire au niveau des kinétochores (Yang et al., 2014). En parallèle, Chk1 régule négativement Plk1, ce qui a pour effet d'inactiver le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique, et permet la progression de la mitose (Tang et al., 2006a).

Enfin, Chk1 a un rôle majeur lors de la cytokinèse, car l'inactivation de Chk1 dans des cellules mitotiques de mammifères conduit à l'apparition de figures de regression de cytokinèse, ou à la formation de nombreuses cellules binuclées (Peddibhotla et al., 2009). Un schéma récapitulant les principales fonctions de Chk1 décrites en mitose est présenté en figure 15.

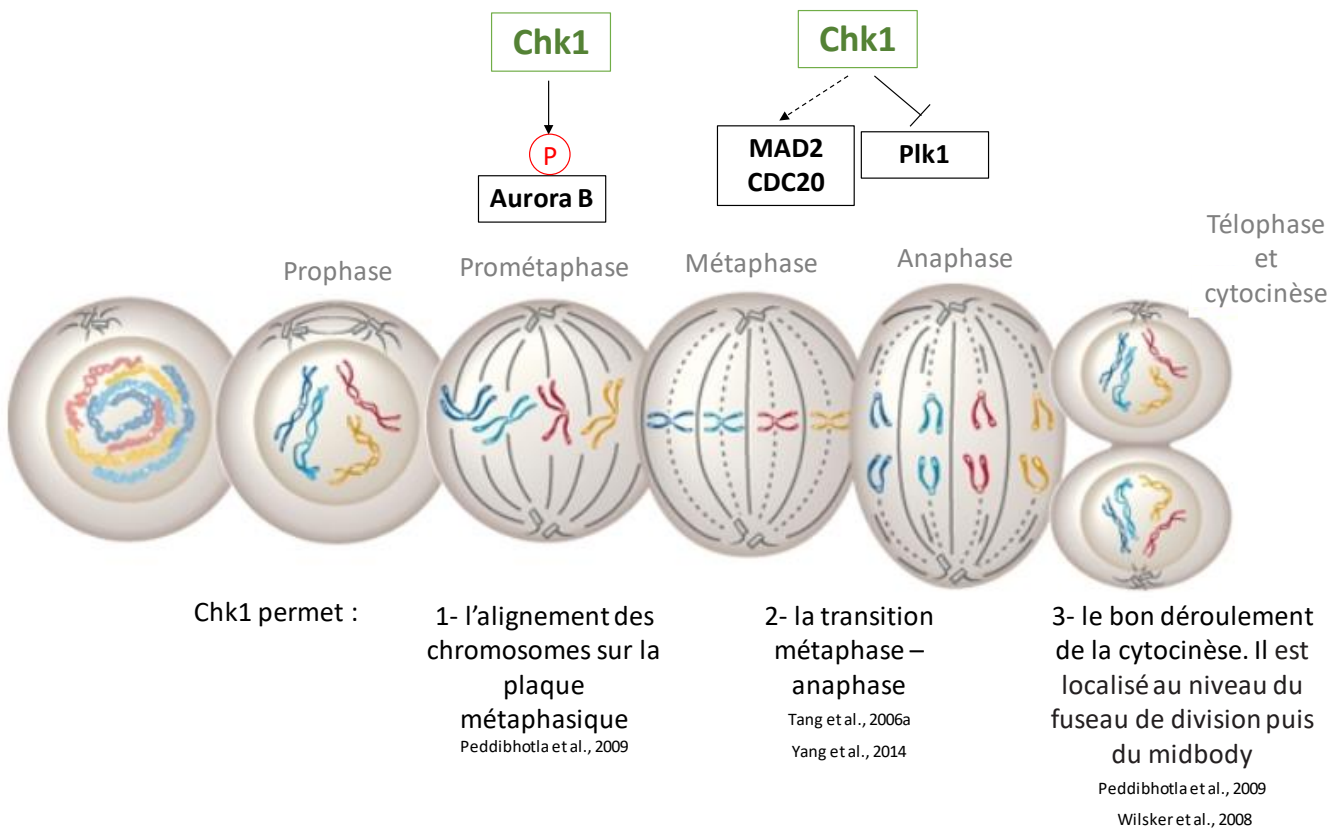


Figure 15 : Schéma récapitulatif des fonctions de Chk1 et ses substrats durant la mitose.

G. Autres rôles de Chk1 au cours d'un cycle cellulaire

1. Rôle transcriptionnel

Lors de dommages de l'ADN, le programme transcriptionnel de nombreux gènes est largement modifié. En particulier, l'activation du point de contrôle de phase S ou du point de contrôle G2/M entraîne une diminution rapide de la phosphorylation de l'histone H3 sur le résidu thréonine 11. Cette phosphorylation a lieu tout au long du cycle cellulaire, et est dépendante de Chk1. En cas de lésion de l'ADN, Chk1 se dissocie de la chromatine, et de façon concomitante, la phosphorylation sur la thréonine 11 de l'histone H3 diminue. De plus, cette diminution de phosphorylation est corrélée à une diminution de la fixation de l'histone acétyltransférase GCN5 au niveau de l'histone H3. Ceci provoque une diminution de son acétylation, de façon simultanée avec une diminution de la transcription de gènes impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire, notamment cycline B1 et CDK1. Chk1 est donc

« une kinase d'histone », responsable d'une certaine répression transcriptionnelle en cas de dommage de l'ADN (Shimada and Nakanishi, 2008; Shimada et al., 2008).

Par ailleurs, Beckerman et al. ont pu montrer que lorsque des cellules sont bloquées en phase S du cycle cellulaire, certains gènes cibles de p53 ne sont pas exprimés, malgré un fort niveau d'expression et d'activation de p53. En particulier, lorsque la réplication est bloquée, ils constatent une diminution de l'expression de l'ARNm de p21, due à une diminution de l'élongation lors de la transcription de ce gène. Leurs résultats montrent que Chk1 a un rôle direct de répression de l'élongation de l'ARNm de p21 dans ce contexte (Beckerman et al., 2009).

D'autre part, il a été montré qu'en réponse à un état de stress réplicatif, le programme transcriptionnel des facteurs de transcription E2F dépendant du cycle cellulaire était maintenu, alors que dans des conditions non stressées, ce programme se limite à la phase G1. En effet, dans des conditions normales, à la transition G1/S, E2F6, un répresseur de la transcription dépendante de E2F, remplace E2F au niveau des promoteurs, afin de réprimer la transcription des gènes de la phase G1 et de permettre la progression dans la phase S. En cas de stress réplicatif, Chk1 phosphoryle E2F6, ce qui conduit à sa dissociation des promoteurs. Ainsi, Chk1 favorise la transcription dépendant de E2F, qui permet à la cellule de faire face à l'état de stress réplicatif (Bertoli et al., 2013). De plus, Chk1 conduirait à la stabilisation de E2F3, dont une des cibles transcriptionnelles, la sous-unité M2 de la ribonucleotide reductase, permet la réparation des dommages de l'ADN (Gong et al., 2016).

2. Rôle au niveau de la régulation de l'apoptose

P53 est la protéine en aval de la cascade de signalisation liée aux points de contrôle des dommages de l'ADN qui est responsable de la mort cellulaire. Cependant, l'axe ATR/Chk1 est essentiel pour la suppression de l'apoptose dépendant de la caspase 3, suite à un état de stress réplicatif (Myers et al., 2009). De plus, Chk1 bloque aussi l'apoptose dépendant de la caspase 2, indépendamment de p53, Bcl2, et caspase 3 (Sidi et al., 2008). Enfin, certaines caspases sont capables de cliver Chk1, et ce clivage favorise son activité, ce qui suggère un lien entre la voie de signalisation de l'apoptose et Chk1 (Matsuura et al., 2008).

En conclusion de cette partie, Chk1 apparait comme un régulateur majeur du cycle cellulaire, qui est capable de médier l'inhibition de l'activité de kinases et de phosphatases au niveau de la transition G1/S, durant la phase S, au niveau de la transition G2/M et durant la mitose en cas de détection de dommages de l'ADN. Dans un contexte cellulaire non perturbé, Chk1 est au contraire un garant de la progression dans le cycle cellulaire, tant en phase S qu'en mitose (figure 16).

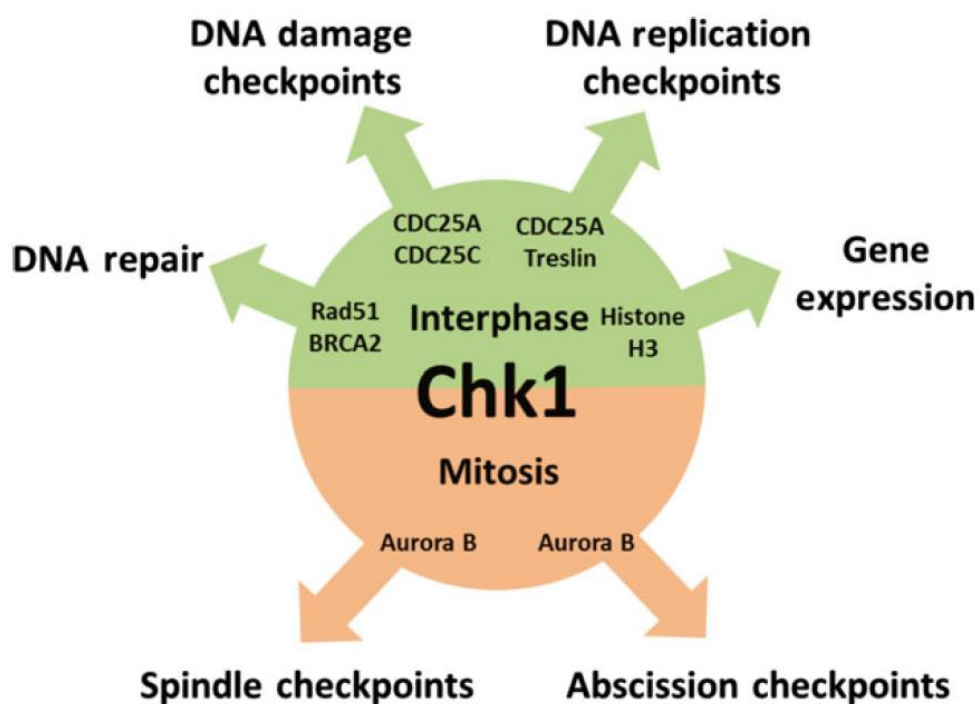


Figure 16: Résumé des cibles et des fonctions de Chk1 au cours de l'interphase et de la mitose (Smits and Gillespie, 2015).

Chk1 est aussi impliquée dans d'autres fonctions biologiques telles que le développement embryonnaire ou la différenciation hématopoïétique. Ce deuxième aspect fait l'objet de la partie III.

III. Rôle de Chk1 au cours de l'hématopoïèse normale

A. Définition de l'hématopoïèse

1. Généralités

L'hématopoïèse désigne le processus physiologique de production des cellules sanguines. Chez l'adulte sain, la production quotidienne représente 10^{11} à 10^{12} cellules sanguines néoformées qui remplacent un nombre équivalent de cellules sénescents. Ainsi, l'hématopoïèse est un renouvellement cellulaire régulé qui permet de maintenir l'homéostasie des cellules sanguines.

Chez l'adulte, elle a lieu principalement dans la moelle osseuse des os long, et des os plats et courts. La moelle osseuse est constituée de cellules hématopoïétiques, de fibroblastes, d'adipocytes, d'une matrice extra-cellulaire et d'un système de vascularisation, l'ensemble formant la niche hématopoïétique, lieu de l'hématopoïèse.

2. Déroulement de l'hématopoïèse

2.1. La cellule souche hématopoïétique

Tous ces types cellulaires sont générés à partir de cellules appelées cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Baum et al., 1992; Morrison and Weissman, 1994; Osawa et al., 1996; Spangrude et al., 1988). La découverte par Till et McCulloch d'une population de cellules clonogènes, dans la moelle osseuse, et capables de régénérer des colonies myéloïdes dans la rate de souris irradiées constitue la première évidence expérimentale de l'existence des CSH (Till and McCULLOCH, 1961). Ces colonies contiennent des cellules qui, une fois re-transplantées dans un hôte secondaire irradié, ont la propriété de pouvoir reconstituer le tissu immunitaire. Ces cellules ont été définies comme des CSHs, c'est-à-dire des cellules avec un potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation en tous les types cellulaires du sang (Baum et al., 1992; Morrison and Weissman, 1994; Osawa et al., 1996; Spangrude et al., 1988). Chez l'homme, les CSH sont caractérisées par l'immunophénotypage LIN-, CD34+, CD38-

Thy1+, CD45RA- et CD117+. La population des CSH peut être divisée en CSH-LT, cellules avec un fort potentiel d'auto-renouvellement, capable de reconstituer tout le tissu hématopoïétique et qui perdurent tout au long de la vie de l'organisme, et CSH-ST, qui sont capables de reconstituer le tissu hématopoïétique seulement durant un temps limité, environ 8 semaines. Lors de la division d'une CSH, soit les cellules filles sont des CSH, soit elles s'engagent dans un processus de différenciation.

2.2. Maturation des progéniteurs et des précurseurs

Les CSH se différencient en progéniteurs hématopoïétiques multipotents (MPP) (Morrison et al., 1997). Les MPP sont caractérisées par les marqueurs de surface LIN-, CD34+, CD38-, Thy- et CD45RA-. Les MPP n'ont pas de capacité d'autorenouvellement même si leur potentiel de prolifération est élevé. Les MPP ont un potentiel de différenciation restreint ; ils se différencient de manière irréversible en progéniteurs engagés dans un des lignages sanguins. On distingue plusieurs progéniteurs selon la branche de l'hématopoïèse concernée. 2 progéniteurs orientés dans un lignage spécifique ont été identifiées jusqu'à présent : les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) et les progéniteurs myéloïdes communs (CMP). Les CLP produisent les lymphocytes B et T, et les cellules natural killer (Kondo et al., 1997). Les CMP donnent naissance aux progéniteurs myélomonocytaires (GMP), qui vont former les monocytes/macrophages et les granulocytes, ainsi que les progéniteurs mégacaryocytaires et érythrocytaires (MEP), qui vont à leur tour se différencier en érythrocytes et en plaquettes (Akashi et al., 2000).

De manière intéressante, les CMP et les CLP sont capables de produire des cellules dendritiques, ce qui suggère l'existence d'une voie de différenciation alternative à celles des lignages myéloïdes et lymphoïdes, qui sont mutuellement exclusifs (figure 17) (Manz et al., 2001; Traver et al., 2000). Enfin, il a été établi que les cellules en cours de maturation, appelées cellules précurseurs, possèdent une morphologie, un phénotype et des propriétés fonctionnelles propres à chaque lignage. Les cellules à ce stade sont incapables d'auto-renouvellement et ont un taux de prolifération réduit (Na Nakorn et al., 2002). Elles produisent

les cellules matures qui vont sortir de la moelle osseuse et rejoindre la circulation périphérique. Les précurseurs du lignage myéloïde sont les suivants :

- Les CFU-GEMM (Colony Forming Unit – Granulocyte Erythrocyte Macrophage and Megakaryocyte) produisent les CFU-GM, les CFU-E et les CFU-Meg.
- Les CFU-GM (Granulocyte and Macrophage) sont les progéniteurs qui donnent naissance aux CFU-G et les CFU-M.
- Les BFU-E (burst Forming Unit-Erythroid) se différencient en CFU-E (Erythrocyte).
- Les CFU-Meg forment les mégacaryocytes.

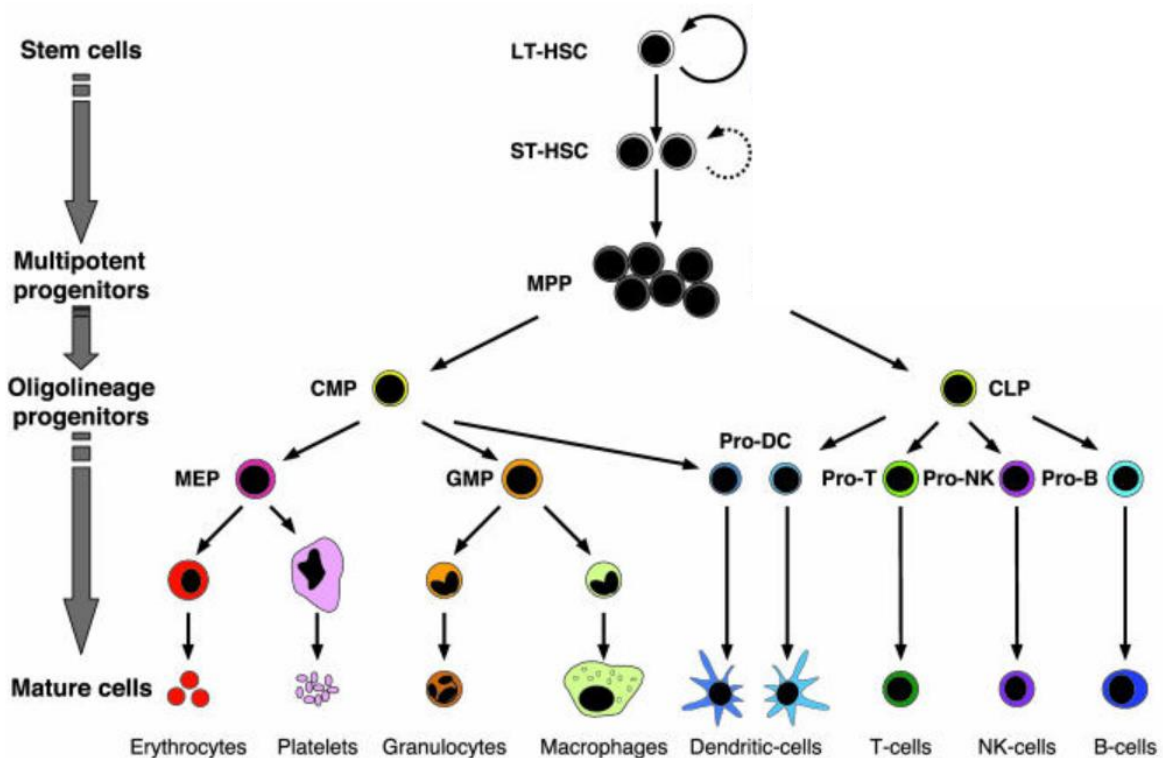


Figure 17: Représentation schématique du modèle classique de l'hématopoïèse normale. L'hématopoïèse comprend la myélopoïèse, ou différenciation myéloïde, qui permet la synthèse des globules rouges, des polynucléaires neutrophiles et des plaquettes, et la lymphopoïèse, ou différenciation lymphoïde, synthèse des lymphocytes T et B. Les lymphocytes T et B naïfs se différencient à nouveau lors de la réponse immunitaire (Passegué et al., 2003).

3. Régulation de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est finement contrôlée, de manière à conserver dans la moelle osseuse un niveau suffisant de CSH fonctionnelles, et à fournir en quantité suffisante des progéniteurs pour les différents lignages hématopoïétiques (Morrison and Weissman, 1994). Ainsi, les différentes étapes de la différenciation hématopoïétique sont caractérisées par l'expression alternative de régulateurs transcriptionnels, de facteurs de croissance et de récepteurs à ces facteurs de croissance, dont les combinaisons déterminent l'engagement des progéniteurs dans un lignage cellulaire, et leur maturation (Orkin, 2000; Zhu and Emerson, 2002).

Ainsi, les facteurs de croissance sécrétés par les cellules hématopoïétiques ou par les cellules de la matrice extra-cellulaire se fixent à la surface des cellules et activent de nombreuses voies de signalisation, qui conditionnent la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation. Certains facteurs de croissance sont spécifiques d'un lignage particulier, comme le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) pour les granulocytes, le M-CSF (Monocyte-Colony Stimulating Factor) pour les monocytes, l'EPO (Erythropoïétine) pour les Erythrocytes, et la TPO (Thrombopoïétine) pour les plaquettes (Metcalf, 2008).

Par ailleurs, certains facteurs de transcriptions jouent un rôle primordial dans la régulation de l'hématopoïèse. En particulier, RUNX1 (Runt-Related transcription factor 1), GATA1/2 (Globin Transcription factor 1/2) et PU.1 ont un rôle majeur dans ce contexte ; leur invalidation conduit à des blocages de la différenciation à différents stades et ils sont retrouvés mutés fréquemment dans les cancers du sang et notamment les leucémies aiguës myéloïdes (Eisbacher et al., 2003; Kuvardina et al., 2015; Nerlov et al., 2000; Tsang et al., 1998). Leurs rôles seront présentés dans le paragraphe sur la régulation de la différenciation mégacaryocytaire.

L'importance des acteurs du cycle cellulaire dans le déroulement de l'hématopoïèse, et plus particulièrement de la différenciation myéloïde est très peu étudiée. Cependant, des travaux suggèrent l'importance de Chk1 au cours de ce processus biologique.

B. Evidences de l'importance de Chk1 au cours de la différenciation hématopoïétique

Chk1 est fortement exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques (Chambers et al., 2007), et son invalidation par des approches d'ARN interférence dans ces cellules hautement proliférantes conduit à une apoptose massive, sans modification des profils de cycle cellulaire (Hu et al., 2011)

De plus, des travaux de Carrassa et al. ont porté sur le rôle de Chk1 dans des cellules souches hématopoïétiques (CD133+) issues de donneurs sains. Leur étude a permis d'établir qu'en présence d'inhibiteur de Chk1 (AZD-7762, 3.75 nM, 72h) les cellules souches hématopoïétiques se différencient préférentiellement en progéniteurs lymphoïdes (CD38+) au détriment des progéniteurs myéloïdes (CD33+). Chk1 aurait donc un rôle dans la différenciation précoce des cellules souches hématopoïétiques (CD133+) en progéniteurs myéloïdes (Carrassa et al., 2010).

En parallèle, il a été montré que Chk1 est impliqué dans la différenciation monocyttaire. En effet, son invalidation par l'inhibiteur UCN-01 dans la lignée U937 stimulée par l'agent différenciant phorbol 12-myristate 13-acetate ou PMA entraîne une inhibition du processus de différenciation, mesuré par l'expression du marqueur de surface CD11b et par l'adhésion cellulaire. Une augmentation de l'apoptose cellulaire consécutive à l'inhibition de Chk1 est aussi constatée (Blagosklonny and Conney, 2002; Rahmani and Grant, 2002).

Enfin, une étude portant sur des nouvelles fonctions de Chk1 a été réalisée à partir de souris hétérozygotes Chk1 +/- . Ces souris présentent une forte diminution du nombre de globules rouges circulants, comparativement aux souris contrôles. Les conclusions de l'étude indiquent que ces souris subissent un défaut de différenciation érythrocytaire consécutif à la présence de dommages à l'ADN spontanés au niveau des précurseurs myéloïdes, mais aussi et surtout à un défaut lors de la mise en place de l'anneau contractile d'actine permettant l'énucléation lors de l'étape terminale de l'érythropoïèse (Boles et al., 2010).

Ces auteurs observent également une diminution drastique du nombre de plaquettes circulantes chez les souris hétérozygotes Chk1 +/- en comparaison avec les souris sauvages, mais ce résultat n'est pas commenté. Il semble pourtant suggérer que Chk1 joue un rôle dans la différenciation mégacaryocytaire, en dépit du fait qu'une autre étude indique que le traitement de fond de souris avec un inhibiteur de Chk1 en prise (SCH-900776, 50 mg/kg) n'a pas d'impact majeur sur le nombre de globules rouges ou de plaquettes dans le sang (les

paramètres ont été évalués à J0, J3, J7, J14 (Guzi et al., 2011). Ces résultats nous ont amenés à étudier plus en détail l'implication de Chk1 dans la différenciation mégacaryocytaire.

C. Différenciation mégacaryocytaire

1. Généralités

La différenciation mégacaryocytaire, ou mégacaryocytopoïèse, permet la formation de plaquettes. Les plaquettes, petites cellules anuclées de 1 à 3 μm sont issues du cytoplasme des mégacaryocytes matures, qui sont les cellules nucléées les plus grosses, entre 50 à 100 μm , et les plus rares de la moelle osseuse (0,01%) (Machlus and Italiano, 2013).

Les mégacaryocytes se développent à partir d'une cellule souche hématopoïétique, dans la moelle osseuse des os longs chez l'adulte, mais aussi dans le foie, le sac vitellin et la rate chez l'embryon (Machlus and Italiano, 2013).

La différenciation mégacaryocytaire est stimulée par de nombreuses cytokines (IL-3, IL-6, IL-11...), les plus importantes étant le facteur Stem Cell Factor ou SCF, et la thrombopoïétine, ou TPO. La TPO et son récepteur c-Mpl, retrouvé à la membrane plasmique des progéniteurs mégacaryocytaires, sont indispensables à la croissance et à la différenciation de ces cellules. Des modèles murins déficients pour la production de TPO, ou pour l'expression du récepteur c-Mpl voient leur nombre de plaquettes circulantes réduit à 15% des valeurs normales. Les plaquettes ne présentent en revanche aucune anomalie. Ces résultats suggèrent que la TPO a un rôle prédominant en début de différenciation, mais qu'elle n'est pas indispensable pour les étapes terminales (Challen et al., 2009; Geddis, 2010)

2. Signalisation cellulaire induite par la TPO

Le récepteur c-Mpl est transmembranaire et n'a pas d'activité kinase intrinsèque, mais est associé avec la tyrosine kinase cytoplasmique JAK2 (Janus kinase 2).

Lorsqu'il n'est pas stimulé, le récepteur c-Mpl est sous forme homodimérique inactive. Après fixation de la TPO, il subit un changement de conformation qui rapproche ses domaines cytoplasmiques, ce qui rapproche les protéines JAK2 et conduit à leur activation par transphosphorylation sur de nombreux résidus (Witthuhn et al., 1993). JAK2 phosphoryle aussi c-Mpl sur les tyrosines 625 et 630. Ces phosphorylation servent de sites d'ancrages pour des protéines contenant des domaines SH2 (Src Homology 2), qui vont moduler la signalisation en aval du récepteur (Drachman and Kaushansky, 1997).

Ainsi, suite à l'activation de Jak2, 3 grandes voies de signalisation sont activées et médient la réponse cellulaire induite par la TPO : la voie STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), et la voie PI3K (Phosphoinositol-3 kinase) (Figure 14).

Jak2 phosphoryle directement les protéines STAT1, 3, 5a et 5b (Schulze et al., 2000), ce qui entraîne leur dimérisation et leur translocation dans le noyau où elles entraînent la transcription de gènes tels que p21, cycline D1, Pim (Magné et al., 2003; Matsumura et al., 1997; Mui et al., 1996)...

Jak 2 active aussi la protéine GTPase Ras et la cascade de signalisation des MAPK, qui aboutit à l'activation des kinases ERK1/2 (Extracellular signal Related Kinase 1/2). De nombreuses études ont pu montrer le rôle fondamental de cette voie de signalisation au cours de la différenciation mégacaryocytaire (Fichelson et al., 1999; Miyakawa et al., 1995; Rojnuckarin et al., 1999; Rouyez et al., 1997). La fixation de la TPO sur le récepteur c-Mpl entraîne sa phosphorylation sur le résidu tyrosine 599 et permet la phosphorylation d'une protéine adaptatrice, Shc (Alexander et al., 1996; Drachman and Kaushansky, 1997; Miyakawa et al., 1995). Cette phosphorylation permet l'assemblage d'un complexe contenant la protéine adaptatrice Grb2 et le facteur d'échange nucléotide guanine SOS (Alexander et al., 1996; Skolnik et al., 1993). Ce complexe permet l'activation de Ras, qui active à son tour Raf-1, les kinases MEK (Mitogen-induced Extracellular Kinase), et enfin les kinases ERK1/2 (Avruch et al., 2001). L'activation de ERK1/2 peut aussi être médiée par un mécanisme indépendant de Shc (Brizzi et al., 1996), et enfin par une voie de signalisation impliquant B-Raf, et indépendante de Ras (Garcia et al., 2001).

Enfin, la voie PI3K est aussi essentielle pour la mégacaryocytopoïèse (Geddis et al., 2001). PI3K est composée d'une kinase (p110) et d'une sous-unité régulatrice (p85). La TPO induit la formation de complexes entre p85 phosphorylée et une protéine adaptatrice Gab (Miyakawa et al., 2001). PI3K peut aussi être activée indirectement via Ras (Kodaki et al., 1994). Une fois activée, PI3K active par phosphorylation la sérine/thréonine kinase Akt, dont les nombreux substrats favorisent la survie cellulaire et la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires (Nakao et al., 2008). PI3K active aussi mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), dont les cibles, SK6 et 4E-BP1, permettent la prolifération et la maturation des progéniteurs mégacaryocytaires (Raslova et al., 2006). PI3K est négativement régulée par PTEN (Phosphatase ans Tensin Homolog), une phosphatase suppresseur de tumeur, qui promeut la quiescence dans les cellules souches hématopoïétiques (figure 18) (Zhang et al., 2006a). Le rôle de la phosphatase PTEN dans la signalisation induite par la TPO, ou dans la différenciation mégacaryocytaire, n'a pas été défini.

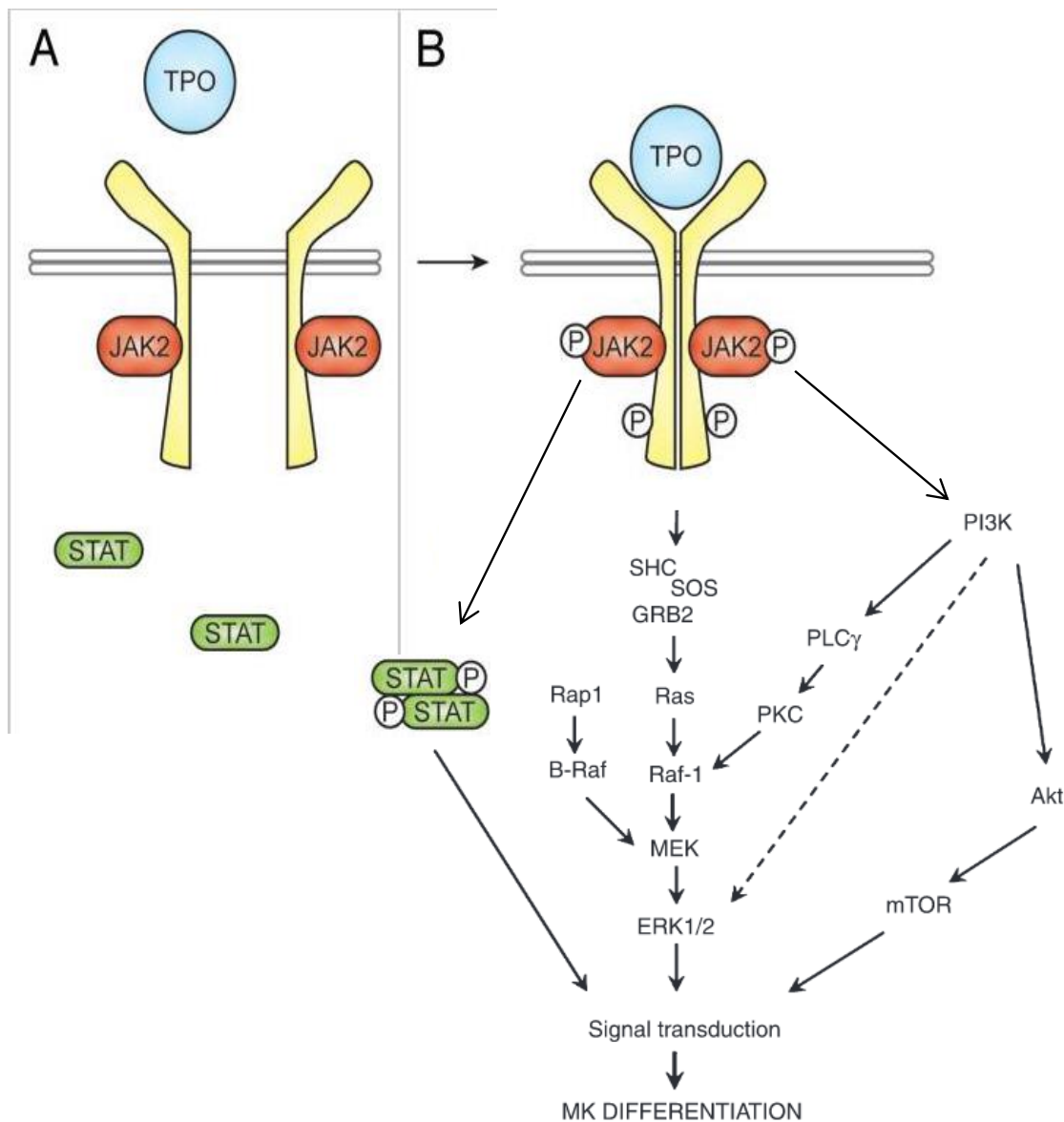


Figure 18: La signalisation induite par la TPO. (A) c-Mpl est un récepteur homodimérique qui s'associe avec la tyrosine kinase cytoplasmique Jak2. (B) Suite à la fixation de la TPO, c-Mpl subit un changement de conformation qui concourt au rapprochement des queues cytoplasmiques du récepteur et à l'activation de Jak2 et des voies de signalisation en aval : STAT, MAPK et PI3K. (Geddis, 2010; de Graaf and Metcalf, 2011; Kaushansky, 2005; SéVerin et al., 2010)

L'activation de ces cascades de signalisation induit la différenciation mégacaryocytaire. Un mégacaryocyte met en moyenne 5 jours chez l'homme pour effectuer les étapes de polyploïdisation, de maturation cytoplasmique et pour former des proplaquettes. Chez la souris, ce processus met 2 à 3 jours. Chaque mégacaryocyte mature produit 10 000

plaquettes. Les plaquettes ont une durée de vie de 7 à 10 jours chez l'homme, contre seulement 4 à 5 jours chez la souris (Machlus and Italiano, 2013).

3. Les étapes de la différenciation mégacaryocytaire

La mégacaryocytopoïèse est marquée par le développement progressif d'une cellule géante avec une accumulation de matériel nucléaire et cytoplasmique. Elle a lieu en plusieurs étapes : l'étape de maturation nucléaire, l'étape de maturation cytoplasmique, puis l'étape de formation des proplaquettes et l'étape ultime, le relargage des plaquettes matures (figure 19).

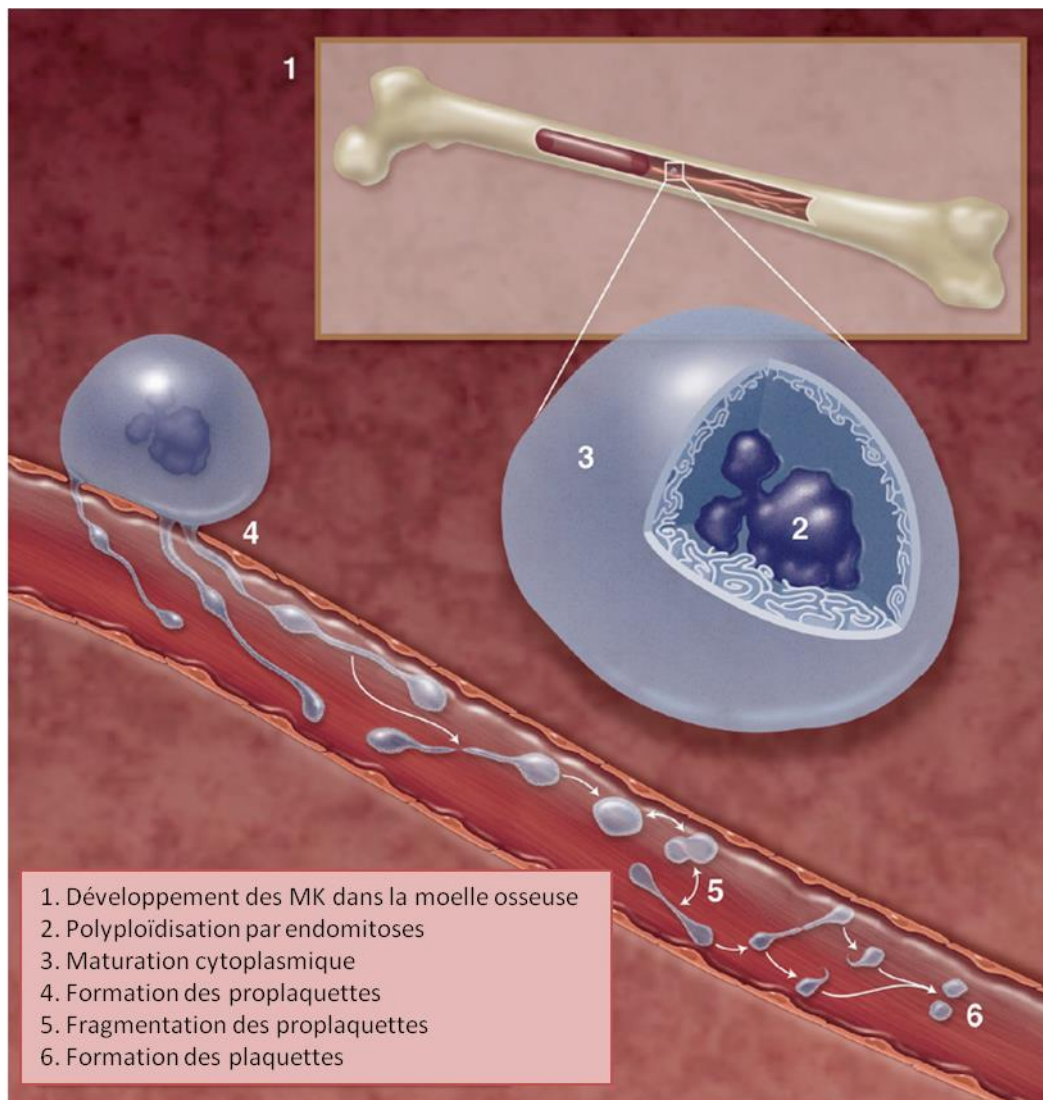


Figure 19: Schéma de la différenciation mégacaryocytaire et de la formation des plaquettes. (1) Les cellules souches hématopoïétiques de la moëlle osseuse se différencient en mégacaryocytes en réponse à la TPO. (2) Les mégacaryocytes subissent des endomitoses successives et voient leurs noyaux passer d'un contenu de 2N à un maximum de 128N. (3) Dans le même temps, les mégacaryocytes développent un système de réseau de membranes invaginées, qui vont servir de réservoir pour la formation des plaquettes. (4) Les mégacaryocytes matures migrent vers la niche vasculaire, où ils produisent des extensions cytoplasmiques dans la lumière vasculaire, d'où bourgeonnent les proplaquettes. (5) Les proplaquettes s'interconvertissent en préplaquettes dans la circulation sanguine. (6) Les plaquettes sont produites par fission des proplaquettes (Machlus and Italiano, 2013).

4.1. L'étape de maturation nucléaire

Les progéniteurs mégacaryocytaires, lorsqu'ils sont stimulés par la TPO, subissent un changement de programme qui est responsable de l'entrée en différenciation. Les progéniteurs perdent alors leur capacité de prolifération (Besancenot et al., 2014) et enchainent des cycles d'endomitoses, cycles cellulaires incomplets au cours desquels les cellules ont une phase G1 et une réplication normale, mais où la mitose aborte au niveau de l'anaphase tardive, avec un défaut de cytokinèse (Vitrat et al., 1998). La mitose ne conduit donc pas à la production de cellules-filles et la cellule mère se retrouve alors avec une accumulation de matériel nucléaire : d'un état diploïde (2N), elle devient tetraploïde (4N), puis passent à un contenu 8N, et ce jusqu'à 128N au maximum (Zimmet and Ravid, 2000).

Cette étape de polyploïdisation par endomitose est qualifiée de maturation nucléaire et dure quelques jours. Au cours de ce processus, la cycline B est dégradée, ce qui conduit à une diminution de l'activité du complexe CDK1 / cycline B par inactivation de CDC25C. En parallèle, les progéniteurs mégacaryocytaires présentent des forts niveaux d'expression des cyclines A et E. (Datta et al., 1996; García and Calés, 1996; Zhang et al., 1996, 1998).

De plus, l'analyse de la ségrégation des chromosomes au cours de cette mitose atypique a permis de constater que la distribution du matériel génétique est asymétrique entre les pôles du fuseau mitotique de la cellule, malgré un point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique et un niveau d'expression de Cdc20 normaux. Ceci est lié au fait que les mégacaryocytes sont caractérisés par un fuseau multipolaire, ce qui entraîne une répartition

inégalement des chromatides qui se regroupent au niveau de chaque centrosome. Il est à noter que les centrosomes sont reliés entre eux par des microtubules, et en l'absence d'élongation du fuseau mitotique, ces connections perdurent durant la reformation de l'enveloppe nucléaire, qui englobe un seul noyau polylobé (Roy et al., 2001).

Par ailleurs, les endomitoses présentent un défaut lors des étapes ultimes de la cytokinèse, en fin d'anaphase. En effet, du fait d'une diminution de l'expression de la chaîne lourde de la myosine II B par le facteur de transcription RUNX1 l'anneau contractile d'actine n'a pas les forces nécessaires pour induire la segmentation de la cellule mère en cellules filles (Badirou et al., 2014; Geddis et al., 2007; Lordier et al., 2008, 2012).

La protéine GTPase RhoA, qui est requise pour générer les forces de contraction de l'anneau d'actine pour permettre la terminaison de la cytokinèse, est aussi régulée négativement lors de la différenciation mégacaryocytaire par GEF-01 (une protéine associée aux microtubules) et ECT2 (Epithelial Cell-Transforming sequence 2) (Gao et al., 2012; Melendez et al., 2011).

Enfin, grâce à des modèles de souris déficientes pour les protéines tyrosines phosphatases Shp1 et Shp2, l'implication de ces 2 protéines dans la formation des endomitoses a pu être mise en évidence (Mazharian et al., 2013).

Cette étape de maturation nucléaire est importante pour permettre à la cellule de produire les grandes quantités d'ARNm et de protéines qui vont permettre la maturation cytoplasmique du mégacaryocyte, ainsi que les ARNm et les protéines qui vont ensuite être incorporées dans les plaquettes (Zimmet and Ravid, 2000). Ainsi, la maturation nucléaire permet la maturation cytoplasmique, même si la corrélation entre la quantité de matériel nucléaire que contient un mégacaryocyte et son efficacité dans la formation des proplaquettes n'est pas démontrée à ce jour.

4.2. La maturation cytoplasmique

Cette seconde étape est beaucoup plus rapide, de l'ordre de quelques heures, et correspond au remodelage cytoplasmique du mégacaryocyte, ou maturation cytoplasmique. La maturation cytoplasmique est caractérisée par la formation d'un système de démarcation des

membranes (DMS). Le DMS est aussi appelé Système de Membranes Invaginées (IMS), en référence à l'origine de sa formation (Machlus and Italiano, 2013). Le DMS dérive de la membrane plasmique, et est distribué dans l'ensemble du cytoplasme. Il sert de membranes de réserves pour la formation des proplaquettes et des plaquettes (Schulze et al., 2006; Yamada, 1957). Les forces nécessaires pour l'internalisation des DMS proviennent de l'assemblage d'un filament d'actine dépendant de la voie de signalisation WASP-WAVE, du côté cytoplasmique du DMS. Cette signalisation se met en place en réponse à l'activation de la kinase PI3K (Schulze et al., 2006).

De plus, lors de la maturation cytoplasmique, le mégacaryocyte produit des granules. Les granules les plus abondants sont les granules α qui contiennent des protéines nécessaires à l'adhésion plaquettaire. Les mégacaryocytes synthétisent aussi des granules denses, qui contiennent des petites molécules, comme l'ADP, la sérotonine ou l'épinéphrine. Ces 2 types de granules trouvent leur origine au niveau de l'appareil de Golgi et sont présents dès les stades précoces de la maturation cytoplasmique. Puis ils se remplissent petit à petit, grâce à une synthèse endogène (facteur de Willebrand, thromboglobuline β , ...), et une récupération de composés plasmatiques par endocytose et pinocytose (fibrinogène...) (Handagama et al., 1987). Une fois la synthèse des granules achevée et le système de démarcation des membranes en place, le mégacaryocyte est mature.

4.3. La formation des proplaquettes puis des plaquettes

A la fin de la maturation cytoplasmique, le mégacaryocyte mature migre au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins sinusoides de la moelle osseuse par un chimiotactisme impliquant le facteur SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor-1) et le récepteur membranaire CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) (Avecilla et al., 2004; Hamada et al., 1998; Pitchford et al., 2012). Il se retrouve alors dans une niche vasculaire composée de protéines de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, fibrinogène, collagène IV...) et de protéines chimioattractives. Ce micro-environnement permet les étapes ultimes de la différenciation mégacaryocytaire (Avecilla et al., 2004). Ainsi, le mégacaryocyte dans la niche externalise le DMS pour former des longs prolongements cytoplasmiques qui vont s'infiltrer à travers la membrane basale de

l'épithélium vasculaire et atteindre la lumière du capillaire (Tavassoli and Aoki, 1989). Puis les organelles et les granules sont transportés via les microtubules le long de ces prolongements cytoplasmiques jusqu'à leur extrémité, où se forment les proplaquettes (Blair and Flaumenhaft, 2009). Les proplaquettes ne sont en continuité avec le corps cellulaire que par le biais de ponts cytoplasmiques. La rupture de ces ponts va conduire à la séparation de la proplaquette et du mégacaryocyte. La proplaquette se retrouve alors dans la circulation sanguine (Italiano et al., 1999), où se déroule l'étape terminale de la différenciation plaquettaire, c'est-à-dire la fragmentation de la proplaquette en plaquettes par abscission. Ce mécanisme est médié par le réseau de microtubules intra-plaquettaire (Thon et al., 2010).

4. Evolution des marqueurs de surface antigéniques mégacaryocytaires au cours de la différenciation

La différenciation mégacaryocytaire à partir d'une cellule souche hématopoïétique est associée à une diminution puis à une perte du cluster de différenciation CD34, et est corrélée avec une augmentation de l'expression d'antigènes de surface caractéristiques des mégacaryocytes. Les marqueurs utilisés pour évaluer l'état de différenciation d'un progéniteur mégacaryocytaire sont les clusters de différenciation CD61 (GPIIIA ou intégrine $\beta 3$), CD41a (correspondant à la glycoprotéine membranaire GPIIb ou αIIb) et CD42 (GPIb) (Mikkola et al., 2003). La différenciation mégacaryocytaire est caractérisée par une augmentation de l'expression de GPIIb et GPIIIa, qui forment ensemble un récepteur hétérodimérique connu sous le nom de GPIIb/IIIa ou $\alpha IIb\beta 3$. Ce récepteur est présent à la surface de la membrane plasmique des progéniteurs mégacaryocytaires jusqu'à la plaquette, et son niveau d'expression augmente au cours de la différenciation. L'expression de GPIb est un peu plus tardive que celle de GPIIb, et peut être utilisée pour identifier des cellules plus matures. La différenciation mégacaryocytaire est aussi marquée par l'apparition du marqueur de surface GPVI (figure 20) (SéVerin et al., 2010; Tomer, 2004).

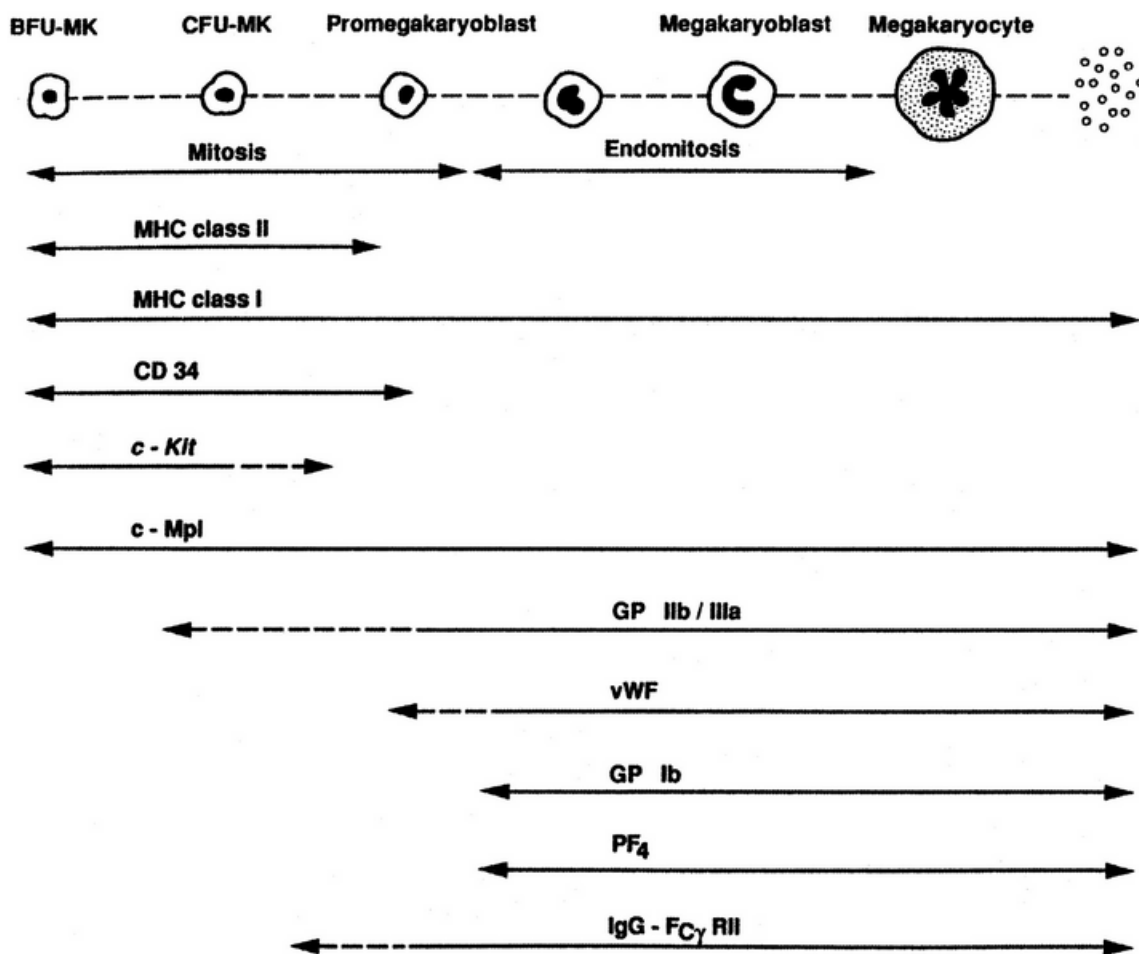


Figure 20: Les marqueurs de différenciation du lignage mégacaryocytaire (Tomer, 2004).

5. Régulation de la différenciation mégacaryocytaire par des facteurs de transcription

De nombreux facteurs de transcription, tels que RUNX1, GATA1, Fli1, ETV6, c-Myc ou NF-E2 participent à la régulation positive et négative de la mégacaryocytopoïèse.

GATA1 (Globulin Transcription Factor 1) et son co-facteur Fog1 (Friend of Gata1) permettent la différenciation mégacaryocytaire des progéniteurs communs, et GATA1 inhibe dans le même temps le facteur de transcription PU.1 qui favorise la différenciation érythrocytaire de ces mêmes progéniteurs (Nerlov et al., 2000; Tsang et al., 1998).

Des sites de fixation pour Gata1 et Fli1 ont été mis en évidence au niveau des promoteurs de nombreux gènes spécifiques aux mégacaryocytes. Fli1 renforce l'activité de GATA1 au niveau de ces promoteurs et inhibe l'activité de facteurs de transcription de la voie de différenciation érythrocytaire (Eisbacher et al., 2003). L'inactivation de Fli1 dans des modèles murins conduit à une forte diminution du nombre de mégacaryocytes matures et une thrombocytopénie (Moussa et al., 2010).

GATA1 et RUNX1 forment aussi un complexe, qui stimule la mégacaryocytopoïèse (Elagib et al., 2003).

Le facteur de transcription RUNX1 joue un rôle important dans le développement du mégacaryocyte, et l'inactivation conditionnelle de RUNX1 chez la souris adulte entraîne une thrombocytopénie, et un défaut de différenciation mégacaryocytaire (Ichikawa et al., 2004; Kaushansky, 2008). RUNX1 permet d'orienter la différenciation du progéniteur commun vers la différenciation mégacaryocytaire (Kuvardina et al., 2015).

RUNX 1 entraîne aussi une diminution de l'expression de la myosine IIB (MYH10), ce qui empêche la terminaison de la cytokinèse et provoque en partie la polyploïdisation (Lordier et al., 2012).

De plus, RUNX1 module la formation des proplaquettes en régulant positivement directement les gènes MYL9, et MYH9, codant pour la myosine II, responsable de l'abscission lors de l'étape de séparation des proplaquettes du corps cellulaire (Bluteau et al., 2012)

Le facteur de transcription NF-E2 (Nuclear Factor Erythroïd 2) est aussi important pour la maturation terminale des mégacaryocytes et la formation des proplaquettes. Il n'est en revanche pas nécessaire pour les étapes de maturation précoce (Fock et al., 2008; Shivdasani, 1996).

A l'inverse, l'expression de c-Myc oriente la différenciation du progéniteur mégacaryocytaire – érythrocytaire vers le lignage érythrocytaire au détriment du lignage mégacaryocytaire. Son expression est d'ailleurs régulée négativement au cours de la mégacaryocytopoïèse (Metcalf et al., 2005). Enfin, TEL/ETV6, membre de la famille de facteurs de transcription ETS (E26 transformation-specific) est aussi un régulateur négatif de la mégacaryocytopoïèse, en faveur de l'érythropoïèse (Takahashi et al., 2005)

6. Kinases impliquées dans le déroulement de la différenciation mégacaryocytaire

Pour les besoins de l'étude, seules les kinases impliquées dans le déroulement de la différenciation mégacaryocytaire les kinases ayant un lien avec Chk1 décrit dans un autre contexte cellulaire sont présentées ici.

6.1. Les kinases Aurora

L'étude de l'impact d'Aurora A sur la différenciation hématopoïétique révèle que l'inactivation de cette kinase dans les progéniteurs hématopoïétiques entraîne une mortalité importante dans presque tous les lignages hématopoïétiques. Cependant, de manière intéressante, la déplétion d'Aurora A entraîne une augmentation de la différenciation et de la polyploïdisation des mégacaryocytes, *in vivo* et *in vitro*. Ces résultats suggèrent que Aurora A est nécessaire pour l'hématopoïèse, mais n'est pas requise pour le déroulement de la polyploïdisation même si elle semble la réguler négativement (Goldenson et al., 2015; Huang et al., 2004).

Le statut d'expression et la fonction de Aurora B, aussi appelée AIM-1, au cours du processus d'endomitoses demeure peu connu. Durant la différenciation mégacaryocytaire, elle est localisée au niveau de la zone centrale en anaphase, puis du midbody en télophase (Geddis and Kaushansky, 2006). Elle est active, car MgcRasGAP, son substrat principal, est phosphorylé, ce qui entraîne la cytokinèse au cours d'une mitose classique. Cependant, dans ce contexte, l'activité de Aurora B n'empêche pas la régression mitotique des progéniteurs mégacaryocytaires (Lordier et al., 2010). Il semblerait que son niveau d'expression diminue chez le mégacaryocyte en cours de polyploïdisation. En accord avec ces données, la suppression artificielle de Aurora B induit la polyploïdisation des progéniteurs mégacaryocytaires, alors que son expression ectopique la bloque (Katayama et al., 1998; Kawasaki et al., 2001; Vinci et al., 1984; Zhang et al., 2004).

Par ailleurs, les kinases Aurora ont été décrites comme interagissant avec le facteur de transcription RUNX, acteur majeur de la progression de la différenciation mégacaryocytaire, dans un contexte de mitose classique. En effet, elles sont responsables de la phosphorylation du facteur de transcription Runx sur les résidus thréonine 14 et thréonine 173, lors de l'entrée en mitose. Ces phosphorylations favorisent l'entrée des cellules en mitose. Par ailleurs, elles entraînent le recrutement de RUNX au niveau des structures mitotiques, notamment les centrosomes ou le midbody durant la cytokinèse. Runx pourrait interagir à ce niveau avec de nombreuses protéines pour permettre le bon déroulement de la mitose (Chuang et al., 2016).

6.2. La kinase BubR1

Les fonctions de BubR1, composant majeur du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique, ont été étudiées grâce à la génération d'une souris mutée pour cette protéine. Le knock-out de BubR1 est létal au stade embryonnaire E 8.5, et les souris hétérozygotes BubR1^{+/-} présentent une splénomégalie et une mégacaryocytopoïèse anormale. En effet, ces souris présentent un nombre important de mégacaryocytes dans la rate et la moelle osseuse, associé à une diminution du nombre de progéniteurs érythrocytaires. Cependant, les souris BubR1^{+/-} ne présentent pas de thrombocytose périphérique, à cause notamment d'un défaut lors de la formation des proplaquettes. Ainsi, BubR1 est requis pour le développement embryonnaire et pour les étapes terminales de la différenciation mégacaryocytaires (Wang, 2003)

6.3. Les kinases Plk

Une étude menée par Yagi et al. a visé à regarder l'expression de plusieurs protéines impliquée dans la mitose au cours de la différenciation mégacaryocytaire de progéniteurs murins en culture, et leurs effets sur la polyploïdisation. Les résultats montrent que les mégacaryocytes expriment de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de la transition métaphase – anaphase, dont Aurora B, et Mad2, et une protéine impliquée dans l'élongation du fuseau mitotique et de la cytokinèse, PRC1 (Protein Regulating Cytokinesis 1). De façon surprenante,

les mégacaryocytes n'expriment ni CDC20 ni Plk1, protéines impliquées dans l'initiation de l'anaphase entre autres fonctions. L'expression ectopique de Plk1 dans des progéniteurs mégacaryocytaires murins provoque une diminution de la polyploïdisation de ces cellules, ce qui semble indiquer que les mégacaryocytes immatures mettent en place des mécanismes particuliers de régulation du cycle cellulaire lors des étapes précoces de la polyploïdisation (Yagi and Roth, 2006).

Une autre étude confirme l'implication de Plk1 dans la régulation de la polyploïdisation, par un modèle de souris déficientes pour Plk1. Ces souris présentent une déficience au niveau des mécanismes d'endomitose, accompagné d'une mortalité cellulaire par catastrophe mitotique. De plus, ces cellules ont des défauts au niveau de la maturation des centrosomes, et de la formation des fuseaux mitotiques. De ce fait, la formation des pôles multiples qui a normalement lieu dans les mégacaryocytes ne peut se faire. Dans ces conditions, les mégacaryocytes subissent un arrêt prolongé en mitose du fait de l'activation du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique, ce qui conduit à leur mort. Cet arrêt en mitose peut être aboli par l'inhibition de protéines du SAC. Ces résultats suggèrent d'une part que Plk1 est requis au cours de la polyploïdisation, et d'autre part que les mégacaryocytes possèdent un point de contrôle endomitotique efficient (Trakala et al., 2015).

Plk3 est aussi impliquée dans la régulation de la progression dans le cycle cellulaire. En particulier, elle est associée aux centrosomes et joue un rôle important dans la régulation de la dynamique des microtubules. Son niveau d'expression augmente dans des cellules de la lignée leucémique K562 stimulées par l'agent différenciant PMA. De plus, elle interagit avec les kinases Aurora A et BubR1 au cours de la polyploïdisation des progéniteurs mégacaryocytaires au niveau des centrosomes, ce qui suggère que ces 3 kinases pourraient appartenir à la même voie de signalisation pour participer à la maturation nucléaire de ces cellules (Huang et al., 2004).

6.4. Les kinases Pim

L'analyse du profil d'expression de gènes dans des progéniteurs mégacaryocytaires humains primaires a permis de montrer que Pim1 est exprimée de façon plus abondante dans ces

cellules que des cellules souches hématopoïétiques CD34+ (Kim et al., 2002). De plus, l'inactivation de Pim1 dans la lignée cellulaire K562 ou dans des cellules primaires CD34+ conduit à une réduction de la polyploïdisation de ces cellules traitées par la TPO. A l'inverse, la surexpression de Pim1 provoque une augmentation de la polyploïdisation dans ces mêmes conditions. Ces résultats suggèrent que l'expression de Pim1 est nécessaire et suffisante pour induire la polyploïdisation des progéniteurs mégacaryocytaires. Toutefois, Pim1 ne semble pas nécessaire pour la régulation de la maturation cytoplasmique (Jung et al., 2006).

6.5. La kinase ATR

Les modèles de souris Seckel, déficientes pour ATR, développés par Murga et al., présentent une diminution importante du nombre de plaquettes circulantes par rapport aux souris contrôles, avec une diminution encore plus drastique chez les animaux étant en plus déficients pour p53. Ainsi, la voie ATR ou plus généralement la voie de réparation des dommages de l'ADN pourrait être impliquée dans la différenciation mégacaryocytaire ou dans la formation des proplaquettes (Murga et al., 2009).

6.6. Les kinases RSK

La kinase RSK1 semble aussi avoir un rôle au cours de la différenciation mégacaryocytaire puisque sa surexpression dans la lignées leucémique K562 favorise sa différenciation après traitement par l'agent différenciant PMA, alors que la surexpression d'une forme de RSK dominant négative (D205N) l'inhibe dans les mêmes conditions (Kim et al., 2001). En revanche, l'inhibition des kinases RSK par un inhibiteur pharmacologique (SL0101, 10 μ M) n'a pas d'impact sur la différenciation mégacaryocytaire de cellules primaires murines (Mazharian et al., 2009).

Il est à noter que la voie des signalisation MAPKinases et les kinases ERK1/2 jouent aussi un rôle majeur au cours du processus de mégacaryocytopoïèse (Avruch et al., 2001; Mazharian et al., 2009)

La différenciation mégacaryocytaire est un processus en plusieurs étapes, avec notamment une maturation nucléaire, qui conduit à la formation de cellules polyploïdes géantes, par des cycles d'endomitose successifs. Certains régulateurs majeurs du cycle cellulaire semblent impliqués dans ce processus biologique. Aucune étude à ce jour n'a évalué le rôle de Chk1 dans la mégacaryocytopoïèse.

Nous avons jusqu'ici présenté les fonctions de Chk1 au cours d'un cycle cellulaire classique, et ses fonctions inhérentes à la différenciation hématopoïétique, 2 processus physiologiques majeurs.

De part les rôles majeurs que joue Chk1 sur plusieurs aspects du cycle cellulaire, cette kinase est aussi impliquée dans la tumorigenèse.

IV. Rôles de Chk1 dans la tumorigenèse et dans les cancers

A. Généralités

L'instauration d'un état de stress répliatif et l'apparition de dommages de l'ADN, sous pression oncogénique, font partie des caractéristiques majeures qui permettent de définir la tumorigenèse (figure 21). Les agents carcinogènes sont d'ailleurs des composés responsables de l'apparition de cassures de l'ADN. De ce fait, il est clair que la voie de signalisation ATR/Chk1 joue un rôle majeur au cours des processus pré-néoplasique et néoplasique.

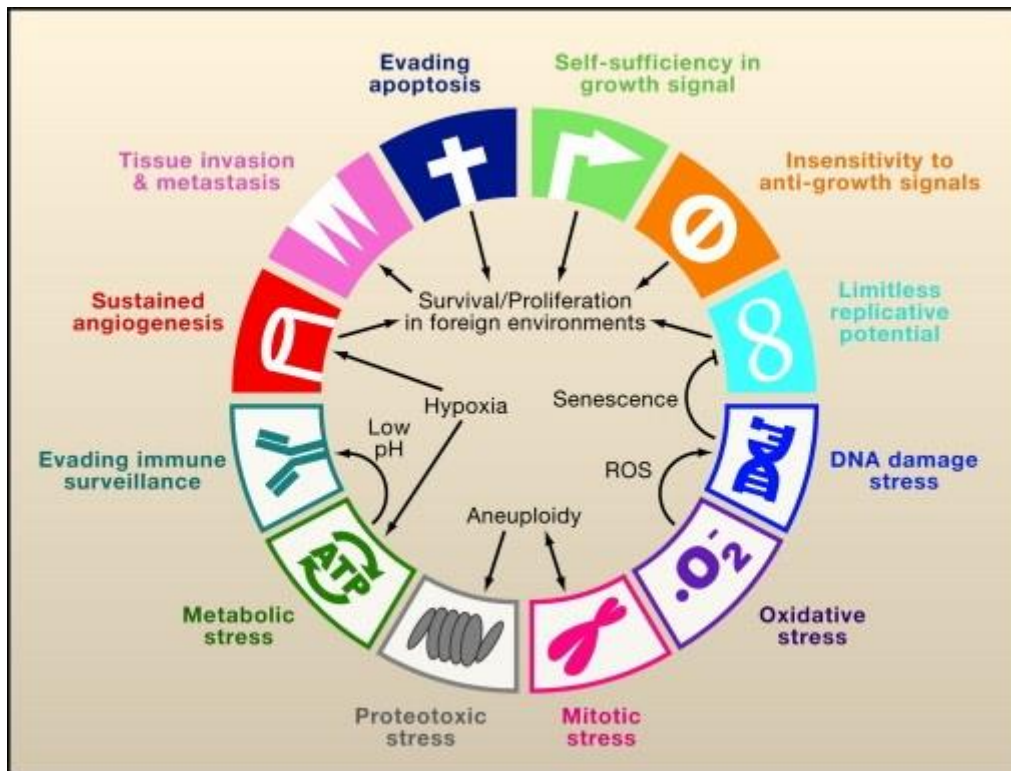


Figure 21: Les caractéristiques des cancers. Aux 6 propriétés des tumeurs proposées par Hanahan et Weinberg (dans le cadran du haut, ce sont les symboles en blanc), et à la capacité d'évasion de la surveillance immunitaire proposée par Kroemer et Pouyssegur s'ajoutent des caractéristiques en termes de stress métabolique, de stress protéotoxique, de stress mitotique, de stress oxydatif et de stress lié aux dommages de l'ADN. Les répercussions fonctionnelles de ces états de stress favorisent la progression de la tumorigenèse (Luo et al., 2009).

1. Dérégulation de Chk1 dans les cancers

1.1. Amplifications

Chk1 est très peu mutée dans les cancers. En particulier, aucune mutation héréditaire n'a pu être identifiée dans des syndromes prédisposant à des cancers (Solyom et al., 2010), contrairement à d'autres composants des points de détection et de réparation des dommages de l'ADN, tels que TP53, CHK2, BRCA1, ATM ou ATR. Cependant, la perte d'hétérozygotie de Chk1 a été constatée dans des cancers génétiquement instables, due à des changements du cadre de lecture (Bertoni et al., 1999). De plus, la délétion du chromosome 11q, et notamment

11q24, portion qui contient le locus de *CHEK1*, a été décrite dans des cancers du sein positifs pour le récepteur aux œstrogènes et apparaît souvent de façon concomitante avec une amplification du locus de la cycline D1 en 11q13. Ces mutations contribuent à la résistance au tamoxifène de ces tumeurs (Lundgren et al., 2008). Une amplification génique de *CHEK1* est aussi décrite dans les cancers ovariens et dans les leucémies aiguës myéloïdes (Krajewska et al., 2015).

En revanche, l'expression de Chk1 est souvent modulée dans les cancers.

1.2. Variations du niveau d'expression

Ainsi, son expression est diminuée dans certaines leucémies aiguës lymphoblastiques, du fait de la surexpression d'un répresseur transcriptionnel, TLX1 (T cell leukemia homeobox protein-1) (De Keersmaecker et al., 2010). De la même manière, la transcription de *CHEK1* est régulée négativement par les facteurs de transcription de la famille des ETS (ERG, ETV1, ETV5, ETV5). Ces facteurs de transcription sont souvent surexprimés dans les cancers de la prostate, à cause de translocations chromosomiques, et de ce fait Chk1 est souvent sous-exprimé dans ce type de tumeurs (Lunardi et al., 2015). Chk1 est aussi retrouvé sous-exprimé dans certains syndrômes myodysplasiques (Pellagatti et al., 2010)

A l'inverse, Chk1 est fréquemment trouvée surexprimée dans les cancers (cancer colorectal, cancer du sein triple négatif, cancer du col de l'utérus, cancer du poumon, leucémie lymphoblastique...) (Madoz-Gúrpide et al., 2007; Sarmiento et al., 2014; Speers et al., 2009; Verlinden et al., 2007; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2009b).

2. Importance de Chk1 dans la tumorigenèse

L'état de stress répliatif et les dommages de l'ADN associés au processus de tumorigenèse conduisent à l'activation constitutive des voies de détection et de réparation des dommages de l'ADN. En particulier, ATR et Chk1 sont les protéines essentielles dans ce contexte (Bartkova

et al., 2005, 2006; Dereli-Öz et al., 2011; Di Micco et al., 2006; Gorgoulis et al., 2005; Mallette et al., 2007). Elles apparaissent comme ayant des rôles différents au cours du développement pré-néoplasique et néoplasique (Figure 22).

2.1. Importance des acteurs des points de contrôle du cycle cellulaire dans l'initiation tumorale

Aux étapes précoces de la tumorigenèse, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire qui fait suite aux dommages de l'ADN induits par l'expression d'un oncogène entraîne un arrêt du cycle cellulaire. Cela prévient la prolifération des cellules et provoque leur mort. En ce sens, ATR et Chk1 sont les garants de la stabilité génétique et luttent contre l'apparition des tumeurs. On parle de « barrière anti-tumorale » (Bartek et al., 2012; Bartkova et al., 2005, 2006; Di Micco et al., 2006; Gorgoulis et al., 2005; Mallette et al., 2007). De fait, les cellules haploinsuffisantes pour ATR et Chk1 sont dans un état d'instabilité génétique qui favorise la transformation tumorale. Ainsi, il a été montré, grâce à des modèles de souris haploinsuffisantes pour Chk1, que la diminution du niveau d'expression de cette kinase provoque une mauvaise coordination dans la progression du cycle cellulaire, avec notamment un chevauchement des phases de réplication et de mitose. Ce phénotype conduit à de l'instabilité génétique persistante, avec des cassures de l'ADN et provoque l'apparition de tumeurs. Ainsi, Chk1 est considérée dans ce contexte comme un gène suppresseur de tumeur (Lam et al., 2004). Cela explique pourquoi une diminution de son expression dans les cancers en aval des facteurs de transcription TLX1 ou de la famille des ETS peut conduire à une instabilité génétique, de l'aneuploïdie et de la tumorigenèse (De Keersmaecker et al., 2010; Lunardi et al., 2015). Il est à noter que les souris déficientes pour ATR présentent de façon similaire des cellules avec un état de stress réplicatif important et un vieillissement prématuré (Murga et al., 2009b).

2.2. Rôle des voies de détection et de réparation des dommages dans la progression tumorale

En revanche, lorsque le processus de tumorigenèse se situe dans des étapes plus tardives, et que les cellules ont échappé à la barrière anti-tumorale, via divers mécanismes, comme par exemple la mutation de p53, elles subissent un état de stress réplicatif important. A ce moment, l'activité d'ATR et de Chk1 leur permet de lutter contre l'instabilité génétique, et ainsi de continuer à survivre et à proliférer malgré la présence de dommages de l'ADN et la persistance de région sous-répliquées (Bartek et al., 2012; Dereli-Öz et al., 2011; Halazonetis et al., 2008). A ce stade, une surexpression de Chk1 favorise plutôt la tumorigenèse induite par un oncogène, car elle permet de lutter contre le stress réplicatif qu'il provoque. Dans ce cas, Chk1 contrebalance l'effet néfaste de la transformation tumorale sur la cellule ce qui permet sa survie (López-Contreras et al., 2012) et pourrait donner un avantage sélectif aux cellules tumorales en leur conférant une plus grande résistance aux traitements chimiothérapeutiques (Figure 22) (Bao et al., 2006; Grabauskiene et al., 2013).

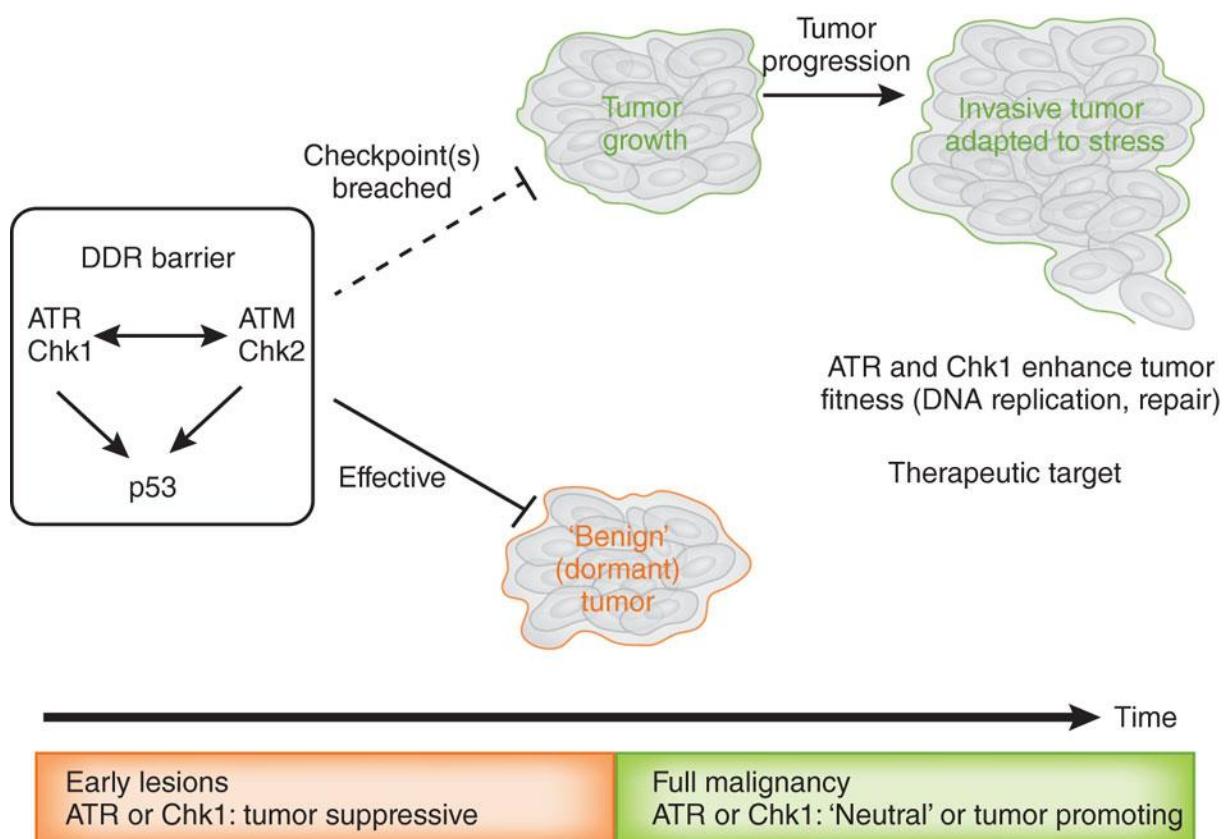


Figure 22: Des rôles différents de la voie de signalisation ATR-Chk1 au cours de la tumorigenèse. L'activation oncogénique dans les étapes précoces crée un état de stress réplicatif et des dommages de l'ADN, ce qui active les voies de détection et de réparation des dommages de l'ADN, arrête la progression dans le cycle et est donc une barrière anti-tumorale. Dans les étapes tardives, lorsque les cellules tumorales ont franchi cette barrière antitumorale, ces mêmes voies de signalisation

permettent de contrebalancer l'instabilité génétique intra tumorale et favorise ainsi sa survie et son extension (Bartek et al., 2012).

Ces résultats ont été obtenus à partir d'expériences menées dans des cancers solides. Il apparaît que dans les cancers liquides aussi le rôle des voies de détection et de réparation des dommages de l'ADN est prépondérant dans l'évolution du processus prénéoplasique en néoplasme. En effet, dans les syndromes myélodysplasiques intermédiaires, qui est le reflet d'un état pré-leucémique de faible grade, le niveau d'activation de Chk1 et Chk2 est aussi faible que dans les échantillons sains, alors que le niveau de phosphorylation activatrice de ces 2 kinases augmente avec le grade de cette maladie (Boehrer et al., 2009). L'activation de ces points de contrôle sert aussi de barrière anti-tumorale dans ce contexte (Horibe et al., 2007). A l'inverse, dans les leucémies à forte instabilité génétique, l'activation de Chk1 permet de contrecarrer l'état de stress réplicatif intrinsèque de ces tumeurs, à l'image de ce qui se passe dans les tumeurs solides (Cavelier et al., 2009; Didier et al., 2012).

Cette dualité des rôles d'ATR et de Chk1 selon l'état d'avancement de la maladie est un paramètre important à prendre en compte lors de l'utilisation d'inhibiteurs de ces kinases au cours de thérapies anti-cancéreuses (Bartek et al., 2012).

2.3. Importance de Chk1 dans la réponse aux traitements chimiothérapeutiques : bases scientifiques justifiant l'utilisation d'inhibiteurs de Chk1 dans les chimiothérapies

L'idée de se servir de l'état de stress réplicatif présent dans les cellules tumorales pour provoquer leur mort a émergé avec la découverte que la transformation oncogénique dans ces cellules induit des dommages de l'ADN endogènes. Ceci a pu être constaté dans de nombreux modèles de recherche, mais aussi sur des échantillons primaires biologiques issus de nombreux types de tumeurs, et de lésions pré-néoplasiques (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005; Halazonetis et al., 2008). Ces lésions liées au stress réplicatif sont présentes spécifiquement dans les tissus cancéreux, et semblent absentes dans les tissus sains, même ceux présentant un indice de prolifération élevé (Halazonetis et al., 2008; Toledo et al., 2011).

L'état de stress répliatif et les dommages de l'ADN associés au processus oncogénique apparaissent alors comme étant le talon d'Achille des cellules tumorales, d'où l'intérêt de cibler les acteurs majeurs des voies de détection et de réparation des dommages de l'ADN dans les traitements anti-cancéreux (Halazonetis et al., 2008; Jackson and Bartek, 2009; Luo et al., 2009). L'idée ici est de s'attaquer au point faible de la tumeur, à savoir sa dépendance au système de détection et de réparation des dommages de l'ADN pour contrebalancer son état de stress répliatif endogène, afin de provoquer la mort spécifiquement de ces cellules tumorales. En particulier, Chk1 est très rarement muté dans les cancers, contrairement à p53, muté dans 50% des cas, ce qui suggère que parmi tous les acteurs des voies de détection et de réparation des dommages de l'ADN, Chk1 est essentiel pour la survie de la cellule tumorale, et de ce fait représente une cible thérapeutique particulièrement pertinente (figure 23) (Carrassa and Damia, 2011; Furgason and Bahassi, 2013; Kawabe, 2004; Kuntz and O'Connell, 2009).

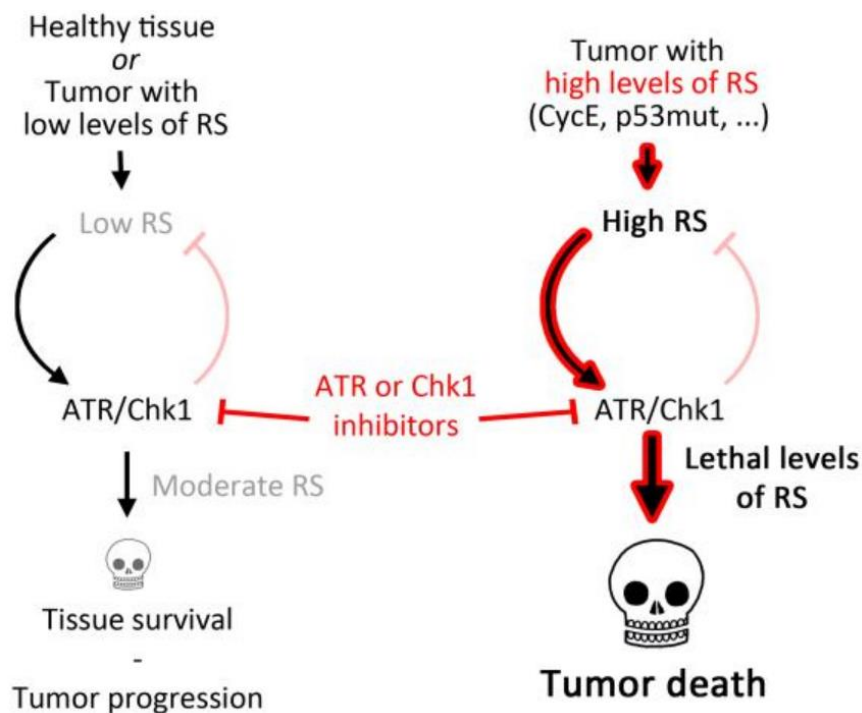


Figure 23: L'intérêt de l'utilisation d'inhibiteurs d'ATR ou de Chk1 dans les traitements anticancéreux (Toledo et al., 2011).

L'inhibition d'ATR ou de Chk1 exacerbe l'état de stress répliatif de la cellule tumorale, ce qui provoque sa mort. Cet effet est spécifique des tumeurs présentant un fort niveau de stress

réplicatif, et n'affecte pas les tissus sains ou les tumeurs présentant un faible niveau de stress réplcatif endogène (Toledo et al., 2011).

De la même manière, en l'absence de tout traitement génotoxique, il a été montré que les cellules présentant des forts niveaux d'expression de CDC25A, et donc dans un état de prolifération important, sont très sensibles à l'inhibition d'ATR alors que les cellules déficientes pour cette phosphatase sont au contraire très résistantes à ce traitement. Cette résistance est réversée par l'inhibition de la kinase Wee1. Conjointement, ces résultats montrent que le mécanisme de mort cellulaire lié à l'inhibition d'ATR passe par une abolition du point de contrôle de la réplication et de l'entrée en mitose ; abolition permise par l'inhibition de la régulation négative (ATR) mais facilitée par des forts niveaux d'expression et d'activation de CDC25A, régulateur positif de la progression dans le cycle (figure 25) (Ruiz et al., 2016).

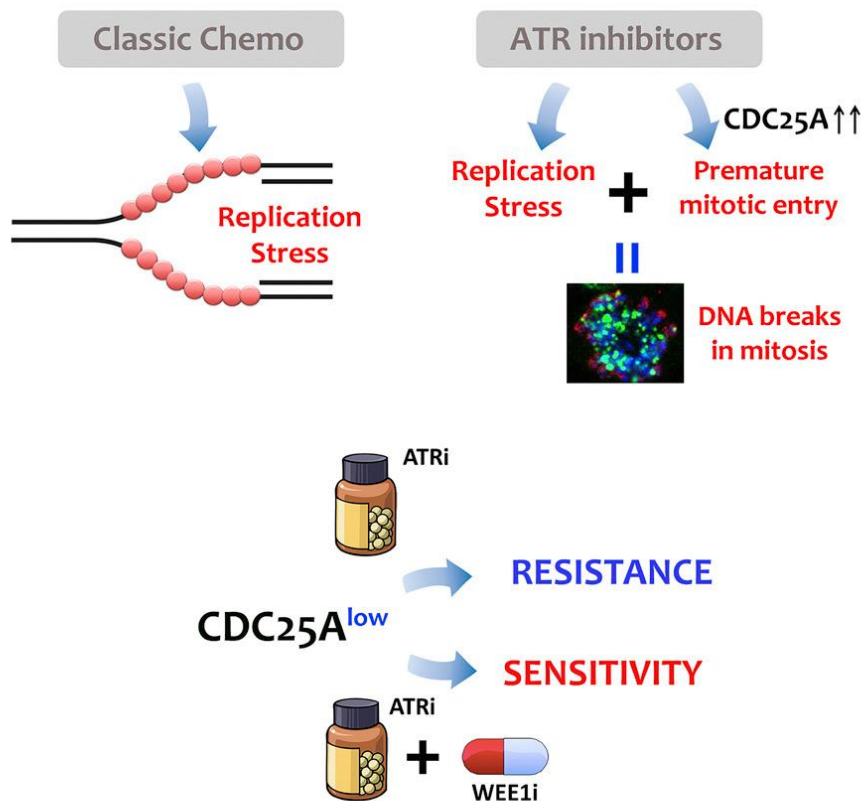


Figure 24 : Le niveau de CDC25A est prédictif de la sensibilité aux inhibiteurs d'ATR. Dans les cellules tumorales à fort stress réplcatif intrinsèque et avec des niveaux élevés de CDC25A, l'inhibition d'ATR

entraîne la mort des cellules consécutivement à une progression en mitose prématurée. Dans les cellules tumorales subissant un fort stress réplicatif sans forte expression de CDC25A, l'inhibition de Wee1 combinée à l'inhibition d'ATR conduit au même résultat (Ruiz et al., 2016).

De ce fait, de nombreuses études ont été menées pour comprendre l'impact de l'inhibition des voies de détection et de réparation des dommages de l'ADN sur la survie de la cellule tumorale.

3. Conséquences de l'inhibition de Chk1 sur le devenir des cellules tumorales

3.1. Abolition des points de contrôle des dommages de l'ADN

a. Contexte p53 muté

La mutation de p53, qui est fréquemment observée dans les cellules tumorales, rend les cellules particulièrement dépendantes de Chk1. En effet, ces cellules ont un défaut majeur au niveau du point de contrôle G1/S, et doivent leur survie à un renforcement du point de contrôle intra S, de la transition G2/M, et de la mitose, activés par Chk1. Les stratégies thérapeutiques utilisées dans de nombreux cancers sont basées sur l'utilisation d'agents génotoxiques ou d'anti-métabolites qui induisent des dommages de l'ADN. Ces lésions entraînent l'activation d'ATR, et l'activation des points de contrôle. L'inhibition de Chk1 dans ce contexte abolit ces points de contrôle avant que les cellules cancéreuses n'aient pu réparer ces cassures de l'ADN. La cellule continue donc sa progression en phase G2 puis en mitose malgré une réplication incomplète et une forte instabilité génétique, ce qui provoque sa mort par catastrophe mitotique. De ce fait, les inhibiteurs de Chk1 sensibilisent les cellules tumorales à de nombreux agents génotoxiques ou anti-métabolites (figure 24) (Barnard et al., 2016; Ma et al., 2011; Maugeri-Saccà et al., 2013; Sakurikar and Eastman, 2015; Tao et al., 2009a; Zabludoff et al., 2008).

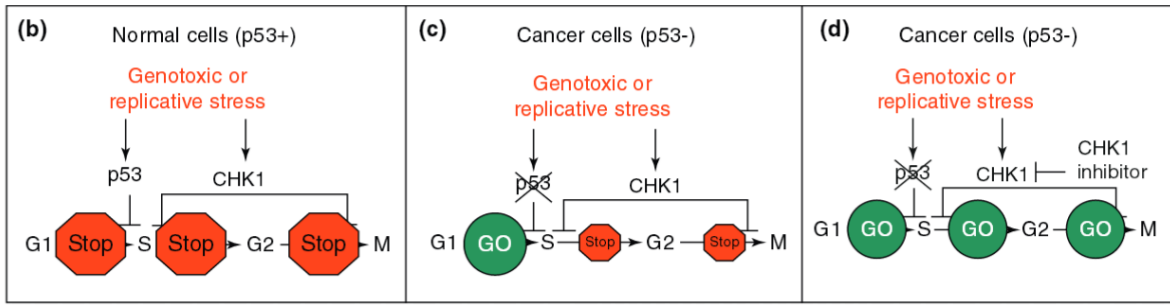


Figure 25 : Conséquence de l'inhibition de Chk1 dans des cellules mutées pour p53. 50% des cancers sont mutés pour le gène codant pour p53, et de ce fait ont un défaut au niveau du point de contrôle G1/S, mais ont des points de contrôle intra S et G2/M fonctionnels. L'inhibition de Chk1 entraîne la perte de tous les points de contrôles de la cellule et provoque sa mort par catastrophe mitotique (Ma et al., 2011).

b. Contexte p53 non muté

Cependant, le bénéfice à utiliser des inhibiteurs de Chk1 ne se limite pas aux tumeurs mutées pour p53. En effet, Zenvirt et al. ont étudié l'impact de l'inhibition de Chk1 sur des lignées isogéniques efficaces ou déficientes pour p53. Ils ont pu montrer que cette inhibition conduit à des défauts dans l'arrêt du cycle consécutif à un traitement chimiothérapeutique spécifiquement dans les cellules déficientes pour p53. Cependant, les cellules efficaces pour p53 ne sont pas moins sensibles à l'inhibition de Chk1 en présence de dommages de l'ADN. Ainsi, la combinaison d'un traitement génotoxique et d'un inhibiteur de Chk1 n'entraîne pas la mort spécifiquement des cellules déficientes pour p53, et ce résultat ouvre de nouvelles perspectives pour potentialiser les traitements chimiothérapeutiques (Zenvirt et al., 2010).

Par exemple, le traitement de cellules tumorales par un inhibiteur de Chk1 sensibilise ces cellules à un traitement par un inhibiteur des topoisomérases. En effet, ce traitement induit des cassures simples brins de l'ADN, qui sont prises en charges par le point de contrôle de la phase S, avec Chk1 en première ligne, d'où l'intérêt ici de l'inhiber pour potentialiser l'effet cytotoxique (Aris and Pommier, 2012; Tse et al., 2007).

3.2. Déstabilisation de la réplication

L'inhibition de Chk1 dans des cellules de cancer du pancréas mutées pour p53 et traitées par la gemcitabine, un anti-métabolite, entraîne une bonne sensibilisation des cellules au traitement. Dans ce modèle, le mécanisme de mort cellulaire ne passe pas par un défaut majeur d'activation du point de contrôle G2/M mais par une désorganisation de la réplication. En effet, les cellules subissant le double traitement s'accumulent en phase S, avec un important recrutement de protéines RPA activées à la chromatine au niveau de zones d'ADN simple brin. Dans certaines de ces cellules apparaissent en plus des dommages de l'ADN persistants (Koh et al., 2015).

De la même manière, l'inhibition d'ATR conduit à des blocages de fourches, à l'activation de nouvelles origines de réplication inappropriée, et de ce fait, à un recrutement massif de RPA au niveau de la chromatine, due à l'excessive proportion d'ADN sous forme simple brin. Les protéines RPA se retrouvent alors en nombre limitant, ce qui provoque des cassures de fourches dans tout le noyau. Ce phénomène est appelé « catastrophe de la réplication ». Il peut justifier du fait que les cellules tumorales ayant déjà une forte instabilité génétique sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs d'ATR, (Toledo et al., 2013) mais aussi de Chk1 (King et al., 2015).

3.3. Défaut de réparation des dommages de l'ADN

L'inhibition de Chk1 durant la phase S du cycle cellulaire en présence de dommages de l'ADN entraîne l'inhibition de la réparation par recombinaison homologue (Parsels et al., 2009), et la formation de cassures doubles brins par l'endonucléase Mus81, qui agit normalement pour la résolution des jonctions de Holliday, à la fin de la recombinaison (Montano et al., 2013; Osman and Whitby, 2007). C'est la raison pour laquelle, dans les carcinomes, l'inhibition de Chk1, qui inhibe la réparation par recombinaison homologue, combinée à l'inhibition de PARP-1, protéine impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN par excision de base (BER) aboutit à l'induction de l'apoptose dans les cellules tumorales (Mitchell et al., 2010). Pour des raisons similaires, l'utilisation d'inhibiteurs de Chk1 est particulièrement intéressant dans le cas de tumeurs déficientes pour les voies de réparation par les protéines de la famille Fanconi Anemia (FA) (Chen et al., 2009)

Ainsi, l'inhibition de Chk1 seule suffit à induire de la mortalité dans des cellules pour lesquelles l'état de stress réplicatif intrinsèque est très important (Brooks et al., 2013; Ferrao et al., 2012; Hoglund et al., 2011; Murga et al., 2011; Zhang et al., 2016).

3.4. Inhibition de Chk1 et abolition des points de contrôle mitotiques

L'inhibition de Chk1 sensibilise les cellules du cancer du côlon au traitement par l'inhibiteur d'Aurora B. En effet, le traitement des cellules avec cet inhibiteur seul aboutit à la formation de cellules tumorales polyploïdes, avec des micronuclei et des multinucléations. Associé à l'inhibiteur de Chk1, il conduit à la mort cellulaire par catastrophe mitotique (Tao et al., 2009b).

Par ailleurs, il a également été montré que l'inhibition de Chk1 sensibilise les cellules tumorales au taxol, un agent anti-mitotique qui stabilise les microtubules et provoque la mort cellulaire par arrêt prolongé en mitose. Cela est dû au fait que l'inhibition de Chk1 favorise l'entrée des cellules en mitose, par l'activation de CDK1 et l'accumulation de cycline B. De plus, elle limite la sortie de la mitose, via le maintien de la sécurine, empêchant la progression en anaphase. Ainsi, l'inhibiteur de Chk1 favorise l'accumulation des cellules en mitose, phase que cible le taxol (Xiao et al., 2005).

3.6. Inhibition de Chk1 et modification du transcriptome

L'inhibition de l'activité de Chk1 dans les cellules tumorales induit l'activation de la phosphatase PP2A. En effet, lorsque Chk1 est inhibée, la transcription de CIP2A diminue. Or CIP2A est un inhibiteur de l'activité de PP2A. PP2A est une protéine suppresseur de tumeur, qui agit notamment sur Myc en le déphosphorylant sur la sérine 62, ce qui inhibe son activité. Ces résultats permettent d'expliquer l'efficacité des inhibiteurs de Chk1 en monothérapie sur des tumeurs présentant l'oncogène Myc (Khanna et al., 2013).

Toutes ces études justifient l'intérêt d'utiliser des inhibiteurs de Chk1 dans les traitements de chimiothérapie anti-cancéreuse.

4. Utilisation d'inhibiteurs de Chk1 dans les protocoles de traitements

4.1. Développement des inhibiteurs

Le développement des inhibiteurs de Chk1 est une longue histoire. Dès 1982, Lau et Pardee démontrent que la caféine provoque des défauts dans l'activation du point de contrôle des dommages de l'ADN et potentialise la toxicité d'agents génotoxiques (Lau and Pardee, 1982). La caféine est par la suite décrite comme un agent inhibant les kinases ATM et ATR, mais les concentrations nécessaires pour obtenir cet effet biologique en clinique ne sont pas atteignables (Blasina et al., 1999; Sarkaria et al., 1999). Le premier inhibiteur de Chk1 à entrer en essai clinique est le 7-hydroxystaurosporine, ou UCN-01 (Bunch and Eastman, 1996; Wang et al., 1996). Cependant, ses nombreux effets secondaires, notamment de la cardiotoxicité, certainement liés à sa très faible spécificité, et une forte fixation aux protéines plasmatiques, rendant sa biodisponibilité peu contrôlable et très variable, ont rendu son utilisation en clinique impossible (Fuse et al., 1998). De nombreux autres inhibiteurs de Chk1 ont par la suite été développés (Chen et al., 2012; Thompson and Eastman, 2013). Dans ces études, la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 296 ou les sérines 317/345 (Parsels et al., 2011a), ainsi que la phosphorylation de l'histone H3, l'histone H2AX et la phosphatase CDC25C ont été utilisées comme biomarqueurs permettant d'évaluer le niveau d'inhibition de Chk1 (Bucher and Britten, 2008; Rawlinson and Massey, 2014).

Le tableau 1 ci-dessous récapitule les inhibiteurs de Chk1 qui ont été développés à ce jour (Garrett and Collins, 2011; Lainchbury and Collins, 2011; Matthews et al., 2013; McNeely et al., 2014).

Composé	Activité inhibitrice	Référence
UCN-01	Chk1 IC ₅₀ = 11 nM Chk2 IC ₅₀ = 1040 nM	(Busby et al., 2000)

	Chk2 IC ₅₀ ~ 10 nM	(Yu et al., 2002)
Isogranulatimide	Chk1 IC ₅₀ = 100 nM Chk2 IC ₅₀ = 3000 nM	(Jiang et al., 2004)
SB-218078	Chk1 IC ₅₀ = 15 nM Chk2 IC ₅₀ non rapportée	(Jackson et al., 2000)
PD 407824	Chk1 IC ₅₀ = 47 nM Chk2 IC ₅₀ non rapportée WEE1 IC ₅₀ = 97 nM	(Palmer et al., 2006)
PD-321852	Chk1 IC ₅₀ = 5 nM Chk2 IC ₅₀ non rapportée	(Parsels et al., 2009)
AZD7762	Chk1 K _i = 4 nM Chk2 IC ₅₀ = <10 nM	(Zabludoff et al., 2008)
CHIR-124	Chk1 IC ₅₀ = 0.3 nM	(Tse et al., 2007)
PF-00477736	Chk1 K _i = 0.5 nM Chk2 K _i = 47 nM	(Blasina et al., 2008)
SCH900776 (MK-8776)	Chk1 IC ₅₀ = 3nM	(Guzi et al., 2011)
LY2603618	Chk1 IC ₅₀ = 7nM	(King et al., 2014)
LY2606368	Chk1 IC ₅₀ = 1.5nM	(King et al., 2015)
GDC-0575 (ARRY-575)	Non rapportée	(Davies et al., 2011)
SAR-020106	Chk1 K _i = 11 nM	(Walton et al., 2010)
XL-844 (EXEL-9844)		(Matthews, 2007; Riesterer et al., 2011)

Tableau 1: Récapitulatif des inhibiteurs de Chk1 développés à ce jour.

4.2. Les inhibiteurs de Chk1 en essai clinique

La plupart d'entre eux ont été testés avec succès en phase pré-clinique et sont donc rentrés dans des protocoles d'essais cliniques, résumés dans le tableau 2 ci-dessous (Garrett and Collins, 2011; Lainchbury and Collins, 2011; Matthews et al., 2013; McNeely et al., 2014).

Composé	Etape de développement clinique	Référence
UCN-01	<ul style="list-style-type: none"> - phase II complétée ; en monothérapie dans les lymphomes à cellules T récidivants - phase II complétée ; en combinaison avec le fluorouracil dans le cancer du pancréas - phase II complétée ; en combinaison avec le topotecan dans les cancers de l’ovaire, de la trompe de falope, du péritoine et du poumon à petites cellules - phase II complétée ; en monothérapie dans les mélanomes métastatiques - phase I complétée dans de multiples essais cliniques 	(Fracasso et al., 2011; Kummar et al., 2010; Li et al., 2012c; Ma et al., 2013)
XL-844	<ul style="list-style-type: none"> - phase I ; en combinaison avec la gemcitabine dans des tumeurs avancées - phase I ; en monothérapie dans les LLC terminales 	
LY2603618	<ul style="list-style-type: none"> - phase I complétée ; en combinaison avec le pemetrexed - phase II active ; en combinaison avec le pemetrexed, ou avec le pemetrexed plus cisplatine, dans les cancers du poumon à non petites cellules - phase II active ; en combinaison avec la gemcitabine dans le cancer du pancréas et d’autres tumeurs solides 	(Calvo et al., 2014; Weiss et al., 2013)
LY2606368	<ul style="list-style-type: none"> - phase I en cours de recrutement ; en monothérapie dans des tumeurs avancées, et dans le cancer de la tête et du cou 	
PF-00477736	<ul style="list-style-type: none"> - phase I dans les tumeurs solides ; en combinaison avec la gemcitabine, terminée 	

AZD7762	-phase I complétée ; en monothérapie et en combinaison avec la gemcitabine dans les tumeurs solides	(Sausville et al., 2014)
SCH900776	- phase I complétée ; en combinaison avec la gemcitabine dans les tumeurs solides et le lymphome - phase I en combinaison avec la cytarabine dans les leucémies aiguës myéloïdes, terminée - phase II active ; en combinaison avec la cytarabine dans les leucémies aiguës myéloïdes	(Daud et al., 2015; Karp et al., 2012)
GDC-0575	-phase I en cours de recrutement ; en combinaison avec la gemcitabine et en monothérapie dans le lymphome et les tumeurs solides	
GDC-0425	-phase I en cours de recrutement ; en combinaison avec la gemcitabine et en monothérapie dans le lymphome et les tumeurs solides	

Tableau 2: Liste des inhibiteurs de Chk1 actuellement en essai clinique.

La liste des essais cliniques en cours en cancérologie testant des inhibiteurs de Chk1 est disponible sur internet en suivant le lien :

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Chk1+cancer&Search=Search>.

Le principal problème récurrent des inhibiteurs de Chk1 est leur grande toxicité, qui limite leur utilisation en clinique (Sakurikar and Eastman, 2015). Voilà pourquoi il est pertinent de cibler les types de tumeurs pour lesquelles la synergie entre le traitement chimiothérapeutique et l'inhibiteur de Chk1 est le plus bénéfique. Toute la question est de savoir quels sont les types de tumeurs les plus sensibles à l'inhibition de Chk1 (Thompson and Eastman, 2013).

4.3. Efficacité des inhibiteurs de Chk1

a. L'efficacité des inhibiteurs de Chk1 est conditionnée par son niveau d'expression

Certains cancers du sein triples négatifs présentent une surexpression de Chk1, et il apparaît que ces cellules tumorales sont dépendantes de cette kinase pour leur survie. De ce fait, des études ont montré que dans ce contexte, l'inhibition de Chk1 provoque une mortalité cellulaire, ce qui fait de Chk1 une cible thérapeutique de choix dans ce type de tumeur (Albiges et al., 2014).

Le facteur de transcription c-Myc est un régulateur majeur des voies de signalisation gouvernant la croissance cellulaire et la prolifération. Cet oncogène est dérégulé dans de nombreux cancers, faisant de ses cibles des candidats potentiels intéressants pour le développement de nouvelles thérapies. Or Chk1 est une cible majeure de Myc. L'inhibition de Chk1 dans ce type de tumeurs est alors bénéfique à 3 niveaux : (I) elle permet de limiter le potentiel oncogénique de Myc, (II) elle limite les réponses cellulaires face à l'état de stress répliatif important qu'elles subissent et (III) elle entraîne la ré-expression de PP2A, qui va inhiber Myc par déphosphorylation (Ferrao et al., 2012; Hoglund et al., 2011; Khanna et al., 2013).

Enfin, certains cancers du poumon non à petites cellules surexpriment Chk1. Cette surexpression est corrélée à un mauvais pronostic, et contribue à la résistance aux traitements. L'inhibition de Chk1 dans cette catégorie de tumeurs augmente l'efficacité du traitement (Grabauskiene et al., 2013, 2014)

b. L'efficacité des inhibiteurs de Chk1 est conditionnée par son niveau d'activation

Dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) à caryotype complexe, Chk1 est activée sur les résidus sérine 317 et sérine 345 de manière constitutive, car ces tumeurs présentent une forte instabilité génétique intrinsèque. Dans ce modèle, l'inhibition de Chk1 ou son invalidation par siARN dans des échantillons de patients ou des lignées cellulaires permet de potentialiser le traitement de ces cellules par des agents génotoxiques (Cavelier et al., 2009; Didier et al., 2012).

Dans la suite de l'étude, nous nous intéressons plus généralement au rôle de Chk1 dans la pathogénicité des cellules de LAM.

B. Rôles de Chk1 dans la pathogénicité des LAM

1. Définition des LAM

1.1 Généralités

Les leucémies aiguës myéloïdes font partie des hémopathies malignes. Elles se caractérisent par la prolifération clonale de cellules immatures et non fonctionnelles, les blastes, qui sont bloquées à un stade précoce de leur différenciation. La maladie est d'évolution spontanée rapide, d'où le terme « aiguë ». Les blastes s'accumulent dans la moelle osseuse des os longs, ce qui entraîne un envahissement médullaire puis sanguin et un déficit de cellules matures (insuffisance médullaire), à l'origine des signes cliniques de la maladie. On parle de leucémie aiguë myéloïde lorsque le lignage myéloïde est touché, et de leucémie aiguë lymphoïde (LAL) lorsqu'il s'agit du lignage lymphoïde.

1.2. Origine de la leucémogénèse

Il est communément admis que la leucémie aiguë myéloïde est issue de la prolifération et de l'expansion clonale d'une cellule souche leucémique (CSL). L'origine de l'apparition de la CSL reste toutefois controversée. Au vu du potentiel prolifératif des CSL, il est concevable qu'elles soient issues d'une cellule souche hématopoïétique qui a subi une accumulation de mutations, car ces 2 types cellulaires, CSH et CSL ont en commun cette capacité d'autorenouvellement. De plus, une cellule souche hématopoïétique peut perdurer durant toute la vie de l'individu, et est de ce fait plus susceptible d'accumuler des mutations qu'une cellule plus différenciée. De façon alternative, il est également proposé que les progéniteurs hématopoïétiques engagés puissent subir des mutations qui leur permettent de réacquérir un potentiel de prolifération et d'auto-renouvellement. L'expression de marqueurs myéloïdes dans certaines

cellules leucémiques laisse également supposer que la CSL pourrait être issue d'une cellule déjà engagée dans le lignage myéloïde (Passegué et al., 2003; Taussig et al., 2005).

La CSL a la capacité de recréer une hématopoïèse leucémique avec la même hiérarchie que l'hématopoïèse normale (Bonnet and Dick, 1997). Cette notion suggère que la LAM est en réalité le résultat d'un processus de différenciation similaire à celui de l'hématopoïèse, mais peu contrôlé et non fonctionnel. La cellule souche leucémique a les mêmes propriétés que la cellule souche hématopoïétique. Le tissu leucémique, comme le tissu hématopoïétique sain, est composé de populations de cellules hétérogènes, avec des caractéristiques phénotypiques et des potentiels de prolifération différents. L'hématopoïèse leucémique est organisée en 3 compartiments (figure 26) :

Un compartiment composé de CSL au phénotype immature ayant des capacités d'autorenouvellement.

Un compartiment de progéniteurs leucémiques (CFU-L pour Colony Forming Unit-Leukemia).

Un compartiment majoritaire de cellules leucémiques plus matures, le bulk, bloquées à un stade de la différenciation.

Ainsi, même si l'hétérogénéité intra-tumorale est le résultat de l'accumulation de mutations et de modifications épigénétiques, elle est également due à cette organogenèse (Passegué et al., 2003).

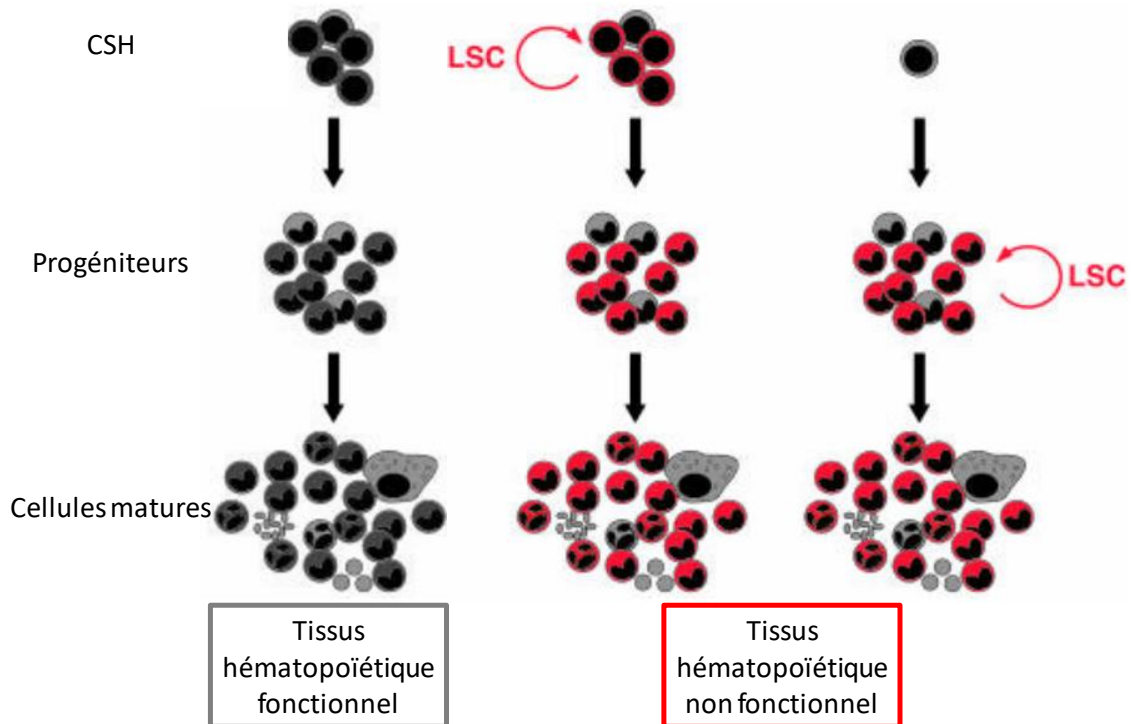


Figure 26: Origine de la CSL. Une LAM peut être représentée comme un nouveau tissu hématopoïétique non fonctionnel, formé à partir de CSL qui subissent un processus de différenciation similaire à celui de CSH. Les CSL peuvent être issues de CSH qui sont devenues leucémiques à la suite de l'accumulation de mutations, ou elles peuvent être issues de cellules progénitrices plus différenciées qui ont récupéré leur capacité d'auto-renouvellement (d'après Passegué et al., 2003).

Une des caractéristiques de la LAM est l'envahissement de la moelle osseuse par les blastes, et l'insuffisance médullaire qui lui est associée. Un des mécanismes provoquant ce phénomène pourrait être la répression négative de l'hématopoïèse normale par les blastes leucémiques. En effet, il a été montré que ces derniers créent un micro-environnement qui provoque le dysfonctionnement des cellules souches hématopoïétiques saines (Colmone et al., 2008)

1.3. Modèles moléculaires de la leucémogénèse

Des études ont été menées pour comprendre les mécanismes qui conduisent à la leucémogénèse. Les événements majeurs dans le processus de tumorigénèse sont divisés en 2 classes, selon l'hypothèse du « two hits model ». Ce modèle de leucémogénèse fait

intervenir des mutations de classe I (FLT3, c-Kit, RAS, c-Myc, cycline ,...), conférant un avantage de prolifération et de survie à la cellule, et des mutations de classe II (AML1, CEBPA, ...), qui provoquent un blocage de différenciation et confèrent un potentiel d'auto-renouvellement (Renneville et al., 2008). Cependant, ce modèle ne prend pas en compte d'autres caractéristiques des cancers, comme l'instabilité génétique, le rôle du micro-environnement, l'échappement à la réponse immunitaire, etc.. Pourtant, ces facteurs sont primordiaux dans l'installation de la maladie et la réponse aux traitements. De plus, l'association d'une mutation de classe I et d'une mutation de classe II ne sont que très rarement observées dans les cellules leucémiques (Corces-Zimmerman and Majeti, 2014; Shlush et al., 2014). Ainsi, ce modèle n'intègre pas les nouvelles données obtenues à partir du séquençage du génome entier de cellules leucémiques, qui permettent de constater que la modulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme (par exemple les mutations sur le gène codant pour l'isocitrate deshydrogénase 1 ou IDH1), et les modulation épigénétiques de la transcription qui conduisent à l'accumulation d'oncoprotéines complètent ce modèle initial de la leucémogénèse (Rocquain et al., 2010; Tefferi, 2010). Le tableau 3 récapitule les mutations actuellement connues dans les LAM :

- Translocations chromosomiques

	Name	Function	Mutation	Frequency in cytogenetically normal AML	Prognosis
t(9;11)	MLLT3-MLL	Epigenetic regulation of transcription	Gene fusion by reciprocal translocation	10%	Intermediate
t(v;11) (v;q23)	MLL-AF-, MLL AF10	Epigenetic regulation of transcription	Gene fusion by reciprocal translocation	10%	Unfavourable
t(8;21)	RUNX2-RUNX1	Regulation of transcription and differentiation	Gene fusion by reciprocal translocation	10%	Favourable
t(15;17)	PML-RARA	Regulation of transcription and differentiation	Gene fusion by reciprocal translocation	5-8%	Favourable
t(16;16 Inv(16)	CBFB-MYH6	Regulation of transcription and differentiation	Gene fusion by reciprocal translocation	5%	Favourable
t(6;9)	DEK-NUP214	Dysregulation of translation	Gene fusion by reciprocal translocation	1%	Unfavourable

- Mutations identifiées par séquençage de gènes candidats

	Name	Function	Mutation	Frequency in cytogenetically normal AML	Prognosis
NPM1	Nucleophosmin	Nucleolar component	Frameshift indel	25-35%, 45-64%	Favourable
FLT3-ITD	Fms-related tyrosine kinase 3	Receptor tyrosine kinase for Flt3 ligand	Internal tandem duplication	28-34%	Unfavourable
FLT3-TKD	Fms-related tyrosine kinase 3	Receptor tyrosine kinase for Flt3 ligand	Tyrosine kinase domain mutations	11-14%	Neutral
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein α	Haematopoietic transcription factor	Mostly biallelic, N-terminal non sense, C-terminal in frame	10-18%	Favourable
RAS	RAS viral oncogene homologue	G-protein associated with receptor tyrosine kinases	Point mutations at codon 12, 13, 61	25% NRAS, 15% KRAS	Neutral
MLL-PTD	Mixed lineage leukaemia partial tandem duplication	Histone H3K4 methyltransferase	N-terminal partial tandem duplication	5-10%	Unfavourable
WT1	Wilms tumour 1	Transcription factor	Frameshift exon 7,9 Missense exon 1,2,3,8	10-13%	Inconclusive
RUNX1	Runt-related transcription factor 1	Haematopoietic transcription factor	Missense and frameshift mutations, indel	5-13%	Unfavourable
KIT	CD117	Receptor tyrosine kinase for stem cell factor	Extracellular portion and activation loop	20-30% of CBF AML	Unfavourable
TP53	Tumour protein 53	Cell cycle control	Mutation of loss due to -17 or 17p-	2%; in CKAML 70%	Unfavourable

- Nouvelles mutations identifiées par séquençage de nouvelle génération

	Name	Function	Mutation	Frequency in cytogenetically normal AML	Prognosis
DNMT3A	DNA methyltransferase 3A	De novo DNA methylation	Point mutation R882 (50%) and whole ORF	20-25%	Inconclusive
IDH1 and IDH2	Isocitrate dehydrogenase 1,2	Conversion of isocitrate to α -ketoglutarate	IDH1:R132, IDH2:R140, R172	15-30%	Favourable
TET2	Ten-11 translocation 2	Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, mediating demethylation	Mainly point and frameshift mutations in exon 3 and 11	10%	Inconclusive
ASXL	Additional sex comb like 1	Epigenetic regulation by interaction with PRC2	Missense, nonsense, and frameshift mutations	5-16%	Unfavourable
STAG2, RAD21, SMC1A, SMC2	Cohesins	Regulation of chromatid separation	Deletions, nonsense, and splice-site mutation	13%	Inconclusive
SF3B1, SRSF2, U2AF35, ZRSR2	Spliceosome complex component	Regulation of RNA splicing	Missense mutation	14%	SF3B1 favourable, SRSF2 unfavourable
PHF6	Plant homeodomain-like finger 6	Potential involvement in DNA/histone modification	Deletion Xq26; gene mutations: frameshift and nonsense 70%, missense 30%	3%	Unfavourable

Tableau 3 : Altérations génétiques retrouvées dans les LAM (d'après Meyer and Levine, 2014)

1.4. Aspects cliniques

Les LAM sont des maladies rares dont l'incidence est d'environ 5 à 8 cas pour 100000 habitants en Europe. Elles représentent malgré tout 80% des leucémies aiguës de l'adulte ; elles peuvent survenir à tout moment de la vie, mais leur fréquence augmente avec l'âge, surtout après 40 ans. L'âge médian de survenue est autour de 67 ans.

a. Diagnostic et pronostic

Le diagnostic de certitude repose sur la présence de plus de 20% de blastes sur le frottis médullaire.

Le pronostic est globalement très mauvais. La survie globale à 5 ans est d'environ 90-95% pour les LAM promyélocytaires, 60% pour les LAM de risque favorable, 40% pour les LAM de risque intermédiaire et 20% pour les LAM de risque défavorable chez les sujets de moins de 60 ans. Chez les sujets âgés de plus de 60 ans, la survie globale à 5 ans est de 20%, voire moins, avec la chimiothérapie intensive. Cependant, le pronostic est très variable en fonction du type de LAM (déterminé en fonction de la cytogénétique, de l'immunomarquage et de la biologie moléculaire), de l'âge au diagnostic, de l'évolution de la maladie, de la réponse au traitement, et du caractère secondaire de la LAM.

b. Prise en charge thérapeutique

Elle dépend de l'âge du patient

- Patient âgé de plus de 60 ans : il repose sur des traitements par des agents déméthylants, une thérapie ciblée, des traitements de support, ou une allogreffe.

- Patient âgé de moins de 60 ans : il repose sur la chimiothérapie intensive, après élimination des contre-indications. Ce traitement comporte une cure d'induction, qui a pour but d'obtenir une rémission complète (c'est-à-dire un examen clinique normal avec une normalisation de l'hémogramme), et des cures de consolidation, qui ont pour objectif de diminuer le risque de rechutes.

Le traitement d'induction se compose d'anthracyclines (un inhibiteur des topoisomérases II) pendant 3 jours, suivies de cytarabine (ou aracytine, AraC) pendant 7 jours. L'aracytine est un terminateur de chaîne, c'est-à-dire qu'il est incorporé dans le brin néo-synthétisé de l'ADN lors de la réplication et qu'il va entraîner un blocage des polymérase répliquatives, ce qui va créer un état de stress répliquatif et des dommages de l'ADN. La cytarabine est aussi un inhibiteur des polymérase répliquatives.

La rémission complète est obtenue dans 85% des cas chez le sujet jeune, contre 65% des cas chez le sujet de plus de 60 ans.

Les cures de consolidation sont adaptées en fonction de la maladie, elles sont à base de cytarabine, et peuvent comporter une allogreffe dans les cas de mauvais pronostic.

Au terme de ce traitement, 45% des sujets jeunes, et 64% des sujets de plus de 60 ans rechutent. Ainsi, le pronostic demeure très sombre et les alternatives thérapeutiques inexistantes. Dans ce contexte, il semble pertinent de s'intéresser au rôle de Chk1 dans ces cancers, et à l'impact de son inhibition sur l'efficacité du traitement chimiothérapeutique.

2. Chk1 et LAM

2.1. Utilisation d'inhibiteurs de Chk1 en monothérapie

Le traitement de lignées leucémiques a permis d'établir que ces cancers sont particulièrement sensibles à l'inhibition de Chk1, comparé à des lignées de cancer du côlon ou de cancer du poumon. Dans ces cancers liquides, l'inhibition de Chk1 par l'inhibiteur V158411 a pour effet de provoquer la mort cellulaire, avec une fragmentation du noyau dépendante et indépendante des caspases. L'analyse des paramètres pharmacocinétiques a permis de mettre en évidence une diminution des niveaux protéiques de Chk1, et de la cycline B1, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de CDK1 sur la tyrosine 15 et de H2AX sur la sérine 139 de façon dose-dépendante de l'inhibiteur de Chk1. Ainsi, l'utilisation des inhibiteurs de Chk1 dans ces cancers semble intéressant (Bryant et al., 2014). Les travaux de Iacobucci et al. confirment ces conclusions, car ils montrent que dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de

leucémie aiguë lymphoblastique, l'inhibition de Chk1 seule (par le PF-00477736) entraîne une augmentation des dommages de l'ADN associée à de la mortalité cellulaire (Iacobucci et al., 2015).

2.2. Utilisation d'inhibiteurs de Chk1 en combinaison avec un agent génotoxique

La résistance de certaines cellules leucémiques aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels demeure un obstacle majeur dans l'amélioration de la survie et de la guérison de ces cancers. Dans ce cadre, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques prend tout son sens. L'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 par l'inhibiteur ABT-199 a montré des premiers résultats précliniques prometteurs, mais les résistances à ce traitement demeurent préoccupantes, et seraient dues à la surexpression d'une protéine de la famille de Bcl-2, la protéine Mcl-1. L'utilisation d'un inhibiteur de Chk1, le LY2603618 en combinaison avec l'ABT-199 semble diminuer l'apparition de résistances. Ce résultat s'explique pour 2 raisons : (I) l'inhibition de Chk1 entraîne la formation de dommage de l'ADN et l'abolition du point de contrôle G2/M, et donc provoque la mort cellulaire par catastrophe mitotique, et (II) l'apparition des dommages de l'ADN s'accompagne d'une diminution de l'expression de Mcl-1, et donc une diminution des résistances à l'inhibition de Bcl-2 (Zhao et al., 2014)

D'autre part, il apparaît que l'inhibition de Chk1 augmente l'effet antiprolifératif de la cytarabine, sur des lignées cellulaires de LAM mais aussi sur des échantillons primaires de patients, à des concentrations qui ont un impact négligeable sur les progéniteurs myéloïdes sains. Cet effet passe par une létalité synthétique entre les 2 composés : la cytarabine induit des dommages de l'ADN qui provoquent l'activation du point de contrôle de phase S ; l'inhibition de Chk1 provoque la levée du point de contrôle, conduisant à des catastrophes mitotiques (Schenk et al., 2012). De la même manière, il y a une synergie entre l'inhibition des topoisomères et l'inhibition de Chk1 dans les leucémies ayant la mutation FLT3 – ITD (Yao et al., 2007).

Cette synergie semble d'autant plus intéressante que les cellules présentent une forte instabilité génétique endogène et une activation constitutive des acteurs des points de

contrôles des dommages de l'ADN. Ainsi, la sous-catégorie des leucémies à caryotype complexe est une cible thérapeutique pertinente. En effet, l'inactivation de Chk1 dans des cellules primaires de LAM à caryotype complexe entraîne une diminution drastique de leur potentiel clonogénique, ainsi qu'une bonne sensibilisation au traitement par la cytarabine. En revanche, l'inactivation de Chk1 n'a aucun impact sur les propriétés clonogéniques des progéniteurs hématopoïétiques sains (Cavelier et al., 2009; Didier et al., 2012).

Enfin, des travaux précédents de l'équipe d'accueil ont pu mettre en évidence une nouvelle voie de phosphorylation de Chk1 sur le résidu sérine 280 dans les cellules leucémiques présentant la mutation FLT3-ITD. En effet, dans ces cellules, le niveau de Chk1 phosphorylé sur le résidu sérine 280 est élevé, et cette phosphorylation est catalysée par les kinases Pim, exprimées en aval du récepteur FLT3-ITD. La phosphorylation sur la sérine 280 n'a pas d'impacts sur la localisation sub-cellulaire de Chk1, mais renforce ses fonctions d'activation du point de contrôle du cycle cellulaire en réponse à des traitements génotoxiques. Ainsi, l'inhibition du récepteur FLT3, des kinases Pim ou de Chk1 potentialise le traitement par un inhibiteur des topoisomérases car les cellules outrepassent le point de contrôle des dommages de l'ADN et meurent par catastrophe mitotique. Ces résultats ont conduit à l'identification d'une nouvelle voie de signalisation impliquée dans la prolifération cellulaire et dans la résistance des cellules de LAM porteuses de la mutation FLT3-ITD aux agents génotoxiques, et à la description d'une nouvelle voie de régulation de la phosphorylation de Chk1 sur le résidu sérine 280 dans les LAM (Yuan et al., 2014a, 2014b).

En conclusion de cette partie, l'impact de Chk1 dans la tumorigenèse et la résistance aux traitements chimiothérapeutiques n'est pas neutre, car une sous-expression ou une sous-activation de cette kinase favorise l'instauration d'un état d'instabilité génétique propice à l'évolution tumorale, alors qu'une surexpression ou une suractivation de Chk1 permet le maintien d'un contrôle de l'état de stress réplcatif lié à la prolifération des cellules néoplasique.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Composante clé du cycle cellulaire, la sérine-thréonine kinase Chk1 est associée aux différents points de contrôle (G1/S, intra-S, G2/M et mitotique). Essentielle en réponse aux dommages de l'ADN, elle participe également à la régulation du cycle cellulaire normal en contrôlant, notamment, le bon déroulement de la réplication et de la mitose. De plus, outre ces fonctions canoniques, des études récentes suggèrent que Chk1 pourrait avoir d'autres fonctions, indépendamment de celles de réponses aux dommages de l'ADN, dans des contextes cellulaires particuliers.

Le premier axe de ma thèse s'inscrit dans ce cadre, et s'intéresse à des nouvelles fonctions de Chk1 au cours de la différenciation myéloïde normale. En particulier, l'objectif de cette étude est de déterminer le statut et le rôle de Chk1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire.

Le deuxième axe de ma thèse s'intéresse à l'impact du niveau d'expression de Chk1 sur la résistance des cellules de LAM aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels. Les LAM se caractérisent par l'accumulation de cellules leucémiques immatures et un blocage du programme de différenciation, qui interfèrent avec la production de cellules hématopoïétiques normales. Les patients atteints de LAM sont traités avec des molécules qui induisent des dommages au niveau de l'ADN. Mais dans ces cellules tumorales, des mécanismes de détection existent qui peuvent activer les points de contrôle du cycle cellulaire et permettre la réparation de ces lésions, possiblement à l'origine de résistances aux chimiothérapies conventionnelles. La protéine Chk1, acteur majeur du cycle cellulaire, pourrait favoriser l'apparition de ces résistances. Ainsi, l'objectif de ce projet est de définir s'il existe un lien entre la résistance des cellules leucémiques aux thérapies conventionnelles et le statut d'expression et l'activité de la kinase Chk1.

PARTIE 2 : RESULTATS

I. Rôle de Chk1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire

A. Contexte scientifique

Actuellement, peu d'études ont été réalisées sur l'importance des acteurs du cycle cellulaire dans le déroulement de l'hématopoïèse ; pourtant des travaux soulignent l'importance des kinases Aurora, et des kinases Plk ou encore des kinases Pim au cours de la différenciation mégacaryocytaire. En ce qui concerne Chk1, une étude réalisée à partir de souris hétérozygotes Chk1^{+/-} indique, sans le commenter, que ces souris présentent une diminution du nombre de plaquettes circulantes (Boles et al., 2010). Ce résultat nous a amené à émettre l'hypothèse selon laquelle Chk1 pourrait intervenir au niveau de la différenciation mégacaryocytaire et/ou jouer un rôle au sein même de la plaquette, et une diminution de son expression conduirait à la formation de plaquettes non fonctionnelles rapidement dégradées. Cette seconde hypothèse est corroborée par le fait que 2 analyses transcriptomiques ont pu mettre en évidence la présence de l'ARNm de Chk1 dans des plaquettes humaines et murines (Burkhart et al., 2012; Rowley et al., 2011). Pourtant, les expériences que j'ai menées au laboratoire n'ont pas permis ni de mettre en évidence un rôle éventuel de Chk1 dans la coagulation plaquettaire in vitro, principale fonction des plaquettes, ni de démontrer que Chk1 est présente au niveau protéique dans ces cellules spécialisées. Nous avons donc concentré nos efforts sur la compréhension du rôle de Chk1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire.

Dans ce contexte les objectifs du premier axe de ma thèse sont (I) d'évaluer le rôle de Chk1 ainsi que son statut d'expression et de phosphorylation au cours de la différenciation mégacaryocytaire, (II) d'étudier les voies de signalisation impliquées dans sa régulation au cours de la différenciation, et (III) de rechercher les partenaires de Chk1 au cours de la mégacaryocytopoïèse.

Ce projet fait l'objet d'une collaboration avec la Dr. Sonia SEVERIN, chercheuse au sein de l'équipe 11 de l'I2MC (Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires), dirigée par le Pr. Bernard PAYRASTRE.

B. Matériel et méthodes

1. Modèles cellulaires de différenciation mégacaryocytaire

L'étude de la différenciation mégacaryocytaire a été réalisée dans un premier temps sur des lignées leucémiques modèles capables de se différencier dans le lignage mégacaryocytaire, et les résultats obtenus ont été confirmés sur du matériel primaire murin.

Les lignées leucémiques utilisées sont :

- Les HEL, lignée érythroleucémique harborant la mutation JAK V617 qui entraîne son activation constitutive, induites en différenciation par un traitement au Phorbol Myristate Acetate (PMA) 1.5nM pendant 3 jours.
- Les Meg01 et les K562, lignées de leucémie myéloïde chronique caractérisées par la translocation BCR-ABL, et induites en différenciation par le traitement à la PMA 100nM pendant 3 jours
- Les UT7-11oc1 (UT7), lignée cellulaire de leucémie mégacaryoblastique surexprimant le récepteur à la TPO, et induites en différenciation par un traitement à la TPO 10ng/mL pendant 3 jours.

Les cellules murines sont extraites de la moelle osseuse des os longs (fémur et tibia) des pattes arrières de souris C57BL/6. L'enrichissement en progéniteurs mégacaryocytaires s'effectue par lyse des érythrocytes, et par appauvrissement en macrophages, monocytes, lymphocytes B, granulocytes et cellules Natural Killer par sélection négative grâce à des anticorps dirigés contre des protéines de surface spécifiques de ces cellules (Gr-1, B220, CD16/32, CD11b). Les cellules résiduelles après cette étape sont en majorité des cellules progénitrices mégacaryocytaires, qui peuvent être cultivées *in vitro* dans du milieu Stempro complet et peuvent être induites en différenciation par un traitement à la TPO 50ng/mL pendant 4 jours.

2. Méthodes d'évaluation de la progression de la différenciation mégacaryocytaire

Le suivi de la progression de la différenciation mégacaryocytaire peut être évalué de 2 manières :

- En mesurant l'apparition de marqueurs de surface spécifiques de la différenciation mégacaryocytaire par cytométrie en flux après avoir marqué les cellules grâce à des anticorps couplés à un fluorochrome. Nous avons utilisé le marqueur de surface CD61 et les marqueurs CD42b et GPVI pour suivre la progression de la différenciation dans respectivement les lignées cellulaires et les cellules primaires murines.
- En mesurant la polyploïdisation des cellules, qui est le reflet de leur état de maturation nucléaire. Pour cela, les lignées cellulaires ou les cellules primaires sont récupérées après 3 jours de traitement par l'agent différenciant, puis elles sont laissées à sédimenter à travers un gradient de 1% à 3% de BSA afin de les trier selon leur poids. Les cellules les plus lourdes sont les plus différenciées. Au bout de 45 minutes, on récupère le bas du gradient, enrichi en cellules polyploïdes. Cette étape permet de concentrer la population en cellules différenciées, qui sont peu abondantes au sein de la population totale de cellules. Puis ces cellules sont fixées – 50% EtOH pour les lignées cellulaires, 0.5% PFA pour les cellules primaires - et marquées par une solution contenant de l'iodure de propidium. L'évaluation du cycle cellulaire par cytométrie en flux permet alors de mesurer l'état de polyploïdisation des cellules.

3. Méthode d'évaluation de la formation de proplaquettes à partir d'explants de moelle osseuse de souris

Les explants qui vont servir à l'observation de la formation de proplaquettes sont récupérés à partir des os longs de souris. Puis ils sont coupés en tranches, et répartis dans des boîtes de pétri à 4 puits, dans du Tyrode Buffer contenant du sucrose, de l'Hepes et de la BSA, et ce milieu est supplémenté en sérum de souris. Après 2 heures d'incubation à 37°C, 5% CO₂, le suivi de la formation des proplaquettes à partir des mégacaryocytes matures, facilement reconnaissables car ils constituent des cellules géantes, peut se faire par une expérience de videomicroscopie sur 15 heures.

C. Résultats

Afin de déterminer si Chk1 joue un rôle au cours de la différenciation mégacaryocytaire, j'ai mené une approche par inhibition pharmacologique dans un premier temps en traitant la lignée modèle HEL à la dose de 500 nM d'un inhibiteur de Chk1 (SCH-900776) lors de l'induction de la différenciation par un traitement au PMA. Les cellules sont récupérées à 72h et marquées avec un anticorps dirigé contre le marqueur de surface CD61, qui est exprimé au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Puis ces cellules sont analysées par cytomètre en flux.

Les résultats sont présentés sous forme d'un ratio correspondant au pourcentage de cellules positives en présence de PMA rapporté au pourcentage de cellules positives dans la condition non traitée. L'analyse de ces résultats montre que le nombre de cellules positives pour ce marqueur augmente en présence de PMA, indiquant que les cellules se différencient correctement dans nos conditions expérimentales (figure 27 A). L'inhibition de Chk1 induit une diminution du nombre de cellules positives pour le marqueur CD61 en présence de PMA. Le pourcentage de diminution moyen à 72h est de 30.6% (Figure 27 A). L'inhibition de Chk1 semble donc conduire à un blocage partiel de la différenciation.

Pour conforter ce résultat, j'ai évalué le rôle de Chk1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire en mesurant l'état de polyploïdisation des cellules HEL par une approche d'inactivation par une technique d'ARN interférence (shRNA). Les cellules ont subi une étape de transduction avec des particules virales contenant les shRNA contrôle et les shRNA dirigés contre Chk1 72h avant d'être induites en différenciation par un traitement au PMA. Les cellules transduites avec le shRNA contrôle ont subi de nombreuses endoréplifications allant jusqu'à 32N, la majorité des cellules ayant un contenu nucléaire de 4, 8 ou 16N (26,4%, 24,5% et 19,7% respectivement) (Figure 27 B panel de gauche). La polyploïdisation est donc bien effective dans ces cellules. Les cellules transduites avec le shRNA dirigé contre Chk1 ont subi moins d'endomitoses. 47,1% et 31,6% des cellules ont, respectivement, un contenu nucléaire de 2N ou 4N. La majorité des cellules présentent donc un blocage de la polyploïdisation. En effet, seulement 2,65% des cellules sont au stade 8N, et 5,91% des cellules au stade 16N (figure 27 B panel du milieu). Ces résultats suggèrent que Chk1 joue un rôle au niveau du processus

d'endoréplication. Un western blot réalisé en parallèle nous confirme l'invalidation de Chk1 lors de cette expérience (figure 27 B panel de droite).

J'ai ensuite réalisé des expériences sur du matériel primaire murin afin de confirmer les résultats concernant le rôle de Chk1 dans la différenciation mégacaryocytaire obtenus avec la lignée HEL. Après récupération des progéniteurs mégacaryocytaires murins à partir des os longs de souris, ces cellules sont traitées à la TPO pendant 3 jours (50ng/mL) avec ou sans SCH900776 (500nM). L'étude de deux marqueurs de surface, CD42b et GPVI, après 72h de traitement permet de mesurer l'impact de l'inhibition de Chk1 sur la différenciation de ces cellules. Nous avons observé dans ces expériences une diminution de 24.4% de cellules positives pour le marqueur de surface CD42b en présence du SCH900776 (figure 27 C), et une diminution de 44.7% pour le marqueur de surface GPVI (figure 27 D).

En parallèle, l'analyse de la polypléidisation par cytométrie en flux dans ces mêmes conditions montre que les cellules ayant été traitées avec le SCH900776 ont subi moins d'endomitoses que les cellules de la condition contrôle. En effet, une quantité d'ADN allant jusqu'à 64N par cellule est observée pour la condition contrôle, alors qu'en présence de l'inhibiteur, les cellules atteignent seulement 32N. La majorité des cellules subissent donc un blocage de la polypléidisation lorsque Chk1 est inhibée (Figure 27 E). L'ensemble de ces résultats confirme que l'activité catalytique de Chk1 est nécessaire au bon déroulement du processus de différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL et des cellules primaires murines.

Figure 27

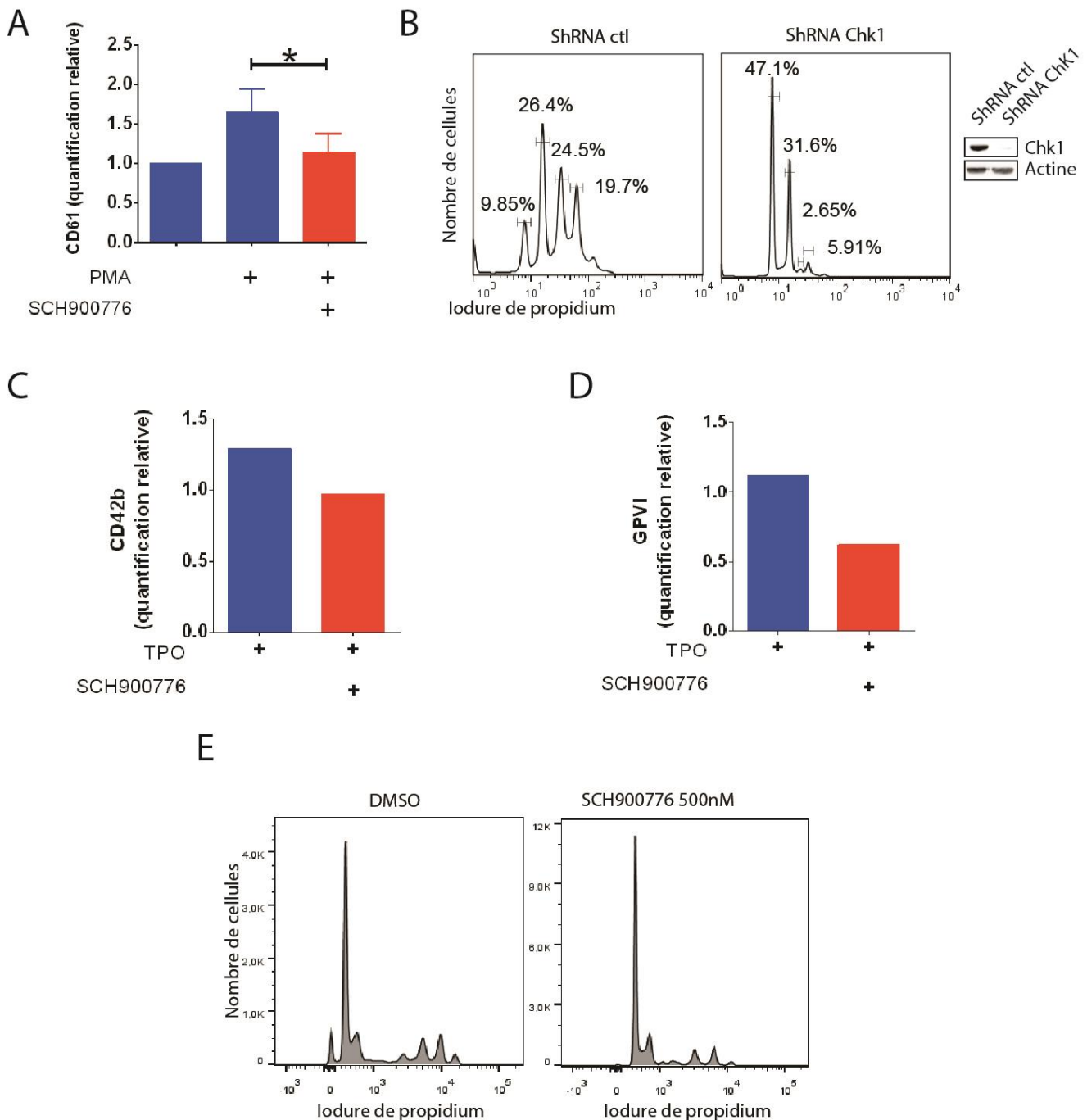


Figure 27 : Chk1 est impliquée dans la progression de la différenciation mégacaryocytaire. (A) Analyse du marqueur de surface CD61 (n= 4 ; *, p=0.0391) dans la lignée HEL à 72h en présence de PMA 3nM avec (colonne rouge) ou sans (colonne bleue) traitement avec le SCH-900776, 500nM. **(B)** Analyse de la polyploïdisation par un marquage au iodure de propidium dans les cellules HEL transduites par le shRNA contrôle ou le shRNA dirigé contre Chk1 puis traitées à la PMA 72h après, pendant 3 jours (n=3) . Un western blot **(B)** est réalisé sur ces cellules pour vérifier le niveau d'expression protéique de Chk1. **(C – D)** Analyse des marqueurs de surface CD42b (n=1) **(C)** et GPVI (n=1) **(D)** après 72h de traitement à la TPO 50ng/mL sur des progéniteurs mégacaryocytaires murins avec (colonne rouge) ou sans (colonne bleue) SCH900776 500nM. **(E)** Analyse de la polyploïdisation par un marquage au iodure de propidium dans des progéniteurs mégacaryocytaires murins traités après 72h de traitement à la TPO 50ng/mL (n=7).

Après avoir démontré que la kinase Chk1 jouait un rôle majeur au cours de la différenciation mégacaryocytaire, j'ai évalué son statut d'expression et de phosphorylation par western blot, à différents temps, sur la lignée modèle HEL traitée au PMA.

Les résultats ne montrent pas de modulation significative du niveau d'expression de la protéine totale, du moins au cours des premières 48 heures (figure 28 A). Nous avons voulu évaluer le niveau de phosphorylation des sérines 317 et 345 car la forte accumulation de matériel nucléaire au sein d'un mégacaryocyte peut le rendre particulièrement sensible aux dommages de l'ADN. Cependant, aucune variation significative des niveaux de phosphorylation sur ces résidus n'est constatée (figure 28 A). Nous avons alors porté notre attention sur la phosphorylation de la sérine 280, par ailleurs étudiée dans l'équipe dans des cellules en mitose. Au cours de la différenciation mégacaryocytaire, une forte augmentation du niveau de phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280 a lieu dès 30 min après traitement au PMA, et elle s'estompe à partir de 24h de traitement (Figure 28 A). Cette expérience a été reproduite dans les lignées K562 et Meg01. Nous avons pu mesurer une augmentation de la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280 significative dans les 3 lignées modèles traitées au PMA, à savoir les HEL, les K561 et les Meg01 (Figure 28 B).

Il semblerait donc qu'une phosphorylation précoce de Chk1 sur la sérine 280 ait lieu au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Ce résultat a été conforté en induisant la différenciation sur la lignée modèle UT7 avec de la TPO. Avec cet autre agent différenciant plus physiologique, nous pouvons constater une augmentation de la phosphorylation sur la sérine 280 dès 3h de traitement, ce qui confirme nos résultats précédents obtenus avec la PMA (figure 28 C). Ces résultats ont aussi été confirmés sur des progéniteurs primaires murins récupérés des os longs de souris et traités avec de la TPO pendant 3h (Figure 28 D). Dans tous les cas, la stimulation par la TPO entraîne une augmentation de phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280.

Nous avons donc montré que la sérine 280 est phosphorylée au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Nous avons ensuite souhaité déterminer dans quel contexte cette phosphorylation pouvait avoir lieu. En effet, la kinase Chk1 est connue pour être phosphorylée sur les sérines 345 et 317 par la kinase ATR en réponse aux dommages à l'ADN. Dans nos expériences de traitement des HEL au PMA, les niveaux de ces phosphorylations ne varient pas. Nous avons tout de même évalué le niveau de la phosphorylation sur la sérine 139

du variant d'histone H2AX, qui a lieu en réponse aux dommages à l'ADN. Dans nos expériences, le niveau de γ H2AX reste constant (figure 28 E). Chk1 ne semble donc pas phosphorylée sur la sérine 280 en réponse à des dommages de l'ADN dans ce contexte.

D'autre part, pour vérifier que les cellules HEL ne sont pas engagées dans des processus de mort cellulaire précoce lié au traitement au PMA, nous avons utilisé des protéines marqueurs de l'apoptose, comme la caspase 3 et la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), qui sont clivées dans ce contexte de mort cellulaire. Ces 2 protéines ne sont clivées que tardivement - à partir de 48 h - ce qui pourrait être attribué à une forte confluence cellulaire (figure 28 F). Les cellules HEL ne sont donc pas engagées dans un processus d'apoptose précoce.

Figure 28

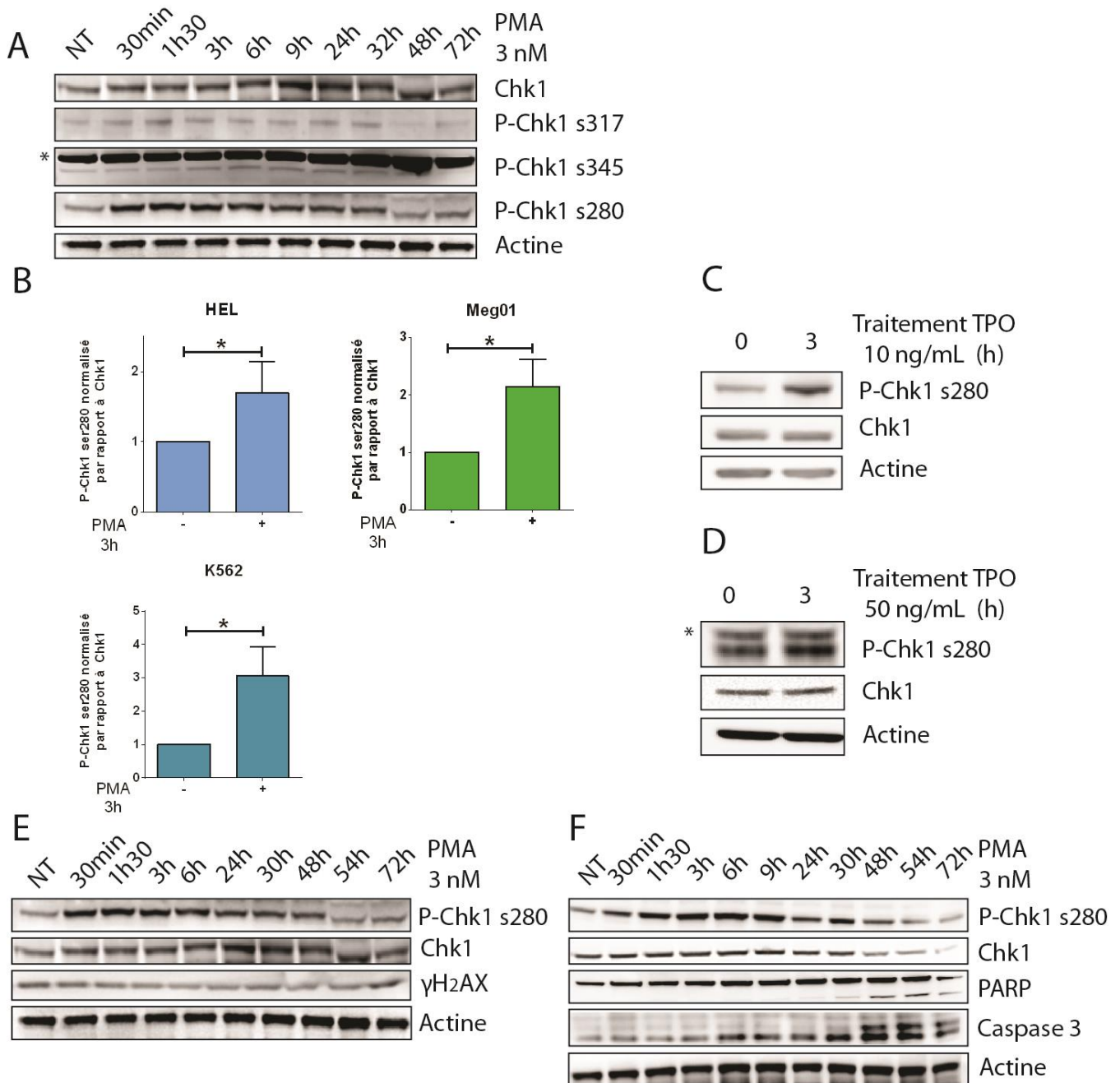


Figure 28: Chk1 est phosphorylée précocement sur le résidu sérine 280 au cours de la différenciation mégacaryocytaire. (A) Cinétique d'expression protéique de Chk1 et de son statut de phosphorylation au cours de la différenciation de la lignée HEL traitée avec 3nM PMA (n=5). (B) quantification de l'augmentation de la phosphorylation sur la sérine 280 dans les lignées modèles après 3h de traitement à la PMA. Le niveau de phosphorylation est relativisé par rapport au niveau d'expression de la kinase Chk1. Ces résultats ont ensuite été normalisés par rapport aux résultats des cellules non traitées PMA (analyse statistique par un t-test non apparié avec correction de Welch, HEL, n=5, *, p=0,0118; K562, n=3, *, p=0,0182; Meg01, n=3, *, p=0,0172). (C - D) Expression protéique de Chk1 et de son niveau de phosphorylation sur la sérine 280 après 3h de traitement TPO 10ng/mL dans la lignée UT7 (C) (n=4) ou après 3h de traitement TPO 50ng/mL dans les progéniteurs mégacaryocytaires murins (D) (n=3). (E - F) Analyse de γH2AX (E) et du clivage de PARP et caspase 3 (F) au cours de la cinétique de différenciation de la lignée HEL avec 3nM PMA (n=5).

Nous avons ensuite cherché à déterminer quelle pouvait être la ou les kinase(s) phosphorylant Chk1 sur ce résidu. En effet, dans la littérature, trois kinases ont été décrites comme pouvant phosphoryler cette sérine en fonction du contexte cellulaire : la kinase Akt, les kinases p90 RSK et les kinases Pim. Pour déterminer laquelle intervient potentiellement au cours de la mégacaryocytopoïèse, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques de ces kinases au cours de la différenciation.

Nos résultats montrent que dans les cellules UT7 le traitement des cellules par un inhibiteur d'Akt (inhibitor VIII, 5 μ M) ne modifie pas la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280 induite par 3h de traitement à la TPO. Akt ne semble donc pas impliqué dans la régulation de Chk1 dans ce modèle (Figure 29 A). Ce résultat a été reproduit sur les autres lignées modèles (HEL, K562 et Meg01) traitées au PMA (données non montrées).

En revanche, le traitement des cellules HEL avec un inhibiteur des kinases MEK (PD0325901, 100nM), qui se situent en amont des kinases P90 RSK, avant l'induction de la différenciation au PMA entraîne une nette diminution de la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280 (figure 29 B). Ce résultat a été reproduit sur les autres lignées modèles (K562 et Meg01) traitées au PMA ainsi que sur les UT7 traitées à la TPO (données non montrées).

Cette forte réduction du niveau de phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280 est également observée dans la lignée HEL après traitement par l'inhibiteur de Pim (SGI-1776, 5 μ M) puis le traitement au PMA (figure 29 C). Ce résultat a été reproduit sur les autres lignées modèles (K562 et Meg01) traitées au PMA ainsi que sur les UT7 traitées à la TPO (données non montrées).

Enfin, la combinaison des traitements avec les 2 inhibiteurs provoque une diminution presque totale de la phosphorylation de Chk1 en sérine 280 dans la lignée HEL traitée au PMA (Figure 29 C). Ce résultat a été reproduit sur les autres lignées modèles (K562 et Meg01) traitées au PMA ainsi que sur les UT7 traitées à la TPO (données non montrées).

J'ai confirmé ces résultats par des approches d'interférence à l'ARN. La co-transfection des cellules HEL avec des siARN dirigés contre Pim1 et Pim2 entraîne une diminution de la phosphorylation de Chk1 en sérine 280 liée au PMA (Figure 29 D). Une forte diminution du niveau de phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280 liée au PMA est également constatée dans les cellules HEL co-transfectées avec des siARN dirigés contre RSK1 et RSK2, par rapport à la condition contrôle (figure 29 E), ce qui suggère qu'au sein de la voie MEK/ERK, ce sont les

kinases P90RSK qui sont responsables de la phosphorylation de Chk1 dans ce contexte. Ces résultats ont été reproduits sur les autres lignées modèles (K562 et Meg01) traitées au PMA ainsi que sur les UT7 traitées à la TPO (données non montrées).

Enfin, j'ai pu renforcer ces résultats par des approches pharmacologiques dans les cellules primaires murines. Les progéniteurs murins sont récupérés à partir des os longs des souris et ils sont mis en culture en présence des inhibiteurs des kinases MEK (PD0325901, 100nM) ou des kinases Pim (SGI-1776, 5 μ M) et traités à la TPO. Après 3h de traitement, les cellules sont récupérées et un western-blot est réalisé (figure 29 F). Nous pouvons constater que les inhibiteurs entraînent également une diminution de phosphorylation de Chk1 sérine 280 liée au traitement à la TPO dans ces cellules primaires. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la phosphorylation de Chk1 sur le résidu 280 au cours de la différenciation mégacaryocytaire est permise par les kinases Pim et les kinases p 90 RSK.

Figure 29

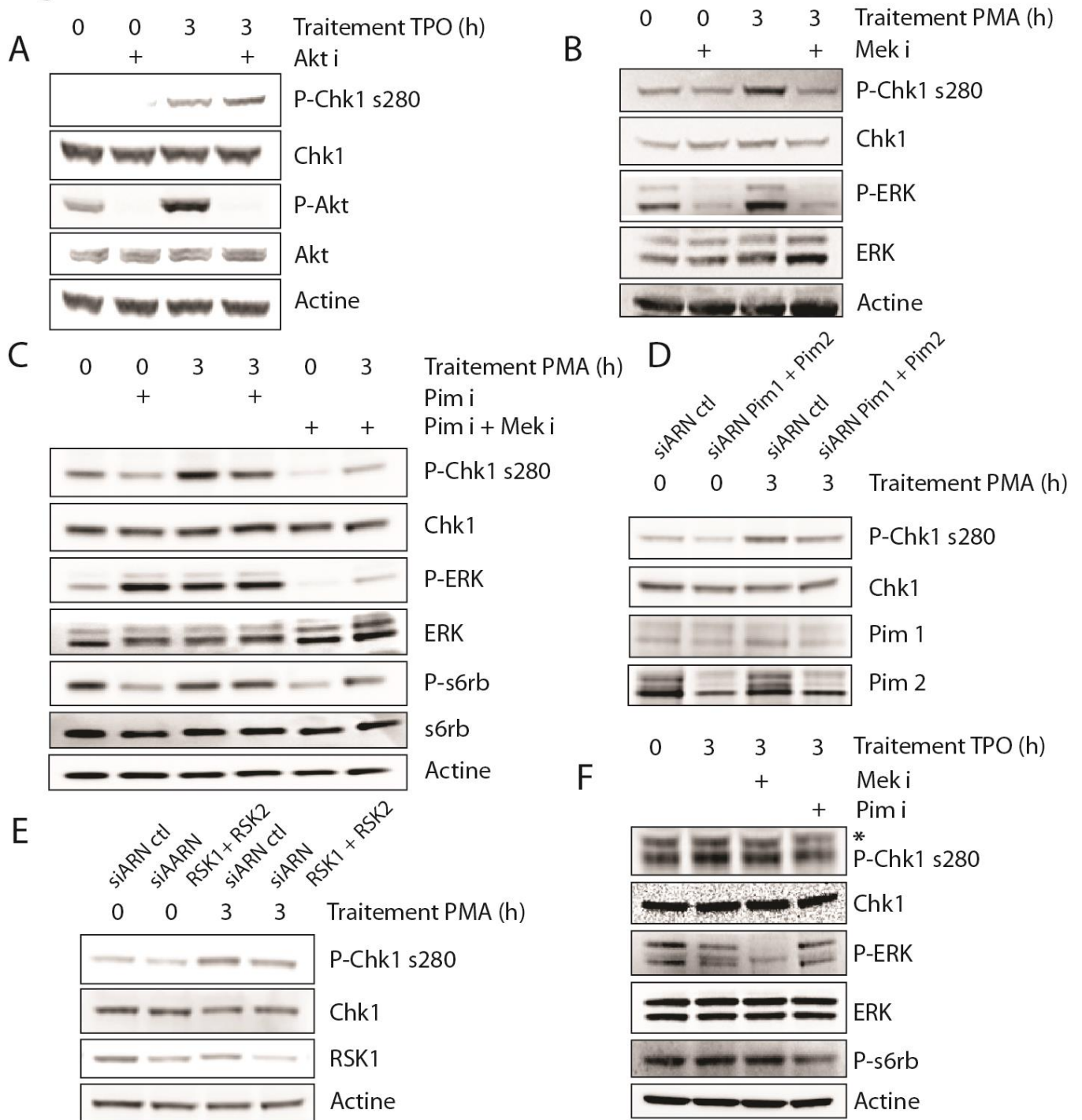


Figure 29 : Les kinases p90 RSK et les kinases Pim sont responsables de la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280. (A – C) Les cellules UT7 (A) ou HEL (B – C) sont prétraitées pendant 1h avec l’inhibiteur d’Akt (inhibitor VIII 5µM) (A), de MEK (PD0325901 100nM)(B), de Pim (SGL-1776 5 µM)(C) ou de la combinaison des inhibiteurs de MEK et Pim (PD0325901 100nM + SGL-1776 5 µM) (C, les 2 dernières pistes) avant un traitement à la TPO 50ng/mL (UT-7) ou PMA 2ng/mL (HEL) pendant 3h (n=3, résultats reproductibles sur les 4 lignées modèles). La diminution de phosphorylation de ERK valide l’efficacité de l’inhibiteur de MEK, la diminution de phosphorylation de s6rb valide l’efficacité de l’inhibiteur des kinases Pim. (D – F) Résultats confirmés dans la lignée HEL par des approches par siARN 300nM dirigés contre les kinases Pim (D), les kinases RSK (E) (n=3). (F) Résultats confirmés dans les progéniteurs mégacaryocytaires murins. Les cellules sont prétraitées pendant 1h avec le PD0325901 100nM, ou le SGL-1776 5 µM puis traitées à la TPO pendant 3h.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux partenaires potentiels de Chk1 phosphorylée sur la sérine 280 au cours de la différenciation mégacaryocytaire, car parmi ces partenaires peuvent se trouver des substrats de Chk1 permettant de comprendre ses fonctions au cours de la différenciation. Différents éléments de la littérature nous amènent à évaluer le lien entre Chk1 et Plk1 au cours de la mégacaryocytopoïèse. En effet, Plk1 est une kinase qui régule de nombreux acteurs de la mitose, un processus dont le déroulement est très particulier dans les mégacaryocytes puisqu'il s'agit d'endomitoses, et elle est elle-même contrôlée par Chk1 au cours de la progression mitotique (Tang et al., 2006a). De plus, Trakala et al. montrent l'importance de Plk1 dans la bonne progression de la polyloïdisation. Cette étude réalisée à partir de souris déficientes pour Plk1 permet de démontrer que le point de contrôle mitotique est finement régulé dans les mégacaryocytes, en particulier par Plk1, et que son invalidation concourt à un blocage de la différenciation (Trakala et al., 2015; Yagi and Roth, 2006). Par ailleurs, des travaux en cours au sein de l'équipe ont permis de mettre en évidence que Plk1 est un partenaire de Chk1 phosphorylée sur le résidu sérine 280 dans des cellules en mitose (données non publiées). C'est la raison pour laquelle j'ai réalisé des expériences pour établir si Chk1 et Plk1 interagissent au cours de la différenciation mégacaryocytaire.

L'immunoprécipitation (IP) de la forme phosphorylée sur la sérine 280 de Chk1 dans les HEL traitées 3h avec la PMA révèle la présence de Plk1 dans la fraction immunoprécipitée (Figure 30 A). Quand l'immunoprécipitation est réalisée sur des cellules invalidées pour Chk1 par interférence à l'ARN, Plk1 n'est pas présent, ce qui démontre la spécificité de cette co-immunoprécipitation. Réciproquement, l'IP de Plk1 dans des HEL traitées avec la PMA permet de mettre en évidence la présence de P-Chk1 sérine 280 dans la fraction immunoprécipitée. Le contrôle négatif effectué grâce à un anticorps isotypique (IgG), permet de valider la spécificité de l'expérience (Figure 30 B). Ainsi, ces résultats suggèrent que P-Chk1 sérine 280 et Plk1 co-immunoprécipitent dans un même complexe dans des cellules en cours de différenciation mégacaryocytaire.

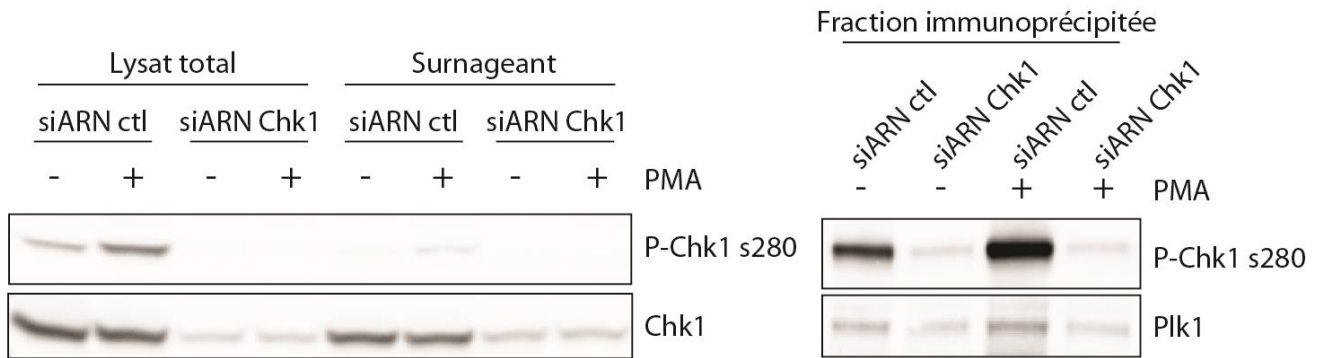
J'ai ensuite étudié si des cibles connues de Plk1 étaient modifiées au cours de la différenciation, telles que la protéine Emi1. Emi1 a la capacité d'inhiber l'activité du complexe APC, et sa dégradation par le complexe SCF β TrCP est nécessaire pour permettre l'activation du complexe APC. Emi1 est une cible de Plk1, qui la phosphoryle et entraîne alors sa dégradation. La diminution d'expression de Emi1 est donc considérée comme un reflet de

l'activité de Plk1. Après 3 h de traitement des cellules HEL au PMA, nous observons une diminution du niveau de Emi1 concomitante de l'augmentation de phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280, suggérant que Plk1 est activée lors du processus de différenciation, ce qui est en accord avec la littérature (Figure 30 C).

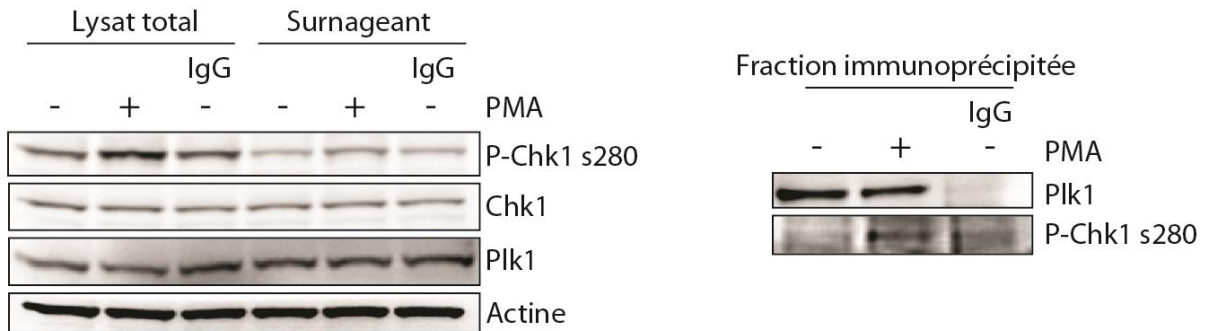
L'ensemble de ces résultats indiquent que Plk1 et Chk1 phosphorylée sur la sérine 280 interagissent au cours de la différenciation mégacaryocytaire, et ils permettent de poser l'hypothèse que Plk1 pourrait être une des cibles fonctionnelles de Chk1 au cours de cette différenciation.

Figure 30

A



B



C

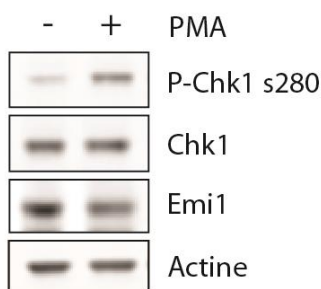


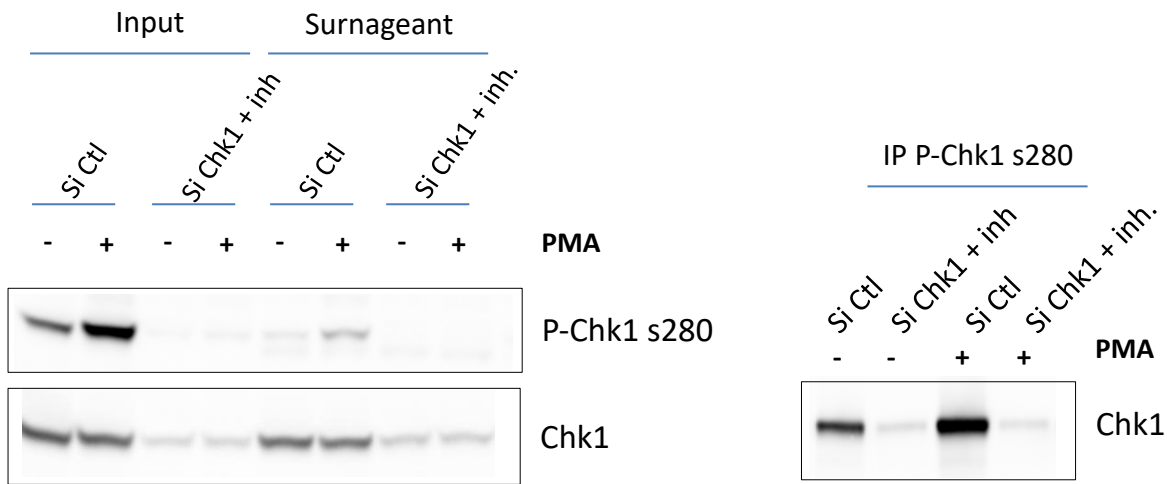
Figure 30 : Plk1 est une cible de P-Chk1 sérine 280. (A) Immunoprécipitation de P-Chk1 sérine 280 dans des cellules transfectées par un siARN contrôle ou un siARN dirigé contre Chk1, puis 24h après, traitées PMA 3nM pendant 3h. Plk1 est retrouvée dans les fractions immunoprécipitées (n=2). (B) Immunoprécipitation de Plk1 dans des cellules traitées PMA 3nM pendant 3h (n=2). (C) Expression de Emi1 dans la lignée HEL traitée pendant 3h au PMA 3nM (n=2).

Pour répertorier de manière plus globale tous les partenaires potentiels de Chk1 phosphorylée sur le résidu sérine 280 au cours de la mégacaryocytopoïèse, nous avons réalisé une analyse par spectrométrie de masse à partir de fractions immunoprécipitées. Ces fractions ont été obtenues grâce à 2 expériences d'immunoprécipitations qui ont été réalisées sur des cellules HEL traitées au PMA, et ont permis d'immunoprécipiter la fraction de Chk1 phosphorylée sur le résidu sérine 280 dans un cas (Figure 31 A) et la protéine totale dans l'autre cas (Figure 31 B). A chaque fois, une condition non traitée PMA a aussi été réalisée de manière à contrôler la bonne augmentation de phosphorylation consécutive au traitement au PMA. Un contrôle négatif a aussi été ajouté, il s'agit d'une fraction de cellules dans laquelle Chk1 est invalidée par siARN et dans laquelle les cellules sont en plus traitées avec les inhibiteurs des kinases Pim et des kinases MEK ; cette fraction de cellules présente un niveau d'expression et de phosphorylation de Chk1 en sérine 280 très faible. Elle permet de valider la spécificité de nos expériences puisque ni dans la figure 31 A ni dans la figure 31 B Chk1 n'est retrouvée de façon non spécifique dans les fractions IP de ce contrôle négatif. Lors de l'analyse par spectrométrie de masse, ce contrôle nous a permis de discriminer les protéines qui font partie du même complexe protéique que P-Chk1 sérine 280 ou que Chk1 total des protéines constituant le bruit de fond non spécifique.

L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée par la plate-forme protéomique de l'institut Cochin, dirigée par le D. Patrick MAYEUX, à partir des extraits d'IP présentés sur la figure 31. Cette analyse a permis d'identifier toutes les protéines retrouvées dans les fractions d'IP, et d'éliminer celles qui s'y sont retrouvées de manière non spécifique de manière certaine. Puis, j'ai pu rechercher les partenaires potentiels de Chk1 ou Chk1 phosphorylée sur la sérine 280 en comparant les valeurs des LFQ (Label-Free Quantification) obtenues pour chaque protéine identifiée entre la fraction contrôle et la fraction où Chk1 a été invalidée et sa phosphorylation inhibée. La quantification LFQ permet de déterminer la quantité relative d'une protéine dans un échantillon donné. Ainsi, si la valeur LFQ d'une protéine diminue lorsque Chk1 est invalidée, cette protéine est potentiellement un partenaire de Chk1. Cette méthode d'analyse a permis d'identifier 341 protéines dans la fraction d'IP Chk1 phosphorylée en sérine 280 et 233 protéines dans la fraction d'IP Chk1 total ; toutes ces protéines ont une valeur de CRAPome (Contaminant Repository for Affinity Purification) inférieure à 25, c'est-à-dire la valeur seuil au-delà de laquelle on considère que l'identification du peptide a pu être faussée par des contaminants. La liste de toutes ces protéines est disponible en annexe.

Figure 31

A.



B.

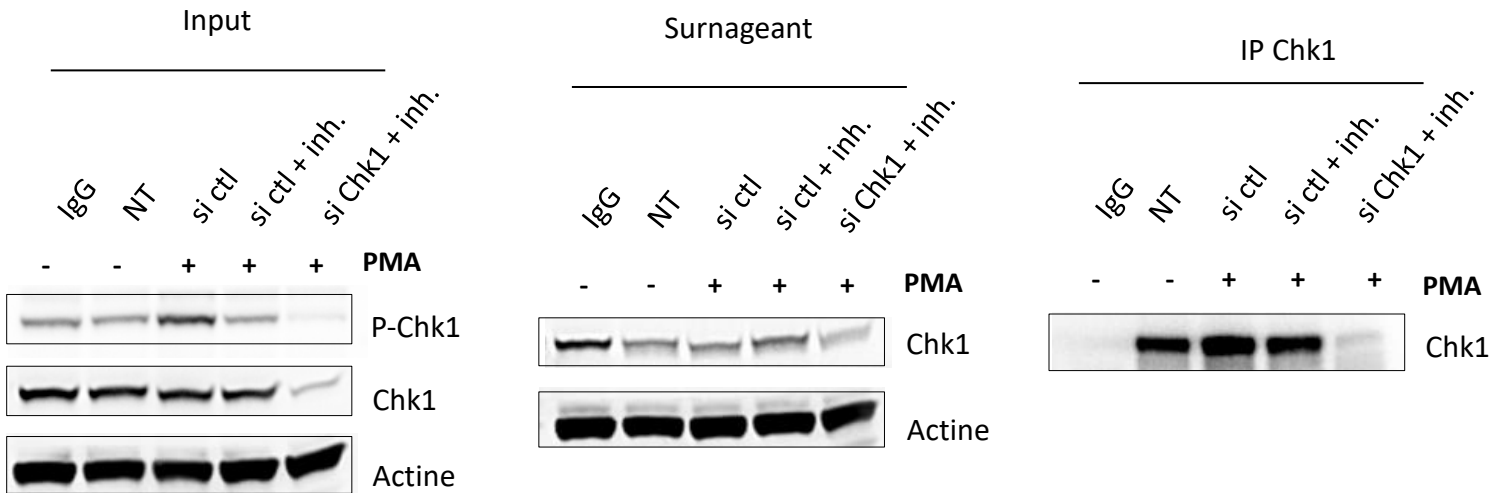


Figure 31 : Immunoprécipitations de Chk1 phosphorylée en sérine 280 et de Chk1 total pour rechercher tous leurs partenaires potentiels par spectrométrie de masse. Western-blot obtenu après Immunoprécipitation de Chk1 phosphorylée sur la sérine 280 (A) ou de Chk1 total (B) dans les cellules HEL traitées au PMA 3nM pendant 3h. 20 millions de cellules HEL ont été transfectées 24h avant le traitement au PMA par siARN 300nM contrôle ou siARN dirigé contre Chk1. Les cellules dans laquelle Chk1 est invalidée sont en plus traitées avec les inhibiteurs des kinases Pim Pim (SGI-1776, 5 μ M) et des kinases MEK (PD0325901, 100nM) et servent de contrôle négatif. Dans l'immunoprécipitation de Chk1 total (B), un 2^{ème} contrôle négatif a été effectué avec un anticorps isotypique (IgG).

Parmi toutes ces protéines, la liste des partenaires potentiels de P-Chk1 sérine 280 qui ont retenu notre attention est présentée dans les tableaux ci-dessous. Nous retrouvons dans le tableau 5 la famille des régulateurs de la différenciation mégacaryocytaire, parmi lesquels des facteurs de transcription dont l'importance au cours de la différenciation mégacaryocytaire est connue : les facteurs ETV3/ETV6, RUNX1 et GATA2. Nous retrouvons aussi les protéines de la signalisation JAK1 et JAK2 ainsi que la myosine IX.

ETV3 / ETV6	ETS translocation variant 3/6
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
GATA2	Endothelial transcription factor GATA2
JAK1 / JAK2	Tyrosine-protein kinase JAK1/2
MYO9B	Unconventional myosin -IXb

Tableau 4 : Régulateurs de la différenciation mégacaryocytaire

Le tableau 6 présente les protéines impliquées dans la progression des cellules en mitose, et qui de ce fait pourraient jouer un rôle au cours des étapes de polyploïdisation. Nous retrouvons la protéine Plk1, mais aussi les protéines PRC1, KIF15, ainsi que les protéines CDC20, Aurora A-interacting protéin ou les ANAPC1/5.

PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1
CDC20	Cell division cycle protein 20 homolog
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1
AURKAIP1	Aurora kinase A-interacting protein
KIF15	Kinesin-like protein KIF15
CLASP1	CLIP-associating protein 1
ANAPC1/ANAPC5	Anaphase-promoting complex subunit 1/5

Tableau 5 : Protéines impliquées dans la progression en mitose

Enfin, certaines protéines connues pour être impliquées dans les réplication ont retenu notre attention, car elles pourraient aussi être importante pour la bonne progression de la polyploïdisation, au vu de l'importante quantité de matériel nucléaire que les mégacaryocytes accumulent lors de cette étape de la différenciation. Elles sont répertoriées dans le tableau 7 : un facteur associé à PCNA, l'hélicase RECQL4 et la kinase TLK1.

KIAA0101	PCNA-associated factor
RECQL4	ATP-dependent DNA helicase Q4
TLK1	Serine/threonine-protein kinase tousled-like-1

Tableau 6 : Protéines impliquées dans la réplication

Cette expérience par spectrométrie de masse permet de confirmer l'interaction entre Chk1 et Plk1. De plus, un autre partenaire potentiel de P-Chk1 sérine 280 a retenu notre attention, au vu de son importance dans le déroulement de la différenciation mégacaryocytaire : il s'agit de RUNX1.

J'ai donc effectué des expériences complémentaires visant à comprendre si Chk1 et RUNX1 sont des partenaires au cours de la différenciation mégacaryocytaire, ce qui pourrait expliquer au moins pour partie l'importance de Chk1 dans ce processus. L'observation de l'expression de RUNX1 par western-blot montre que son expression augmente dans la lignée cellulaire UT-7 dès 3h de traitement à la TPO, et que cette augmentation n'est plus observée lorsque Chk1 est inhibée par le SCH900776 dans ces cellules (Figure 32 A). L'efficacité de l'inhibiteur de Chk1 est validée par l'augmentation de phosphorylation de Chk1 sur la sérine 345. En effet, la déphosphorylation de Chk1 est régulée, du moins pour partie, par PP2A et est dépendant de l'activité catalytique de Chk1, qui est inhibée par le SCH900776. Ainsi, lorsque Chk1 est inhibée, l'activité de PP2A diminue, ce qui conduit à une augmentation de la phosphorylation de Chk1 sur les sérines 317 et 345. Cette augmentation de phosphorylation pourrait être aussi due à une augmentation des dommages de l'ADN consécutive à l'inhibition de Chk1, et donc à une augmentation de l'activité d'ATR (Parsels et al., 2011b).

J'ai pu effectuer des expériences de surexpression de Chk1 pour conforter le résultat de la Figure 32 A. Ainsi, dans la lignée HEL, j'ai co-transfecté un siARN dirigé contre la région 3'UTR de Chk1 pour invalider le Chk1 endogène de ces cellules, avec des plasmides codant pour Chk1 sauvage ou sa forme mutante non phosphorylable (S280A). L'expression de ces plasmides est visible sur la bande du haut de l'immunoblot Chk1 (Figure 32 B). La bande du bas correspond au Chk1 endogène résiduel. 24 h après cette transfection, les cellules sont ensuite traitées au PMA pendant 3 h. Nous pouvons observer que dans ces conditions, la surexpression de Chk1 mutée en alanine sur la sérine 280 entraîne également une diminution de l'expression de RUNX1 par rapport au niveau d'expression dans la condition avec la surexpression de Chk1

sauvage (Figure 32 B). Ces premiers résultats suggèrent que RUNX1 pourrait être une cible de Chk1 phosphorylée sur le résidu sérine 280 au cours de la différenciation mégacaryocytaire, même si cette conclusion doit être confortée par des expériences complémentaires.

Figure 32

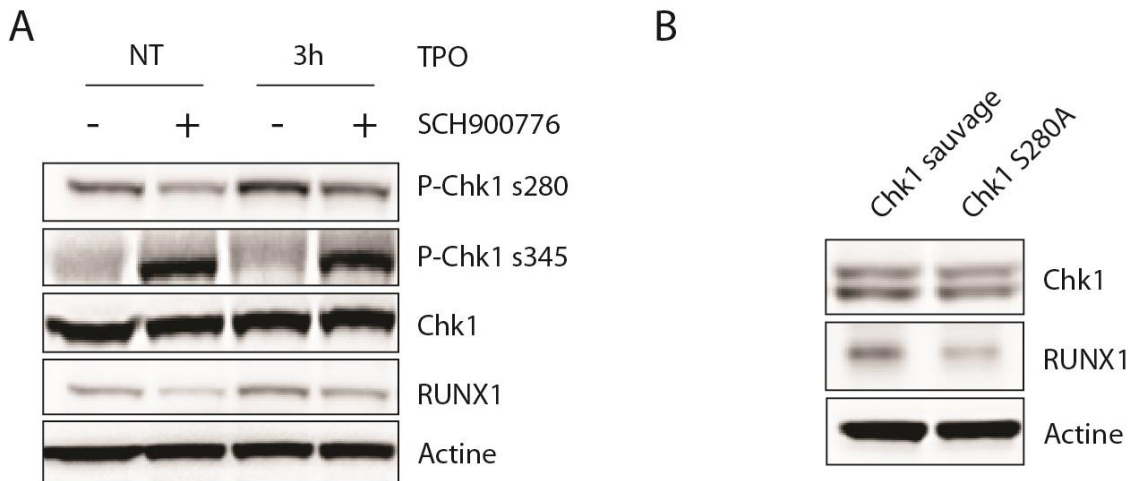
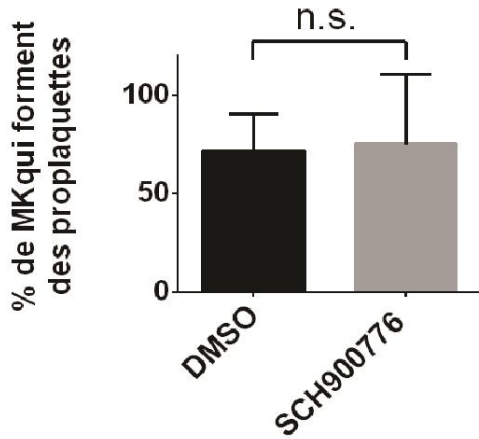


Figure 32 : RUNX1 est une cible de P-Chk1 sérine 280. (A) Expression de RUNX1 dans les UT-7 traitées à la TPO 50ng/mL pendant 3h, avec ou sans prétraitement d'1h par le SCH900776 500nM. L'augmentation de la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 345 valide l'efficacité du traitement par le SCH900776 (n=1). **(B)** Expression de RUNX1 dans les HEL à 24h après surexpression par transfection de 5µg de plasmide codant pour Chk1 sauvage ou Chk1 muté S280A et invalidation de Chk1 endogène par siARN 3'UTR. L'expression de ces plasmides est visible sur la bande du haut de l'immunoblot Chk1. La bande du bas correspond au Chk1 endogène résiduel (n=1).

Par ailleurs, j'ai pu étudier le rôle de Chk1 sur l'étape terminale de la différenciation, c'est-à-dire la formation des proplaquettes, par des approches d'inhibition pharmacologique. Les expériences ont été menées sur des mégacaryocytes primaires murins matures récupérés de la moelle osseuse, ensemencés dans des boîtes de culture et directement stimulés pour former des proplaquettes par du sérum murin. Le suivi de la formation des proplaquettes se fait par video-microscopie et permet d'évaluer (I) la proportion de mégacaryocytes matures qui font des proplaquettes, et (II) le temps que met en moyenne un mégacaryocyte pour bourgeonner, première étape de la formation des proplaquettes. Ces paramètres ont été évalués dans la condition traitée avec l'inhibiteurs de Chk1 ou non traitée. Ainsi, en moyenne, 71.7% des mégacaryocytes matures ont formé des proplaquettes dans la condition contrôle contre 75% dans la condition traitée avec l'inhibiteur de Chk1 (SCH900776, 500nM). L'écart entre ces valeurs n'est pas significatif (Figure 33 A). La durée moyenne avant laquelle les mégacaryocytes qui vont former des proplaquettes commencent à bourgeonner est de 3h55 dans la condition contrôle contre 4h06 dans la condition traitée avec l'inhibiteur de Chk1. L'écart entre ces durées n'est pas significatif (Figure 33 B). En conclusion, ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence du rôle de l'activité catalytique de Chk1 au cours de cette étape de la mégacaryocytopoïèse.

Figure 33

A



B

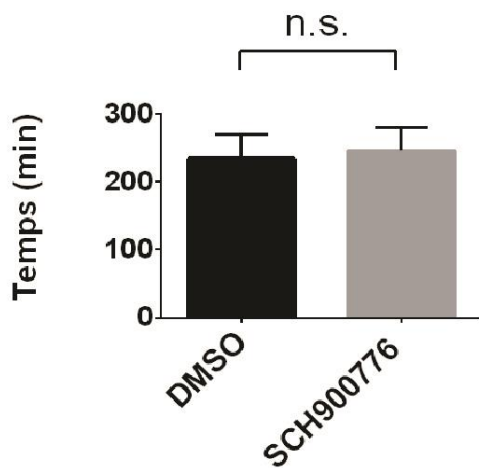


Figure 33 : Chk1 n'est pas impliquée dans la formation de proplaquettes. (A) Analyse par vidéomicroscopie et quantification du pourcentage de mégacaryocytes matures murins qui forment des proplaquettes sous stimulation par du sérum de souris, avec ou sans traitement par le SCH900776 500nM (n=3). Au moins 50 mégacaryocytes par condition ont été analysés. **(B)** Analyse par vidéomicroscopie et mesure du temps que mettent les mégacaryocytes avant de bourgeonner, c'est-à-dire de commencer à former des longs prolongements cytoplasmiques sous stimulation par du sérum de souris, avec ou sans traitement par le SCH900776 500nM (n=3). Au moins 50 mégacaryocytes par condition ont été analysés.

D. Discussion

Dans ce travail, nous avons pu montrer que Chk1 joue un rôle dans la polyploïdisation et la maturation cytoplasmique des progéniteurs mégacaryocytaires. En utilisant des agents induisant la différenciation (PMA, TPO) sur nos lignées modèles nous avons pu observer une phosphorylation précoce de Chk1 sur la sérine 280, associée à la différenciation. Nous avons ainsi pu montrer que les kinases Pim et la voie Ras/MEK/ERK étaient responsables de la phosphorylation de Chk1 sur la sérine 280.

Ainsi, nos résultats mettent en évidence un nouveau rôle et un nouveau mode de régulation de Chk1, sur la sérine 280, par les kinases Pim et la voie Ras/MEK/ERK au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Ces 2 voies de signalisations sont par ailleurs connues pour être impliquées dans la transduction du signal conduisant au processus de différenciation en aval du récepteur à la TPO (Jung et al., 2006; Mazharian et al., 2009). La phosphorylation de Chk1 sur le résidu sérine 280 pourrait participer à la médiation de ce signal, en faisant vraisemblablement intervenir la kinase Plk1 et/ou le facteur de transcription RUNX1.

Dans ces résultats, aucune précision quant à la localisation subcellulaire de Chk1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire n'est apportée. Pourtant, des travaux de la littérature décrivent des modifications de la localisation de Chk1 lorsqu'elle est phosphorylée sur le résidu sérine 280, et qui jouent un rôle majeur dans la modulation de son activité. L'étude par immunofluorescence de la kinase Chk1 et de sa forme phosphorylée sur la sérine 280, dans les HEL traitées à la PMA ou les UT-7 traitées à la TPO, n'a pas montré de modulation significative de la localisation de Chk1 phosphorylée sur la sérine 280 au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Des expériences de fractionnement cellulaire ont aussi été réalisées dans ces mêmes conditions, qui n'ont pas permis de mettre en évidence de changement de localisation de Chk1 ou de sa forme phosphorylée sur la sérine 280 au cours de la différenciation. Mais ces résultats peuvent être expliqués par le fait que seule une petite fraction des protéines kinases Chk1 cellulaires se retrouve phosphorylée au cours de la mégacaryocytopoïèse, et de ce fait, la modulation de la localisation qui y est liée est trop faible pour être visualisable par ces approches. Il serait intéressant de surexprimer des mutants S280 A ou S280 E de Chk1 dans les lignées HEL ou UT-7, d'induire la différenciation mégacaryocytaire et d'observer dans ces conditions la localisation de ces protéines.

Nous pouvons nous demander quel est le rôle de Chk1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Nous avons montré que Chk1 interagit avec Plk1 spécifiquement dans la fraction cellulaire traitée avec l'agent différenciant. Cette interaction a déjà été décrite dans un contexte de mitose classique, sur des cellules HeLa, et coïncide avec un pic d'activité de Chk1 et de Plk1. En effet, Tang et al. montrent que Chk1 permet la bonne progression des cellules en mitose, et notamment un bon appariement des chromosomes au niveau de la plaque métaphasique. Son invalidation conduit à un mauvais alignement des chromosomes à ce niveau, avec un mauvais attachement des kinétochores au fuseau de microtubules (Tang et al., 2006a). Par ailleurs, Plk1 est requise pour le déroulement des endomitoses car cette kinase assure une bonne maturation des centrosomes et la formation d'un fuseau mitotique fonctionnel. L'invalidation de Plk1 entraîne un arrêt prolongé des progéniteurs mégacaryocytaires en mitose, précédé de leur mort par apoptose. Ce phénotype est réversé lorsque les cellules invalidées pour Plk1 reçoivent un traitement avec des inhibiteurs des protéines du SAC (Trakala et al., 2015). Le rôle de Plk1 sur ce processus pourrait être lié à l'activité de Chk1. A ce titre, il serait intéressant de rechercher l'impact de l'inhibition de Chk1 au cours de la différenciation sur l'activité des protéines du SAC et de la kinase BubR1. En effet, dans des cellules Hela, l'invalidation de Chk1 conduit à une activation prolongée du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique, qui passe notamment par Mad2 et BubR1. L'inhibition de BubR1 ou de Mad2 entraîne l'inactivation de ce point de contrôle et contrecarre le blocage cellulaire massif lié à l'invalidation de Chk1 (Tang et al., 2006b). Il est imaginable qu'au cours de la différenciation mégacaryocytaire, les cellules dans lesquelles Chk1 est invalidée subissent un arrêt au niveau du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique, avec une activation majeure de BubR1, d'autant que cette kinase a été décrite comme importante au cours de la mégacaryocytopoïèse (Wang, 2003). Nous pouvons envisager que Chk1 phosphorylée sur la sérine 280 intervient de façon similaire au cours du processus d'endomitoses, potentiellement via sa cible fonctionnelle Plk1.

Chk1 pourrait aussi être impliquée dans la régression de la cytokinèse mégacaryocytaire. En effet, une haplo-insuffisance de Chk1 provoque des anomalies de ségrégation et de positionnement des chromosomes durant la mitose (Peddibhotla et al., 2009). Une cible potentielle de Chk1 à ce niveau pourrait être le facteur de transcription RUNX1, dont nos résultats préliminaires suggèrent qu'il interagit avec Chk1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Par ailleurs, RUNX1 entraîne la diminution de l'expression de la myoïne IIB

ce qui provoque la régression de l'anneau contractile d'actine à l'origine des endomitoses des mégacaryocytes (Lordier et al., 2008, 2012). Par ailleurs, d'autres kinases mitotiques, les kinases Aurora, ont déjà été décrites comme capables de phosphoryler le facteur de transcription RUNX dans un contexte de mitose classique sur les résidus thréonine 14 et thréonine 173, lors de l'entrée en mitose. Ces phosphorylations favorisent l'entrée des cellules en mitose et entraînent le recrutement de RUNX au niveau des structures mitotiques, notamment les centrosomes ou le midbody durant la cytokinèse. RUNX pourrait interagir à ce niveau avec de nombreuses protéines pour permettre le bon déroulement de la mitose (Chuang et al., 2016). Il est donc envisageable que Chk1 puissent phosphoryler RUNX1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire et que cette phosphorylation de RUNX1 (I) favorise son activité transcriptionnelle, et donc permettent le processus d'endomitoses, et (II) entraîne son recrutement au niveau de structures mitotiques, où il pourrait faciliter la progression de l'endomitose.

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence une possible interaction entre Chk1 et d'autres facteurs de transcription impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire (ETV3/ETV6, GATA2) et nous pourrions investiguer plus en détail ces résultats.

D'autre part, la polyploïdisation s'accompagne de variations d'expression de gènes impliqués dans de nombreuses voies de signalisation, notamment celles de la réplication de l'ADN, de la transcription ou de l'apoptose (Chen et al., 2007; Raslova et al., 2007). En particulier, l'expression de la protéine MCM7 est modulée au cours de la différenciation mégacaryocytaire, au profit de l'expression d'un variant transcriptionnel responsable de la dégradation des ARNm non-sens comme le miR-106b-25 (Haldar et al., 2014). Les MCM pourraient donc être impliquées dans la progression de la différenciation mégacaryocytaire. Comme Chk1 est par ailleurs connue pour interagir avec les complexes MCM et moduler leur activité dans un contexte de dommages de l'ADN (Han et al., 2014, 2015), nous pouvons nous demander si Chk1 n'interagit pas avec les MCM au cours de la polyploïdisation. Ceci pourrait être d'autant plus intéressant que la majorité des progéniteurs mégacaryocytaires sont en phase G1 du cycle cellulaire (Wang et al., 1995), phase où l'expression des MCM augmente et où les complexes de pré-réplication commencent à se mettre en place (Lampert et al., 2005). Ainsi, Chk1 pourrait permettre de réguler à ce niveau l'organisation spatio-temporelle de la réplication, étape particulièrement critique lors des endomitoses, au vu de la quantité

importante d'ADN à répliquer et au vu de la diminution de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et dans sa réparation qui a lieu au cours de la différenciation mégacaryocytaire (Raslova et al., 2007).

Enfin, il est connu que la protéine p53 inhibe la différenciation mégacaryocytaire en déclenchant l'apoptose dans ces cellules (Apostolidis et al., 2012; Fuhrken et al., 2008; Mahfoudhi et al., 2016), et comme Chk1 est une cible transcriptionnelle de p53, cette dernière pourrait aussi médier la mort des progéniteurs mégacaryocytaires via la diminution d'expression de Chk1 (Umezawa et al., 2016). Chk1 pourrait jouer un rôle au cours de la différenciation mégacaryocytaire en bloquant l'apoptose dépendant de la caspase 2, indépendamment de p53, Bcl2, et caspase 3, permettant ainsi la polyploïdisation (Josefsson et al., 2011; Sidi et al., 2008). De plus, certaines caspases sont capables de cliver Chk1, et ce clivage favorise son activité, ce qui suggère un lien entre la voie de signalisation de l'apoptose et Chk1 (Matsuura et al., 2008).

L'investigation plus approfondie de ces différentes hypothèses permettra de mieux appréhender le rôle et la régulation de Chk1 phosphorylée sur le résidu sérine 280 dans ce contexte.

Par ailleurs, l'inhibition de Chk1 dans nos conditions expérimentales n'a pas permis d'établir de rôle de Chk1 sur le processus de formation des proplaquettes. Pour autant, il n'est pas exclu que Chk1 puisse avoir un rôle indépendant de celui lié à sa fonction de kinase, dans ce contexte. En particulier, il pourrait être envisagé que Chk1 serve de plateforme de signalisation et ait un rôle au niveau du remodelage majeur du cytosquelette ou du transport des vésicules et granules jusqu'aux extrémités des prolongements cytoplasmiques, qui a lieu avant et au moment de la formation des proplaquettes (Italiano et al., 1999). D'autre part, une étude a pu montrer que Chk1 régulait positivement l'expression génique de la protéine associée aux microtubules PRC1 (protein regulator of cytokinesis 1), de la protéine de la famille des kinésines KIFC1, de la protéine de la famille TRAPP (transport protein particle), TPC6, impliquée dans le transport de vésicules (Shimada et al., 2008). Ces protéines semblent par ailleurs des partenaires potentiels de Chk1 ou Chk1 phosphorylée sur la sérine 280, d'après l'analyse par spectrométrie de masse. Ainsi, Chk1 pourrait jouer un rôle au niveau transcriptionnel sur la formation de proplaquettes.

II. Chk1 : marqueur pronostic et cible thérapeutique dans les LAM

A. Contexte scientifique

Le rôle des acteurs du cycle cellulaire dans la pathogénicité des LAM est peu étudié. En particulier, peu de choses sont connues concernant l'impact pronostic des protéines des voies de détection et de réparation des dommages de l'ADN dans ces hémopathies. Pourtant, plusieurs arguments justifient leur étude dans ce type de cancer. En effet, il est connu que chez la souris, les CSH ont des niveaux intrinsèques de stress répliatif élevés associés à une modification du timing de réplication, et l'apparition de dommages de l'ADN (Flach et al., 2014). De plus, des travaux ont permis de montrer (I) que les leucémies sont des cancers particulièrement sensibles à l'inhibition de Chk1 en monothérapie (Bryant et al., 2014; Iacobucci et al., 2015), (II) que Chk1 est activée de façon constitutive dans des échantillons primaires de patients atteints de LAM à caryotype complexe, et cette activation est corrélée à une sensibilité accrue aux inhibiteurs de Chk1 (Cavelier et al., 2009), et enfin (III) que Chk1 est régulée de façon positive par des voies de signalisation activées dans les cellules leucémiques porteuses de la mutation sur le récepteur FLT3-ITD (kinases Pim), et que cette régulation participe à la résistance de ces cellules aux agents thérapeutiques (Yuan et al., 2014a).

Tous ces résultats suggèrent un rôle important de Chk1 et plus généralement des acteurs de la réplication, des voies de détection des dommages et de réparation de l'ADN dans la tumorigénèse et la réponse aux traitements des LAM.

Dans ce contexte, un travail a été mené au sein de l'équipe avant mon arrivée en thèse, visant à explorer l'impact pronostic de l'expression de 72 gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, la stabilisation des fourches bloquées et la mise en place du point de contrôle de phase S. Cette étude a été menée par une analyse par fluidigm, sur une cohorte de 198 échantillons de patients atteints de LAM. Parmi tous les gènes testés, *CHEK1* est apparu comme celui ayant le plus fort impact pronostic, notamment sur la survie globale, qui est significativement augmentée chez les patients qui ont un niveau d'expression inférieur à la médiane d'expression, comparativement aux patients présentant un niveau d'expression de *CHEK1*

supérieur à la médiane d'expression de la cohorte (la survie globale est de 52.4% contre 29.5% respectivement). Cette étude a permis d'établir que le niveau d'expression génique de Chk1 est un marqueur pronostic négatif et indépendant dans les LAM.

Suite à ce résultat, l'objectif de mon projet de thèse est de définir le statut d'expression et de régulation de la kinase Chk1 dans les LAM, et d'établir par la suite s'il existe un lien entre ce statut et la résistance des cellules leucémiques aux agents thérapeutiques utilisés dans le traitement de ces hémopathies. Nous pourrions ainsi définir (I) si les cellules exprimant plus de Chk1 sont plus résistantes aux agents génotoxiques et (II) si ces cellules sont plus sensibles aux inhibiteurs de Chk1 en association avec un traitement génotoxique.

Ce projet fait l'objet d'une collaboration avec la Dr. Anne VIDAL-FERNANDEZ, au sein de l'équipe 2 du CRCT (Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse), dirigée par le Dr Jean-Sébastien HOFFMANN. Il a permis la rédaction d'un manuscrit intitulé *CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML* qui a été publié dans le journal *Science Signaling* daté du 13 September 2016 Vol 9 Issue 445, disponible en annexe.

B. Matériel et méthodes

1. Modèle cellulaire

Les échantillons de cellules de patients atteints de LAM ont été obtenus auprès du Centre de Ressources Biologiques du Pôle Technologique du CRCT, qui abrite la tumorothèque HIMIP (Hémopathies malignes de l'Inserm Midi Pyrénées).

2. Mesure du potentiel clonogénique des cellules primaires de LAM

Pour évaluer les répercussions fonctionnelles des différents traitements appliqués aux cellules primaires, celles-ci sont ensemencées dans un milieu semi-solide à base de méthylcellulose à 100 000 cellules par mL et y sont cultivées pendant 7 jours. Au bout des 7 jours, on mesure par comptage le potentiel clonogénique, c'est-à-dire la capacité des cellules à former des clones. Un clone se définit par un groupe d'au moins 5 cellules.

3. Mesure des paramètres de la réplication par la technique de « DNA spreading »

Cette technique consiste en un traitement des cellules par successivement 2 analogues de bases couplés à un fluorophore, CldU puis IdU, durant un temps déterminé (ici, 20minutes par analogue). Les cellules en phase répllicative au moment du traitement incorporent ces analogues au cours de la synthèse de l'ADN. Les cellules sont ensuite lysées, puis un étalement des fibres d'ADN est réalisé, suivi d'une immunodétection des analogues de base, afin de mesurer la vitesse de progression au niveau des fourches de réplication par microscopie en quantifiant la longueur des pistes, ou tracks, colorées. Cette technique a été réalisée sur des cellules leucémiques primaires récupérées après 7 jours de culture dans un milieu semi-solide. Avant l'étape d'incorporation des analogues nucléotidiques, ces cellules primaires sont lavées et sont de nouveau traitées 2h dans un milieu liquide (IMDM).

C. Résultats

J'ai dans un premier temps étudié le niveau d'expression de Chk1, au niveau protéique, sur 10 échantillons issus de la cohorte utilisée pour l'analyse fluidigm. Il apparaît que les niveaux d'expression de l'ARNm, obtenus grâce à l'analyse fluidigm, et de la protéine Chk1 sont corrélés positivement (Figure 34 A et 34 B) ($r^2=0.7781$, $p=0.0105$). Ce résultat nous a amené à étudier plus en détail l'impact de l'expression protéique de Chk1 dans des cellules primaires leucémiques, car la forte expression génique de Chk1 est de mauvais pronostic dans les LAM. Pour cela, une nouvelle cohorte de 37 échantillons de patients a été constituée, sur laquelle le niveau d'expression de Chk1 au moment de la décongélation a été évalué et quantifié par immunofluorescence (figure 34 C) et/ou par western-blot (figure 34 D et 34 E). Cette cohorte a pu être divisée en 2 groupes : 15 échantillons ont des niveaux d'expression de Chk1 élevés, ils constituent le groupe « High Chk1 » ou « H Chk1 », et 22 échantillons présentent des niveaux de Chk1 faibles, ils constituent le groupe « Low Chk1 » ou « L Chk1 ».

Nous avons ensuite évalué le niveau d'activation de Chk1 dans ces échantillons à la décongélation, en l'absence de traitement. Pour cela, nous avons regardé le niveau de phosphorylation sur le résidu sérine 345 et le niveau d'expression de CDC25A, une cible majeure de Chk1 qui, lorsqu'elle est activée par ATR, entraîne sa dégradation. Les données indiquent qu'il n'y a pas de corrélation entre le niveau d'expression de Chk1 et son niveau de phosphorylation par ATR, ni avec le niveau de la phosphatase CDC25A, en condition non traitée (figure 34 F). Ceci suggère que la survie globale dans les LAM est dépendante du niveau d'expression de *CHEK1*, mais n'est pas liée à une activation chronique du point de contrôle de la réponse aux dommages de l'ADN.

Figure 34

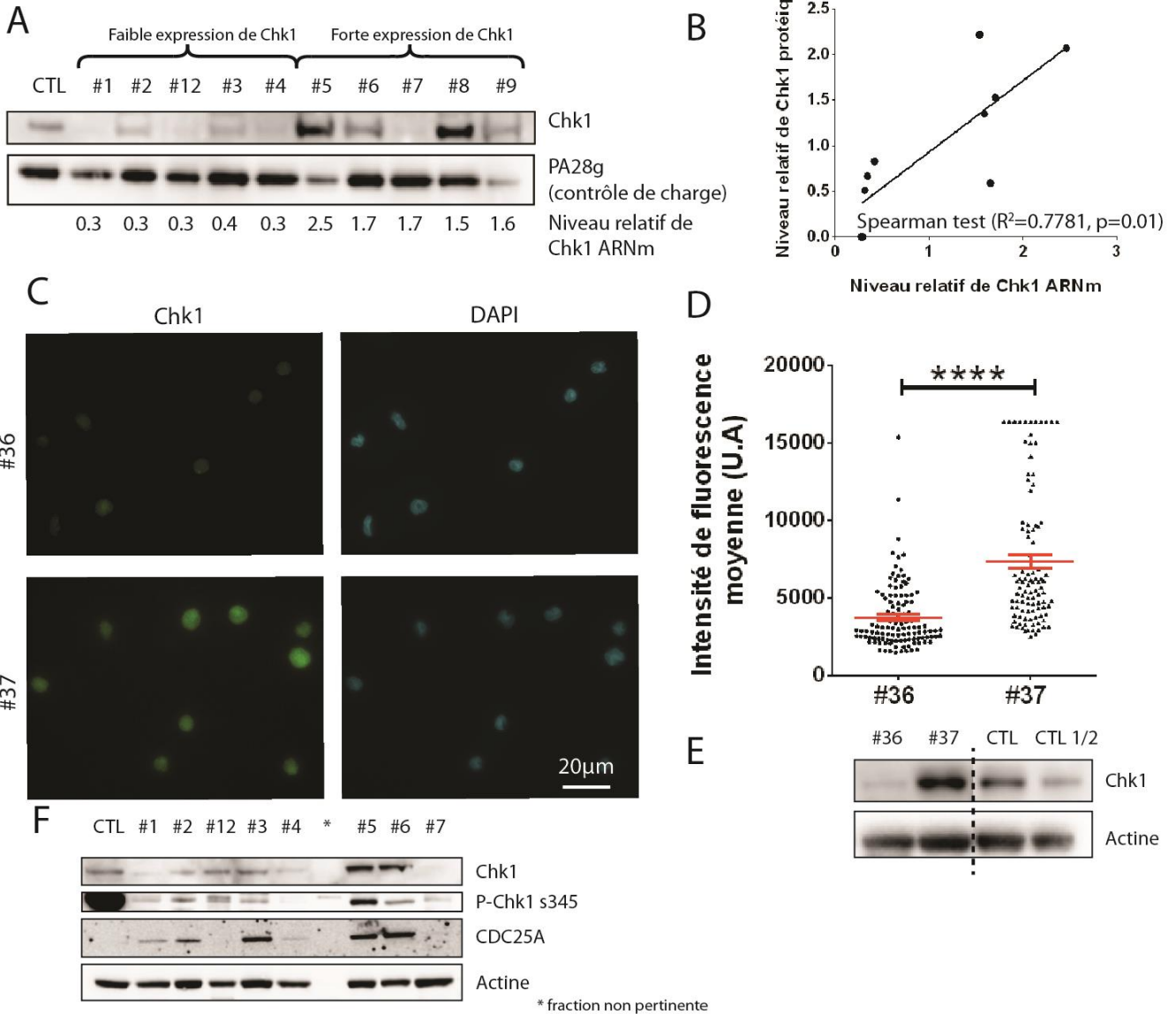


Figure 34: Le niveau d'expression protéique de Chk1 est corrélé au niveau d'expression de l'ARNm et est hétérogène entre les échantillons de patients atteints de LAM (A-B) Corrélation entre les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine Chk1. **(A)** L'expression protéique est déterminée par western-blot, en utilisant la sous-unité du proteasome PA28g comme contrôle de charge, sur 10 échantillons de patients de la cohorte utilisée pour l'étude fluidigm. Des extraits de la lignée cellulaire KG1A ont été utilisés comme contrôle interne pour normaliser les niveaux protéiques entre différents gels. Les niveaux d'ARNm de Chk1 déterminés par l'analyse fluidigm sont indiqués sous le gel. **(B)** Analyse de la robustesse de la corrélation entre les niveaux d'expression de Chk1 génique et protéique par régression linéaire (test de Spearman, $R^2=0.7781$, $p<0.01$). **(C-E)** Méthode de quantification du niveau protéique de Chk1 dans les 37 échantillons de la nouvelle cohorte. **(C)** Images représentatives de détection de Chk1 par immunofluorescence dans les cellules de patients #36 et #37. Les noyaux sont marqués au DAPI. **(D)** Quantification du niveau de Chk1 déterminé par l'analyse de l'intensité de fluorescence sur des images d'immunofluorescence, par le logiciel ImageJ. Chaque carré ou triangle correspond à une cellule ; au moins 100 cellules ont été analysées par condition. Lignes horizontales, valeurs moyennes. Analyses statistiques par un t-test non apparié avec correction de Welch (****, $p<0.0001$). **(E)** Analyse du niveau de Chk1 dans les échantillons de patients #36 et #37 par western-blot. Les contrôles permettent de comparer plusieurs membranes entre elles. **(F)** Les niveaux de P-Chk1 sérine 345 et de CDC25A sont analysés par western-blot à partir d'extraits cellulaires d'échantillons de patient.

En parallèle de l'évaluation du niveau d'expression de Chk1 au sein des échantillons de patient, j'ai évalué leur niveau de sensibilité à un traitement génotoxique par l'AraC par des tests de clonogénie dans des conditions non traitées, ou traitées avec de l'AraC à 5nM ou 10nM. L'analyse des résultats de ces expériences montre que les cellules des échantillons du groupe « H Chk1 » sont significativement plus résistantes au traitement par l'AraC que les cellules des échantillons du groupe « L Chk1 » ($p=0.0242$ et $p=0.0173$ pour les conditions avec 5nM et 10 nM d'AraC respectivement) (Figure 35 A).

Afin de déterminer si la résistance accrue des échantillons « H Chk1 » est bien liée aux fonctions de la kinase, un inhibiteur de Chk1, le SCH900776, a été ajouté en combinaison avec l'AraC dans ces échantillons, à une concentration de 250nM. La présence de cet inhibiteur restaure un niveau de sensibilité de ces cellules leucémiques équivalent à celui des cellules du groupe « L Chk1 » traitées par l'AraC seule ($p=0.0398$) (figure 35 A). Ces résultats suggèrent l'existence d'un lien direct entre le niveau d'expression de Chk1 et la résistance des cellules leucémiques à un traitement par l'AraC.

Pour comprendre le mécanisme qui pourrait expliquer cette résistance, nous avons émis l'hypothèse que Chk1 permet le maintien de fourches de réplifications actives durant le traitement par l'AraC, terminateur de chaîne qui entraîne des blocages des fourches de réplication. Pour vérifier cette hypothèse, la vitesse de réplication a été mesurée par une technique d'étalement des fibres d'ADN. Cette technique a été réalisée sur des cellules leucémiques primaires récupérées après 7 jours de culture dans un milieu semi-solide, avec les différents traitements (non traité, AraC 5 nM, AraC 5 nM + SCH900776). Des images représentatives des fibres d'ADN marquées des cellules des groupes « L Chk1 » et « H Chk1 » sont présentées en figure 35 B et figure 35 D respectivement. Nous pouvons constater que dans les cellules du groupe « L Chk1 », le traitement par l'AraC entraîne une diminution de la longueur des tracks significative ($p=0.0018$) (Figure 35 C), alors que les cellules du groupe « H Chk1 » ne subissent pas de ralentissement de la vitesse de progression des fourches répliquatives consécutivement au traitement par l'AraC (Figure 35 E). En revanche, l'addition de l'inhibiteur de Chk1 dans le milieu de culture permet de diminuer significativement la longueur des tracks dans les cellules du groupe « H Chk1 » ($p<0.0001$) (Figure 35 E). Ces données suggèrent que des forts niveaux d'expression de Chk1 facilitent la progression des fourches dans un contexte de stress répliatif.

Figure 35

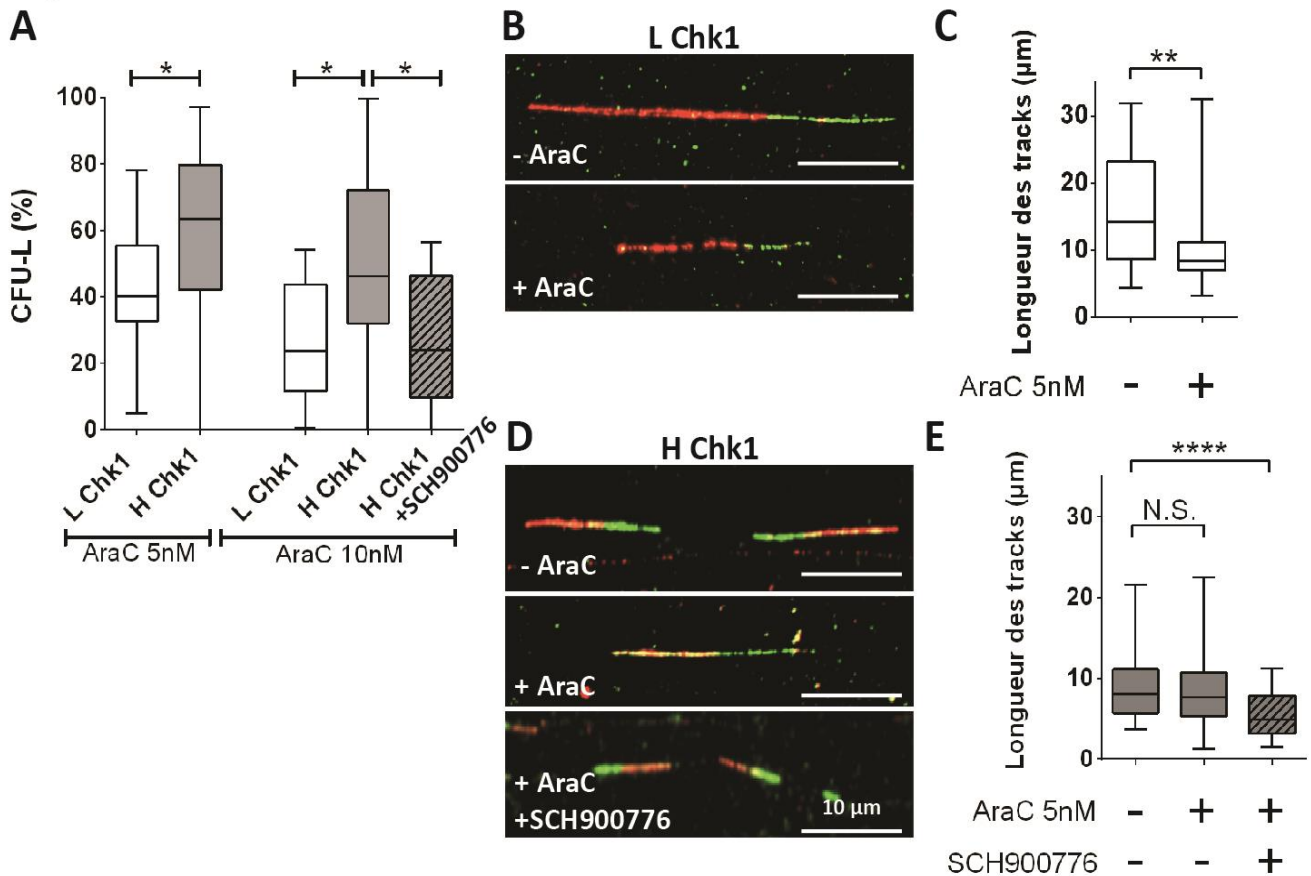


Figure 35: Des niveaux élevés de Chk1 favorisent la résistance des cellules leucémiques au traitement par l'AraC. (A) Analyse des clones – c'est-à-dire des groupes d'au moins 5 cellules - de cellules primaires de patients formées après 7 jours de traitement à l'AraC à 5 ou 10 nM seule, ou en combinaison avec le SCH900776 à 250nM. La figure représente le ratio du nombre de clones comptés dans la condition traitée par le nombre de clones comptés dans la condition non traitée. Les lignes horizontales représentent la valeur moyenne (n=22 pour le groupe «Low Chk1» et n=15 pour le groupe «High Chk1»). Analyses statistiques par un test de Mann Whitney (5 et 10 nM Ara-C, *, p=0.0242 and p= 0.0173 respectivement, et 10 nM Ara-C + 250nM SCH900776, *, p=0.0398). (B–E) Analyse de la progression des fourches répliquatives par DNA spreading. (B, D) Images représentatives de fibres issues de cellules primaires du groupe «Low Chk1» et «High Chk1», après 7 jours de culture en méthylcellulose avec ou sans traitement à l'araC seule ou en combinaison avec le SCH900776. (C, E) Analyse quantitative de la longueur des tracks IdU dans les différentes conditions de traitement. 30 fibres/échantillon ont été analysées (n=2 pour le groupe "L Chk1" et n=2 pour le groupe "H Chk1"). Analyses statistiques par un t-test non apparié avec correction de Welch (**, p=0.0018 ; ****, p<0.0001).

D'autre part, j'ai évalué le potentiel clonogénique des cellules des échantillons des groupes « H Chk1 » et « L Chk1 » indépendamment de tout traitement. Il apparaît que la proportion de cellules qui ont la capacité de former des clones, notées CFU-L, est plus importante au sein des échantillons du groupe « H Chk1 » qu'au sein des échantillons du groupe « L Chk1 » (Figure 36 A). De plus, pour chaque échantillon de patient, j'ai pu évaluer quelle taille faisaient la majorité des clones : petite taille (de 5 à 9 cellules), moyenne taille (de 10 à 20 cellules), et grande taille (au-delà de 20 cellules). Cette analyse a permis de montrer que les clones formés sont de plus grande taille dans les échantillons « H Chk1 » que dans les échantillons « L Chk1 » (Figure 38 B). Des images représentatives des clones des différentes tailles sont présentées en Figure 36 C. Ce résultat supporte l'idée que non seulement des forts niveaux de Chk1 cellulaires favorisent la résistance à des traitements par l'AraC, mais aussi favorisent la prolifération cellulaire et potentiellement un phénotype tumoral plus agressif indépendamment de tout traitement.

Cette prolifération cellulaire exacerbée pourrait être la conséquence de fonctions de Chk1 en faveur de la progression dans le cycle cellulaire, notamment via son rôle transcriptionnel. Ainsi, la kinase CDK1 étant une cible transcriptionnelle connue de Chk1 dont elle favorise l'expression dans des conditions cellulaires non stressées, son niveau d'expression a été évalué, au niveau de l'ARNm et de la protéine. La figure 36D représente un western-blot représentatif sur lequel nous pouvons constater que le niveau d'expression de CDK1 corrèle au niveau d'expression de Chk1. La quantification de l'expression de CDK1 obtenue par western-blot est présentée sur la figure 36 E. La quantification de l'expression génique mesurée par q-RT PCR est présentée sur la figure 36 F. De manière intéressante, l'expression génique et protéique de CDK1 est plus importante dans les cellules du groupe « H Chk1 » que dans les cellules du groupe « L Chk1 », ce qui suggère que Chk1 supporte le potentiel clonogénique des cellules primaires leucémiques en l'absence de traitement.

Figure 36

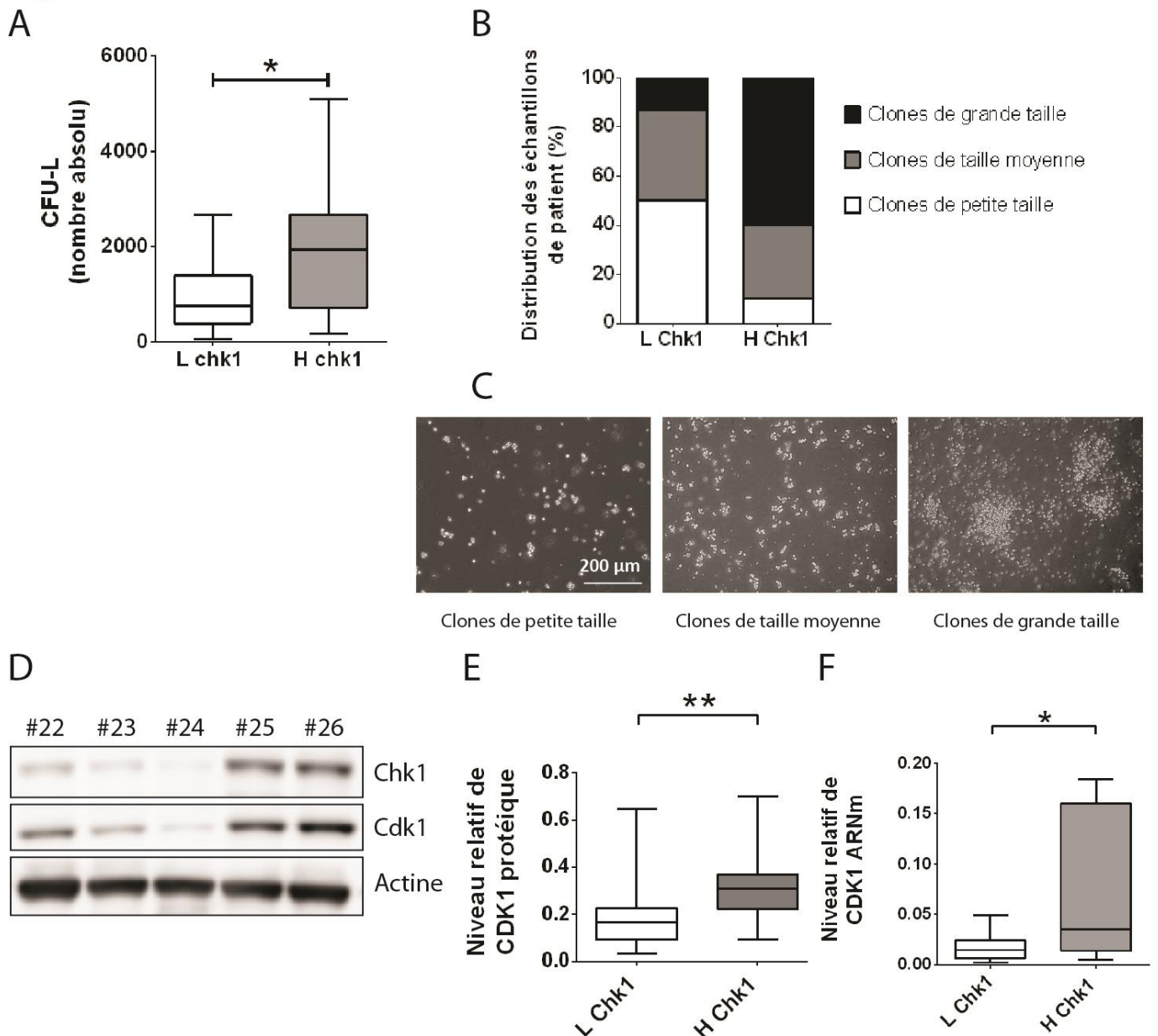


Figure 36: Un niveau d'expression de Chk1 élevé favorise le potentiel clonogène des cellules leucémiques. (A) Le potentiel clonogène a été mesuré en comptant le nombre de clones après 7 jours de culture en méthylcellulose. Les résultats sont présentés en nombre absolu de clones formés. Les lignes horizontales représentent la valeur moyenne (n=22 pour le groupe «Low Chk1» et n=15 pour le groupe «High Chk1»). Analyses statistiques par un test de Mann Whitney (*, p=0.0371). (B) Les histogrammes indiquent la distribution des échantillons de patients issus des groupes «Low Chk1» et «High Chk1» qui ont été caractérisés selon leur capacité à faire des clones de petite taille, de moyenne taille ou de grande taille après 7 jours de culture. Les clones de petite taille, de moyenne taille et de grande taille (illustrés sur le panel de droite) contiennent entre 5 et 9 cellules, de 10 cellules à 20 cellules, et plus de 20 cellules respectivement. 5 patients ont été analysés pour le groupe «Low Chk1» et 10 patients ont été analysés pour le groupe «High Chk1». (C) Illustrations des clones de petite taille, de moyenne taille et de grande taille analysés dans le (A) et le (B). (D-F) Quantification du niveau d'expression de CDK1 dans les échantillons «Low Chk1» et «High Chk1». L'analyse du niveau d'expression de Chk1 et CDK1 par western-blot est présentée en (D) et la quantification du niveau d'expression au niveau de la protéine et de l'ARNm de CDK1 est montrée en (E) et (F) respectivement. Les lignes horizontales représentent la valeur moyenne. Analyses statistiques par un t-test non apparié avec correction de Welch (*, p=0.0344 ; **, p=0.0023).

D. Discussion

Au cours de ce travail, il a été établi qu'au sein d'une cohorte de patients atteints de LAM, le niveau d'expression génique de Chk1 est hétérogène, et un niveau élevé de Chk1 constitue un marqueur de mauvais pronostic en termes de survie globale. De plus, il apparaît que dans ces échantillons de cellules primaires, les niveaux d'ARN et protéique de Chk1 sont corrélés, même si cette corrélation n'est pas parfaite, et qu'un fort niveau d'expression de cette kinase favorise le potentiel clonogénique des cellules, indépendamment de tout traitement, mais aussi qu'il favorise la résistance à un traitement à l'AraC ; résistance qui est abrogée lorsqu'un inhibiteur de Chk1 est administré en combinaison avec l'AraC.

Nous avons pu observer une forte hétérogénéité d'expression de Chk1 au niveau génique et protéique, entre les échantillons primaires de patients atteints de LAM. Ce résultat pose la question de la régulation de Chk1 dans ces échantillons. Plusieurs protéines pourraient être à l'origine de la régulation de Chk1 dans les LAM.

Tout d'abord, le facteur de transcription E4F1, qui est important pour la survie cellulaire et la prolifération, a été récemment décrit comme un activateur transcriptionnel de *CHEK1*. En effet, son invalidation entraîne une diminution des niveaux de *CHEK1* (Rodier et al., 2015). E4F1 joue aussi un rôle sur la stabilité de la protéine Chk1 (Grote et al., 2015). Par ailleurs, il apparaît que des biopsies de moelle osseuse de patients atteints de LAM ont des niveaux d'expression protéique d'E4F1 élevés par rapport aux biopsies de donneurs sains, et que cette surexpression favorise la survie des cellules leucémiques (Hatchi et al., 2011). Ainsi, nous pouvons nous demander si les niveaux d'expression de Chk1 au niveau ARN et protéique ne sont pas régis, du moins en partie, par le facteur de transcription E4F1 dans les LAM. Des premières expériences menées au laboratoire pour répondre à cette question indiquent que dans les lignées cellulaires leucémiques et dans les échantillons primaires de patient, les niveaux d'expression protéique de Chk1 sont corrélés à ceux d'E4F1. De plus, des immunoprécipitations ont permis de montrer qu'E4F1 et Chk1 co-immunoprécipitent au sein d'un même complexe protéique, et des analyses d'immunofluorescence par Proximity Ligation Assays (PLA) suggèrent également que ces 2 protéines sont proches dans les cellules leucémiques. Enfin, l'invalidation d'E4F1 par shARN entraîne une forte diminution de l'expression protéique de Chk1. Ceci nous laisse envisager un rôle majeur d'E4F1 au niveau de la stabilité de Chk1 et de façon étonnante, une forte augmentation de l'expression de l'ARNm

de Chk1, ce qui va à l'encontre de résultats déjà publiés (Rodier et al., 2015). Ce résultat peut s'expliquer de plusieurs manières : soit E4F1 est un régulateur transcriptionnel négatif de CHEK1 dans notre modèle, soit E4F1 régule l'expression de facteurs de transcription, en particulier p53, ou de miARN capables de réprimer CHEK1. Cette seconde hypothèse s'appuie sur des résultats indiquant qu'E4F1 est capable de mono-ubiquitinyler p53, ce qui favorise son activité transcriptionnelle et donc la répression de l'expression génique de *CHEK1* (Bargiela-Iparraguirre et al., 2016; Gottifredi et al., 2001). Par ailleurs, le miR-26 a été identifié comme étant régulé par p53 au niveau transcriptionnel, et capable de réprimer *CHEK1* (Lezina et al., 2013). L'invalidation d'E4F1 pourrait donc induire une modification de l'activité transcriptionnelle de p53, une diminution d'expression du miR-26 et donc une perte de la régulation négative de *CHEK1*.

Un autre régulateur potentiel de Chk1 dans les LAM est la déubiquitynilase USP7 qui a pour substrats des protéines intervenants dans la réponse aux dommages à l'ADN, en particulier la protéine Chk1 qui a été identifiée comme une de ses cibles, dans la lignée d'ostéosarcome U2OS. Cette étude a permis de montrer que la déplétion d'USP7 induit une diminution de l'expression protéique de Chk1, alors que la surexpression d'USP7 induit une augmentation de son expression. La modulation des niveaux de Chk1 passe ici par une stabilisation de cette protéine via sa dé-ubiquitynilation, qui empêche sa dégradation (Alonso-de Vega et al., 2014; Zhang et al., 2014). Il est concevable qu'un mécanisme similaire soit mis en jeu dans les LAM. Des premiers résultats obtenus dans l'équipe montrent que comme pour E4F1, les variations des niveaux protéiques d'USP7 sont corrélés aux variations observées pour Chk1 dans les lignées cellulaires leucémiques, et que l'invalidation d'USP7 provoque une diminution du niveau protéique de Chk1. De plus, des expériences d'immunoprécipitation indiquent que ces 2 protéines sont présentes au sein d'un même complexe. Ce résultat laisse supposer qu'USP7 protège effectivement Chk1 de la dégradation. Par ailleurs, l'inhibition d'USP7 dans ces cellules impacte négativement leur viabilité suite à un traitement par l'AraC. Ces résultats sont en accord avec les travaux de la littérature, selon lesquels l'inhibition de USP7 provoque une apoptose cellulaire médiée par la réactivation de p53 (Fan et al., 2013), mais aussi due à l'instauration d'un état de stress oxydant majeur dans ces cellules (Lee et al., 2016). Ce résultat laisse aussi supposer qu'USP7 pourrait protéger Chk1 de la dégradation, notamment lorsqu'elle est activée après des dommages de l'ADN, et favoriser ainsi la survie des cellules leucémiques traitées par l'AraC.

Nos résultats permettent d'établir une corrélation d'expression protéique entre Chk1 et CDC25A, ce qui semble paradoxal au vu de la littérature qui présente CDC25A comme une cible de Chk1 dans des conditions de dommages de l'ADN, et dont la phosphorylation entraîne sa dégradation (Hassepass et al., 2003; Kasahara et al., 2010; Mailand et al., 2000; Sørensen et al., 2003). Dans ce contexte, Chk1 régule négativement la progression dans le cycle cellulaire et limite l'impact du stress réplicatif cellulaire. A l'inverse, CDC25A, s'il n'est pas séquestré ou dégradé, entraîne l'instauration d'une instabilité génétique car il stimule la progression des cellules dans le cycle. Ainsi, les cellules ayant des faibles niveaux de Chk1 ou des forts niveaux de CDC25A ont une capacité d'activation des systèmes de détection et de réparation des dommages faible. Elles sont donc particulièrement tributaires de la pleine activité des kinases ATM et surtout ATR pour la mise en place de ces points de contrôle, ce qui explique que ces cellules sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs d'ATR (données non publiées ; Ruiz et al., 2016). Cependant, dans nos conditions expérimentales, les cellules ne subissent aucun stress génotoxique, auquel cas Chk1 et CDC25A favorisent toutes les deux la prolifération cellulaire. Les niveaux d'expression de ces 2 protéines au sein d'un échantillon de patient peuvent donc être envisagées comme étant le reflet du niveau de prolifération au sein de cet échantillon.

Par ailleurs, la corrélation d'expression observée entre ces 2 protéines suggère qu'elles pourraient posséder un mécanisme de régulation commun dans les LAM. Ce mécanisme pourrait passer par une régulation post-transcriptionnelle par le microARN miR-16. En effet, ce miR a été décrit comme régulant négativement Chk1 dans les cellules U2OS, en particulier après un stress génotoxique induit par un traitement par la doxorubicine (Lezina et al., 2013). Par ailleurs, miR 16 régule également négativement la phosphatase CDC25A en réponse à des dommages de l'ADN provoqués par un traitement aux rayonnements ultra-violets, dans les cellules Hela et dans des fibroblastes primaires humaines (Pothof et al., 2009). Ainsi, miR-16 pourrait être un régulateur commun de Chk1 et CDC25A dans les LAM, ce qui permettrait d'expliquer que ces protéines varient dans le même sens dans ce contexte. Les premiers résultats que nous avons obtenus sur cette question permettent effectivement de penser que les niveaux d'expression du miR-16 d'un côté, et de Chk1 et CDC25A de l'autre suivent des profils inverses, nous invitant à poursuivre notre étude plus en détail sur le rôle de miR-16 dans la régulation de Chk1 et CDC25A dans les LAM.

Nos résultats mettent en évidence 2 rôles majeurs et distincts de Chk1 dans les LAM : d'une part elle permet la prolifération cellulaire, en condition non perturbée, et par ailleurs, en condition de stress génotoxique, elle favorise la résistance aux traitements.

La première fonction de Chk1 semble passer par son rôle de régulateur transcriptionnel de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, notamment de la kinase CDK1, ce qui est en lien avec une fonction de Chk1 déjà décrite dans la littérature (Shimada and Nakanishi, 2008; Shimada et al., 2008). Cependant, il n'est pas exclu que Chk1 supporte en plus la prolifération cellulaire via des fonctions au niveau de la réplication (Guo et al., 2015; Petermann and Caldecott, 2006; Petermann et al., 2006) ou de la mitose (Peddibhotla et al., 2009; Tang et al., 2006b; Yang et al., 2014; Zachos et al., 2007), qui permettent une bonne coordination dans la progression du cycle cellulaire.

La seconde fonction de Chk1 mise en évidence passe par une réponse aux dommages cellulaires causés par l'AraC. L'araC, est un analogue de la cytidine, dont le ribose est remplacé par un arabinose. L'araC est convertie en forme triphosphate dans la cellule et entre en compétition avec la cytidine pour être incorporée lors de la synthèse de l'ADN. Il s'agit d'un antimétabolite dit terminateur de chaîne, car une fois incorporé au brin néo-synthétisé, le sucre arabinose entraîne un blocage de la réplication par gêne stérique. Par ailleurs, l'AraC inhibe l'activité des ADN polymérase, ce qui diminue de manière globale la vitesse de réplication de l'ADN et crée un état de stress répliatif. Un fort niveau d'expression de Chk1 pourrait donc permettre de contrecarrer cet état de stress répliatif, en permettant la réparation des dommages de l'ADN, et une reprogrammation du timing de réplication adaptée, comme le suggèrent les résultats de spreading obtenus. Chk1 pourrait aussi limiter l'impact du stress répliatif en favorisant la réplication trans-lésionnelle (Speroni et al., 2012; Yamada et al., 2013). Cependant, il est à noter que dans les échantillons de patients atteints de LAM, la plus grande majorité des cellules se situe dans la phase G1 du cycle cellulaire (entre 95% et 98% des cellules), et moins de 5% des cellules se retrouvent simultanément en phase S, ce qui ne permet pas d'expliquer l'effet majeur observé lié au traitement par l'AraC, si son effet se cantonne à la phase de réplication du cycle cellulaire. Ceci laisse supposer que l'AraC pourrait créer des dommages cellulaires en phase G1, en instaurant un état de stress oxydatif par exemple, et que de la même manière qu'ATR joue un rôle important en phase G1 en réponse à un stress induit par des rayonnements ultra-violets, Chk1 pourrait être impliquée

dans la réponse à l'AraC au cours de cette étape du cycle cellulaire (Gamper et al., 2013). Chk1 pourrait être aussi important en phase G1 pour la réplication translésionnelle ou la réparation des régions d'ADN non répliquées durant la phase S précédente du fait de l'état de stress réplcatif, et prises en charge par les protéines 53BP1 durant la mitose afin de limiter l'apparition de cassures double brins de l'ADN (Harrigan et al., 2011; Lukas et al., 2011).

Nos résultats nous ont amené à la conclusion que Chk1 est une cible thérapeutique intéressante dans les LAM, et notamment chez les patients dont l'expression génique et protéique est la plus élevée. Nous pourrions éventuellement affiner encore l'impact pronostic de Chk1 dans les LAM en prenant en compte la localisation sub-cellulaire de Chk1, si on se réfère aux travaux de Al-kaabi et al dans le cancer du sein. En effet, par l'observation de la localisation de Chk1 phosphorylée sur le résidu s317 sur des coupes immunohistochimiques de cancer de sein, cette équipe a pu montrer que selon les échantillons, phospho-Chk1 présente une localisation nucléaire ou cytoplasmique. De plus, en l'absence de tout traitement, l'expression nucléaire de phospho-Chk1 au sein d'une tumeur corrèle avec la présence de paramètres de bon pronostic (faible activité mitotique, faible expression de KI67 et de PI3K, etc..). A contrario, l'expression cytoplasmique de phospho-Chk1 est associée à des caractéristiques de mauvais pronostic (tumeur de grade élevé, phénotype triple négatif, expression de KI67, Akt, PI3K, etc..).

Par ailleurs, l'expression nucléaire de phospho-Chk1 est prédictive d'une meilleure survie globale tous patients confondus, et chez les patients présentant des tumeurs positives pour les récepteurs aux oestrogènes, chez les patients ne recevant aucune chimiothérapie. Dans le sous-groupe négatif pour les récepteurs aux oestrogènes et dans le sous-groupe triple négatif, la localisation nucléaire de phospho-Chk1 est prédictive d'une survie globale diminuée, chez les patients recevant une chimiothérapie. Ces résultats suggèrent que la localisation de la fraction de Chk1 phosphorylée sur la sérine 317 est un marqueur pronostic et prédictif de la réponse au traitement chimiothérapeutique dans le cancer du sein (Al-Kaabi et al., 2015). Nos conclusions diffèrent car nos résultats n'ont pas permis d'établir que le statut de phosphorylation de Chk1 dans les LAM avait un impact pronostic. Malgré tout, il serait intéressant d'évaluer la localisation de Chk1 dans les cellules de patients, et confronter les images obtenues avec le niveau de sensibilisation à l'AraC conféré par le traitement avec l'inhibiteur de Chk1.

PARTIE 3 : DISCUSSION GENERALE

Les 2 projets auxquels je me suis intéressée au cours de ma thèse constituent des exemples de rôles de Chk1 qui diffèrent selon le statut de prolifération ou de différenciation mégacaryocytaire, selon l'état sain ou tumoral de la cellule myéloïde, et enfin au sein des cellules de LAM, selon l'état de prolifération sans stress exogène ou au contraire selon l'état de stress réplicatif consécutif à un traitement par l'AraC.

Dans tous ces contextes, il apparaît que le niveau d'expression protéique de Chk1 est primordial pour que la cellule ait une réponse adaptée à la situation. En effet, dans le contexte de la différenciation myéloïde, le niveau d'expression ou de phosphorylation de Chk1 pourrait régir l'état de prolifération versus l'état de différenciation des cellules hématopoïétiques normales stimulées par des agents différenciants. Ce résultat peut être replacé dans un contexte plus général, à travers d'autres travaux de la littérature où le niveau d'expression de Chk1 a été décrit comme important pour l'induction de la différenciation dans d'autres contextes cellulaires. Dans les cellules souches neuronales capables de se différencier en neurones, en oligodendrocytes ou en astrocytes *in vitro*, le niveau d'expression de Chk1 et d'ATR diminue drastiquement au 10^{ème} jour de différenciation, alors que dès le 6^{ème} jour, le niveau d'expression et d'activation de p53 et de ses cibles, notamment p21, augmente dans une fraction des cellules, qui vont ensuite mourir par apoptose. Cette apoptose est un phénomène physiologique qui a lieu lors de la neurogenèse. La perte d'expression de Chk1 et d'ATR pourrait contribuer à cette mort cellulaire programmée, liée à l'accumulation de dommages de l'ADN non réparés et à une progression erratique dans le cycle cellulaire (Carlessi et al., 2009). Dans le trophoblaste, le niveau d'expression de Chk1 régite l'état de prolifération ou de différenciation des cellules. Les cellules souches du trophoblaste sont proliférantes mais aussi capables de se différencier en cellules géantes polyploïdes qui sont viables mais non proliférantes. Il apparaît que l'induction de la différenciation dans ce contexte est dû à l'expression d'inhibiteurs des CDK, les protéines p21 et p57. En l'absence de dommages de l'ADN dans les cellules souches du trophoblaste, Chk1 entraîne la suppression de l'expression de ces protéines. Pour cela, Chk1 phosphoryle p21 et p57, ce qui les adresse au protéasome et conduit à leur dégradation, et empêche la progression de la mitose et la division cellulaire, d'où l'apparition de cellules polyploïdes. Ce mécanisme n'est pas observable dans les cellules géantes polyploïdes car elles présentent un niveau d'expression de Chk1 très faible. Dans ce contexte, Chk1 favorise la prolifération cellulaire au détriment de la différenciation, dans un contexte cellulaire non perturbé (Ullah et al., 2011).

Dans le système hématologique, Chk1 pourrait aussi favoriser la prolifération cellulaire. En effet, il est connu que les cellules hématopoïétiques sont particulièrement sensibles au stress réplicatif, et que celui-ci provoque l'induction de la différenciation cellulaire, avec la perte des capacités de prolifération (Blanpain et al., 2011). Sachant que Chk1, comme tous les acteurs du système d'identification et de réparation des dommages de l'ADN, permet de lutter contre le stress réplicatif, il peut être perçu comme un acteur favorisant le maintien des caractéristiques d'auto-renouvellement et de prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Blanpain et al., 2011).

Ainsi, Chk1 pourrait permettre le contrôle de l'orientation de la cellule hématopoïétique vers l'état de prolifération ou de différenciation. Cette notion ouvre de nombreuses perspectives, notamment dans le traitement des LAM, cancer caractérisé par des cellules proliférantes bloquées dans leur différenciation. Jouer sur le niveau d'expression de Chk1 pourrait permettre de restaurer un processus de différenciation dans ces cellules leucémiques et de limiter leur prolifération. Ce concept thérapeutique existe déjà puisque il est connu que certaines résistances des cellules de LAM à l'AraC peuvent être abolies par l'utilisation d'un agent différenciant en combinaison avec l'aracytine (Wang et al., 2015). Ce concept thérapeutique s'adresse plus particulièrement aux cellules ayant un fort niveau d'expression de Chk1, ce qui pourrait permettre le maintien des propriétés d'auto-renouvellement et de prolifération selon Blanpain et al., et qui est totalement cohérent avec les résultats obtenus dans la 2^{ème} partie de ce travail. Dans ce contexte, l'inhibition de Chk1 entrainerait une reprise de la différenciation myéloïde des cellules leucémiques.

Par ailleurs, si le niveau d'expression ou de phosphorylation de Chk1 gouverne l'état de prolifération ou de différenciation des cellules hématopoïétiques normales, une dérégulation de son expression pourrait alors provoquer des conditions favorables au développement de leucémies, notamment la LAM 6 qui est érythroleucémique et la LAM 7 qui est mégacaryoblastique. Dans ce contexte, l'importance du maintien de l'homeostasie cellulaire du niveau d'expression Chk1 prend tout son sens, car elle pourrait prévenir les étapes précoces de la tumorigenèse. D'autant plus que la différenciation myéloïde, contrôlée pour partie par le niveau d'expression de Chk1 comme montré notamment dans la 1^{ère} partie de ce travail, est une étape nécessaire à l'établissement des LAM. En effet, Ye et al. démontrent que le déroulement de la différenciation myéloïde est une étape nécessaire pour le

développement de la leucémogénèse et l'apparition de la cellule initiateur leucémique. Ainsi, un blocage de la différenciation myéloïde résulte en une impossibilité de développement de la leucémogénèse. De ce fait, la différenciation myéloïde a un rôle central dans l'initiation de la leucémogénèse ; de plus l'étape critique dans le développement leucémique semble être la transition des cellules progénitrices myéloïdes vers des cellules initiateur leucémiques (Ye et al., 2015).

Or nous avons montré dans ces travaux de thèse que Chk1 a un rôle dans la bonne progression de la différenciation myéloïde, comme dans la prolifération et l'agressivité des cellules leucémiques. Dans ce contexte, nous pouvons nous poser la question de savoir dans quelle mesure le niveau d'expression de Chk1 peut participer à la mise en place des étapes précoces de la leucémogénèse et gouverne la bonne progression de la différenciation hiérarchisée de la cellule hématopoïétique normale et leucémique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* 25, 863–874.
- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15, 2177–2196.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193–197.
- Albiges, L., Goubar, A., Scott, V., Vicier, C., Lefèbvre, C., Alsafadi, S., Commo, F., Saghatchian, M., Lazar, V., Dessen, P., et al. (2014). Chk1 as a new therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Breast Edinb. Scotl.* 23, 250–258.
- Alexander, W.S., Maurer, A.B., Novak, U., and Harrison-Smith, M. (1996). Tyrosine-599 of the c-Mpl receptor is required for Shc phosphorylation and the induction of cellular differentiation. *EMBO J.* 15, 6531–6540.
- Al-Kaabi, M.M., Alshareeda, A.T., Jerjees, D.A., Muftah, A.A., Green, A.R., Alsubhi, N.H., Nolan, C.C., Chan, S., Cornford, E., Madhusudan, S., et al. (2015). Checkpoint kinase1 (CHK1) is an important biomarker in breast cancer having a role in chemotherapy response. *Br. J. Cancer* 112, 901–911.
- Alonso-de Vega, I., Martín, Y., and Smits, V.A. (2014). USP7 controls Chk1 protein stability by direct deubiquitination. *Cell Cycle* 13, 3921–3926.
- An, N., Kraft, A.S., and Kang, Y. (2013a). Abnormal hematopoietic phenotypes in Pim kinase triple knockout mice. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 6, 12.
- An, N., Lin, Y.-W., Mahajan, S., Kellner, J.N., Wang, Y., Li, Z., Kraft, A.S., and Kang, Y. (2013b). Pim1 serine/threonine kinase regulates the number and functions of murine hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 31, 1202–1212.
- Apostolidis, P.A., Lindsey, S., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2012). Proposed megakaryocytic regulon of p53: the genes engaged to control cell cycle and apoptosis during megakaryocytic differentiation. *Physiol. Genomics* 44, 638–650.
- Arata, Y., Fujita, M., Ohtani, K., Kijima, S., and Kato, J. (2000). Cdk2-dependent and -independent Pathways in E2F-mediated S Phase Induction. *J. Biol. Chem.* 275, 6337–6345.
- Archambault, V., Lépine, G., and Kachaner, D. (2015). Understanding the Polo Kinase machine. *Oncogene* 34, 4799–4807.
- Aressy, B., and Ducommun, B. (2008). Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents Med. Chem.* 8, 818–824.
- Aris, S.M., and Pommier, Y. (2012). Potentiation of the novel topoisomerase I inhibitor indenoisoquinoline LMP-400 by the cell checkpoint and Chk1-Chk2 inhibitor AZD7762. *Cancer Res.* 72, 979–989.
- Asteriti, I.A., De Mattia, F., and Guarguaglini, G. (2015). Cross-Talk between AURKA and Plk1 in Mitotic Entry and Spindle Assembly. *Front. Oncol.* 5, 283.
- Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., et al. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat. Med.* 10, 64–71.

- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J.M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., and Zhang, X.F. (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.* *56*, 127–155.
- Bachmann, M., Hennemann, H., Xing, P.X., Hoffmann, I., and Möröy, T. (2004). The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J. Biol. Chem.* *279*, 48319–48328.
- Badirou, I., Pan, J., Legrand, C., Wang, A., Lordier, L., Boukour, S., Roy, A., Vainchenker, W., and Chang, Y. (2014). Carboxyl-terminal-dependent recruitment of nonmuscle myosin II to megakaryocyte contractile ring during polyploidization. *Blood* *124*, 2564–2568.
- Bahassi, E.M., Ovesen, J.L., Riesenber, A.L., Bernstein, W.Z., Hasty, P.E., and Stambrook, P.J. (2008). The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene* *27*, 3977–3985.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499–506.
- Ball, H.L., Myers, J.S., and Cortez, D. (2005). ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2372–2381.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* *444*, 756–760.
- Bargiela-Iparraguirre, J., Prado-Marchal, L., Fernandez-Fuente, M., Gutierrez-González, A., Moreno-Rubio, J., Muñoz-Fernandez, M., Sereno, M., Sanchez-Prieto, R., Perona, R., and Sanchez-Perez, I. (2016). CHK1 expression in Gastric Cancer is modulated by p53 and RB1/E2F1: implications in chemo/radiotherapy response. *Sci. Rep.* *6*, 21519.
- Barnard, D., Diaz, H.B., Burke, T., Donoho, G., Beckmann, R., Jones, B., Barda, D., King, C., and Marshall, M. (2016). LY2603618, a selective CHK1 inhibitor, enhances the anti-tumor effect of gemcitabine in xenograft tumor models. *Invest. New Drugs* *34*, 49–60.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 238–245.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (1997). The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp. Cell Res.* *237*, 1–6.
- Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 792–804.
- Bartek, J., Mistrik, M., and Bartkova, J. (2012). Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 5–7.
- Bartkova, J., Hořejší, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* *434*, 864–870.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* *444*, 633–637.
- Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M., and Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 2804–2808.

- Beckerman, R., Donner, A.J., Mattia, M., Peart, M.J., Manley, J.L., Espinosa, J.M., and Prives, C. (2009). A role for Chk1 in blocking transcriptional elongation of p21 RNA during the S-phase checkpoint. *Genes Dev.* **23**, 1364–1377.
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M.B., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol.* **173**, 195–206.
- Bennett, L.N., and Clarke, P.R. (2006). Regulation of Claspin degradation by the ubiquitin-proteasome pathway during the cell cycle and in response to ATR-dependent checkpoint activation. *FEBS Lett.* **580**, 4176–4181.
- Bertoli, C., Klier, S., McGowan, C., Wittenberg, C., and de Bruin, R.A.M. (2013). Chk1 keeps cell cycle transcription active in response to replication stress by interfering with E2F6-dependent repression. *Curr. Biol. CB* **23**, 1629–1637.
- Bertoni, F., Codegoni, A.M., Furlan, D., Tibiletti, M.G., Capella, C., and Broggin, M. (1999). CHK1 frameshift mutations in genetically unstable colorectal and endometrial cancers. *Genes. Chromosomes Cancer* **26**, 176–180.
- Besancenot, R., Roos-Weil, D., Tonetti, C., Abdelouahab, H., Lacout, C., Pasquier, F., Willekens, C., Rameau, P., Lecluse, Y., Micol, J.-B., et al. (2014). JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. *Blood* **124**, 2104–2115.
- Bhattacharya, N., Wang, Z., Davitt, C., McKenzie, I.F.C., Xing, P.-X., and Magnuson, N.S. (2002). Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma* **111**, 80–95.
- Blagosklonny, M.V., and Conney, A.H. (2002). Combining phorbol ester (PMA) with UCN-01: fueling fire with water. *Cell Cycle Georget. Tex* **1**, 258–259.
- Blair, P., and Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* **23**, 177–189.
- Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P.A., and Passegué, E. (2011). DNA-Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell* **8**, 16–29.
- Blasina, A., Price, B.D., Turenne, G.A., and McGowan, C.H. (1999). Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr. Biol. CB* **9**, 1135–1138.
- Blasina, A., Hallin, J., Chen, E., Arango, M.E., Kraynov, E., Register, J., Grant, S., Ninkovic, S., Chen, P., Nichols, T., et al. (2008). Breaching the DNA damage checkpoint via PF-00477736, a novel small-molecule inhibitor of checkpoint kinase 1. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2394–2404.
- Blomberg, I., and Hoffmann, I. (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6183–6194.
- Blow, J.J., Ge, X.Q., and Jackson, D.A. (2011). How dormant origins promote complete genome replication. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 405–414.
- Bluteau, D., Glembotsky, A.C., Raimbault, A., Balayn, N., Gilles, L., Rameau, P., Nurden, P., Alessi, M.C., Debili, N., Vainchenker, W., et al. (2012). Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood* **120**, 2708–2718.
- Bockstaele, L., Bisteau, X., Paternot, S., and Roger, P.P. (2009). Differential regulation of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK6, evidence that CDK4 might not be activated by CDK7, and design of a CDK6 activating mutation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4188–4200.
- Boehrer, S., Adès, L., Tajeddine, N., Hofmann, W.K., Kriener, S., Bug, G., Ottmann, O.G., Ruthardt, M., Galluzzi, L., Fouassier, C., et al. (2009). Suppression of the DNA damage response in acute myeloid leukemia versus myelodysplastic syndrome. *Oncogene* **28**, 2205–2218.

- Boles, N.C., Peddibhotla, S., Chen, A.J., Goodell, M.A., and Rosen, J.M. (2010). Chk1 Haploinsufficiency Results in Anemia and Defective Erythropoiesis. *PLoS ONE* 5.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.
- Bourke, E., Dodson, H., Merdes, A., Cuffe, L., Zachos, G., Walker, M., Gillespie, D., and Morrison, C.G. (2007). DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO Rep.* 8, 603–609.
- Bourke, E., Brown, J.A.L., Takeda, S., Hochegger, H., and Morrison, C.G. (2010). DNA damage induces Chk1-dependent threonine-160 phosphorylation and activation of Cdk2. *Oncogene* 29, 616–624.
- Brault, L., Gasser, C., Bracher, F., Huber, K., Knapp, S., and Schwaller, J. (2010). PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica* 95, 1004–1015.
- Brennan, I.M., Peters, U., Kapoor, T.M., and Straight, A.F. (2007). Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis. *PLoS One* 2, e409.
- Brenner, A.K., Reikvam, H., Lavecchia, A., and Bruserud, Ø. (2014). Therapeutic Targeting the Cell Division Cycle 25 (CDC25) Phosphatases in Human Acute Myeloid Leukemia — The Possibility to Target Several Kinases through Inhibition of the Various CDC25 Isoforms. *Molecules* 19, 18414–18447.
- Brizzi, M.F., Dentelli, P., Lanfrancone, L., Rosso, A., Pelicci, P.G., and Pegoraro, L. (1996). Discrete protein interactions with the Grb2/c-Cbl complex in SCF- and TPO-mediated myeloid cell proliferation. *Oncogene* 13, 2067–2076.
- Brooks, K., Oakes, V., Edwards, B., Ranall, M., Leo, P., Pavey, S., Pinder, A., Beamish, H., Mukhopadhyay, P., Lambie, D., et al. (2013). A potent Chk1 inhibitor is selectively cytotoxic in melanomas with high levels of replicative stress. *Oncogene* 32, 788–796.
- Brown, E.J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* 14, 397–402.
- Bryant, C., Scriven, K., and Massey, A.J. (2014). Inhibition of the checkpoint kinase Chk1 induces DNA damage and cell death in human Leukemia and Lymphoma cells. *Mol. Cancer* 13, 147.
- Bucher, N., and Britten, C.D. (2008). G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br. J. Cancer* 98, 523–528.
- Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Popoff, I.J., Gaarde, W.A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., and Fornace, A.J. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 411, 102–107.
- Bunch, R.T., and Eastman, A. (1996). Enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), a new G2-checkpoint inhibitor. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2, 791–797.
- Burkard, M.E., Randall, C.L., Larochelle, S., Zhang, C., Shokat, K.M., Fisher, R.P., and Jallepalli, P.V. (2007). Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4383–4388.
- Burkhart, J.M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2012). The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 120, e73-82.
- Burrell, R.A., McClelland, S.E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M.-C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S.M., Gronroos, E., et al. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494, 492–496.

- Busby, E.C., Leistriz, D.F., Abraham, R.T., Karnitz, L.M., and Sarkaria, J.N. (2000). The Radiosensitizing Agent 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) Inhibits the DNA Damage Checkpoint Kinase hChk1. *Cancer Res.* *60*, 2108–2112.
- Calonge, T.M., and O’Connell, M.J. (2008). Turning off the G2 DNA damage checkpoint. *DNA Repair* *7*, 136–140.
- Calvo, E., Chen, V.J., Marshall, M., Ohnmacht, U., Hynes, S.M., Kumm, E., Diaz, H.B., Barnard, D., Merzoug, F.F., Huber, L., et al. (2014). Preclinical analyses and phase I evaluation of LY2603618 administered in combination with Pemetrexed and cisplatin in patients with advanced cancer. *Invest. New Drugs* *32*, 955–968.
- Capasso, H., Palermo, C., Wan, S., Rao, H., John, U.P., O’Connell, M.J., and Walworth, N.C. (2002). Phosphorylation activates Chk1 and is required for checkpoint-mediated cell cycle arrest. *J. Cell Sci.* *115*, 4555–4564.
- Carlessi, L., De Filippis, L., Lecis, D., Vescovi, A., and Delia, D. (2009). DNA-damage response, survival and differentiation in vitro of a human neural stem cell line in relation to ATM expression. *Cell Death Differ.* *16*, 795–806.
- Carrassa, L., and Damia, G. (2011). Unleashing Chk1 in cancer therapy. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 2121–2128.
- Carrassa, L., Montelatici, E., Lazzari, L., Zangrossi, S., Simone, M., Broggin, M., and Damia, G. (2010). Role of Chk1 in the differentiation program of hematopoietic stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 1713–1722.
- Cavelier, C., Didier, C., Prade, N., Mansat-De Mas, V., Manenti, S., Recher, C., Demur, C., and Ducommun, B. (2009). Constitutive activation of the DNA damage signaling pathway in acute myeloid leukemia with complex karyotype: potential importance for checkpoint targeting therapy. *Cancer Res.* *69*, 8652–8661.
- Cazales, M., Schmitt, E., Montembault, E., Dozier, C., Prigent, C., and Ducommun, B. (2005). CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 1233–1238.
- Chabaliere-Taste, C., Bricchese, L., Racca, C., Canitrot, Y., Calsou, P., and Larminat, F. (2016). Polo-like kinase 1 mediates BRCA1 phosphorylation and recruitment at DNA double-strand breaks. *Oncotarget* *7*, 2269–2283.
- Challen, G.A., Boles, N., Lin, K.K., and Goodell, M.A. (2009). Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification And Analysis. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *75*, 14–24.
- Chambers, S.M., Boles, N.C., Lin, K.-Y.K., Tierney, M.P., Bowman, T.V., Bradfute, S.B., Chen, A.J., Merchant, A.A., Sirin, O., Weksberg, D.C., et al. (2007). Hematopoietic fingerprints: an expression database of stem cells and their progeny. *Cell Stem Cell* *1*, 578–591.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T.D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* *14*, 278–288.
- Chen, Y., and Sanchez, Y. (2004). Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair* *3*, 1025–1032.
- Chen, C.C., Kennedy, R.D., Sidi, S., Look, A.T., and D’Andrea, A. (2009). CHK1 inhibition as a strategy for targeting fanconi anemia (FA) DNA repair pathway deficient tumors. *Mol. Cancer* *8*, 24.
- Chen, P., Luo, C., Deng, Y., Ryan, K., Register, J., Margosiak, S., Tempczyk-Russell, A., Nguyen, B., Myers, P., Lundgren, K., et al. (2000). The 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1: implications for Chk1 regulation. *Cell* *100*, 681–692.
- Chen, T., Stephens, P.A., Middleton, F.K., and Curtin, N.J. (2012). Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov. Today* *17*, 194–202.

- Chen, Y.-H., Jones, M.J.K., Yin, Y., Crist, S.B., Colnaghi, L., Sims, R.J., Rothenberg, E., Jallepalli, P.V., and Huang, T.T. (2015). ATR-mediated phosphorylation of FANCI regulates dormant origin firing in response to replication stress. *Mol. Cell* *58*, 323–338.
- Chen, Z., Hu, M., and Shivdasani, R.A. (2007). Expression analysis of primary mouse megakaryocyte differentiation and its application in identifying stage-specific molecular markers and a novel transcriptional target of NF-E2. *Blood* *109*, 1451–1459.
- Chini, C.C.S., and Chen, J. (2003). Human claspin is required for replication checkpoint control. *J. Biol. Chem.* *278*, 30057–30062.
- Chini, C.C.S., and Chen, J. (2004). Claspin, a regulator of Chk1 in DNA replication stress pathway. *DNA Repair* *3*, 1033–1037.
- Chow, J.P.H., Poon, R.Y.C., and Ma, H.T. (2011). Inhibitory Phosphorylation of Cyclin-Dependent Kinase 1 as a Compensatory Mechanism for Mitosis Exit. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1478–1491.
- Chuang, L.S.H., Khor, J.M., Lai, S.K., Garg, S., Krishnan, V., Koh, C.-G., Lee, S.H., and Ito, Y. (2016). Aurora kinase-induced phosphorylation excludes transcription factor RUNX from the chromatin to facilitate proper mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 6490–6495.
- Cicenas, J. (2016). The Aurora kinase inhibitors in cancer research and therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*
- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 616–627.
- Colmone, A., Amorim, M., Pontier, A.L., Wang, S., Jablonski, E., and Sipkins, D.A. (2008). Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* *322*, 1861–1865.
- Conde, C., Osswald, M., Barbosa, J., Moutinho-Santos, T., Pinheiro, D., Guimarães, S., Matos, I., Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2013). Drosophila Polo regulates the spindle assembly checkpoint through Mps1-dependent BubR1 phosphorylation. *EMBO J.* *32*, 1761–1777.
- Corces-Zimmerman, M.R., and Majeti, R. (2014). Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells – the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia* *28*, 2276–2282.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* *294*, 1713–1716.
- Cortez, D., Glick, G., and Elledge, S.J. (2004). Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10078–10083.
- Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P.J., Cimprich, K.A., Gottesman, M., and Gautier, J. (2003). An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol. Cell* *11*, 203–213.
- Crosby, M.E. (2007). *Cell Cycle: Principles of Control*. Yale J. Biol. Med. *80*, 141–142.
- Datta, N.S., Williams, J.L., Caldwell, J., Curry, A.M., Ashcraft, E.K., and Long, M.W. (1996). Novel alterations in CDK1/cyclin B1 kinase complex formation occur during the acquisition of a polyploid DNA content. *Mol. Biol. Cell* *7*, 209–223.
- Daud, A.I., Ashworth, M.T., Strosberg, J., Goldman, J.W., Mendelson, D., Springett, G., Venook, A.P., Loechner, S., Rosen, L.S., Shanahan, F., et al. (2015). Phase I dose-escalation trial of checkpoint kinase 1 inhibitor MK-8776 as monotherapy and in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 1060–1066.

- Davies, K.D., Humphries, M.J., Sullivan, F.X., von Carlowitz, I., Le Huerou, Y., Mohr, P.J., Wang, B., Blake, J.F., Lyon, M.A., Gunawardana, I., et al. (2011). Single-agent inhibition of Chk1 is antiproliferative in human cancer cell lines in vitro and inhibits tumor xenograft growth in vivo. *Oncol. Res.* **19**, 349–363.
- De Keersmaecker, K., Real, P.J., Gatta, G.D., Palomero, T., Sulis, M.L., Tosello, V., Van Vlierberghe, P., Barnes, K., Castillo, M., Sole, X., et al. (2010). The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. *Nat. Med.* **16**, 1321–1327.
- Dereli-Öz, A., Versini, G., and Halazonetis, T.D. (2011). Studies of genomic copy number changes in human cancers reveal signatures of DNA replication stress. *Mol. Oncol.* **5**, 308–314.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Giovanni Nuciforo, P., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642.
- Didier, C., Demur, C., Grimal, F., Jullien, D., Manenti, S., and Ducommun, B. (2012). Evaluation of checkpoint kinase targeting therapy in acute myeloid leukemia with complex karyotype. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 307–313.
- Dimitrova, D.S., and Gilbert, D.M. (1999). The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol. Cell* **4**, 983–993.
- Doehn, U., Hauge, C., Frank, S.R., Jensen, C.J., Duda, K., Nielsen, J.V., Cohen, M.S., Johansen, J.V., Winther, B.R., Lund, L.R., et al. (2009). RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Mol. Cell* **35**, 511–522.
- Donzelli, M., and Draetta, G.F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep.* **4**, 671–677.
- Drachman, J.G., and Kaushansky, K. (1997). Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2350–2355.
- Draga, M., Madgett, E.B., Vandenberg, C.J., du Plessis, D., Kaufmann, A., Werler, P., Chakraborty, P., Lowndes, N.F., and Hiom, K. (2015). BRCA1 Is Required for Maintenance of Phospho-Chk1 and G2/M Arrest during DNA Cross-Link Repair in DT40 Cells. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3829–3840.
- Dunaway, S., Liu, H.-Y., and Walworth, N.C. (2005). Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function. *J. Cell Sci.* **118**, 39–50.
- Eisbacher, M., Holmes, M.L., Newton, A., Hogg, P.J., Khachigian, L.M., Crossley, M., and Chong, B.H. (2003). Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3427–3441.
- Elagib, K.E., Racke, F.K., Mogass, M., Khetawat, R., Delehanty, L.L., and Goldfarb, A.N. (2003). RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* **101**, 4333–4341.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664–1672.
- Elowe, S., Hümmer, S., Uldschmid, A., Li, X., and Nigg, E.A. (2007). Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev.* **21**, 2205–2219.
- den Elzen, N.R., and O'Connell, M.J. (2004). Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *EMBO J.* **23**, 908–918.
- den Elzen, N., Kosoy, A., Christopoulos, H., and O'Connell, M.J. (2004). Resisting arrest: recovery from checkpoint arrest through dephosphorylation of Chk1 by PP1. *Cell Cycle Georget. Tex* **3**, 529–533.
- Enoch, T., Carr, A.M., and Nurse, P. (1992). Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes Dev.* **6**, 2035–2046.

- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* *410*, 842–847.
- Fan, Y.-H., Cheng, J., Vasudevan, S.A., Dou, J., Zhang, H., Patel, R.H., Ma, I.T., Rojas, Y., Zhao, Y., Yu, Y., et al. (2013). USP7 inhibitor P22077 inhibits neuroblastoma growth via inducing p53-mediated apoptosis. *Cell Death Dis.* *4*, e867.
- Feijoo, C., Hall-Jackson, C., Wu, R., Jenkins, D., Leitch, J., Gilbert, D.M., and Smythe, C. (2001). Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *J. Cell Biol.* *154*, 913–923.
- Ferguson, A.M., White, L.S., Donovan, P.J., and Piwnica-Worms, H. (2005). Normal Cell Cycle and Checkpoint Responses in Mice and Cells Lacking Cdc25B and Cdc25C Protein Phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 2853–2860.
- Ferrao, P.T., Bukczynska, E.P., Johnstone, R.W., and McArthur, G.A. (2012). Efficacy of CHK inhibitors as single agents in MYC-driven lymphoma cells. *Oncogene* *31*, 1661–1672.
- Fichelson, S., Freyssinier, J.M., Picard, F., Fontenay-Roupie, M., Guesnu, M., Cherai, M., Gisselbrecht, S., and Porteu, F. (1999). Megakaryocyte growth and development factor-induced proliferation and differentiation are regulated by the mitogen-activated protein kinase pathway in primitive cord blood hematopoietic progenitors. *Blood* *94*, 1601–1613.
- Flach, J., Bakker, S.T., Mohrin, M., Conroy, P.C., Pietras, E.M., Reynaud, D., Alvarez, S., Diolaiti, M.E., Ugarte, F., Forsberg, E.C., et al. (2014). Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature* *512*, 198–202.
- Flaggs, G., Plug, A.W., Dunks, K.M., Mundt, K.E., Ford, J.C., Quiggle, M.R., Taylor, E.M., Westphal, C.H., Ashley, T., Hoekstra, M.F., et al. (1997). Atm-dependent interactions of a mammalian chk1 homolog with meiotic chromosomes. *Curr. Biol. CB* *7*, 977–986.
- Fock, E., Yan, F., Pan, S., and Chong, B.H. (2008). NF-E2-mediated enhancement of megakaryocytic differentiation and platelet production in vitro and in vivo. *Exp. Hematol.* *36*, 78–92.
- Fogarty, P., Campbell, S.D., Abu-Shumays, R., Phalle, B.S., Yu, K.R., Uy, G.L., Goldberg, M.L., and Sullivan, W. (1997). The *Drosophila* grapes gene is related to checkpoint gene *chk1/rad27* and is required for late syncytial division fidelity. *Curr. Biol. CB* *7*, 418–426.
- Foley, E.A., and Kapoor, T.M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 25–37.
- Forment, J.V., Blasius, M., Guerini, I., and Jackson, S.P. (2011). Structure-Specific DNA Endonuclease Mus81/Eme1 Generates DNA Damage Caused by Chk1 Inactivation. *PLOS ONE* *6*, e23517.
- Fracasso, P.M., Williams, K.J., Chen, R.C., Picus, J., Ma, C.X., Ellis, M.J., Tan, B.R., Pluard, T.J., Adkins, D.R., Naughton, M.J., et al. (2011). A Phase 1 study of UCN-01 in combination with irinotecan in patients with resistant solid tumor malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *67*, 1225–1237.
- Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., and Méchali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 360–374.
- Freire, R., van Vugt, M.A.T.M., Mamely, I., and Medema, R.H. (2006). Claspin: timing the cell cycle arrest when the genome is damaged. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 2831–2834.
- Fuhrken, P.G., Apostolidis, P.A., Lindsey, S., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2008). Tumor suppressor protein p53 regulates megakaryocytic polyploidization and apoptosis. *J. Biol. Chem.* *283*, 15589–15600.
- Fujita, N., Sato, S., and Tsuruo, T. (2003). Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J. Biol. Chem.* *278*, 49254–49260.

- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* *390*, 308–311.
- Furgason, J.M., and Bahassi, E.M. (2013). Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol. Ther.* *137*, 298–308.
- Fuse, E., Tanii, H., Kurata, N., Kobayashi, H., Shimada, Y., Tamura, T., Sasaki, Y., Tanigawara, Y., Lush, R.D., Headlee, D., et al. (1998). Unpredicted clinical pharmacology of UCN-01 caused by specific binding to human alpha1-acid glycoprotein. *Cancer Res.* *58*, 3248–3253.
- Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D., and Labib, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat. Cell Biol.* *8*, 358–366.
- Gamper, A.M., Rofougaran, R., Watkins, S.C., Greenberger, J.S., Beumer, J.H., and Bakkenist, C.J. (2013). ATR kinase activation in G1 phase facilitates the repair of ionizing radiation-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res.* *41*, 10334–10344.
- Ganuzá, M., Sáiz-Ladera, C., Cañamero, M., Gómez, G., Schneider, R., Blasco, M.A., Pisano, D., Paramio, J.M., Santamaría, D., and Barbacid, M. (2012). Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion. *EMBO J.* *31*, 2498–2510.
- Gao, Y., Smith, E., Ker, E., Campbell, P., Cheng, E., Zou, S., Lin, S., Wang, L., Halene, S., and Krause, D.S. (2012). Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev. Cell* *22*, 573–584.
- García, P., and Calés, C. (1996). Endoreplication in megakaryoblastic cell lines is accompanied by sustained expression of G1/S cyclins and downregulation of cdc25C. *Oncogene* *13*, 695–703.
- Garcia, J., de Gunzburg, J., Eychène, A., Gisselbrecht, S., and Porteu, F. (2001). Thrombopoietin-mediated sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in UT7-Mpl cells requires both Ras-Raf-1- and Rap1-B-Raf-dependent pathways. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 2659–2670.
- Garner-Hamrick, P.A., and Fisher, C. (1998). Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects. *Int. J. Cancer* *76*, 720–728.
- Garrett, M.D., and Collins, I. (2011). Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? *Trends Pharmacol. Sci.* *32*, 308–316.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuäsen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.-B., Bartek, J., et al. (2003a). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* *278*, 14806–14811.
- Ge, X.Q., and Blow, J.J. (2010). Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J. Cell Biol.* *191*, 1285–1297.
- Geddis, A.E. (2010). Megakaryopoiesis. *Semin. Hematol.* *47*, 212–219.
- Geddis, A.E., and Kaushansky, K. (2006). Endomitotic megakaryocytes form a midzone in anaphase but have a deficiency in cleavage furrow formation. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 538–545.
- Geddis, A.E., Fox, N.E., and Kaushansky, K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors. *J. Biol. Chem.* *276*, 34473–34479.
- Geddis, A.E., Fox, N.E., Tkachenko, E., and Kaushansky, K. (2007). Endomitotic megakaryocytes that form a bipolar spindle exhibit cleavage furrow ingression followed by furrow regression. *Cell Cycle Georget. Tex* *6*, 455–460.

- Gelot, C., Magdalou, I., and Lopez, B.S. (2015). Replication stress in Mammalian cells and its consequences for mitosis. *Genes* 6, 267–298.
- Glotzer, M. (2009). The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 9–20.
- Goldenson, B., and Crispino, J.D. (2015). The Aurora Kinases in Cell Cycle and Leukemia. *Oncogene* 34, 537–545.
- Goldenson, B., Kirsammer, G., Stankiewicz, M.J., Wen, Q.J., and Crispino, J.D. (2015). Aurora kinase A is required for hematopoiesis but is dispensable for murine megakaryocyte endomitosis and differentiation. *Blood* 125, 2141–2150.
- Goldstone, S., Pavey, S., Forrest, A., Sinnamon, J., and Gabrielli, B. (2001). Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene* 20, 921–932.
- Golsteyn, R.M., Mundt, K.E., Fry, A.M., and Nigg, E.A. (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* 129, 1617–1628.
- Gong, C., Liu, H., Song, R., Zhong, T., Lou, M., Wang, T., Qi, H., Shen, J., Zhu, L., and Shao, J. (2016). ATR–CHK1–E2F3 signaling transactivates human ribonucleotide reductase small subunit M2 for DNA repair induced by the chemical carcinogen MNNG. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1859, 612–626.
- Gong, E.-Y., Smits, V.A.J., Fumagallo, F., Piscitello, D., Morrice, N., Freire, R., and Gillespie, D.A. (2015). KA1-targeted regulatory domain mutations activate Chk1 in the absence of DNA damage. *Sci. Rep.* 5, 10856.
- González Besteiro, M.A., and Gottifredi, V. (2015). The fork and the kinase: a DNA replication tale from a CHK1 perspective. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 763, 168–180.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.-V.F., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434, 907–913.
- Goto, H., Izawa, I., Li, P., and Inagaki, M. (2012). Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Sci.* 103, 1195–1200.
- Goto, H., Kasahara, K., and Inagaki, M. (2015). Novel insights into Chk1 regulation by phosphorylation. *Cell Struct. Funct.* 40, 43–50.
- Gottifredi, V., Karni-Schmidt, O., Shieh, S.S., and Prives, C. (2001). p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1066–1076.
- Goudelock, D.M., Jiang, K., Pereira, E., Russell, B., and Sanchez, Y. (2003). Regulatory interactions between the checkpoint kinase Chk1 and the proteins of the DNA-dependent protein kinase complex. *J. Biol. Chem.* 278, 29940–29947.
- de Graaf, C.A., and Metcalf, D. (2011). Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 1582–1589.
- Grabauskiene, S., Bergeron, E.J., Chen, G., Chang, A.C., Lin, J., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Beer, D.G., Morgan, M.A., and Reddy, R.M. (2013). CHK1 levels correlate with sensitization to pemetrexed by CHK1 inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer Amst. Neth.* 82, 477–484.
- Grabauskiene, S., Bergeron, E.J., Chen, G., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Beer, D.G., Morgan, M.A., and Reddy, R.M. (2014). Checkpoint kinase 1 protein expression indicates sensitization to therapy by checkpoint kinase 1 inhibition in non-small cell lung cancer. *J. Surg. Res.* 187, 6–13.
- Gross, S.D., Lewellyn, A.L., and Maller, J.L. (2001). A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 46099–46103.

- Grote, D., Moison, C., Duhamel, S., Chagraoui, J., Girard, S., Yang, J., Mayotte, N., Coulombe, Y., Masson, J.-Y., Brown, G.W., et al. (2015). E4F1 Is a Master Regulator of CHK1-Mediated Functions. *Cell Rep.* *11*, 210–219.
- Groth, A., Lukas, J., Nigg, E.A., Silljé, H.H.W., Wernstedt, C., Bartek, J., and Hansen, K. (2003). Human Toslled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint. *EMBO J.* *22*, 1676–1687.
- Guo, C., Kumagai, A., Schlacher, K., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. (2015). Interaction of Chk1 with Treslin Negatively Regulates the Initiation of Chromosomal DNA Replication. *Mol. Cell* *57*, 492–505.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X., and Dunphy, W.G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* *14*, 2745–2756.
- Guzi, T.J., Paruch, K., Dwyer, M.P., Labroli, M., Shanahan, F., Davis, N., Taricani, L., Wiswell, D., Seghezzi, W., Penafior, E., et al. (2011). Targeting the Replication Checkpoint Using SCH 900776, a Potent and Functionally Selective CHK1 Inhibitor Identified via High Content Screening. *Mol. Cancer Ther.* *10*, 591–602.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. (2008). An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* *319*, 1352–1355.
- Haldar, S., Roy, A., and Banerjee, S. (2014). Differential regulation of MCM7 and its intronic miRNA cluster miR-106b-25 during megakaryopoiesis induced polyploidy. *RNA Biol.* *11*, 1137–1147.
- Hamada, T., Möhle, R., Hesselgesser, J., Hoxie, J., Nachman, R.L., Moore, M.A., and Rafii, S. (1998). Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J. Exp. Med.* *188*, 539–548.
- Han, X., Aslanian, A., Fu, K., Tsuji, T., and Zhang, Y. (2014). The interaction between checkpoint kinase 1 (Chk1) and the minichromosome maintenance (MCM) complex is required for DNA damage-induced Chk1 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *289*, 24716–24723.
- Han, X., Mayca Pozo, F., Wisotsky, J.N., Wang, B., Jacobberger, J.W., and Zhang, Y. (2015). Phosphorylation of Minichromosome Maintenance 3 (MCM3) by Checkpoint Kinase 1 (Chk1) Negatively Regulates DNA Replication and Checkpoint Activation. *J. Biol. Chem.* *290*, 12370–12378.
- Han, X., Tang, J., Wang, J., Ren, F., Zheng, J., Gragg, M., Kiser, P., Park, P.S.-H., Palczewski, K., Yao, X., et al. (2016). Conformational change of human checkpoint kinase 1 (Chk1) induced by DNA damage. *J. Biol. Chem.*
- Handagama, P.J., George, J.N., Shuman, M.A., McEver, R.P., and Bainton, D.F. (1987). Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 861–865.
- Harrigan, J.A., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D.S., Polo, S.E., Bradshaw, C.R., Fraser, P., and Jackson, S.P. (2011). Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J. Cell Biol.* *193*, 97–108.
- Harris, D.R., and Bunz, F. (2010). Protein phosphatases and the dynamics of the DNA damage response. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 861.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* *246*, 629–634.
- Hassepass, I., Voit, R., and Hoffmann, I. (2003). Phosphorylation at serine 75 is required for UV-mediated degradation of human Cdc25A phosphatase at the S-phase checkpoint. *J. Biol. Chem.* *278*, 29824–29829.
- Hatchi, E., Rodier, G., Lacroix, M., Caramel, J., Kirsh, O., Jacquet, C., Schrepfer, E., Lagarrigue, S., Linares, L.K., Lledo, G., et al. (2011). E4F1 deficiency results in oxidative stress-mediated cell death of leukemic cells. *J. Exp. Med.* *208*, 1403–1417.

- Hayles, J., Fisher, D., Woollard, A., and Nurse, P. (1994). Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell* 78, 813–822.
- Heffernan, T.P., Simpson, D.A., Frank, A.R., Heinloth, A.N., Paules, R.S., Cordeiro-Stone, M., and Kaufmann, W.K. (2002). An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8552–8561.
- Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J.* 13, 4302–4310.
- Hoglund, A., Nilsson, L.M., Muralidharan, S.V., Hasvold, L.A., Merta, P., Rudelius, M., Nikolova, V., Keller, U., and Nilsson, J.A. (2011). Therapeutic Implications for the Induced Levels of Chk1 in Myc-Expressing Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 17, 7067–7079.
- Horibe, S., Takagi, M., Unno, J., Nagasawa, M., Morio, T., Arai, A., Miura, O., Ohta, M., Kitagawa, M., and Mizutani, S. (2007). DNA damage check points prevent leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 21, 2195–2198.
- Hromas, R., Williamson, E., Fnu, S., Lee, Y.-J., Park, S.-J., Beck, B.D., You, J.-S., Laitao, A., Nickoloff, J.A., and Lee, S.-H. (2012). Chk1 phosphorylation of Metnase/SETMAR at Ser495 enhances DNA repair but decreases replication fork restart. *Oncogene* 31, 4245–4254.
- Hu, W., Zong, Q., John-Baptiste, A., and Jessen, B. (2011). Transient knock down of checkpoint kinase 1 in hematopoietic progenitors is linked to bone marrow toxicity. *Toxicol. Lett.* 204, 141–147.
- Huang, X., Ruan, Q., Fang, Y., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., and Dai, W. (2004). Physical and Functional Interactions between Mitotic Kinases during Polyploidization and Megakaryocytic Differentiation. *Cell Cycle* 3, 944–949.
- Iacobucci, I., Di Rorà, A.G.L., Falzacappa, M.V.V., Agostinelli, C., Derenzini, E., Ferrari, A., Papayannidis, C., Lonetti, A., Righi, S., Imbrogno, E., et al. (2015). In vitro and in vivo single-agent efficacy of checkpoint kinase inhibition in acute lymphoblastic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 8, 125.
- Ichikawa, M., Asai, T., Chiba, S., Kurokawa, M., and Ogawa, S. (2004). Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle Georget. Tex* 3, 722–724.
- Ikegami, Y., Goto, H., Kiyono, T., Enomoto, M., Kasahara, K., Tomono, Y., Tozawa, K., Morita, A., Kohri, K., and Inagaki, M. (2008). Chk1 phosphorylation at Ser286 and Ser301 occurs with both stalled DNA replication and damage checkpoint stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1227–1231.
- Italiano, J.E., Lecine, P., Shivdasani, R.A., and Hartwig, J.H. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.* 147, 1299–1312.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jackson, J.R., Gilmartin, A., Imburgia, C., Winkler, J.D., Marshall, L.A., and Roshak, A. (2000). An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res.* 60, 566–572.
- Jia, L., Kim, S., and Yu, H. (2013). Tracking spindle checkpoint signals from kinetochores to APC/C. *Trends Biochem. Sci.* 38, 302–311.
- Jiang, K., Pereira, E., Maxfield, M., Russell, B., Goudelock, D.M., and Sanchez, Y. (2003). Regulation of Chk1 Includes Chromatin Association and 14-3-3 Binding following Phosphorylation on Ser-345. *J. Biol. Chem.* 278, 25207–25217.

- Jiang, X., Zhao, B., Britton, R., Lim, L.Y., Leong, D., Sanghera, J.S., Zhou, B.-B.S., Piers, E., Andersen, R.J., and Roberge, M. (2004). Inhibition of Chk1 by the G2 DNA damage checkpoint inhibitor isogranulatimide. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1221–1227.
- Josefsson, E.C., James, C., Henley, K.J., Debrincat, M.A., Rogers, K.L., Dowling, M.R., White, M.J., Kruse, E.A., Lane, R.M., Ellis, S., et al. (2011). Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J. Exp. Med.* **208**, 2017–2031.
- Jung, Y.-J., Chae, H.-C., Seoh, J.-Y., Ryu, K.-H., Park, H.-K., Kim, Y.-J., and Woo, S.-Y. (2006). Pim-1 induced polyploidy but did not affect megakaryocytic differentiation of K562 cells and CD34+ cells from cord blood. *Eur. J. Haematol.* **0**, 061205033335002–???
- Kaldis, P. (1999). The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **55**, 284–296.
- Kaneko, Y.S., Watanabe, N., Morisaki, H., Akita, H., Fujimoto, A., Tominaga, K., Terasawa, M., Tachibana, A., Ikeda, K., Nakanishi, M., et al. (1999). Cell-cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene* **18**, 3673–3681.
- Karp, J.E., Thomas, B.M., Greer, J.M., Sorge, C., Gore, S.D., Pratz, K.W., Smith, B.D., Flatten, K.S., Peterson, K., Schneider, P., et al. (2012). Phase I and Pharmacologic Trial of Cytosine Arabinoside with the Selective Checkpoint 1 Inhibitor Sch 900776 in Refractory Acute Leukemias. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 6723–6731.
- Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T., and Inagaki, M. (2010). 14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J.* **29**, 2802–2812.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316–323.
- Kastan, M.B., and Lim, D.S. (2000). The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 179–186.
- Katayama, H., Ota, T., Morita, K., Terada, Y., Suzuki, F., Katoh, O., and Tatsuka, M. (1998). Human AIM-1: cDNA cloning and reduced expression during endomitosis in megakaryocyte-lineage cells. *Gene* **224**, 1–7.
- Katsuragi, Y., and Sagata, N. (2004). Regulation of Chk1 kinase by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1680–1689.
- Kaushansky, K. (2005). The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J. Clin. Invest.* **115**, 3339–3347.
- Kaushansky, K. (2008). Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* **111**, 981–986.
- Kawabe, T. (2004). G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 513–519.
- Kawasaki, A., Matsumura, I., Miyagawa, J., null, Ezo, S., Tanaka, H., Terada, Y., Tatsuka, M., Machii, T., Miyazaki, H., Furukawa, Y., et al. (2001). Downregulation of an AIM-1 kinase couples with megakaryocytic polyploidization of human hematopoietic cells. *J. Cell Biol.* **152**, 275–287.
- Kelly, A.E., and Funabiki, H. (2009). Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 51–58.
- Khanna, A., Kauko, O., Böckelman, C., Laine, A., Schreck, I., Partanen, J.I., Szwajda, A., Bormann, S., Bilgen, T., Helenius, M., et al. (2013). Chk1 Targeting Reactivates PP2A Tumor Suppressor Activity in Cancer Cells. *Cancer Res.* **73**, 6757–6769.
- al-Khodairy, F., and Carr, A.M. (1992). DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **11**, 1343–1350.

- al-Khodairy, F., Fotou, E., Sheldrick, K.S., Griffiths, D.J., Lehmann, A.R., and Carr, A.M. (1994). Identification and characterization of new elements involved in checkpoint and feedback controls in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* *5*, 147–160.
- Kim, J.-A., Jung, Y.-J., Seoh, J.-Y., Woo, S.-Y., Seo, J.-S., and Kim, H.-L. (2002). Gene Expression Profile of Megakaryocytes from Human Cord Blood CD34+ Cells Ex Vivo Expanded by Thrombopoietin. *STEM CELLS* *20*, 402–416.
- Kim, K.W., Kim, S.H., Lee, E.Y., Kim, N.D., Kang, H.S., Kim, H.D., Chung, B.S., and Kang, C.D. (2001). Extracellular signal-regulated kinase/90-KDA ribosomal S6 kinase/nuclear factor-kappa B pathway mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 13186–13191.
- King, C., Diaz, H., Barnard, D., Barda, D., Clawson, D., Blosser, W., Cox, K., Guo, S., and Marshall, M. (2014). Characterization and preclinical development of LY2603618: a selective and potent Chk1 inhibitor. *Invest. New Drugs* *32*, 213–226.
- King, C., Diaz, H.B., McNeely, S., Barnard, D., Dempsey, J., Blosser, W., Beckmann, R., Barda, D., and Marshall, M.S. (2015). LY2606368 Causes Replication Catastrophe and Antitumor Effects through CHK1-Dependent Mechanisms. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 2004–2013.
- Kodaki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Downward, P.R.-V.J., and Parker, P.J. (1994). The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr. Biol.* *4*, 798–806.
- Koh, S.-B., Courtin, A., Boyce, R.J., Boyle, R.G., Richards, F.M., and Jodrell, D.I. (2015). CHK1 Inhibition Synergizes with Gemcitabine Initially by Destabilizing the DNA Replication Apparatus. *Cancer Res.* *75*, 3583–3595.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661–672.
- Kosoy, A., and O’Connell, M.J. (2008). Regulation of Chk1 by its C-terminal domain. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4546–4553.
- Krajewska, M., Fehrmann, R.S.N., Schoonen, P.M., Labib, S., de Vries, E.G.E., Franke, L., and van Vugt, M. (2015). ATR inhibition preferentially targets homologous recombination-deficient tumor cells. *Oncogene* *34*, 3474–3481.
- Krämer, A., Lukas, J., and Bartek, J. (2004a). Checking out the centrosome. *Cell Cycle Georget. Tex* *3*, 1390–1393.
- Krämer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuåsen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J., and Lukas, J. (2004b). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat. Cell Biol.* *6*, 884–891.
- Krause, D.R., Jonnalagadda, J.C., Gatei, M.H., Sillje, H.H., Zhou, B.-B., Nigg, E.A., and Khanna, K. (2003). Suppression of Tousled-like kinase activity after DNA damage or replication block requires ATM, NBS1 and Chk1. *Oncogene* *22*, 5927–5937.
- Krishnan, V., Nirantar, S., Crasta, K., Cheng, A.Y.H., and Surana, U. (2004). DNA replication checkpoint prevents precocious chromosome segregation by regulating spindle behavior. *Mol. Cell* *16*, 687–700.
- Kristjánsdóttir, K., and Rudolph, J. (2004). Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem. Biol.* *11*, 1043–1051.
- Krystyniak, A., Garcia-Echeverria, C., Prigent, C., and Ferrari, S. (2006). Inhibition of Aurora A in response to DNA damage. *Oncogene* *25*, 338–348.
- Kumagai, A., Guo, Z., Emami, K.H., Wang, S.X., and Dunphy, W.G. (1998). The Xenopus Chk1 protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of checkpoint control in cell-free extracts. *J. Cell Biol.* *142*, 1559–1569.
- Kummar, S., Gutierrez, M.E., Gardner, E.R., Figg, W.D., Melillo, G., Dancy, J., Sausville, E.A., Conley, B.A., Murgo, A.J., and Doroshow, J.H. (2010). A phase I trial of UCN-01 and prednisone in patients with refractory solid tumors and lymphomas. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *65*, 383–389.

- Kuntz, K., and O'Connell, M.J. (2009). The G(2) DNA damage checkpoint: could this ancient regulator be the Achilles heel of cancer? *Cancer Biol. Ther.* *8*, 1433–1439.
- Kuvardina, O.N., Herglotz, J., Kolodziej, S., Kohrs, N., Herkt, S., Wojcik, B., Oellerich, T., Corso, J., Behrens, K., Kumar, A., et al. (2015). RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood* *125*, 3570–3579.
- Lainchbury, M., and Collins, I. (2011). Checkpoint kinase inhibitors: a patent review (2009 – 2010). *Expert Opin. Ther. Pat.* *21*, 1191–1210.
- Lam, M.H., Liu, Q., Elledge, S.J., and Rosen, J.M. (2004). Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* *6*, 45–59.
- Lampert, I.A., Horncastle, D., Dilworth, S., Roberts, I., Alison, M.R., and Naresh, K.N. (2005). The expression of minichromosome maintenance protein-2 in normal and abnormal megakaryocytes and comparison with the proliferative marker Ki-67. *Br. J. Haematol.* *131*, 490–494.
- Lane, H.A., and Nigg, E.A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* *135*, 1701–1713.
- Lara, R., Seckl, M.J., and Pardo, O.E. (2013). The p90 RSK Family Members: Common Functions and Isoform Specificity. *Cancer Res.* *73*, 5301–5308.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol. CB* *22*, R966-980.
- Laresgoiti, U., Apraiz, A., Olea, M., Mitxelena, J., Osinalde, N., Rodriguez, J.A., Fullaondo, A., and Zubiaga, A.M. (2013). E2F2 and CREB cooperatively regulate transcriptional activity of cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* *41*, 10185–10198.
- Lau, C.C., and Pardee, A.B. (1982). Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 2942–2946.
- Le Cam, L., Linares, L.K., Paul, C., Julien, E., Lacroix, M., Hatchi, E., Triboulet, R., Bossis, G., Shmueli, A., Rodriguez, M.S., et al. (2006). E4F1 Is an Atypical Ubiquitin Ligase that Modulates p53 Effector Functions Independently of Degradation. *Cell* *127*, 775–788.
- Lee, G., Oh, T.-I., Um, K.B., Yoon, H., Son, J., Kim, B.M., Kim, H.-I., Kim, H., Kim, Y.J., Lee, C.-S., et al. (2016). Small-molecule inhibitors of USP7 induce apoptosis through oxidative and endoplasmic reticulum stress in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *470*, 181–186.
- Lee, H.-J., Hwang, H.-I., and Jang, Y.-J. (2010). Mitotic DNA damage response: Polo-like kinase-1 is dephosphorylated through ATM-Chk1 pathway. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 2389–2398.
- Lénárt, P., Petronczki, M., Steegmaier, M., Di Fiore, B., Lipp, J.J., Hoffmann, M., Rettig, W.J., Kraut, N., and Peters, J.-M. (2007). The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr. Biol. CB* *17*, 304–315.
- Leung-Pineda, V., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H. (2006). Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7529–7538.
- Leung-Pineda, V., Huh, J., and Piwnica-Worms, H. (2009). DDB1 targets Chk1 to the Cul4 E3 ligase complex in normal cycling cells and in cells experiencing replication stress. *Cancer Res.* *69*, 2630–2637.
- Lezina, L., Purmessur, N., Antonov, A.V., Ivanova, T., Karpova, E., Krishan, K., Ivan, M., Aksenova, V., Tentler, D., Garabadgiu, A.V., et al. (2013). miR-16 and miR-26a target checkpoint kinases Wee1 and Chk1 in response to p53 activation by genotoxic stress. *Cell Death Dis.* *4*, e953.

- Li, P., Goto, H., Kasahara, K., Matsuyama, M., Wang, Z., Yatabe, Y., Kiyono, T., and Inagaki, M. (2012a). P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1582–1592.
- Li, R., Chen, D.-F., Zhou, R., Jia, S.-N., Yang, J.-S., Clegg, J.S., and Yang, W.-J. (2012b). Involvement of Polo-like Kinase 1 (Plk1) in Mitotic Arrest by Inhibition of Mitogen-activated Protein Kinase-Extracellular Signal-regulated Kinase-Ribosomal S6 Kinase 1 (MEK-ERK-RSK1) Cascade. *J. Biol. Chem.* **287**, 15923–15934.
- Li, T., Christensen, S.D., Frankel, P.H., Margolin, K.A., Agarwala, S.S., Luu, T., Mack, P.C., Lara, P.N., and Gandara, D.R. (2012c). A phase II study of cell cycle inhibitor UCN-01 in patients with metastatic melanoma: a California Cancer Consortium trial. *Invest. New Drugs* **30**, 741–748.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 3079–3093.
- Liu, P., Barkley, L.R., Day, T., Bi, X., Slater, D.M., Alexandrow, M.G., Nasheuer, H.-P., and Vaziri, C. (2006a). The Chk1-mediated S-phase checkpoint targets initiation factor Cdc45 via a Cdc25A/Cdk2-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**, 30631–30644.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* **14**, 1448–1459.
- Liu, S., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J. (2006b). Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6056–6064.
- Liu, S., Shiotani, B., Lahiri, M., Maréchal, A., Tse, A., Leung, C.C.Y., Mark Glover, J.N., Yang, X.H., and Zou, L. (2011). ATR Autophosphorylation as a Molecular Switch for Checkpoint Activation. *Mol. Cell* **43**, 192–202.
- Löffler, H., Rebacz, B., Ho, A.D., Lukas, J., Bartek, J., and Krämer, A. (2006). Chk1-dependent regulation of Cdc25B functions to coordinate mitotic events. *Cell Cycle Georget. Tex* **5**, 2543–2547.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., and Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**, 557–561.
- López-Contreras, A.J., Gutierrez-Martinez, P., Specks, J., Rodrigo-Perez, S., and Fernandez-Capetillo, O. (2012). An extra allele of Chk1 limits oncogene-induced replicative stress and promotes transformation. *J. Exp. Med.* **209**, 455–461.
- Lopez-Girona, A., Tanaka, K., Chen, X.B., Baber, B.A., McGowan, C.H., and Russell, P. (2001). Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11289–11294.
- Lordier, L., Jalil, A., Aurade, F., Larbret, F., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W., and Chang, Y. (2008). Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* **112**, 3164–3174.
- Lordier, L., Chang, Y., Jalil, A., Aurade, F., Garcon, L., Lecluse, Y., Larbret, F., Kawashima, T., Kitamura, T., Larghero, J., et al. (2010). Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. *Blood* **116**, 2345–2355.
- Lordier, L., Bluteau, D., Jalil, A., Legrand, C., Pan, J., Rameau, P., Jouni, D., Bluteau, O., Mercher, T., Leon, C., et al. (2012). RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat. Commun.* **3**, 717.
- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., et al. (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* **13**, 243–253.

- Lunardi, A., Varmeh, S., Chen, M., Taulli, R., Guarnerio, J., Ala, U., Seitzer, N., Ishikawa, T., Carver, B.S., Hobbs, R.M., et al. (2015). Suppression of CHK1 by ETS Family Members Promotes DNA Damage Response Bypass and Tumorigenesis. *Cancer Discov.* *5*, 550–563.
- Lundgren, K., Holm, K., Nordenskjöld, B., Borg, A., and Landberg, G. (2008). Gene products of chromosome 11q and their association with CCND1 gene amplification and tamoxifen resistance in premenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* *10*, R81.
- Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J. (2009). Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* *136*, 823–837.
- Ma, C.X., Janetka, J.W., and Piwnica-Worms, H. (2011). Death by releasing the breaks: CHK1 inhibitors as cancer therapeutics. *Trends Mol. Med.* *17*, 88–96.
- Ma, C.X., Ellis, M.J.C., Petroni, G.R., Guo, Z., Cai, S., Ryan, C.E., Craig Lockhart, A., Naughton, M.J., Pluard, T.J., Brenin, C.M., et al. (2013). A phase II study of UCN-01 in combination with irinotecan in patients with metastatic triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *137*, 483–492.
- Machlus, K.R., and Italiano, J.E. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J. Cell Biol.* *201*, 785–796.
- Macurek, L., Benada, J., Müllers, E., Halim, V.A., Krejčíková, K., Burdová, K., Pecháčková, S., Hodný, Z., Lindqvist, A., Medema, R.H., et al. (2013). Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis. *Cell Cycle Georget. Tex* *12*, 251–262.
- Madoz-Gúrpide, J., Cañamero, M., Sanchez, L., Solano, J., Alfonso, P., and Casal, J.I. (2007). A proteomics analysis of cell signaling alterations in colorectal cancer. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *6*, 2150–2164.
- Magné, S., Caron, S., Charon, M., Rouyez, M.-C., and Dusanter-Fourt, I. (2003). STAT5 and Oct-1 form a stable complex that modulates cyclin D1 expression. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8934–8945.
- Mahfoudhi, E., Lordier, L., Marty, C., Pan, J., Roy, A., Roy, L., Rameau, P., Abbes, S., Debili, N., Raslova, H., et al. (2016). P53 activation inhibits all types of hematopoietic progenitors and all stages of megakaryopoiesis. *Oncotarget*.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuåsen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* *288*, 1425–1429.
- Mailand, N., Podtelejnikov, A.V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2002). Regulation of G2/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J.* *21*, 5911–5920.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol. Cell* *23*, 307–318.
- Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.-F., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* *21*, 43–48.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 153–166.
- Mamely, I., van Vugt, M.A., Smits, V.A.J., Semple, J.I., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R.H., and Freire, R. (2006). Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. *Curr. Biol. CB* *16*, 1950–1955.
- Manke, I.A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M.Q., Elia, A.E.H., and Yaffe, M.B. (2005). MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol. Cell* *17*, 37–48.

- Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* *97*, 3333–3341.
- Matsumura, I., Ishikawa, J., Nakajima, K., Oritani, K., Tomiyama, Y., Miyagawa, J., Kato, T., Miyazaki, H., Matsuzawa, Y., and Kanakura, Y. (1997). Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 2933–2943.
- Matsuura, K., Wakasugi, M., Yamashita, K., and Matsunaga, T. (2008). Cleavage-mediated Activation of Chk1 during Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *283*, 25485–25491.
- Matsuyama, M., Goto, H., Kasahara, K., Kawakami, Y., Nakanishi, M., Kiyono, T., Goshima, N., and Inagaki, M. (2011). Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J Cell Sci* *124*, 2113–2119.
- Matthews, D. (2007). In vitro and in vivo potentiation of cytotoxic therapy by XL844, an orally bioavailable inhibitor of Chk1 and Chk2. *Mol. Cancer Ther.* *6*, B228–B228.
- Matthews, T.P., Jones, A.M., and Collins, I. (2013). Structure-based design, discovery and development of checkpoint kinase inhibitors as potential anti-cancer therapies. *Expert Opin. Drug Discov.* *8*, 621–640.
- Maugeri-Saccà, M., Bartucci, M., and De Maria, R. (2013). Checkpoint kinase 1 inhibitors for potentiating systemic anticancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* *39*, 525–533.
- Maya-Mendoza, A., Petermann, E., Gillespie, D.A., Caldecott, K.W., and Jackson, D.A. (2007). Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *EMBO J.* *26*, 2719–2731.
- Mazharian, A., Watson, S.P., and Séverin, S. (2009). Critical role for ERK1/2 in bone marrow and fetal liver–derived primary megakaryocyte differentiation, motility, and proplatelet formation. *Exp. Hematol.* *37*, 1238–1249.e5.
- Mazharian, A., Mori, J., Wang, Y.-J., Heising, S., Neel, B.G., Watson, S.P., and Senis, Y.A. (2013). Megakaryocyte-specific deletion of the protein-tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 causes abnormal megakaryocyte development, platelet production, and function. *Blood* *121*, 4205–4220.
- McNeely, S., Beckmann, R., and Bence Lin, A.K. (2014). CHEK again: revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* *142*, 1–10.
- Melendez, J., Stengel, K., Zhou, X., Chauhan, B.K., Debidda, M., Andreassen, P., Lang, R.A., and Zheng, Y. (2011). RhoA GTPase is dispensable for actomyosin regulation but is essential for mitosis in primary mouse embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *286*, 15132–15137.
- Merry, C., Fu, K., Wang, J., Yeh, I.-J., and Zhang, Y. (2010). Targeting the checkpoint kinase Chk1 in cancer therapy. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 279–283.
- Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* *111*, 485–491.
- Metcalf, D., Carpinelli, M.R., Hyland, C., Mifsud, S., Dirago, L., Nicola, N.A., Hilton, D.J., and Alexander, W.S. (2005). Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene. *Blood* *105*, 3480–3487.
- Meyer, S.C., and Levine, R.L. (2014). Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* *15*, e382–e394.
- Mikkola, H.K.A., Fujiwara, Y., Schlaeger, T.M., Traver, D., and Orkin, S.H. (2003). Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood* *101*, 508–516.
- Mitchell, C., Park, M., Eulitt, P., Yang, C., Yacoub, A., and Dent, P. (2010). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Modulates the Lethality of CHK1 Inhibitors in Carcinoma Cells. *Mol. Pharmacol.* *78*, 909–917.

- Miyakawa, Y., Oda, A., Druker, B.J., Kato, T., Miyazaki, H., Handa, M., and Ikeda, Y. (1995). Recombinant thrombopoietin induces rapid protein tyrosine phosphorylation of Janus kinase 2 and Shc in human blood platelets. *Blood* *86*, 23–27.
- Miyakawa, Y., Rojnuckarin, P., Habib, T., and Kaushansky, K. (2001). Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J. Biol. Chem.* *276*, 2494–2502.
- Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F., and Draetta, G.F. (2000). Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep.* *1*, 71–79.
- Mondello, P., Cuzzocrea, S., and Mian, M. (2014). Pim kinases in hematological malignancies: where are we now and where are we going? *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* *7*, 95.
- Montano, R., Thompson, R., Chung, I., Hou, H., Khan, N., and Eastman, A. (2013). Sensitization of human cancer cells to gemcitabine by the Chk1 inhibitor MK-8776: cell cycle perturbation and impact of administration schedule in vitro and in vivo. *BMC Cancer* *13*, 604.
- Morishita, D., Katayama, R., Sekimizu, K., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Res.* *68*, 5076–5085.
- Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* *1*, 661–673.
- Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Hemmati, H.D., Wright, D.E., and Weissman, I.L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 1929–1939.
- Moser, B.A., Brondello, J.M., Baber-Furnari, B., and Russell, P. (2000). Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4288–4294.
- Moussa, O., LaRue, A.C., Abangan, R.S., Williams, C.R., Zhang, X.K., Masuya, M., Gong, Y.Z., Spyropoulos, D.D., Ogawa, M., Gilkeson, G., et al. (2010). Thrombocytopenia in mice lacking the carboxy-terminal regulatory domain of the Ets transcription factor Fli1. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 5194–5206.
- Mui, A.L., Wakao, H., Kinoshita, T., Kitamura, T., and Miyajima, A. (1996). Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *EMBO J.* *15*, 2425–2433.
- Murga, M., Bunting, S., Montaña, M.F., Soria, R., Mulero, F., Cañamero, M., Lee, Y., McKinnon, P.J., Nussenzweig, A., and Fernandez-Capetillo, O. (2009). A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat. Genet.* *41*, 891–898.
- Murga, M., Campaner, S., Lopez-Contreras, A.J., Toledo, L.I., Soria, R., Montaña, M.F., D'Artista, L., Schleker, T., Guerra, C., Garcia, E., et al. (2011). Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1331–1335.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 379–393.
- Myers, K., Gagou, M.E., Zuazua-Villar, P., Rodriguez, R., and Meuth, M. (2009). ATR and Chk1 suppress a caspase-3-dependent apoptotic response following DNA replication stress. *PLoS Genet.* *5*, e1000324.
- Na Nakorn, T., Traver, D., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2002). Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *J. Clin. Invest.* *109*, 1579–1585.
- Nakanishi, M., Katsuno, Y., Niida, H., Murakami, H., and Shimada, M. (2010). Chk1-cyclin A/Cdk1 axis regulates origin firing programs in mammals. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* *18*, 103–113.

- Nakao, T., Geddis, A.E., Fox, N.E., and Kaushansky, K. (2008). PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27(Kip1). *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 257–266.
- Nam, E.A., and Cortez, D. (2011). ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem. J.* 436, 527–536.
- Nam, H.-J., Lee, I.J., Jang, S., Bae, C.-D., Kwak, S.-J., and Lee, J.-H. (2014). p90 ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) isoenzyme specifically regulates cytokinesis progression. *Cell. Signal.* 26, 208–219.
- Narlik-Grassow, M., Blanco-Aparicio, C., and Carnero, A. (2014). The PIM family of serine/threonine kinases in cancer. *Med. Res. Rev.* 34, 136–159.
- Neef, R., Gruneberg, U., Kopajtich, R., Li, X., Nigg, E.A., Sillje, H., and Barr, F.A. (2007). Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat. Cell Biol.* 9, 436–444.
- Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H., and Graf, T. (2000). GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* 95, 2543–2551.
- Niida, H., and Nakanishi, M. (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21, 3–9.
- Niida, H., Katsuno, Y., Banerjee, B., Hande, M.P., and Nakanishi, M. (2007). Specific role of Chk1 phosphorylations in cell survival and checkpoint activation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2572–2581.
- Nilsson, I., and Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog. Cell Cycle Res.* 4, 107–114.
- O’Connell, M.J., and Cimprich, K.A. (2005). G2 damage checkpoints: what is the turn-on? *J. Cell Sci.* 118, 1–6.
- O’Connell, M.J., Raleigh, J.M., Verkade, H.M., and Nurse, P. (1997). Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J.* 16, 545–554.
- O’Connell, M.J., Walworth, N.C., and Carr, A.M. (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol.* 10, 296–303.
- Okita, N., Minato, S., Ohmi, E., Tanuma, S., and Higami, Y. (2012). DNA damage-induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by an intramolecular mechanism. *FEBS Lett.* 586, 3974–3979.
- Okita, N., Yoshimura, M., Watanabe, K., Minato, S., Kudo, Y., Higami, Y., and Tanuma, S. (2013). CHK1 cleavage in programmed cell death is intricately regulated by both caspase and non-caspase family proteases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1830, 2204–2213.
- Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1, 57–64.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242–245.
- Osman, F., and Whitby, M.C. (2007). Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks. *DNA Repair* 6, 1004–1017.
- Ou, Y.-H., Chung, P.-H., Sun, T.-P., and Shieh, S.-Y. (2005). p53 C-Terminal Phosphorylation by CHK1 and CHK2 Participates in the Regulation of DNA-Damage-induced C-Terminal Acetylation. *Mol. Biol. Cell* 16, 1684–1695.
- Pabla, N., Bhatt, K., and Dong, Z. (2012). Checkpoint kinase 1 (Chk1)-short is a splice variant and endogenous inhibitor of Chk1 that regulates cell cycle and DNA damage checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 197–202.
- Palmer, B.D., Thompson, A.M., Booth, R.J., Dobrusin, E.M., Kraker, A.J., Lee, H.H., Lunney, E.A., Mitchell, L.H., Ortwine, D.F., Smaill, J.B., et al. (2006). 4-Phenylpyrrolo[3,4-c]carbazole-1,3(2H,6H)-dione inhibitors of the

- checkpoint kinase Wee1. Structure-activity relationships for chromophore modification and phenyl ring substitution. *J. Med. Chem.* **49**, 4896–4911.
- Park, C., Suh, Y., and Cuervo, A.M. (2015). Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat. Commun.* **6**, 6823.
- Parsels, L.A., Morgan, M.A., Tanska, D.M., Parsels, J.D., Palmer, B.D., Booth, R.J., Denny, W.A., Canman, C.E., Kraker, A.J., Lawrence, T.S., et al. (2009). Gemcitabine sensitization by Chk1 inhibition correlates with inhibition of a Rad51 DNA damage response in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 45–54.
- Parsels, L.A., Qian, Y., Tanska, D.M., Gross, M., Zhao, L., Hassan, M.C., Arumugarajah, S., Parsels, J.D., Hylander-Gans, L., Simeone, D.M., et al. (2011a). Assessment of Chk1 phosphorylation as a pharmacodynamic biomarker of Chk1 inhibition. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 3706–3715.
- Passegué, E., Jamieson, C.H.M., Ailles, L.E., and Weissman, I.L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11842–11849.
- Patil, M., Pabla, N., and Dong, Z. (2013). Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70**, 4009–4021.
- Paulsen, R.D., and Cimprich, K.A. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair* **6**, 953–966.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**, 821–828.
- Peddibhotla, S., Lam, M.H., Gonzalez-Rimbau, M., and Rosen, J.M. (2009). The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5159–5164.
- Pellagatti, A., Cazzola, M., Giagounidis, A., Perry, J., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Killick, S., Verma, A., Norbury, C.J., et al. (2010). Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia* **24**, 756–764.
- Peschiaroli, A., Dorrello, N.V., Guardavaccaro, D., Venere, M., Halazonetis, T., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. *Mol. Cell* **23**, 319–329.
- Petermann, E., and Caldecott, K.W. (2006). Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. *Cell Cycle Georget. Tex* **5**, 2203–2209.
- Petermann, E., Maya-Mendoza, A., Zachos, G., Gillespie, D.A.F., Jackson, D.A., and Caldecott, K.W. (2006). Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3319–3326.
- Petermann, E., Helleday, T., and Caldecott, K.W. (2008). Claspin promotes normal replication fork rates in human cells. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2373–2378.
- Petermann, E., Woodcock, M., and Helleday, T. (2010). Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16090–16095.
- Petronczki, M., Glotzer, M., Kraut, N., and Peters, J.-M. (2007). Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev. Cell* **12**, 713–725.
- Petsalaki, E., and Zachos, G. (2013). Chk1 and Mps1 jointly regulate correction of merotelic kinetochore attachments. *J. Cell Sci.* **126**, 1235–1246.

- Petsalaki, E., Akoumianaki, T., Black, E.J., Gillespie, D.A.F., and Zachos, G. (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *J. Cell Biol.* *195*, 449–466.
- Pitchford, S.C., Lodie, T., and Rankin, S.M. (2012). VEGFR1 stimulates a CXCR4-dependent translocation of megakaryocytes to the vascular niche, enhancing platelet production in mice. *Blood* *120*, 2787–2795.
- Porrello, E.R., Johnson, B.A., Aurora, A.B., Simpson, E., Nam, Y.-J., Matkovich, S.J., Dorn, G.W., van Rooij, E., and Olson, E.N. (2011). MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ. Res.* *109*, 670–679.
- Pothof, J., Verkaik, N.S., van IJcken, W., Wiemer, E.A.C., Ta, V.T.B., van der Horst, G.T.J., Jaspers, N.G.J., van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H.J., and Persengiev, S.P. (2009). MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *EMBO J.* *28*, 2090–2099.
- Puc, J., Keniry, M., Li, H.S., Pandita, T.K., Choudhury, A.D., Memeo, L., Mansukhani, M., Murty, V.V.V.S., Gaciong, Z., Meek, S.E.M., et al. (2005). Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* *7*, 193–204.
- Ragland, R.L., Patel, S., Rivard, R.S., Smith, K., Peters, A.A., Bielinsky, A.-K., and Brown, E.J. (2013). RNF4 and PLK1 are required for replication fork collapse in ATR-deficient cells. *Genes Dev.* *27*, 2259–2273.
- Rahmani, M., and Grant, S. (2002). UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) blocks PMA-induced maturation and reciprocally promotes apoptosis in human myelomonocytic leukemia cells (U937). *Cell Cycle Georget. Tex* *1*, 273–281.
- Raleigh, J.M., and O’Connell, M.J. (2000). The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 10)*, 1727–1736.
- Raslova, H., Baccini, V., Loussaief, L., Comba, B., Larghero, J., Debili, N., and Vainchenker, W. (2006). Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates both proliferation of megakaryocyte progenitors and late stages of megakaryocyte differentiation. *Blood* *107*, 2303–2310.
- Raslova, H., Kauffmann, A., Sekkai, D., Ripoche, H., Larbret, F., Robert, T., Tronik Le Roux, D., Kroemer, G., Debili, N., Dessen, P., et al. (2007). Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood* *109*, 3225–3234.
- Rawlinson, R., and Massey, A.J. (2014). γ H2AX and Chk1 phosphorylation as predictive pharmacodynamic biomarkers of Chk1 inhibitor-chemotherapy combination treatments. *BMC Cancer* *14*, 483.
- Ray, D., Terao, Y., Nimbalkar, D., Hirai, H., Osmundson, E.C., Zou, X., Franks, R., Christov, K., and Kiyokawa, H. (2007). Hemizygous Disruption of Cdc25A Inhibits Cellular Transformation and Mammary Tumorigenesis in Mice. *Cancer Res.* *67*, 6605–6611.
- Ray-David, H., Romeo, Y., Lavoie, G., Dél  ris, P., Tcherkezian, J., Galan, J.A., and Roux, P.P. (2013). RSK promotes G2 DNA damage checkpoint silencing and participates in melanoma chemoresistance. *Oncogene* *32*, 4480–4489.
- Reboutier, D., Benaud, C., and Prigent, C. (2015). Aurora A’s Functions During Mitotic Exit: The Guess Who Game. *Front. Oncol.* *5*, 290.
- Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A., and Yaffe, M.B. (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* *11*, 175–189.
- Reinhardt, H.C., Hasskamp, P., Schmedding, I., Morandell, S., van Vugt, M., A.T.M., Wang, X., Linding, R., Ong, S.-E., Weaver, D., Carr, S.A., et al. (2010). DNA Damage activates A Spatially Distinct Late Cytoplasmic Cell Cycle Checkpoint Network Controlled by MK2-mediated RNA Stabilization. *Mol. Cell* *40*, 34–49.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J.D., Morris, E.P., and Diffley, J.F.X. (2009). Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* *139*, 719–730.

- Renneville, A., Roumier, C., Biggio, V., Nibourel, O., Boissel, N., Fenaux, P., and Preudhomme, C. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 22, 915–931.
- Rhind, N., Furnari, B., and Russell, P. (1997). Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes Dev.* 11, 504–511.
- Riesterer, O., Matsumoto, F., Wang, L., Pickett, J., Molkenhine, D., Giri, U., Milas, L., and Raju, U. (2011). A novel Chk inhibitor, XL-844, increases human cancer cell radiosensitivity through promotion of mitotic catastrophe. *Invest. New Drugs* 29, 514–522.
- Rocquain, J., Carbuccia, N., Trouplin, V., Raynaud, S., Murati, A., Nezri, M., Tadrict, Z., Olschwang, S., Vey, N., Birnbaum, D., et al. (2010). Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer* 10, 401.
- Rodier, G., Kirsh, O., Baraibar, M., Houlès, T., Lacroix, M., Delpèch, H., Hatchi, E., Arnould, S., Severac, D., Dubois, E., et al. (2015). The Transcription Factor E4F1 Coordinates CHK1-Dependent Checkpoint and Mitochondrial Functions. *Cell Rep.* 11, 220–233.
- Roh, M., Gary, B., Song, C., Said-Al-Naief, N., Tousson, A., Kraft, A., Eltoum, I.-E., and Abdulkadir, S.A. (2003). Overexpression of the oncogenic kinase Pim-1 leads to genomic instability. *Cancer Res.* 63, 8079–8084.
- Rojnuckarin, P., Drachman, J.G., and Kaushansky, K. (1999). Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood* 94, 1273–1282.
- Rouyez, M.C., Boucheron, C., Gisselbrecht, S., Dusanter-Fourt, I., and Porteu, F. (1997). Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4991–5000.
- Rowley, J.W., Oler, A.J., Tolley, N.D., Hunter, B.N., Low, E.N., Nix, D.A., Yost, C.C., Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2011). Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 118, e101-111.
- Roy, L., Coullin, P., Vitrat, N., Hellio, R., Debili, N., Weinstein, J., Bernheim, A., and Vainchenker, W. (2001). Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes. *Blood* 97, 2238–2247.
- Ruiz, S., Mayor-Ruiz, C., Lafarga, V., Murga, M., Vega-Sendino, M., Ortega, S., and Fernandez-Capetillo, O. (2016). A Genome-wide CRISPR Screen Identifies CDC25A as a Determinant of Sensitivity to ATR Inhibitors. *Mol. Cell.*
- Sakurikar, N., and Eastman, A. (2015). Will Targeting Chk1 Have a Role in the Future of Cancer Therapy? *J. Clin. Oncol.* 33, 1075–1077.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H., and Elledge, S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497–1501.
- Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L.M., and Abraham, R.T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.* 59, 4375–4382.
- Sarmiento, L.M., Póvoa, V., Nascimento, R., Real, G., Antunes, I., Martins, L.R., Moita, C., Alves, P.M., Abecasis, M., Moita, L.F., et al. (2014). CHK1 overexpression in T-cell acute lymphoblastic leukemia is essential for proliferation and survival by preventing excessive replication stress. *Oncogene* 0.
- Sato, K., Sundaramoorthy, E., Rajendra, E., Hattori, H., Jeyasekharan, A.D., Ayoub, N., Schiess, R., Aebersold, R., Nishikawa, H., Sedukhina, A.S., et al. (2012). A DNA-damage selective role for BRCA1 E3 ligase in claspin ubiquitylation, CHK1 activation, and DNA repair. *Curr. Biol. CB* 22, 1659–1666.

- Sausville, E., LoRusso, P., Carducci, M., Carter, J., Quinn, M.F., Malburg, L., Azad, N., Cosgrove, D., Knight, R., Barker, P., et al. (2014). Phase I dose-escalation study of AZD7762, a checkpoint kinase inhibitor, in combination with gemcitabine in US patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *73*, 539–549.
- Schenk, E.L., Koh, B.D., Flatten, K.S., Peterson, K.L., Parry, D., Hess, A.D., Smith, B.D., Karp, J.E., Karnitz, L.M., and Kaufmann, S.H. (2012). Effects of selective checkpoint kinase 1 inhibition on cytarabine cytotoxicity in acute myelogenous leukemia cells in vitro. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 5364–5373.
- Schmitt, E., Boutros, R., Froment, C., Monsarrat, B., Ducommun, B., and Dozier, C. (2006). CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. *J. Cell Sci.* *119*, 4269–4275.
- Schulze, H., Ballmaier, M., Welte, K., and Germeshausen, M. (2000). Thrombopoietin induces the generation of distinct Stat1, Stat3, Stat5a and Stat5b homo- and heterodimeric complexes with different kinetics in human platelets. *Exp. Hematol.* *28*, 294–304.
- Schulze, H., Korpai, M., Hurov, J., Kim, S.-W., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T., and Shivdasani, R.A. (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* *107*, 3868–3875.
- Schulze, J., Lopez-Contreras, A.J., Uluçkan, Ö., Graña-Castro, O., Fernandez-Capetillo, O., and Wagner, E.F. (2014). Fos-dependent induction of Chk1 protects osteoblasts from replication stress. *Cell Cycle Georget. Tex* *13*, 1980–1986.
- Scorah, J., Dong, M.-Q., Yates, J.R., Scott, M., Gillespie, D., and McGowan, C.H. (2008). A Conserved Proliferating Cell Nuclear Antigen-interacting Protein Sequence in Chk1 Is Required for Checkpoint Function. *J. Biol. Chem.* *283*, 17250–17259.
- Sebastian, B., Kakizuka, A., and Hunter, T. (1993). Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3521–3524.
- Segurado, M., and Tercero, J.A. (2009). The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *101*, 617–627.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.-Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* *320*, 1655–1658.
- SéVerin, S., Ghevaert, C., and Mazharian, A. (2010). The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. *J. Thromb. Haemost.* *8*, 17–26.
- Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004). ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat. Cell Biol.* *6*, 648–655.
- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* *2*, 103–112.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* *14*, 289–300.
- Shimada, M., and Nakanishi, M. (2008). Checkpoints meet the transcription at a novel histone milestone (H3-T11). *Cell Cycle Georget. Tex* *7*, 1555–1559.
- Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D.H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., and Nakanishi, M. (2008). Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* *132*, 221–232.
- Shiromizu, T., Goto, H., Tomono, Y., Bartek, J., Totsukawa, G., Inoko, A., Nakanishi, M., Matsumura, F., and Inagaki, M. (2006). Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *11*, 477–485.

- Shivdasani, R.A. (1996). The role of transcription factor NF-E2 in megakaryocyte maturation and platelet production. *Stem Cells Dayt. Ohio* 14 *Suppl* 1, 112–115.
- Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., et al. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 506, 328–333.
- Sidi, S., Sanda, T., Kennedy, R.D., Hagen, A.T., Jette, C.A., Hoffmans, R., Pascual, J., Imamura, S., Kishi, S., Amatruda, J.F., et al. (2008). Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3. *Cell* 133, 864–877.
- Skolnik, E.Y., Batzer, A., Li, N., Lee, C.H., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260, 1953–1955.
- Smith, J.A., Poteet-Smith, C.E., Xu, Y., Errington, T.M., Hecht, S.M., and Lannigan, D.A. (2005). Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 65, 1027–1034.
- Smits, V.A.J., and Gillespie, D.A. (2015). DNA damage control: regulation and functions of checkpoint kinase 1. *FEBS J.* n/a-n/a.
- Smits, V.A., Klompaker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E.A., and Medema, R.H. (2000). Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 2, 672–676.
- Smits, V.A.J., Reaper, P.M., and Jackson, S.P. (2006). Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr. Biol. CB* 16, 150–159.
- Solyom, S., Pylkäs, K., and Winqvist, R. (2010). Screening for large genomic rearrangements of the BRIP1 and CHK1 genes in Finnish breast cancer families. *Fam. Cancer* 9, 537–540.
- Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Rönstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.-B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247–258.
- Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G., Lukas, J., and Bartek, J. (2004). ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage. *Cell Cycle Georget. Tex* 3, 941–945.
- Sørensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewska, J., Syljuåsen, R.G., Lundin, C., Bartek, J., and Helleday, T. (2005). The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* 7, 195–201.
- Sorino, C., Bruno, T., Desantis, A., Di Certo, M.G., Iezzi, S., De Nicola, F., Catena, V., Floridi, A., Chessa, L., Passananti, C., et al. (2013). Centrosomal Che-1 Protein Is Involved in the Regulation of Mitosis and DNA Damage Response by Mediating Pericentriolar (PCNT)-dependent Chk1 Protein Localization. *J. Biol. Chem.* 288, 23348–23357.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58–62.
- Speers, C., Tsimelzon, A., Sexton, K., Herrick, A.M., Gutierrez, C., Culhane, A., Quackenbush, J., Hilsenbeck, S., Chang, J., and Brown, P. (2009). Identification of novel kinase targets for the treatment of estrogen receptor-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 6327–6340.
- Speroni, J., Federico, M.B., Mansilla, S.F., Soria, G., and 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, 7344–7349.
- Sulli, G., Di Micco, R., and di Fagagna, F. d'Adda (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 709–720.

- Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P.T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E.A., and Peters, J.-M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* *9*, 515–525.
- Sumara, I., Giménez-Abián, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr. Biol. CB* *14*, 1712–1722.
- Sundararaman, B., Avitabile, D., Konstandin, M.H., Cottage, C.T., Gude, N., and Sussman, M.A. (2012). Asymmetric chromatid segregation in cardiac progenitor cells is enhanced by Pim-1 kinase. *Circ. Res.* *110*, 1169–1173.
- Syljuåsen, R.G., Sørensen, C.S., Hansen, L.T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., Helleday, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2005). Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 3553–3562.
- Tachibana, K., Mori, M., Matsuhira, T., Karino, T., Inagaki, T., Nagayama, A., Nishiyama, A., Hara, M., and Kishimoto, T. (2010). Initiation of DNA replication after fertilization is regulated by p90Rsk at pre-RC/pre-IC transition in starfish eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 5006–5011.
- Takahashi, W., Sasaki, K., Komatsu, N., and Mitani, K. (2005). TEL/ETV6 accelerates erythroid differentiation and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM. *Cancer Sci.* *96*, 340–348.
- Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, M., and Nakayama, K. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev.* *14*, 1439–1447.
- Tang, J., Erikson, R.L., and Liu, X. (2006). Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11964–11969.
- Tao, Y., Leteur, C., Yang, C., Zhang, P., Castedo, M., Pierré, A., Golsteyn, R.M., Bourhis, J., Kroemer, G., and Deutsch, E. (2009a). Radiosensitization by Chir-124, a selective Chk1 inhibitor: Effects of p53 and cell cycle checkpoints. *Cell Cycle* *8*, 1196–1205.
- Tao, Y., Leteur, C., Calderaro, J., Girdler, F., Zhang, P., Frascogna, V., Varna, M., Opolon, P., Castedo, M., Bourhis, J., et al. (2009b). The Aurora B kinase inhibitor AZD1152 sensitizes cancer cells to fractionated irradiation and induces mitotic catastrophe. *Cell Cycle* *8*, 3172–3181.
- Taussig, D.C., Pearce, D.J., Simpson, C., Rohatiner, A.Z., Lister, T.A., Kelly, G., Luongo, J.L., Danet-Desnoyers, G.-A.H., and Bonnet, D. (2005). Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* *106*, 4086–4092.
- Tavassoli, M., and Aoki, M. (1989). Localization of megakaryocytes in the bone marrow. *Blood Cells* *15*, 3–14.
- Taylor, W.R., and Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* *20*, 1803–1815.
- Técher, H., Koundrioukoff, S., Carignon, S., Wilhelm, T., Millot, G.A., Lopez, B.S., Brison, O., and Debatisse, M. (2016). Signaling from Mus81-Eme2-Dependent DNA Damage Elicited by Chk1 Deficiency Modulates Replication Fork Speed and Origin Usage. *Cell Rep.* *14*, 1114–1127.
- Tefferi, A. (2010). Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* *24*, 1128–1138.
- Thanasoula, M., Escandell, J.M., Suwaki, N., and Tarsounas, M. (2012). ATM/ATR checkpoint activation downregulates CDC25C to prevent mitotic entry with uncapped telomeres. *EMBO J.* *31*, 3398–3410.
- Thompson, R., and Eastman, A. (2013). The cancer therapeutic potential of Chk1 inhibitors: how mechanistic studies impact on clinical trial design. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *76*, 358–369.

- Thon, J.N., Montalvo, A., Patel-Hett, S., Devine, M.T., Richardson, J.L., Ehrlicher, A., Larson, M.K., Hoffmeister, K., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2010). Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J. Cell Biol.* *191*, 861–874.
- Till, J.E., and McCULLOCH, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* *14*, 213–222.
- Toledo, L.I., Murga, M., and Fernandez-Capetillo, O. (2011). Targeting ATR and Chk1 kinases for cancer treatment: A new model for new (and old) drugs. *Mol. Oncol.* *5*, 368–373.
- Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* *155*, 1088–1103.
- Tomer, A. (2004). Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood* *104*, 2722–2727.
- Trakala, M., Partida, D., Salazar-Roa, M., Maroto, M., Wachowicz, P., de Carcer, G., and Malumbres, M. (2015). Activation of the endomitotic spindle assembly checkpoint and thrombocytopenia in Plk1-deficient mice. *Blood*.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., and Weissman, I.L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* *290*, 2152–2154.
- Trenz, K., Errico, A., and Costanzo, V. (2008). Plx1 is required for chromosomal DNA replication under stressful conditions. *EMBO J.* *27*, 876–885.
- Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B., and Orkin, S.H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.* *12*, 1176–1188.
- Tse, A.N., Rendahl, K.G., Sheikh, T., Cheema, H., Aardalen, K., Embry, M., Ma, S., Moler, E.J., Ni, Z.J., Menezes, D.E.L. de, et al. (2007). CHIR-124, a Novel Potent Inhibitor of Chk1, Potentiates the Cytotoxicity of Topoisomerase I Poisons In vitro and In vivo. *Clin. Cancer Res.* *13*, 591–602.
- Turowski, P., Franckhauser, C., Morris, M.C., Vaglio, P., Fernandez, A., and Lamb, N.J.C. (2003). Functional cdc25C Dual-Specificity Phosphatase Is Required for S-Phase Entry in Human Cells. *Mol. Biol. Cell* *14*, 2984–2998.
- Ullah, Z., de Renty, C., and DePamphilis, M.L. (2011). Checkpoint kinase 1 prevents cell cycle exit linked to terminal cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 4129–4143.
- Umezawa, Y., Kurosu, T., Akiyama, H., Wu, N., Nogami, A., Nagao, T., and Miura, O. (2016). Down regulation of Chk1 by p53 plays a role in synergistic induction of apoptosis by chemotherapeutics and inhibitors for Jak2 or BCR/ABL in hematopoietic cells. *Oncotarget*.
- Unsal-Kaçmaz, K., Chastain, P.D., Qu, P.-P., Minoo, P., Cordeiro-Stone, M., Sancar, A., and Kaufmann, W.K. (2007). The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3131–3142.
- Varma, D., Wan, X., Cheerambathur, D., Gassmann, R., Suzuki, A., Lawrimore, J., Desai, A., and Salmon, E.D. (2013). Spindle assembly checkpoint proteins are positioned close to core microtubule attachment sites at kinetochores. *J. Cell Biol.* *202*, 735–746.
- Verlinden, L., Vanden Bempt, I., Eelen, G., Drijkoningen, M., Verlinden, I., Marchal, K., De Wolf-Peeters, C., Christiaens, M.-R., Michiels, L., Bouillon, R., et al. (2007). The E2F-regulated gene Chk1 is highly expressed in triple-negative estrogen receptor /progesterone receptor /HER-2 breast carcinomas. *Cancer Res.* *67*, 6574–6581.

- Viallard, J.F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J.L., and Reiffers, J. (2001). [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* 5, 109–129.
- Vigneron, S., Brioudes, E., Burgess, A., Labbé, J.-C., Lorca, T., and Castro, A. (2010). RSK2 is a kinetochore-associated protein that participates in the spindle assembly checkpoint. *Oncogene* 29, 3566–3574.
- Vinci, G., Tabilio, A., Deschamps, J.F., Van Haeke, D., Henri, A., Guichard, J., Tetteroo, P., Lansdorp, P.M., Hercend, T., and Vainchenker, W. (1984). Immunological study of in vitro maturation of human megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* 56, 589–605.
- Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Pique, C., Le Couedic, J.P., Norol, F., Larsen, A.K., Katz, A., Vainchenker, W., and Debili, N. (1998). Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood* 91, 3711–3723.
- Vugt, M.A.T.M. van, Weerdt, B.C.M. van de, Vader, G., Janssen, H., Calafat, J., Klompaker, R., Wolthuis, R.M.F., and Medema, R.H. (2004). Polo-like Kinase-1 Is Required for Bipolar Spindle Formation but Is Dispensable for Anaphase Promoting Complex/Cdc20 Activation and Initiation of Cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 279, 36841–36854.
- van der Waal, M.S., Saurin, A.T., Vromans, M.J.M., Vleugel, M., Wurzenberger, C., Gerlich, D.W., Medema, R.H., Kops, G.J.P.L., and Lens, S.M.A. (2012). Mps1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B. *EMBO Rep.* 13, 847–854.
- Walker, M., Black, E.J., Oehler, V., Gillespie, D.A., and Scott, M.T. (2009). Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity. *Oncogene* 28, 2314–2323.
- Walton, M.I., Eve, P.D., Hayes, A., Valenti, M., De Haven Brandon, A., Box, G., Boxall, K.J., Aherne, G.W., Eccles, S.A., Raynaud, F.I., et al. (2010). The preclinical pharmacology and therapeutic activity of the novel CHK1 inhibitor SAR-020106. *Mol. Cancer Ther.* 9, 89–100.
- Walworth, N.C., and Bernard, R. (1996). rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* 271, 353–356.
- Walworth, N., Davey, S., and Beach, D. (1993). Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* 363, 368–371.
- Wang, Q. (2003). BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. *Blood* 103, 1278–1285.
- Wang, J., Han, X., Feng, X., Wang, Z., and Zhang, Y. (2012a). Coupling Cellular Localization and Function of Checkpoint Kinase 1 (Chk1) in Checkpoints and Cell Viability. *J. Biol. Chem.* 287, 25501–25509.
- Wang, J., Han, X., and Zhang, Y. (2012b). Autoregulatory mechanisms of phosphorylation of checkpoint kinase 1. *Cancer Res.* 72, 3786–3794.
- Wang, J., Han, X., Feng, X., Wang, Z., and Zhang, Y. (2012c). Coupling cellular localization and function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in checkpoints and cell viability. *J. Biol. Chem.* 287, 25501–25509.
- Wang, Q., Fan, S., Eastman, A., Worland, P.J., Sausville, E.A., and O'Connor, P.M. (1996). UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 956–965.
- Wang, W.-J., Wu, S.-P., Liu, J.-B., Shi, Y.-S., Huang, X., Zhang, Q.-B., and Yao, K.-T. (2013). MYC Regulation of CHK1 and CHK2 Promotes Radioresistance in a Stem Cell-like Population of Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 73, 1219–1231.
- Wang, X., Kennedy, R.D., Ray, K., Stuckert, P., Ellenberger, T., and D'Andrea, A.D. (2007). Chk1-Mediated Phosphorylation of FANCE Is Required for the Fanconi Anemia/BRCA Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3098–3108.

- Wang, X., Harrison, J.S., and Studzinski, G.P. (2015). Enhancement of arabinocytosine (AraC) toxicity to AML cells by a differentiation agent combination. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
- Wang, Y., Ji, P., Liu, J., Broaddus, R.R., Xue, F., and Zhang, W. (2009). Centrosome-associated regulators of the G2/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Mol. Cancer* *8*, 8.
- Wang, Z., Zhang, Y., Kamen, D., Lees, E., and Ravid, K. (1995). Cyclin D3 is essential for megakaryocytopoiesis. *Blood* *86*, 3783–3788.
- van de Weerd, B.C.M., and Medema, R.H. (2006). Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 853–864.
- Weiderhold, K.N., Fadri-Moskwick, M., Pan, J., Nishino, M., Chuang, C., Deeraksa, A., Lin, S.-H., and Yu-Lee, L.-Y. (2016). Dynamic Phosphorylation of NudC by Aurora B in Cytokinesis. *PLoS One* *11*, e0153455.
- Weinert, T.A., and Hartwell, L.H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *241*, 317–322.
- Weiss, G.J., Donehower, R.C., Iyengar, T., Ramanathan, R.K., Lewandowski, K., Westin, E., Hurt, K., Hynes, S.M., Anthony, S.P., and McKane, S. (2013). Phase I dose-escalation study to examine the safety and tolerability of LY2603618, a checkpoint 1 kinase inhibitor, administered 1 day after pemetrexed 500 mg/m² every 21 days in patients with cancer. *Invest. New Drugs* *31*, 136–144.
- Williamson, E.A., Wu, Y., Singh, S., Byrne, M., Wray, J., Lee, S.-H., Nickoloff, J.A., and Hromas, R. (2014). The DNA repair component Metnase regulates Chk1 stability. *Cell Div.* *9*, 1.
- Wilsker, D., Petermann, E., Helleday, T., and Bunz, F. (2008). Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 20752–20757.
- Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O., and Ihle, J.N. (1993). JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* *74*, 227–236.
- Woodward, A.M., Göhler, T., Luciani, M.G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2006). Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J. Cell Biol.* *173*, 673–683.
- Wu, Z.-Q., and Liu, X. (2008). Role for Plk1 phosphorylation of Hbo1 in regulation of replication licensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1919–1924.
- Wysong, D.R., Chakravarty, A., Hoar, K., and Ecsedy, J.A. (2009). The inhibition of Aurora A abrogates the mitotic delay induced by microtubule perturbing agents. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 876–888.
- Xiao, Z., Xue, J., Semizarov, D., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H., and Zhang, H. (2005). Novel indication for cancer therapy: Chk1 inhibition sensitizes tumor cells to antimetotics. *Int. J. Cancer* *115*, 528–538.
- Xu, J., Li, Y., Wang, F., Wang, X., Cheng, B., Ye, F., Xie, X., Zhou, C., and Lu, W. (2013). Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene* *32*, 976–987.
- Yagi, M., and Roth, G.J. (2006). Megakaryocyte polyploidization is associated with decreased expression of polo-like kinase (PLK). *J. Thromb. Haemost.* *4*, 2028–2034.
- Yamada, E. (1957). The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat. (Basel)* *29*, 267–290.
- Yamada, M., Watanabe, K., Mistrik, M., Vesela, E., Protivankova, I., Mailand, N., Lee, M., Masai, H., Lukas, J., and Bartek, J. (2013). ATR-Chk1-APC/CCdh1-dependent stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) kinase is required for DNA lesion bypass under replication stress. *Genes Dev.* *27*, 2459–2472.

- Yang, X., Xu, W., Hu, Z., Zhang, Y., and Xu, N. (2014). Chk1 is required for the metaphase–anaphase transition via regulating the expression and localization of Cdc20 and Mad2. *Life Sci.* *106*, 12–18.
- Yao, Q., Weigel, B., and Kersey, J. (2007). Synergism between etoposide and 17-AAG in leukemia cells: critical roles for Hsp90, FLT3, topoisomerase II, Chk1, and Rad51. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 1591–1600.
- Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H., and Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat. Genet.* *30*, 285–289.
- Ye, M., Zhang, H., Yang, H., Koche, R., Staber, P.B., Cusan, M., Levantini, E., Welner, R.S., Bach, C.S., Zhang, J., et al. (2015). Hematopoietic Differentiation Is Required for Initiation of Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell* *17*, 611–623.
- Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. (2004). Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* *117*, 575–588.
- Yoshizawa-Sugata, N., and Masai, H. (2007). Human Tim/Timeless-interacting protein, Tipin, is required for efficient progression of S phase and DNA replication checkpoint. *J. Biol. Chem.* *282*, 2729–2740.
- Yu, Q., La Rose, J., Zhang, H., Takemura, H., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (2002). UCN-01 inhibits p53 up-regulation and abrogates gamma-radiation-induced G(2)-M checkpoint independently of p53 by targeting both of the checkpoint kinases, Chk2 and Chk1. *Cancer Res.* *62*, 5743–5748.
- Yuan, L.L., Green, A.S., Bertoli, S., Grimal, F., Mansat-De Mas, V., Dozier, C., Tamburini, J., Récher, C., Didier, C., and Manenti, S. (2014a). Pim kinases phosphorylate Chk1 and regulate its functions in acute myeloid leukemia. *Leukemia* *28*, 293–301.
- Yuan, L.L., Green, A., David, L., Dozier, C., Récher, C., Didier, C., Tamburini, J., and Manenti, S. (2014b). Targeting CHK1 inhibits cell proliferation in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* *38*, 1342–1349.
- Zabludoff, S.D., Deng, C., Grondine, M.R., Sheehy, A.M., Ashwell, S., Caleb, B.L., Green, S., Haye, H.R., Horn, C.L., Janetka, J.W., et al. (2008). AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 2955–2966.
- Zachos, G., Rainey, M.D., and Gillespie, D.A.F. (2003). Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *EMBO J.* *22*, 713–723.
- Zachos, G., Black, E.J., Walker, M., Scott, M.T., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C., and Gillespie, D.A.F. (2007). Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev. Cell* *12*, 247–260.
- Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* *16*, 2–9.
- Zenvirt, S., Kravchenko-Balasha, N., and Levitzki, A. (2010). Status of p53 in human cancer cells does not predict efficacy of CHK1 kinase inhibitors combined with chemotherapeutic agents. *Oncogene* *29*, 6149–6159.
- Zhang, Y., and Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in Cell Biology and Cancer Therapy. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *134*.
- Zhang, J., Grindley, J.C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X.C., Ross, J.T., Haug, J.S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K.S., Wiedemann, L.M., et al. (2006a). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* *441*, 518–522.
- Zhang, P., Wei, Y., Wang, L., Debeb, B.G., Yuan, Y., Zhang, J., Yuan, J., Wang, M., Chen, D., Sun, Y., et al. (2014). ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat. Cell Biol.* *16*, 864–875.

- Zhang, T., Nirantar, S., Lim, H.H., Sinha, I., and Surana, U. (2009a). DNA damage checkpoint maintains CDH1 in an active state to inhibit anaphase progression. *Dev. Cell* *17*, 541–551.
- Zhang, Y., Wang, Z., and Ravid, K. (1996). The cell cycle in polyploid megakaryocytes is associated with reduced activity of cyclin B1-dependent cdc2 kinase. *J. Biol. Chem.* *271*, 4266–4272.
- Zhang, Y., Wang, Z., Liu, D.X., Pagano, M., and Ravid, K. (1998). Ubiquitin-dependent degradation of cyclin B is accelerated in polyploid megakaryocytes. *J. Biol. Chem.* *273*, 1387–1392.
- Zhang, Y., Nagata, Y., Yu, G., Nguyen, H.G., Jones, M.R., Toselli, P., Jackson, C.W., Tatsuka, M., Todokoro, K., and Ravid, K. (2004). Aberrant quantity and localization of Aurora-B/AIM-1 and survivin during megakaryocyte polyploidization and the consequences of Aurora-B/AIM-1-deregulated expression. *Blood* *103*, 3717–3726.
- Zhang, Y., Lai, J., Du, Z., Gao, J., Yang, S., Gorityala, S., Xiong, X., Deng, O., Ma, Z., Yan, C., et al. (2016). Targeting radioresistant breast cancer cells by single agent CHK1 inhibitor via enhancing replication stress. *Oncotarget* *5*.
- Zhang, Y.-W., Otterness, D.M., Chiang, G.G., Xie, W., Liu, Y.-C., Mercurio, F., and Abraham, R.T. (2005). Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell* *19*, 607–618.
- Zhang, Y.-W., Hunter, T., and Abraham, R.T. (2006b). Turning the replication checkpoint on and off. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 125–128.
- Zhang, Y.-W., Brognard, J., Coughlin, C., You, Z., Dolled-Filhart, M., Aslanian, A., Manning, G., Abraham, R.T., and Hunter, T. (2009b). The F box protein Fbx6 regulates Chk1 stability and cellular sensitivity to replication stress. *Mol. Cell* *35*, 442–453.
- Zhao, H., and Piwnica-Worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 4129–4139.
- Zhao, H., Watkins, J.L., and Piwnica-Worms, H. (2002). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 14795–14800.
- Zhao, J., Niu, X., Li, X., Edwards, H., Wang, G., Wang, Y., Taub, J.W., Lin, H., and Ge, Y. (2014). Inhibition of CHK1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*.
- Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* *408*, 433–439.
- Zhu, J., and Emerson, S.G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* *21*, 3295–3313.
- Zhu, N., Ramirez, L.M., Lee, R.L., Magnuson, N.S., Bishop, G.A., and Gold, M.R. (2002). CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *168*, 744–754.
- Zimmet, J., and Ravid, K. (2000). Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp. Hematol.* *28*, 3–16.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* *300*, 1542–1548.
- Zou, L., and Stillman, B. (1998). Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* *280*, 593–596.
- Zou, L., and Stillman, B. (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3086–3096.

Zuazua-Villar, P., Rodriguez, R., Gagou, M.E., Evers, P.A., and Meuth, M. (2014). DNA replication stress in CHK1-depleted tumour cells triggers premature (S-phase) mitosis through inappropriate activation of Aurora kinase B. *Cell Death Dis.* 5, e1253.

ANNEXES

Liste des partenaires potentiels de P-Chk1 sérine 280 identifiés par spectrométrie de masse

ADRBK1	Beta-adrenergic receptor kinase 1
AGAP1	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 1
ATP2C1	Calcium-transporting ATPase;Calcium-transporting ATPase type 2C member 1
C2CD2L	C2 domain-containing protein 2-like
CBR4	Carbonyl reductase family member 4
CCM2	Cerebral cavernous malformations 2 protein
CNOT4	CCR4-NOT transcription complex subunit 4
CPA3	Mast cell carboxypeptidase A
CTU1	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1
CYP2S1	Cytochrome P450 2S1
DCAF6	DDB1- and CUL4-associated factor 6
DMTN	Dematin
DNAJC12	DnaJ homolog subfamily C member 12
DNAJC15	DnaJ homolog subfamily C member 15
DNAJC6	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin
DOK1	Docking protein 1
DONSON	Protein downstream neighbor of Son
DUSP23	Dual specificity protein phosphatase 23
EI24	Etoposide-induced protein 2.4 homolog
EPB42	Erythrocyte membrane protein band 4.2
ETV3	ETS translocation variant 3
EXOC3L2	Exocyst complex component 3-like protein 2
F2R	Proteinase-activated receptor 1
FAM173A	Protein FAM173A
FAM186A	Protein FAM186A
FAM65C	Protein FAM65C
FCER1A	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit alpha
FCHO1	F-BAR domain only protein 1
GALNT1	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1;Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 soluble form
GALNT6	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6
GAPT	Protein GAPT
GATA2	Endothelial transcription factor GATA-2
GPAA1	Glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1 protein
HDC	Histidine decarboxylase
HPGD	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]
ICAM4	Intercellular adhesion molecule 4
ITGB1BP1	Integrin beta-1-binding protein 1

ITGB3	Integrin beta;Integrin beta-3
JAK2	Tyrosine-protein kinase JAK2
KIAA1522	Uncharacterized protein KIAA1522
KLF1	Krueppel-like factor 1
KSR1	Kinase suppressor of Ras 1
KTI12	Protein KTI12 homolog
LCP2	Lymphocyte cytosolic protein 2
MED11	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 11
MGAT2	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
NAT14	N-acetyltransferase 14
NBEAL2	Neurobeachin-like protein 2
NDUFB6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6
NPRL3	Nitrogen permease regulator 3-like protein
NRIP1	Nuclear receptor-interacting protein 1
NT5C3A	5-nucleotidase;Cytosolic 5-nucleotidase 3A
PANX1	Pannexin-1
PER3	Period circadian protein homolog 3
PEX16	Peroxisomal membrane protein PEX16
PRG2	Bone marrow proteoglycan;Eosinophil granule major basic protein
RFWD3	E3 ubiquitin-protein ligase RFWD3
SHQ1	Protein SHQ1 homolog
SIK3	Serine/threonine-protein kinase SIK3
SLC1A4	Neutral amino acid transporter A
SLC38A5	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 5
SMIM20	Small integral membrane protein 20
ST3GAL4	CMP-N-acetylneuramate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 4
TAOK3	Serine/threonine-protein kinase TAO3
TAPBP	Tapasin
TAX1BP1	Tax1-binding protein 1
TIE1	Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1
TLK1	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1
UBA7	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7
UQCC2	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2
VIMP	Selenoprotein S
WDYHV1	Protein N-terminal glutamine amidohydrolase
XRCC6BP1	Mitochondrial inner membrane protease ATP23 homolog
ABHD12	Monoacylglycerol lipase ABHD12
ADAM10	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
AGPAT6	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4
ARHGAP22	Rho GTPase-activating protein 22
AURKAIP1	Aurora kinase A-interacting protein
C3orf58	Deleted in autism protein 1
CCDC88B	Coiled-coil domain-containing protein 88B
CDC7	Cell division cycle 7-related protein kinase
CDK5RAP3	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3
CDS2	Phosphatidate cytidyltransferase 2
CERS2	Ceramide synthase 2

CRTC2	CREB-regulated transcription coactivator 2
CUTC	Copper homeostasis protein cutC homolog
DEF6	Differentially expressed in FDCP 6 homolog
DNAJC3	DnaJ homolog subfamily C member 3
ENDOD1	Endonuclease domain-containing 1 protein
ETV6	Transcription factor ETV6
FAM210A	Protein FAM210A
FBXL12	F-box/LRR-repeat protein 12
ICMT	Protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase
INTS6	Integrator complex subunit 6
KALRN	Kalirin
LONP2	Lon protease homolog 2, peroxisomal
MAN2A1	Alpha-mannosidase 2
MARCH7	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH7
MED20	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 20
METTL14	N6-adenosine-methyltransferase subunit METTL14
PRKCB	Protein kinase C beta type
RASGRP4	RAS guanyl-releasing protein 4
RNGTT	mRNA-capping enzyme;Polynucleotide 5-triphosphatase;mRNA guanylyltransferase
RPUSD4	RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 4
TAP2	Antigen peptide transporter 2
TIAM1	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
TMED5	Transmembrane emp24 domain-containing protein 5
TTC1	Tetratricopeptide repeat protein 1
UBR1	E3 ubiquitin-protein ligase UBR1
VPS37B	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B
VWA8	von Willebrand factor A domain-containing protein 8
WBSCR22	Probable 18S rRNA (guanine-N(7))-methyltransferase
ABCC4	Multidrug resistance-associated protein 4
ALG5	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase
AMBRA1	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1
ARMCX3	Armadillo repeat-containing X-linked protein 3
AUP1	Ancient ubiquitous protein 1
BICD2	Protein bicaudal D homolog 2
CLEC11A	C-type lectin domain family 11 member A
DENND4A	C-myc promoter-binding protein
DHRS13	Dehydrogenase/reductase SDR family member 13
EIF2AK4	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4
FCHO2	F-BAR domain only protein 2
GHDC	GH3 domain-containing protein
GTF2H4	General transcription factor IIH subunit 4
MDM1	Nuclear protein MDM1
MRPL30	39S ribosomal protein L30, mitochondrial
NDUFAF2	Mimitin, mitochondrial
NSMCE2	E3 SUMO-protein ligase NSE2
PHKB	Phosphorylase b kinase regulatory subunit beta
PRIM1	DNA primase small subunit;DNA primase

PTRHD1	Putative peptidyl-tRNA hydrolase PTRHD1
R3HDM1	R3H domain-containing protein 1
RIOK2	Serine/threonine-protein kinase RIO2
SLC27A4	Long-chain fatty acid transport protein 4
SNX27	Sorting nexin-27
SSU72	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72
TGFB1	Transforming growth factor beta-1;Latency-associated peptide
TIMMDC1	Complex I assembly factor TIMMDC1, mitochondrial
TTC27	Tetratricopeptide repeat protein 27
TYK2	Tyrosine-protein kinase;Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2
UHRF1BP1	UHRF1-binding protein 1
WDR48	WD repeat-containing protein 48
AGPAT5	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase epsilon
ARFGEF1	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1
CHP1	Calcineurin B homologous protein 1
CUL5	Cullin-5
CYB5A	Cytochrome b5
DAPK3	Death-associated protein kinase 3
EARS2	Probable glutamate--tRNA ligase, mitochondrial
FN3KRP	Ketosamine-3-kinase
GALNT7	N-acetylgalactosaminyltransferase 7;Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase
HMOX2	Heme oxygenase 2
HS2ST1	Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1
LTN1	E3 ubiquitin-protein ligase listerin
MAGI1	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1
MIER1	Mesoderm induction early response protein 1
MPP1	55 kDa erythrocyte membrane protein
PDCD10	Programmed cell death protein 10
PPM1F	Protein phosphatase 1F
RECQL4	ATP-dependent DNA helicase Q4
RPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
SFXN2	Sideroflexin-2
TMEM201	Transmembrane protein 201
TNS1	Tensin-1
ALG1	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase
AP1G1	AP-1 complex subunit gamma-1
APPL1	DCC-interacting protein 13-alpha
C12orf10	UPF0160 protein MYG1, mitochondrial
CDC20	Cell division cycle protein 20 homolog
CHEK1	Serine/threonine-protein kinase Chk1
DOCK11	Dedicator of cytokinesis protein 11
EEFSEC	Selenocysteine-specific elongation factor
FAM120B	Constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma
FBXO3	F-box only protein 3
GIGYF1	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 1
KRIT1	Krev interaction trapped protein 1
METAP2	Methionine aminopeptidase 2

NDUFB4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4
NISCH	Nischarin
OCIAD1	OCIA domain-containing protein 1
PREB	Prolactin regulatory element-binding protein
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RPS6KA1	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1;Ribosomal protein S6 kinase
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
TK1	Thymidine kinase, cytosolic;Thymidine kinase
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAM1	Translocating chain-associated membrane protein 1
UBA6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6
VPS51	Vacuolar protein sorting-associated protein 51 homolog
ABCB6	ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial
DFFA	DNA fragmentation factor subunit alpha
GNPAT	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase
NRBP1	Nuclear receptor-binding protein
OBSL1	Obscurin-like protein 1
OSGEP	Probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase
PSAP	Prosaposin;Saposin-A;Saposin-B-Val;Saposin-B;Saposin-C;Saposin-D
SDF2L1	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1
SLC25A22	Mitochondrial glutamate carrier 1
UCK2	Uridine-cytidine kinase 2
ASAH1	Acid ceramidase;Acid ceramidase subunit alpha;Acid ceramidase subunit beta
DHRS7B	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B
MAP2K1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
METTL3	N6-adenosine-methyltransferase 70 kDa subunit
PPOX	Protoporphyrinogen oxidase
RAB32	Ras-related protein Rab-32
RAF1	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
SMG9	Protein SMG9
TRAPPC5	Trafficking protein particle complex subunit 5
UBR2	E3 ubiquitin-protein ligase UBR2
VPS4A	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A
CLU	Clusterin;Clusterin;Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain
CMC1	COX assembly mitochondrial protein homolog
DCAF13	DDB1- and CUL4-associated factor 13
DNAJB12	DnaJ homolog subfamily B member 12
DNAJC19	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
KIAA0101	PCNA-associated factor
MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
POLR1D	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC2
RAD23A	UV excision repair protein RAD23 homolog A
SMAD2	Mothers against decapentaplegic homolog 2;Mothers against decapentaplegic homolog
TCEAL4	Transcription elongation factor A protein-like 4
TM9SF3	Transmembrane 9 superfamily member 3
CPT1A	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform

CTBP2	C-terminal-binding protein 2
MLLT11	Protein AF1q
NCAPD3	Condensin-2 complex subunit D3
PDS5B	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B
SHKBP1	SH3KBP1-binding protein 1
SMTN	Smoothelin
SORD	Sorbitol dehydrogenase
STK3	Serine/threonine-protein kinase 3;Serine/threonine-protein kinase 3 36kDa subunit;Serine/threonine-protein kinase 3 36kDa subunit
TFB2M	Dimethyladenosine transferase 2, mitochondrial
TIMM8B	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B
CYC1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial
LANCL2	LanC-like protein 2
PTPMT1	Phosphatidylglycerophosphatase and protein-tyrosine phosphatase 1
SLFN11	Schlafen family member 11
STT3B	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B
TAF6L	TAF6-like RNA polymerase II p300/CBP-associated factor-associated factor 65 kDa subunit 6L
USP24	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24
C9orf78	Uncharacterized protein C9orf78
ERAL1	GTPase Era, mitochondrial
NDUFB10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10
PACSLIN2	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2
PDE12	2,5-phosphodiesterase 12
PNKD	Probable hydrolase PNKD
PUS1	tRNA pseudouridine synthase;tRNA pseudouridine synthase A, mitochondrial
TRIM33	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33
UBQLN1	Ubiquilin-1
CUL3	Cullin-3
EIF2B3	Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma
ERP44	Endoplasmic reticulum resident protein 44
MYO9B	Unconventional myosin-IXb
PITRM1	Presequence protease, mitochondrial
SLC39A7	Zinc transporter SLC39A7
UFL1	E3 UFM1-protein ligase 1
C2orf47	Uncharacterized protein C2orf47, mitochondrial
CLASP1	CLIP-associating protein 1
DGCR14	Protein DGCR14
DMAP1	DNA methyltransferase 1-associated protein 1
EMC1	ER membrane protein complex subunit 1
KIF15	Kinesin-like protein KIF15;Kinesin-like protein
LEM3	Inner nuclear membrane protein Man1
MTPAP	Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial
NOSIP	Nitric oxide synthase-interacting protein
PSMD10	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10
RCL1	RNA 3-terminal phosphate cyclase-like protein
TSFM	Elongation factor Ts, mitochondrial
DNAJC13	DnaJ homolog subfamily C member 13
MLH1	DNA mismatch repair protein Mlh1

PLEKHA5	Pleckstrin homology domain-containing family A member 5
RABEP1	Rab GTPase-binding effector protein 1
FAR1	Fatty acyl-CoA reductase 1
FHL2	Four and a half LIM domains protein 2
JAK1	Tyrosine-protein kinase JAK1
KIAA1524	Protein CIP2A
NDUFS2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial
PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1
TMEM165	Transmembrane protein 165
ZNF609	Zinc finger protein 609
HELLS	Lymphoid-specific helicase
HSDL2	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2
MCMBP	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein
MOGS	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase
SKA3	Spindle and kinetochore-associated protein 3
TRIM24	Transcription intermediary factor 1-alpha
ACOT9	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial
AGK	Acylglycerol kinase, mitochondrial
MRPL47	39S ribosomal protein L47, mitochondrial
NOP10	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3
QPCTL	Glutaminyl-peptide cyclotransferase-like protein
WDR44	WD repeat-containing protein 44
YARS2	Tyrosine--tRNA ligase, mitochondrial;Tyrosine--tRNA ligase
ARID3B	AT-rich interactive domain-containing protein 3B
IDE	Insulin-degrading enzyme
NDUFA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial
NDUFS7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial
PPP4R2	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 2
SDF4	45 kDa calcium-binding protein
ADSS	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2
GTF2E1	General transcription factor IIE subunit 1
LETM1	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial
RAB3GAP1	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit
ARHGEF2	
GSTM3	Glutathione S-transferase Mu 3
NDUFS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial
SCO2	Protein SCO2 homolog, mitochondrial
SGTA	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha
SSR1	Translocon-associated protein subunit alpha
CSNK1A1	Casein kinase I isoform alpha
DNAJB2	DnaJ homolog subfamily B member 2
SLC25A12	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1
TACC1	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1
AFG3L2	AFG3-like protein 2
CLUH	Clustered mitochondria protein homolog
DENR	Density-regulated protein
FKBP8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8

HEXIM1	Protein HEXIM1
KANK2	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2
NUP188	Nucleoporin NUP188 homolog
PYGL	Alpha-1,4 glucan phosphorylase;Glycogen phosphorylase, liver form
SPG20	Spartin
VCPIP1	Deubiquitinating protein VCIP135
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1
CYCS	Cytochrome c
NCOR1	Nuclear receptor corepressor 1
PCF11	Pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11
AP2A1	AP-2 complex subunit alpha-1
CCDC47	Coiled-coil domain-containing protein 47
CDK17	Cyclin-dependent kinase 17
POLR2C	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3
ACAA2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial
DNAJB6	DnaJ homolog subfamily B member 6
GPATCH8	G patch domain-containing protein 8
LANCL1	LanC-like protein 1
MYO5A	Unconventional myosin-Va
NUP210	Nuclear pore membrane glycoprotein 210
PIN1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
RBM22	Pre-mRNA-splicing factor RBM22

Liste des partenaires potentiels de Chk1 identifiés par spectrométrie de masse

MORC3	MORC family CW-type zinc finger protein 3
SCYL1	N-terminal kinase-like protein
NOS1AP	Carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein
C1orf226	Uncharacterized protein C1orf226
GRSF1	G-rich sequence factor 1
ISYNA1	Inositol-3-phosphate synthase 1
GRWD1	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1
KIAA0020	Pumilio domain-containing protein KIAA0020
PWP1	Periodic tryptophan protein 1 homolog
ABCF2	ATP-binding cassette sub-family F member 2
IFI16	Gamma-interferon-inducible protein 16
PRKRA	Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A
POP1	Ribonucleases P/MRP protein subunit POP1
ADSS	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2
PLRG1	Pleiotropic regulator 1
APOBEC3G	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3G
AP2A1	AP-2 complex subunit alpha-1
GTPBP1	GTP-binding protein 1
EIF2AK2	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase

CRKL	Crk-like protein
EMG1	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1
CMSS1	Protein CMSS1
PLEK	Pleckstrin
SSR1	Translocon-associated protein subunit alpha
GSTM3	Glutathione S-transferase Mu 3
H1FO	Histone H1.0;Histone H1.0, N-terminally processed
METAP2	Methionine aminopeptidase 2
CLASP1	CLIP-associating protein 1
TBC1D25	TBC1 domain family member 25
DDX55	ATP-dependent RNA helicase DDX55
EEFSEC	Selenocysteine-specific elongation factor
NHP2	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2
TSN	Translin
ZNF609	Zinc finger protein 609
AUP1	Ancient ubiquitous protein 1
NOC4L	Nucleolar complex protein 4 homolog
NUSAP1	Nucleolar and spindle-associated protein 1
MRPS27	28S ribosomal protein S27, mitochondrial
FAR1	Fatty acyl-CoA reductase 1
PDCD10	Programmed cell death protein 10
MARK2	Serine/threonine-protein kinase MARK2
BCAS2	Pre-mRNA-splicing factor SPF27
LDB1	LIM domain-binding protein 1
NDUFA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial
MAGI1	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1
TMA16	Translation machinery-associated protein 16
BLM	Bloom syndrome protein
DYNC2H1	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1
CYCS	Cytochrome c
NDUFS2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial
TFB2M	Dimethyladenosine transferase 2, mitochondrial
DNTTIP1	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 1
ACOT9	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial
EI24	Etoposide-induced protein 2.4 homolog
ARRB1	Beta-arrestin-1
LARP4	La-related protein 4
TCEB3	Transcription elongation factor B polypeptide 3
NOSIP	Nitric oxide synthase-interacting protein
APOA1BP	NAD(P)H-hydrate epimerase
MRPS22	28S ribosomal protein S22, mitochondrial
HEXIM1	Protein HEXIM1
NOSTRIN	Nostrin
TTC27	Tetratricopeptide repeat protein 27
PACSIN2	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2
PPIH	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H
FMNL1	Formin-like protein 1

MT-CO2	Cytochrome c oxidase subunit 2
LARP4B	La-related protein 4B
KIAA1524	Protein CIP2A
SPATA5	Spermatogenesis-associated protein 5
C12orf10	UPF0160 protein MYG1, mitochondrial
NDUFS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial
PLBD2	Putative phospholipase B-like 2;Putative phospholipase B-like 2 32 kDa form;Putative phospholipase B-like 2 45 kDa form
PTRHD1	Putative peptidyl-tRNA hydrolase PTRHD1
PSD4	PH and SEC7 domain-containing protein 4
PUS1	tRNA pseudouridine synthase;tRNA pseudouridine synthase A, mitochondrial
ARL1	ADP-ribosylation factor-like protein 1
PNO1	RNA-binding protein PNO1
KRI1	Protein KRI1 homolog
UTP18	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog
LTN1	E3 ubiquitin-protein ligase listerin
MOGS	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase
DHX57	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57
KRR1	KRR1 small subunit processome component homolog
YTHDF1	YTH domain-containing family protein 1
ZC3H8	Zinc finger CCCH domain-containing protein 8
WBP11	WW domain-binding protein 11
AP2S1	AP-2 complex subunit sigma
TFB1M	Dimethyladenosine transferase 1, mitochondrial
SCRIB	Protein scribble homolog
NIP7	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog
RAE1	mRNA export factor
FAM98A	Protein FAM98A
GFI1B	Zinc finger protein Gfi-1b
MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
FANCI	Fanconi anemia group I protein
SLC38A5	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 5
SLAIN2	SLAIN motif-containing protein 2
MRPS23	28S ribosomal protein S23, mitochondrial
SLBP	Histone RNA hairpin-binding protein
DHX37	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX37
ATP6V1C1	V-type proton ATPase subunit C 1
MRPS31	28S ribosomal protein S31, mitochondrial
MMS19	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog
CSNK1A1	Casein kinase I isoform alpha
RTCA	RNA 3-terminal phosphate cyclase
OSBPL8	Oxysterol-binding protein-related protein 8;Oxysterol-binding protein
NCKAP1L	Nck-associated protein 1-like
WBSCR22	Probable 18S rRNA (guanine-N(7))-methyltransferase
DIMT1	Probable dimethyladenosine transferase
LSM1	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm1
ZCCHC8	Zinc finger CCHC domain-containing protein 8

TARBP2	RISC-loading complex subunit TARBP2
MPST	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase;Sulfurtransferase
RPUSD4	RNA pseudouridylylase domain-containing protein 4
EXOSC3	Exosome complex component RRP40
UPF2	Regulator of nonsense transcripts 2
SRPK2	SRSF protein kinase 2;SRSF protein kinase 2 N-terminal;SRSF protein kinase 2 C-terminal
ASCC1	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 1
ZNF574	Zinc finger protein 574
KIFC1	Kinesin-like protein KIFC1
MRPS35	28S ribosomal protein S35, mitochondrial
YRDC	YrdC domain-containing protein, mitochondrial
DCAF13	DDB1- and CUL4-associated factor 13
FTL	Ferritin light chain;Ferritin
ALDH1B1	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial
NISCH	Nischarin
CDK12	Cyclin-dependent kinase 12
NXF1	Nuclear RNA export factor 1
MRPL41	39S ribosomal protein L41, mitochondrial
APOBEC3C	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3C
XPO4	Exportin-4
STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B
MSI2	RNA-binding protein Musashi homolog 2
FNTA	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha
CDK5RAP1	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1
SLC39A7	Zinc transporter SLC39A7
FAM120B	Constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PUM1	Pumilio homolog 1
ANAPC1	Anaphase-promoting complex subunit 1
SFXN2	Sideroflexin-2
MTPAP	Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial
MLLT11	Protein AF1q
PKD1	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial
HELLS	Lymphoid-specific helicase
SNX9	Sorting nexin;Sorting nexin-9
PSME4	Proteasome activator complex subunit 4
ILK	Integrin-linked protein kinase
ASH2L	Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1
GNL3L	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein
NOB1	RNA-binding protein NOB1
SKA3	Spindle and kinetochore-associated protein 3
UTP3	Something about silencing protein 10
EIF2D	Eukaryotic translation initiation factor 2D
RRP9	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2
UPF3B	Regulator of nonsense transcripts 3B
ZBTB11	Zinc finger and BTB domain-containing protein 11
ETV6	Transcription factor ETV6

CDC16 Cell division cycle protein 16 homolog
 Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit;Serine/threonine-protein phosphatase 6
 PPP6C catalytic subunit, N-terminally processed
 ASCC2 Activating signal cointegrator 1 complex subunit 2
 RBM6 RNA-binding protein 6
 ATPIF1 ATPase inhibitor, mitochondrial
 CLSPN Claspine
 TRIM56 E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56
 MED16 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16
 MIER1 Mesoderm induction early response protein 1
 CWC25 Pre-mRNA-splicing factor CWC25 homolog
 MAP3K4 Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4
 NCAPD3 Condensin-2 complex subunit D3
 NOM1 Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1
 CRTAP Cartilage-associated protein
 WDR6 WD repeat-containing protein 6
 CBFβ Core-binding factor subunit beta
 CPEB4 Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4
 R3HDM1 R3H domain-containing protein 1
 ANAPC5 Anaphase-promoting complex subunit 5
 KAZN Kazrin
 ZNF385A Zinc finger protein 385A
 LUM Lumican
 AKAP9 A-kinase anchor protein 9
 MED19 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 19
 EPN1 Epsin-1
 ZC3H4 Zinc finger CCCH domain-containing protein 4
 C17orf75 Protein Njmu-R1
 ASPM Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein
 TBL3 Transducin beta-like protein 3
 ETV3 ETS translocation variant 3
 JUNB Transcription factor jun-B
 SPATA5L1 Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1
 GSTM2 Glutathione S-transferase Mu 2
 RBM12B RNA-binding protein 12B
 CENPJ Centromere protein J
 SH2B3 SH2B adapter protein 3
 ZNF768 Zinc finger protein 768
 KCTD20 BTB/POZ domain-containing protein KCTD20
 CDK8 Cyclin-dependent kinase 8
 PIGK GPI-anchor transamidase
 GTPBP10 GTP-binding protein 10
 DIS3L DIS3-like exonuclease 1
 NFYA Nuclear transcription factor Y subunit alpha
 KIF13A Kinesin-like protein KIF13A
 EPSTI1 Epithelial-stromal interaction protein 1
 POLRMT DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial

RIOK2 Serine/threonine-protein kinase RIO2
 NLRP4 NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 4
 RAB11FIP5 Rab11 family-interacting protein 5
 RPUUSD3 RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 3
 TRAPPC8 Trafficking protein particle complex subunit 8
 OGFOD2 2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain-containing protein 2
 GIGYF1 PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 1
 RPAP2 Putative RNA polymerase II subunit B1 CTD phosphatase RPAP2
 MED15 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15
 DICER1 Endoribonuclease Dicer
 MIB1 E3 ubiquitin-protein ligase MIB1
 SBSN Suprabasin
 GTF3C4 General transcription factor 3C polypeptide 4
 NFE2 Transcription factor NF-E2 45 kDa subunit
 MED13 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13
 POLR2C DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3
 STON2 Stonin-2
 EHHADH Peroxisomal bifunctional enzyme;Enoyl-CoA hydratase/3,2-trans-enoyl-CoA isomerase;3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
 PLEKHA7 Pleckstrin homology domain-containing family A member 7
 SUN2 SUN domain-containing protein 2
 MRPS9 28S ribosomal protein S9, mitochondrial
 RASGRP4 RAS guanyl-releasing protein 4
 CDC23 Cell division cycle protein 23 homolog
 MED8 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 8
 KMT2D Histone-lysine N-methyltransferase 2D
 NBEAL2 Neurobeachin-like protein 2
 PRKAB1 5-AMP-activated protein kinase subunit beta-1
 MED23 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23

CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML

Laure David,^{1,2,3*} Anne Fernandez-Vidal,^{1,2,3*} Sarah Bertoli,^{1,2,3,4} Srdana Grgurevic,^{1,2,3} Benoît Lepage,^{3,5,6} Dominique Deshaies,⁵ Naïs Prade,⁷ Maëlle Cartel,^{2,3} Clément Larrue,^{2,3} Jean-Emmanuel Sarry,^{2,3} Eric Delabesse,^{2,3,7} Christophe Cazaux,^{1,2,3} Christine Didier,^{1,2,3} Christian Récher,^{2,3,4†} Stéphane Manenti,^{1,2,3†} Jean-Sébastien Hoffmann^{1,2,3†}

The nucleoside analog cytarabine, an inhibitor of DNA replication fork progression that results in DNA damage, is currently used in the treatment of acute myeloid leukemia (AML). We explored the prognostic value of the expression of 72 genes involved in various aspects of DNA replication in a set of 198 AML patients treated by cytarabine-based chemotherapy. We unveiled that high expression of the DNA replication checkpoint gene *CHEK1* is a prognostic marker associated with shorter overall, event-free, and relapse-free survivals and determined that the expression of *CHEK1* can predict more frequent and earlier postremission relapse. *CHEK1* encodes checkpoint kinase 1 (CHK1), which is activated by the kinase ATR when DNA replication is impaired by DNA damage. High abundance of CHK1 in AML patient cells correlated with higher clonogenic ability and more efficient DNA replication fork progression upon cytarabine treatment. Exposing the patient cells with the high abundance of CHK1 to SCH900776, an inhibitor of the kinase activity of CHK1, reduced clonogenic ability and progression of DNA replication in the presence of cytarabine. These results indicated that some AML cells rely on an efficient CHK1-mediated replication stress response for viability and that therapeutic strategies that inhibit CHK1 could extend current cytarabine-based treatments and overcome drug resistance. Furthermore, monitoring *CHEK1* expression could be used both as a predictor of outcome and as a marker to select AML patients for CHK1 inhibitor treatments.

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous disease characterized by different recurrent cytogenetic and molecular aberrations that occur in hematopoietic progenitor cells and alter the growth, differentiation, and proliferation capacities of the progenitor cells. The treatment of AML has remained a huge challenge for oncohematologists. Although roughly 70% of adults with AML under age 60 achieve a complete remission with traditional cytarabine- and anthracycline-based induction regimens, the overall long-term survival (>5 years) rate with therapy is only 30 to 40% (1, 2). The prognosis is even worse for older patients, for which long-term survival is less than 10% (3). Whereas recurrent chromosomal structural alterations are well-established prognostic markers, the outcome of patients with a normal karyotype, referred to as cytogenetically normal AML (CN-AML), has been recently better defined with the discoveries of recurrent mutations in the *FLT3*, *NPM1*, and *CEBPA* genes. These genetic alterations have been associated with favorable or negative outcome, depending on the mutated gene, after standard intensive chemotherapy.

Consequently, the presence of these mutations now serves as a basis for molecularly guided risk assessment and treatment stratification (4). In addition, altered expression of genes such as *MNI*, *BAALC*, and *ERG* is also predictive for outcomes of patients with CN-AML (5–7). However, the roles of most of these genes in leukemogenesis remain unclear, and many of their products are not optimal drug targets.

Here, we reasoned that DNA replication represents a less explored source of prognostic markers that could be used in combination with cytogenetics to predict AML prognosis and eventually provide potential targets for therapeutic targeting. Accurate execution of the DNA replication program limits cancer risk by preserving genome integrity. Multiple studies of solid cancers have provided evidence that defective or dysregulated DNA replication program triggers replicative stress, leading to the accumulation of genetic alterations (8–12). However, defective DNA replication as a source of markers in hematological malignancies has not been explored. Genome-wide analyses detected widespread dysregulation of replication timing in different types of leukemic cells (13). Because the defect in replication timing occurred at the same temporal aspect of the replication process, leukemogenesis may be associated with a common early replication defect event (13). Here, we test the hypothesis that misexpression of genes encoding proteins involved in DNA replication occurs in AML and contributes to the cytogenetic aberrations that characterize AML. We speculated that specific signatures of genes encoding proteins involved in the regulation of DNA replication could be relevant during relapses and thus represent predictors of outcome for AML patients. We also reasoned that a modified DNA replication program could affect the response to current standard AML treatment, the nucleoside analog cytarabine, an inhibitor of DNA chain elongation during replication fork progression.

Using information and cells from 198 treated AML patients, we examined the prognostic significance of the expression of genes encoding proteins involved in DNA replication as a determinant of survival, and tested the

¹Equipe Labellisée, La Ligue Contre Le Cancer, Toulouse, France. ²Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer Labex TOUCAN, Cancer Research Center of Toulouse, Inserm U1037, CNRS ERL5294, Toulouse, France. ³Université Paul Sabatier, Toulouse, France. ⁴Service d'hématologie, Institut Universitaire du Cancer Toulouse-Oncopole, 1 avenue Irène Joliot-Curie, 31059 Toulouse, Cedex 9, France. ⁵Département d'Epidémiologie, Economie de la Santé et Santé Publique, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France. ⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1027, Epidémiologie et analyses en santé publique: Risques, maladies chroniques et handicaps, Faculté de médecine, Toulouse, France. ⁷Service d'hématologie, Institut Universitaire du Cancer Toulouse-Oncopole, Toulouse, France.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: jean-sebastien.hoffmann@inserm.fr (J.-S.H.); stephane.manenti@inserm.fr (S.M.); recher.christian@iuct-oncopole.fr (C.R.)

encoded proteins as possible therapeutic targets in AML. Our data demonstrate that *CHEK1* expression alone is a prognostic marker in AML and that high abundance of the encoded protein checkpoint kinase 1 (CHK1) protects AML cells against the toxic effects of the therapeutic agent cytarabine.

RESULTS

Established prognostic markers validate the AML cohort

The clinical characteristics of the AML cohort used in this study are described in Materials and Methods and shown in table S1. Because high *BAALC*, *ERG*, or *MNI* expression was previously reported as an indicative of poor prognosis in CN-AML patients in several independent studies (5–7), we first confirmed that increased abundance of the expression of these three genes, measured by the Fluidigm system, was significantly associated with a reduction in the overall survival in our cohort (table S2). Overall survival was calculated from the date of the first day of chemotherapy until the date of death from any cause. For the 90 CN-AML

patients, high expression (greater than the median expression value) of *BAALC*, *ERG*, or *MNI* was associated with an increase in death rate with respective hazard ratios (HRs), an indicator of the death rate between low versus high expression, of 2.11, 2.3, and 1.63 (fig. S1 and table S2). Collectively, these data validate the cohort chosen for the study as representative of CN-AML patients.

High *CHEK1* expression is an independent prognostic marker in AML

We then monitored the expression of a subset of genes encoding proteins involved in different aspects of DNA replication, including those that maintain the stability of stalled DNA replication forks and those that control the DNA replication checkpoint (table S3). Among all the genes tested, the replication checkpoint gene *CHEK1* was the strongest factor associated with outcome (overall, event-free, and relapse-free survival) (Fig. 1). Thus, we divided the patient data into two groups according to their *CHEK1* median expression: low or high expressers (Table 1). The complete response, measured as the full recovery of blood counts, did not differ

Table 1. Characteristics of 198 patients in the study population.

	Total (n = 198)	<i>CHEK1</i> expression				P*
		Low (<median value)		High (>median value)		
		($\Delta\Delta C_t = [-2.69, 0.13]$, n = 99)		($\Delta\Delta C_t = [0.14, 1.95]$, n = 99)		
		n	%	n	%	
Sex, n (%)						
Men	98 (49.5)	46	46.5	52	52.5	0.39
Women	100 (50.5)	53	53.5	47	47.5	
Age in years (mean \pm SD)	46.6 \pm 12.2					
Age by quartiles, n (%)						
18–37	50 (25.3)	21	21.2	29	29.3	0.20
37–48	49 (24.7)	30	30.3	19	19.2	
48–57	50 (25.3)	22	22.2	28	28.3	
57–65	49 (24.7)	26	26.3	23	23.2	
White blood cells in g/liter, median (interquartile range)	30.3 (6.3–72.9)					
White blood cells by quartiles						
0.7–6.5	50 (25.3)	22	22.2	28	28.3	0.61
6.5–30.0	49 (24.7)	23	23.2	26	26.3	
30.0–73.0	50 (25.3)	28	28.3	22	22.2	
73.0–356	49 (24.7)	26	26.3	23	23.2	
Secondary AML, n (%) [†]						
No	169 (85.8)	89	90.8	80	80.8	0.04
Yes	28 (14.2)	9	9.2	19	19.2	
Cytogenetic risk group, n (%)						
Favorable	31 (15.7)	15	15.2	16	16.2	0.31
Intermediate	129 (65.2)	69	69.7	60	60.6	
Adverse	38 (19.2)	15	15.2	23	23.2	
<i>NPM1</i> mutation without <i>FLT3-ITD</i> mutation, n (%) [‡]						
No	83 (74.1)	42	68.9	41	80.4	0.17
Yes	29 (25.9)	19	31.1	10	19.6	
Complete response, n (%)						
Yes	162 (81.8)	83	83.8	79	79.8	0.46
No	36 (18.2)	16	16.2	20	20.2	
Allograft, n (%)						
No	141 (71.2)	75	75.8	66	66.7	0.16
Yes	57 (28.8)	24	24.2	33	33.3	

* χ^2 test. [†]One unknown value; secondary means 10 cases post-myelodysplastic syndrome, 7 post-myeloproliferative neoplasia, and 11 therapy-related AML. [‡]n = 129, with 17 unknown values.

according to *CHEK1* expression status, with 83 of 99 (83.8%) and 79 of 99 (79.8%) achieving a complete response in both the *CHEK1*^{high} and *CHEK1*^{low} groups, respectively ($P = 0.46$). There were also no significant differences between patients with low and high *CHEK1* expression in age, sex, white blood cell count, cytogenetics, or *FLT3-ITD* and *NPM1* status (Table 1). Consequently, we focused on the relationship between *CHEK1* expression and the survival and relapse rate predictions.

First, we found that *CHEK1* expression predicted overall survival with a 5-year estimate of 29.5% in the *CHEK1*^{high} group and 52.4% in the *CHEK1*^{low} group (Fig. 1A and Table 2). We calculated event-free survival from the first day of chemotherapy until the date of treatment failure, relapse, or patient death from any cause. High *CHEK1* expression predicted shorter event-free survival, with 5-year estimates of 24.2% for the *CHEK1*^{high} group and 50.3% for the *CHEK1*^{low} group (Fig. 1B and Table 2). Relapse-free survival for patients who achieved complete response was calculated from the date of complete response until the date of relapse or death from any cause. For the 162 patients with complete response (Table 1), 5-year relapse-free survival was significantly lower in the *CHEK1*^{high} group (30.4%) than in the *CHEK1*^{low} group (60%) (Fig. 1C and Table 2).

Consistent with the relapse-free survival data, *CHEK1* expression was also indicative of relapse rates. Five-year cumulative incidence of relapse, measured from the date of complete response until the date of relapse, was significantly different between both groups (Fig. 2, left). *CHEK1* expression did not correlate with patients who deceased without relapse where death was independent of AML (Fig. 2, right). Similarly, cumulative cause-specific hazards of relapse were also significantly different between both groups (fig. S2). There was no difference in the rate of death without relapse between low and high *CHEK1* groups (fig. S2).

We also analyzed the cohort by subpopulations of patients who had received allogeneic stem cell transplants (allografted patients) (Fig. 3, A and B and fig. S3) and patients with the *MLL* translocation (Fig. 3C), a genetic abnormality that confers particularly poor prognosis (14). We also found that *CHEK1* expression was significantly associated with overall survival in allografted patients and high *CHEK1* expression was associated with reduced relapse-free survival (Fig. 3 and fig. S3). The patients with the *MLL* translocation already have a poor prognosis, and with only 12 patients in the cohort, survival analysis would not be informative. However, the average *CHEK1* expression was 3.6 times higher in patients with *MLL* translocation than in the rest of 171 cases in the cohort (Fig. 3C).

The multivariate analyses based on Cox proportional hazard models adjusted for age, sex, year of diagnosis, and white blood cell count revealed that the value of *CHEK1* expression is independent of these factors (Tables 3 and 4). Furthermore, *CHEK1* expression did not significantly affect overall survival in the favorable-risk groups, including 29 patients with *NPM1* mutation without *FLT3* mutation (Tables 1 and 4).

High CHK1 abundance in AML patients does not correlate with higher activation of the DNA replication checkpoint

We quantified CHK1 abundance in 10 AML samples from patients in the cohort tested in the transcript Fluidigm study (see Fig. 1). *CHEK1* transcript abundance and CHK1 protein abundance are correlated (Fig. 4, A and B). Analysis of samples from an additional 37 AML patients by immunoblot and immunofluorescence revealed that the samples could be divided into 21 low CHK1 abundance samples (exemplified by #36) and 16 high CHK1 abundance samples (exemplified by #37) [Fig. 4, C and D (lower panel), and table S4]. The analysis of high CHK1 abundance patient samples by immunofluorescence revealed a subpopulation of cells within the samples with a much higher amount of CHK1 [Fig. 4, C and D (upper panel)].

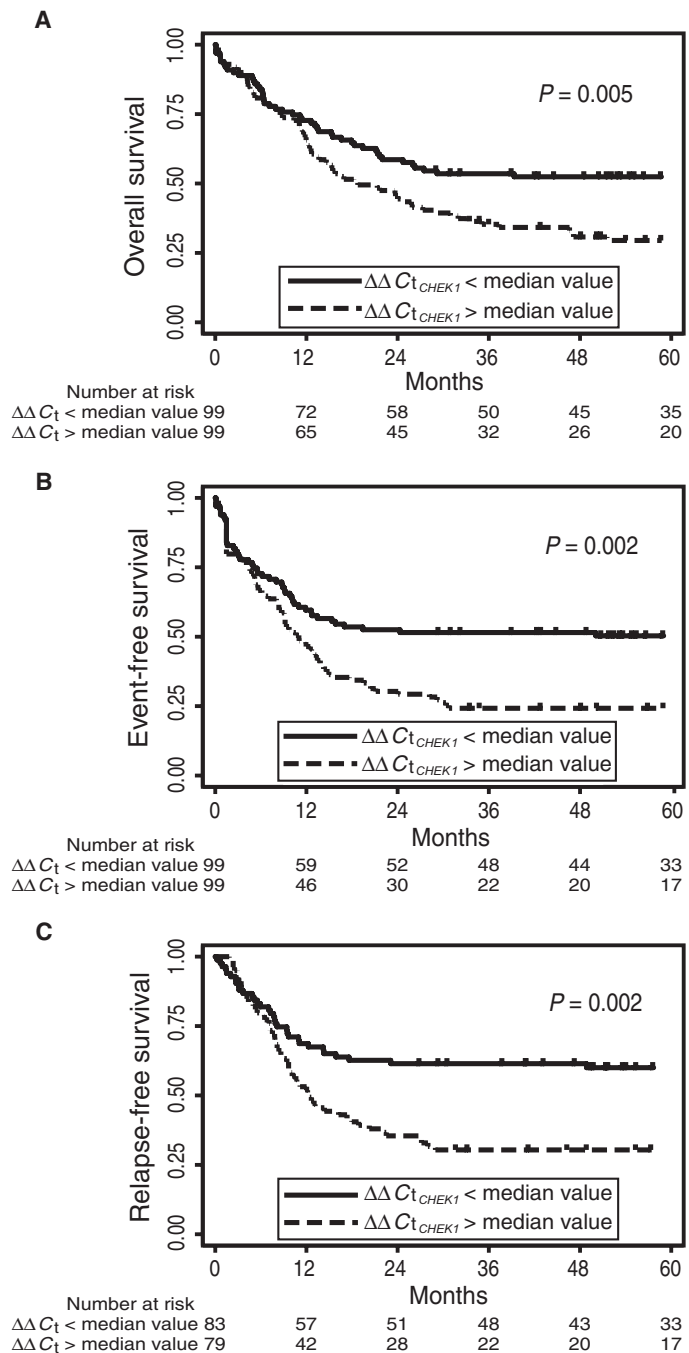


Fig. 1. Relationship between survival and *CHEK1* expression. (A to C) Overall survival (A), event-free survival (B), and relapse-free survival (C) according to *CHEK1* expression. Dashed lines, high *CHEK1* expression patients ($\Delta\Delta C_t$ *CHEK1* > median); solid lines, low *CHEK1* expression patients ($\Delta\Delta C_t$ *CHEK1* < median).

The ATR replication checkpoint pathway becomes activated when DNA replication is stalled. This ATR checkpoint involves the translocation of multicomponent protein complexes to the stalled replication forks, which is then followed by the phosphorylation of the ATR effector CHK1 (15). Therefore, we explored whether high CHK1 abundance in

Table 2. Survival estimations using Kaplan-Meier method and comparisons between high and low *CHEK1* expression.

Survival	<i>CHEK1</i> expression	<i>n</i>	Events	Survival (months)		<i>P</i> *
				First quartile	Median	
Overall (<i>n</i> = 198)	<Median	99	48	10.2	98.4	0.005
	>Median	99	70	8.5	18.8	
Event-free (<i>n</i> = 198)	<Median	99	52	5.0	63.2	0.002
	>Median	99	75	4.3	11.0	
Relapse-free (<i>n</i> = 162)	<Median	83	36	8.1	—	0.002
	>Median	79	55	7.2	12.2	

*Log-rank test.

AML patient cells isolated from the patients at diagnosis correlated with the amount of phosphorylated and activated CHK1, indicating activation of the DNA replication checkpoint before exposure to the drug. We assessed the abundance of CHK1, the phosphorylation of CHK1 on Ser³⁴⁵, and the abundance of CDC25A, a CHK1 substrate that becomes targeted for degradation upon phosphorylation by CHK1 (16), in cell extracts from a set of eight randomly chosen samples from the initial cohort. CHK1 abundance did not correlate with CHK1 phosphorylation status or CDC25A abundance (Fig. 4E), suggesting that CHK1 abundance was not indicative of activation of the DNA replication checkpoint. Thus, although high *CHEK1* expression, and by extension CHK1 abundance (Fig. 4B), correlated with poor patient survival and relapse, these data indicated that this was not due to chronic activation of the DNA replication checkpoint.

Resistance to cytarabine in AML samples correlates with increased abundance of CHK1 and is abolished by the CHK1 inhibitor SCH900776

We assessed whether AML primary cells with low and high CHK1 abundance had different sensitivity to the toxic effects of cytarabine. We quantified the ability of the cells to form colonies in methylcellulose-based semisolid medium when exposed to clinically relevant concentrations (5 and 10 nM) of cytarabine (Fig. 5A). In the colony-forming assay, cells with high CHK1 abundance were significantly more resistant to cytarabine compared to the low CHK1 abundance cells (Fig. 5A). Because high CHK1 abundance correlated with higher AML cell survival in the presence of cytarabine, we also tested whether inhibition of the kinase activity of CHK1 restored the sensitivity of these leukemic cells to the toxic effects of cytarabine. Addition of the CHK1 inhibitor (SCH900776) increased cytarabine sensitivity of the high CHK1 abundance cells such that they exhibited a similar sensitivity to inhibition of colony formation as the low CHK1 abundance cells (Fig. 5A). These data support a direct link between the increased abundance of CHK1 and resistance to cytarabine in AML cells.

Because we found no correlation between CHK1 abundance and the activation of its function for replication checkpoint in AML patients, we predicted that the mechanism of resistance to cytarabine is independent of the role of CHK1 in the ATR replication checkpoint pathway. Instead, we

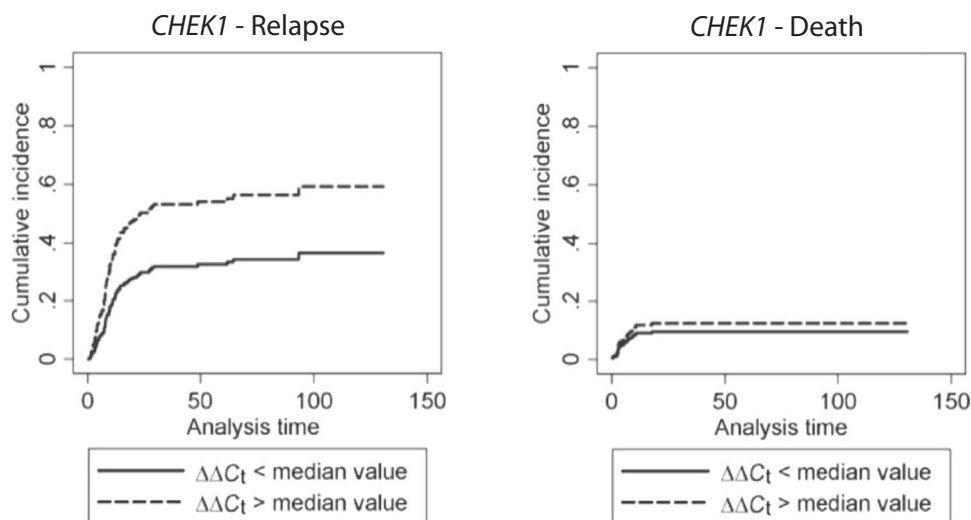


Fig. 2. Relationship between relapse and death and *CHEK1* expression. Cumulative incidence of relapse (left) and death (right) according to *CHEK1* expression. Dashed lines, high *CHEK1* expression patients ($\Delta\Delta C_{t\ CHEK1} > \text{median}$); solid lines, low *CHEK1* expression patients ($\Delta\Delta C_{t\ CHEK1} < \text{median}$).

hypothesized that the high abundance of CHK1 ensured the maintenance of active replication forks when the patient received cytarabine. Without abundant CHK1, cytarabine terminates DNA polymerization during progression of the replication forks, thereby causing stalled replication forks and triggering the DNA replication checkpoint. To test whether high CHK1 abundance enabled cells to bypass cytarabine-induced stalling of the replication forks, we analyzed the DNA replication forks in cellulo both at the whole-genome and at the single-molecule levels with the DNA fiber spreading technique, which labels tracks of new DNA synthesis *in vivo* (17). With this technique, we monitored replication fork progression as indicated by the presence of nascent DNA at the level of individual replicating DNA molecules. With this method, a reduction in nascent DNA track length is indicative of stalled DNA replication. Cytarabine induced a significant reduction in nascent DNA track length in low CHK1 abundance cells (Fig. 5, B and C). In contrast, similar treatment with cytarabine had no significant impact on DNA replication fork progression in high CHK1 abundance cells (Fig. 5, D and E). However, addition of the CHK1 inhibitor SCH900776 to the cytarabine-treated, high CHK1 abundance cells triggered a significant reduction in nascent DNA track length (Fig. 5, D and E). Collectively, these data showed that high CHK1 abundance and a CHK1 activity inhibited by SCH900776 facilitate the progression or restart of cytarabine-induced stalled DNA replication forks.

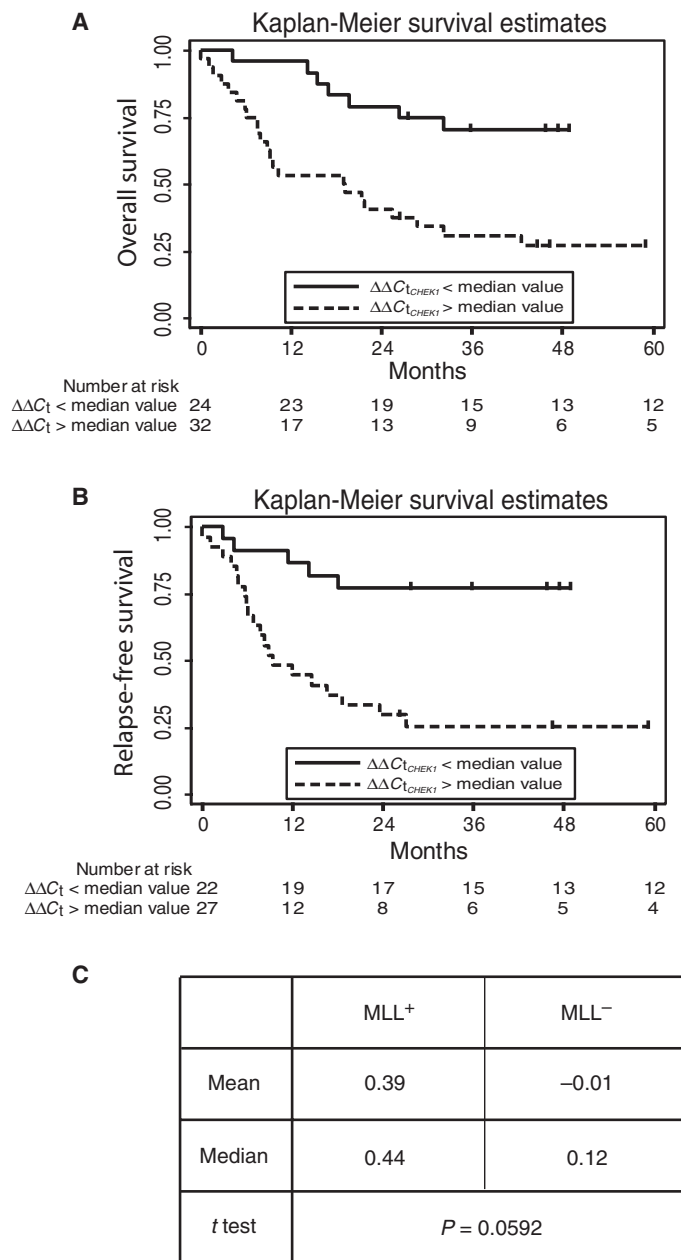


Fig. 3. A study of *CHEK1* expression in subpopulations of allografted patients and patients with the MLL translocation. (A) Overall survival according to *CHEK1* expression in patients who were allografted in first complete response ($n = 50$). (B) Relapse-free survival according to *CHEK1* expression in patients who were allografted in first complete response ($n = 50$). (C) *CHEK1* expression analysis in patients with MLL translocation. Twelve cases in the cohort contained the MLL translocation (MLL⁺), and 171 cases in the cohort did not (MLL⁻).

Increased abundance of CHK1 in AML cells enhances clonogenic ability

One scenario that may reconcile the resistant phenotype and the enhanced potential for aggressive relapse of cells with abundant CHK1 is that a pre-existing subpopulation of high CHK1 abundance AML cells (Fig. 4, C and

D), which can be selected and enriched by the treatment with cytarabine, has the potential to form a residual aggressive tumor burden after treatment. Therefore, we used the colony-forming assay to compare the aggressiveness potential of AML cells with low or high CHK1 abundance in the absence of cytarabine. Consistent with the hypothesis, we found that high abundance of CHK1 increased not only the number of colonies that formed (Fig. 6A) but also the number of cells in each clonal colony (Fig. 6, B and C), in comparison to the AML cells with low CHK1 abundance.

Because the cells with high CHK1 abundance had increased proliferative potential, we examined the abundance of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), a conserved serine/threonine kinase necessary for cell cycle progression (18). Furthermore, in absence of replication stress or DNA damage, CHK1 phosphorylates histone H3 at Thr¹¹, which enhances the expression of *CDK1* and thereby enables cells to progress into mitosis (19). In response to the activation of DNA damage or DNA replication stress, CHK1 dissociates from chromatin, which is concomitant with reduced histone H3 Thr¹¹ phosphorylation and repression of *CDK1* expression, resulting in the activation of the G₂/M checkpoint. CDK1 was increased (at both the mRNA and protein levels) in unstressed AML cells with high CHK1 abundance compared to AML cells with low CHK1 abundance (Fig. 6D). These results provide a mechanism for the higher colony-forming ability of AML cells with higher CHK1 abundance.

DISCUSSION

Our data show that *CHEK1* transcript abundance is an independent prognostic marker in AML. High *CHEK1* transcripts in leukemic cells were associated with an increased risk of relapse and poor survival in a cohort of AML patients who had received first-line cytarabine and anthracycline chemotherapy. Several mechanisms of enhanced *CHEK1* expression in cancers have been described, including gene amplifications (20) and overexpression of the gene encoding the transcriptional factor E4F1, described as a positive regulator of *CHEK1* expression (21, 22). Future studies can evaluate the importance and contribution of these mechanisms in high *CHEK1*-expressing AML cells. Because we found that in primary cells from nine AML patients *CHEK1* transcripts correlated with CHK1 protein abundance, either transcript analysis or protein analysis by flow cytometry with suitable antibodies could be used to monitor CHK1 abundance in AML patient samples. The identification of relevant molecular markers is of great importance in AML because current molecular classification patterns do not fully predict the heterogeneity in outcome of these patients. To date, only high levels of *BAALC*, *ERG*, or *MNI* expression were reported to negatively affect the outcome of AML patients (5–7), which we confirmed here. The mechanisms through which increased expression of these genes contributes to malignant transformation remain to be elucidated. Moreover, presently, the products of these genes are not druggable targets.

Our analyses also revealed that high CHK1 protein abundance does not correlate with higher endogenous activation of the replication checkpoint yet favored AML cell survival and proliferation of cells exposed to clinically relevant concentrations of cytarabine. This finding could explain why AML patients classified as high-expressing *CHEK1* by Fluidigm assay and treated by intensive cytarabine-based chemotherapy have a poor clinical outcome. To explain why these patients also showed a higher relapse rate months or years after the treatment, we propose that a pre-existing subpopulation of AML cells with increased abundance of CHK1 survives the selective pressure of cytarabine during the treatment, becoming enriched and forming a residual aggressive tumor burden that is the source of the relapse. This hypothesis is supported by our findings that (i) AML cells with increased average quantity of CHK1 are heterogeneous for CHK1 abundance with a minor population having very high

Table 3. Multivariate survival analysis by Cox proportional hazard models.

	Adjusted		Adjusted and corrected for overoptimism
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)
Overall survival (n = 198)*			
<i>CHEK1</i> expression			
<Median (reference)	1.00		1.00
>Median	1.74 (1.19–2.56)	0.004	1.58 (1.15–2.17)
Age	1.00 (0.99–1.02)	0.26	
Year of diagnosis	0.96 (0.91–1.02)	0.26	
White blood cells (g/liter)			
0.7–6.5 (reference)	1.00		
6.5–30.0	1.40 (0.81–2.42)	0.23	
30.0–73.0	2.09 (1.22–3.59)	0.008	
73.0–356	1.91 (1.11–3.31)	0.02	
Sex			
Men (reference)	1.00		
Women	1.06 (0.72–1.55)	0.77	
Cytogenetic risk group			
Favorable (reference)	1.00		
Intermediate	3.16 (1.50–6.65)	0.002	
Adverse	7.51 (3.35–16.84)	<0.001	
Event-free survival (n = 198)†			
<i>CHEK1</i> expression			
<Median (reference)	1.00		1.00
>Median	1.74 (1.21–2.52)	0.003	1.58 (1.17–2.14)
Age	1.01 (0.99–1.03)	0.19	
Year of diagnosis	0.99 (0.94–1.05)	0.83	
White blood cells (g/liter)			
0.7–6.5 (reference)	1.00		
6.5–30.0	1.40 (0.83–2.37)	0.21	
30.0–73.0	2.17 (1.28–3.69)	0.004	
73.0–356	1.86 (1.10–3.15)	0.02	
Sex			
Men (reference)	1.00		
Women	0.90 (0.62–1.31)	0.59	
Cytogenetic risk group			
Favorable (reference)	1.00		
Intermediate	2.80 (1.43–5.48)	0.003	
Adverse	6.27 (2.97–13.24)	<0.001	
Relapse-free survival (n = 162)‡			
<i>CHEK1</i> expression			
<Median (reference)	1.00		
>Median	2.10 (1.35–3.29)	0.001	1.74 (1.25–2.43)
Age (years)			
18–37	1.00		
37–48	1.19 (0.64–2.18)	0.58	
48–57	0.82 (0.45–1.49)	0.52	
57–65	1.48 (0.83–2.63)	0.18	
Year of diagnosis	0.97 (0.91–1.05)	0.46	
White blood cells (g/liter)			
0.7–6.5 (reference)	1.00		
6.5–30.0	1.73 (0.90–3.32)	0.10	
30.0–73.0	2.62 (1.34–5.12)	0.005	
73.0–356	2.40 (1.28–4.50)	0.007	
Sex			
Men	1.00		
Women	0.91 (0.58–1.43)	0.67	
Cytogenetic risk group			
Favorable (reference)	1.00		
Intermediate	2.83 (1.37–5.82)	0.002	
Adverse	6.47 (2.71–15.46)	<0.001	

*HRs have been corrected for overoptimism, applying an internal validation procedure based on cross-validation. Slope index was 0.82. †HRs have been corrected for overoptimism, applying an internal validation procedure based on cross-validation. Slope index was 0.82. ‡HRs have been corrected for overoptimism, applying an internal validation procedure based on cross-validation. Slope index was 0.75.

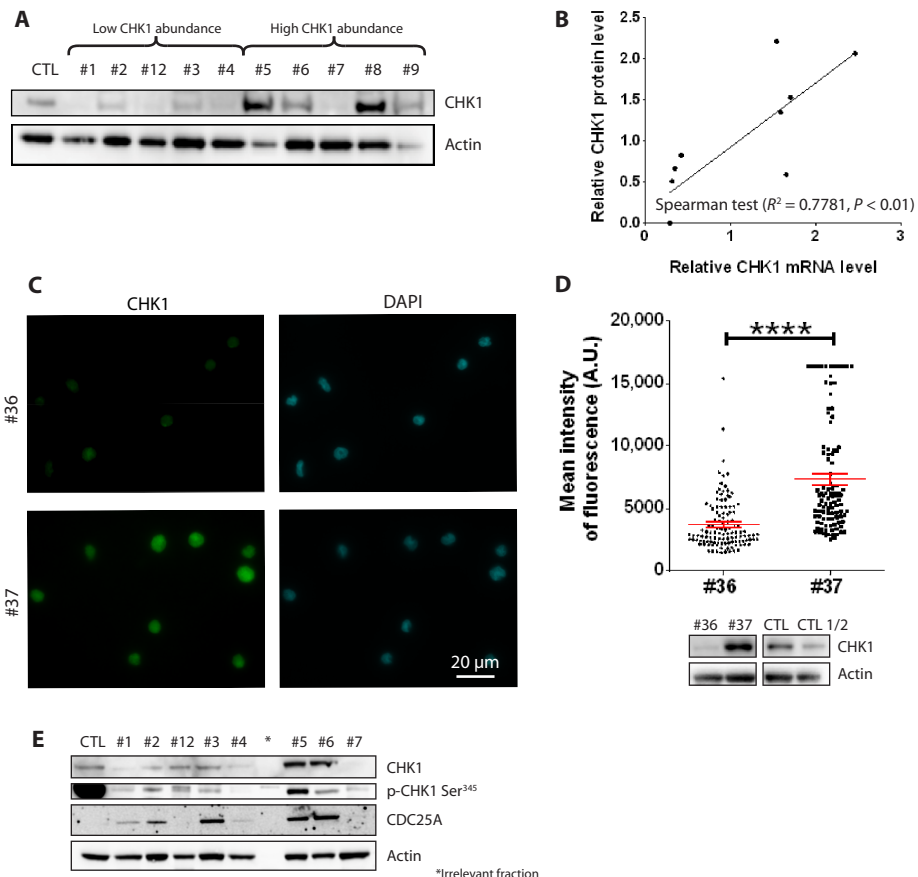
amounts of CHK1 (Fig. 4, C and D), (ii) AML cells with increased average abundance of CHK1 were associated with increased abundance of the cell cycle-promoting protein CDK1 and displayed a higher ability to form cellular clones in methylcellulose in the absence of any treatment (Fig. 6), and (iii) the high *CHEK1* group of AML patients showed a striking re-

Table 4. Estimated cause-specific and subdistribution HRs for relapse and death of other cause using unadjusted and adjusted regression models.

	Cox: Cause-specific HR			
	Relapse		Death of other cause	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
<i>CHEK1</i> unadjusted	2.11 (1.31–3.39)	0.002	1.39 (0.55–3.52)	0.49
<i>CHEK1</i> adjusted*	2.32 (1.41–3.80)	0.001	1.26 (0.47–3.34)	0.65
	Fine-Gray: Subdistribution HR			
	Relapse		Death of other cause	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
<i>CHEK1</i> unadjusted	1.97 (1.23–3.18)	0.005	1.31 (0.52–3.33)	0.56
<i>CHEK1</i> adjusted*	2.19 (1.32–3.65)	0.003	1.20 (0.42–3.40)	0.73

*Adjusted for year of diagnosis, age, sex, white blood cell count, and cytogenetic risk group.

Fig. 4. Identification of high and low CHK1 abundance in patient cells. (A and B) Correlation between *CHEK1* mRNA and CHK1 protein abundance in AML patient samples. (A) CHK1 abundance was determined by immunoblot using the antibodies against CHK1 and actin as a loading control in 10 AML patient samples. Extracts from KG1a leukemic cell line served as a between-gel control. (B) Linear regression analysis for the correlation between *CHEK1* mRNA level and CHK1 protein level. Statistical analysis was performed using Spearman's test. (C and D) Quantification of CHK1 in two representative samples of the 37 AML samples of the cohort. (C) Representative images by immunofluorescence staining of samples #36 and #37. (D) Upper panel: Quantification of CHK1 in samples #36 and #37. Each solid circle or square corresponds to one cell; at least 100 cells were scored for each condition. Horizontal lines, mean values. Statistical analyses were performed using unpaired *t* test with Welch's correction (*****P* < 0.0001). (D) Lower panel: Western blot analyses of CHK1 abundance in representative AML samples [#36, #37, and control (CTL)]. Actin served as a loading control. A.U., arbitrary units. (E) Western blot analysis of CHK1 abundance, CHK1 phosphorylation (p-CHK1), and CDC25A abundance in AML patient cells.

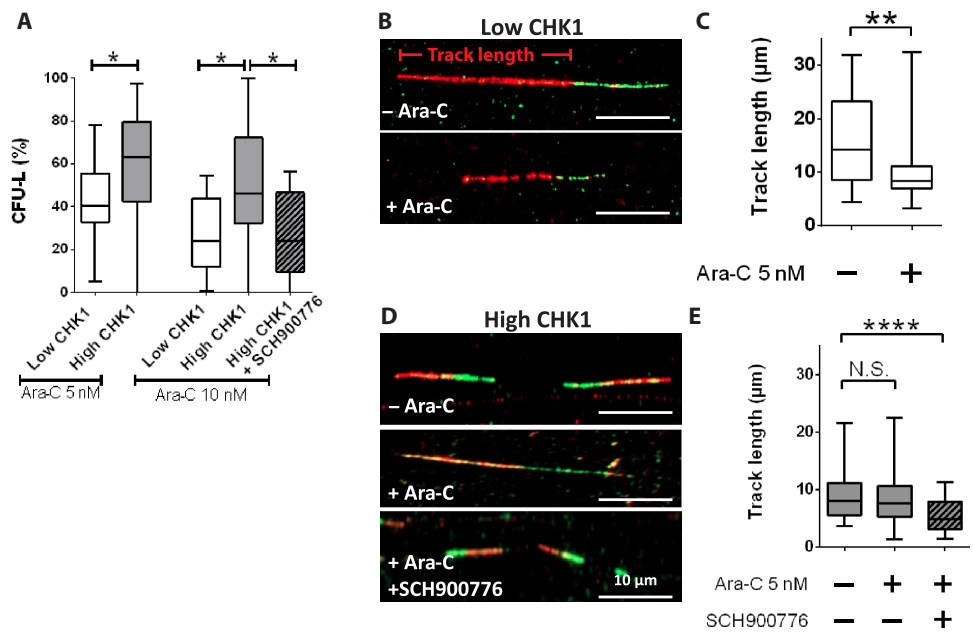


lapse rate also after allogeneic stem cell transplantation (Fig. 3 and fig. S3).

CHEK1 encodes the transducer and effector protein kinase CHK1 that regulates cell cycle progression and chromosome metabolism in response to genotoxic stress (23), particularly during S phase during which CHK1 has been proposed to maintain the stability of stalled DNA replication forks in response to replication inhibitors (23, 24). With a single-molecule DNA fiber spreading technique, we showed that inhibition of fork progression by cytarabine was significantly more pronounced in AML cells with low abundance of CHK1 compared to those with high CHK1 abundance, supporting the hypothesis that high CHK1 abundance in AML cells could facilitate replication fork progression or restart stalled forks upon cytarabine treatment.

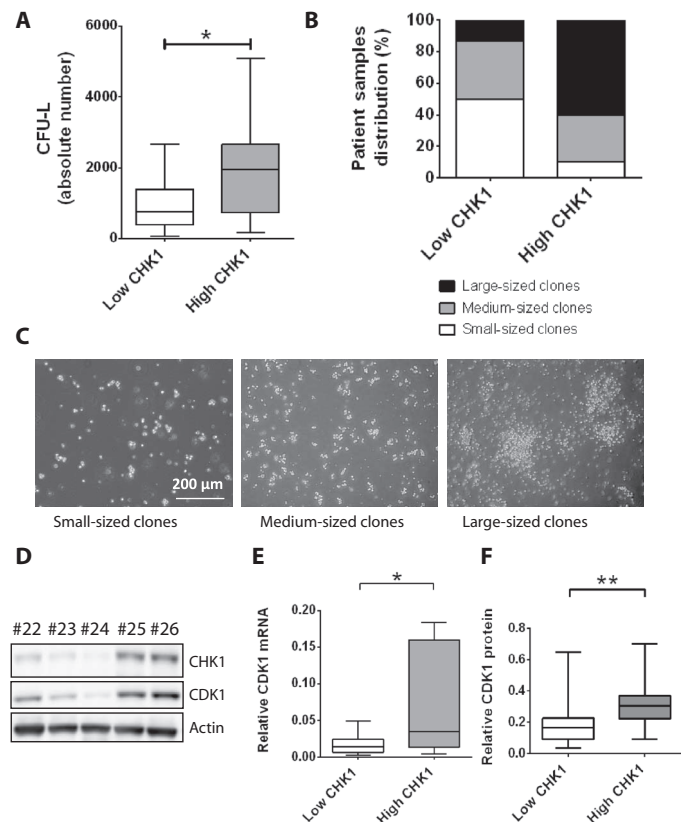
The control of fork elongation by CHK1 could be independent of its function in the regulation of the firing of replication origins (24). Because cytarabine acts as a DNA chain elongation inhibitor in the course of the DNA replication fork progression, the treatment with this nucleotide analog leads to the accumulation of stalled forks, which in turn favors fork collapse and chromosomal breakage, events that are detrimental for cell survival. Just as the role of CHK1 in cells experiencing DNA replication stress is to protect cells (25), the high abundance of CHK1 could protect AML cells from cytarabine toxicity by enhancing stabilization of stalled forks, avoiding fork collapse, and enabling fork restart. Consistent with this mechanism of CHK1 action in AML, supraphysiological abundance of CHK1 protects cells from endogenous replication stress in mice (25) and in primary T cell acute lymphoblastic leukemia cells (26). Our results support the notion that a modified DNA replication program in

Fig. 5. Increased CHK1 abundance favors AML cell proliferation and efficient DNA replication fork progression upon arabinosylcytosine treatment. (A) Analyses of the clonogenic properties of high CHK1 abundance (high CHK1) and low CHK1 abundance (low CHK1) AML blast cells upon continuous exposure to 5 or 10 nM arabinosylcytosine (Ara-C) alone or in combination with 250 nM CHK1 inhibitor (SCH900776). Colony formation was assessed after 7 days and represented as the ratio of the number of clones scored between untreated and treated conditions. Horizontal lines correspond to mean value ($n = 22$ for low CHK1 abundance cells and $n = 15$ for high CHK1 abundance cells). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test (5 and 10 nM Ara-C, $*P = 0.0242$ and $P = 0.0173$, respectively; 10 nM Ara-C and 250 nM SCH900776, $*P = 0.0398$). CFU-L, leukemic colony-forming units. (B to E) Analysis of the DNA replication fork progression by DNA spreading.



(B and D) Representative fibers from low and high abundance CHK1 AML cells collected after 7 days in clonogenic assays in the presence of Ara-C (5 nM), without Ara-C, or in the presence of Ara-C (5 nM) and SCH900776 (250 nM). (C and E) Quantitative analysis of iododeoxyuridine (IdU) track length under different treatment conditions. Thirty fibers per samples were analyzed ($n = 2$ for low CHK1 abundance cells and $n = 2$ for high CHK1 abundance cells). Statistical analysis was performed using unpaired t test with Welch's correction ($**P = 0.0018$, $****P < 0.0001$). N.S., not significant.

Fig. 6. Increased abundance of CHK1 favors leukemic clonogenicity. (A) The clonogenic properties were analyzed by scoring AML cell colonies from cells with high and low CHK1 abundance at day 7. Results are expressed as absolute number of colonies. Horizontal lines, mean value ($n = 22$ for low CHK1 abundance cells and $n = 15$ for high CHK1 abundance cells). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test ($*P = 0.0371$). (B and C) The histograms indicate the distribution of AML samples from low CHK1 abundance cells and high CHK1 abundance cells characterized for their ability to form small-, medium-, and large-sized clones after 7 days. Small-sized clones contained less than 9 cells, medium-sized clones contained between 9 and 20 cells, and large-sized clones contained more than 20 cells. Five patients were analyzed for the low CHK1 group, and 10 patients were analyzed for the high CHK1 group. Representative images of the clones of different sizes are shown in (C). (D to F) Analysis of CDK1 abundance in low and high CHK1 abundance cells. Immunoblotting of CDK1 is shown in (D), and quantitative analyses of *CDK1* mRNA transcript and CDK1 protein are shown in (E) and (F), respectively. Horizontal lines, mean value. Statistical analysis was performed using unpaired t test with Welch's correction ($*P = 0.0344$, $n = 18$; $**P = 0.0023$, $n = 31$).



AML, through high abundance of CHK1, could be a mechanism by which the cells adapt to DNA replication stress, such as the accumulation of stalled forks induced by cytarabine. The restart of these stabilized forks could be mutagenic. Cytarabine induces an increased mutation rate in relapsed AML patients (27). Together with recent findings that have demonstrated abnormal temporal control of DNA replication in several hematologic malignancies (13), our results also suggest that these changes in the replication program enable cell survival despite endogenous replication stress and, in AML, contribute to chromosomal instability and the aggressive progression of the pathology.

Finally, we provide evidence that a CHK1 inhibitor enhanced the inhibition of colony formation and fork progression by cytarabine in primary AML with high CHK1 abundance. The CHK1 inhibitor SCH900776 sensitized high CHK1 abundance group to cytarabine to the same level as that of the low CHK1 abundance group treated with cytarabine alone. These observations have potential important implications in view of current efforts to enhance the efficacy of cytarabine-containing AML regimens, especially for refractory patients. They will also give important keys for analyzing the results of the phase 2 clinical trial that is in progress for SCH900776 in AML (ClinicalTrials.gov/NCT01870596; <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01870596?term=CHK1&rank=2>) (28). Compared with the rest of the patient cohort, the average *CHEK1* expression was 3.6 times higher in patients with the *MLL* translocation, which is known to confer poor prognosis. Therefore, targeting CHK1 could be a strategy for treating AML with *MLL* translocation, especially because these tumors have an inherent deficiency in responding to DNA damage. Morgado-Palacin *et al.* (29) provide compelling preclinical analysis of this therapeutic strategy.

In conclusion, we propose that high levels of CHK1 protein favor not only proliferation of leukemic cells but also cell viability upon intensive chemotherapy through an efficient DNA replication stress response and that novel therapeutic strategies that aim at inhibiting CHK1 could extend our current cytarabine-based approaches, overcome active drug resistance pathways, and eventually improve the outcome of patients with AML. Thus, monitoring expression of this key gene could be used both as a strong predictor of outcome and as a marker to select AML patients for treatment with CHK1 inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Between 1 January 2000 and 31 December 2010, 513 consecutive patients (65 years of age or younger) with a new diagnosis of AML have been treated by intensive chemotherapy in our center. Diagnosis workup and treatment modalities have been described elsewhere (30, 31). The cytogenetic risk was established according to the Medical Research Council classification (32). The use of fresh and thawed samples (or derivative products, such as DNA and RNA) from 198 AML patients as well the analysis of CHK1 abundance from these samples have been performed after informed consent and stored at the HIMIP collection (BB-0033-00060). The characteristics and outcomes of the remaining 315 nontested patients as compared to the 198 tested patients are shown in table S1. According to the French law, HIMIP collections have been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1), and we obtained a transfer agreement (AC 2008-129) after approbation by the Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre-Mer II (ethical committee). Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés, that is, Data processing and Liberties National Committee), and these are supported by CAPTOR (Cancer Pharmacology of Toulouse-Oncopole and Region). This

study was approved by the institutional review board (Ethical Committee of Research).

Total RNA extraction and reverse transcription PCR

Total RNA was extracted from frozen cells (7 million to 15 million of cells) stored in 1 ml of TRI Reagent RNA/DNA/protein isolation reagent (Molecular Research Center). The extraction was done by adding 200 μ l of cold Ready-Red chloroform-isoamyl alcohol (MP Biomedicals) and vigorously shaking for 15 s using a vortex, and then the sample was incubated on ice for at least 5 min. After centrifugation at 13,000 rpm in a microfuge for 15 min at 4°C, the upper aqueous phase was transferred into a new vial. One volume of isopropanol was added, and the sample was vortexed and incubated for 1 hour at -20°C. After centrifugation at 13,000 rpm in a microfuge for 15 min at 4°C, the pellet was dried and 1 ml of cold 75% ethanol was added. After centrifugation at 8000 rpm in a microfuge for 10 min at 4°C, the pellet was dried and incubated for 4 min at 65°C. The pellet was resuspended in 30 μ l of ribonuclease (RNase)-free water with RiboLock RNase Inhibitor (40 U; Fermentas). RNA concentration was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Thermo Fisher Scientific). RNA quality and purity were assessed on the Agilent 2100 BioAnalyzer by using the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). Only RNAs presenting an RNA integrity number (RIN) of >6.5 were selected for expression analysis (~90% of the samples had a RIN of >8). Complementary DNA (cDNA) was generated from 1 μ g of RNA with the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) for reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) following the manufacturer's suggestions. To ensure a good quality reverse transcription step, one part of each cDNA was used to check *ABL1* (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems; Hs01104728_m1) expression using ABI Prism 7300 HT (Applied Biosystems).

Specific target amplification and quantitative PCR

The other part of each cDNA was diluted in water (5 ng/ μ l) and used for target amplification by BioMark Dynamic Arrays (Fluidigm). Inventoried TaqMan assays (Applied Biosystems) were pooled using 84 probes and primer pairs (72 DNA replication genes, 9 housekeeping genes, and *BAALC*, *ERG*, and *MNI*; the latter 3 are genes reported to negatively affect the outcome of CN-AML patients) (table S2) to a final concentration of 0.2 \times for each of the 84 assays. For *CHEK1*, the assay ID was Hs00967506_m1 and the reference of the DNA sequence was NM_001114121.2, localized at exons 6 and 7. To increase sensitivity, a multiplexed preamplification process was performed for the pool on every 1.25 μ l of cDNA using 14 cycles of cDNA preamplification step (at 95°C for 15 s and at 60°C 4 min) and TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) in a standard PCR thermocycler. Preamplified cDNA was diluted 1:5 in 10 mM tris, 1 mM EDTA. Diluted cDNA (2.25 μ l) was added to 2.5 μ l of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 0.25 μ l of GE Sample Loading Reagent (Fluidigm). In a separate tube, 3.5 μ l of TaqMan assay was added to 3.5 μ l of the GE Sample Loading Reagent. cDNA samples (5 μ l) were loaded onto the sample inlet wells, and assay samples (5 μ l) were loaded onto assay detector inlets. Because 198 samples were to be analyzed in duplicate, five 96.96 Dynamic Arrays (Fluidigm) were used. For each plate, one well was loaded with H₂O as a control for contamination. Genomic DNA (gDNA) from three different patients was loaded to check whether TaqMan assays can also amplify gDNA. To verify specific target amplification efficiency, a sample of control gDNA and assay control RNase P TaqMan probe was treated (Life Technologies, PN 4316844), preamplified, and quantified using the same TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems). The expected value of cycle quantitation was between 12 and 13. To perform interplate

calibration, a sample calibrator made of cDNA from patient #1 was included in duplicate in each plate. The chip was primed and placed into the NanoFlex Integrated fluidic circuit controller, where 8 nl of cDNA and 1 nl of Assay were mixed. Real-time PCR analysis was completed on the BioMark System (Fluidigm).

Data processing

Raw data obtained from the system's software, using the auto detector function to establish the threshold setting (BioMark Real-Time PCR Analysis v2.1.1, Fluidigm), were checked using the graphical representation of the plate layout. Among all reactions investigated, none were rejected due to bubbles or instable ROX (carboxy-X-rhodamine) signal. All amplification curves were displayed for each well of the calibrator sample. When the threshold for cycle did not meet quality criteria (that is, the threshold occurred in the linear phase of the amplification curve instead of the exponential phase), the threshold value was set manually. The threshold established for the first dynamic array was applied to the four other dynamic arrays. Wells with very high (>26), absent (999), or very low (<2) endogenous C_t were excluded.

Normalization method

We normalized the real-time quantitative PCR data with the data obtained with the housekeeping genes and performed the interplate calibration using the qbase+ algorithm as described (33). Among the nine housekeeping genes tested [*GUSB* (Hs99999908_m1), *ACTB* (Hs99999903_m1), *ABLI* (Hs01104728_m1), *G6PD* (Hs00166169_m1), *TBP* (Hs00427621_m1), *GAPDH* (Hs03929097_g1), *HMBS* (Hs00609293_g1), *B2M* (Hs00984230_m1), and *UBC* (Hs00824723_m1)], geNorm algorithm determined the four most stable, which were *GAPDH*, *GUSB*, *TBP*, and *ABLI*, and these were used to calculate the gene expression normalization factor. Expression values are given in $\Delta\Delta C_t$. *BAALC* (Hs00227249_m1), *ERG* (Hs01554635_m1), and *MNI* (Hs00159202_m1) genes were used to validate our cohort data.

Statistical analysis

We explored the association between the expression of 72 DNA replication genes of interest (table S3) and the different survival endpoints. Complete response required a normocellular bone marrow with >5% blasts and no Auer rods, a neutrophil count of $\geq 1 \times 10^9$ /liter, and a platelet count of $\geq 100 \times 10^9$ /liter, without evidence of extramedullary disease after one or two courses of treatment. Induction failures included deaths in aplasia and resistant disease. After applying a multiple testing correction by the Benjamini-Yekutieli method (for a global type I risk of 5%), a *P* value lower than 0.000136 was needed for statistical significance, and none of the 72 gene expressions was significantly associated with overall, event-free, or relapse-free survival. Because our sample size was limited to 198 in this study, HRs lower than 2.1 to 2.3 were not expected to be statistically significant with a power of 80%. As an alternative to *P* values for identifying the potentially most interesting genes, we performed an analysis of the dose-effect relationship between gene expression and survival, as suggested elsewhere (34). *CHEK1* expression appeared to be the most significantly associated with patient survival with a stable dose-effect relationship. Consequently, we focused the analysis on *CHEK1* expression only. We categorized gene expression in a binary variable "high expression" versus "low expression" from the median expression value. Clinical characteristics were compared according to the gene expression level using χ^2 tests. We estimated the overall, event-free, and relapse-free survival functions using the Kaplan-Meier method. The median follow-up among patients who were still alive at the date of last contact (*n* = 80) was 68.3 months (range, 29.0 to 132.0). High and low

CHEK1 expression groups were compared using log-rank tests. For multivariate analyses, we applied Cox proportional hazards models adjusted for sex, age, white blood cell count, year of diagnosis, and cytogenetic risk group. An internal validation procedure was computed to correct the expected overoptimism of Cox models for overall, event-free, and relapse-free survival. We applied the bootstrap cross-validation procedure described previously (35). We derived slope indices from 200 bootstrap samples and used them as shrinkage factors by multiplying slope indices with regression coefficients. Slope indices were computed using the "rms" package for R (Harrell FE [2009]: *rms: S Functions for Biostatistical/Epidemiologic Modeling, Testing, Estimation, Validation, Graphics, and Prediction*). We performed the competitive risk analysis following the approach recommended by Latouche *et al.* (36), using the Cox model (to calculate cause-specific HRs) and the Fine-Gray model (to calculate subdistribution HRs), and presenting the results for all causes side by side. All analyses were performed using Stata Statistical Software (release 11.2; Stata Corporation), except for the internal validation procedure that was achieved with R (v3.0.1) [R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2013); www.R-project.org/].

Western blot and immunofluorescence

Each sample from AML patient cells or the KG1a cell line (internal control loaded at two dilutions) was processed according to previously described Western blotting protocol (37). Briefly, before quantification, the linearity of the signal was checked for all the membranes. Then, quantification of chemiluminescent signals for CHK1 [G4 (Santa Cruz Biotechnology) against CHK1] and actin proteins for each membrane was done with the GeneTools from Syngene software (v1.4.0.0). Quantifications were performed from the ratio between CHK1 values in AML samples and the CHK1 value in the KG1a cell line, normalized by the actin values. AML patient cells are considered "high CHK1 abundance" if the average protein abundance value is 1.2-fold higher than the median.

For most of the patients (22 of 37), CHK1 protein status was confirmed by an immunofluorescence approach. Briefly, AML cells were seeded onto coverslips pretreated with 0.01% poly-L-lysine (Sigma) and processed as previously described (37, 38). CHK1 was detected with using a monoclonal antibody (C9358, Sigma). Secondary antibody labeled with Alexa 488 was purchased from Invitrogen. DNA was visualized using ProLong Gold antifade reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen). Images were acquired using a Zeiss Axio Observer microscope fitted with an AxioCam HRm Rev.3 camera and subsequently processed using the ImageJ or ZEN software packages.

Clonogenic assay

Primary cells from AML patients were thawed and adjusted to 1×10^5 cells/ml final concentration in H4230 methylcellulose medium (STEMCELL Technologies) supplemented with 10% 5637-CM as a stimulant (39) and Ara-C (5 and 10 nM) alone or in combination with the CHK1 inhibitor SCH900776 (250 nM). The cells were then plated in 35-mm petri dishes in duplicate and allowed to grow for 7 days in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C). At day 7, the leukemic colonies (more than five cells) were scored.

DNA fiber spreading

Exponentially growing AML cells were pulse-labeled with chlorodeoxyuridine (CldU) (20 μ M) for 20 min, washed twice, and incubated with IdU (200 μ M) for additional 20 min. Cells were lysed with 6 μ l of 0.5% SDS, 200 mM tris-HCl (pH 7.4), and 50 mM EDTA buffer onto clean glass slides, which were tilted to allow the DNA to unwind. Samples were fixed in 3:1

methanol/acetic acid and denatured with HCl (2.5 N) for 1 hour, blocked with phosphate-buffered saline (pH 7.4) with 5% bovine serum albumin for 15 min, and incubated with a mouse antibody recognizing bromodeoxyuridine (BrdU) (Becton Dickinson) to detect IdU, a donkey Cy3-conjugated secondary antibody against mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch), a rat antibody against BrdU (Accurate Chemicals) to detect CldU, and a donkey Alexa 488 secondary antibody (Invitrogen). Slides were mounted with Mowiol 4-88 (Calbiochem), and DNA fibers were visualized using a Zeiss Cell Observer microscope. Images were analyzed using Zeiss LSM Image Browser software and ImageJ software. Each data set is derived from measurement of 30 to 40 fibers.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/9/445/ra90/DC1

Fig. S1. Kaplan-Meier survivor functions according to *BAALC*, *ERG*, or *MN1* expression.

Fig. S2. Analysis of relapse and death.

Fig. S3. Overall survival, relapse-free survival, and relapse incidence according to *CHEK1* expression in allografted patients.

Fig. S4. Kaplan-Meier overall survivor functions according to *CHEK1* expression in the favorable-risk group.

Table S1. Clinical characteristics of the cohort.

Table S2. Overall survival according to *BAALC*, *ERG*, or *MN1* expression.

Table S3. List of the genes tested for the analysis.

Table S4. Quantification method to determine CHK1 abundance in patient samples.

REFERENCES AND NOTES

- Cancer Genome Atlas Research Network, Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2059–2074 (2013).
- Marcucci, T. Haferlach, H. Döhner, Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: Prognostic and therapeutic implications. *J. Clin. Oncol.* **29**, 475–486 (2011).
- A. Burnett, M. Wetzler, B. Löwenberg, Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **29**, 487–494 (2011).
- H. Döhner, E. H. Estey, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Büchner, A. K. Burnett, H. Dombret, P. Fenau, D. Grimwade, R. A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. A. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, B. Löwenberg, C. D. Bloomfield, Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**, 453–474 (2010).
- M. C. H. Hermkens, M. M. van den Heuvel-Eibrink, S. T. C. J. M. Arentsen-Peters, A. Baruchel, J. Stary, D. Reinhardt, M. Zimmerman, V. de Haas, R. Pieters, C. M. Zwaan, The clinical relevance of *BAALC* and *ERG* expression levels in pediatric AML. *Leukemia* **27**, 735–737 (2013).
- M. Heuser, G. Beutel, J. Krauter, K. Döhner, N. von Neuhoff, B. Schlegelberger, A. Ganser, High meningioma 1 (*MN1*) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood* **108**, 3898–3905 (2006).
- S. Santamaría, M. C. Chillón, R. García-Sanz, C. Pérez, M. D. Caballero, M. V. Mateos, F. Ramos, A. G. de Coca, J. M. Alonso, P. Giraldo, T. Bernal, J. A. Queizán, J. N. Rodríguez, N. Puig, A. Balanzategui, M. E. Sarasquete, M. Alcoceba, J. Díaz-Mediavilla, J. San Miguel, M. González, *BAALC* is an important predictor of refractoriness to chemotherapy and poor survival in intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML). *Ann. Hematol.* **89**, 453–458 (2010).
- C. Allera-Moreau, I. Rouquette, B. Lepage, N. Oumouhou, M. Walschaerts, E. Leconte, V. Schilling, K. Gordien, L. Brouchet, M. B. Delisle, J. Mazieres, J. S. Hoffmann, P. Pasero, C. Cazaux, DNA replication stress response involving *PLK1*, *CDC6*, *POLQ*, *RAD51* and *CLASPIN* upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients. *Oncogenesis* **1**, e30 (2012).
- J. Bartkova, Z. Hořejší, K. Koed, A. Krámer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldberg, M. Sehested, J. M. Nesland, C. Lukas, T. Ørntoft, J. Lukas, J. Bartek, DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864–870 (2005).
- V. G. Gorgoulis, 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, T. D. Halazonetis, Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907–913 (2005).
- F. Lemée, V. Bergoglio, A. Fernandez-Vidal, A. Machado-Silva, M.-J. Pillaire, A. Bieth, C. Gentil, L. Baker, A.-L. Martin, C. Leduc, E. Lam, E. Magdeleine, T. Filleron, N. Oumouhou, B. Kaina, M. Seki, F. Grimal, M. Lacroix-Triki, A. Thompson, H. Roché, J.-C. Bourdon, R. D. Wood, J.-S. Hoffmann, C. Cazaux, *DNA polymerase θ* up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 13390–13395 (2010).
- M.-J. Pillaire, J. Selves, K. Gordien, P.-A. Gourraud, C. Gentil, M. Danjoux, C. Do, V. Negre, A. Bieth, R. Guimbaud, D. Trouche, P. Pasero, M. Méchali, J.-S. Hoffmann, C. Cazaux, A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. *Oncogene* **29**, 876–887 (2010).
- T. Ryba, D. Battaglia, B. H. Chang, J. W. Shirley, Q. Buckley, B. D. Pope, M. Devidas, B. J. Druker, D. M. Gilbert, Abnormal developmental control of replication-timing domains in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Res.* **22**, 1833–1844 (2012).
- J. P. Patel, M. Gönen, M. E. Figueroa, H. Fernandez, Z. Sun, J. Racevskis, P. Van Vlierberghe, I. Dolgalev, S. Thomas, O. Aminova, K. Huberman, J. Cheng, A. Viale, N. D. Succi, A. Heguy, A. Chery, G. Vance, R. R. Higgins, R. P. Ketterling, R. E. Gallagher, M. Litzow, M. R. van den Brink, H. M. Lazarus, J. M. Rowe, S. Luger, A. Ferrando, E. Paietta, M. S. Tallman, A. Melnick, O. Abdel-Wahab, R. L. Levine, Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1079–1089 (2012).
- K. A. Cimprich, D. Cortez, ATR: An essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 616–627 (2008).
- C. S. Sørensen, R. G. Syljuasen, J. Falck, T. Schroeder, L. Rønnstrand, K. K. Khanna, B.-B. Zhou, J. Bartek, J. Lukas, Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **3**, 247–258 (2003).
- M.-J. Pillaire, R. Betous, C. Conti, J. Czaplinski, P. Pasero, A. Bensimon, C. Cazaux, J.-S. Hoffmann, Upregulation of error-prone DNA polymerases beta and kappa slows down fork progression without activating the replication checkpoint. *Cell Cycle* **6**, 471–477 (2007).
- D. Santamaría, C. Barrière, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J. F. Cáceres, P. Dubus, M. Malumbres, M. Barbacid, Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* **448**, 811–815 (2007).
- M. Shimada, H. Niida, D. H. Zinkeldein, H. Tagami, M. Tanaka, H. Saito, M. Nakanishi, Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* **132**, 221–232 (2008).
- M. Krajewska, R. S. N. Fehrmann, P. M. Schoonen, S. Labib, E. G. E. de Vries, L. Franke, M. A. T. M. van Vugt, ATR inhibition preferentially targets homologous recombination-deficient tumor cells. *Oncogene* **34**, 3474–3481 (2015).
- D. Grote, C. Moison, S. Duhamel, J. Chagraoui, S. Girard, J. Yang, N. Mayotte, Y. Coulombe, J.-Y. Masson, G. W. Brown, S. Meloche, G. Sauvageau, E4F1 is a master regulator of CHK1-mediated functions. *Cell Rep.* **11**, 210–219 (2015).
- G. Rodier, O. Kirsh, M. Baraibar, T. Houllès, M. Lacroix, H. Delpech, E. Hatchi, S. Arnould, D. Severac, E. Dubois, J. Caramel, E. Julien, B. Friguet, L. Le Cam, C. Sardet, The transcription factor E4F1 coordinates CHK1-dependent checkpoint and mitochondrial functions. *Cell Rep.* **11**, 220–233 (2015).
- Q. Liu, S. Guntuku, X.-S. Cui, S. Matsuo, D. Cortez, K. Tamai, G. Luo, S. Carattini-Rivera, F. DeMayo, A. Bradley, L. A. Donehower, S. J. Elledge, Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G₂/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* **14**, 1448–1459 (2000).
- M. A. González Besteiro, V. Gottifredi, The fork and the kinase: A DNA replication tale from a CHK1 perspective. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **763**, 168–180 (2015).
- A. J. López-Contreras, P. Gutierrez-Martinez, J. Specks, S. Rodrigo-Perez, O. Fernandez-Capetillo, An extra allele of Chk1 limits oncogene-induced replicative stress and promotes transformation. *J. Exp. Med.* **209**, 455–461 (2012).
- L. M. Sarmento, V. Póvoa, R. Nascimento, G. Real, I. Antunes, L. R. Martins, C. Moita, P. M. Alves, M. Abecasis, L. F. Moita, R. M. E. Parkhouse, J. P. P. Meijerink, J. T. Barata, CHK1 overexpression in T-cell acute lymphoblastic leukemia is essential for proliferation and survival by preventing excessive replication stress. *Oncogene* **34**, 2978–2790 (2014).
- S. E. Fordham, M. Cole, J. A. Irving, J. M. Allan, Cytarabine preferentially induces mutation at specific sequences in the genome which are identifiable in relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 491–494 (2015).
- J. E. Karp, B. M. Thomas, J. M. Greer, C. Sorge, S. D. Gore, K. W. Pratz, B. D. Smith, K. S. Flatten, K. Peterson, P. Schneider, K. Mackey, T. Freshwater, M. J. Levis, M. A. McDevitt, H. E. Carraway, D. E. Gladstone, M. M. Showel, S. Loechner, D. A. Parry, J. A. Horowitz, R. Isaacs, S. H. Kaufmann, Phase I and pharmacologic trial of cytosine arabinoside with the selective checkpoint 1 inhibitor Sch 900776 in refractory acute leukemias. *Clin. Cancer Res.* **18**, 6723–6731 (2012).
- I. Morgado-Palacin, A. Day, M. Murga, V. Lafarga, M. E. Anton, A. Tubbs, H. Chen, A. Ergon, R. Anderson, A. Bhandoola, K. G. Pike, B. Barlaam, E. Cadogan, X. Wang, A. J. Pierce, C. Hubbard, S. A. Armstrong, A. Nussenzweig, O. Fernandez-Capetillo, Targeting the kinase activities of ATR and ATM exhibits antitumoral activity in mouse models of *MLL*-rearranged AML. *Sci. Signal.* **9**, ra91 (2016).
- S. Bertoli, E. Bérard, F. Hugué, A. Huynh, S. Tavitián, F. Vergez, S. Dobbstein, N. Dastugue, V. Mansat-De Mas, E. Delabesse, E. Duchayne, C. Demur, A. Sarry, V. Lauwers-Cances, G. Laurent, M. Attal, C. Récher, Time from diagnosis to intensive chemotherapy initiation does not adversely impact the outcome of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 2618–2626 (2013).
- O. LaRochelle, S. Bertoli, F. Vergez, J.-E. Sarry, V. Mansat-De Mas, S. Dobbstein, N. Dastugue, A.-C. Strzelecki, C. Cavélier, L. Creancier, A. Pillon, A. Kruczynski, C. Demur, A. Sarry, F. Hugué, A. Huynh, C. Récher, E. Delabesse, Do AML patients with DNMT3A

- exon 23 mutations benefit from idarubicin as compared to daunorubicin? A single center experience. *Oncotarget* **2**, 850–861 (2011).
32. D. Grimwade, R. K. Hills, A. V. Moorman, H. Walker, S. Chatters, A. H. Goldstone, K. Wheatley, C. J. Harrison, A. K. Burnett, Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: Determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116**, 354–365 (2010).
 33. J. Hellemans, G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman, J. Vandesomepele, qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**, R19 (2007).
 34. D. A. Savitz, Reconciling theory and practice regarding *P* values. *Epidemiology* **24**, 781–782 (2013).
 35. F. E. Harrell Jr., K. L. Lee, D. B. Mark, Multivariable prognostic models: Issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat. Med.* **15**, 361–387 (1996).
 36. A. Latouche, A. Allignol, J. Beyersmann, M. Labopin, J. P. Fine, A competing risks analysis should report results on all cause-specific hazards and cumulative incidence functions. *J. Clin. Epidemiol.* **66**, 648–653 (2013).
 37. C. Cavelier, C. Didier, N. Prade, V. Mansat-De Mas, S. Manenti, C. Recher, C. Demur, B. Ducommun, Constitutive activation of the DNA damage signaling pathway in acute myeloid leukemia with complex karyotype: Potential importance for checkpoint targeting therapy. *Cancer Res.* **69**, 8652–8661 (2009).
 38. R. Boutros, V. Lobjois, B. Ducommun, CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. *Cancer Res.* **67**, 11557–11564 (2007).
 39. H. Quentmeier, M. Zaborski, H. G. Drexler, The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines. *Leuk. Res.* **21**, 343–350 (1997).

Acknowledgments: We gratefully acknowledge J.-J. Maoret and F. Martin for their technical contributions in the real-time PCR analysis on the BioMark System (Fluidigm). We thank C. Demur, V. De Mas (Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse), and S. Lagarde for accessing and managing the patient samples, and A. Sarry for patient data collection. We

thank all the clinicians of the Oncomp Network who referred their patients, all the nurses and other health care providers from the Hematology Department of the Toulouse University Hospital, and all the members of the GAEL (Gaël Adolescent Espoir Leucémie) association for their kind support to the patients. **Funding:** This work was supported by grants from La Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée 2013 to J.-S.H. and 2016 to S.M.), the Ligue Régionale Midi-Pyrénées 2014 (to S.M.), the Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer Labex TOUCAN grant (Integrative analysis of resistance in hematological cancers to J.-S.H. and S.M.), the Toulouse Cancer Santé Foundation (RESISTAML program to J.-E.S. and C.R.), the Canceropole Grand Sud-Ouest (projet Emergence 2012 to J.-S.H.), La Fondation de France (to A.F.-V.), and the "Plan Cancer 2014-2019" (to L.D.). **Author contributions:** A.F.-V., L.D., C.R., C.D., S.M., and J.-S.H. designed the experiments. A.F.-V., L.D., S.G., N.P., M.C., and C.L. performed the experiments. B.L. and D.D. performed the statistical analysis. A.F.-V., S.B., B.L., E.D., J.-E.S., S.M., C.C., C.R., and J.-S.H. analyzed the data and contributed to the manuscript preparation. C.R., C.D., S.M., and J.-S.H. supervised the project and wrote the manuscript. **Competing interests:** The authors declare the following patents that relate to this work: "New biomarkers for acute myeloid leukemia" (PCT/EP2015/053532, 19 February 2015 INSERM Transfert) (J.S.-H., C.C., A.F.-V., and C.R.) and "CHK1 and POLQ gene expression predicts AML patient survival" (EP14305231.4, 20 February 2014, INSERM Transfert) (J.S.-H., C.C., A.F.-V., and C.R.). **Data and materials availability:** Raw data of fluidigm analysis have been deposited in NCBI-Gene Expression Omnibus (GEO). Slope indices have been computed using the "rms" package for R (*S Functions for Biostatistical/Epidemiologic Modeling, Testing, Estimation, Validation, Graphics, and Prediction*; programs available from biostat.mc.vanderbilt.edu/rms).

Submitted 7 July 2015

Accepted 26 August 2016

Final Publication 13 September 2016

10.1126/scisignal.aac9704

Citation: L. David, A. Fernandez-Vidal, S. Bertoli, S. Grgurevic, B. Lepage, D. Deshaies, N. Prade, M. Cartel, C. Larrue, J.-E. Sarry, E. Delabesse, C. Cazaux, C. Didier, C. Récher, S. Manenti, J.-S. Hoffmann, CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML. *Sci. Signal.* **9**, ra90 (2016).

CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML

Laure David, Anne Fernandez-Vidal, Sarah Bertoli, Srdana Grgurevic, Benoît Lepage, Dominique Deshaies, Naïs Prade, Maëlle Cartel, Clément Larrue, Jean-Emmanuel Sarry, Eric Delabesse, Christophe Cazaux, Christine Didier, Christian Récher, Stéphane Manenti and Jean-Sébastien Hoffmann (September 13, 2016)
Science Signaling **9** (445), ra90. [doi: 10.1126/scisignal.aac9704]

The following resources related to this article are available online at <http://stke.sciencemag.org>.
This information is current as of September 26, 2016.

- Article Tools** Visit the online version of this article to access the personalization and article tools:
<http://stke.sciencemag.org/content/9/445/ra90>
- Supplemental Materials** "*Supplementary Materials*"
<http://stke.sciencemag.org/content/suppl/2016/09/09/9.445.ra90.DC1>
- Related Content** The editors suggest related resources on *Science's* sites:
<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/9/445/ra91.full>
<http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/6/268/rs6.full>
<http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/6/229/229ra42.full>
- References** This article cites 39 articles, 14 of which you can access for free at:
<http://stke.sciencemag.org/content/9/445/ra90#BIBL>
- Permissions** Obtain information about reproducing this article:
<http://www.sciencemag.org/about/permissions.dtl>

RESUME

Le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes qui conduisent une cellule mère à se diviser en deux cellules filles. La protéine Checkpoint kinase 1 (Chk1) est importante pour sa progression. Nous avons d'une part cherché à savoir si Chk1 intervenait lors des mécanismes de production des plaquettes, car ces cellules permettant la coagulation du sang sont issues d'un cycle cellulaire particulier. Par ailleurs, nous avons étudié le rôle de Chk1 dans la Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM), cancer des cellules sanguines. Les patients atteints de LAM sont traités par une chimiothérapie visant à endommager l'ADN afin d'entraîner la mort des cellules cancéreuses. Chk1 est garante du contrôle de la réparation des dommages de l'ADN, ce qui contrecarre l'effet de la chimiothérapie. Elle pourrait donc favoriser l'apparition de résistance. Son rôle dans les LAM étant peu connu, l'objectif de ce projet est donc de vérifier si Chk1 favorise la résistance des cellules leucémiques aux chimiothérapies.

MOTS CLEFS : cycle cellulaire, checkpoint kinase 1, différenciation mégacaryocytaire, polyploïdisation, leucémie aiguë myéloïde, stress réplicatif, progression tumorale.

SUMMARY

The cell cycle is a series of events that takes place in a mother cell, leading to its division into two daughter cells. The protein Checkpoint kinase 1 (Chk1) is mandatory for its coordinated progression. In this PhD projet, we wondered on the one hand whether Chk1 could be involved in the platelets production process, because these componants of blood that enables coagulation are produced due to a particular cell cycle dedicated to this end. On the other hand, we studied the role of Chk1 in Acute Myeloid Leukemia (LAM) physiopathology. LAM is a cancer of blood cells, in which patients are treated with drugs that create DNA damages, causing the death of tumoral cells. The role of Chk1 in the drug response in LAM is not well studied, but, as it enables DNA repair, it may render theses medicines less efficient, leading to relapses to therapies. So the goal of this project is to check wether Chk1 favors the resistance of some LAM cells to chemotherapeutic treatments.

KEYWORDS : cell cycle, checkpoint kinase 1, megakaryocyte differentiation, polyploisization, acute myeloid leukemia, replicative stress, tumor progression.