HAL
open science

Adaptation à la signalisation induite par la dysfonction et le raccourcissement des télomères chez Saccharomyces cerevisiae

Héloïse Coutelier

To cite this version:

Héloïse Coutelier. Adaptation à la signalisation induite par la dysfonction et le raccourcissement des télomères chez Saccharomyces cerevisiae. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLET046 . tel-03016380

HAL Id: tel-03016380

https://theses.hal.science/tel-03016380

Submitted on 20 Nov 2020

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.

PSL UNIVERSITÉ PARIS

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Institut de Biologie Physico-Chimique

Adaptation à la signalisation induite par la dysfonction et le raccourcissement des télomères chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Soutenue par
Héloïse COUTELIER
Le 25 novembre 2019

Ecole doctorale n° 515
Complexité du vivant

Spécialité
Biologie Cellulaire

Composition du jury :

Valérie, BORDE DR, Institut Curie - CNRS	Présidente
Damien, D'AMOURS Pr, Université d'Ottawa	*Rapporteur*
Lionel, PINTARD DR, CNRS, Institut Jaques Monod - CNRS	*Rapporteur*
Karine, DUBRANA DR, CEA - Institut de Biologie François Jacob	Examinatrice
Zhou, XU CR, Institut de Biologie Paris Seine	*Examinateur*
Maria Teresa, TEIXEIRA DR, IBPC - CNRS	*Directrice de thèse*

IBPC

Adaptation à la signalisation induite par la dysfonction et le raccourcissement des télomères chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Soutenue par

Héloïse COUTELIER

Le 25 novembre 2019

Composition du jury :

Valérie, BORDE DR, Institut Curie - CNRS	Présidente
Damien, D'AMOURS Pr, Université d'Ottawa	*Rapporteur*
Lionel, PINTARD DR, CNRS, Institut Jaques Monod - CNRS	*Rapporteur*
Karine, DUBRANA DR, CEA - Institut de Biologie François Jacob	Examinatrice
Zhou, XU CR, Institut de Biologie Paris Seine	*Examinateur*
Maria Teresa, TEIXEIRA DR, IBPC - CNRS	*Directrice de thèse*

REMERCIEMENTS

On dit souvent qu'il faut un village pour élever un enfant, je crois que l'on peut aisément en dire de même d'un projet de thèse. Je souhaite donc remercier l'ensemble des personnes qui m'ont accompagnée pendant cette thèse.

Je souhaite d'abord remercier Damien D'amours et Lionel Pintard d'avoir accepté de participer à l'aboutissement de ce projet en étant rapporteur de la thèse et membres du jury. Merci Damien de faire le déplacement depuis le Canada mais aussi pour l'ensemble des discussions et contributions apportées pendant ces 3 ans à essayer de comprendre Cdc5. Je remercie ensuite Valérie Borde et Karine Dubrana d'avoir accepté le rôle d'examinatrices et membres du jury. Merci Karine d'avoir accepté ce rôle supplémentaire après avoir suivi le projet lors des comités de suivi de thèse.

Je remercie Martial Marbouty et Stephan Eberhard pour leur participation et conseils lors des comités de suivi de thèse.

Un grand merci à Teresa Teixeira et Zhou Xu de m'avoir embarquée et encadrée dans ce projet passionnant dès le stage de M2 et pendant les 3 ans de thèse.

Merci Teresa de m'avoir fait confiance et de m'avoir toujours poussée pour que je donne le meilleur de moi-même et de m'avoir permis de réaliser ce projet dans les meilleures conditions.

Merci Zhou de m'avoir prise sous ton aile, de m'avoir supportée et laissé de la liberté par rapport au projet et pour nos discussions captivantes qu'elles soient scientifiques ou sur un tout autre sujet. Et pour les tonnes de noix de cajou bien sûr !

Je garderai un excellent souvenir de ces 3 ans de thèse !

Je souhaite ensuite remercier plus particulièrement les membres de mon équipe Pascale, Aurélia, Erin, Rachel, Stefano et les anciens, Pierre-François et Mohcen et les stagiaires de passage.

Merci Pascale et Aurélia de m'avoir soutenue et d'avoir toujours été là pour m'écouter me plaindre, maintenir ma santé mentale à un niveau convenable et ne pas être exaspérées par ma maladresse et mes passades sans cerveau. Pascale, sous ton influence je suis sure d'avoir mangé bien plus de chocolat en 3 ans de thèse que pendant le reste de ma vie. Aurélia j'espère qu'on continuera de partager nos découvertes Netflix.

Thank you so much Erin for our endless conversations of crazy cat persons and for always being there when I am dancing/being silly in the lab. I hope that you will perpetuate our victory dance wherever you are!

Je souhaite bien sûr remercier l'ensemble des membres du LBMCE et de l'IBPC qui ont pu croiser ma route pour avoir participé au bon déroulement de cette thèse.

Merci Cynthia d'avoir toujours été là et d'avoir été ma partner in crime. J'ai arrêté de compter les litres de coca et le nombre de sushis qu'on a pu partager. Et n'oublie pas que « Sometimes pop song don't really rhyyyyyme », BGB, I say goodbye!

Merci Sébastien pour ton soutien permanent et de m'avoir accompagnée dans mes tentatives de compenser les kilos de burger et de frites et de gouters ingurgités en allant courir ou nager. Mais grâce à ça, nous sommes devenus les experts de la junk food autour de l'institut et c'est quand même pas rien !

Merci Marion m'avoir suivie dans mes envies de voyage à la dernière minute. Même si on a failli être ensevelies sous deux mètres de neige en Islande et qu'on a dû se baigner dans de l'eau à 17°C à Zakynthos, j'en garde des souvenirs géniaux.

Merci Justin, Nathalie, Dhenesh, Maxence, Sandrine, Benjamin et Suzanne pour les soirées mémorables.

Merci aussi au LCQB pour l'accueil chaleureux et les encouragements pendant l'écriture de la thèse.

Enfin je veux particulièrement remercier ma famille (et mon chat Gnocchi ^^) qui me soutient depuis toujours et qui a toujours cru en moi.

Merci mes « sistah », Elsa et Lulu, d'être toujours là pour moi, pour vos encouragements et d'alimenter en permanence notre groupe Whatsapp de bêtises les plus saugrenues les unes que les autres et de me faire rire pendant que j'écris cette thèse !

Merci Mamie pour toutes les petites attention donc tu sais toujours faire preuve. Merci d'avoir envoyé sur Paris, tous les ans sans exception, un petit cochon en pain d'épices de la Sainte Catherine de Vesoul. Le petit cochon de cette année sera encore plus mémorable quand je le mangerai le jour de la soutenance !

Enfin, merci à mes parents. Dad et Mam's je ne pourrai jamais assez vous remercier de m'avoir portée jusque là, quelle idée de m'avoir fait aimer l'école, c'est devenu interminable ! Merci de votre soutien permanent même quand vous n'aviez aucune idée de ce dont je parlais, ça fait 3 ans que vous me demandez quand est ma soutenance, ça y est, c'est arrivé !

Je profite de cette partie pour remercier l'association Planète Urgence de m'avoir permis de compenser un peu mon empreinte carbone et les nombreuses impressions sur papier pendant la thèse en plantant des arbres pour moi.

PLANETE URGENCE
VOLONTARIAT & DEVELOPPEMENT
| GROUPE SOS |

CERTIFICAT DE PLANTATION

L'association Planète Urgence certifie qu'en 2019

HELOÏSE COUTELIER

a permis la plantation de 15 arbres grâce à son don.

PLANÈTE URGENCE
NOUS VOUS AIDONS À AGIR
Mumeo M
47 Avenue Pasteur
93100 Montreuil
France
+33 (0)1 43 46 42 02 - www.planete-urgence.org

RESUME

En réponse à un dommage de l'ADN, les cellules eucaryotes activent un checkpoint qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire afin de permettre la réparation et préserver la stabilité génomique. Si le dommage n'est pas réparé, les cellules peuvent éviter la mort cellulaire et reprendre leur division grâce à un processus appelé l'adaptation au checkpoint. Ce mécanisme offre l'opportunité de survie en permettant au dommage d'être réparé au cycle cellulaire suivant et/ou en tolérant la présence d'un dommage non létal. La stabilité génomique est aussi maintenue grâce aux télomères, les séquences répétées aux extrémités des chromosomes. Cependant, les télomères raccourcissent progressivement à chaque réplication et enclenchent une réponse similaire à celle des dommages de l'ADN. Ce phénomène appelé sénescence réplicative est accompagné d'une augmentation de l'instabilité génomique.

J'ai montré que l'adaptation est une réponse cellulaire à la signalisation des télomères courts et contribue à l'augmentation de l'instabilité génomique en sénescence réplicative. J'ai également caractérisé certaines bases moléculaires de l'adaptation impliquant la polo kinase Cdc5 en réponse au dysfonctionnement télomérique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les cellules cancéreuses échappent toujours à la sénescence et l'adaptation, chez l'Homme, pourrait contribuer à la transformation cancéreuse et l'acquisition de la résistance aux chimiothérapies. L'étude de ces processus permet une meilleure compréhension de ces phénomènes.

Mots clés : Sénescence réplicative, télomère, adaptation, instabilité génomique, levure, microfluidique.

SUMMARY

Upon DNA damage, eukaryotic cells activate a dedicated checkpoint that arrests the cell cycle to give time for repair and preserve genomic stability. If the damage is not repaired, cells can avoid death and resume their division by bypassing the checkpoint activation thanks to a process named checkpoint adaptation. This process is thought to provide the cell with an opportunity to survive by allowing repair to occur in the next cell cycle and/or by tolerating non-lethal damage. Genomic stability is also maintained thanks to telomeres, repeated sequences at the end of chromosomes. However they shorten at each round of replication and trigger a checkpoint response similar to the DNA damage pathway. This phenomenon named replicative senescence is associated with a specific increase of genomic instability.

I showed that adaptation is a response to critically short telomeres and contributes to the increase of genomic instability in replicative senescence. I also characterized some of the molecular basis of adaptation and the role of the polo kinase Cdc5 upon telomeric dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. Cancer cells always escape from senescence and adaptation, in human cells, might contribute to cancer cell transformation and to acquire chemotherapy resistance. Study these processes allow a better understanding of the mechanism of these phenomena.

Keywords: replicative senescence, telomere, adaptation, genomic instability, yeast, microfluidics.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 2

RESUME 5

SUMMARY 6

TABLE DES MATIERES 7

LISTE DES ABREVIATIONS 11

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 13

Liste des figures 13

Liste des tableaux 14

INTRODUCTION 15

I. LES DOMMAGES DE L'ADN 16

A. LES DIFFERENTES SOURCES ET TYPES DE DOMMAGE DE L'ADN 17

1. Les dommages de source endogène 17

2. Les dommages de source exogène 18

3. La réparation des dommages de l'ADN 20

B. LE CHECKPOINT DES DOMMAGES DE L'ADN 21

1. Le signal et reconnaissance de la cassure double brin 22

2. L'activation des kinases effectrices du checkpoint 23

3. L'arrêt du cycle cellulaire induit par l'activation du checkpoint des dommages de l'ADN 25

II. LES VOIES DE REPARATION DES CASSURES DOUBLE BRINS 28

A. RECOMBINAISON HOMOLOGUE 29

1. Conversion génique 29

2. Réplication induite par une coupure (Break Induced Replication, BIR) 30

3. L'hybridation de simple brin : SSA (Single Strand Annealing) 31

B. NON HOMOLOGOUS END JOINING 32

1. La voie canonique du NHEJ 32

2. La voie alternative MMEJ 33

III. LA REPRISE DU CYCLE CELLULAIRE 34

A. RECOVERY 34

B. L'ADAPTATION AU CHECKPOINT DES DOMMAGES DE L'ADN 35

1. Les mutants d'adaptation 37

2. Les conséquences de l'adaptation 39

3. L'adaptation chez les autres organismes 40
IV. LES POLO KINASES 41
A. STRUCTURE ET FONCTIONS DES POLO KINASES 42
B. REGULATION DES PLK 44
C. LA POLO KINASE DE *S. CEREVISIAE* : CDC5 44
1. Régulation de Cdc5 au cours du cycle 45
2. Fonctions de Cdc5 en mitose 46
a) Entrée en mitose 46
b) Maintenance de la forme du noyau 47
c) Le clivage de l'anneau de cohésine 48
d) Sortie de mitose 49
La voie FEAR 49
La voie du MEN 50
e) Cytokinèse 51
3. Régulation et fonctions de Cdc5 en réponse aux dommages de l'ADN 53
a) Méthodes d'induction d'un dommage persistant pour étudier l'adaptation 54
b) Fonctions de Cdc5 nécessaires à l'adaptation 54
4. Une autre fonction de Cdc5 : en méiose. 56
V. LES TELOMERES ET LA SENESCENCE 56
A. LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE 56
B. LES PROTEINES ASSOCIEES AUX TELOMERES 58
C. LA REPLICATION DES TELOMERES 61
D. L'ELONGATION DES TELOMERES PAR LA TELOMERASE 62
1. Les sous-unités de la télomérase 62
2. Le recrutement de la télomérase 62
E. LA SENESCENCE REPLICATIVE 63
1. L'activation du checkpoint en sénescence réplicative 65
2. La dynamique de sénescence 66
3. Mécanismes d'échappement à la sénescence 68
4. L'instabilité génomique en sénescence 69
VI. PROBLEMATIQUE DE LA THESE 70

RESULTATS 72

I. L'ADAPTATION AU CHECKPOINT EN ABSENCE DE TELOMERASE 73
A. RESUME DES RESULTATS DE L'ARTICLE COUTELIER, XU *ET AL*, 2018. 73
Article n°1 Coutelier *et al.*, 2018 77
B. CONTRIBUTION A LA PUBLICATION COUTELIER, XU *ET AL*, 2018 104
C. RESULTATS COMPLEMENTAIRES A CETTE ETUDE 105

1. Matériel et méthodes 105
a) Test de croissance en gouttes 105
b) PCR d'amplification des jonctions VI-R/Y′ 106
2. Résultats 106
a) La voie de réparation BIR est impliquée dans l'augmentation d'instabilité génomique en sénescence réplicative 106
b) Cdc5 joue-t-elle un rôle dans les voies de recombinaison ? 108
D. CONCLUSION 111
Article n°2 Coutelier and Xu *et al.*, 2019 113
II. ETUDE DE LA FONCTION ET REGULATION DE CDC5 EN REPONSE A UN DOMMAGE TELOMERIQUE 120
A. MATERIEL ET METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE DE CDC5 121
1. Méthodes de microbiologie 121
2. Test de formation de microcolonies 122
3. Microscopie 122
4. Etude de l'adaptation en cellules uniques 123
5. Techniques utilisées pour l'étude des modifications post-traductionnelles 124
a) Western blot 124
b) Traitement phosphatase 125
c) Immunoprécipitation 125
d) Gel, coloration au nitrate d'argent et spectrométrie de masse 126
B. RESULTATS 127
1. Localisation de Cdc5 en réponse à un dommage 127
2. Etude de Cdc5 et des modifications post-traductionnelles 134
3. Etude de la régulation transcriptionnelle de Cdc5 136

DISCUSSION 141

I. L'ADAPTATION CONTRIBUE A L'AUGMENTATION DE L'INSTABILITE GENOMIQUE EN ABSENCE DE TELOMERASE. 141
A. LA DYNAMIQUE DE SENESCENCE 141
B. L'ADAPTATION EST UNE REPONSE A L'ACTIVATION DU CHECKPOINT EN ABSENCE DE TELOMERASE 143
C. LES CONSEQUENCES DES EVENEMENTS D'ADAPTATION EN ABSENCE DE TELOMERASE 144
D. LA REPARATION PAR LA VOIE BIR ET L'ADAPTATION SEMBLENT ETRE LIEES EN ABSENCE DE TELOMERASE 146
II. L'ADAPTATION EN REPONSE AUX TELOMERES DYSFONCTIONNELS. 147
A. LE ROLE DE CDC5 AUX SPB EN ADAPTATION ? 148
B. LA FONCTION DE CDC5 EN SORTIE DE MITOSE EST NECESSAIRE MAIS PAS SUFFISANTE A L'ADAPTATION 149

C. L'EXPRESSION ET LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE CDC5 EN REPONSE A UN DOMMAGE TELOMERIQUE 150
D. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE CDC5 EN REPONSE A UN DOMMAGE TELOMERIQUE 151
E. CDC5 EST REGULEE A PLUSIEURS NIVEAUX AFIN DE PROMOUVOIR L'ADAPTATION 152

CONCLUSION 154

BIBLIOGRAPHIE 156

ANNEXES 183

I. COUVERTURE DU NUMERO DE *GENES AND DEVELOPMENT* DE DECEMBRE 2018 COUTELIER *ET AL*, 2018 183
II. COMPLEMENTATION HETEROALLELIQUE DES MUTANTS DE CDC5 184

LISTE DES ABREVIATIONS

4-NQO= 4-NitroQuinoline 1-Oxide

9-1-1 = Rad17-Mec3-Ddc1

Adaptation = Adaptation au checkpoint des dommages de l'ADN

ADN = Acide DésoxyriboNucléique

APC = Anaphase Promoting Complex

ARN = Acide RiboNucléique

BER = Base Excision Repair (Réparation par excision de base)

BIR = Break Induced Replication (Réplication induite par cassure)

CAR = Contractile Actin Ring (Anneau contractile d'actine)

Checkpoint = Checkpoint des dommages de l'ADN

DB = Destruction Box (Boîte de destruction)

DDR = DNA Damage Response (Réponse aux dommages de l'ADN)

dHJ = double Holliday Junction (double jonction de Holliday)

D-loop = Displacement loop (boucle étendue)

DO = Densité Optique

FEAR = Cdc Fourteen Early Anaphase Release (Relargage de Cdc14 en début d'anaphase)

FHA = ForkHead Associated domain (Domaine associé à un motif « forkhead »)

GAP = GTPase Activating Protein (Protéine activatrice de GTPase)

GEF = Guanine Exchange Factor (Facteur d'échange de guanine)

IP = ImmunoPrécipitation

kb = kilobase

KEN = K-lysine E-glutamate N-asparagine

NLS = Nuclear Localisation Signal (Signal de localisation nucléaire)

MEN = Mitotic Exit Network (Réseau de sortie de mitose)

MMEJ = Microhomology Mediated End Joining Jonction (Jonction des extrémités médiée par microhomologie)

MMR = MisMatch Repair (Réparation des mésappariements)

MMS = Methyl Methan Sulfonate (Méthane sulfonate de méthyle)

MRX = Mre11-Rad50-Xrs2

NER = Nucleotide Excision Repair (Réparation par excision de nucléotide)

NHEJ = Non Homologous End Joining (Jonction des extrémités non homologues)

pb = paire de base

PCR = Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérase en chaîne)

PIKK = PhosphatidylInositol 3-Kinase like Kinases

PLK = Polo Like Kinase

RH = Recombinaison Homologue

RI = rayons ionisants

ROS = Reactive Oxygen Species (Espèce réactives de l'oxygène)

RPA = Replication Protein A

RSC = Remodeling the Structure of Chromatin (Remodeler la structure de la chromatine)

SAC = Spindle Assembly Checkpoint (Checkpoint de l'assemblage du fuseau mitotique)

SAM = S-AdénosylMéthionine

SDSA = Synthesis-Dependant Strand Annealing (Synthèse dépendante de l'hybridation du brin)

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SPB = Spindle Pole Bodies

SPOC = Spindle Pole Orientation Checkpoint (Checkpoint de l'orientation du fuseau mitotique)

SSA = Single Strand Annealing (Hybrydation de simple brin)

UV = Ultra-Violet

YPD = Yeast extract Peptone Dextrose (Extrait de levure, peptone, dextrose)

Anglicismes employés dans la thèse par manque de traduction appropriée en français :

Ligation	Budneck
Checkpoint	Délétion/délété
Recovery	Résection/résecté

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures

Figure 1 : Réprésentation de plusieurs types de dommages possibles en fonction de la source de stress et les voies possibles de réparation…….. **19**
Figure 2 : Voie de signalisation du checkpoint des dommages de l'ADN…….. **27**
Figure 3 : Réparation par recombinaison homologue et issues possible à la réparation…….. **31**
Figure 4 : La voie de réparation par jonction des extrémités non-homologues, NHEJ…… **32**
Figure 5 : Alignement de la séquence de la boucle d'activation, T-loop, des polo inases de différents organismes (d'après Rawal et al. 2016)……. **42**
Figure 6 : Rôle de Cdc5 dans l'entrée en mitose (d'après Botchkarev and Haber, 2018)…… **47**
Figure 7 : Régulation du clivage de l'anneau de cohésine (d'après Botchkarev and Haber, 2018)…….. **49**
Figure 8 : Rôle de Cdc5 dans la régulation du FEAR et du MEN (d'après Botchkarev and Haber, 2018)…….. **51**
Figure 9 : Rôle de Cdc5 dans la régulation de la cytokinèse (d'après Botchkarev and Haber, 2018)…….. **52**
Figure 10 : Schéma récapitulatif des fonctions et localisations de Cdc5 au cours du cycle cellulaire…… **53**
Figure 11 : Structure du télomère et protéines télomériques…… **60**
Figure 12 : Le raccourcissement progressif des télomères induit la sénescence réplicative… **64**
Figure 13 : La dynamique de sénescence……. **68**
Figure 14 : Hypothèse de travail sur laquelle s'est appuyé ce projet de thèse……. **70**
Figure 15 : Système de microfluidique adapté à l'étude de la sénescence réplicative (d'après Xu et al 2015)…….. **74**
Figure 16 : La délétion de *POL32* diminue significativement le taux de mutation en sénescence réplicative…… **108**
Figure 17 : Cdc5-ad favorise légèrement la recombinaison homologue aux extrémités en absence de télomérase……... **110**
Figure 18 : Test de formation de microcolonies en réponse à un dommage télomériques persistant…… **122**
Figure 19 : Système de microfluidique CellASIC utilisé pour étudier les évènements d'adaptation…… **124**
Figure 20 : Analyse par microfluidique d'évènements d'adaptation en cellules uniques…… **128**
Figure 21 : Cdc5-ad-eGFP ne maintient pas sa localisation au SPB après 9h d'arrêt et la fusion à eGFP abolie le défaut d'adaptation de Cdc5-ad…….. **130**
Figure 22 : Cibler Cdc5-ad aux SPB sauve partiellement son défaut d'adaptation……. **131**
Figure 23 : *bfa1Δ* sauve partiellement le phénotype de *cdc5-ad*…… **133**
Figure 24 : Cdc5-ad est hyper-phosphorylée en comparaison à Cdc5 en réponse à un dommage télomérique…… **135**
Figure 25 : Régulation transcriptionnelle de Cdc5 par le complexe Mcm1-Fkh2-Ndd1 en réponse à un dommage télomérique…….. **140**

Liste des tableaux

Tableau 1 : Protéines impliquées dans le checkpoint chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *H. Sapiens*……... **28**
Tableau 2 : Liste des souches utilisées pour les résultats complémentaires……. **105**
Tableau 3 : Liste des souches utilisées pour l'étude de Cdc5 en réponse à un dommage télomérique. ……... **121**
Tableau 4 : Anticorps utilisés au cours de la thèse. ……. **125**

INTRODUCTION

La cellule est l'unité de construction du vivant. Que la cellule soit la brique d'un organisme multicellulaire ou qu'elle soit indépendante et constitue un organisme unicellulaire, elle fonctionne grâce à un ensemble de processus complexes et soumis à de nombreuses régulations en fonction de son environnement, de la phase dans laquelle elle se trouve, etc. Le fonctionnement de la cellule est déterminé par l'information génétique contenue dans le noyau chez les eucaryotes. Toutes ces informations sont codées dans des molécules d'ADN qui forment les chromosomes. Il est important pour la cellule de préserver l'intégrité de l'information génétique pour assurer le bon fonctionnement de la cellule et la transmission fidèle du génome aux futures générations de cellules. Pour cela, les chromosomes sont protégés par différents systèmes.

Les cellules sont exposées à différentes sources de stress qui peuvent impacter l'intégrité du génome. En effet, certains phénomènes environnementaux mais aussi des processus internes à la cellule peuvent agir directement sur l'ADN. Afin de contrer les dommages variés qui peuvent être engendrés, les cellules possèdent un système de contrôle appelé « checkpoint du dommage de l'ADN » et qui permet aux différentes voies de réparation d'agir pour préserver l'information génétique. Le checkpoint arrête la progression du cycle cellulaire afin de permettre aux machineries de réparation d'intervenir au niveau du dommage reconnu. Cependant, dans certains cas, la réparation n'est pas fructueuse et le dommage persiste. Un phénomène appelé « adaptation aux checkpoint des dommages de l'ADN » peut alors se produire (que j'abrégerai par « adaptation » dans le manuscrit). Dans ce cas, le cycle cellulaire se poursuit malgré la persistance du dommage. L'adaptation n'est pas sans conséquence puisqu'elle permet la transmission d'une molécule d'ADN compromise ce qui contribue à l'instabilité génomique de la cellule.

En amont des systèmes de réparation, l'intégrité de l'information génétique est protégée par différents moyens. Par exemple, les télomères, qui se trouvent à l'extrémité des chromosomes, protègent le chromosome en évitant la perte de séquence essentielle d'ADN, car à chaque division cellulaire les extrémités des chromosomes raccourcissent. Les télomères sont préservés grâce à une transcriptase inverse appelée la télomérase. Elle est absente dans la plupart des cellules somatiques chez l'homme, les séquences télomériques raccourcissent alors jusqu'à atteindre une taille critique qui va activer une réponse similaire au checkpoint des dommages de l'ADN et induire un arrêt du cycle cellulaire similaire qu'on appelle sénescence réplicative. La sénescence réplicative est associée à l'augmentation de

d'instabilité génomique. Mais la ou les causes de l'apparition de l'instabilité sont mal caractérisées.

Au cours de ce projet de thèse, je me suis intéressée à l'augmentation de l'instabilité génomique en sénescence et en particulier à la contribution de l'adaptation à cette augmentation.

Dans l'introduction qui va suivre, je vais vous présenter, dans un premier temps, les mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN : leur reconnaissance, la transmission du signal et le traitement de ces dommages. Pour cela je vous présenterai la voie de signalisation du checkpoint des dommages de l'ADN qui permettent son activation complète puis les voies de réparation.

Dans un second temps, je présenterai les mécanismes de reprise du cycle cellulaire en cas de réparation ou au contraire, en cas de persistance du dommage et d'adaptation. Comme le mécanisme moléculaire de l'adaptation est mal caractérisé. Je vais vous présenter les fonctions de la polo kinase Cdc5 afin d'exposer les possibilités d'action de Cdc5 pour favoriser l'adaptation.

Enfin je vous présenterai la fonction des télomères et le phénomène de sénescence réplicative en absence de télomérase.

I. Les dommages de l'ADN

L'ADN contient l'information génétique d'une cellule pour coder les ARN, produire les protéines et maintenir la fonctionnalité de la cellule. La préservation de l'information génétique est donc particulièrement critique pour la cellule et sa descendance. Bien que les mutations soient essentielles à l'évolution, elles contribuent aussi à l'apparition de certaines maladies, comme le cancer. L'ADN est sujet à un certain nombre de modifications chimiques par des agents exogènes ou endogènes. De plus, les polymérases de l'ADN qui interviennent en réplication ou lors de la réparation font aussi des erreurs conduisant à de possibles mutations. Afin de gérer ces lésions et de limiter leurs conséquences, la cellule est équipée de différents systèmes comme les machineries de réparation, les voies de tolérance à un dommage, les checkpoints et les voies de mort cellulaire.

A. Les différentes sources et types de dommage de l'ADN

Les dommages de l'ADN sont classés en deux groupes, d'origine exogène ou endogène (Chatterjee et Walker 2017). Les sources exogènes proviennent de l'environnement, ou d'agents physiques ou chimiques comme les rayons ultra-violets (UV), les radiations ionisantes (RI), des agents alkylants ou agents favorisant les liaisons covalentes inter- et intra-brin. Les dommages endogènes apparaissent la plupart du temps quand une molécule d'ADN est impliquée dans une réaction chimique, avec H_2O ou les espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) par exemple. Ces multiples sources vont engendrer des dommages différents qui sont ensuite substrats de voies de réparation distinctes.

Je vais faire une description, non exhaustive, de ces différents dommages (Figure 1).

1. Les dommages de source endogène

Avant chaque division cellulaire, l'ensemble du génome doit être répliqué afin d'être divisé en deux de manière fidèle et équilibrée. Ce processus de réplication est réalisé principalement par des polymérases à haute fidélité mais aussi d'autres polymérases dont l'activité est moins fidèle. Des substitutions de base et des insertions ou délétions de base unique peuvent alors survenir. De plus, les séquences répétées, par exemple, peuvent conduire à des « glissements » de la polymérase et ainsi provoquer l'insertion ou la délétion de plusieurs nucléotides avec pour conséquence le décalage du cadre de lecture du gène (Viguera, Canceill, et Ehrlich 2001). Les polymérases peuvent aussi générer des erreurs en insérant des nucléotides alternatifs tel que l'uracile ou lorsque les réserves de nucléotides sont altérées.

Une autre source provient des topoisomérases qui sont impliquées dans la régulation de la compaction/décompaction de l'ADN. Pour réaliser leur fonction, ces enzymes coupent ponctuellement l'ADN puis permettent la ligation des deux extrémités de la cassure en alignant l'extrémité 5′-OH avec le lien phosphodiester de la tyrosine. Si cet alignement est mal exécuté, la cassure peut persister.

Les bases peuvent aussi se désaminer spontanément. Les cytosine, adénines, guanines et 5-méthyl cytosine perdent une amine pour devenir un uracile, hypoxanthine, xanthine et thymine respectivement. En plus de la désamination spontanée, des sources externes telles que les UV, des agents intercalants ou du bisulfite de sodium peuvent conduire à la désamination des bases.

Le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons entraîne la production de ROS. Les ROS servent de molécules signal pour certains systèmes. En revanche, lorsqu'ils sont en excès, ils peuvent réagir avec l'ADN et oxyder les bases, la modification la plus connue étant la 8-oxoguanine. Des systèmes de contrôle de la quantité des ROS sont présents dans la cellule. Malgré ces systèmes, la dérégulation de la quantité des ROS est associée à certaines pathologies, comme la maladie de Parkinson (Dias, Junn, et Mouradian 2013). Non seulement les ROS attaquent les bases mais ils sont aussi responsables d'un certain nombre de cassures simple brin.

Un autre composé retrouvé dans la cellule est le S-adénosylméthionine (SAM). SAM est le donneur de méthyle pour les méthyltransférases mais peut aussi spontanément méthyler certaines bases. D'autres composés endogènes ou environnementaux conduisent aussi à la méthylation de l'ADN.

2. Les dommages de source exogène

Les radiations ionisantes (RI) sont très présentes dans l'environnement et peuvent endommager l'ADN, soit directement ou indirectement en provoquant la production de radicaux hydroxyles dans l'eau environnante. Les lésions engendrées sont similaires à celles obtenues par réaction de l'ADN avec les ROS. En plus des lésions sur les bases, les RI peuvent engendrer des cassures simple brin, mais aussi des cassures double brin.

Les UV sont également une source de dommages et causent principalement des liaisons covalentes entre bases.

Différents types d'agents chimiques sont également responsables de dommages de l'ADN. Ces agents chimiques peuvent être le résultat d'activités humaines (la fumée du tabac, l'industrie, les pesticides ou des agents chimio thérapeutiques par exemple) mais peuvent venir aussi de l'alimentation, ou des toxines issues des mécanismes de défense de microorganismes par exemple.

La première catégorie comprend les agents alkylants conduisant à des adduits sur la base ou des phosphates alkylés dans le squelette de l'ADN voire des cassures simple brin. Parmi ces agents alkylants se trouve le méthane sulfonate de méthyle (MMS) couramment utilisé en laboratoire et qui provoque la formation de N^7-méthylguanine et N^3-méthyladénine (Wyatt et Pittman 2006).

Parmi les agents chimiques, nous pouvons également citer les amines aromatiques qui modifient les guanines et forment des substitutions de bases et des décalages de cadre de lecture. On trouve aussi des hydrocarbones aromatiques polycycliques, qui forment des

intermédiaires dans le foie et réagissent ensuite avec l'ADN principalement par oxydation, des N-nitrosamines, le 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), utilisé en système expérimental qui permet la formation d'adduits sur les guanines et adénines ou du stress oxydatif. Des toxines naturelles sont aussi parfois des composés génotoxiques. L'aflatoxine, par exemple, produite par une espèce de champignons est considérée comme le composé carcinogène le plus important d'origine naturelle (Chatterjee et Walker 2017).

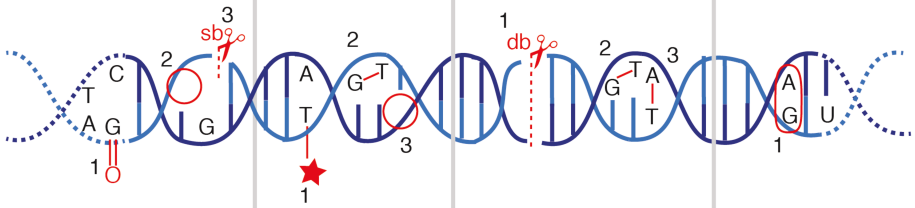
Source de dommage	ROS, rayons X agents alkylants réactions spontanées	ROS, UV (cisplatin hydrocarbones)	UV ; RI Composés chimiques (ex : bléomycine)	Erreurs de réplication et recombinaison
Type de dommage	 1. Base modifiée (oxidation, déamination, alkylation) (ex : oxo-G) 2. Sites abasiques 3. Cassure simple brin	1. Adduit de l'ADN 2. Lien intrabrin 3. Site abasique	1. Coupure double brin 2 et 3. Liaison covalente intra- et interbrin + Fourche de réplication effondrée	1. Mésappariement 2. Uracile + Insertion/Délétion
Voie de réparation	BER	BER	NHEJ et RH	MMR

Figure 1 : Réprésentation de plusieurs types de dommages possibles en fonction de la source de stress et les voies possibles de réparation.

3. La réparation des dommages de l'ADN

Certaines lésions, les bases alkylées en particulier, peuvent être simplement éliminées par des enzymes spécifiques. Sinon, plusieurs voies existent en fonction du dommage et de la phase du cycle cellulaire : la réparation par excision de base (BER, Base Excision Repair), réparation par excision de nucléotide (NER, Nucleotide Excision Repair), réparation d'un mésappariement (MMR, MisMatch Repair), recombinaison homologue (RH) et réparation par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ, Non Homologous End Joining) pour citer les plus fréquentes.

Dans la voie BER, la base modifiée (oxydation, hydrolyse, alkylation et désamination) est reconnue puis éliminée par des N-glycosylases spécifiques. Le site d'insertion est ensuite clivé par une endonucléase, une phosphodiestérase s'occupe ensuite d'éliminer le résidu phosphate, une polymérase comble la base manquante et enfin une ligase agit afin d'assurer la continuité du brin (Boiteux et Jinks-Robertson 2013; Bauer, Corbett, et Doetsch 2015).

La seconde voie est l'excision du nucléotide. Cette voie reconnaît les dommages qui conduisent à une malformation structurelle de l'ADN, qui affectent particulièrement la structure de l'hélice et résultent principalement en des mésappariements. C'est en général des lésions produites par des facteurs environnementaux, notamment les UV. Lors de ce processus, des protéines spécifiques qui reconnaissent le dommage se lient à l'ADN. Deux incisions sont ensuite effectuées de chaque coté du nucléotide affecté par des endonucléases ce qui élimine un fragment d'une vingtaine de nucléotide (Boiteux et Jinks-Robertson 2013). Ensuite, des polymérases et une ligase sont recrutées pour combler la séquence manquante.

Les lésions dues à la réplication, c'est-à-dire les mésappariements et insertion/délétion, sont réparées par excision des nucléotides affectés puis synthèse de la séquence manquante par une polymérase puis une ligase pour joindre les deux extrémités du brin par la voie MMR. Ce processus se déroule de façon synchronisée à la réplication, le nouveau brin synthétisé est reconnu afin de procéder à la correction. Les erreurs des ADN polymérases qui ne sont pas détectées et réparées pendant la réplication ne posent pas de problème majeur au déroulement de la réplication.

Les cassures double brin sont les dommages les plus cytotoxiques (Mehta et Haber 2014). Elles sont générées de différentes façons, soit directement soit à la suite d'un autre dommage. Si elles ne sont pas éliminées, elles peuvent interférer avec la fourche de réplication ou la machinerie transcriptionnelle.

Il est important de mentionner qu'il existe aussi des cas où des cassures double brin sont physiologiquement induites. Au cours de la méiose, de nombreuses cassures double brin

sont induites afin de promouvoir la recombinaison et la formation de crossing-over (enjambement). Ce phénomène est essentiel à la séparation des chromosomes homologues d'origine parentale différente pendant la méiose (Lam et Keeney 2014). Chez les mammifères, des cassures sont induites pour permettre la recombinaison VDJ impliquée dans l'assemblage des récepteurs des immunoglobines (Soulas-Sprauel et al. 2007). Chez *S. cerevisiae*, un système d'inversion du signe sexuel est également permis par une cassure double brin au sein d'un des deux locus du signe sexuel grâce à une endonucléase (Strathern et al. 1982). La présence d'une cassure double brin est donc dangereuse lorsqu'elle est accidentelle mais peut être nécessaire à certains processus. L'induction de cassures double brin dans l'ADN des cellules cancéreuses est l'une des stratégies thérapeutiques contre le cancer. Par exemple, la famille des bléomycines est utilisée dans certains types de cancers, cette molécule est capable de se lier à l'ADN et de cliver l'ADN double brin (Chen et Stubbe 2005).

Deux mécanismes principaux permettent la réparation de ces cassures. La réparation par NHEJ est active tout au long du cycle mais intervient principalement en phase G1 et début de phase S du cycle cellulaire et permet de joindre directement les deux extrémités de la cassure. La recombinaison homologue quant à elle intervient en phases S et G2.

En conclusion, de nombreuses réactions peuvent altérer la séquence d'ADN et produire différents types de dommages : des bases modifiées, des mésappariement, des insertions, délétion, des liaisons inter- et intra-brins et des coupures simple- ou double-brin. L'accumulation de ces dommages peut être particulièrement délétère s'ils provoquent la formation de mutations qui touchent des gènes essentiels dans la cellule. Ces modifications sont donc fortes en conséquences puisqu'elles peuvent conduire, par exemple, à des pathologies dans les organismes multicellulaires ou à l'extinction de la lignée cellulaire dans un organisme unicellulaire lorsqu'elles ne sont pas traitées

B. Le checkpoint des dommages de l'ADN

La cellule est dotée de mécanismes de surveillance pour (i) détecter la présence du dommage selon le type et la localisation, (ii) arrêter le cycle cellulaire et (iii) recruter les facteurs de réparation et réparer le dommage. On appelle ces mécanismes la réponse aux dommages de l'ADN (DDR, DNA Damage Response). La DDR est une voie de signalisation entre les facteurs de progression du cycle cellulaire et les machineries de réparation de l'ADN en présence d'un dommage. Cette voie est conservée chez les eucaryotes ainsi que les principaux acteurs de cette voie (Tableau 1).

Chez la levure, T. Weinert et L. Hartwell ont découvert pour la première fois un délai du cycle cellulaire assimilé à une mise en pause causée par un phénomène nommé checkpoint. Ils ont également montré la nécessité du gène *RAD9* dans l'induction de l'arrêt en G2 en réponse à un dommage de l'ADN (Weinert et Hartwell 1988; Hartwell et Weinert 1989). Leur expérience montrait que des lésions d'ADN causées par des irradiations aux rayons X provoquent un arrêt du cycle cellulaire avant de reprendre la mitose. Le checkpoint des dommages de l'ADN (que l'on appelle checkpoint G2/M) s'active et arrête les cellules en anaphase. À ce moment du cycle cellulaire, les centromères des paires de chromosomes sont attachés au niveau du fuseau mitotique, sous tension. L'activation du checkpoint empêche l'anaphase de se poursuivre jusqu'à réparation de la lésion. Une fois le dommage réparé, le blocage est relâché et la cellule peut terminer la mitose et reprendre sa division.

Je vais décrire dans les paragraphes suivants les étapes permettant l'activation du checkpoint, en réponse à une cassure double brin, en trois points : la reconnaissance du dommage, l'activation du checkpoint et sa maintenance et la reprise du cycle cellulaire appelé « recovery » en anglais (terme que je vais utiliser dans le reste du texte par faute de traduction pertinente en français) (Figure 2).

1. Le signal et reconnaissance de la cassure double brin

L'activation du checkpoint, dépend des phosphatidylinositol 3′ kinase-like kinases (PIKK) Mec1 (ATR chez l'Homme) (Weinert 1992) et Tel1 (ATM chez l'Homme) (Morrow et al. 1995). À noter aussi la présence des DNA-PK chez les mammifères qui ne sont pas présentes chez la levure (Lee et Kim 2002). Le recrutement des PIKK au niveau du dommage est la première étape d'activation du checkpoint.

En réponse à une cassure double brin, le complexe Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) est recruté au site de la cassure puis recrute Tel1 qui stabilise la liaison de MRX à l'ADN (Nakada, Matsumoto, et Sugimoto 2003). En parallèle, le complexe Ku composé de yKu70 et yKu80 est recruté aux extrémités de la cassure.

Contrairement à Tel1, Mec1 ne s'associe pas aux extrémités de la cassure mais à l'ADN simple brin. L'ADN simple brin est généré au niveau des cassures double brin par la résection 5′→3′. La résection des extrémités de la cassure double brin nécessite l'activité 5′→3′ d'une exonucléase ou d'une hélicase /endonucléase. Les protéines du complexe MRX, et les nucléases Exo1 et Dna2 participent à la résection en réponse à une cassure. Lorsque la résection a démarré, Tel1 favorise la dissociation du complexe Ku des extrémités de la cassure. Mre11 a une activité exonucléase de l'ADN double brin. Cependant cette activité est

dirigée de 3′ en 5′, qui est la direction opposée à celle de la résection. En revanche, Mre11 a aussi une activité endonucléase 5′ et cette activité participe à l'initiation de la résection. Bien que le mécanisme moléculaire par lequel Mre11 enclenche la résection n'est pas totalement définie, on sait que la protéine Sae2, en interagissant avec Mre11 et permettant sa dissociation de l'ADN, contribue à stimuler cette activité (Cannavo et Cejka 2014). Cette première étape de résection permet l'obtention d'un court fragment d'ADN simple brin. C'est l'activité exonucléase 5′-3′ de Exo1 et endonucléase de Dna2 qui vont permettre la résection étendue (Villa et al. 2016). L'activité de Dna2 est aidée par l'hélicase Sgs1. Ces deux voies, Exo1 et Dna2/Sgs1, sont indépendantes (Cannavo, Cejka, et Kowalczykowski 2013).

Une fois que l'ADN simple brin est formé, les autres protéines du checkpoint sont progressivement recrutées. Le recrutement du complexe Mec1-Ddc2, protéines senseur du checkpoint, nécessite la présence du complexe RPA (Replication Protein A), composé des sous unités Rfa1, Rfa2 et Rfa3, qui recouvre l'ADN simple brin (Zou et Elledge 2003). Mec1 et Ddc2 forment un complexe de indépendamment de la présence d'un dommage de l'ADN. Ddc2 permet le recrutement de Mec1 au niveau de l'ADN endommagé et Mec1 peut seulement interagir avec ses substrats lorsqu'il est lié à l'ADN lésé ce qui permet d'éviter l'activation intempestive du checkpoint. La structure du complexe Mec1-Ddc2 a récemment été obtenue et met en évidence plusieurs interactions pouvant expliquer des changements conformationnels qui permettraient d'exposer le site d'interaction avec les substrats (Wang et al. 2017).

En conclusion, lorsqu'un dommage de l'ADN est formé et en particulier une cassure double brin, le complexe MRX, la kinase Tel1 et le complexe Ku sont rapidement recrutés au niveau des extrémités. En phase S/G2, s'en suit la résection initiée par MRX et poursuivie par Dna2/Sgs1 et Exo1. L'ADN simple brin formé est ensuite recouvert par RPA qui va permettre le recrutement du complexe Mec1-Ddc2. Cette voie de signalisation qui passe par une étape de résection favorise la réparation par RH par rapport à la voie NHEJ et est aussi régulatrice de l'activation du checkpoint. C'est pourquoi la résection est finement régulée (Huertas 2010).

2. L'activation des kinases effectrices du checkpoint

Une fois que le dommage est détecté, une cascade de signalisation initiée par Mec1 va permettre d'activer complètement le checkpoint. Rad9, une protéine qu'on appelle adaptatrice est ensuite recrutée au niveau du dommage. Une fois présente dans la région du dommage,

Rad9 est phosphorylée par Mec1 et Tel1. Rad9 phosphorylé joue son rôle d'adaptateur par interaction avec Rad53 et permet ainsi son recrutement au niveau de la cassure. Rad53 est la kinase effectrice du checkpoint et est phosphorylée par Mec1 (Sun et al. 1998; Durocher et al. 2000; 1999). Cette phosphorylation conduit à l'activation catalytique de Rad53 (Fiorani et al. 2008) mais à elle seule n'est pas suffisante pour l'activation complète et robuste du checkpoint. C'est l'autophosphorylation extensive de Rad53 qui le permet.

Dans le cas d'un stress réplicatif, le recrutement et l'activation de Rad53 sont favorisés par l'adaptateur Mrc1. En effet, Mrc1 fait partie de la machinerie de réplication et octroie donc une réponse plus rapide que par le biais de Rad9 qui nécessite d'être recruté (Pardo, Crabbé, et Pasero 2017).

En parallèle des premières étapes du checkpoint, plusieurs modifications de la chromatine interviennent et participent à l'activation robuste du checkpoint. Par exemple, la sérine 129 de l'histone H2A est phosphorylée par Mec1 et Tel1. Il est possible d'observer la propagation de la phosphorylation d'H2A, γ-H2A, sur une région de la chromatine environnante de la cassure d'environ 50kb (Shroff et al. 2004; C.-S. Lee et al. 2014). La phosphorylation γ-H2A permet de maintenir le checkpoint. En effet, il a été montré que le checkpoint est désactivé prématurément en son absence (Nakamura et al. 2004). D'autres modifications des histones sont observées : la phosphorylation de H4S1, la méthylation de H3K79 qui pourrait permettre le recrutement de Rad9 (Grenon et al. 2007; Humpal, Robinson, et Krebs 2009) ou 53BP1 chez l'Homme (Huyen et al. 2004). Le complexe de remodelage de la chromatine RSC (Remodelling the Structure of Chromatin), composé de 15 sous-unités (Cairns et al. 1996), joue aussi un rôle en cas de cassure. Il interagit avec Mre11 et yKu80, ce qui permet le recrutement du complexe RSC au niveau de la cassure. RSC pourrait être impliqué dans le recrutement de Mec1 et Tel1, la phosphorylation de H2A, l'activation de Rad9 et Rad53 et le remodelage de la chromatine (Liang et al. 2007; Chambers et al. 2012).

Un autre complexe impliqué dans l'activation du checkpoint est le complexe 9-1-1, composé des protéines Rad17, Mec3 et Ddc1. Ce complexe est recruté par un complexe composé de Rad24 associé aux sous-unités Rfc2 à 5 (qui font habituellement partie du complexe Replication Factor C, RF-C). L'ADN simple brin recouvert par RPA participe également au recrutement de 9-1-1 qui se place à la jonction ADN double brin/ADN simple brin. Le rôle du complexe 9-1-1 n'est pas très bien décrit mais il semble impliqué dans le recrutement des substrats de Mec1, dont Rad9 et Rad53. Il a également été montré que la protéine Dbp1 participe au recrutement de Rad9 par une voie indépendante des histones et contribue ainsi à la transmission du signal entre les PIKK jusqu'à la kinase effectrice Rad53 (Granata et al. 2010). Ces étapes de régulation convergent vers le même objectif : activer et

renforcer le signal du checkpoint en favorisant le recrutement puis l'hyperphosphorylation de Rad53.

Mec1 active également la kinase effectrice Chk1, et Rad9 est nécessaire à sa phosphorylation. Chk1 et Rad53 contribuent à l'arrêt du cycle cellulaire par deux voies indépendantes (Sanchez 1999). De plus, bien qu'ils soient tous les deux nécessaires à l'arrêt, leur implication dans la robustesse du checkpoint n'est pas comparable. En effet, le délai observé entre l'induction du dommage et la reprise du cycle cellulaire en présence de télomères déprotégés est plus long lorsque *CHK1* est délété que lorsque *RAD53* est délété (Sanchez 1999).

3. L'arrêt du cycle cellulaire induit par l'activation du checkpoint des dommages de l'ADN

Une fois activée, Rad53 et Chk1 ont plusieurs cibles qui permettent de contrôler l'arrêt du cycle cellulaire. La protéine appelée sécurine, Pds1, qui permet de maintenir les chromatides sœurs ensemble, est hyper phosphorylée de manière dépendante de Mec1, Rad9 et Chk1 mais indépendante de Rad53 (Cohen-Fix et Koshland 1997). Cette hyper phosphorylation est spécifique de la réponse aux dommages de l'ADN (Sanchez 1999). Lors du déroulement classique du cycle cellulaire, Pds1 est ubiquitinylée par le complexe de promotion de l'anaphase APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cdc20) lors de l'entrée en mitose pour permettre sa dégradation. Dans le cas d'un dommage à l'ADN, Pds1 est stabilisée car l'étape d'ubiquitinylation est empêchée par la phosphorylation de Pds1 par Chk1 et l'interaction entre Pds1 et Cdc20 est inhibée par Rad53, bien que les mécanismes moléculaires respectifs ne soient pas totalement compris (Agarwal et al. 2003).

Des protéines impliquées dans la sortie de mitose sont des cibles de Rad53. Rad53 inhibe la polo kinase Cdc5 (Sanchez 1999; Valerio-Santiago, de Los Santos-Velázquez, et Monje-Casas 2013; Zhang et al. 2009) (voir le paragraphe IV.B.2. sur les fonctions de Cdc5 en mitose). Cdc5 inhibe le complexe Bub2/Bfa1, qui à son tour inhibe la sortie de mitose (Hu et al. 2001; Hu et Elledge 2002; Geymonat et al. 2003). L'inhibition de Cdc5 par Rad53 permet donc de maintenir l'arrêt induit par l'activation du checkpoint en empêchant la phosphorylation de Bfa1 (Valerio-Santiago, de Los Santos-Velázquez, et Monje-Casas 2013). Cependant, bien que des données semblent indiquer que Cdc5 et Rad53 interagissent (Vidanes et al. 2010), il n'y a pas de preuve que Rad53 phosphoryle directement Cdc5. Chez l'homme, l'activité de la protéine Plk1, orthologue de Cdc5, est aussi inhibée lors de l'activation du checkpoint en réponse à un dommage de l'ADN (Bruinsma et al. 2017).

J'ai mentionné précédemment la faculté de Rad53 à inhiber certaines protéines pro mitotiques. En effet, environ 150 gènes sont inhibés ou stimulés en réponse à l'activation du checkpoint (Gasch et al. 2001; Jaehnig et al. 2013). Une partie de ces gènes est régulée transcriptionnellement. Une des cibles de Rad53 est le cofacteur de transcription Ndd1. Rad53 permet de réguler Ndd1 par le biais de plusieurs sites phosphorylations (Edenberg et al. 2014; Yelamanchi et al. 2014). Ce facteur de transcription contrôle le niveau d'expression d'un cluster de gènes qui inclut les gènes des cyclines mitotiques *CLB1* et *CLB2*, *CDC5*, *CDC20* et d'autres gènes impliqués dans le cycle cellulaire et qui permettent la transition entre les phases M et G1. La transcription de ces gènes est régulée par les 3 facteurs qui composent le complexe Mcm1-Fkh2-Ndd1 (Loy, Lydall, et Surana 1999), ainsi qu'un complexe de désacétylases d'histones, Sin3-Rpd3. Mcm1 et Fkh2 ont la faculté de se lier au promoteur des gènes cibles. Fkh2 est un adaptateur qui permet le recrutement de Ndd1 (activation de la transcription) en G2/M (Koranda et al. 2000; Darieva et al. 2003) ou du complexe de désacétylation des histones (répression de la transcription) en G1 (Linke et al. 2013). C'est l'interaction entre Fkh2 et Ndd1 qui est inhibée lorsque Rad53 phosphoryle Ndd1. La transcription des gènes mitotiques est donc maintenue à un bas niveau (Edenberg et al. 2014; Yelamanchi et al. 2014).

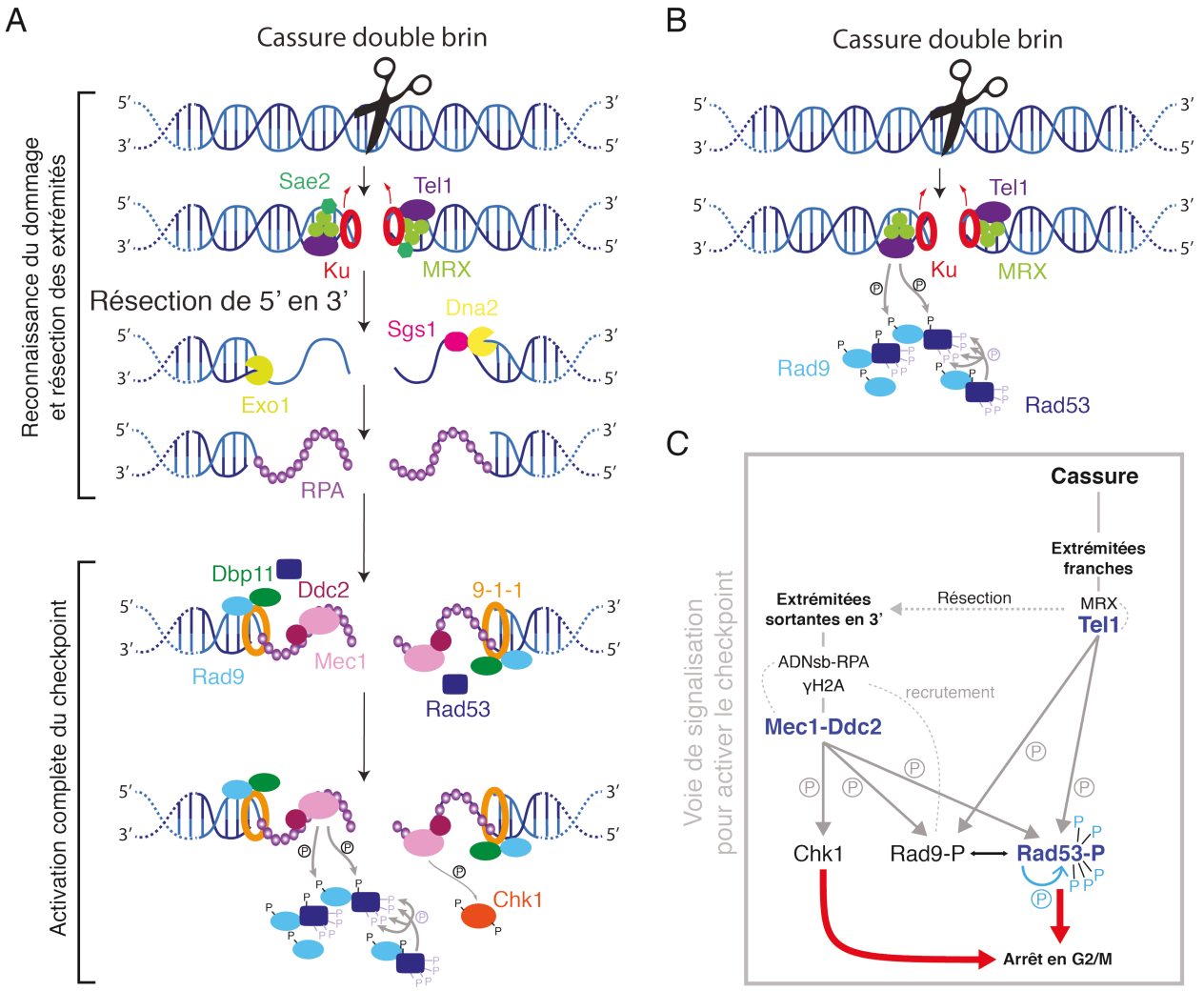


Figure 2 : Voie de signalisation du checkpoint des dommages de l'ADN. Dans le cas d'une cassure double brin, les extrémités sont reconnues par le complexe MRX, Tel1 et le complexe Ku. S'il y a recrutement de Sae2, la résection sera initiée et donc Ku sera dissocié des extrémités et la réparation se fera ensuite par recombinaison homologue (**A**). La résection en 5'→3' résulte en la fomation d'ADN simple brin. L'ADN simple brin est ensuite recouvert par RPA ce qui permet le recrutement de Mec1. Les prtéines Dbp11 et 9-1-1 sont également recrutées au niveau de région environnante de la cassure. Rad9 est ensuite phosphorylé par Mec1 et permet le recrutement de Rad53 qui est phosphorylé par Mec1. Rad53 est alors hyperautophophorylé ce qui conduit à l'activation complète du checkpoint. En absence de résction, les complexes MRX Ku et Tel1 sont maintenus aux extrémités de la cassure double brin (**B**). Tel1 peut alors phosphoryler Rad9 ce qui permet le recrutement de Rad53 qui est phosphorylé par Tel1. Enfin Rad53 s'hyperautophosphoryle pour permettre l'activation complète du checkpoint. **C**. Schéma récapitulatif des régulations et phosphorylations impliquées dans la voie d'activation du checkpoint.

Fonction	*S. cerevisiae*	*S. pombe*	*H. sapiens*
Reconnaissance du dommage et activation du checkpoint			
PIKK	Mec1	Rad3	ATR
	Tel1	Tel1	ATM
	Ddc2	Rad26	ATRIP
Protéine adaptrice	Rad9	Crb2	53BP1, MDC1, BRCA1?
Homologue de Rfc1	Rad24	Rad17	Rad17
9-1-1 "pince"	Rad17	Rad9	Rad9
	Mec3	Hus1	Hus1
	Ddc1	Rad1	Rad1
Résection des extrémités de la cassure			
Complexe MRX(N)	Mre11	Mre11	Mre11
	Rad50	Rad50	Rad50
	Xrs2	Nbs1	Nbs1
Adapteur à domaine BRCT	Dbp11	Rad4/Cut5	TopBP1
Kinase effectrice	Rad53	Cds1	Chk2
	Chk1	Chk1	Chk1
Cibles du checkpoint			
Kinase de type polo	Cdc5	Plo1	Plk1
Sécurine	Pds1	Cut2	Securin
Séparase	Esp1	Cut1	Separase
Sous-unité d'APC	Cdc20	Slp1	p55CDC/CDC20

Tableau 1 : Protéines impliquées dans le checkpoint chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *H. sapiens*.

II. Les voies de réparation des cassures double brins

Une fois l'arrêt du cycle cellulaire enclenché par l'activation du checkpoint, le dommage doit être réparé avant la reprise du cycle cellulaire. La réparation par RH utilise une séquence homologue non endommagée comme matrice a l'avantage de générer très peu d'erreurs, et la voie NHEJ permet la liaison des deux extrémités de la cassure.

Le choix de la voie de réparation d'une cassure double brin est principalement influencé par la résection (Huertas 2010). L'étape de résection est nécessaire pour les voies de RH et pour la voie alternative de NHEJ nommée *Microhomology-Mediated End-Joining*. L'équilibre entre la RH, la voie NHEJ ou MMEJ est en partie contrôlée par des facteurs de résection comme Sae2 ou CtIP chez l'Homme (Huertas 2010; Cannavo et Cejka 2014). Enfin la résection est principalement dépendante du cycle cellulaire puisqu'elle ne peut se dérouler qu'en phases S et G2 lorsque la chromatide sœur est disponible afin de fournir la matrice d'ADN à la polymérase. Ainsi, la résection ne peut s'effectuer que lorsque le complexe Cdk1-Clb est actif (Ira et al. 2004; Harrison et Haber 2006; Huertas 2010).

A. Recombinaison Homologue

Dans un premier temps, je vais décrire les différentes voies de recombinaison homologue : la conversion génique, la voie BIR puis la voie SSA (Figure 2).

Tous les mécanismes de recombinaison font suite à une étape critique à leur initiation qui est la résection 5′→3′ que j'ai décrite auparavant. La protéine Rad51, indispensable à la RH, recouvre l'ADN simple brin en remplaçant RPA pour former ce qu'on appelle le filament Rad51. Ce filament permet la recherche d'homologie puis l'invasion du brin au niveau d'ADN double brin homologue. La formation du filament Rad51 est un processus complexe et nécessite l'intervention de Rad52 et d'autres facteurs. Une fois que le filament de Rad51 est formé, la recherche de la séquence d'homologie peut commencer. Ce processus est encore mal connu, mais on sait qu'il nécessite l'augmentation de la mobilité des chromosomes (Miné-Hattab et Rothstein 2012).

Une fois la séquence homologue trouvée, l'extrémité 3' associée au filament de Rad51 s'apparie avec le brin complémentaire ce qui crée une D-loop, « Displacement loop ». La D-loop est une région d'ADN duplexé et d'ADN simple brin déplacé. La structure intermédiaire de la D-loop peut mener à différentes voies de réparation par recombinaison. Ces voies impliquent ou non un crossing-over. Dans le cas de la méiose, au moins une cassure double brin par paire de chromosomes doit être résolue par crossing-over (CO) pour assurer la séparation correcte des chromosomes homologues à la première division méiotique. Cependant, en mitose, la fréquence des CO est peu élevée et il existe des régulations permettant de favoriser les voies ne résultant pas en un crossing over, comme Srs2, par exemple, qui favorise la voie de réparation par synthèse d'ADN dépendante de l'hybridation à un brin complémentaire (SDSA, Synthesis-Dependant Strand Annealing), ce qui permet de limiter la formation de CO pour limiter l'instabilité génomique (Ira et al. 2003).

1. Conversion génique

La conversion génique, est un transfert non réciproque d'information génétique d'un chromosome à son homologue, décrit initialement en méiose. Cette conversion génique peut aussi intervenir dans les voies de réparation d'une cassure double brin.

Lorsqu'une seule des extrémités de la cassure est impliquée dans l'invasion de la séquence homologue et formation de la D-loop, c'est la voie SDSA qui permet la réparation (Figure 3D). La séquence d'ADN synthétisée par une des polymérases δ ou ε s'apparie ensuite avec la seconde extrémité. Enfin la séquence manquante est synthétisée résultant en

un événement de conversion génique où il y a eu un transfert de séquence d'ADN du donneur au niveau de l'entourage de la cassure (Ira, Satory, et Haber 2006; Mehta et Haber 2014).

Dans le cas où les deux extrémités sont impliquées dans l'invasion de la séquence homologue et la formation de la D-loop, il y a formation d'une structure intermédiaire appelée double jonction de Holliday (dHJ) (Figure 3E). Plusieurs voies permettent de résoudre cette structure : soit elle est résolue soit elle est dissoute. Selon la voie empruntée, un CO sera ou non formé. En effet, la résolution implique des clivages qui, selon leur orientation, peuvent engendrer un CO. En revanche la voie de dissolution par les hélicases Sgs1-Top3-Rmi1 ne produit pas de CO.

2. Réplication induite par une coupure (Break Induced Replication, BIR)

Les premières étapes du BIR sont similaires à celle de la conversion génique. En revanche, les étapes de synthèse d'ADN sont bien différentes. En effet, la voie BIR est une voie de réparation qui, après que le filament Rad51 a envahi la séquence homologue, copie cette séquence de la séquence d'homologie jusqu'au télomère grâce à une machinerie de réplication qui met en place une fourche de réplication unidirectionnelle (Sakofsky et Malkova 2017) (Figure 3C). Cette réplication est conservatrice et est dépendante de Pol α, δ, ε mais aussi de Pol32 qui n'est pourtant pas nécessaire à la réplication (Lydeard et al. 2007). L'hélicase Pif1 est également nécessaire au BIR (Mehta et Haber 2014; Sakofsky et Malkova 2017).

La voie BIR est particulièrement mutagène parce que la synthèse d'ADN est imprécise et qu'elle peut conduire entre autres à des réarrangements (Sakofsky et al. 2014; Vasan et al. 2014).

Malgré les conséquences sur l'instabilité génomique, le BIR est une voie intéressante qui permet de réparer les cassures où une des extrémités est « perdue » ou s'il n'y a pas de séquence homologue. Cette voie est particulièrement fréquente au niveau des télomères (Lydeard et al. 2007).

3. *L'hybridation de simple brin : SSA (Single Strand Annealing)*

Le SSA est détecté aux cassures qui sont entourées de séquences répétées ou en tandem. À l'inverse des autres voies de recombinaison homologue, la voie SSA ne nécessite pas la présence du filament Rad51 puisque la résection expose la séquence homologue du brin complémentaire. Les deux séquences complémentaires sont alors appariées par Rad52. Des « queues » flottantes qui correspondent aux extrémités de la cassure en dehors de l'appariement sont ensuite éliminées et les extrémités sont liguées (Pâques et Haber 1999; Mehta et Haber 2014) (Figure 3B).

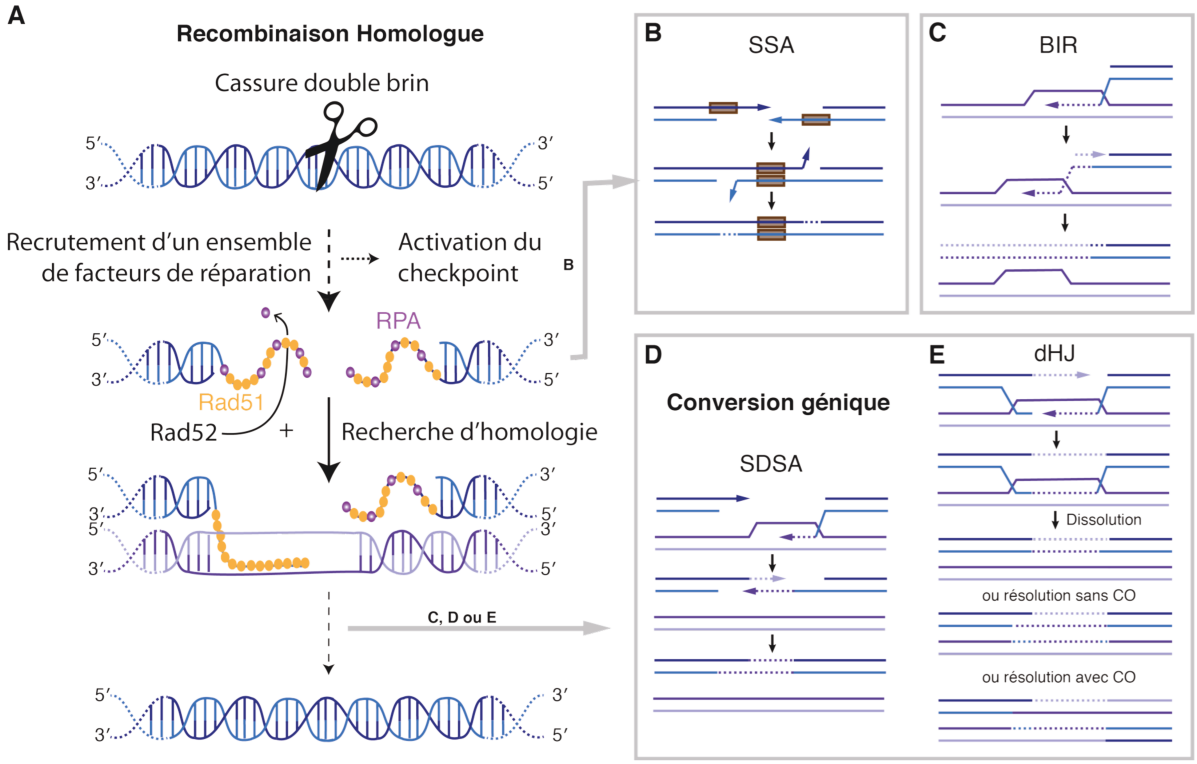


Figure 3 : Réparation par recombinaison homologue et issues possibles à la réparation. A. La récombinaion homologue en réponse à une cassure double brin est initiée par la formation du filament Rad51 qui en collaboration avec Rad52 va permettre la recherche d'homologie et l'invasion du brin matrice. Plusieurs voies sont possibles. La voie SSA (**B**) qui ne nécessite pas de séquence homologue et consiste à joindre des séquence répétées ou en tandem. La voie BIR (**C**) lorsqu'une seule des extrémités de la cassure a une séquence homologue comme matrice, la matrice est alors copiée par les polymérases à partir du site de cassure jusqu'au télomère. La conversion génique (**D** et **E**) est une voie de réparation qui peut soit impliquer une seule des extrémiéts de la cassure pour le SDSA (**D**) ou les deux extrémités qui forment alors un intermédiaire de réparation appelé dHJ (**E**). Cet intermédiaire est dissout ou résolu et la résolution peut mener ou non à un CO.

B. Non Homologous End Joining

1. La voie canonique du NHEJ

La voie NHEJ, comme son nom l'indique est une voie de réparation indépendante de la disponibilité d'une séquence d'homologie à la zone lésée. Cependant, le type de dommage influence également le choix de réparation. En effet, la nature des extrémités qui résultent de la coupure double brin est à considérer afin de permettre la réparation sans erreur par le NHEJ (Emerson et Bertuch 2016). Par exemple, une coupure par une endonucléase permet d'obtenir des extrémités nettes et compatibles avec l'action d'une ligase. En revanche, les rayons ionisants, par exemple, crée des dommages complexes avec des extrémités peu utilisables par la voie de réparation NHEJ. Ces extrémités ont donc besoin d'être traitées (Wyman et Kanaar 2006). La voie NHEJ est favorisée en phase G1 de cellules haploïdes car la RH est réprimée par l'inhibition de la résection pendant cette phase du cycle. Le complexe Ku inhibe aussi la résection.

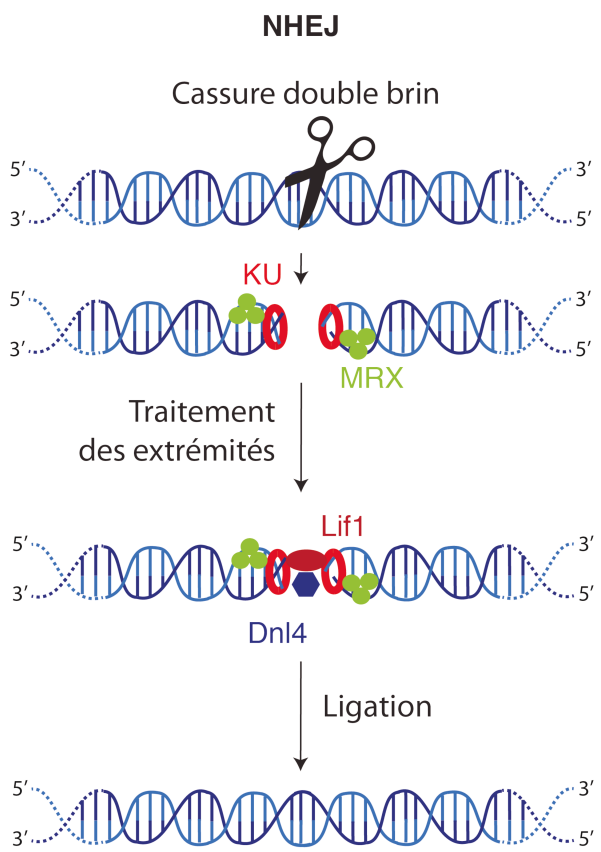


Figure 4 : La voie de réparation par jonction des extrémités non-homologues, NHEJ. Les extrémités de la cassure double brin sont reconnues par les complexes Ku et MRX. Les extrémités sont ensuite traitées afin d'être ligaturées grâce à la ligase Dnl4. Lif1 participe au maintien de la proximité des extrémités.

Les protéines du NHEJ sont conservées chez les eucaryotes. Les facteurs clés au cœur du mécanisme sont, chez *S. cerevisiae*, yKu70-yKu80, Dln4-Lif1, Nej1 et le complexe MRX (Daley et al. 2005). Ku est un hétérodimère composé des deux sous-unités, yKu70 et yKu80. La première étape pour une réparation par NHEJ fonctionnelle est l'inhibition de la résection par le complexe Ku. De plus, Ku permet aussi le recrutement des autres facteurs de réparation par la voie NHEJ. Les fonctions et interactions entre les facteurs sont encore floues mais plusieurs grandes étapes du NHEJ peuvent être proposées : (i) la protection et le maintien à proximité des extrémités de la cassure, (ii) assemblage du complexe de réparation et enfin (iii) ligation des brins et le

désassemblage du complexe.

YKu et MRX lient le site du dommage rapidement. MRX est nécessaire à la fois pour la voie NHEJ ainsi que la RH. Afin d'éviter que les extrémités de la cassure ne se séparent, les deux brins sont rapprochés et le site de coupure est stabilisé. Une fois que les extrémités ont été préparées, Dnl4, la ligase, ligue les extrémités des brins appariés (Figure 4).

Les options de réparation sont généralement divisées en ces deux grandes catégories décrites dans ce chapitre, la voie classique de NHEJ et la voie de RH. Cependant, la réalité est un peu plus complexe que cela. En effet, lorsque les deux voies principales ne sont pas exécutables, il existe des évènements de réparation par voies dites alternatives.

2. La voie alternative MMEJ

La voie MMEJ est différente de la voie NHEJ, car elle est indépendante de Ku et Dnl4 mais aussi de la RH car indépendante de Rad51. Elle s'apparente à la voie SSA à la différence que la séquence complémentaire entourant la cassure double brin est plus courte (entre 2 et 20pb) (McVey et Lee 2008). Ce mécanisme, ainsi que les acteurs de cette voie, sont encore peu connus. Cependant, un modèle établi à partir de sa ressemblance avec la voie NHEJ et la voie SSA a pu être proposé. En effet, la taille de la séquence d'homologie est intermédiaire par rapport à celles des deux voies : 0 à 3 pb pour le NHEJ et >15 pb pour le SSA. L'hybridation de l'ADN compris dans les séquences de micro-homologie est l'étape clé de ce processus. En amont de cette étape, une étape de résection doit se produire. Un intermédiaire de réparation, avec un espace vide et une queue flottante à chaque extrémité 3' de la cassure, est obtenu. Les queues flottantes sont ensuite éliminées puis les extrémités sont liguées.

Parce que la voie MMEJ permet la délétion ou l'insertion jusqu'à une vingtaine de nucléotides, chaque événement de réparation par cette voie est très mutagène. La fréquence des évènements de réparation par ce processus doit être régulée par la cellule. Certaines études suggèrent une régulation temporelle et spatiale. La voie MMEJ semble être inhibée en phase G1, de manière indépendante de l'inhibition de la résection. Les évènements de MMEJ semblent également favorisés au niveau de la périphérie du noyau ce qui est particulièrement cohérent puisque cette région est apparentée au site de réparation des dommages de l'ADN persistants et à la réparation mutagène (Nagai et al. 2008). De plus, l'assemblage de fragments chromosomaux par un mécanisme semblable au MMEJ a été attribué aux évènements de chromotripsis dans des cellules humaines (Terradas, Martín, et Genescà 2016). La chromotripsis est associée à de nombreuses translocations dues à des fragmentations et

jonctions de chromosomes. Ces caryotypes très particuliers sont généralement associés à des cellules tumorales. Toutes les données sur la voie MMEJ qui sont disponibles à ce jour présentent un mécanisme très versatile capable de « réparer » un grand éventail de dommages dans des conditions non favorables. C'est pourquoi, cibler la voie MMEJ est une stratégie thérapeutique contre certains cancers.

En conclusion, les cassures double brin peuvent être prises en charge par différentes voies de réparation qui sont également régulées par le cycle cellulaire, ce qui permet un traitement approprié et efficace pour éviter l'accumulation de lésions avant d'entamer la division du contenu génétique en deux parties égales et équilibrées pendant la mitose.

Cependant, ces processus peuvent tout de même être chronophages pour la cellule et nécessitent parfois un arrêt du cycle cellulaire par le checkpoint des dommages de l'ADN.

III. La reprise du cycle cellulaire

A. Recovery

Une fois que les facteurs de réparation ont été recrutés et que le dommage a pu être réparé, les cellules doivent « éteindre » le checkpoint pour reprendre leur cycle cellulaire. Cette phase de retour à la normale est appelée recovery en anglais qui pourrait être traduit par « récupération ».

Une fois le dommage réparé, les protéines senseurs du dommage vont retourner à leur forme inactive ce qui va enclencher le retour à l'état inactif de l'ensemble de la cascade de signalisation. L'extinction du checkpoint est un processus actif. En effet, beaucoup d'éléments de la voie de réponse aux dommages de l'ADN sont phosphorylés en réponse à la présence d'une lésion, les phosphatases jouent donc un rôle prépondérant dans la phase de recovery.

C'est l'hyper-phosphorylation de Rad53 qui marque l'activation complète et fonctionnelle du checkpoint. Il est donc logique que son inactivation soit une étape clé de l'inactivation du checkpoint. Plusieurs phosphatases participent à l'inactivation de Rad53. Ce sont les phosphatases de la famille des PP2C, Ptc2 et Ptc3, qui vont lever la phosphorylation de Rad53 en réponse à la réparation d'une cassure double brin (Leroy et al. 2003). La protéine homologue humaine de Ptc2 et Ptc3, Wip1, est aussi impliquée dans l'extinction du checkpoint. Elle permet de restituer Chk1 à un état non phosphorylé (Lu, Nannenga, et

Donehower 2005). La phosphatase de type PP2A Pph3 en complexe avec la sous-unité régulatrice Psy2 participe également à la déphosphorylation de Rad53. En effet, lorsque les cellules sont traitées par MMS et que celui-ci est retiré, les cellules *pph3Δ* ne sont pas capables de déphosphoryler Rad53 (O'Neill et al. 2007). De plus, lorsque les 3 gènes codant pour Ptc2, Ptc2 et Pph3 sont délétés, à nouveau l'autophosphorylation de Rad53 persiste après que le traitement par MMS soit retiré (Travesa, Duch, et Quintana 2008).

La phosphorylation des histones H2A est une des premières réponses à la présence d'une cassure double brin. La régulation de leur état de phosphorylation influence également la durée d'activation du checkpoint. La phosphatase Pph3 participe également à la déphosphorylation de γ-H2A (Keogh et al. 2006).

L'hélicase Srs2 est nécessaire pour le recovery. Lorsque le gène codant pour cette protéine est délété, les cellules dans lesquelles une coupure HO a été induite restent arrêtées en permance en G2/M avec le maintien de l'hyperphosphorylation de Rad53 après réparation (Vaze et al. 2002). Ce défaut de recovery semble être associé à la capacité de Srs2 de dissocier Rad51 de l'ADN simple brin (Krejci et al. 2003). En effet, en son absence, Ddc2, Rfa1 et Dpb11 persisteraient dans la région de la cassure au niveau de l'ADN simple brin car il est protégé par la présence de Rad51 (Yeung et Durocher 2011). Ces expériences suggèrent aussi que la persistance de l'activation du checkpoint semble donc être dépendante de la quantité d'ADN simple brin. Une fois que la réparation a eu lieu, il n'y a plus de simple brin ce qui participe à l'extinction du checkpoint.

L'ensemble de la voie de signalisation du checkpoint est donc très régulé, à partir du moment où la lésion de l'ADN est reconnue jusqu'à sa réparation puis pendant la phase de recovery pour que la cellule reprenne le cours de son cycle.

Cependant, la machinerie de réparation n'est pas parfaite :
que se passe t-il quand le dommage n'est pas réparé ?

B. L'adaptation au checkpoint des dommages de l'ADN

En présence d'un dommage persistant, qui n'a pas été réparé, l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'activation du checkpoint peut durer plusieurs heures. Dans ce cas, il est logique de penser que l'arrêt du cycle induit se résout par la mort cellulaire. Cependant, les cellules peuvent reprendre leur cycle cellulaire et ainsi « contourner » l'activation du checkpoint par un processus nommé **adaptation au checkpoint des dommages de l'ADN** et ce malgré la présence d'un dommage persistant. Dans ce manuscrit je ferai référence à l'adaptation au

checkpoint des dommages de l'ADN par simplement « adaptation » pour faciliter la lecture. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Sandell et Zakian en 1993 (Sandell et Zakian 1993). Dans cette étude, une souche de levure où un télomère d'un chromosome surnuméraire non essentiel peut être éliminé suite à une cassure double brin par une endonucléase a été utilisée. La perte de ce télomère active le checkpoint. En revanche, après 5 à 15h d'arrêt, la plupart des cellules reprennent leur cycle sans avoir réparé le chromosome endommagé. À partir de la perte du télomère, les cellules peuvent se diviser jusqu'à 10 fois avant la perte totale du chromosome surnuméraire. De ce fait, l'adaptation offre à la lignée cellulaire l'opportunité de survivre lorsque le dommage semble ne pas affecter de fonction essentielle de la cellule.

Le mécanisme moléculaire de l'adaptation est encore mal caractérisé. Mais une des étapes clés, similaire à la phase de recovery, semble être la déphosphorylation de Rad53 (Pellicioli et al. 2001). Puisque l'adaptation permet de contourner l'activation du checkpoint en G2/M, malgré la présence d'un dommage dans la cellule, la robustesse de l'activation de Rad53 semble être un verrou de l'adaptation. En effet, lorsque des cellules sont mutées spécifiquement pour être déficientes en adaptation et qu'elles surexpriment un dominant négatif de Rad53 : Rad53-D339A, pour lequel l'activité kinase de Rad53 est altérée, leur défaut d'adaptation est corrigé (Pellicioli et al. 2001). Les autres facteurs de la voie de signalisation du checkpoint ne sont pas ou très peu affectés. Les protéines senseurs Ddc1 et Ddc2 ainsi que Rad9 sont toujours présents au niveau du dommage et actifs (Melo, Cohen, et Toczyski 2001; Donnianni et al. 2010; Vidanes et al. 2010). En effet, il est courant d'observer des *foci* formés de la protéine Ddc2 fusionnée à un fluorophore pour observer la présence d'un dommage de l'ADN. Ces *foci* sont maintenus pendant toute l'activation du checkpoint, et leur intensité diminue seulement légèrement pendant l'adaptation alors qu'ils disparaissent pendant la phase de recovery. Les *foci* Ddc1, eux, restent intenses en adaptation (Melo, Cohen, et Toczyski 2001). Ces conclusions sont quelques peu nuancées par une étude récente qui montre qu'en réponse à une cassure double brin, Mec1 est autophosphorylé et que la stabilité de Ddc2 est affectée ce qui, après 9 à 12 heures d'arrêt, conduit à fragiliser la robustesse du checkpoint. Cette régulation pourrait mener à la dissociation du complexe Mec1-Ddc2 du site de cassure et ainsi contribuer à promouvoir l'adaptation (Memisoglu et al. 2019).

Plusieurs types de dommages peuvent conduire à l'adaptation. Une coupure double brin non réparable induite par un endonucléase peut être suivie d'adaptation (Sandell et Zakian 1993). Cependant, à partir de deux coupures, l'adaptation est inhibée (Lee et al. 1998). Les cellules irradiées, en absence de RH, s'adaptent également (Galgoczy et Toczyski 2001).

L'allèle *cdc13-1* affecte la fonction protectrice des télomères de la protéine Cdc13. Les télomères sont résectés et le checkpoint activé. L'activation prolongée de ce checkpoint peut être contournée par l'adaptation (Toczyski, Galgoczy, et Hartwell 1997). Ce mutant est d'ailleurs très utilisé pour étudier l'adaptation (Toczyski 2006).

1. Les mutants d'adaptation

En 1997, un crible a été mené pour identifier les gènes impliqués dans l'adaptation. Le même système d'étude que (Sandell et Zakian 1993) a été utilisé afin d'introduire un dommage persistant. La mutation *cdc5-ad*, L251W, a été mise en évidence pour son défaut prononcé pour l'adaptation (Toczyski, Galgoczy, et Hartwell 1997). C'est d'ailleurs de ce phénotype que lui vient son nom : *ad* pour *adaptation-defective* en anglais. C'est de cette étude que la polo kinase Cdc5 a été identifiée comme un facteur clé de l'adaptation. Lors de ce crible, le complexe CKII, composé de Ckb1 et Ckb2, a aussi été identifié comme impliqué dans l'adaptation mais montre un phénotype moins marqué que les cellules exprimant *cdc5-ad* (Toczyski, Galgoczy, et Hartwell 1997). Ckb1 et Ckb2 permettent la phosphorylation de Ptc2, la phosphatase en partie responsable de la déphosphorylation de Rad53. Cette phosphorylation favorise l'interaction entre Ptc2 et Rad53. Or, la déphosphorylation de Rad53 est importante pour l'adaptation. En effet, Ptc2 et Ptc3 sont impliquées dans l'adaptation, puisque lorsque les gènes codant pour ces protéines sont délétés, les cellules ne peuvent pas s'adapter (Leroy et al. 2003). Toutefois, la surexpression de Cdc5 dans ces cellules permet aux cellules de s'adapter (Vidanes et al. 2010). Comme pour *PTC2* et *PTC3*, les cellules dans lesquelles les gènes codant les protéines impliquées dans le recovery sont délétés sont souvent déficientes en adaptation. Mais l'inverse n'est pas vrai et certains mutants d'adaptation, comme *cdc5-ad*, ne présentent pas de défaut de recovery. Outre le fait que cela démontre que le recovery est effectivement un processus actif et que la disparition du dommage n'est à elle seule pas suffisante pour désactiver le checkpoint, cela suggère que l'adaptation et le recovery sont deux mécanismes distincts de reprise du cycle cellulaire.

Les cellules *srs2Δ*, en plus de ne pas être en mesure de réaliser la phase de recovery, sont aussi incapables de s'adapter en présence d'un dommage persistant (Vaze et al. 2002).

La quantité d'ADN simple brin semble contribuer à l'adaptation. En effet, les cellules pour lesquelles les protéines yKu70 ou yKu80 sont absentes ne peuvent pas s'adapter à cause de la résection exacerbée des extrémités (Lee et al. 1998) ce qui suggère à nouveau que la quantité de résection d'ADN simple brin contribue au maintien de l'activation du checkpoint et empêche l'adaptation. J'ai mentionné plus haut que l'adaptation pouvait faire suite à

différents dommages, notamment avec le mutant *cdc13-1*. Or la quantité de simple brin obtenue par résection chez ce mutant est théoriquement plus importante que la quantité de simple brin qui serait obtenue dans le cas de deux coupures double brin (Garvik, Carson, et Hartwell 1995). Ceci suggère que non seulement la quantité de simple brin mais aussi la nature du dommage sont importantes pour l'adaptation.

Les cellules *sae2Δ* sont également déficientes en adaptation et maintiennent la phosphorylation de Rad53 dans son état hyper phosphorylé en réponse à certains dommages. La surexpression de Sae2 confère aux cellules une meilleure chance de s'adapter après irradiation par des rayons ultra-violet (Clerici et al. 2006). En revanche en réponse à un dommage télomérique, la délétion de *SAE2* n'affecte pas la capacité d'adaptation et Cdc5 peut promouvoir l'adaptation indépendamment de Sae2 (Ratsima et al. 2016). Récemment, deux études ont montré une séparation des fonctions de Sae2 : la première fonction est de dissocier le complexe MRX de l'ADN après l'initiation de la résection des extrémités d'une cassure double brin, la seconde fonction proposée est de participer à la régulation négative de Rad53 (Yu, Kimble, et Symington 2018; Colombo et al. 2019). Ces deux études suggèrent que Sae2 inhibe l'interaction entre Rad53 et Rad9, permettant ainsi l'inhibition de l'hyper-phosphorylation de Rad53 donc par extension du checkpoint. Or Sae2 présente des sites potentiels d'interaction et de phosphorylation par Cdc5 (Donnianni et al. 2010). Chez l'Homme, la polo kinase Plk1 interagit et phosphoryle la protéine CtIP, homologue de Sae2 (Wang et al. 2018). La régulation post-traductionnelle de Sae2 par Cdc5 pourrait donner des indications sur le mécanisme moléculaire de certains cas d'adaptation. Il est à noter que la différence de réponse, quant à l'implication de Sae2 en fonction du dommage, suggère qu'il existe plusieurs voies d'adaptation dépendantes de Cdc5 en fonction des dommages, et en particulier entre les dommages télomériques et non télomériques.

D'autres protéines jouent également un rôle dans l'adaptation. Comme mentionné précédemment, la plupart ont un effet sur l'activation du checkpoint, principalement l'activation de Rad53. Elles peuvent avoir une fonction dans la régulation de l'état de la chromatine comme Rpd3, Fun30, Tid1. En effet, un mutant de délétion du gène *RPD3* est déficient en adaptation (Tao et al. 2013). Lorsque Rpd3 est fonctionnelle, elle permet d'éviter la suractivation de Rad53 par déacétylation de Rad53 et conduit à la réduction de son activité kinase. La protéine Fun30, qui contribue à remodeler la chromatine, participe à la régulation de la résection afin de permettre l'adaptation (Eapen et al. 2012). À noter aussi, la contribution de la protéine Tid1 (ou Rdh54 : RaD54 Homolog). Cette protéine est impliquée dans la dissociation de Rad51 de l'ADN double brin afin d'éviter l'accumulation d'intermédiaires ADN-Rad51 et permettre la disponibilité de Rad51 pour la recombinaison

homologue (Sang Eun Lee et al. 2001; Shah et al. 2010). Tid1 est phosphorylé par Mec1 et Rad53 en présence d'une coupure double brin et cette phosphorylation n'est plus visible lorsque la cellule entre en phase de recovery ou s'adapte, mais la caractérisation de cette régulation n'est pas claire en adaptation (Ferrari et al. 2013). Parmi les protéines impliquées dans la structure de la chromatine, nous retrouvons aussi Ino80. Cette protéine est recrutée au niveau de la cassure double brin et favorise la présence des histones γ-H2A, phosphorylés par Mec1 et Tel1, grâce à son activité ATPase. Cette activité ATPase fonctionnelle est requise pour permettre à la cellule de s'adapter (Papamichos-Chronakis, Krebs, et Peterson 2006).

En conclusion, le principal facteur de l'adaptation à avoir été identifié est la polo kinase Cdc5 mais il existe d'autres gènes qui confèrent aux cellules un défaut d'adaptation lorsqu'ils sont délétés. Cependant, ils affectent souvent la voie du checkpoint, le recovery, ou la quantité de simple brin. Il est donc plus difficile d'identifier leur fonction propre à l'adaptation.

2. Les conséquences de l'adaptation

Le checkpoint des dommages de l'ADN en G2/M est un système de défense pour prévenir la transmission de chromosomes endommagés. Chez l'Homme, le checkpoint est une barrière à la transformation cancéreuse. En effet, dans la plupart des cancers, les protéines du checkpoint sont mutées (Gorgoulis et al. 2005; Bartkova et al. 2005). L'adaptation, en revanche, est un processus par lequel les cellules affaiblissent leur réponse à un stimulus après une exposition prolongée. L'adaptation au checkpoint des dommages de l'ADN offre une tentative de survie. Toutefois, la division cellulaire se fait au prix de l'instabilité génomique qui augmente. En effet, l'adaptation contribue à l'apparition spontanée et induite d'instabilité génomique (Galgoczy et Toczyski 2001). Dans cette étude, des cellules diploïdes où *RAD52* a été délété pour empêcher la réparation sont soumises à différents dommages et plusieurs types d'instabilité génomique sont recensés : la perte de chromosomes, les translocations ou la perte d'hétérozygotie par BIR. Ces formes d'instabilités apparaissent après que les cellules se sont arrêtées au checkpoint puis se sont adaptées. De plus, un manuscrit récent posté sur BiorXiv, démontre que l'adaptation favorise l'acquisition de résistance à des produits génotoxiques (la camptothécine) dans des cellules diploïdes où *RAD52* a été délété pour empêcher la RH (Vydzhak et al. 2019). Cependant, malgré l'instabilité génomique générée, l'adaptation procure une chance de survie et de maintenir la lignée cellulaire en permettant, par exemple, la réparation du dommage dans le cycle cellulaire suivant ou en tolérant la perte d'information

génétique non essentielle (Kaye et al. 2004). Chez les organismes unicellulaires, l'adaptation peut aussi contribuer à la génération de variants génétiques et phénotypiques et ainsi permettre à une population de cellules de survivre à un environnement stressant (Galgoczy et Toczyski 2001).

3. L'adaptation chez les autres organismes

Des évènements assimilés à des évènements d'adaptation au checkpoint ont aussi été observés chez des organismes multicellulaires. Dans des extraits d'embryon de xénope, des cellules peuvent s'adapter à un arrêt du cycle cellulaire en phase S induit à cause de fourches de réplication bloquées par ajout d'aphidicoline, un inhibiteur de la réplication. En effet, les cellules entrent en mitose malgré la réplication incomplète de l'ADN. Chez le xénope, la protéine Claspin (Mrc1 chez *S. cerevisiae*) permet l'activation de Chk1, protéine effectrice du checkpoint. La protéine Claspin est phosphorylée et c'est par cette phosphorylation que la polo kinase du xénope, Plx1, se fixe sur Claspin et phosphoryle la protéine sur un site voisin, ce qui conduit à sa dissociation de la chromatine. L'activation de Chk1 est donc affaiblie et cela permet l'adaptation (Yoo et al. 2004). Un tel mécanisme avec Cdc5 chez *S. cerevisiae*, n'a pas été démontré.

Des évènements d'adaptation ont aussi été observés dans des cellules tumorales humaines. Des cellules cancéreuses irradiées ou en réponse à des traitements génotoxiques parviennent à échapper à l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M pour entrer en mitose en présence d'ADN endommagé, (Syljuåsen et al. 2006; Kubara et al. 2012; Swift et Golsteyn 2014; 2016). Plk1 contribue à l'adaptation au checkpoint dans ces conditions (Syljuåsen et al. 2006). L'entrée en mitose par adaptation est corrélée avec la déphosphorylation et l'inactivation de Chk1 (Syljuåsen et al. 2006). Dans ces cellules, l'adaptation leur offre la possibilité d'acquérir une résistance à l'activité cytotoxique des molécules ou RI et de maintenir leur prolifération. Permettre la division et la propagation de ces cellules instables contenant des dommages de l'ADN augmente le risque de progresser vers des cellules tumorales. L'adaptation au checkpoint pourrait donc être un mécanisme qui contribue au développement de cancers. De plus, Plk1 est très souvent surexprimée dans les cellules tumorales (Yamamoto et al. 2006), ce qui pourrait expliquer que la situation est propice à l'adaptation dans ces cellules si la surexpression est l'élément déclencheur ou si les cellules qui se sont adaptées maintiennent un niveau élevé de Plk1.

Certaines cellules cancéreuses contiennent des structures que l'on appelle micronoyaux. Les micronoyaux, distincts du noyau principal, contiennent des fragments de

chromosome voire des chromosomes entiers et sont formés lorsqu'un problème survient en anaphase et induisent l'activation du checkpoint (Crasta et al. 2012). Dans 7% des cas, ces molécules d'ADN sont très fragmentées et pourraient être à l'origine du phénomène de chromotripsis (Terradas, Martín, et Genescà 2016). Certaines cellules qui contiennent ces micronoyaux sont capable de les « ignorer » et peuvent se diviser une dizaine de fois avant que leur contenu ne rejoigne le noyau principal. Des cellules qui se sont adaptées peuvent elles aussi contenir des micronoyaux (Lewis et Golsteyn 2016; Kalsbeek et Golsteyn 2017). L'adaptation pourrait donc contribuer à la formation de micronoyaux et à l'instabilité génomique et aux réarrangement chromosomiques qui en découlent favorisant la cancérisation des cellules (Kalsbeek et Golsteyn 2017).

L'adaptation au checkpoint, la formation de micronoyaux et la chromothripsis sont 3 des caractéristiques distinctes associées aux cellules cancéreuses qui semblent être biologiquement liés avec pour conséquence l'augmentation de l'instabilité génomique. C'est pourquoi l'étude de l'adaptation au checkpoint pourrait donner des indications sur les mécanismes de cancérogénèse et permettre le développement de nouvelles thérapies. En effet, des essais cliniques ayant pour objectif de tester des inhibiteurs de Plk1 ont déjà été initiés (Gutteridge et al. 2016). Cependant, du fait de son implication dans le déroulement normal du cycle cellulaire, il est difficile de développer une molécule thérapeutique ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses (Swift et Golsteyn 2014). L'étude des bases moléculaires des polo kinases en adaptation permettrait d'acquérir de précieuses informations afin d'identifier des cibles thérapeutiques plus spécifiques.

À noter que des évènements apparentés à l'adaptation au checkpoint ont été documentés chez les plantes. Lorsque des cellules sont irradiées à différentes doses et lorsque la dose est suffisamment basse pour ne pas enclencher l'apoptose, des mitoses aberrantes sont observées après un arrêt induit par le checkpoint favorisant l'augmentation d'instabilité génomique (Carballo, Pincheira, et de la Torre 2006).

IV. Les polo kinases

Les polo kinases (PLK, Polo Like Kinase) sont des régulateurs essentielles de la phase mitotique. Cette famille de kinases est conservée chez les eucaryotes, et des membres de cette famille ont été isolés dans de nombreux organismes, de la levure à l'Homme. Chez *S. cerevisiae*, Cdc5 est la seule polo kinase, ce qui n'est pas le cas de tous les organismes. Chez l'Homme, par exemple, les polo kinases ont divergé en 5 polo kinases, Plk1 à 5. Elles sont

distinctes par leur localisation, leur régulation transcriptionnelle et leur fonction dans la cellule.

La kinase polo a été décrite pour la première fois dans des neuroblastes de drosophile. En effet, lorsque le gène *polo* est muté, les cellules présentent un fuseau mitotique monopolaire (Sunkel et Glover 1988). Cdc5 avait été décrite en 1973 par (Hartwell et al. 1973) où les auteurs ont montré qu'à température restrictive, pour des mutants thermosensibles de Cdc5, les cellules n'étaient pas en mesure de terminer la cytokinèse et par conséquent, la population était enrichie en cellules bi-nucléées. La conservation de ces kinases a également été confirmée par complémentation hétérologue de Cdc5 par Plk1 dans des cellules de *S. cerevisiae* où Cdc5 n'est pas fonctionnelle (cellules exprimant l'allèle *cdc5-1*, mutant qui présente un défaut dans l'élongation du spindle à température restrictive) (Charles et al. 1998; Lee et Erikson 1997).

A. Structure et fonctions des polo kinases

Toutes les polo kinases sont composées de 2 domaines : (i) en N terminal, un domaine kinase catalytique qui contient une boucle T (T-loop) d'activation et (ii) un domaine boîte polo PBD (Polo Box Domain) non-catalytique composé de deux motifs PB (Polo Box) (Figure 5).

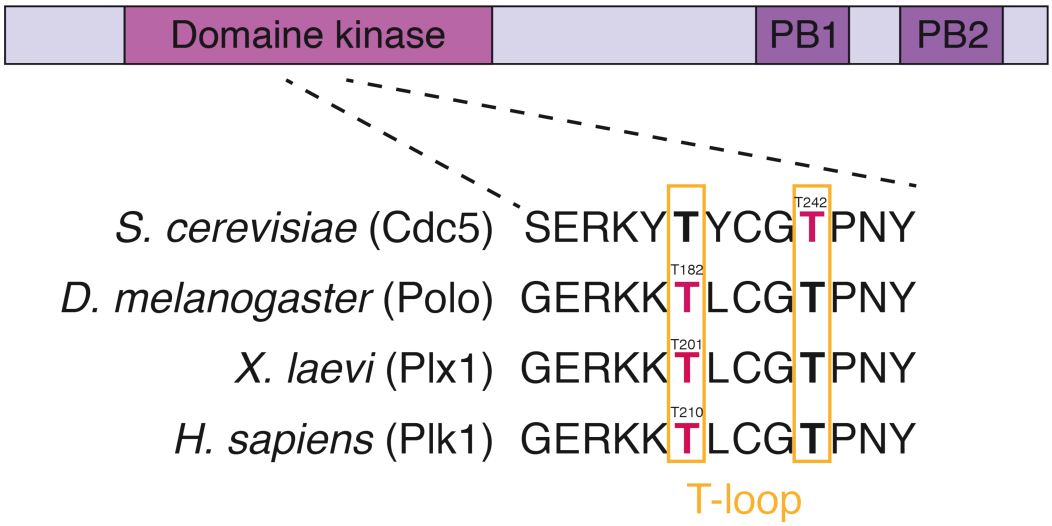


Figure 5 : Alignement de la séquence de la boucle d'activation, T-loop, des polo inases de différents organismes (d'après Rawal et al. 2016)). Les T indiqués en rouge sont les thréonines dont la phosphorylation est essentielle à l'activation de l'activité kinase.

La plupart des PLK a 2 PB mais ce nombre peut varier, par exemple la Plk4 humaine n'en a qu'une (Colicino et Hehnly 2018). Cette structure est très conservée entre les eucaryotes. Les PB ainsi que la région intermédiaire entre les deux domaines agissent comme un module de reconnaissance et de liaison des serines et thréonines phosphorylées. Grâce à une banque de peptides contenant un motif de phosphorylation dégénéré, la séquence consensus de liaison du PBD de Plk1 a été définie comme suit : Ser-pSer/pThr-Pro/X (Elia et al. 2003). La modification des substrats par primo-phosphorylation est souvent observée et est généralement effectuée par Cdk1.

La fonction principale de Plk1 est de permettre la transition morphologique de la cellule entre l'interphase et la mitose. Plk1 contrôle notamment l'entrée en mitose par activation du complexe cycline B/Cdk1. Plk1 a aussi des fonctions à la fois aux centrosomes, aux kinétochores ou dans le noyau. Cdc5 a aussi des fonctions aux « spindle pole bodies » (SPB), les centrosomes de la levures, dans le noyaux et au niveau du « budneck », la constriction entre le bourgeon et la cellule mère (Botchkarev et Haber 2018).

Lorsque la quantité de Plk1 est réduite, la cellule présente un fort défaut d'entrée en mitose et le checkpoint d'alignement du fuseau mitotique est activé. Un variant catalytique a été utilisé pour étudier certaines de ces fonctions, $Plk1^{as}$. La poche catalytique de ce variant est mutée de telle sorte qu'elle accepte certains analogues de purines qui inhibent son activité kinase (Burkard et al. 2007). Grâce à ce mutant, il a été montré que Plk1 participe à l'assemblage du fuseau mitotique, à la maturation des centrosomes, l'alignement des chromosomes et la cytokinèse (Colicino et Hehnly 2018). Elle est localisés au niveau des kinétochores afin d'assurer l'attachement correcte des microtubules. Plk1 est placée sur plusieurs sites des kinétochores avec des fonctions distinctes. Une fois la transition entre l'anaphase et la télophase effectuée, Plk1 se déplace du kinétochore à la zone intercellulaire où elle participe à la formation du pont intercellulaire de la cytokinèse et à l'abscission (Burkard et al. 2007). En parallèle, Plk1 participe à la mise en place du fuseau mitotique aux centrosomes (Bruinsma, Raaijmakers, et Medema 2012; Colicino et Hehnly 2018). Le centrosome est une structure composée de deux centrioles qui se dupliquent en phase S. Une fois qu'ils se sont dupliqués, ils permettent l'assemblage du fuseau mitotique. Plk1 phosphoryle notamment CEP215, un élément de la matrice péricentriolaire. Lorsque cette phosphorylation est inhibée, la ségrégation des chromosomes est affectée conduisant à la formation de micronoyaux (Colicino et al. 2018).

B. Régulation des PLK

Les PLK sont généralement exprimées à partir de la phase S pour atteindre un maximum en phase G2/M (Colicino et Hehnly 2018; Golsteyn et al. 1995).

L'activité de Plk1 augmente en phase G2 pour atteindre un maximum en mitose. L'activation de Plk1 en phase G2 nécessite la phosphorylation de la Thr210 par Aurora A qui est un facteur au cœur de la régulation de la mitose chez l'Homme (Joukov et Nicolo 2018). Aurora A ne peut phosphoryler Plk1 qu'en présence de son cofacteur Bora. L'interaction entre Plk1 et Bora est permise par phosphorylation de Bora par Cdk1 (Wytse Bruinsma, Raaijmakers, et Medema 2012). L'activité de Cdk1 est nécessaire pour l'activation de Plk1 et Plk1 est nécessaire à l'activation du complexe cycline B/Cdk1. Ce type de boucle de rétroaction est souvent observées pour la régulation des transitions entre phases cellulaires et empêche un retour en arrière (Colicino et Hehnly 2018; Joukov et Nicolo 2018).

La régulation des PLK se fait aussi par leur localisation. En effet, elles sont très dynamiques (Pintard et Archambault 2018). Leur recrutement se fait principalement grâce à leur PBD. Si Plk1 est séquestrée dans le cytoplasme ou le noyau sans pouvoir naviguer entre les deux compartiments, la cellule n'entre pas en mitose (Bruinsma, Raaijmakers, et Medema 2012).

En conclusion, le rôle des PLK et la régulation de leur activité kinase est essentielle afin de permettre le bon déroulement de la transition entre phase G2 et mitose dont certaines étapes de la mitose elle-même comme la ségrégation des chromosomes afin de maintenir l'intégrité du génome. Cette régulation de l'activité est couplée à la régulation spatio-temporelle des PLK qui est primordiale et se fait en partie par le PBD qui permet de favoriser l'interaction des PLK avec leurs substrats. De plus, le PBD et le domaine kinase peuvent interagir pour s'inhiber l'un l'autre (Xu et al. 2013). Comprendre les fonctions et la régulation des PLK, en particulier en réponse à un dommage de l'ADN peut donc permettre de déterminer les fonctions impliquées dans l'adaptation au checkpoint.

C. La polo kinase de *S. cerevisiae* : Cdc5

Au cours de mon projet, j'ai étudié l'adaptation chez *S. cerevisiae*, je vais donc décrire plus en détail les mécanismes moléculaires et fonctions de la polo kinase Cdc5 dans la suite de ce chapitre.

Cdc5 est la seule polo kinase de *S. cerevisiae*. Elle est amplement étudiée pour ses fonctions dans le cycle cellulaire et son implication en méiose. Cdc5 est également une cible

du checkpoint des dommages de l'ADN. Cependant Cdc5 est aussi un facteur clé du contournement de l'arrêt du cycle cellulaire induit par le checkpoint afin de promouvoir l'adaptation. Le mécanisme moléculaire de Cdc5 en adaptation est encore mal caractérisé. C'est pourquoi je me suis intéressée aux fonctions et régulations de Cdc5 au cours de la mitose et en réponse à un dommage de l'ADN pour identifier les bases moléculaires de Cdc5 en adaptation.

1. Régulation de Cdc5 au cours du cycle

Cdc5 est finement régulée au cours du cycle, elle est exprimée à partir de la phase S et son niveau d'expression est maintenu à un niveau assez élevé jusqu'à la fin de la division cellulaire (Charles et al. 1998; Cheng, Hunke, et Hardy 1998; Shirayama et al. 1998). L'activation de Cdc5 est dépendante de la phosphorylation par Cdk1 (Mortensen et al. 2005; Benanti 2016). Cdc5 contient un site de phosphorylation stricte par Cdk1 (S/T-P-X-K/R) au niveau de la thréonine 242 et 4 sites accessoires (Mortensen et al. 2005). D'autres phosphorylations sont nécessaires pour certains processus. Par exemple, la phosphorylation de la thréonine 70 de Cdc5 est impliquée dans la régulation du réseau de sortie de mitose (MEN, Mitotic Exit Network) (Rodriguez-Rodriguez et al. 2016). Au sein de la séquence de Cdc5 existe un autre site de phosphorylation conservé : T238. Lorsque la phosphorylation de la T238 est empêchée, malgré une viabilité cellulaire similaire, l'activité kinase est largement réduite et la cellule présente alors des défauts d'adaptation à un dommage de l'ADN (Rawal et al. 2016). Dans les cellules humaines, c'est cette thréonine de Plk1 (Thr210) qui est phosphorylée par Aurora A (Ipl1 chez *S. cerevisiae*) et permet son activation (Seki et al. 2008). Tout au long de la mitose, l'activité kinase de Cdc5 reste assez élevée. Un fois que les étapes de mitose et de cytokinèse sont terminées et la division cellulaire terminée, Cdc5 est dégradée en phase G1 par le protéasome. La sous-unité Cdh1 d'APC/C cible Cdc5 par le biais de trois motifs de dégradation en région N terminale de Cdc5 (Arnold, Höckner, et Seufert 2015; Cheng, Hunke, et Hardy 1998; Shirayama et al. 1998). Ces motifs sont : deux motifs de destruction (DB, destruction box) et un motif de destruction KEN (K-lysine, E-glutamate et N-asparagine), ils sont tous la cible d'APC.

En plus de la régulation de l'activité kinase, Cdc5 est très dynamique afin d'aller à la rencontre de ses substrats. J'ai déjà mentionné que l'avantage du PBD est de cibler des substrats pré-phosphorylés de telle sorte que leur reconnaissance est plus spécifique (Lee et al. 2005). De ce fait, Cdc5 présente différentes localisations au cours du cycle cellulaire (Cheng, Hunke, et Hardy 1998; Song et al. 2000). En phase S, Cdc5 apparaît au niveau du SPB quand

celui-ci n'est pas encore dupliqué (Botchkarev, Rossio, et Yoshida 2014; Lee et al. 2005). Lorsque la duplication du SPB a lieu Cdc5 est alors localisée aux deux SPB sur la face nucléaire de ceux-ci. Cdc5 s'accumule ensuite au niveau du noyau en phase G2 et reste principalement nucléaire. Cdc5 contient d'ailleurs deux motifs de localisation vers le noyau NLS (Nucleus Localization Signal) mais un seul semble fonctionnel. Ce motif NLS est conservé parmi les PLK. L'import de Cdc5 dans le noyau est régulé par différents facteurs et il présente tout son intérêt pour la contribution de Cdc5 dans l'entrée en mitose (Mortensen et al. 2005). Cdc5 est ensuite libérée du noyau en anaphase par Cdc14 et passe de la face nucléaire des SPB à la face cytoplasmique. Cependant, aucun motif d'export du noyau n'a été décrit et le mécanisme reste peu clair mais cette translocation semble dépendante de Bfa1 (Botchkarev et al. 2017). Etant donné que le recrutement de Cdc5 aux SPB semble dépendre de ses substrats, il y a de grande chance que le recrutement soit dépendant de la primo-phosphorylation de ceux-ci. En effet, en l'absence de certains composants du SPB, comme Cnm67, Nud1 ou Bbp1, Cdc5 n'est pas correctement localisée au SPB (Park et al. 2004; Park et al. 2004).

En G2 et en anaphase, on observe également Cdc5 au niveau du budneck, localisation nécessaire à la cytokinèse (Sakchaisri et al. 2004; Song et al. 2000; Meitinger et al. 2011; Botchkarev, Rossio, et Yoshida 2014).

2. Fonctions de Cdc5 en mitose

Cdc5 a plusieurs fonctions dans des étapes variées de la mitose. Plusieurs substrats ont été identifiés par crible et la plupart des mécanismes où Cdc5 est impliquée ont été étudiés au niveau moléculaire. Cependant il existe encore des zones d'ombres et du travail pour aboutir à la caractérisation complète des interactions et des régulations. Lorsque Cdc5 est inactivée par incubation du mutant *cdc5-1* à température restrictive, les cellules sont stoppées en télophase suggérant que la fonction essentielle de Cdc5 porte sur les phases tardives de la mitose (Charles et al. 1998; Hartwell et al. 1973).

a) Entrée en mitose

Cdc5 favorise l'entrée en mitose. Deux de ses cibles sont la protéine kinase Swe1 et la cycline Clb2. En phase G2, la protéine kinase Hsl1 en association avec Hsl7 permettent le recrutement de Cdc5 ainsi que de Swe1 au niveau du budneck de la cellule (Sakchaisri et al. 2004; Asano et al. 2005). Cdc5 régule l'entrée en mitose par deux voies. Premièrement en

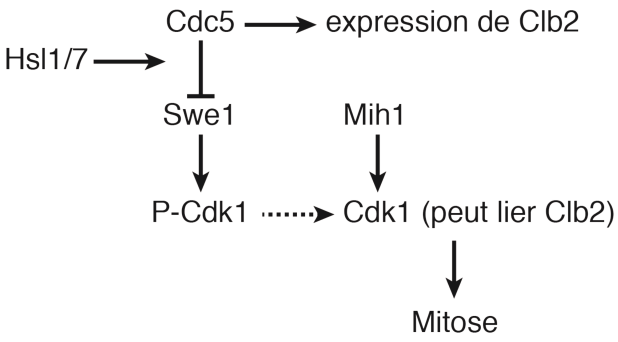


Figure 6 : Rôle de Cdc5 dans l'entrée en mitose (d'après Botchkarev and Haber, 2018). Cdc5 phosphoryle Swe1 pour l'inactiver et favoriser l'interaction entre Clb2 et Cdk1. Hsl1/7 sont nécessaires pour permettre cette phosphorylation.

régulant négativement la protéine kinase Swe1. Swe1 phosphoryle Cdk1 afin d'inhiber son interaction avec Clb2 et inhiber l'entrée en mitose. En phosphorylant Swe1, Cdc5 induit sa dégradation dépendante de l'ubiquitine (Asano et al. 2005). Une fois que Swe1 est dégradée, l'inhibition de Cdk1 est levée et peut ainsi être déphosphorylée par la phosphatase Mih1 Cdk1 peut interagir avec Clb2 afin de provoquer l'entrée en mitose (Russell, Moreno, et Reed 1989) (Figure 6).

Cdc5 joue aussi un rôle dans le noyau puisque lorsque Cdc5 est conditionnellement exclue du noyau, l'entrée en mitose est retardée. Cdc5 phosphoryle le complexe facteur de transcription Mcm1-Fkh2-Ndd1 qui est requis pour l'expression de Clb2 (Darieva et al. 2006). Cdc5 est donc probablement importée au niveau du noyau, mais le mécanisme n'est pas encore très clair. Cependant, des études chez d'autres organismes donnent des indications sur le mécanisme possible par lequel Cdc5 est recrutée dans le noyau. La phosphorylation de polo chez la drosophile est nécessaire afin de permettre l'exposition du NLS et de recruter polo dans le noyau. Selon la structure résolue de Plk1 chez le poisson zèbre, cette hypothèse est consolidée, un changement de conformation de la PLK expose le NLS (Kachaner et al. 2017; Xu et al. 2013; Pintard et Archambault 2018). Un mécanisme similaire pourrait être à l'origine du recrutement de Cdc5 dans le noyau.

b) Maintenance de la forme du noyau

Cdc5 semble être aussi impliquée dans la forme du noyau pendant la mitose Au cours du cycle cellulaire, en phase S, l'enveloppe nucléaire de la région du nucléole s'étend de sorte à former un léger évasement qui est plus important en cas d'arrêt du cycle en mitose car la cellule est toujours métaboliquement active et l'enveloppe nucléaire continue de s'étendre. Cdc5 a été identifiée comme l'une des protéines permettant de restreindre cette expansion à la région nucléolaire dans les cellules arrêtées en mitose et les cellules en cycle (Walters et al. 2014). Un mutant spécifique de *CDC5*, *cdc5-nf*, présente un défaut dans la formation de ces structures spéciales du nucléole lorsque les cellules, exprimant cet allèle, sont placées à 34°C. D'autres mutants connus de Cdc5 présentent également ce défaut signifiant que l'activité kinase semble être nécessaire à la régulation de cette morphologie de nucléole. L'expansion

de l'enveloppe nucléaire limitée au nucléole pourrait éviter d'affecter l'enveloppe nucléaire de la région où sont localisés les chromosomes.

c) Le clivage de l'anneau de cohésine

Une fois que Cdc5 est recrutée dans le noyau, elle a plusieurs autres fonctions clés. En effet, Cdc5 peut phosphoryler Scc1, qui est une sous-unité de l'anneau de cohésine, qui permet le maintien de l'association des chromatides sœurs pour promouvoir son clivage. Le clivage de Scc1 est effectué par la protéine séparase Esp1 (Alexandru et al. 2001). L'anneau de cohésine est composé de plusieurs sous-unités : Scc1/Mcd1, Scc3, Smc1 et Smc3. Pour promouvoir l'avancement dans la mitose et la séparation des chromatides, certaines étapes préliminaires sont requises. Les microtubules du fuseau mitotique s'accrochent au niveau des kinétochores de chaque chromosome. Afin de garantir que tous les microtubules sont alignés de la bonne façon et permettre la division normale des chromosomes, il existe un système de vérification de la transition métaphase-anaphase appelé Spindle Assembly Checkpoint en anglais (SAC). S'il n'y pas de problème, les protéines du SAC, plutôt que d'arrêter le cycle, activent Cdc20, sous-unité d'APC/C, qui est une E3 ligase requise pour l'entrée en anaphase. Cdc20 a plusieurs substrats, dont Pds1 (sécurine) qui est impliquée dans la promotion de l'anaphase. La sécurine favorise le maintien les chromatides sœurs jointes en métaphase jusqu'à ce que la cellule soit prête pour leur séparation. Cdc20 cible Pds1 pour dégradation, l'inhibition sur Esp1 est levée et peut cliver Scc1 phosphorylé. (Cohen-Fix et al. 1996). Le SAC permet donc la dégradation de Pds1 dépendante de Cdc20 pour déstabiliser Scc1 et ainsi promouvoir la ségrégation équilibrée des chromosomes en anaphase entre les deux cellules filles (Figure 7).

Pendant la mitose, afin d'intervenir au niveau de la cohésine, Cdc5 se lie à la chromatine dans les régions associées à Scc1 (Mishra et al. 2016). Dix sites de phosphorylation par Cdc5 sont recensés pour Scc1. Ces phosphorylations peuvent être contrecarrées par la sous-unité B Cdc55 de la protéine phosphatase 2A (PP2A). Ce qui est intéressant, c'est que Cdc55 est elle-même inhibée par Esp1 en anaphase. Il est donc probable que Cdc55 module la phosphorylation de Scc1 par Cdc5 jusqu'à ce que la cellule obtienne le feu vert pour l'anaphase. Cela nous montre à nouveau la finesse de la régulation de la mitose pour permettre que la séparation des chromosomes entre les cellules filles soit équilibrée et fidèle, en évitant, ici, le clivage précoce de la cohésine, Scc1 (Yaakov, Thorn, et Morgan 2012).

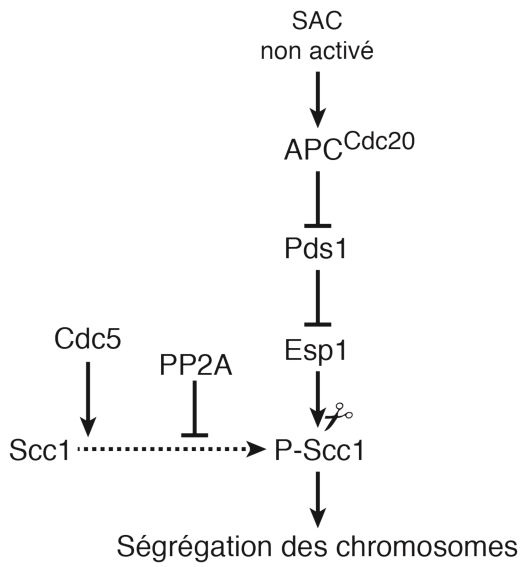


Figure 7 : Régulation du clivage de l'anneau de cohésine (d'après Botchkarev and Haber, 2018). Cdc5 phosphoryla la sous-unité de la cohésine, Scc1. Esp1 peut cliver Scc1 une fois qu'elle est phosphorylée.

Cdc5 participe également à la ségrégation des chromosomes. Premièrement, Cdc5 intervient dans la condensation des chromosomes. En effet, plusieurs sous-unités de la condensine sont phosphorylées par Cdc5 lorsque le fuseau mitotique commence à s'allonger (St-Pierre et al. 2009). Deuxièmement, Cdc5 agit au centromère par phosphorylation de Cse4, un variant de l'histone H3. Cette interaction est dépendante de la phase du cycle et est nécessaire à la viabilité cellulaire (Mishra et al. 2019).

En conclusion, Cdc5 participe à la ségrégation des chromosomes par promotion de la dégradation de la cohésine qui retient la chromatine des chromatides sœurs mais contribue aussi à ce qu'elle soit correcte par son action aux centromères et au niveau de la condensation des chromosomes.

À noter que Cdc5 contribue à la dégradation du facteur de réplication de l'ADN Sld2 afin d'éviter la simultanéité de la réplication et de la mitose ce qui permet de maintenir l'intégrité du génome en autorisant seulement une copie du génome après duplication (Reusswig et al. 2016).

d) Sortie de mitose

Une fois la cellule en anaphase, Cdc5 intervient à nouveau dans la sortie de mitose par le biais de deux voies.

La voie FEAR

La première voie est dépendante du relargage du nucléole de Cdc14, elle est appelée FEAR pour Cdc Fourteen Early Anaphase Release en anglais (Visintin, Hwang, et Amon 1999). La seconde est ce qu'on appelle le réseau de sortie de mitose (MEN, Mitotic Exit Network) (Stegmeier et Amon 2004). Les deux processus ont pour objectif la sortie de Cdc14 du nucléole et son activation. Cdc14 est une phosphatase essentielle chez *S. cerevisiae* et permet l'inhibition de Cdk1 et de ses substrats (Figure 8). Tout au long du cycle cellulaire, Cdc14 est séquestré au sein du nucléole (Stegmeier et Amon 2004). Cette localisation est due à la protéine Net1 (aussi appelée Cfi1) (Visintin, Hwang, et Amon 1999). Cette régulation

spatiale de Cdc14 l'empêche alors d'accéder à ses divers substrats tant dans le noyau que dans le cytoplasme. Lorsque la cellule entre en anaphase, Net1 est phosphorylé par Cdc5 et Cdk1 (Rodriguez-Rodriguez et al. 2016) en réponse à la voie FEAR, contrôlée par un ensemble de protéines : Esp1, Slk19, Spo12, $PP2A^{Cdc55}$ (D'Amours et Amon 2004). Grâce à cette phosphorylation, Cdc14 peut alors être relâché du nucléole. Dans ce processus Cdc5 est capable d'interagir avec plusieurs protéines du réseau : Esp1, Slk19 ainsi que Cdc14 elle-même (Rahal et Amon 2008). La sous-unité Rsc2 du complexe de remodelage de la chromatine RSC est aussi impliquée dans la phosphorylation de Net1 et pourrait promouvoir l'activité de Cdc5 (Rossio et al. 2010). L'implication directe de Cdc5 dans la phosphorylation de Net1 n'a pas été montrée. Il se peut (certains arguments vont dans ce sens) que Cdc5 participe au FEAR en permettant la dégradation de la kinase Swe1 (qui inhibe Cdk1 par phosphorylation). Le mécanisme d'action de Cdc5 dans le FEAR n'est pas tout à fait résolu mais son implication est certaine. Une fois que Cdc14 est relâchée du nucléole, elle a accès à ses substrats pour engager la cellule en sortie de mitose.

La voie du MEN

Plus tard en anaphase, Cdc5 a un autre substrat : le complexe GTP-ase Activating Protein (GAP) Bfa1/Bub2. Ce complexe se trouve sur la face cytoplasmique du SPB (Hu et al. 2001). Cet événement de phosphorylation est important pour l'activation de la seconde cascade de signalisation qui permet la sortie de mitose, le MEN. Le MEN est principalement régi par la GTPase Tem1 et particulièrement par son état d'activation (Bardin et Amon 2001). En amont de l'anaphase, Tem1 est gardée inactive par le complexe GAP Bfa1/Bub2 (Geymonat et al. 2003) (Figure 8).

La cellule peut définitivement sortir de mitose si le checkpoint de l'orientation du fuseau mitotique : le SPOC (Spindle Pole Orientation Checkpoint), qui est un mécanisme de surveillance de l'orientation du fuseau mitotique entre les SPB des cellules mère et fille, n'est pas activé. Cdc5 phosphoryle alors Bfa1. Cette modification est suffisante pour désactiver le complexe Bfa1/Bub2 (Geymonat et al. 2003; Hu et al. 2001). Cette inactivation permet de lever l'inhibition de Tem1 qui devient actif grâce au facteur d'échange de guanine (GEF, Guanine Exchange Factor), Lte1, qui se trouve dans la cellule fille (Bardin et Amon 2001). Tem1 a pour substrat la protéine kinase Cdc15 qui va permettre de promouvoir le MEN (Molk et al. 2004). La phosphorylation de Bfa1 dans la région du site d'inactivation par Cdc5 permet également de maintenir sa localisation au niveau du SPB de la cellule fille en anaphase (Kim et al. 2012).

Indépendamment de l'activité GTPase de Tem1, Cdc5 peut, elle aussi, phosphoryler Cdc15 (Rock et Amon 2011). Cdc5 contribue donc au MEN en phosphorylant, à la fois Bfa1 et Cdc15.

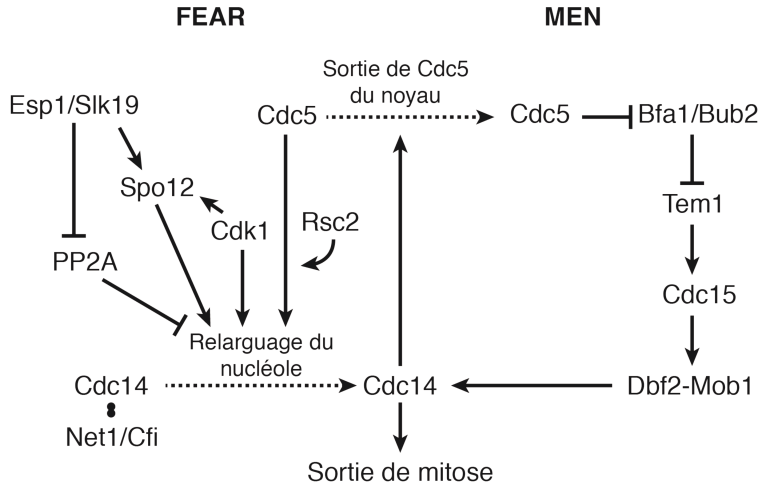


Figure 8 : Rôle de Cdc5 dans la régulation du FEAR et du MEN (d'après Botchkarev and Haber, 2018). La sortie de mitose est permise grâce à Cdc14. Pour cela Cdc14 doit être relargué du nucléole. La phosphorylation de Net1 par Cdk1 et Cdc5 permet le relarguage. Le FEAR est aussi contrôlé par d'autres facteurs. Une fois que Cdc5 est sortie du noyau, elle peut phosphoryler Bfa1 ce qui lève l'inhibition de Tem1 et va permettre d'induire la sortie de mitose.

En parallèle, Cdc5 intervient et contribue à la condensation des chromosomes en anaphase en ciblant les composés de la condensine : Brn1, Ycg1 et Ycs4 et l'allongement du fuseau mitotique (Park et al. 2008). De plus, Cdc5 peut cibler Sfi1 qui fait partie du corps des SPB. Cette interaction permettrait de prévenir une nouvelle duplication des SPB (initialement le SPB se duplique en phase S, le SPB dupliqué se dirige alors en direction de la cellule fille) avant la division complète de la cellule (Elserafy et al. 2014).

En conclusion, Cdc5, à nouveau, participe à des évènements hautement régulés de la mitose pour promouvoir l'achèvement de la division cellulaire. Son implication se traduit par deux étapes principales : la participation à la phosphorylation de Net1 pour permettre de relâcher Cdc14 du nucléole et la phosphorylation de Cdc15 directement ou par le biais de l'inhibition du complexe GAP Bfa1/Bub2.

e) Cytokinèse

Une fois que tout le matériel génétique a été divisé en deux parties dans les deux cellules et que la sortie de mitose a été effectuée, les deux cellules filles se séparent. Pour cela, la jonction entre les deux cellules, le budneck se resserre et se contracte. Pour permettre la contraction, plusieurs mécanismes entrent en jeu et Cdc5 participe à la régulation de plusieurs d'entre eux (Figure 9). Dans un premier temps, un anneau d'actine contractile (CAR, Contractile Actin Ring) se forme. Le CAR est une structure conservée et son assemblage est observé chez la levure comme chez l'Homme (Wloka et Bi 2012). L'assemblage du CAR est régulé par la GTPase Rho1. Cette GTPase favorise la polymérisation de l'actine au niveau du budneck (Tolliday, VerPlank, et Li 2002). Dans ce

processus, Cdc5 est requise pour une activation globale de Rho1. En effet Cdc5 va permettre de recruter et d'activer Tus1 et Rom2 qui sont des facteurs d'échange de guanine (GEF) et vont induire le recrutement et l'activation de Rho1 au niveau du budneck (Yoshida et al. 2006). Bem3, une GAP, a également été identifiée comme partenaires du PBD de Cdc5 par un crible (Snead et al. 2007). Cdc42 est une GTPase qui contrôle la polarité des cellules de levure. Bem3 et Bem2 ont à nouveau été identifiés comme des potentiels partenaires de Cdc5. Ils démontrent aussi que la diminution à un bas niveau d'expression de Cdc42 est nécessaire à la cytokinèse et que Cdc5 est un des régulateurs négatifs qui permettent cette diminution (Atkins et al. 2013). La régulation de l'expression de Cdc42 se fait probablement par le biais de l'interaction entre Cdc5, Bem2 et 3.

La protéine Hof1 est impliquée dans la cytokinèse en contribuant à la contraction de l'anneau d'actomyosine qui se situe au niveau du budneck et participe aussi à l'ingression de la membrane. Afin de réguler cette étape de la cytokinèse, plusieurs kinases phosphorylent Hof1 et contrôlent sa localisation et son activation. Parmi ces kinases se trouve Cdc5 (Meitinger et al. 2011).

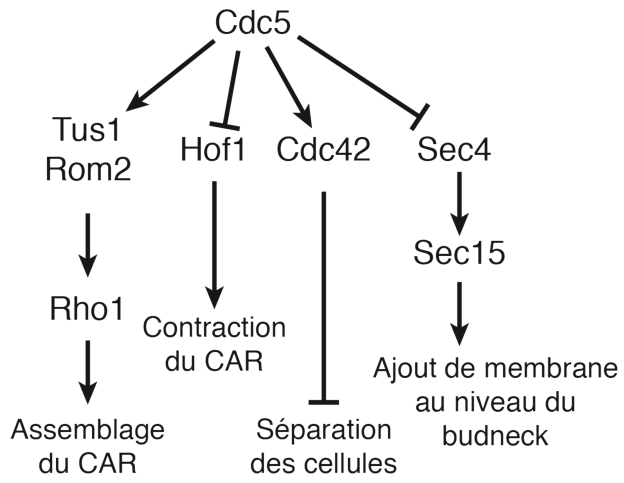


Figure 9 : Rôle de Cdc5 dans la régulation de la cytokinèse (d'après Botchkarev and Haber, 2018). Cdc5 contrôle plusieurs étapes de la cytokinèse. Elle phosphoryle Rho1 et Hof1 qui contribuent à l'assemblage et la contraction du CAR, et elle favorise aussi la séparation de la cellule en inhibant Cdc42 et en contrôlant la taille du budneck en empêchant Sec4 d'interagir avec Sec15.

Cdc5 joue un rôle dans les toutes dernières étapes de la mitose qui permettent d'obtenir deux cellules indépendantes lors de la cytokinèse. De plus, Cdc5 phosphoryle la protéine Sec4, une protéine impliquée dans le trafic membranaire, lorsqu'elle est présente sur des vésicules de sécrétion au niveau du budneck. Cette modification va alors empêcher l'interaction entre Sec4 et Sec15, l'effecteur en aval de Sec4, et interrompre l'ajout de nouvelle membrane plasmique au niveau du budneck (Lepore et al. 2016).

En conclusion, Cdc5 présente de nombreuses fonctions et localisations (Figure 10), c'est pourquoi elle est particulièrement dynamique au cours du cycle cellulaire. Plusieurs de ces fonctions pourraient intervenir en adaptation au checkpoint afin de promouvoir la reprise du cycle cellulaire après l'arrêt induit par un dommage et donc poursuivre la mitose.

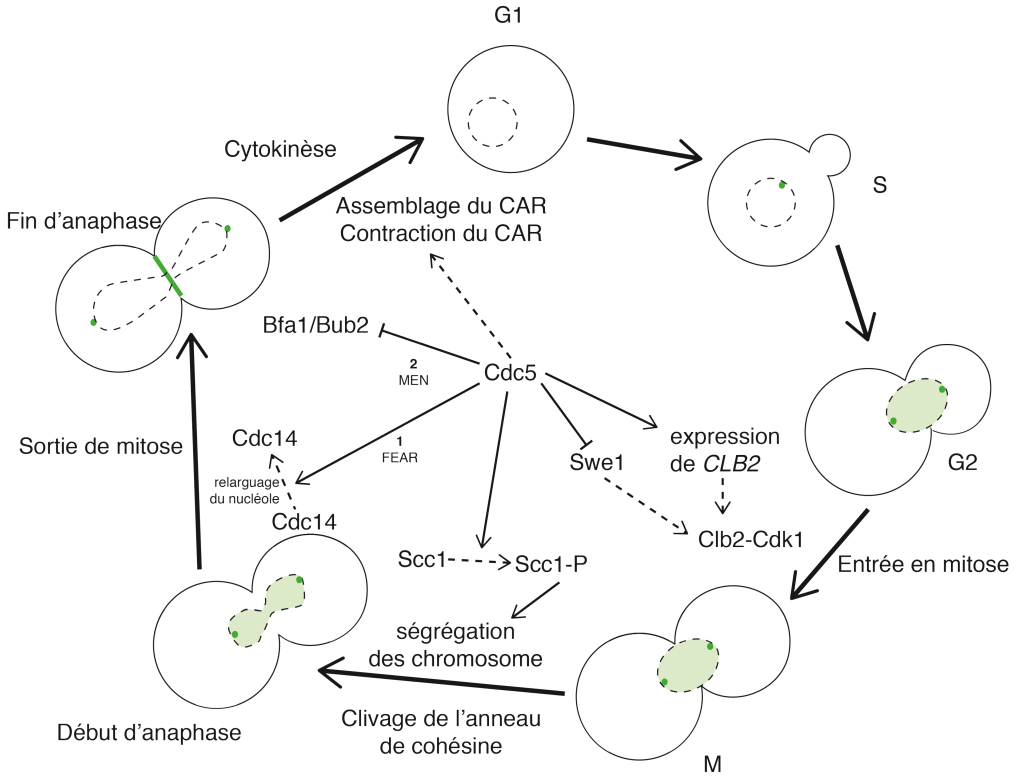


Figure 10 : Schéma récapitulatif des fonctions et localisations de Cdc5 au cours du cycle cellulaire. Cdc5 apparaît en phase S au niveau du SPB. Une fois que le SPB s'est dupliqué, en phase G2, Cdc5 s'accumule dans le noyau et au niveau des deux SPB et va contrôler l'entrée en mitose et le clivage de l'anneau de cohésine. En fin d'anaphase, Cdc5 participe au relargage de Cdc14 du nucléole avec la voie FEAR puis Cdc5 sort du noyau permet la sortie de mitose en induisant le MEN. Enfin Cdc5 contribue à différentes étapes de la cytokinèse.

3. Régulation et fonctions de Cdc5 en réponse aux dommages de l'ADN

Je vous ai présenté l'ensemble des fonctions connues de Cdc5 dans le cycle cellulaire. Elle en présente beaucoup notamment en mitose et en particulier pour la sortie de mitose.

Comme je l'ai mentionné dans le chapitre sur le checkpoint, Cdc5 est une cible de Rad53 en cas de dommage de l'ADN. Bien que l'interaction entre Rad53 et Cdc5 soit possible il n'y a pas de démonstration existante de phosphorylation par l'une ou par l'autre des deux kinases (Vidanes et al. 2010; Lopez-Mosqueda, Vidanes, et Toczyski 2010) En revanche, Rad53 peut inhiber Cdc5 indirectement par le biais de l'inhibition de l'interaction entre Ndd1 et Fkh2 ou en favorisant l'activation de Bfa1 habituellement inhibée par Cdc5. Mais la régulation de Cdc5, en réponse à un dommage de l'ADN, devient particulièrement

intéressante quand on sait que Cdc5 contribue à la sortie de mitose par l'adaptation en présence d'un dommage persistant.

a) Méthodes d'induction d'un dommage persistant pour étudier l'adaptation

Lorsque (Sandell et Zakian 1993) ont décrit pour la première fois des évènements d'adaptation chez la levure c'était en réponse à la perte d'un télomère d'un chromosome surnuméraire. Depuis cette étude, plusieurs systèmes ont été développés et utilisés pour comprendre l'adaptation. Cdc13 est une protéine qui se localise au niveau de l'ADN simple brin des télomères. Lorsque les cellules expriment l'allèle muté *cdc13-1* et qu'elles sont placées à température restrictive, 37°C (l'effet s'observe à partir d'une température supérieure à 25°C), la protéine Cdc13 perd sa fonction protectrice des télomères, les télomères sont alors résectés puis activent les checkpoint des dommages de l'ADN (Lin et Zakian 1996; Weinert, Kiser, et Hartwell 1994). La capacité à maintenir les cellules à température restrictive et induire facilement un dommage avec activation du checkpoint conditionnelle a fait de cette souche un outil largement utilisé pour étudier l'adaptation (Toczyski 2006). Une autre méthode d'induction d'un dommage persistant consiste à induire une cassure double brin et s'assurer qu'il n'est pas possible de la réparer, en empêchant la recombinaison homologue par délétion de *RAD52* par exemple. La cassure double brin est généralement induite par une endonucléase, le plus souvent HO ou I-SceI, ou une source exogène de dommage : les RI ou un composé chimique qui mime leur effets, comme la bléomycine. En comparaison aux RI, les endonucléase permettent une analyse plus précise (Toczyski 2006).

b) Fonctions de Cdc5 nécessaires à l'adaptation

Le crible de (Toczyski, Galgoczy, et Hartwell 1997) a identifié Cdc5 comme facteur de l'adaptation car l'allèle *cdc5-ad* présente une mutation ponctuelle qui conduit à la modification suivante de la séquence de Cdc5 : L251W. Les cellules exprimant cet allèle restent arrêtées, par l'activation du checkpoint, en présence d'un dommage persistant et ne s'adaptent pas.

En parallèle de l'adaptation, la perte progressive de l'hyper phosphorylation de Rad53 est observée. En revanche dans les cellules *cdc5-ad*, ce n'est pas le cas, Rad53 reste hyperphosphorylé (Pellicioli et al. 2001). L'allèle *cdc5-ad* présente un défaut spécifique et

prononcé de l'adaptation. En effet, son activité kinase n'est pas affectée et les cellules ne montrent pas de défaut dans de prolifération lorsqu'elles sont en conditions normales (Charles et al. 1998; Shirayama et al. 1998; Rawal et al. 2016). C'est pourquoi il est intéressant de l'utiliser comme outil pour étudier l'adaptation. De plus, contrairement à d'autres mutants d'adaptation, *cdc5-ad* n'influence pas la quantité d'ADN simple brin et n'interfère pas avec la voie de signalisation d'activation du checkpoint. Les cellules diploïdes hétérozygotes *CDC5/cdc5-ad* ne suppriment pas complètement le défaut d'adaptation aux dommages de l'ADN ce qui suggère que la mutation de l'allèle *cdc5-ad* pourrait ne pas être récessive (Dotiwala et al. 2007; Vidanes et al. 2010). Des résultats semblables concernant le niveau d'adaptation des cellules, ont été obtenus avec l'allèle mutant *cdc5-77* pour lequel l'activité kinase est diminuée et pour l'allèle *cdc5-T238A* dont l'activité kinase est diminuée de 60% (H. Ratsima et al. 2011; Rawal et al. 2016). L'activité kinase de Cdc5 est donc indispensable à l'adaptation.

Par la suite, un autre mutant de Cdc5 qui présente un défaut d'adaptation a été décrit et a permis d'identifier des fonctions et régulations de Cdc5 impliquées dans l'adaptation.

L'allèle *cdc5-16*, qui a été obtenu par le groupe de Damien D'amours, présente 3 mutations ponctuelles dans le PBD. Ces mutations empêchent l'interaction de Cdc5 avec ses substrats pré phosphorylés, son enrichissement aux SPB et confèrent un défaut d'adaptation (Ratsima et al. 2011; Ratsima et al. 2016). La surexpression de *cdc5-16* permet de restaurer sa capacité d'adaptation. En effet, le défaut de *cdc5-16* provient du fait qu'il présente une localisation défectueuse au niveau des SPB et donc que Cdc5 ne peut phosphoryler des substrats spécifiques. Le phénotype de *cdc5-16* peut aussi être supprimé lorsque la protéine est forcée aux SPB grâce à la fusion avec un domaine de la protéine Bbp1 qui permet sa localisation aux SPB. À noter que chez ce mutant, la déphosphorylation de Rad53 est plus rapide que chez les cellules exprimant *CDC5*. Une explication est que le défaut d'adaptation de *cdc5-16* n'affecte pas la fonction conduisant à l'inactivation du checkpoint ou suggère que la déphosphorylation de Rad53 n'est pas suffisante à l'adaptation.

L'activité de phospho-liaison dépendante du PBD est nécessaire à l'adaptation à plusieurs types de dommage : dans des cellules exprimant l'allèle *cdc13-1* à température restrictive, après traitement au MMS, une molécule qui conduit à l'alkylation de l'ADN, ou au 4-NQO qui permet de mimer les lésions causées par les rayons UV.

En conclusion, l'étude de mutants de *CDC5* en présence de dommages a permis de montrer que l'activité kinase de Cdc5 est nécessaire à l'adaptation et que sa localisation et fonctions aux SPB est également importante au bon déroulement de la reprise du cycle cellulaire par l'adaptation. Mais on ne connaît toujours pas les substrats spécifiques de Cdc5

s'ils existent qui permettent la reprise du cycle. De plus, l'adaptation est probablement un processus à plusieurs étapes.

4. Une autre fonction de Cdc5 : en méiose.

Pendant, la méiose, deux évènements de séparation des chromosomes s'enchaînent pour produire les gamètes à partir d'une cellule diploïde. Pendant la phase de méiose I, les chromosomes homologues sont séparés et en phase de méiose II, ce sont les chromatides sœurs qui le sont. Cdc5 est impliquée dans 3 évènements de la première phase de méiose. Cdc5 est requise pour la résolution des dHJ qui se forment pendant la RH (Clyne et al. 2003). Elle participe aussi au contrôle de la co-orientation des chomatides sœurs au niveau des kinétochores (Lee et Amon 2003). Enfin elle est impliquée dans l'élimination de la cohésine qui maintien les bras des chromosomes ensemble. En effet, Cdc5 phosphoryle Rec8 la sous-unité de la cohésine qui remplace Scc1 en méiose. Cette phosphorylation est indispensable à son clivage protéolytique (Attner et al. 2013). Cdc5 est donc un régulateur clé de la ségrégation des chromosomes en méiose I.

V. Les télomères et la sénescence

Les chromosomes des cellules eucaryotes étant linéaires leurs extrémités ressemblent à des cassures double brin accidentelles. Si elles étaient reconnues comme telle, le recrutement de la machinerie de réparation serait désastreux s'il résulte en la fusion de chromosomes. De plus, la machinerie de réplication n'est pas en mesure d'effectuer une réplication complète des extrémités. Afin d'échapper à ces deux « obstacles », il existe, à l'extrémité de chaque bras de chromosome, une région de l'ADN appelée télomère.

A. La séquence nucléotidique

Cette région de l'ADN est composée de séquences répétées riches en guanines et en thymines. La première séquence de répétition télomérique identifiée fut celle du cilié *Tetrahymena thermophilia* par E. Blackburn et J. Gall en 1978. Cette séquence est composée de 2 thymines suivies de 3 guanines 5'-TTGGG-3'. La nature des séquences répétées riches en guanine et en thymine est conservée parmi les eucaryotes mais présentent parfois de légères différences dans la séquence. Ces répétitions sont, chez *S. cerevisiae*, des séquences

dégénérées composées de $TG_{(1-3)}$ (Shampay, Szostak, et Blackburn 1984) et TTAGGG chez l'Homme par exemple. Le nombre de répétitions de la séquence est variable ce qui conduit à une longueur moyenne des télomères variable selon l'organisme. Chez *S. cerevisiae*, la taille des télomères est en moyenne de 300 paires de bases. Chez l'Homme, ils ont une longueur de 10 kilobases (kb) à la naissance et chez la souris, de manière surprenante, les télomères peuvent atteindre une longueur de plusieurs dizaines de kb selon la souche de souris.

La plupart des extrémités des chromosomes ne sont pas des extrémités franches mais plutôt des extrémités asymétriques où le brin riche en guanines forme une extrémité 3′ sortante d'ADN simple brin. Ce simple brin sortant est composé d'environ 5 à 10 nucléotides chez *S. cerevisiae* (Larrivée, LeBel, et Wellinger 2004; Soudet, Jolivet, et Teixeira 2014). Puisque le problème de réplication est asymétrique, la moitié des télomères raccourcissent à chaque réplication (Lingner, Cooper, et Cech 1995). En effet, seul un des deux télomères répliqués est plus court que le télomère parental. De plus, la télomérase allonge seulement une faible proportion de télomères par cycle cellulaire et le nombre de répétitions ajoutées est lui aussi variable. C'est pourquoi la longueur des différents télomères dans une cellule et entre cellules est très variable (Shampay et Blackburn 1988).

La structure télomérique avec une séquence riche en TG et une extrémité sortante en 3′ est conservée chez la plupart des eucaryotes étudiés mais ce n'est pas universel. Par exemple, la présence d'extrémité sortante en 5′ a été observée chez *Caenorhabditis elegans* (Raices et al. 2008) ou même des extrémités franches pour certains télomères chez *Arabidopsis thaliana* (Kazda et al. 2012) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Eberhard et al. 2019). Il existe aussi des organismes pour lesquels la séquence des extrémités n'est pas constituée de répétitions télomériques riches en TG. Chez *Drosophila melanogaster*, les extrémités sont composées de séquences alternées de rétrotransposons (Levis et al. 1993). En ce qui concerne les bactéries, bien que leur génome de la plupart soit circulaire et ne présente donc pas d'extrémités, certaines bactéries contiennent des chromosomes linéaires et donc des séquences aux extrémités apparentées à des télomères. En effet, les bactéries de type *Borrelia* présentent aux extrémités de ces fragments d'ADN linéaires des séquences répétées d'une vingtaine de paires de bases avec une structure en épingle à cheveux assimilées à des télomères (Casjens et al. 1997).

En amont des répétitions télomériques, les extrémités des chromosomes contiennent ce qui est communément appelé la région sous-télomérique. Chez *S. cerevisiae*, deux types d'éléments sous-télomériques ont été décrits : les éléments X et Y′. Une copie unique de l'élément X est retrouvée par télomère. Par contre, une à quatre copies de l'élément Y′ sont présentes au niveau d'environ 50% des télomères (Chan et Tye 1983). L'élément X est plus

ou moins variable en séquence et en taille alors que la séquence de l'élément Y′ est conservée et présente en deux tailles : 5,2kb ou 6,7kb (Chan et Tye 1983).

En conclusion, la séquence nucléotidique des télomères est riche en TG et répétée avec parfois une extrémité sortante en 3′ du brin riche en TG. Chez *S. cerevisiae*, les télomères font environ 300 pb et l'extrémité sortante mesure de 5 à 10 nucléotides.

B. Les protéines associées aux télomères

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques conservées au cours de l'évolution. Les télomères de *S. cerevisiae* ne forment pas de nucléosomes canoniques mais recrutent des protéines qui participent à leur protection (Wright, Gottschling, et Zakian 1992) (Figure 11). Ces protéines sont notamment importantes pour la protection et l'intégrité du télomère. Certaines protéines se lient à l'ADN double brin tandis que d'autres sont spécifiques de l'ADN simple brin, donc de l'extrémité sortante en 3′. La protéine Rap1 (Repressor Activator Protein 1) lie l'ADN double brin avec une forte affinité (Gilson et al. 1993). Les télomères contiennent de nombreux sites de liaison de Rap1, environ tous les 20 pb (Shore et Nasmyth 1987; Gilson et al. 1993). Cette protéine est impliquée dans la régulation de la taille des télomères et permet le recrutement d'autres protéines télomériques (Marcand et al. 1997). Elle contribue aussi majoritairement à la protection des télomères contre les fusions télomériques (Pardo et Marcand 2005; Marcand et al. 2008). Rap1 recrute Rif1 et Rif2 (Rap1-Interacting Factor 1 et 2) (Wotton et Shore 1997) et les protéines Sir3 et Sir4 (Silent Information Regulator 3 et 4) (Moretti et al. 1994; Kueng, Oppikofer, et Gasser 2013) qui se lient aux histones et interagissent avec Sir2, une histone déacetylase. Rif2 et Sir4 participent avec Rap1 à l'inhibition de la voie de réparation NHEJ (Stéphane Marcand et al. 2008). Le complexe SIR permet de maintenir la chromatine adjacente au télomère dans un état condensé d'hétérochromatine et ainsi réguler négativement l'activité transcriptionnelle au niveau des télomères, ce qu'on appelle le « Telomere Positioning Effect » (Gottschling et al. 1990).

Une autre protéine qui lie les télomères est le complexe Ku composé de yKu70 et yKu80 (Boulton et Jackson 1996b; 1996a). Ku est essentiel à la réparation par NHEJ et sa présence au niveau du télomère où la réparation est réprimée semble contradictoire. Son rôle au niveau du télomère n'est pas totalement résolu. Cependant il peut lier l'ADN télomérique et sa fonction aux télomères est nécessaire (Gravel et al. 1998).

Certaines protéines lient spécifiquement l'ADN simple brin de l'extrémité sortante 3' du brin riche en G comme Cdc13 (Garvik, Carson, et Hartwell 1995; Lin et Zakian 1996).

Cdc13 a plusieurs rôles aux télomères. En effet, Cdc13 peut interagir avec Est1 (Ever Short Telomere 1) une sous-unité de la télomérase. Deux autres protéines essentielles avec lesquelles Cdc13 interagit sont Stn1 (Suppressor of cdc ThirteeN 1) et Ten1 (TElomeric pathways with StN1 1), ces deux protéines peuvent aussi se lier à l'ADN simple brin (Grandin, Reed, et Charbonneau 1997; Grandin, Damon, et Charbonneau 2001). Ensemble elles forment le complexe CST. Le mutant thermosensible de *cdc13-1* conduit à la résection excessive dans la région télomérique et sous-télomérique lorsqu'il est placé à température restrictive (Garvik, Carson, et Hartwell 1995; Booth et al. 2001). L'ADN simple brin généré entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G2/M dépendant de Rad9 (Lydall et Weinert 1995).

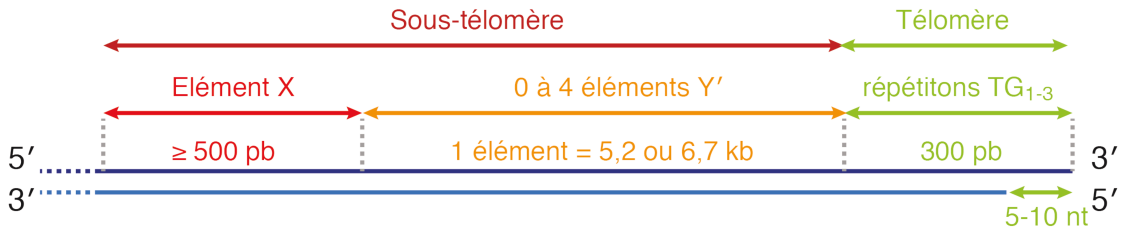
Les protéines qui lient l'ADN télomériques ont une fonction protectrice. Chez *S. pombe* et chez l'Homme, toutes les protéines n'ont pas forcément d'homologue mais partagent des domaines et fonctions conservés (Figure 11).

En conclusion, la fonction principale des protéines télomériques est de protéger les télomères en empêchant la réparation par RH ou NHEJ et en évitant leur reconnaissance par les mécanismes de surveillance de la cellule.

Le recrutement des voies de réparation serait un risque de convertir les extrémités des chromosomes, par tentative de réparation, en des fusions télomériques par exemple. Bien que la plupart de ces protéines soient essentielles à la viabilité de la cellule, des mutants spécifiques ont permis de mettre en évidence ces caractéristiques de protection du télomère. Lorsque la protéine Rap1 est dégradée, les cellules accumulent des fusions intra-télomériques dépendantes de la voie NHEJ (Pardo et Marcand 2005). De manière similaire, lorsqu'un dominant négatif de TRF2, protéine shelterin humaine, est utilisé, des fusions télomère-télomère apparaissent (van Steensel, Smogorzewska, et de Lange 1998). L'activation du checkpoint est aussi empêchée par Rif2 qui inhibe la liaison de Tel1 avec Xrs2 (Hirano, Fukunaga, et Sugimoto 2009).

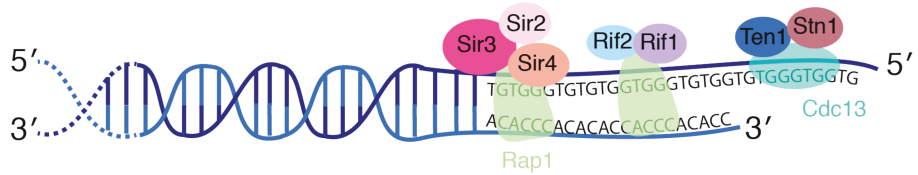
A Structure des télomères

Saccharomyces cerevisiae

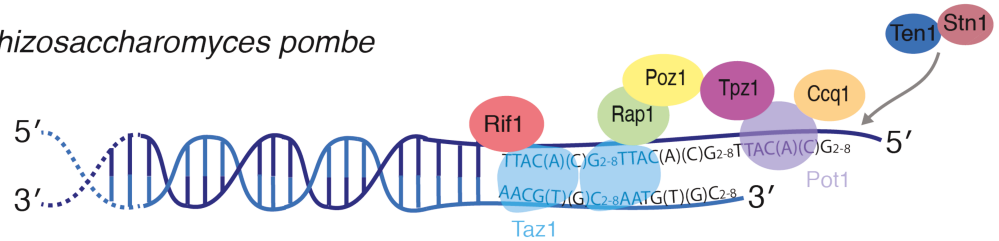


B Protéines télomériques

Saccharomyces cerevisiae



Schizosaccharomyces pombe



Homo sapiens

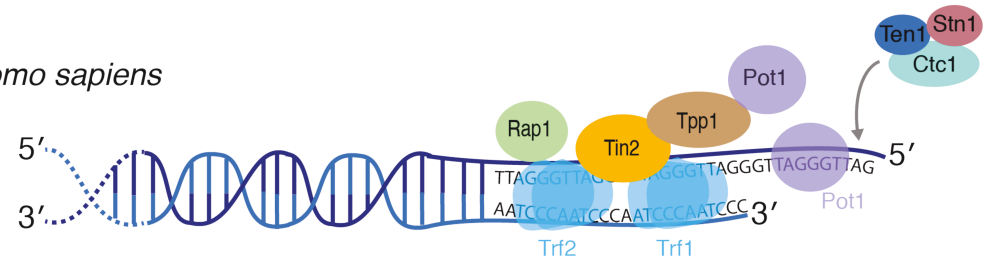


Figure 11 : Structure du télomère et protéines télomériques. A. Différents élément du télomère de *S. cerevisiae*. **B.** Protéines télomériques des espèce *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *H. sapiens*.

C. La réplication des télomères

De par leur structure particulière et leur séquence faite de motifs répétés, les télomères sont des régions à risque pour la machinerie de réplication. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène : (i) la région est riche en GC et ils sont susceptibles de former des structures secondaires sous forme de G-quadruplexes. Cette structure représente un obstacle pour la réplication et peut être la cause d'instabilité génomique (Lopes et al. 2011) : (ii) les origines de réplication proche des télomères sont activées tardivement ; (iii) la liaison avec Rap1 est de forte affinité et peut gêner la machinerie de réplication ; (iv) la transcription télomérique peut engendrer des conflits entre les deux machineries. Les hélicase 5′-3′, Rrm3 et Pif1, permettent, entre autres, d'aider à la réplication des télomères (Ivessa et al. 2002; Byrd et Raney 2017).

Le problème de réplication des extrémités est aussi intrinsèque au mécanisme de réplication. Il se trouve qu'à chaque épisode de réplication, quelques bases de l'extrémité ne sont pas répliquées et cette petite séquence est donc perdue., ce modèle a été décrit pour la première fois par A. Olovnikov et J. Watson (Olovnikov 1973; Watson 1972). Deux causes possibles étaient proposées pour expliquer ces quelques nucléotides manquants: (i) la conformation de la polymérase fait que l'activité catalytique de la polymérase permettant de dupliquer l'ADN est éloignée des bordures de la protéine elle-même. Cet espace de quelques nucléotides constituerait donc une zone où la protéine était fixée une dernière fois à l'ADN. (ii) La plupart des polymérases utilisent une amorce ARN qui est par la suite dégradée, la perte d'information aux extrémités correspondrait alors à la longueur de cet ARN. Par ailleurs, il est suggéré que l'amorce la plus éloignée est retirée et constitue un intervalle à l'extrémité 5′ et donc une extrémité sortante en 3′. Le produit de la réplication serait donc plus court que la matrice (Watson 1972).

La plupart des chromosomes linéaires eucaryotes présentent une extrémité sortante en 3′. En effet, le brin riche en C aux extrémités du chromosome est partiellement dégradé de 30 à 40 nucléotides ce qui explique la génération de l'extrémité sortante (Wellinger et al. 1996; Wellinger 2014) avant d'être prolongé à nouveau par synthèse d'ADN en laissant un espace de 5 à 10 nucléotides (Soudet, Jolivet, et Teixeira 2014).

Le problème de réplication des extrémités est donc la conséquence à la fois d'une matrice d'ADN plus courte en ce qui concerne le brin retardé et à la fois à la nécessité de recréer la structure du télomère caractéristique avec son extrémité sortante en 3′ pour le brin continu.

D. L'élongation des télomères par la télomérase

Le problème de réplication des extrémités sera évidemment rencontré à chaque cycle cellulaire, ce qui conduit à un raccourcissement progressif des télomères. Pour contrer cette perte de séquence d'ADN, les cellules expriment une enzyme spécifique qui permet d'allonger les télomères et qui a été mise en évidence par C. Greider et E. Blackburn chez *Tetrahymena* (Shampay, Szostak, et Blackburn 1984; Greider et Blackburn 1985).

1. Les sous-unités de la télomérase

Cette enzyme est une transcriptase inverse capable d'ajouter des répétitions télomériques à la séquence existante. Pour cela elle utilise une matrice ARN dont la séquence est complémentaire au motif de répétition du télomère (Greider et Blackburn 1989). En parallèle de la découverte de la matrice ARN, un gène est identifié pour être impliqué dans le maintien des télomères. Ce gène a été appelé *EST1* en référence au phénotype « Ever Short Telomeres » (Lundblad et Szostak 1989). Le problème de réplication des extrémités exposé plus haut nécessite donc effectivement une voie spécifique pour contrebalancer la perte de séquence nucléotidique à chaque réplication de l'ADN qui est réalisée par la télomérase. D'autres gènes ont ensuite été identifiés codant les autres sous-unités de la télomérase chez *S. cerevisiae* : *TLC1* (TeLomerase Component 1) (Singer et Gottschling 1994) qui code pour la sous unité ARN, le gène codant pour la sous-unité catalytique *EST2* (Lingner et al. 1997) et *EST3* (Lendvay et al. 1996).

La télomérase allonge le brin 3′ du télomère riche en G puis une polymérase peut synthétiser le brin complémentaire riche en C (Greider et Blackburn 1989).

2. Le recrutement de la télomérase

L'activité de la télomérase permet de réguler la taille des télomères chez *S. cerevisiae*. À chaque réplication, la télomérase n'agit pas sur tous les télomères et son recrutement et son activité sont en partie régulés par la longueur des télomères. En effet, la télomérase allonge de préférence les télomères courts (Teixeira et al. 2004). La télomérase n'est pas recrutée au niveau d'une extrémité franche mais au niveau de l'extrémité sortante en 3′. Le maintien de l'extrémité sortante en 3′ permet donc aux télomères d'être un substrat potentiel de la télomérase. Le recrutement de la télomérase est également régulé par les protéines télomériques.

La protéine Cdc13 est impliquée dans le recrutement de la télomérase, en phase S/G2, via son interaction avec Est1 (Evans et Lundblad 1999). Le recrutement de la télomérase dépend aussi des protéines du checkpoint. Dans les cellules où *TEL1* ou les gènes codant pour les sous-unités de MRX sont délétés, les télomères sont très courts (Lustig et Petes 1986) et la liaison de Tel1 aux télomères courts est plus élevée que pour des télomères de taille normale (Sabourin, Tuzon, et Zakian 2007). Comme pour les cassures double brin, le recrutement de Tel1 aux télomères est dépendant de son interaction avec Xrs2 (Sabourin, Tuzon, et Zakian 2007). Or MRX se lie aux télomères qui ont été répliqués par la polymérase du brin direct (Faure et al. 2010). De même, la délétion de *TEL1* affecte la résection du brin direct uniquement (Soudet, Jolivet, et Teixeira 2014) Une hypothèse est que Tel1 phosphoryle une ou plusieurs protéines télomériques au brin direct ce qui engendre des changements de la chromatine télomérique favorisant le recrutement de la télomérase au brin direct (Wellinger et Zakian 2012).

Parce que Rap1 lie les télomères à intervalles plutôt réguliers, la longueur des télomères est proportionnelle au nombre de protéines Rap1 liées (Marcand et al. 1997). Rap1 recrute Rif1 et Rif2 et ces protéines régulent négativement la télomérase (S. Marcand et al. 1997). La fonction de Rif2 dans la répression de la télomérase pourrait se faire par compétition entre Tel1 et Rif2 pour le site de fixation de Xrs2. Cette hypothèse provient d'une étude réalisée sur des cassures double brin mais n'a pas été confirmée au télomère (Hirano, Fukunaga, et Sugimoto 2009). L'hélicase Pif1 est, elle-aussi, un régulateur négatif de la télomérase (Schulz et Zakian 1994) et lie préférentiellement les télomères longs et redirige indirectement l'action de la télomérase sur les télomères courts (Byrd et Raney 2017).

En conclusion, la télomérase est une transcriptase inverse qui permet l'élongation des télomères courts afin de contrer leur raccourcissement progressif et maintenir la fonction de protection du génome par les télomères. Cependant, la plupart des cellules somatiques humaines n'expriment pas la télomérase.

E. La sénescence réplicative

Les premières observations de cultures cellulaires qui « vieillissent » ont été réalisées par L. Hayflick dans les années 1960. Des fibroblastes humains en culture s'arrêtaient de proliférer à partir d'un certain nombre de générations (Hayflick et Moorhead 1961). Ce nombre de divisions limité a été nommé « limite d'Hayflick », c'est lorsque cette limite est atteinte que les cellules entrent en sénescence réplicative. La corrélation entre le

raccourcissement progressif des télomères, jusqu'à la perte du potentiel de prolifération, et l'arrêt des cellules caractérisé par leur « dégénérescence » mentionnée dans le texte original a ensuite été établie.

Chez *S. cerevisiae*, la télomérase est activée de manière constitutive, la perte de séquences télomériques est contrée par la télomérase au cours des générations successives et c'est le cas pour la plupart des organismes unicellulaires étudiés. En revanche, chez certains organismes pluricellulaires, et en particulier chez l'Homme, la télomérase n'est pas exprimée dans les cellules somatiques En effet, lorsque des fibroblastes primaires sont placés en culture, leurs télomères raccourcissent (Harley, Futcher, et Greider 1990; Hastie et al. 1990). De plus, ces cellules peuvent retrouver un potentiel prolifératif infini grâce à l'élongation des télomères lorsque la télomérase est complémentée (Bodnar et al. 1998).

Lorsque les télomères atteignent une taille critique, ils ne peuvent plus assurer leur fonction de protection des extrémités et sont reconnus par les mécanismes de surveillance. En conséquence, le checkpoint est activé et la cellule s'arrête. Cet arrêt est ce qu'on appelle la sénescence réplicative (d'Adda di Fagagna et al. 2003; Enomoto, Glowczewski, et Berman 2002; IJpma et Greider 2003) (Figure 12).

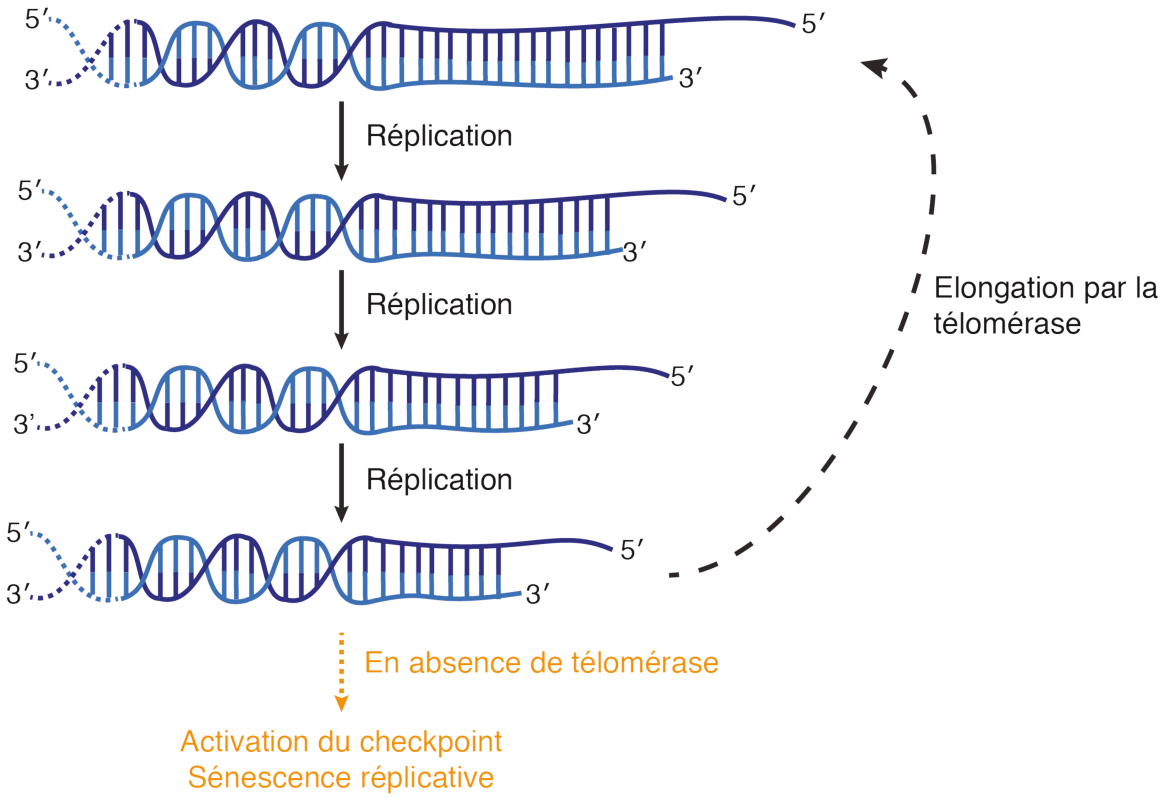


Figure 12 : Le raccourcissement progressif des télomères induit la sénescence réplicative. Le problème de réplication des extrémités conduit à un raccourcissement progressif des télomères. Lorsque les télomères sont courts, ils sont allongés par la télomérase. En absence de la télomérase, le raccourcissement exacerbé des télomères provoque l'activation du checkpoint et la sénescence réplicative.

1. L'activation du checkpoint en sénescence réplicative

Chez les organismes multicellulaires, la sénescence a un rôle anti-tumoral. En restreignant la division des cellules, l'induction de la sénescence permet d'éviter la propagation de cellules qui peuvent présenter de l'instabilité génomique (Campisi et d'Adda di Fagagna 2007; Feldser et Greider 2007).

Bien que la corrélation entre le vieillissement et la sénescence réplicative ne soit pas parfaitement établie, leurs mécanismes sont probablement intriqués. Chez des primates, des cellules sénescentes s'accumulent dans la plupart des tissus lorsque l'organisme vieillit (Jeyapalan et al. 2007). Chez l'Homme, des mutations dans les gènes codant les sous-unités de la télomérase ou des protéines télomériques sont associées à des syndromes de vieillissement prématuré. La taille des télomères est alors affectée et est indicative de la sévérité de la maladie (Armanios et Blackburn 2012). Les télomères jouent donc le rôle d'horloge moléculaire au sein de la cellule.

Chez *S. cerevisiae*, la sénescence réplicative n'existe pas physiologiquement. Cependant, lorsqu'une des sous-unités de la télomérase est inactivée, une limite de prolifération, similaire à la limite d'Hayflick, est observée (Lundblad et Szostak 1989). À cause du problème de réplication des extrémités, les télomères raccourcissent de 3 à 4 pb par génération. Lorsque les télomères deviennent trop courts, les protéines télomériques ne sont plus en mesure de les protéger et ils sont reconnus comme une structure semblable à une cassure double brin. Le checkpoint est activé et enclenche l'arrêt du cycle cellulaire (Teixeira 2013).

La relation entre les télomères et le checkpoint n'est pas complètement comprise. Bien que la fonction principale du télomère et ses protéines soit d'éviter la reconnaissance des extrémités par le checkpoint et les machineries de réparation, certaines protéines du checkpoint sont impliquées dans leur homéostasie. En effet, le complexe MRX et la protéine Tel1 contribuent à l'élongation des télomères par la télomérase. Leur présence conduit à la résection en 5′→ 3′ afin de former une extrémité sortante en 3′. Cependant, la présence de l'ADN télomérique simple brin n'enclenche pas nécessairement l'activation de Mec1 (McGee et al. 2010). Cela est probablement dû à la présence de Cdc13 qui se lie à l'ADN simple brin télomérique et qui inhibe la liaison de RPA au niveau de cette région. Que se passe t-il lorsque la télomérase est absente ?

Contrairement à une cassure double brin, le mécanisme moléculaire et les régulations d'activation du checkpoint en réponse à un télomère court ne sont pas complètement caractérisés. Chez *S. cerevisiae*, les populations de cellules n'exprimant pas la télomérase s'enrichissent en cellules arrêtées en G2/M avec le nombre de générations (Enomoto, Glowczewski, et Berman 2002; IJpma et Greider 2003). Cependant, cet arrêt observé induit par l'hyperphosphorylation de Rad53 est partiellement indépendant de Rad9. L'explication est, qu'en réponse au raccourcissement des télomères, la phosphorylation de Rad53 est dépendante de Rad9, Mec1 et Rad24 mais aussi de Mrc1 (Nathalie Grandin, Bailly, et Charbonneau 2005). Mrc1 joue particulièrement sa fonction d'adaptateur du checkpoint en cas de stress réplicatif. Les télomères courts semblent donc être reconnus à la fois par le checkpoint des dommages de l'ADN et par le checkpoint de la réplication. En revanche, le ou les signaux en faveur de l'une ou l'autre des voies ne sont pas connus.

Les télomères, en plus de raccourcir, peuvent présenter des lésions, leur séquence peut être modifiée ou la fonction d'une protéine télomérique peut être compromise. Il est possible que certains télomères atteignent une taille critique par cassure accidentelle au lieu du raccourcissement progressif pendant la réplication. En présence de télomérase, ces cassures seraient contrées par élongation du télomères. En son absence, le checkpoint est activé. La question que l'on peut se poser est de savoir si la réponse aux télomères courts leur est propre ou si la même réponse est engendrée par des télomères endommagés. Par exemple, l'allèle *cdc13-1*, décrit plus haut pour lequel les cellules sont thermosensibles lorsque la température dépasse 25°C n'enclenche pas la même réponse. Lorsque les cellules sont placées à température restrictive, l'activation de Rad53 qui provoque l'arrêt en G2/M est dépendante de Rad9 et Mec1 mais indépendante de Mrc1. Le même type d'observation peut être fait dans des mutants de délétion du complexe Ku. En effet, les cellules qui n'expriment pas ce complexe présentent des télomères non protégés. Cependant, ici, la protéine checkpoint activée est Mad2, une protéine du checkpoint du fuseau mitotique qui permet d'assurer le bon alignement de celui-ci (Dewar et Lydall 2012).

2. La dynamique de sénescence

L'activation du checkpoint, qui entraîne l'entrée en phase de sénescence réplicative, requièrt chez les cellules de mammifères plusieurs télomères très courts (Kaul et al. 2011). En revanche, un seul télomère de taille critique est nécessaire pour enclencher la sénescence réplicative chez *S. cerevisiae*. En effet, grâce à un système permettant d'obtenir un télomère très court unique artificiel, l'équipe de Maria Teresa Teixeira a montré qu'un télomère de

taille critique est suffisant pour enclencher une réponse checkpoint accompagné de l'enrichissement de Mec1 et Tel1 au niveau de ce télomère (Abdallah et al. 2009; Khadaroo et al. 2009). Cette notion a été consolidée par modélisation où la distribution de la taille des différents télomères de la cellule a été prise en compte et qui met en évidence à nouveau que le télomère le plus court enclenche la sénescence réplicative (Xu et al. 2013). La taille moyenne des télomères lorsque l'arrêt du cycle cellulaire de la sénescence réplicative est induit est d'environ 100 à 120 pb mais le télomère qui a provoqué cet arrêt est significativement plus petit. D'après un modèle mathématique établi en collaboration avec le laboratoire, ce télomère pourrait atteindre la taille critique d'une vingtaine de pb (Bourgeron et al. 2015). Mais biologiquement, la taille du télomère court et le seuil, s'ils existent, ne sont pas connus.

Cette explication de l'entrée en sénescence réplicative en réponse à un télomère court est un peu simpliste et la dynamique de sénescence est en réalité plus complexe. La possibilité que les études en population masquent certaines caractéristiques de la sénescence avait été soulevée auparavant (Enomoto, Glowczewski, et Berman 2002; IJpma et Greider 2003; Lundblad et Szostak 1989). Mais c'est le développement des technologies en cellules uniques qui ont permis de mettre en évidence l'ampleur de l'hétérogénéité de la dynamique de sénescence dans des lignées individuelles de cellules (Xu et Teixeira 2019). La méthode de microfluidique développée au laboratoire en collaboration avec Gilles Charvin a ainsi pu mettre en évidence que bien que les cellules de la plupart des lignées se divisent normalement jusqu'à ce qu'elles entrent abruptement en sénescence réplicative, certaines lignées présentent des arrêts stochastiques du cycle cellulaire ne correspondant pas à l'arrêt terminal de la sénescence réplicative (Xu et al. 2015). Ces arrêts non terminaux, induits par l'activation du checkpoint, peuvent être observés quelques générations après l'inactivation de la télomérase. Ils sont suivis en général de quelques cycles longs puis la cellule peut reprendre ensuite un cycle cellulaire ordinaire (Xie et al. 2015; Xu et al. 2015) (Figure 13).

En conclusion, en absence de télomérase, l'activation du checkpoint est caractéristique de la sénescence réplicative en présence d'un télomère qui a atteint progressivement une taille critique. Le checkpoint peut aussi s'activer pendant la phase de « présénescence », c'est-à-dire avant que le raccourcissement des télomères n'ait engendré un télomère critiquement court mais cette activation du checkpoint pourrait être due au dysfonctionnement d'un télomère (dommage, stress réplicatif, protéine télomérique affectée etc).

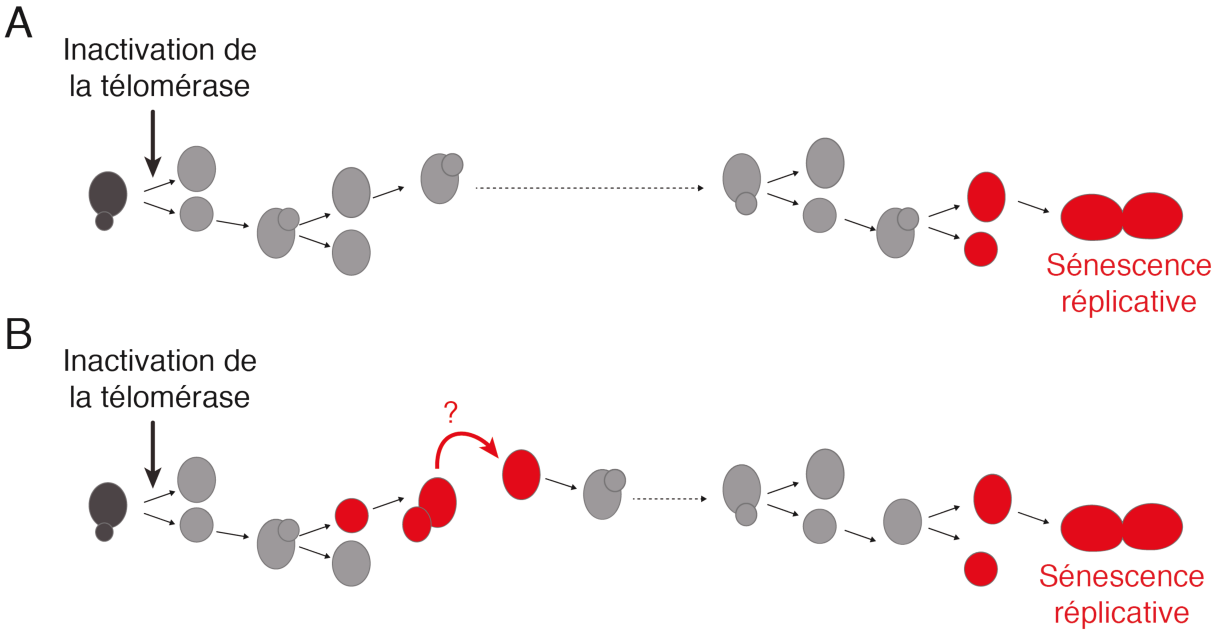


Figure 13 : La dynamique de sénescence. Après inactivation de la télomérase, deux types de lignées sont observés. **A.** Des lignées qui se divisent un certain nombre de générations jusqu'à ce que la cellule s'arrête Plusieurs arrêts peuvent ensuite s'enchaîner avant d'enclencher la sénéscence réplicative qui sera suivie de la mort cellulaire. **B.** Des lignées présentent parfois des arrêts du cycle non terminaux qui peuvent être prolongés (> 6 heures). Le mécanisme qui permet à ces cellules de se reprendre leur cycle n'est pas caractérisé et fait l'objet de cette thèse.

3. Mécanismes d'échappement à la sénescence

En absence de télomérase, les télomères peuvent être allongés par un mécanisme différent dépendant de la recombinaison (Lundblad et Blackburn 1993). Ce mécanisme est aussi décrit chez les cellules de mammifères, il est appelé Alternative Lenthening of Telomere (ALT) et est associé à une petite fraction des cellules cancéreuses. Chez *S. cerevisiae*, deux voies possibles contribuent à l'émergence de ces « survivants post-sénescence », permettant de les classer en deux types. Les survivants de type I sont plus fréquents que les survivants de type II. Cependant, en culture liquide, les survivants de type I poussent lentement et sont rapidement remplacés par des survivants de type II (Teng et al. 2000).

Les survivants de type I présentent à leur extrémité de multiples répétitions de l'élément sous-télomérique Y′ avec entre 50 et 150 pb de séquence télomérique en TG (Lundblad et Blackburn 1993; Larrivée et Wellinger 2006). Les facteurs de recombinaison Rad52, Pol32 mais aussi Rad51, Rad54 et Rad57 sont nécessaires à la formation des survivants de type I (Le et al. 1999; Chen, Ijpma, et Greider 2001).

Les survivants de type II, présentent une forte amplification de répétitions $TG_{1\text{-}3}$. Leur taille est très hétérogène (Teng et Zakian 1999). À la différence des survivants de type I, leur

génération requièrt le complexe MRX, Rad59 et l'hélicase Sgs1, mais aussi Rad52 et Pol32 (Chen, Ijpma, et Greider 2001).

4. L'instabilité génomique en sénescence

La fonction des télomères est de protéger les extrémités des chromosomes contre des processus qui pourraient conduire à de l'instabilité génomique. En absence de télomérase, l'instabilité génomique augmente progressivement (Hackett, Feldser, et Greider 2001; Ijpma et Greider 2003; Lundblad et Szostak 1989). L'instabilité génomique et en particulier la formation de réarrangements chromosomiques augmentent environ dix fois en sénescence. Ces réarrangements sont souvent des translocations réciproques pouvant être expliquées par des évènements de réparation par la voie BIR. De plus, un gradient est observé le long du chromosome et le taux d'instabilité génomique diminue en s'éloignant des télomères suggérant que l'instabilité génomique observée en sénescence est bien liée aux télomères (Hackett et Greider 2003).

La quantité d'ADN simple brin généré au niveau des télomères pourrait contribuer à l'augmentation de l'instabilité génomique, puisque celle-ci dépend de l'exonucléase Exo1 (Fallet et al. 2014; Garvik, Carson, et Hartwell 1995; Hackett et Greider 2003). Les mécanismes de réparation qui sont recrutés à la suite de l'activation du checkpoint pourraient conduire à l'émergence d'instabilité génomique. Cette hypothèse est cohérente avec le modèle suggérant que l'augmentation progressive de l'instabilité génomique augmente avec le nombre de télomères courts qui s'accumulent et donc la quantité d'ADN simple brin.

En conclusion, l'instabilité génomique augmente en sénescence réplicative et bien que les mécanismes conduisant à cette augmentation ne soient pas complètement caractérisés, la génération d'ADN simple brin aux télomères semble être impliquée.

Les cellules cancéreuses présentent une forte instabilité génomique. Or l'incidence des cancers augmente considérablement avec l'âge, c'est même le premier facteur de risque. Les cellules contenant des télomères courts voire très courts deviennent probablement des cellules à risque où ces réarrangements peuvent contribuer à la transformation cancéreuse. Comprendre les mécanismes d'augmentation de l'instabilité génomique en sénescence pourrait aider à expliquer les premières étapes de la tumorigenèse.

VI. Problématique de la thèse

Nous avons vu que les dommages à l'ADN sont reconnus par la voie des checkpoints qui, une fois activée, permet l'arrêt du cycle pour donner le temps aux machineries de réparation d'être recrutées et de réparer le dommage. Une fois le dommage réparé, la cellule entre en phase de recovery et reprend le cours de son cycle. Cependant, nous avons vu aussi que le cycle peut reprendre sans que réparation n'ait eu lieu grâce à un processus appelé adaptation au checkpoint des dommages de l'ADN. De plus, ce phénomène conduit à l'augmentation d'instabilité génomique et on sait que l'adaptation peut être une réponse à un dommage télomérique (mutant *cdc13-1*).

Le projet que j'ai mené au cours de ma thèse consistait à identifier si l'adaptation joue un rôle dans la dynamique de sénescence et peut intervenir dans la reprise du cycle cellulaire à la suite d'un arrêt prolongé. De plus, dans le cas d'une implication de l'adaptation en sénescence, il est raisonnable de se demander si ce phénomène contribue à l'augmentation d'instabilité génomique observée en sénescence réplicative (Figure 14).

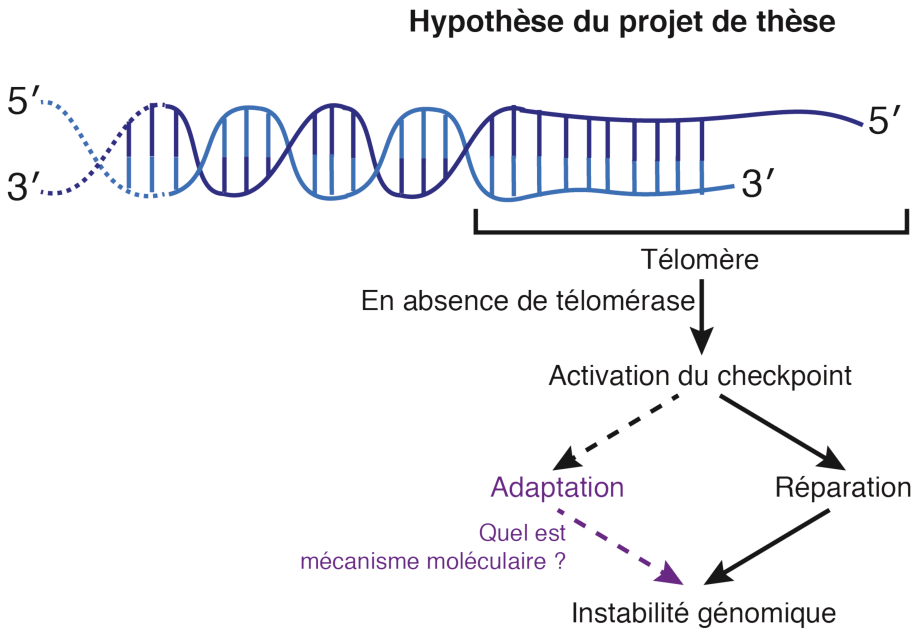


Figure 14 : Hypothèse de travail sur laquelle s'est appuyé ce projet de thèse. En absence de télomérase, des dommages télomériques ou le raccourcissement peuvent induire l'activation du checkpoint dès les premières générations suivant l'inactivation de la télomérase. Notre hypothèse est que la reprise du cycle cellulaire peut être favorisée par un événement d'adaptation et qu'en conséquence de l'adaptation, l'instabilité génomique augmente. Quel est le mécanisme moléculaire qui permet de s'adapter ?

J'ai ensuite tenté de caractériser les bases moléculaires et les régulations impliquées en réponse au dysfonctionnement télomérique.

Afin de réaliser ces deux objectifs, je me suis appuyée sur les systèmes d'études en cellules uniques du laboratoire permettant d'obtenir des informations plus précises sur ces

deux phénomènes, la sénescence et l'adaptation, qui sont particulièrement hétérogènes, notamment en termes de cinétique.

RESULTATS

La réponse aux dommages de l'ADN est complexe et peut avoir différentes issues selon le type de dommage ou la phase du cycle cellulaire pendant laquelle le dommage est détecté. La perte progressive du potentiel prolifératif accompagnant le raccourcissement des télomères en absence de télomérase enclenche aussi une réponse apparentée au checkpoint lorsqu'un des télomères atteint une taille critique. Comme la sénescence est un phénomène hétérogène (Xu et Teixeira 2019) le laboratoire a développé en collaboration avec Gilles Charvin (IGBMC, Stasbourg) un système de microfluidique couplé à la microscopie résolue en temps. Grâce à ce système, les cycles cellulaires successifs de chaque lignée individuelle de cellules peuvent être analysés. Cette stratégie d'étude en cellules uniques a permis de mettre en évidence des arrêts non terminaux (Xu et al. 2015). C'est pourquoi, nous suggérons que l'activation du checkpoint provoquant ces arrêts non terminaux ne correspond pas au raccourcissement progressif des télomères mais plutôt à un dommage télomérique causé par l'absence de télomérase. La première partie de ma thèse s'est concentrée sur le mécanisme d'adaptation et en particulier sur sa contribution à la reprise du cycle cellulaire après ces arrêts non terminaux. Nous avons à nouveau utilisé la méthode de microfluidique avec des souches de *S. cerevisiae* où la télomérase est inactivée de manière conditionnelle afin de caractériser la reprise du cycle cellulaire après un arrêt non terminal. Cette partie de la thèse a abouti à deux publications en premier auteur. La première dans la revue scientifique *Genes and Development* en novembre 2018 (Coutelier, *et al.* 2018) et la seconde sous forme de revue sur les connaissances de l'adaptation en sénescence et ses conséquences dans le journal *Current Genetics* en janvier 2019 (Coutelier et Xu 2019). J'ai résumé dans la partie résultats les principales conclusions du travail de Coutelier *et al*, 2018 afin d'introduire l'article. Lorsque je fais référence à cette publication, la mention est en bleue comme dans l'exemple suivant : Figure **. Au cours de cette étude, nous avons montré que l'adaptation peut être observée en réponse à des arrêts du cycle cellulaire en absence de télomérase et que ces événements ont une conséquence sur l'instabilité génomique de la population de cellules. Des résultats complémentaires qui n'ont pas été inclus dans l'article publié sont décrits à la suite de l'article.

Malgré des avancées sur la compréhension du rôle de Cdc5 en adaptation, l'adaptation est encore mal caractérisée. C'est pourquoi, pendant la seconde partie de ma thèse, nous avons fait le choix d'étudier cette protéine et sa régulation en réponse à un dommage télomérique afin de mieux comprendre ce processus et de caractériser la survenue d'instabilité génomique. Les résultats de cette étude font l'objet de la deuxième partie des résultats. Afin

de caractériser les évènements d'adaptation de cellules individuelles, j'ai utilisé à nouveau un système de microfluidique. J'ai montré qu'en réponse à un dommage télomérique, Cdc5 est régulée à différents niveaux afin de réunir les conditions propices à l'adaptation, suggérant que l'adaptation est un phénomène à plusieurs paramètres et/ou plusieurs étapes.

I. L'adaptation au checkpoint en absence de télomérase

A. Résumé des résultats de l'article Coutelier, Xu *et al*, 2018.

Au cours de cette étude, nous avons confirmé et complété les données publiées dans (Xu et al. 2015) concernant la dynamique de sénescence (n = 187 lignées indépendantes). Pour étudier la sénescence, nous utilisons au laboratoire un système de promoteur tetO_2-OFF/tetO_2-ON régulé par des tétracyclines. Le système est placé en amont du gène cible dont on veut activer ou inhiber l'expression. L'ajout de la tétracycline appropriée permet soit d'activer l'expression du gène soit au contraire de l'inhiber selon le promoteur choisi. Pour inhiber la télomérase, nous utilisons un système tetO_2-OFF inséré en amont du gène *TLC1*, la sous-unité ARN matrice de la télomérase nécessaire à son activité. Cela permet de contrôler l'activité de la télomérase de manière conditionnelle et d'observer l'ensemble du processus de sénescence depuis le moment où la télomérase est inactivée jusqu'à la mort de la cellule et l'extinction de la lignée. Les cellules contenant cette construction sont introduites dans le système de microfluidique puis envahissent des microcavités. Le plan du circuit de microfluidique a été pensé de telle sorte que la cellule analysée au fond de la microcavité est souvent remplacée par la cellule fille permettant ainsi de suivre l'ensemble de la lignée et de pas avoir d'interférence avec le « vieillissement de la cellule mère», phénomène qui décrit le nombre limité de cellules filles qu'une cellule mère peut produire et qui est indépendant des télomères. Cette construction permettant d'inhiber la télomérase couplée à la microfluidique et la microscopie permet de suivre des lignées individuelles ainsi que le cycle cellulaire de chaque cellule de la lignée (Figure 15A). En effet, en suivant les cellules toutes les 10 minutes grâce à une prise d'image, il est possible de reconstituer un film qui permet ensuite de calculer la durée des cycles cellulaires consécutifs de l'ajout de la doxycycline jusqu'à la mort de la dernière cellule de la lignée. Les évènements de bourgeonnement sont utilisés pour ce calcul (Figure 15B, C et D).

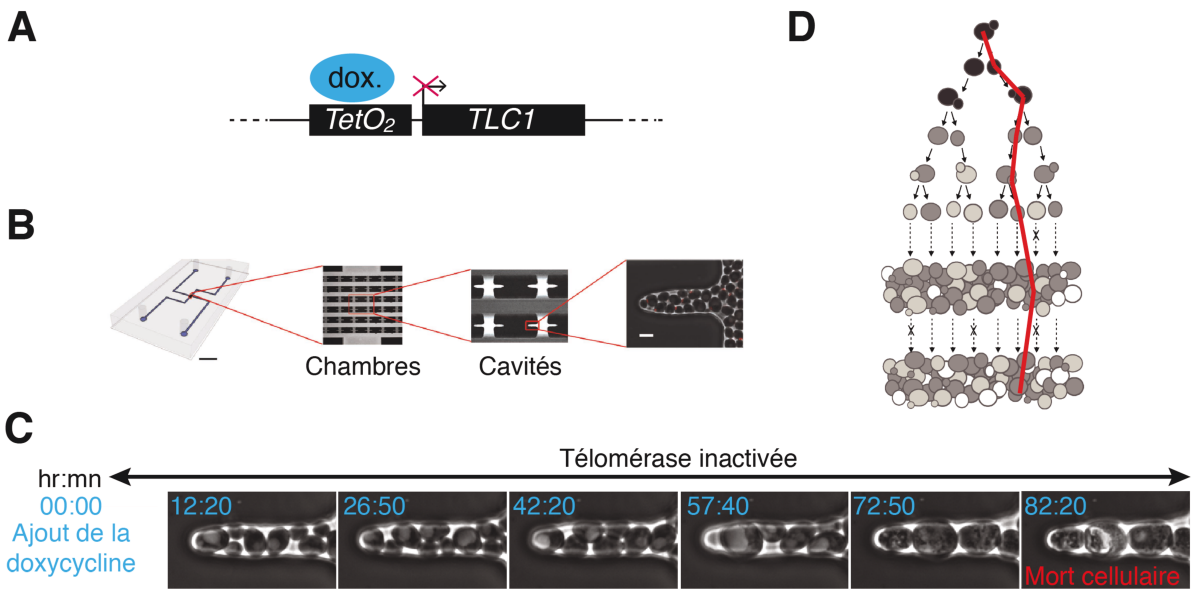


Figure 15 : Système de microfluidique adapté à l'étude de la sénescence réplicative (d'après Xu *et al* 2015) A. Schéma représentant le promoteur tetO_2-OFF placé en amont du gène *TLC1*. Cette construction permet la répression de l'expression de *TLC1* en présence de doxycycline (dox.). **B.** Schéma illustrant le circuit de microfluidique comprenant plusieurs chambres qui contiennent elles mêmes plusieurs cavités. Le flux de milieu et de cellules permet de remplir les cavités. La cellule placée à l'extrémité de la cavité est la cellule dont le cycle cellulaire est analysé. **C.** Représentation de quelques images successives d'un film obtenu par une expérience de microfluidique. En bleu ciel est indiquée en heures et minutes (hr:mn) la durée de temps écoulée entre l'ajout de la doxycycline et la prise d'image. **D.** Schéma représentant par la ligne rouge une lignée cellulaire individuelle qu'il est possible de suivre grâce au système de microfluidique.

C'est grâce à cette méthode que l'équipe a montré que la dynamique de sénescence est complexe. Certaines lignées, après inactivation de la télomérase, prolifèrent jusqu'à l'arrêt du cycle en G2/M suivi de la mort cellulaire. Cependant, certaines lignées se démarquent par la présence de cycles longs non terminaux et parfois très longs (> 6h, appelés arrêts non terminaux prolongés) suivis par la reprise du cycle cellulaire. Ces arrêts non terminaux ne sont pas observés chez des cellules exprimant la télomérase. Cela suggère que la sénescence est un processus complexe et que la prolifération des cellules est affectée par l'absence de télomérase avant même que les télomères n'atteignent une taille très courte (Figures 1 et 1S, paragraphe « Prolonged nonterminal arrests in cells lacking telomerase activity »). La fréquence de ces arrêts non terminaux est drastiquement diminuée en absence de Mec1 et Pol32 suggérant que ces arrêts du cycle sont dus à des dommages télomériques parfois réparés par la voie BIR (Xu et al. 2015).

La durée de certains arrêts non terminaux étant supérieure à six heures, durée inhabituellement longue pour des mécanismes de réparation qui, pour les plus longs, ne dépassent pas environ quatre heures d'arrêt, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la reprise du cycle cellulaire est due à des évènements d'adaptation. Nous avons donc mené des expériences de microfluidique où les cellules étudiées exprimaient, en plus de la construction tetO_2-*TLC1*, l'allèle *cdc5-ad* ou *tid1Δ*, deux mutants qui présentent un défaut d'adaptation.

L'analyse montre que les cellules exprimant l'un ou l'autre de ces gènes mutants présentent une diminution significative du nombre d'arrêts non terminaux et en particulier celui des arrêts non terminaux prolongés, suggérant que l'adaptation est impliquée dans le mécanisme de reprise du cycle cellulaire après ces arrêts non terminaux (Figures 2 et S2, paragraphe « Adaptation occurs in response to telomerase inactivation »). En parallèle, pour s'assurer que les différences observées en sénescence sont propres à l'adaptation, j'ai vérifié que la longueur des télomères et leur taux de raccourcissement ne sont pas affectés chez les mutants *cdc5-ad* et *tid1Δ* de même que leur capacité à activer le checkpoint et à former des survivants (Figures 3 et S3, paragraphe « Adaptation does not affect telomere homeostasis, checkpoint activation, or homology-drpendent repair »).

Afin de confirmer la présence de ces évènements d'adaptation, nous avons développé un rapporteur fluorescent de l'activation de Rad9 en collaboration avec Serge Pelet (Université de Laussanne, Lausanne) et Karine Dubrana (CEA, Fontenay-aux-Roses). Ce rapporteur est composé de la protéine fluorescente mCherry associée au domaine FHA1 de Rad53, domaine qui interagit avec Rad9 phosphorylé. Lorsque ce rapporteur est exprimé dans la cellule, le signal de fluorescence rouge est diffus à un niveau basal réparti dans l'ensemble de la cellule. En réponse à l'induction d'un dommage de l'ADN, le signal de fluorescence est enrichi dans le noyau indiquant l'activation de Rad9. Nous avons montré que ce rapporteur est capable de répondre à plusieurs types de dommage (Figures 4 et S4, paragraphe « A checkpoint activation reporter for monitoring adaptation in single cells). Grâce au changement de localisation, après phosphorylation de Rad9, il est possible d'observer l'activation du checkpoint. Lorsque ce rapporteur est couplé à la microfluidique, il est donc possible de caractériser le processus à l'origine de la reprise du cycle cellulaire après un arrêt non terminal en sénescence. En effet, en examinant l'intensité de fluorescence de la cellule lors du cycle suivant un cycle long, il est possible de distinguer entre un événement d'adaptation et un événement de recovery basé sur le maintien (adaptation) ou non (recovery) du signal de fluorescence élevé dans le noyau (Figure 5 et S5, paragraphe « A checkpoint activation reporter for monitoring adaptation in single cells »). En utilisant ce rapporteur en microfluidique nous avons confirmé la présence d'évènements d'adaptation : 80% des cycles non terminaux prolongés étaient suivis d'un cycle où le signal de fluorescence était maintenu élevé correspondant au maintien de l'activation de Rad9 donc à un événement d'adaptation (Figues 5 et S5) car d'après (Donnianni et al. 2010), la phosphorylation de Rad9 reste élevée à la suite d'adaptation.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la conséquence de ces évènements d'adaptation en absence de télomérase. L'adaptation est souvent suivie par de l'instabilité

génomique (Galgoczy et Toczyski 2001). C'est pourquoi, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'adaptation contribue à l'augmentation d'instabilité génomique observée en sénescence réplicative (Hackett, Feldser, et Greider 2001). Pour vérifier cette hypothèse, j'ai comparé les taux de mutation entre des cellules capables ou non de s'adapter en absence de télomérase. J'ai effectué des tests de fluctuation du taux de mutation du gène rapporteur *CAN1* dans des cellules exprimant la construction tetO_2-*TLC1* en présence de doxycycline dans les cellules de référence *CDC5 TID1* comparées à des cellules exprimant les allèles mutants *cdc5-ad* ou *tid1Δ*. J'ai montré par ce biais que l'adaptation contribue à environ la moitié de l'augmentation de l'instabilité génomique (Figures 6 et S6, paragraphe « Adaptation drives genome instability in senescence »). J'ai également caractérisé le type d'instabilité génomique d'un échantillon des cellules résistantes à la canavanine. Malgré son implication dans la dynamique de sénescence et l'augmentation de l'instabilité génomique, l'adaptation ne semble pas jouer de rôle dans le spectre de l'instabilité. Il est également intéressant de noter que parmi les cellules résistantes à la canavanine sélectionnées, un certain nombre présente des réarrangements chromosomiques n'impliquant pas nécessairement le chromosome 5 où se trouve le gène *CAN1* (Figures 7 et S7, paragraphe « Post-adapted cells display gross genome rearrangements »). En absence de télomérase, l'adaptation contribue à l'augmentation de l'instabilité génomique en participant probablement à la propagation de cellules dont le génome est réarrangé ou muté sans favoriser l'émergence d'un type particulier d'instabilité.

Article n°1

Adaptation to DNA damage checkpoint in senescent telomerase-negative cells promotes genome instability.

Héloïse Coutelier*, Zhou Xu*[1], Mony Chenda Morisse, Maoussi Lhuillier-Akakpo, Serge Pelet, Gilles Charvin, Karine Dubrana, and Maria Teresa Teixeira[1].

Genes and Development, 2018. 32: 1499-1513

*Ces auteurs ont contribué de manière équivalente.

[1] Auteurs de correspondance

La couverture du numéro de *Genes and Development* dans lequel cet article a été publié est placée en anneexe (Annexe I).

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Adaptation to DNA damage checkpoint in senescent telomerase-negative cells promotes genome instability

Héloïse Coutelier,[1,10] Zhou Xu,[1,10] Mony Chenda Morisse,[1] Maoussi Lhuillier-Akakpo,[2,3,4] Serge Pelet,[5] Gilles Charvin,[6,7,8,9] Karine Dubrana,[2,3,4] and Maria Teresa Teixeira[1]

[1]Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, UMR8226, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris Sciences et Lettres (PSL) Research University, Sorbonne Université, F-75005 Paris, France; [2]Institute of Molecular and Cellular Radiobiology, Commissiriat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA)/Direction de la Recherche Fondamentale (DRF), 92260 Fontenay-aux-Roses Cedex, France; [3]U967, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), 92260 Fontenay-aux-Roses Cedex, France; [4]UMR967, Université Paris-Diderot et Université Paris-Sud, 92260 Fontenay-aux-Roses cedex, France; [5]Department of Fundamental Microbiology, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland; [6]Department of Developmental Biology and Stem Cells, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 67400 Illkirch, France; [7]UMR7104, CNRS, 67400 Illkirch, France; [8]U964, INSERM, 67400 Illkirch, France; [9]Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France

In cells lacking telomerase, telomeres gradually shorten during each cell division to reach a critically short length, permanently activate the DNA damage checkpoint, and trigger replicative senescence. The increase in genome instability that occurs as a consequence may contribute to the early steps of tumorigenesis. However, because of the low frequency of mutations and the heterogeneity of telomere-induced senescence, the timing and mechanisms of genome instability increase remain elusive. Here, to capture early mutation events during replicative senescence, we used a combined microfluidic-based approach and live-cell imaging in yeast. We analyzed DNA damage checkpoint activation in consecutive cell divisions of individual cell lineages in telomerase-negative yeast cells and observed that prolonged checkpoint arrests occurred frequently in telomerase-negative lineages. Cells relied on the adaptation to the DNA damage pathway to bypass the prolonged checkpoint arrests, allowing further cell divisions despite the presence of unrepaired DNA damage. We demonstrate that the adaptation pathway is a major contributor to the genome instability induced during replicative senescence. Therefore, adaptation plays a critical role in shaping the dynamics of genome instability during replicative senescence.

[*Keywords*: telomere; senescence; DNA damage checkpoint; adaptation; genomic instability; Cdc5]

Supplemental material is available for this article.

Received July 2, 2018; revised version accepted October 3, 2018.

Eukaryotic cells respond to DNA damage by activating a checkpoint that arrests the cell cycle and permits the cell to attempt DNA damage repair. This pathway is activated at specific phases of the cell cycle and limits genome instability (Harrison and Haber 2006). However, if DNA repair pathways fail or are impeded, cells can avoid death by bypassing the checkpoint arrest and undergoing cell division despite persistent DNA damage, a process known as adaptation (Sandell and Zakian 1993; Toczyski et al. 1997; Lee et al. 1998b). Adaptation is thought to provide the cell with an opportunity to survive and produce progeny by allowing DNA repair to occur in other cell cycle phases and/or by tolerating nonlethal loss of genetic material (Galgoczy and Toczyski 2001; Kaye et al. 2004). For unicellular organisms, adaptation could generate genetic and phenotypic diversity and allow survival of the population under stress conditions. In human cells, adaptation is also a proposed source of genome instability and can contribute to the development of therapy resistance in cancer cells (Syljuasen et al. 2006; Kalsbeek and Golsteyn 2017).

Double-strand breaks (DSBs) and other DNA lesions lead to cell cycle arrest by activating the DNA damage checkpoint signaling cascade. The Mec1/ATR kinase is recruited along with its interacting partner, Ddc2/ATRIP, to the DSB, where they bind to newly formed ssDNA. This complex phosphorylates Rad9 (functionally related

[10]These authors contributed equally to this work.
Corresponding authors: teresa.teixeira@ibpc.fr, zhou.xu@ibpc.fr
Article published online ahead of print. Article and publication date are online at http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.318485.118. Freely available online through the *Genes & Development* Open Access option.

© 2018 Coutelier et al. This article, published in *Genes & Development*, is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

to 53BP1 in mammals), which then binds the forkhead-associated (FHA) domains of the Rad53 and Chk1 kinases (Durocher et al. 1999). Once bound to Rad9, Rad53 is phosphorylated by Mec1, which initiates autohyperphosphorylation of Rad53, which is required to fully activate and amplify the checkpoint signal, resulting in cell cycle arrest in G2/M (Harrison and Haber 2006).

If the cell can repair DNA damage during the checkpoint arrest, it can resume the cell cycle and proceed with mitosis. This process, known as recovery, requires inactivation of the checkpoint factors, including reversal of Rad53 phosphorylation (Pellicioli et al. 2001; Leroy et al. 2003). If DNA damage persists, the cell either is permanently arrested and eventually dies or initiates adaptation. In the latter case, only Rad53 is dephosphorylated and inactivated, whereas the upstream checkpoint factors remain active, with factors such as Ddc2/ATRIP remaining at the DNA damage site (Melo et al. 2001) and phosphorylated Rad9 persisting in the nucleus (Donnianni et al. 2010; Vidanes et al. 2010).

Although telomeres, which cap the ends of linear eukaryotic chromosomes, are structurally similar to the ends of DSBs, they do not activate the DNA damage response under normal conditions and are intrinsically refractory to repair. This prevents fusion of chromosomes and genome instability (Pardo and Marcand 2005; Jain and Cooper 2010). Cellular DNA polymerases cannot fully replicate telomeric DNA, which shortens with each cell division, compromising telomere protective functions (Lingner et al. 1995; Soudet et al. 2014). Telomere shortening is counteracted by telomerase, a reverse transcriptase that iteratively synthesizes telomeric repeats (Wu et al. 2017). However, in some vertebrates, including humans, telomerase is absent from many somatic tissues, and the telomeres eventually shorten sufficiently to induce permanent activation of the DNA damage checkpoint and trigger replicative senescence (d'Adda di Fagagna et al. 2003; Herbig et al. 2006; Campisi and d'Adda di Fagagna 2007; Carneiro et al. 2016). In other multicellular organisms that have constitutively active telomerase, such as mice, and most unicellular experimental model organisms, such as budding yeast, this senescence phenotype can be recapitulated by deleting or inhibiting telomerase activity (Lundblad and Szostak 1989; Blasco et al. 1997; Enomoto et al. 2002; Ijpma and Greider 2003; Teixeira 2013; Gonzalez-Garcia et al. 2015). Thus, telomere shortening limits the life span of eukaryotic cells (Suram and Herbig 2014). Cancer cells can avoid senescence by altering the DNA damage checkpoint pathway response; for example, through p53 inactivation and abnormal elongation of telomeres, by re-expression of telomerase, or by up-regulation of homology-dependent repair between telomeres (Lundblad and Blackburn 1993; Greider 1998; Artandi and DePinho 2000; Shay et al. 2012).

Although senescence was first described as a tumor suppressor mechanism, there is also evidence that telomerase deficiency/inactivation is linked to increased genome instability, a hallmark of cancer (Blasco et al. 1997; Lee et al. 1998a; Chin et al. 1999; Hanahan and Weinberg 2000; Hackett et al. 2001; Hackett and Greider 2003; Maciejowski et al. 2015; Aunan et al. 2017; Maciejowski and de Lange 2017). However, how genome instability arises in a cell with eroding telomeres but functional DNA damage checkpoints, as it occurs physiologically in telomerase-negative somatic cells, has remained elusive. This is a crucial question for understanding how mutations and chromosomal aberrations are introduced during the early stages of tumorigenesis.

Here, we used telomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* cells to investigate sources of genome instability occurring before the onset of replicative senescence. We tracked individual cell lineages over time using a microfluidic/single-cell imaging approach and found that the process of adaptation occurs frequently in response to DNA damage in checkpoint-proficient cells during senescence. Moreover, we show that frequent prolonged arrests and adaptation shape senescence dynamics and are a major contributor to the increase in genome instability associated with replicative senescence.

Results

Prolonged nonterminal cell cycle arrests in cells lacking telomerase activity

To understand the origin of genome instability during replicative senescence in DNA damage checkpoint-proficient cells, we used microfluidics coupled to live-cell imaging, allowing us to monitor successive divisions of single yeast cells (Fig. 1A; Supplemental Fig. S1; Supplemental Movie S1; Fehrmann et al. 2013; Xu et al. 2015). In our previous study (Xu et al. 2015), we examined individual senescent yeast lineages using a TetO2-*TLC1* strain in which expression of *TLC1* telomerase RNA is conditionally repressed by addition of doxycycline (dox) to the medium. We showed that terminal senescence and cell death are often preceded by intermittent and stochastic long cell cycles followed by resumption of cell cycling, suggesting that the onset of replicative senescence is a complex multistep pathway.

To investigate the relationship between long cell cycles and genome instability, we compared cell division cycles in telomerase-positive (−dox) (Supplemental Fig. S1) and telomerase-negative (+dox) (Fig. 1B) TetO2-*TLC1* lineages. We detected a significant difference between the distribution of cell cycle durations of telomerase-positive and telomerase-negative cells ($n = 1895$ and $n = 5962$, respectively; $P = 3.10^{-61}$ by two-sample Kolmogorov-Smirnov test) (Fig. 1B; Supplemental Fig. S1). The average cell cycle duration of telomerase-positive cells was ~90 min, and only 1.3% of cycles were considered "long" (defined as >150 min [mean + 3 SD duration of telomerase-positive cell division]). In contrast, the mean cell cycle duration for telomerase-negative cells was ~140 min, and "long" cycles were much more frequent (>150 min for 19% of cycles) (Fig. 1B,C). Thus, repression of telomere activity substantially increased the frequency of "long" cell cycles.

Because cell cycle arrests found at the termini of the lineages lead to cell death, these events cannot contribute to genome instability at a population level. Therefore, we

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

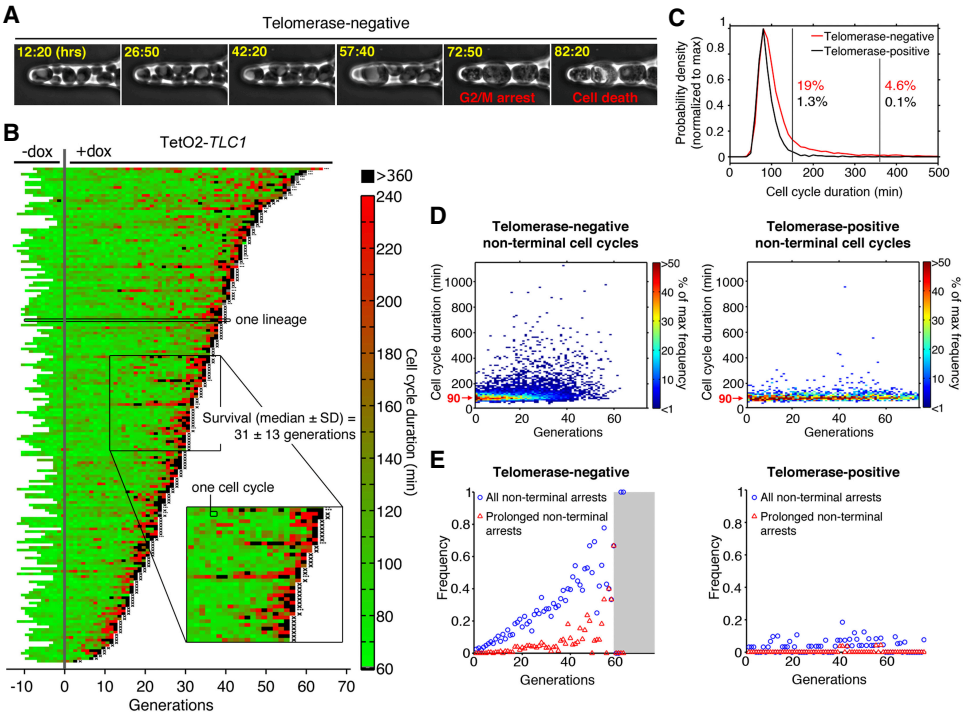


Figure 1. Analysis of individual telomerase-deficient lineages reveals frequent prolonged nonterminal arrests. (*A*) Sequential images of telomerase-negative (TetO2-*TLC1*) cells trapped in a microcavity of the microfluidic device. Hours spent after addition of 30 µg/mL dox to repress telomerase activity are shown in yellow. (*B*) Display of consecutive cell cycle durations of TetO2-*TLC1* lineages grown in the microfluidic device as in *A* ($n = 187$, 40 of which were already published in our previous work) (Xu et al. 2015). Cells were monitored overnight before (−dox) and then for successive generations after (+dox) addition of 30 µg/mL dox to inactivate telomerase (designated generation 0). Each horizontal line is an individual cell lineage, and each segment is a cell cycle. Cell cycle duration (in minutes) is indicated by the color bar. X at the end of the lineage indicates cell death, whereas an ellipsis (…) indicates that the cell was alive at the end of the experiment. (*Inset*) Magnified view of several lineages showing nonterminal arrests (black). (*C*) Distribution of all cell cycle durations taken from telomerase-negative (red; $n = 5962$) and telomerase-positive (black; $n = 1895$) lineages shown in *B* and Supplemental Figure S1. Percentages indicate the fraction of cell cycles >150 min (first vertical black line) or >360 min (second vertical black line) for each lineage. (*D*) Distribution of nonterminal cell cycle durations as a function of generation for telomerase-negative (*left*; $n = 5775$) and telomerase-positive (*right*, $n = 1887$) cells extracted from *B* and Supplemental Figure S1. The color bar indicates the frequency. (*E*) Frequency of all nonterminal arrests (cell cycle >150 min; blue circles) and prolonged nonterminal arrests (cell cycle >360 min; red triangles) extracted from *B* and Supplemental Figure S1 as a function of generation for telomerase-negative (*left*) and telomerase-positive (*right*) lineages. The gray-shaded area encompasses points based on less than five lineages, for which the data may be less reliable. See also Supplemental Figure S1.

focused on nonterminal arrests, which we defined as a long (>150 min) cycle followed by at least one more cell division. When the duration and frequency of nonterminal cell cycles were analyzed as a function of generation number, we observed that the frequency of nonterminal arrests increased with generations in telomerase-negative but not in telomerase-positive cells (Fig. 1D,E). We proposed previously that nonterminal arrests could be attributed at least partially to telomeric DNA damage signaling and an attempt by the cell to effect a repair (Xu et al. 2015). However, close inspection of our larger data set here revealed that a subset of the nonterminal arrests was extremely long (>6 h, which we termed "prolonged" arrests) (Fig. 1B, black segments). In telomerase-negative cells, these prolonged arrests represented ~20% of all nonterminal arrests and also increased in frequency with successive generations. In contrast, they were present at very low frequency in telomerase-positive cells (Fig. 1E, red triangles). The duration of these prolonged arrests was inconsistent with the time scale of DNA repair, even that mediated by break-induced replication, which induces a delay of 2–4 h for repair of a single DSB (Malkova et al. 2005). Thus, our single-cell analyses establish that telomerase-deficient lineages experience many transient and prolonged cell cycle arrests, suggesting that processes distinct from typical DNA repair may occur during these arrests.

Adaptation occurs in response to telomerase inactivation

Adaptation to unrepaired DNA damage might account for the ability of cells to resume division after such prolonged arrests (Sandell and Zakian 1993; Toczyski et al. 1997; Lee et al. 1998b). To determine whether this is occurring in telomerase-negative cells, we analyzed the kinetics of senescence in two adaptation-deficient mutants: *cdc5-ad*, which carries a point mutation in the polo-like kinase gene *CDC5* (Supplemental Movie S2; Toczyski et al. 1997), and *tid1Δ*, which lacks the yeast

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

paralog of the recombination and repair enzyme Rad54 (Lee et al. 2001).

When the *cdc5-ad* allele was introduced into our TetO2-*TLC1* strain and the cells were grown in the absence of dox (i.e., telomerase-positive), we observed no difference between *cdc5-ad* and wild-type lineages in terms of cell cycle duration (mean ± SD: 98 ± 26 min and 91 ± 37 min, respectively) (Supplemental Fig. S2A,E), basal mortality (rate <5.3 × 10^{-3} and <4.3 × 10^{-3} per generation, respectively), or frequency of nonterminal arrests (Supplemental Fig. S2A,C,D). However, telomerase-negative *cdc5-ad* lineages showed a significantly reduced frequency of prolonged nonterminal arrests (Fig. 2A,C,D,G–I; Supplemental Movie S3) compared with telomerase-negative *CDC5* lineages (Fig. 1B,D [left panel], E [left panel]), suggesting that adaptation may be responsible for the high frequency of prolonged nonterminal arrests in telomere-negative cells.

To verify this, we examined the *tid1Δ* mutant, which likely plays a distinct role in adaptation (Lee et al. 2001; Shah et al. 2010). Like the *cdc5-ad* strain, telomerase-positive *tid1Δ* cells displayed normal cell cycle durations (mean ± SD: 85 ± 26 min) (Supplemental Fig. S2B,E), basal mortality level (rate <6 × 10^3 per generation), and frequency of nonterminal arrests (Supplemental Fig. S2B–D) compared with wild-type cells. We also observed a significant decrease in the frequency of prolonged nonterminal arrests in telomerase-negative *tid1Δ* lineages compared with wild-type lineages, albeit to a lesser extent than telomerase-negative *cdc5-ad* cells (Fig. 2B,E,F,G–I; Supplemental Movie S4). Both *cdc5-ad* and *tid1Δ* mutants also showed a reduced frequency of nonterminal arrests <6 h

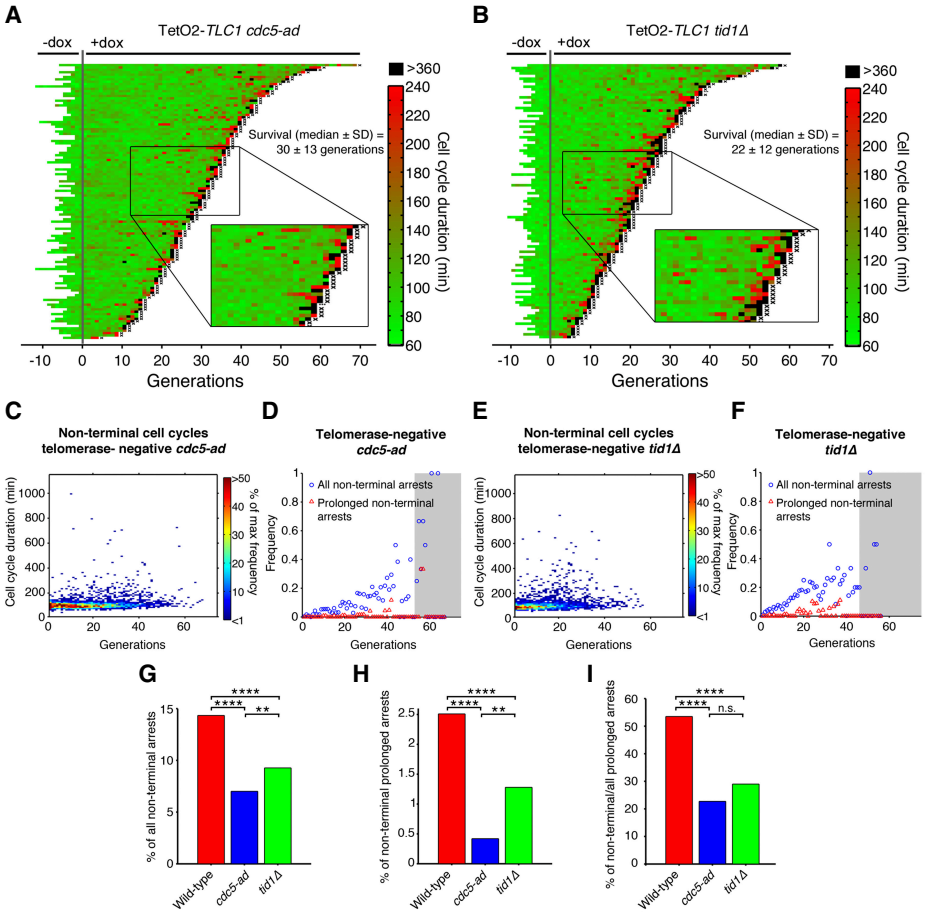


Figure 2. Adaptation-deficient mutants display a reduced frequency of prolonged nonterminal arrests. (*A*,*B*) Display of TetO2-*TLC1 cdc5-ad* (*A*; *n* = 116) and *tid1Δ* (*B*; *n* = 103) lineages before and after dox addition. See Figure 1B for a description of the plot features. (*C*,*E*) Distribution of nonterminal cell cycle durations as a function of generation for telomerase-negative *cdc5-ad* (*C*, *n* = 2397) and *tid1Δ* (*E*, *n* = 999) cells, as extracted from experiment shown in *A* and *B*, respectively. The color bar indicates the frequency. (*D*,*F*) Frequency of all nonterminal arrests (cell cycle >150 min; blue circles) and prolonged nonterminal arrests (cell cycle >360 min; red triangles) as a function of generation for telomerase-negative *cdc5-ad* (*D*) and *tid1Δ* (*F*) cells, as extracted from experiments shown in *A* and *B*, respectively. The gray-shaded area encompasses points based on less than five lineages, for which the data may be less reliable. (*G*–*I*) Percentage of nonterminal arrests (*G*) and prolonged nonterminal arrests (*H*) and the ratio of nonterminal to all prolonged (nonterminal + terminal) arrests (*I*) over all cell cycles for telomerase-negative lineages of the indicated genotypes (wild type: TetO2-*TLC1*), as extracted from experiment shown in *A* and *B* and Figure 1B. (n.s.) Not significant; (**) $P < 0.01$; (****) $P < 0.0001$ by χ^2 goodness of fit test. See also Supplemental Figure S2.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

(Fig. 2A,B,G), suggesting that adaptation in response to telomere shortening might also occur during briefer arrests. Collectively, these data indicate that adaptation mediates the resumption of cell cycling after prolonged arrests.

Adaptation does not affect telomere homeostasis, checkpoint activation, or homology-dependent repair

The absence of prolonged arrests in adaptation mutants could result from altered telomere length or structure. To verify that telomere homeostasis was not disrupted in the adaptation-defective mutants used here, we measured telomere lengths in telomerase-positive (reflecting steady-state length) and telomerase-negative (indicating the kinetics of telomere shortening) backgrounds. A heterozygous diploid *TLC1/tlc1Δ CDC5/cdc5-ad* strain was allowed to sporulate, and spores of all four resulting genotypes were selected. Cultures were grown and diluted daily, and samples were taken throughout senescence (days 4–8) and post-senescence (days 9–10) (Fig. 3A). Telomere length was measured using XhoI digestion of genomic DNA followed by Southern blot analysis. We observed no significant differences between *cdc5-ad* and wild-type cells in steady-state telomere length distribution, telomere shortening kinetics, or the ability of post-senescent survivors to maintain typical long and heterogeneous telomeres (Fig. 3B,E; Lundblad and Blackburn 1993). Similar results were found for *tid1Δ* mutants (Fig. 3C–E). Thus, aberrant telomere homeostasis does not explain the lack of prolonged arrests in the adaptation mutants.

We also asked whether the adaptation mutants might display defective checkpoint activation in response to telomeric damage. We considered this unlikely because while many proteins involved in adaptation also play roles in DNA damage repair and checkpoint activation, this is not the case for Cdc5 and Tid1 (Toczyski et al. 1997; Lee et al. 2001; Melo et al. 2001; Pellicioli et al. 2001; Harrison and Haber 2006; Clerici et al. 2014). Indeed, we specifically chose them to avoid confounding effects on checkpoint activation. Consistent with this, we found that *cdc5-ad* mutants and wild-type cells showed indistinguishable abilities to (1) form Ddc2-eGFP foci in the nucleus, (2) arrest in G2/M phase of the cell cycle, (3) undergo Rad53 hyperphosphorylation in response to DSBs induced by zeocin, and (4) undergo G2/M arrest at the restrictive temperature in a *cdc13-1* background (in which telomeres become uncapped at high temperature, inducing checkpoint activation) (Supplemental Fig. S3A–D; Supplemental Movie S2). Therefore, we conclude that the reduction in prolonged nonterminal arrests during replicative senescence in the *cdc5-ad* mutant is not caused by disruption of DNA damage checkpoint activation.

Finally, we wondered whether adaptation mutants might alter homology-dependent repair efficiency. To test this, we performed a recombination assay based on cell survival following repair of a DSB by homologous

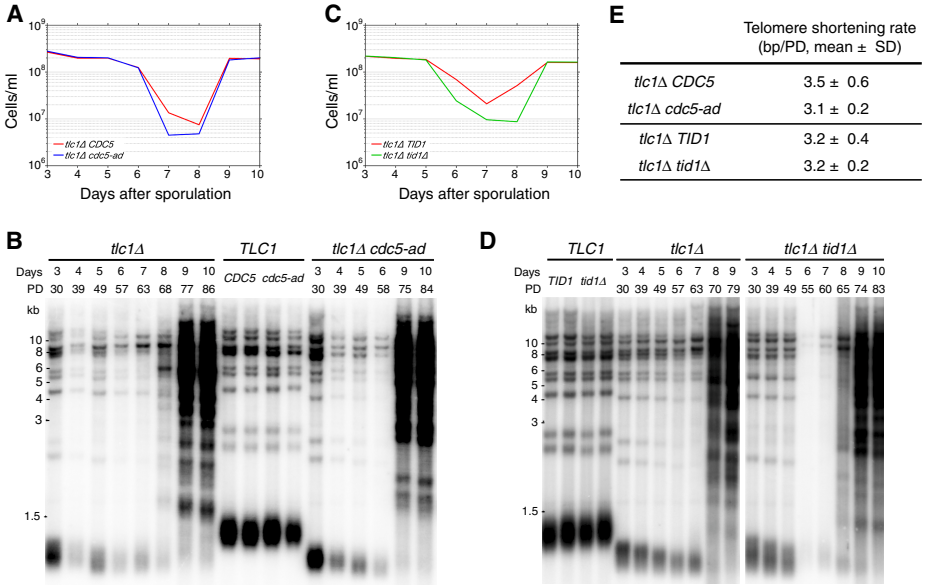


Figure 3. Adaptation does not affect telomere length or its regulation. (*A*) Growth of *tlc1Δ CDC5* and *tlc1Δ cdc5-ad* cells selected after sporulation of a heterozygous *TLC1/tlc1Δ CDC5/cdc5-ad* diploid strain. After dissection, spores were grown on plates for 2 d, genotyped, and transferred to liquid culture (indicated as day 3). Cells were sampled daily and normalized to the same density ($OD_{600\ nm}$ = 0.01). (*B*) XhoI terminal restriction fragment Southern blot analysis of telomere lengths in the cells described in *A*. (PD) Population doublings. (*C*,*D*) As described for *A* and *B* except that *TLC1/tlc1Δ TID1/tid1Δ* heterozygotes were allowed to sporulate, and the growth rates and telomere lengths of *tlc1Δ TID1* and *tlc1Δ tid1Δ* genotypes were analyzed. (*E*) Mean telomere shortening rates (base pair/population doubling [bp/PD]) of the genotypes analyzed in *A*–*D* over days 3–5. Mean ± SD of n = 3 independent experiments per genotype. See also Supplemental Figure S3.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

recombination (Batte et al. 2017). A single DSB was induced by expression of the I-SceI endonuclease, which is driven by the inducible GAL promoter, in a *ura3* allele bearing the I-SceI recognition site. Cells survived by homology-dependent repair with a donor *ura3-1* allele. Survival frequency normalized to the total number of plated cells provides a measure of repair efficiency. We detected no significant difference in survival frequency after DSB induction between the three genotypes (wild type, *cdc5-ad*, and *tid1Δ*) regardless of where the cutting site was placed; i.e., at an intrachromosomal locus (*LYS2* gene) or the 6R subtelomere (Supplemental Fig. S3E). Thus, the observed phenotypes of *cdc5-ad* and *tid1Δ* mutants in replicative senescence are probably not due to a change of homology-dependent repair efficiency.

A checkpoint activation reporter for monitoring adaptation in single cells

To detect adaptation events in senescing cells in real-time, we developed a DNA damage checkpoint activation reporter. We reasoned that the DNA damage checkpoint machinery would remain active during the cell cycle immediately following prolonged arrest if the cell underwent adaptation, whereas the checkpoint would be inactivated if the cell successfully repaired the damage and recovered. We monitored Rad9 phosphorylation, which is maintained at high levels in adapted cells despite Rad53 dephosphorylation (Donnianni et al. 2010; Vidanes et al. 2010). Rad9 is recruited to the DNA damage site and phosphorylated in a Mec1-dependent manner (Emili 1998; Vialard et al. 1998; Schwartz et al. 2002). Phosphorylated Rad9 then binds to Rad53 via its FHA domains (Durocher et al. 1999; Schwartz et al. 2002; Sweeney et al. 2005). We generated strains harboring an mCherry-tagged Rad53 FHA1 domain, which should remain cytoplasmic until checkpoint activation, when it should interact with phosphorylated Rad9 in the nucleus (Fig. 4A). The cells also expressed histone Hta2 fused to yECFP as a nuclear marker.

We treated cells harboring both FHA1-mCherry and Hta2-yECFP (the "FHA1-mCherry reporter") with zeocin to generate DSBs. DNA damage resulted in the accumulation of FHA1-mCherry in the nucleus (Fig. 4B,C). Most cells arrested in G2/M (Supplemental Fig. S4A), indicating that expression of the reporter did not interfere with the checkpoint response. A mutant FHA1 that cannot interact with phosphorylated Rad9 (His75 to alanine [H75A], corresponding to H88A in the full-length Rad53 protein) (Durocher et al. 1999) abolished nuclear localization of mCherry upon DNA damage induction (Fig. 4B,C). Similar results were obtained upon induction of a single DSB in a strain containing a unique cleavage site for the endonuclease HO (Supplemental Fig. S4B,C; Lee et al. 1998b). Thus, the FHA1-mCherry reporter specifically detects checkpoint activation in response to DNA damage.

We asked whether the FHA1-mCherry reporter could distinguish between adaptation and recovery events. We used the *cdc13-1* mutant model of adaptation, in which telomeres are uncapped at high temperatures, leading to checkpoint activation and either adaptation or death

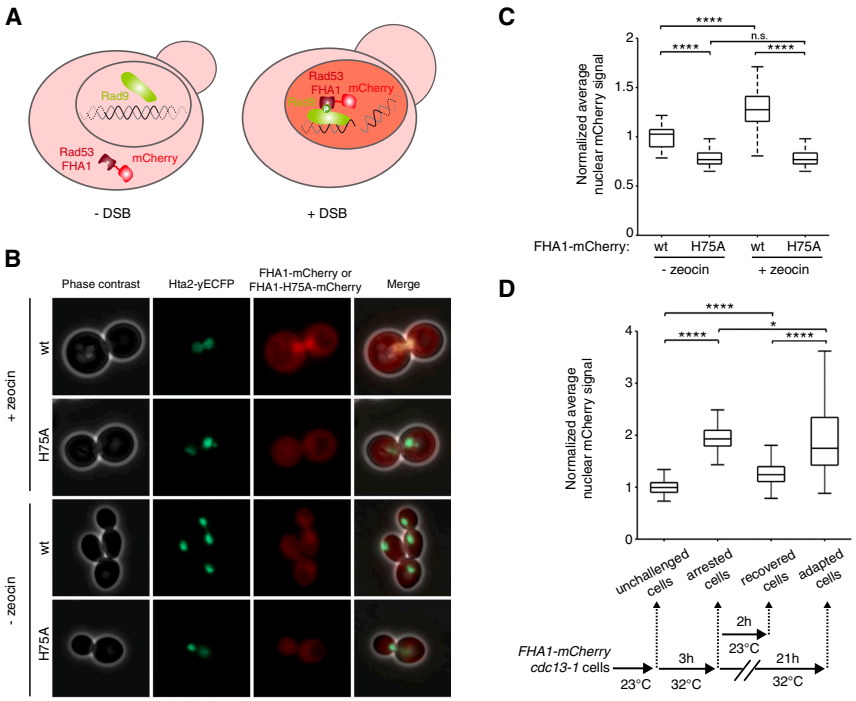


Figure 4. Detection of DNA damage checkpoint activation with a fluorescent biosensor. (*A*) Schematic showing the mCherry-coupled Rad53-FHA1 fluorescent protein interacting with phosphorylated Rad9 in the nucleus in response to a DSB. (*B*) Representative phase contrast and fluorescence images of cells carrying the nuclear marker Hta2-yECFP and either the wild-type FHA1-mCherry (wt) or a mutant version that cannot bind to phosphorylated Rad9 (FHA1-H75A-mCherry). Cells were imaged 3.5 h after treatment with 300 µg/mL zeocin or nontreated. (*C*) Quantification of the experiment in *B*. Data are presented as the nuclear mCherry signal normalized to the untreated cells carrying wild-type FHA1-mCherry. $N \geq 50$ untreated cells; $N \geq 160$ zeocin-treated cells. (****) $P < 0.0001$; (n.s.) not significant by the Mann-Whitney *U*-test. (*D*, *bottom* panel) The experimental scheme: *cdc13-1* cells carrying the FHA1-mCherry reporter were grown at 23°C ("unchallenged cells") and then placed for 3 h at the restrictive temperature of 32°C ("arrested cells"). The cells were then split into two cultures: One was incubated for 2 h at 23°C ("recovered cells"), and the other was incubated for an additional 21 h at 32°C ("adapted cells"). (*Top* panel) Quantification of nuclear mCherry fluorescence normalized to the unchallenged cells. $N = 279$ unchallenged cells; $N = 191$ arrested cells; $N = 255$ recovered cells; $N = 59$ adapted cells. (*) $P < 0.05$; (****) $P < 0.0001$ by the Mann-Whitney *U*-test. See also Supplemental Figure S4.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

(Garvik et al. 1995; Paschini et al. 2012). However, checkpoint activation can be reversed if the cells are returned to the permissive temperature (23°C), allowing full recovery (Lydall and Weinert 1995; Toczyski et al. 1997). We incubated *cdc13-1* cells expressing FHA1-mCherry reporter for 3 h at 32°C and then either incubated them for an additional 21 h at 32°C or returned them for 2 h to 23°C (Fig. 4D). As expected, the nuclear mCherry signal increased significantly after 3 h at the restrictive temperature, indicative of checkpoint activation, and then decreased to basal levels after 2 h at 23°C. However, cells remaining for 24 h at 32°C showed sustained elevation of the nuclear mCherry signal upon adaptation compared with basal levels (Fig. 4D; Supplemental Fig. S4D,E). These data demonstrate that the FHA1-mCherry reporter can distinguish between recovery and adaptation events in live single cells.

We used this reporter to assess checkpoint activation in individual telomerase-negative cell lineages. We confirmed that the senescence profile of reporter-expressing TetO2-*TLC1* cells was comparable with that of control TetO2-*TLC1* cells under the microfluidic imaging conditions (median ± SD: 34 ± 18 vs. 31 ± 13 generations, respectively) (Supplemental Fig. S5A; Fig. 1B). The average nuclear mCherry signal before senescence was low and displayed oscillatory behavior (Fig. 5A,B), which could reflect Rad9 phosphorylation during S and G2 phases of the cell cycle (Vialard et al. 1998). In contrast, the reporter signal increased substantially during cell cycle arrest, indicating DNA damage checkpoint activation, consistent with our finding that deletion of *MEC1* suppressed these arrests (Fig. 5A,B; Xu et al. 2015).

We observed two distinct patterns of nuclear mCherry signal intensity in the cell cycle immediately following nonterminal arrests: maintenance of high levels (79%; 38 out of 48 cycles) (Fig. 5C,D,E,H; Supplemental Fig. S5B) and return to basal levels (21%; 10 out of 48 cycles) (Fig. 5C,F,G,H; Supplemental Fig. S5B), consistent with adaptation and recovery events, respectively. The fraction of cells that adapted after experiencing a prolonged arrest (79%) was in agreement with the 83% reduction in prolonged nonterminal arrests found in the *cdc5-ad* mutant compared with wild-type cells (Fig. 2A,H). Thus, adaptation events occur frequently during senescence, suggesting that telomeric damage is not always repaired before the affected cells resume division and reach a terminal senescent state.

Of 32 prolonged cell cycles, 23 (72%) were followed at some point in the subsequent divisions by a cell cycle of normal duration (Fig. 5I; Supplemental Fig. S5C,D). The mean ± SD number of cell divisions that followed a prolonged arrest was 9.4 ± 10.1 divisions, with a maximum of 33. Therefore, in a majority of lineages, adaptation eventually led to normal cell cycles with inactive DNA damage checkpoints, suggesting that repair pathways operated to silence the initial damage signal in subsequent cell divisions and that post-adapted cells would not die out in the population of senescent cells. Instead, post-adapted cells display substantial proliferation potential, up to billions of cells in the progeny.

Adaptation drives genome instability in senescence

Based on our observation of a high frequency of adaptation events in telomerase-negative lineages (~2%–7% of all cell divisions) and the proliferative potential of adapted cell lineages, we hypothesized that adaptation might contribute to the increase in genome instability observed as cells advance into senescence, since adaptation can be followed by genome instability (Galgoczy and Toczyski 2001). To test this hypothesis, we measured the mutation rate of the endogenous *CAN1* gene in the TetO2-*TLC1* strain using fluctuation assays (Hackett et al. 2001). *CAN1* encodes an arginine permease such that cells carrying mutations in the gene are insensitive to the toxic arginine analog canavanine. Growth in arginine-deficient canavanine-supplemented medium thus selects for *CAN1* mutants, and the mutation rate can be estimated by enumerating Can^R clones (Lea and Coulson 1949; Chen et al. 1998). We observed no difference in the *CAN1* mutation rates of telomerase-positive *cdc5-ad* and wild-type strains (mean [95% confidence intervals]: 1.4 [1.0–1.7] × 10^{-7} and 1.6 [1.2–2.0] × 10^{-7} mutations per generation, respectively).

To evaluate *CAN1* mutation rates during senescence, independent cultures of TetO2-*TLC1* wild-type and *cdc5-ad* cells were grown in rich liquid dox-containing medium and diluted daily to 10^4 cells per milliliter. Each day, a sample of each culture was plated on canavanine-containing plates to score Can^R colonies and, in parallel, on rich medium plates to normalize the number of cells plated (Fig. 6A). As telomerase-negative cells lose their proliferation potential over time, *CAN1* mutants were selected on plates lacking dox to allow telomerase re-expression and thus ensure accurate quantification of colony number. Wild-type telomerase-negative cultures displayed an increase in *CAN1* mutation rate over time, which peaked at approximately ninefold the basal rate on day 6, concomitant with the senescence crisis (Fig. 6B,D; Supplemental Fig. S6A–F; Hackett et al. 2001). In contrast, the *cdc5-ad* strain mutation rate was more modest and peaked at approximately fourfold the basal rate at senescence crisis, corresponding to an ~56% decrease compared with the wild-type strain (Fig. 6D). Similar results were obtained with the *tid1Δ* telomerase-negative strain, which displayed a mutation rate at senescence crisis ~40% lower than the wild-type telomerase-negative cultures (approximately sixfold vs. ~10-fold increased rate, respectively) (Fig. 6C,E; Supplemental Fig. S6G–J). These data indicate that adaptation contributes nearly half of the increase in mutation rate observed in senescence.

Post-adapted cells display gross genome rearrangements

After adaptation to DNA damage, repair pathways available to the cell in the next G1 phase may differ from those in G2/M. We thus asked whether adaptation modified the spectrum of mutations that led to Can^R cells obtained in the fluctuation assays (Fig. 6A).

The Can^R colonies obtained in both wild-type and *cdc5-ad* backgrounds displayed size heterogeneity, possibly reflecting diverse mutation mechanisms. Most small

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

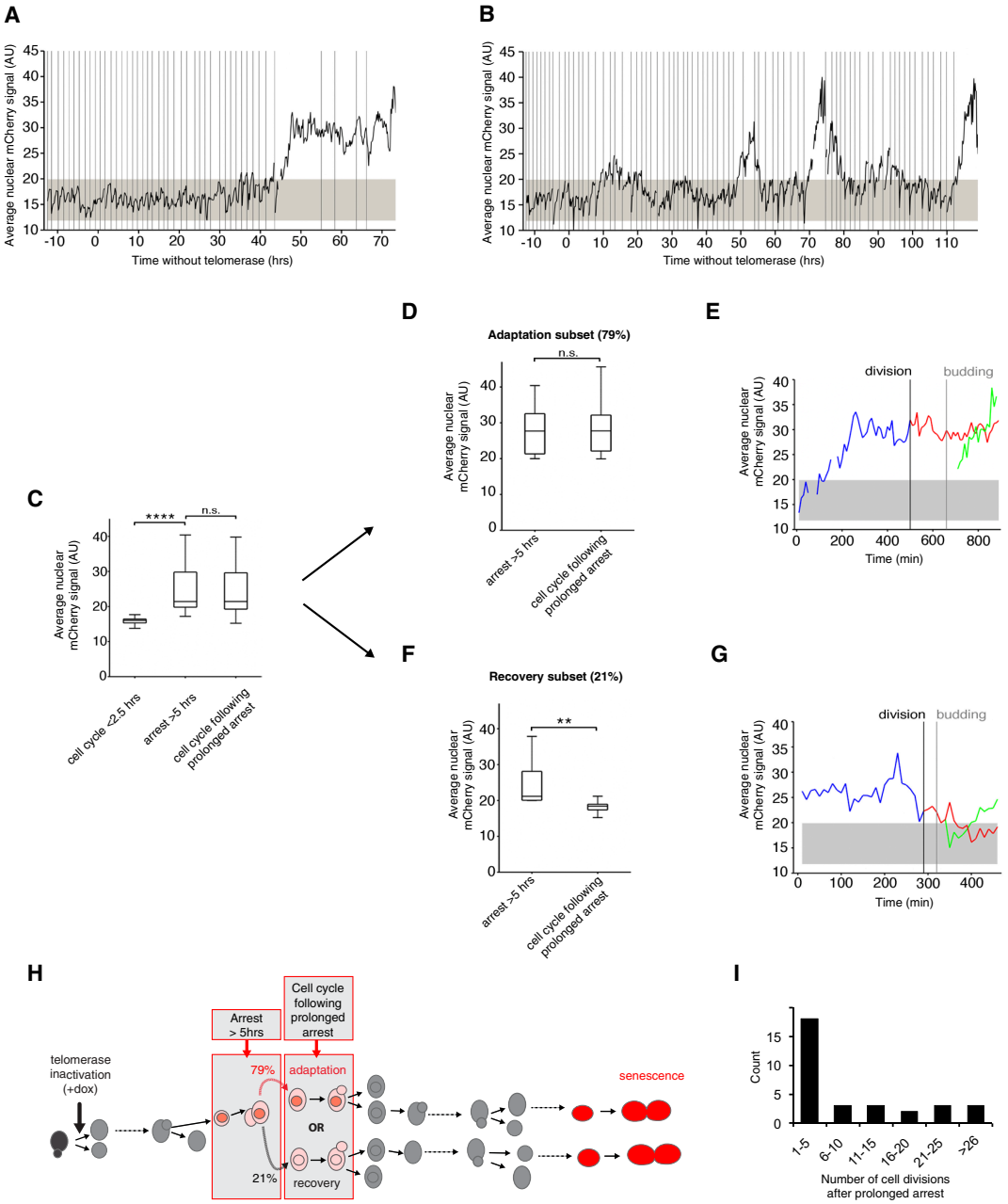


Figure 5. A novel checkpoint activation reporter reveals adaptation events at the single-cell level in telomerase-negative lineages. (*A*,*B*) Average nuclear FHA1-mCherry signal in representative telomerase-negative lineages monitored over the course of senescence shown in Supplemental Figure S5A. Vertical lines represent budding events. The gray-shaded area represents the basal nuclear FHA1-mCherry signal in normally dividing cells ± 3 SD. (*C*) Average nuclear FHA1-mCherry signal per cell cycle quantified in telomerase-negative single cells with normal cell cycle durations (<2.5 h; $n = 31$ cell cycles), cell cycles showing prolonged arrest (>5 h, $n = 32$ cell cycles) (see Supplemental Fig. S5B, indicated by white arrows in Supplemental Fig. S5A), and the first cell cycle immediately following prolonged arrest ($n = 64$ cell cycles) (see Supplemental Fig. S5B). Data were taken from the experiment shown in Supplemental Figure S5A. (****) $P < 0.0001$; (n.s.) not significant by the Mann-Whitney *U* test. (*D*,*F*) The analysis in *C* was further divided into two subsets: adaptation (*D*; $n = 38$ pairs of two consecutive cell cycles) and recovery (*F*; $n = 10$ pairs of two consecutive cell cycles); only cells arrested for >5 h and displaying increased mCherry signal were included in this analysis, thus excluding 16 out of the 64 prolonged arrests from further analysis (Supplemental Fig. S5B). Adaptation and recovery are defined as a high nuclear mCherry signal that is maintained (adaptation; *D*) or decreases to a basal level (recovery; *F*) in the cell cycle immediately following prolonged arrest. (**) $P < 0.01$; (n.s.) not significant by the Mann-Whitney *U*-test. (*E*,*G*) Representative plots of the average nuclear FHA1-mCherry signal showing an adaptation (*E*) and a recovery (*G*) event. Blue lines show the prolonged arrest (>5 h) followed by cell division, budding, and the second cell cycle of the resulting mother (red) and daughter (green) cells. The gray-shaded area represents the average basal reporter signal during normal cell cycles, and the vertical lines indicate cytokinesis and budding. (*H*) Schematic summarizing the behavior of the FHA1-mCherry reporter during an arrest >5 h, the immediate following cell cycle, and its interpretation into adaptation (79% of the events) or recovery (21% of the events), as plotted in *D*–*G*. These particular cell cycles are placed in the context of cell lineages from telomerase inactivation to senescence (red cells). A red nucleus indicates that the nuclear signal of FHA1-mCherry fusion protein is above background as in Figure 4A. See also Supplemental Figure S5. (*I*) Distribution of the number of cell divisions after prolonged arrest. $n = 32$.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

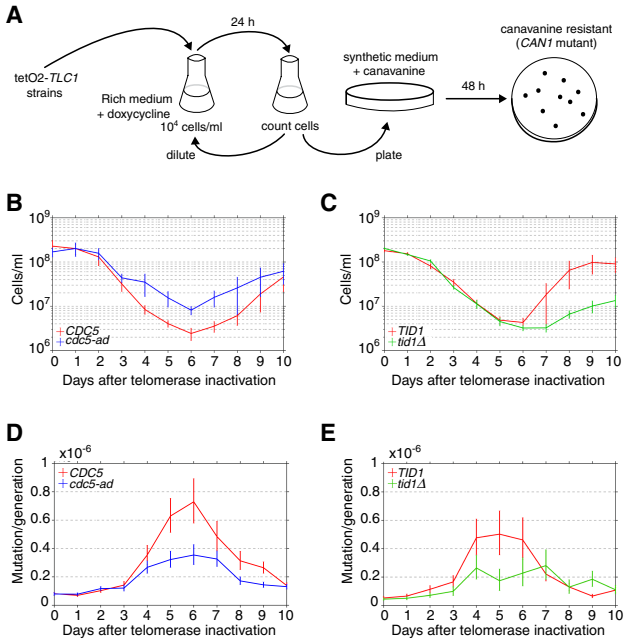


Figure 6. Adaptation contributes to the increased mutation rate observed in senescence. (*A*) Experimental protocol for the fluctuation assay of *CAN1* gene mutation during senescence. Cells were grown in liquid YPD medium and 30 µg/mL dox for 10 d. Cells were counted and diluted daily to ensure that Can^R mutants were not transferred from the previous culture. A sample of cells was plated on canavanine-containing medium lacking arginine or on YPD plates (for normalization). The colonies formed after 2 d at 30°C were counted, and the mutation rate was calculated. (*B*,*C*) Average growth curves of 20 independent cultures of telomerase-inactivated *CDC5* and *cdc5-ad* strains (*B*) and 10 independent cultures of telomerase-inactivated *TID1* and *tid1Δ* strains (*C*). Data are presented as the means ± SD. (*D*,*E*) Rates of *CAN1* gene mutation in the cultures shown in *B* and *C*, respectively. Data are presented as the mutation rate ±95% confidence interval. See also Supplemental Figure S6.

colonies recovered normal growth when restreaked, reminiscent of the transient lower growth/high mortality seen immediately after the appearance of unstable chromosomes (Pobiega and Marcand 2010; Vasan et al. 2014; Beyer and Weinert 2016). To identify altered chromosomes, we separated the whole chromosomes of Can^R clones by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Most Can^R colonies displayed changes in the mobility of one or several chromosomes compared with the initial wild-type or *cdc5-ad CAN1* strains before telomerase inactivation (Fig. 7A; Supplemental Fig. S7A), showing that gross chromosomal rearrangements (GCRs) occur in senescent cells and not only on the chromosome carrying the reporter gene for which we selected. However, the extent of these abnormalities appeared similar between wild-type and *cdc5-ad* strains.

To better quantify the gross chromosomal rearrangements leading to canavanine resistance, we replica-plated Can^R colonies on plates containing both canavanine and 5-fluoroorotic acid (5-FOA), thus additionally selecting for loss of *URA3* expression (Fig. 7C). The simultaneous loss of *CAN1* and *URA3* was characterized previously as due to GCRs (Chen and Kolodner 1999). We observed that in all three genotypes (*CDC5 TID1*, *cdc5-ad*, and *tid1Δ*), 2%–4% of Can^R colonies experienced GCRs. Importantly, we found no significant differences between adaptation-proficient and adaptation-deficient strains at both day 1 and day 6 after telomerase inactivation. Therefore, adaptation did not influence the mechanisms by which senescent cells generate aberrant genome rearrangements.

In small Can^R colonies, PCR designed to amplify the *CAN1* gene frequently failed (Supplemental Fig. S7B,C), consistent with a terminal deletion of chromosome 5 (Hackett et al. 2001), although other possibilities exist, such as mutations of one of the primer annealing sites, large insertions in the *CAN1* gene, or chromosome fusions disrupting the *CAN1* gene. In contrast, in normal-sized colonies, the *CAN1* gene could be amplified most of the time (Supplemental Fig. S7B,D), and chromosome 5 was frequently found to be intact (Fig. 7B). We sequenced the PCR products (Fig. 7D) and identified point mutations, insertions, and deletions. Overall, they were not significantly different between wild-type cells and *cdc5-ad* mutants. Therefore, adaptation did not influence the nature and spectrum of *CAN1* mutations formed during senescence.

Since adaptation is known to transiently alter checkpoint activation, we wondered whether Can^R strains—roughly half of which have previously undergone adaptation in senescence—still had an intact checkpoint pathway. To test this, Can^R strains were treated with zeocin and tested for their ability to arrest in G2/M. All strains of both wild-type and *cdc5-ad* genotypes were arrested in G2/M to the same extent as the parental strains (Fig. 7E). As a negative control, *RAD9* deletion prevented the G2/M arrest in cells treated by zeocin (Supplemental Fig. S3B). This result suggested that although half of the Can^R mutants of wild-type genotype previously experienced adaptation, none irreversibly mutated their checkpoint signaling pathway. Therefore, the increase in mutagenesis and chromosomal rearrangements in senescence is not the result of pre-existing mutations in genes encoding checkpoint factors.

Discussion

The molecular events occurring in individual cells as they divide and progress toward senescence are difficult to study in bulk cell populations. Mutations and other genome-destabilizing events are rare but can have major consequences for the whole cell population. Here, we studied cell division dynamics in individual telomerase-deficient cell lineages to understand when and how genome instability is initiated upon telomerase inactivation. We used a microfluidic-based approach coupled to live-cell imaging to monitor consecutive divisions of individual telomere-deficient cells until they entered senescence and died. We found that many lineages display frequent arrests prior

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

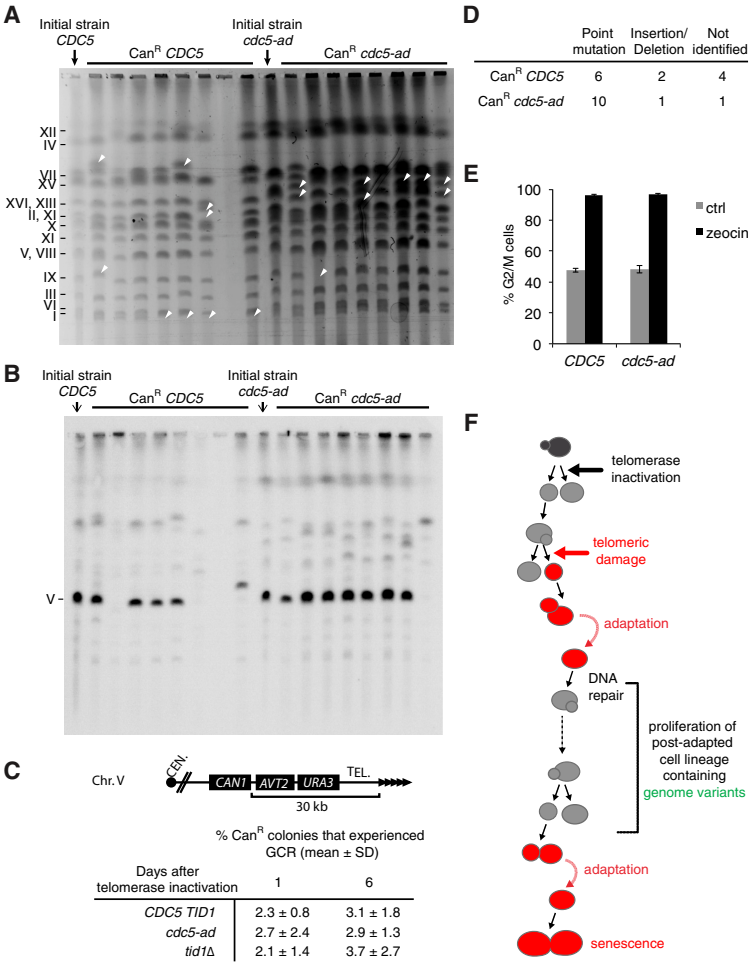


Figure 7. Adaptation drives genome instability in senescence. (*A*) Chromosomes of Can^R colonies of the indicated genotypes were separated by PFGE and visualized by ethidium bromide staining. Arrows illustrate rearranged chromosomes. (*B*) Southern blot of the PFGE shown in *A* hybridized with a probe against the essential gene *PCM1* on chromosome 5. (*C*) Fraction of the Can^R colonies that grew on plates containing both canavanine and 5-fluoroorotic acid (5-FOA), selecting for loss of *CAN1* and *URA3* functions, events that were previously characterized as GCRs (Chen and Kolodner 1999). The percentages were derived from $n > 2500$ Can^R colonies for each genotype and day and from $N = 5–6$ independent cultures per genotype. (*Top* panel) A scheme of the region bearing the *CAN1* and *URA3* reporter genes is shown. (*D*) Types of mutations found by sequencing the *CAN1* gene of Can^R colonies. (*E*) Can^R colonies of the indicated genotypes were tested for the ability to arrest in G2/M following exposure to 300 µg/mL zeocin for 3.5 h. Data are presented as the means ± SD. (*F*) Model for the emergence of checkpoint activation-proficient adapted cells with persistent DNA damage. Upon telomerase inactivation, the DNA damage checkpoint is activated in response to telomere replication defects or telomere shortening (red cells), which interrupts cell proliferation and results in their progressive dilution in the population. Even if DNA repair fails, the cells may undergo adaptation by bypassing downstream checkpoint signaling. The proliferation capacity of these lineages is thus extended despite the persistence of the initial damage or repair intermediates. Some genome variants may arise that result in viable progeny. See also Supplemental Figure S7.

to the terminal arrest at replicative senescence. These nonterminal arrests increased in frequency with time and mirrored the increase in genome instability during senescence. About 20% of the nonterminal arrests, which we called prolonged arrests, were extremely long (>5–6 h), a time scale inconsistent with known DNA repair mechanisms (Fig. 1). Instead, the cells underwent adaptation, entered mitosis, and proceeded to divide in the presence of unrepaired DNA damage (Sandell and Zakian 1993; Toczyski et al. 1997). We showed that this mechanism accounted for nearly half of the increase in genome instability of senescent cells. Our results support the following sequence of events (Fig. 7F): A critically short or damaged telomere induces a checkpoint arrest, and, because repair pathways might not be efficient, adaptation would allow cell division after an extended period of time and lead to genome instability in the following cell cycles. This opens the way for genome variants to arise. Most variants are detrimental to cell growth, but rare ones might potentially stabilize and propagate and thus serve as a precursor for senescence escape.

We used two independent approaches to demonstrate that adaptation occurred in the absence of telomerase. In the first approach, we analyzed adaptation-deficient mutants and found that they displayed significantly fewer nonterminal arrests, particularly the prolonged arrests, compared with their wild-type counterparts, suggesting that adaptation was required for telomerase-negative cells to escape from these arrests (Fig. 2). Interestingly, telomerase-negative *cdc5-ad* lineages display a median survival similar to telomerase-negative *CDC5* lineages, which is higher than expected if adaptation mutants were unable to resume cell cycle after an early arrest. Since telomerase-negative *tid1Δ* lineages have a significantly reduced median survival compared with *cdc5-ad* (median ± SD: 22 ± 12 and 30 ± 13, respectively), we speculate that the higher survival of the *cdc5-ad* mutant might be due to an additional or altered function unrelated to adaptation. Furthermore, in response to DNA damage, the *cdc5-ad* mutant was as proficient for checkpoint activation, cell cycle arrest, recruitment of repair factors (Toczyski et al. 1997; Melo et al. 2001; Pellicioli et al. 2001; this study), and homology-dependent repair as wild type. This rules out inefficient checkpoint activation or repair as a possible explanation for the unexpectedly high survival of telomerase-negative *cdc5-ad* lineages. Further studies shall clarify this *cdc5-ad*-specific phenotype observed only in the absence of telomerase. In the second approach, we developed a fluorescent biosensor to monitor checkpoint activation in live cells (Figs. 4, 5). In the

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

majority of prolonged arrests (~80%), Rad9 phosphorylation was maintained at high levels through the next cell cycle, as expected after adaptation (Donnianni et al. 2010; Vidanes et al. 2010). The remaining prolonged arrests (~20%) were followed immediately by a cell cycle in which the checkpoint reporter signal returned to basal levels, consistent with recovery after repair of the initial DNA damage. The two independent approaches led to similar estimates of the fraction of prolonged nonterminal arrests followed by adaptation (~80%). Taken together, the results revealed that adaptation occurred in telomerase-negative cells at a frequency of ~2%–7% of all cell divisions and therefore contributed substantially to the kinetics of senescence.

Adaptation has been observed previously in response to various mechanisms of DNA damage, including an endonuclease-induced single DSB, DSB-inducing drugs (e.g., zeocin), replication-inhibiting drugs (e.g., aphidicolin), and ionizing radiation (Serrano and D'Amours 2014). However, not all DNA damages can support adaptation; for instance, cells experiencing two induced DSBs cannot adapt, suggesting that adaptation relies on a quantitative and/or qualitative assessment of the initial damage by the cell (Lee et al. 1998b). In contrast, telomeres lacking functional Cdc13 accumulate large amounts of ssDNA, trigger a potent DNA damage checkpoint activation, and can still support adaptation (Garvik et al. 1995; Toczyski et al. 1997). Furthermore, Cdc13-independent survivor cells require factors involved in adaptation (Mersaoui et al. 2015). Our results add critically short and/or broken telomeres resulting simply from telomerase deficiency to the list of DNA damage mechanisms that can lead to adaptation.

We found that some telomerase-negative lineages outlived their first prolonged arrest by many generations (up to 33, representing ~9 billion cells in the progeny) (Fig. 5). Several scenarios might explain such longevity in the face of persistent DNA damage. First, a different set of telomere repair mechanisms might be available in a subsequent cell cycle to repair the dysfunctional telomeres that elicited the prolonged arrest. Second, adaptation might result in at least temporary deficiency in checkpoint activation events downstream from Rad9 phosphorylation. Third, consecutive adaptation events might occur, which is plausible in the case of critically short telomeres because they are not lethal per se. If so, this would raise the question of whether the first adaptation event could favor or even accelerate subsequent ones, perhaps through a priming mechanism or simply because adaptation-promoting factors such as Cdc5 would already be present at high levels. In this context, the initial telomeric damage and subsequent genome rearrangements might be less detrimental to cell growth than other chromosomal breaks leading to loss of essential genes, for instance.

In adaptation-deficient strains, the mutation rate was approximately twofold lower than in adaptation-proficient strains at senescence crisis (Figs. 6, 7). Several non-mutually exclusive mechanisms have been suggested to explain genome instability in senescence. Dysfunctional or short telomeres can lead to extensive resection and end degradation, which would initiate genome instability close to chromosome ends (Garvik et al. 1995; Hackett and Greider 2003; Fallet et al. 2014). Exposed ssDNA or telomere-free ends can also cause global genome instability by recombination with homologous sequences or telomere fusions and subsequent breakage–fusion–bridge cycles (Murnane 2006). Alternatively, sister dysfunctional/short telomeres can fuse, perhaps through faulty replication and fork closure, and form dicentric or other types of unstable chromosomes (Beyer and Weinert 2016). In addition, repair attempts may leave toxic or unstable repair intermediates such as half crossover-initiated cascades, as observed when break-induced replication is ineffective (Vasan et al. 2014). Resolution of chromosomal instability by successive recombination and breakage events over many cell divisions may then spread genome instability across chromosomes. The possibility that the stabilization of the genome spans over several cell divisions is consistent with the nonterminal arrests that we describe, which increase the chances of subsequent arrests, as we noticed previously (Xu et al. 2015). We thus propose that, although adaptation does not change DNA repair options or mechanisms, it could be an important mechanism to force mitosis in cells that might otherwise be permanently arrested, thus promoting progress toward resolution of the instability.

In conclusion, the role of adaptation in senescence described here may have implications for understanding of the early steps of tumorigenesis. We provide a plausible scenario through which mutations and genome instability in general, key enabling characteristics of cancer, can arise in the absence of prior mutations, since telomerase is physiologically repressed in the vast majority of somatic cells in humans. This scenario is consistent with evidence of telomere exhaustion, checkpoint activation, and genome instability found in precancerous lesions (Artandi and DePinho 2010; Hanahan and Weinberg 2011). In addition, because senescent cells accumulate with age (Jeyapalan et al. 2007), adaptation to telomere signaling could be involved in the association between an increased risk of cancer and age.

Materials and methods

Yeast strains

All yeast strains used in this study have a W303 background corrected for *RAD5* and *ADE2* (*rad5-535* and *ade2-1* in the original strain) (see Supplemental Table S1).

Terminal restriction Southern blot analysis

Genomic DNA was extracted from cultures using a standard phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1) purification procedure and isopropanol precipitation. A sample of 500 ng of genomic DNA was digested with XhoI, and the products were ethanol-precipitated, resuspended in loading buffer (gel loading dye, Purple 6X, New England Biolabs), and resolved on a 1% agarose gel for 4 h at 150 V. The gel was then soaked in a denaturation bath (0.4 M NaOH, 1 M NaCl) for 20 min and transferred by capillary action to a charged nylon membrane (Hybond XL, GE Healthcare). The telomere-specific oligonucleotide probe (5′-GGGTGTGGGTGTGTGTG GTGGG-3′) was ^{32}P-labeled at the 5′ terminus with ATP (γ-^{32}P)

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs). The membrane was then hybridized using the Rapid-hyb buffer protocol (GE Healthcare). In brief, the membrane was prehybridized for 1 h at 42°C in Rapid-hyb buffer, 20 pmol of the radioactive probe was added, and the incubation was continued for 1 h. The membrane was washed consecutively with 5× SSC and 0.5% SDS for 10 min at 42°C, 5× SSC and 0.1% SDS for 20 min at 42°C, and 1× SSC and 0.1% SDS for 30 min at 25°C. The membrane was then imaged with a Typhoon FLA 9500 scanner (GE Healthcare).

SDS-PAGE and Western blot analysis

Aliquots of 5×10^7 cells were harvested by centrifugation. The pellets were lysed in 0.2 M NaOH for 10 min on ice, and proteins were precipitated by the addition of 50 µL of 50% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged at 16,100*g* for 10 min at 4°C, and the pellets were resuspended in 4× Laemmli buffer and heated for 5 min at 95°C. Samples were separated in a denaturing 7.5% 37.5:1 polyacrylamide gel, and proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Protran 0.45 NC, GE Healthcare). The membranes were stained with Ponceau Red and immunoblotted with anti-Rad53 primary antibody (Abcam, EL7.E1) that recognizes both the unphosphorylated and phosphorylated forms of Rad53. Blots were then incubated with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody, and the signal was detected using ECL reagent (Amersham, GE Healthcare).

Recombination efficiency measurement

The recombination efficiency measurement upon induction of a single DSB was performed as described (Batte et al. 2017). Briefly, the yeast strains were grown overnight in rich medium containing 2% lactate, 3% glycerol, and 0.05% glucose; counted; and then plated on 2% galactose plates to induce I-Sce I expression and on 2% glucose plates to normalize the cell count and plating efficiency.

PFGE

To prepare DNA samples for PFGE, exponentially growing cells were harvested, washed in 10 mM Tris-HCl and 50 mM EDTA (pH 8.0), and cast in plugs of 0.56% low-melting-point agarose (MP Biomedicals) in 50 mM potassium phosphate and 50 mM EDTA (pH 7.0). Plugs were incubated in the same buffer containing 10 mM dithiothreitol and 0.4 mg/mL Zymolyase 20T (Seikagaku) for 24 h at 37°C. The solution was then replaced with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 50 mM EDTA, 1% sarkosyl, and 2 mg/mL proteinase K (New England Biolabs), and the plugs were incubated for 24 h at 50°C. After extensive washing with 10 mM Tris-HCl and 50 mM EDTA (pH 8.0), the plugs were loaded into the wells of a 0.9% agarose gel (Seakem Gold, Ozyme) and electrophoresed at 13°C in a rotating PFGE apparatus (Rotaphor 6.0, Biometra) according to the manufacturer's instructions for separation of *S. cerevisiae* chromosomes. DNA was visualized by staining with 0.5 µg/mL ethidium bromide under UV illumination (Gel Doc, Bio-Rad).

Fluctuation assay for mutation rate estimation

Cells bearing the TetO2-*TLC1* construct and the endogenous *CAN1* gene were used for this assay. Five independent clones of each genotype (wild-type, *cdc5-ad*, and *tid1Δ*) were selected, grown in 5 or 10 mL of medium containing 30 µg/mL dox for 22 h at 30°C, and counted. Samples of 200–500 cells were plated on standard (control) YPD plates, and 10^7 or 10^8 cells were plated on synthetic complete medium-containing 2% glucose (SD) plates lacking arginine and supplemented with 60 µg/mL canavanine. Each day, the liquid cultures were diluted to 1×10^4 cells per milliliter. Plates were incubated for 48 h at 30°C, and the colonies were counted. The number of Can^R colonies growing on the canavanine plates gives a value *r* corresponding to the number of mutants. The colony count on the control YPD plates was for correction of the cell number added to the canavanine plates. From the *r* values of the five independent cultures, which theoretically follows the Luria and Delbrück distribution, the mutation rate was estimated using the maximum likelihood method (MSS algorithm) (Sarkar et al. 1992; Foster 2006). This algorithm is based on the Lea and Coulson function that gives the different terms $(p_r)_{r\geq 0}$ of the Luria and Delbrück distribution for a given number of mutations *m*:

$$p_0 = e^{-m};\ p_r = \frac{m}{r}\sum_{i=0}^{r-1}\frac{p_i}{(r-i+1)},$$

where $(p_r)_{r\geq 0}$ is the probability of obtaining a culture containing *r* mutants from a number of mutations *m*. To estimate the value of *m* that best fits the probability $(p_r)_{r\geq 0}$ from the experimental measure of *r*, the algorithm maximizes the likelihood function *f*:

$$f(r|m) = \prod_{i=1}^{C} f(r_i|m),$$

where $f(r|m) = p_r$, and *C* is the number of cultures. After obtaining an estimated value of *m*, a correction was applied to take into account that only a fraction of the culture was used to estimate the number of mutants, which would lead to a sampling bias of $m_{\mathrm{act}} = m_{\mathrm{obs}}[(z-1)/z\ln(z)]$, where m_{act} is the corrected number of mutants, m_{obs} is the number of mutants before correction, and *z* is the fraction of plated cells. The mutation rate was then obtained by dividing m_{act} by the total number of cells in the culture.

The 95% confidence interval $(m_{\mathrm{down}}, m_{\mathrm{up}})$ of m_{act} was estimated according to the Stewart method (Stewart 1994; Foster 2006): $m_{\mathrm{up}} = \exp[\ln(m_{\mathrm{act}}) + 1.96\sigma(e^{1.96\sigma})^{-0.315}]$ and $m_{\mathrm{down}} = \exp[\ln(m_{\mathrm{act}}) - 1.96\sigma(e^{1.96\sigma})^{+0.315}]$, where σ is the standard deviation of $\ln(m_{\mathrm{act}})$, calculated with the following approximation:

$$\sigma \approx \frac{1.225m^{-0.315}}{\sqrt{C}},$$

where *C* is the number of cultures. Finally, m_{up} and m_{down} were divided by the average total number of cells in the cultures to obtain the 95% confidence interval of the estimated mutation rate.

Microfluidic experiments

The microfluidic mold was fabricated using standard soft lithography techniques as described (Fehrmann et al. 2013). Epoxy replicates of the mold were used to make the chips. To cast the chip, polydimethylsiloxane (PDMS; Sylgard 184) and curing agent were mixed in a 10:1 ratio, degassed with a vacuum pump for 30 min, and poured into the mold. The PDMS was cured by baking for 5 h at 70°C and then carefully removed from the mold. A biopsy puncher (1.5 mm; Harris Unicore) was used to create holes to connect the tubing. The PDMS and a glass coverslip (24 × 50 mm) were surface-activated by plasma (Diener Electronic) to covalently bond the two parts. SD medium was filtered using a 0.22-µm polyethersulfone filter (Millipore) and loaded into the device using a peristaltic pump (IPCN, Ismatec). Cells from a log-phase culture ($OD_{600} = 0.5$) were gently injected into the device using a 1-mL syringe. A constant medium flow (28 µL/min) was maintained throughout the experiment. For experiments with strains expressing the TetO2-*TLC1* construct, cells were allowed to

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

divide and invade the cavities for 12–24 h before the medium was switched to SD containing 30 µg/mL dox.

Time-lapse and fluorescence microscopy

Cells in the microfluidic device were imaged using a fully motorized Axio Observer Z1 inverted microscope (Zeiss) with a 100× immersion objective, a Hamamatsu Orca R2 camera, and constant focus maintained with focus stabilization hardware (Definite focus, Zeiss). To minimize phototoxicity, we used light-emitting diode light sources for both phase contrast and fluorescence images (Colibri 2, Zeiss) with the following settings: for standard microfluidic time-lapse experiments, 4.0 V for 70 msec; for time-lapse experiments using the FHA1-mCherry/Hta2-yECFP reporters, 3.0 V for 40 msec; and for phase contrast, 10% of maximum intensity for 200 msec for the CFP channel and 15% of maximum intensity for 500 msec for the mCherry channel, with 2 × 2 binning in all three. The temperature was maintained at 30°C with a controlled heating unit and an incubation chamber that held the entire microscope base, including the stage and the objectives. Images were acquired every 10 min using Zen software (Zeiss). All aspects of image acquisition were fully automated and controlled, including temperature, focus, stage position, and time-lapse imaging. Images were acquired for up to 120 h in standard experiments. Static fluorescence microscopy experiments using the FHA1-mCherry reporter were performed with the following settings: 4.0 V for 70 msec for phase contrast, 100% intensity for 300 msec for the CFP channel, and 100% intensity for 1000 msec for the mCherry channel without binning. Ddc2-eGFP was detected similarly with the GFP filter (100% intensity for 400 msec). For the experiment using the single inducible HO cut in Supplemental Figure S4, B and C, live-cell images were acquired at the indicated time points after induction using a wide-field inverted microscope (Leica, DMI-6000B) equipped with adaptive focus control to eliminate Z drift, a 100×/1.4 NA immersion objective with a Prior NanoScanZ Nanopositioning Piezo Z stage system, a CMOS camera (ORCA-Flash 4.0, Hamamatsu), and a solid-state light source (SpectraX, Lumencore). The system was piloted by MetaMorph software (Molecular Devices). Fifteen focal steps of 0.25 µm were acquired sequentially for CFP, YFP, and mCherry, with an exposure time of 100 msec using solid state 434-, 475-, and 575-nm diodes and appropriate filters (GFP-mCherry filter: excitation double BP, 450–490/550–590 nm and dichroic double BP 500–550/600–665 nm; ECFP/EYFP/mCherry filter: excitation triple BP 420–450/490–515/560–590 and dichroic triple BP 455–485/520–550/600–670; Chroma Technology Corp.).

Image analysis and single-cell lineage tracking

Custom software written in Matlab, phyloCell 2.1 was used to segment and track cells and assign mother–daughter links. Time-lapse images were exported as high-resolution TIF files and analyzed with the graphical user interface of phyloCell. For details about the routines and algorithms implemented in phyloCell, see Fehrmann et al. (2013). In contrast to Fehrmann et al. (2013), the cell at the tip of the cavity would frequently be replaced by its daughter cell, which was intended in our approach. To efficiently track such lineages, in which we frequently switched focus from a given cell to its daughter cell, the time-lapse images were retrospectively analyzed starting from the last image. This avoided tracking of lineages in which the cells were ejected from the microcavity. In experiments involving the FHA1-mCherry/Hta2-yECFP reporter, the nucleus was segmented using the CFP channel with an Otsu threshold method, and the cell was segmented with either phyloCell for microfluidic experiments or a custom watershed-based method for phase contrast images. The nuclear mCherry signal was measured in the overlap of the cellular and nuclear masks and averaged over the measured area of the nucleus. For the experiment using the single inducible HO cut, image analysis was performed on the median slice of each image. Nuclei were segmented based on the CFP signal (automatic Otsu threshold), and the mean mCherry intensity was measured for each nucleus using Fiji software (Schindelin et al. 2012).

Checkpoint activation reporter system

The checkpoint activation reporter system consisted of the Rad53 FHA1 domain coupled to mCherry and the nuclear marker Hta2-yECFP. A codon-shuffled sequence encoding the Rad53 FHA1 domain (amino acids 14–164) flanked by two 15-amino-acid linkers was cloned into a pSIV URA3 vector under the pRPS20 promoter and fused with mCherry (pNM66) (Wosika et al. 2016). For Supplemental Figure S4, B and C, the wild-type and H75A mutant versions of FHA1 were cloned into the pSIV URA3 vector under the pRPL24A promoter (pNM65 and pNM142). BstBI-digested fragments of these plasmids were then transformed into the strains of interest and inserted into the *URA3* locus. The endogenous *HTA2* gene was tagged with yECFP-Kan amplified from the pKT102 plasmid (Sheff and Thorn 2004).

Computational and statistical analyses

All computational and statistical analyses were performed with the statistical toolbox of Matlab R2013a. Data are represented as the median, first and third quartiles, 99th percentiles (box plots), the mean ± SD, or the mean and 95% confidence interval, as indicated in the legends. Differences were compared using Student's *t*-test, the Mann-Whiney *U* test, and two-sample Kolmogorov-Smirnov test as indicated.

Acknowledgments

We thank David Toczyski, Jim Haber, and Naïma Belgareh Touzé for yeast strains and plasmids; Pascale Jolivet, Aubin Fleiss, and Gilles Fischer for technical help; and Eric Vandjour for medium preparation. We also thank members of M.T.T.'s laboratory, Miguel Ferreira, Claus Azzalin, Ted Weinert, Titia de Lange, Joachim Lingner, Jim Haber, and Damien D'Amours for fruitful discussions. K.D. thanks the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007 2013/European Research Council grant agreement 281287) for funding. S.P. thanks the Swiss National Science Foundation and the University of Lausanne for funding, and Nadim Mira for technical assistance. This work was supported by "Fondation de la Recherche Medicale" ("MTT Équipe Labellisée") and the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" Program (LabEx Dynamo) and ANR-16-CE12-0026 to M.T.T. and G.C. H.C. has been supported by a doctoral grant from the Paris Sciences et Lettres (PSL) Idex program implemented by the ANR (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL).

Author contributions: Z.X. and M.T.T. conceived the study. H.C., Z.X., S.P., G.C., K.D., and M.T.T. performed the methodology. Z.X. and G.C. were responsible for the software used. H.C. and Z.X. performed the formal analysis. H.C., Z.X., M.C.M., M.L.-A, S.P., and K.D. performed the investigations. H.C., Z.X., and M.T.T. wrote the original draft of the manuscript. H.C. and Z.X. visualized the study. Z.X. and M.T.T. supervised the study.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

References

Artandi SE, DePinho RA. 2000. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **10:** 39–46.

Artandi SE, DePinho RA. 2010. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* **31:** 9–18.

Aunan JR, Cho WC, Soreide K. 2017. The biology of aging and cancer: a brief overview of shared and divergent molecular hallmarks. *Aging Dis* **8:** 628–642.

Batte A, Brocas C, Bordelet H, Hocher A, Ruault M, Adjiri A, Taddei A, Dubrana K. 2017. Recombination at subtelomeres is regulated by physical distance, double-strand break resection and chromatin status. *EMBO J* **36:** 2609–2625.

Beyer T, Weinert T. 2016. Ontogeny of unstable chromosomes generated by telomere error in budding yeast. *PLoS Genet* **12:** e1006345.

Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91:** 25–34.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8:** 729–740.

Carneiro MC, de Castro IP, Ferreira MG. 2016. Telomeres in aging and disease: lessons from zebrafish. *Dis Model Mech* **9:** 737–748.

Chen C, Kolodner RD. 1999. Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet* **23:** 81–85.

Chen C, Umezu K, Kolodner RD. 1998. Chromosomal rearrangements occur in *S. cerevisiae rfa1* mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair. *Mol Cell* **2:** 9–22.

Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA. 1999. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97:** 527–538.

Clerici M, Trovesi C, Galbiati A, Lucchini G, Longhese MP. 2014. Mec1/ATR regulates the generation of single-stranded DNA that attenuates Tel1/ATM signaling at DNA ends. *EMBO J* **33:** 198–216.

d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426:** 194–198.

Donnianni RA, Ferrari M, Lazzaro F, Clerici M, Tamilselvan Nachimuthu B, Plevani P, Muzi-Falconi M, Pellicioli A. 2010. Elevated levels of the polo kinase Cdc5 override the Mec1/ATR checkpoint in budding yeast by acting at different steps of the signaling pathway. *PLoS Genet* **6:** e1000763.

Durocher D, Henckel J, Fersht AR, Jackson SP. 1999. The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell* **4:** 387–394.

Emili A. 1998. MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage. *Mol Cell* **2:** 183–189.

Enomoto S, Glowczewski L, Berman J. 2002. MEC3, MEC1, and DDC2 are essential components of a telomere checkpoint pathway required for cell cycle arrest during senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13:** 2626–2638.

Fallet E, Jolivet P, Soudet J, Lisby M, Gilson E, Teixeira MT. 2014. Length-dependent processing of telomeres in the absence of telomerase. *Nucleic Acids Res* **42:** 3648–3665.

Fehrmann S, Paoletti C, Goulev Y, Ungureanu A, Aguilaniu H, Charvin G. 2013. Aging yeast cells undergo a sharp entry into senescence unrelated to the loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Rep* **5:** 1589–1599.

Foster PL. 2006. Methods for determining spontaneous mutation rates. *Methods Enzymol* **409:** 195–213.

Galgoczy DJ, Toczyski DP. 2001. Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. *Mol Cell Biol* **21:** 1710–1718.

Garvik B, Carson M, Hartwell L. 1995. Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* **15:** 6128–6138.

Gonzalez-Garcia MP, Pavelescu I, Canela A, Sevillano X, Leehy KA, Nelson AD, Ibanes M, Shippen DE, Blasco MA, Cano-Delgado AI. 2015. Single-cell telomere-length quantification couples telomere length to meristem activity and stem cell development in *Arabidopsis*. *Cell Rep* **11:** 977–989.

Greider CW. 1998. Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Curr Biol* **8:** R178–R181.

Hackett JA, Greider CW. 2003. End resection initiates genomic instability in the absence of telomerase. *Mol Cell Biol* **23:** 8450–8461.

Hackett JA, Feldser DM, Greider CW. 2001. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* **106:** 275–286.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100:** 57–70.

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144:** 646–674.

Harrison JC, Haber JE. 2006. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* **40:** 209–235.

Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science* **311:** 1257.

Ijpma AS, Greider CW. 2003. Short telomeres induce a DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14:** 987–1001.

Jain D, Cooper JP. 2010. Telomeric strategies: means to an end. *Annu Rev Genet* **44:** 243–269.

Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U. 2007. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* **128:** 36–44.

Kalsbeek D, Golsteyn RM. 2017. G2/M-phase checkpoint adaptation and micronuclei formation as mechanisms that contribute to genomic instability in human cells. *Int J Mol Sci* **18:** E2344.

Kaye JA, Melo JA, Cheung SK, Vaze MB, Haber JE, Toczyski DP. 2004. DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. *Curr Biol* **14:** 2096–2106.

Lea DE, Coulson CA. 1949. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J Genet* **49:** 264–285.

Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW II, Greider CW, DePinho RA. 1998a. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392:** 569–574.

Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umezu K, Kolodner RD, Haber JE. 1998b. *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94:** 399–409.

Lee SE, Pellicioli A, Malkova A, Foiani M, Haber JE. 2001. The *Saccharomyces* recombination protein Tid1p is required for adaptation from G2/M arrest induced by a double-strand break. *Curr Biol* **11:** 1053–1057.

Leroy C, Lee SE, Vaze MB, Ochsenbien F, Guerois R, Haber JE, Marsolier-Kergoat MC. 2003. PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol Cell* **11:** 827–835.

Downloaded from genesdev.cshlp.org on November 21, 2018 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Lingner J, Cooper JP, Cech TR. 1995. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* **269:** 1533–1534.

Lundblad V, Blackburn EH. 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1⁻ senescence. *Cell* **73:** 347–360.

Lundblad V, Szostak JW. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57:** 633–643.

Lydall D, Weinert T. 1995. Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* **270:** 1488–1491.

Maciejowski J, de Lange T. 2017. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18:** 175–186.

Maciejowski J, Li Y, Bosco N, Campbell PJ, de Lange T. 2015. Chromothripsis and kataegis induced by telomere crisis. *Cell* **163:** 1641–1654.

Malkova A, Naylor ML, Yamaguchi M, Ira G, Haber JE. 2005. RAD51-dependent break-induced replication differs in kinetics and checkpoint responses from RAD51-mediated gene conversion. *Mol Cell Biol* **25:** 933–944.

Melo JA, Cohen J, Toczyski DP. 2001. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* **15:** 2809–2821.

Mersaoui SY, Gravel S, Karpov V, Wellinger RJ. 2015. DNA damage checkpoint adaptation genes are required for division of cells harbouring eroded telomeres. *Microb Cell* **2:** 394–405.

Murnane JP. 2006. Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair* **5:** 1082–1092.

Pardo B, Marcand S. 2005. Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *EMBO J* **24:** 3117–3127.

Paschini M, Toro TB, Lubin JW, Braunstein-Ballew B, Morris DK, Lundblad V. 2012. A naturally thermolabile activity compromises genetic analysis of telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191:** 79–93.

Pellicioli A, Lee SE, Lucca C, Foiani M, Haber JE. 2001. Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol Cell* **7:** 293–300.

Pobiega S, Marcand S. 2010. Dicentric breakage at telomere fusions. *Genes Dev* **24:** 720–733.

Sandell LL, Zakian VA. 1993. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75:** 729–739.

Sarkar S, Ma WT, Sandri GH. 1992. On fluctuation analysis: a new, simple and efficient method for computing the expected number of mutants. *Genetica* **85:** 173–179.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9:** 676–682.

Schwartz MF, Duong JK, Sun Z, Morrow JS, Pradhan D, Stern DF. 2002. Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol Cell* **9:** 1055–1065.

Serrano D, D'Amours D. 2014. When genome integrity and cell cycle decisions collide: roles of polo kinases in cellular adaptation to DNA damage. *Syst Synth Biol* **8:** 195–203.

Shah PP, Zheng X, Epshtein A, Carey JN, Bishop DK, Klein HL. 2010. Swi2/Snf2-related translocases prevent accumulation of toxic Rad51 complexes during mitotic growth. *Mol Cell* **39:** 862–872.

Shay JW, Reddel RR, Wright WE. 2012. Cancer. Cancer and telomeres—an ALTernative to telomerase. *Science* **336:** 1388–1390.

Sheff MA, Thorn KS. 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21:** 661–670.

Soudet J, Jolivet P, Teixeira MT. 2014. Elucidation of the DNA end-replication problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **53:** 954–964.

Stewart FM. 1994. Fluctuation tests: how reliable are the estimates of mutation rates? *Genetics* **137:** 1139–1146.

Suram A, Herbig U. 2014. The replicometer is broken: telomeres activate cellular senescence in response to genotoxic stresses. *Aging Cell* **13:** 780–786.

Sweeney FD, Yang F, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Durocher D. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr Biol* **15:** 1364–1375.

Syljuasen RG, Jensen S, Bartek J, Lukas J. 2006. Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. *Cancer Res* **66:** 10253–10257.

Teixeira MT. 2013. *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study replicative senescence triggered by telomere shortening. *Front Oncol* **3:** 101.

Toczyski DP, Galgoczy DJ, Hartwell LH. 1997. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* **90:** 1097–1106.

Vasan S, Deem A, Ramakrishnan S, Argueso JL, Malkova A. 2014. Cascades of genetic instability resulting from compromised break-induced replication. *PLoS Genet* **10:** e1004119.

Vialard JE, Gilbert CS, Green CM, Lowndes NF. 1998. The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *EMBO J* **17:** 5679–5688.

Vidanes GM, Sweeney FD, Galicia S, Cheung S, Doyle JP, Durocher D, Toczyski DP. 2010. CDC5 inhibits the hyperphosphorylation of the checkpoint kinase Rad53, leading to checkpoint adaptation. *PLoS Biol* **8:** e1000286.

Wosika V, Durandau E, Varidel C, Aymoz D, Schmitt M, Pelet S. 2016. New families of single integration vectors and gene tagging plasmids for genetic manipulations in budding yeast. *Mol Genet Genomics* **291:** 2231–2240.

Wu RA, Upton HE, Vogan JM, Collins K. 2017. Telomerase mechanism of telomere synthesis. *Annu Rev Biochem* **86:** 439–460.

Xu Z, Fallet E, Paoletti C, Fehrmann S, Charvin G, Teixeira MT. 2015. Two routes to senescence revealed by real-time analysis of telomerase-negative single lineages. *Nat Commun* **6:** 7680.

Supplemental Information

Supplemental Figures

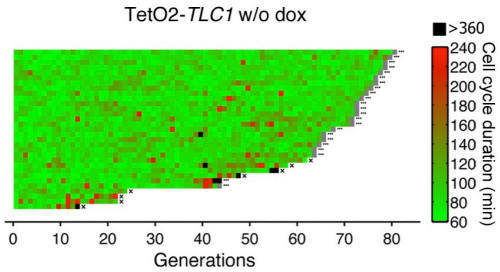


Figure S1, related to Figure 1. Wild-Type Telomerase-Positive Lineages Grown in the Absence of Doxycycline

Display of TetO2-*TLC1* lineages (n = 31) grown in the absence of doxycycline in the microfluidics device. See Fig. 1B for a description of the representation.

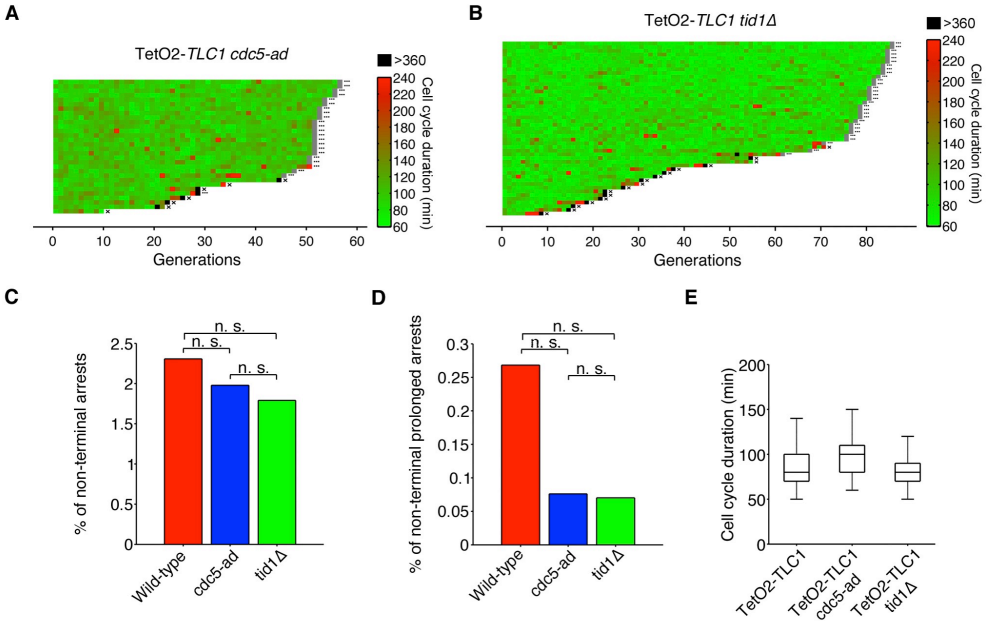


Figure S2, related to Figure 2. Telomerase-Positive *cdc5-ad* and *tid1*Δ Strains have Similar Cell Cycle Durations to Wild-type.

(A and B) Display of TetO2-*TLC1 cdc5-ad* lineages (n = 30, A) and TetO2-*TLC1 tid1*Δ lineages (n = 47, B) grown without doxycycline in the microfluidics device. See Fig. 1B for a description of the representation.

(C and D) Percentage of non-terminal arrests (C) and prolonged non-terminal arrests (D) over all cell cycles for telomerase-positive lineages of the indicated genotypes (wild-type, *cdc5-ad* and *tid1*Δ), as extracted from experiments shown in Supplemental Fig. S1, S2A and S2B, respectively. Total number of cell cycles in each genotype: N > 1300. n.s., not significant by $\chi 2$ goodness-of-fit test.

(E) Cell cycle durations calculated from the data shown in Supplemental Fig. S1, (B) and (C) for telomerase-positive TetO2-*TLC1* wild-type, *cdc5-ad,* and *tid1*Δ strains.

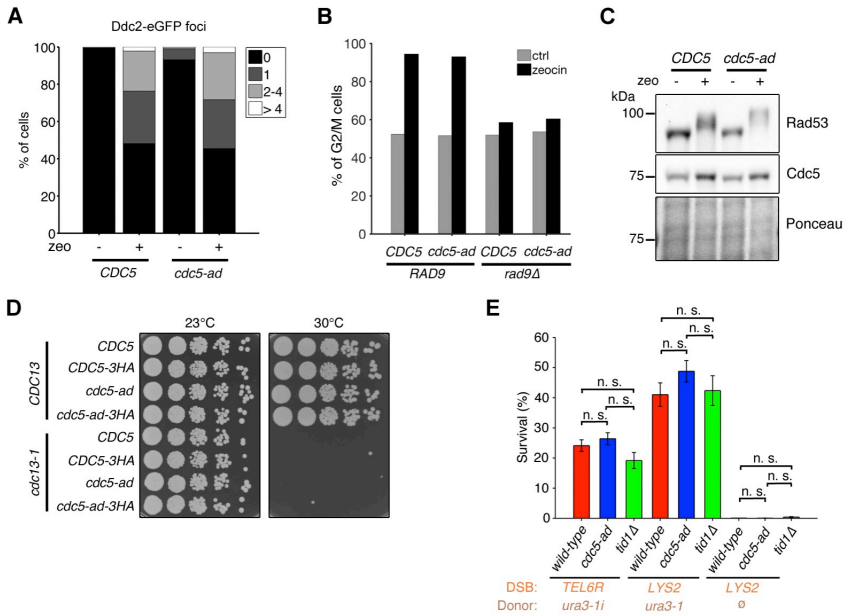


Figure S3, related to Figure 3. The *cdc5-ad* Mutant is Checkpoint-Proficient.

(A) Quantification of fluorescent foci of *CDC5* and *cdc5-ad* cells harboring Ddc2-eGFP and left untreated (-) or treated with zeocin 300 µg/mL for 3.5 h. n ≥ 200 cells for each condition and genotype.

(B) Fraction of cells with a large bud, corresponding to the G2/M phase, in *CDC5*, *cdc5-ad*, *CDC5 rad9*Δ, and *cdc5-ad rad9*Δ cells left untreated (ctrl) or treated with zeocin 300 µg/mL for 3.5 h. n ≥ 200 cells for each condition and genotype.

(C) Representative western blot of Cdc5 and total Rad53 (unphosphorylated and phosphorylated) in *CDC5* and *cdc5-ad* cells left untreated (-) or treated with zeocin 300 µg/mL for 3.5 h. Phosphorylated Rad53 appears as a slower migrating band after electrophoresis, as previously described (Sanchez et al. 1996; Sun et al. 1996). Ponceau red staining of the same membrane is shown as a loading control.

(D) Representative spot assay showing the growth defect in the *cdc13-1 CDC5* and *cdc5-ad* strains grown at the restrictive temperature (30°C). Five-fold serial dilutions of cells of each genotype were spotted and grown at 23°C for 3 days or at 30°C for 2 days.

(E) Mean survival frequencies measured after recombinational repair of a DSB induced at the indicated locus ("TEL6R": subtelomere of the right arm of chromosome 6; "LYS2": LYS2 locus), with the indicated recombination substrate ("Donor"; "*ura3-1i*": *ura3-1* allele in reversed orientation; "*ura3-1*": *ura3-1* allele; "ø": no donor). Strains with no donor were used as a negative control. Error bars represent the standard error (SEM) of at least 3 independent experiments. n.s., not significant by the Mann–Whitney *U* test.

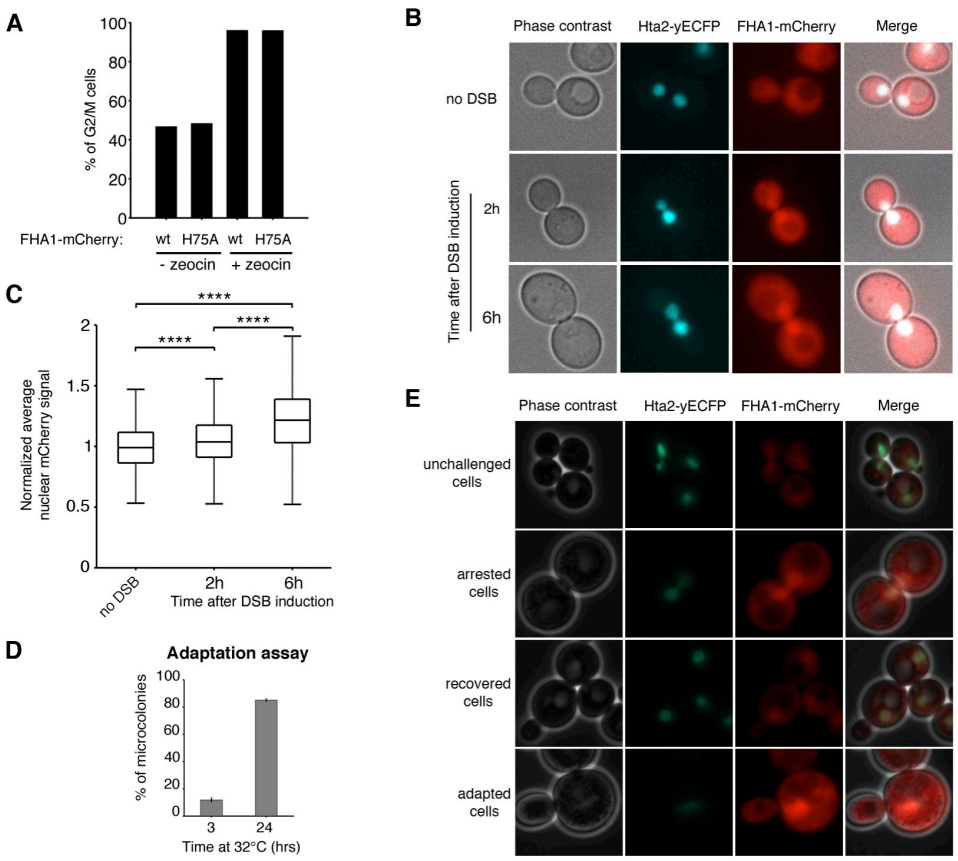


Figure S4, related to Figure 4. Specificity of the Checkpoint Activation Reporter.

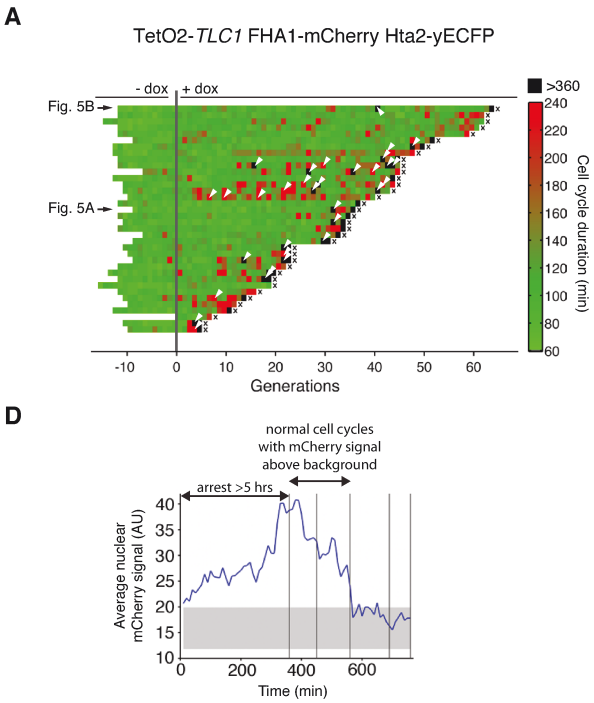
(A) Fraction of cells in G2/M phase (i.e., carrying a large bud) carrying wild-type (wt) or mutant (H75A) forms of the FHA1-mCherry reporter. Cells were left untreated () or treated with zeocin 300 µg/mL for 3.5 h. n ≥ 170 for each condition and genotype.

(B) Representative phase contrast and fluorescence images of cells carrying a single cleavage site for HO endonuclease and expressing the FHA1-mCherry reporter. Cells were incubated for 2 or 6 h in galactose-containing medium to induce expression of HO endonuclease. Control cells (no DSB) were cells with an uncleavable HO site and were incubated for 2 h in galactose-containing medium.

(C) Quantification of the nuclear mCherry signal in the experiment shown in (B). n > 400 cells for each condition and genotype. ****p < 0.0001 by the Mann–Whitney *U* test.

(D) Demonstration of adaptation by the *cdc13-1* strain used for the experiment in Fig. 4D. Cells were incubated at 32°C for 3 h in rich liquid medium before being plated on solid medium. Microcolonies of more than 3 cell bodies were counted immediately (3 h) or 21 h (24 h) after transfer to plates, and the percentage of adapted cells calculated. Data represent the mean ± SD of three independent experiments.

(E) Representative phase contrast and fluorescence images of *cdc13-1* cells carrying the checkpoint activation reporter and incubated at 23°C (unchallenged), 23°C then shifted to 32°C for 3 h (arrested), 23°C, 32°C for 3 h, then 23°C for 2 h (recovered), or 23°C and 32°C for 24 h (adapted) (see Fig. 4D).



B

Arrest >5 hrs (white arrows)	n=32
with mCherry signal < backgroung	n=8
with mCherry signal > background	n=24
Cell cycle following prolonged arrest (>5 hrs) with mCherry signal > background	n=48
adaptation subset	n=38
recovery subset	n=10

C

Adaptation events	n=38
followed immediately by a normal cell cycle	n=15
followed at some point by a normal cell cycle	n=8
followed exclusively by long cell cycles	n=15

Figure S5, related to Figure 5. Expression of the Checkpoint Activation Reporter Does Not Affect the Senescence Profile of Telomerase-Positive or -Negative Lineages.

(A) Display of Tet*O2-TLC1* FHA-mCherry Hta2-yECFP lineages (n = 35) before and after addition of doxycycline (30 µg/mL, designated generation 0). Black arrows indicate the lineages represented in Fig. 5A and 5B; white arrows indicate prolonged cell cycles (here defined as >5 h rather than 6 h to ensure sufficient events) selected for analysis in (B-D) and Fig. 5C-G. See Fig. 1B for further description of the representation.

(B) Description and enumeration of cell cycles considered in Fig. 5C-G.

(C) Enumeration of adapted cells as a function of their proliferation potential.

(D) Representative plot of the average nuclear FHA1-mCherry signal over several cell divisions in a single lineage showing activation of the DNA damage checkpoint (increasing FHA1-mCherry signal), adaptation (maintenance of higher than basal FHA1-mCherry signal), and eventual recovery (return to a basal signal). The gray shaded area represents the average basal reporter signal in normal cell cycles, and the gray vertical lines indicate budding.

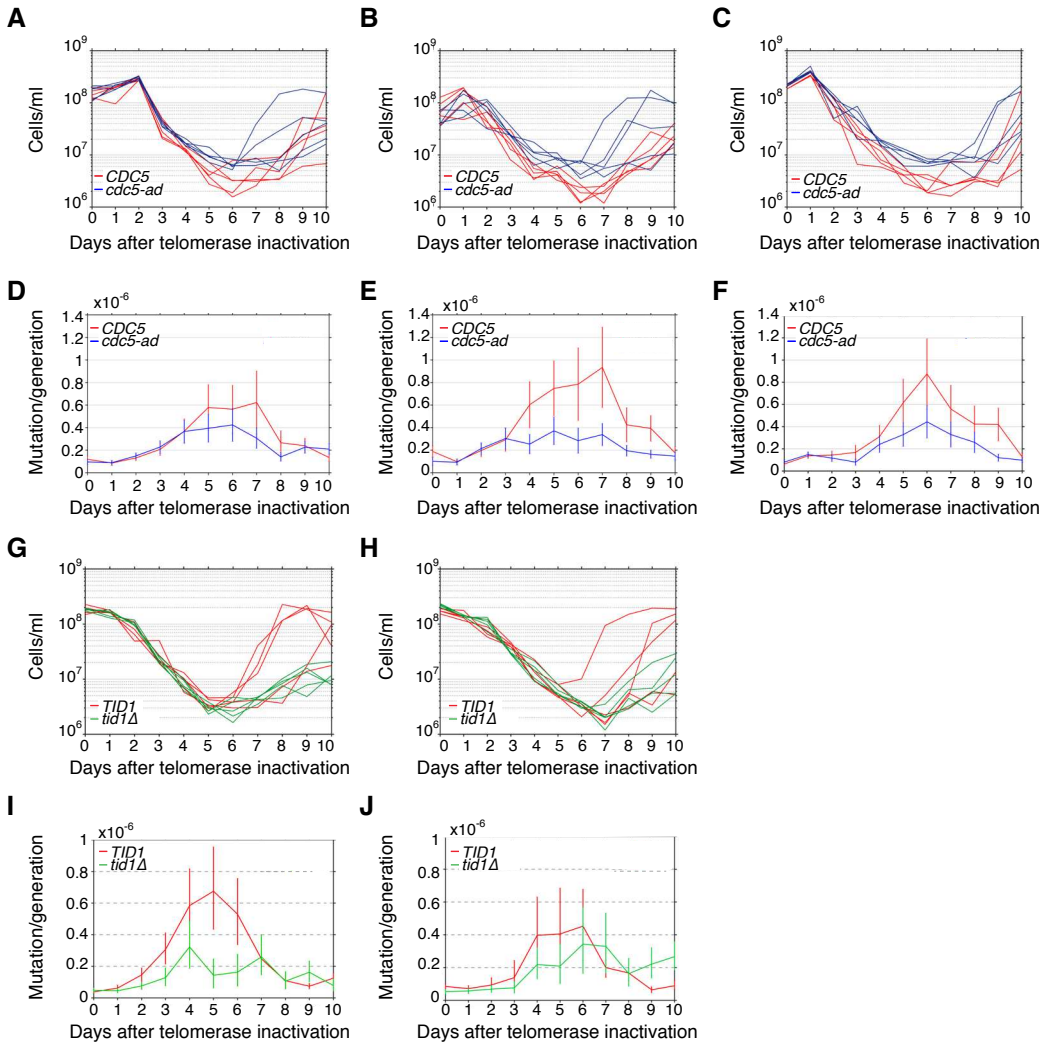


Figure S6, related to Figure 6. Replicates of the Fluctuation Assays.

Replicate experiments that were pooled to generate Fig. 6B–6E.

(A–F) Three independent experiments comparing the mutation rate of telomerase-negative *CDC5* and *cdc5-ad* cells, each performed with 5 independent cultures per genotype. (A–C) Mutation rates were estimated by the fluctuation assay (see also Fig. 6).

(D–F) Individual growth curves that were averaged and plotted in Fig. 6B.

(G–J) Same as (A–F) except telomerase-negative *TID1* and *tid1*Δ cells were examined.

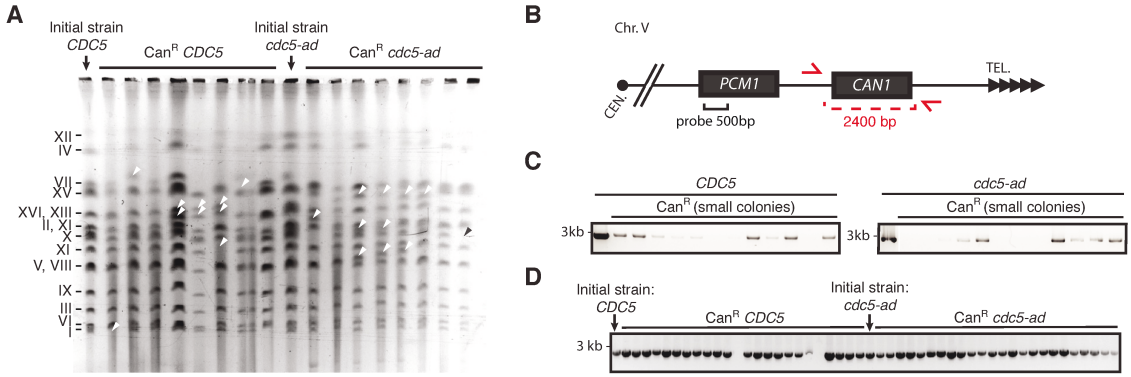


Figure S7, related to Figure 7. Analysis of Can^R Colonies

(A) Replicate assay of Fig. 7A. Chromosomes of Can^R colonies of the indicated genotypes (obtained as in Fig. 6A) were separated by PFGE and visualized by ethidium bromide staining. Arrows illustrate rearranged chromosomes.

(B–D) Colony PCR analysis of Can^R colonies obtained as in Fig. 6A. *CAN1* was amplified using primers on either side of the gene (B, red arrows). Colony PCR products from small- (C) or normal- (D) sized Can^R colonies were electrophoresed and visualized with ethidium bromide.

Supplementary Table

Table S1. List of strains.

Strain	Figure	Genotype
yT528	Fig. 1/S1/S3	*Mat**α** ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc10::CDC10-mCherry-kanMX*
yT719	Fig. 2/S3	yT528 *cdc5::cdc5-ad*
yT762	Fig. 3	*ura3-1/ura3-1 trp1-1/trp1-1 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/ his3-11,15 ADE2/ADE2 LYS2/LYS2 RAD5/RAD5 TLC1/tlc1::kanMX6 CDC5/cdc5-ad*
yT791	Fig. S3	yT528 *ddc2::DDC2-eGFP-caURA3*
yT792	Fig. S3	yT528 *cdc5::cdc5-ad ddc2::DDC2-eGFP-caURA3*
yT815	Fig. S3	yT528 *rad9::LEU2*
yT843	Fig. S3	yT528 *cdc5::cdc5-ad rad9::LEU2*
yT835	Fig. S3	yT528 *cdc5::CDC5-3HA-TRP1*
yT838	Fig. S3	yT719 *cdc-ad::cdc5-ad-3HA-TRP1*
yT851	Fig. S3	*Mat**α** ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc5::CDC5-3HA-TRP1 cdc13-1*
yT853	Fig. S3	*Mat**α** ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc13-1*
yT855	Fig. S3	*Mat**α** ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc5-ad::cdc5-ad-3HA-TRP1 cdc13-1*
yT856	Fig. S3	*Mat**α** ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc5::cdc5-ad cdc13-1*
yT936	Fig. 6/S6/7/S7	yT528 *can1-100::CAN1 chrV(29898-29899)::URA3*
yT938	Fig. 6/S6/7/S7	yT528 *cdc5::cdc5-ad can1-100::CAN1 chrV(29898-29899)::URA3*
yT945	Fig. 4/S4	*ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 hta2::HTA2-ECFP-KANMX6 ura3::caURA3-pRPS20-FHA1-mCherry*
yT972	Fig. 5	*ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 hta2::HTA2-ECFP-KANMX6 ura3::caURA3-pRPS20-FHA1-mCherry*
yT999	Fig. 2/S2	yT528 *tid1::LEU2*
yT1008	Fig. 6/S6/7/S7	yT528 *can1-100::CAN1 chrV(29898-29899)::URA3 tid1::LEU2*
yT1014	Fig. 3	yT762 *TID1/tid1::LEU2*
yT1046	Fig. 4/5/S5	*ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 hta2::HTA2-ECFP-KANMX6 ura3::caURA3-pRPL24A-FHA1-mCherry*
yT1048	Fig. 4/S4	*ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 hta2::HTA2-ECFP-KANMX6 ura3::caURA3-pRPL24A-FHA1-H75A-mCherry*
yT1120	Fig. 4/S4	*ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100*

		hta2::HTA2-ECFP-KANMX6 cdc13-1 ura3::caURA3-pRPS20-FHA1domain-mCherry
yKD1411	Fig. S4	*Mat**a** hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GALHO ade1 leu2-3,112 lys5 trp1::hisG ura3-52 Rad52-YFP hta2::HTA2-ECFP-KanMX6 ura3::caURA3-pRPS20-FHA1domain-mCherry*
yKD1413	Fig. S4	*Mat**a** hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GALHO ade1 leu2-3,112 lys5 trp1::hisG ura3-52 mata-inc Rad52-YFP hta2::HTA2-ECFP-KanMX6 ura3::caURA3-pRPS20-FHA1domain-mCherry*
yKD1183	Fig. S3	*Mat**a** VI-R::ura3-ISceI(lox) ura3-1::ura3-1(lox-KanMx-lox) rap1::GFP-RAP1(LEU2) hmLΔ::HPH trp1::pGal1-ISceI-TRP*
yKD1285	Fig. S3	*Mat**a** lys2::ura3-ISceI(lox) rap1::GFP-RAP1(LEU2) hmLΔ::HPH trp1::pGal-ISceI-TRP1*
yKD516	Fig. S3	*Mat**a** lys2::ura3-ISceI(lox) rap1::GFP-RAP1(LEU2) hmLΔ::HPH trp1::pGal-ISceI-TRP1 ura3-1::KanMX*
yT1159	Fig. S3	yKD1183 *cdc5-ad*
yT1162	Fig. S3	yKD1285 *cdc5-ad*
yT1161	Fig. S3	yKD516 *cdc5-ad*
yT1303	Fig. S3	yKD1183 *tid1::LEU2*
yT1304	Fig. S3	yKD1285 *tid1::LEU2*
yT1305	Fig. S3	yKD516 *tid1::LEU2*

Multimedia Files

Supplemental Movie 1

Time-lapse phase contrast images of a representative lineage of the TetO2-*TLC1* strain, from dox addition to senescence and cell death. Timer starts at dox addition.

Supplemental Movie 2

Time-lapse phase contrast images of *cdc13-1 CDC5* and *cdc13-1 cdc5-ad* cells incubated at restrictive temperature (32°C), undergoing adaptation after several hours (*cdc13-1 CDC5 strain*) or permanently arrested (*cdc13-1 cdc5-ad*).

Supplemental Movie 3

Time-lapse phase contrast images of a representative lineage of the TetO2-*TLC1 cdc5-ad* strain, from dox addition to senescence and cell death. Timer starts at dox addition.

Supplemental Movie 4

Time-lapse phase contrast images of a representative lineage of the TetO2-*TLC1 tid1*Δ strain, from dox addition to senescence and cell death. Timer starts at dox addition.

Supplemental Movie 5

Time-lapse overlay of phase contrast and fluorescence (mCherry and CFP) images of a representative lineage of the TetO2-*TLC1* strain bearing the FHA1-mCherry Hta2-yECFP reporter system, from dox addition to senescence and cell death. Timer starts at dox addition.

Supplemental References

Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ. 1996. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271**: 357-360.

Sun Z, Fay DS, Marini F, Foiani M, Stern DF. 1996. Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes Dev* **10**: 395-406.

B. Contribution à la publication Coutelier, Xu *et al*, 2018

Lorsque je suis arrivée au laboratoire, les expériences de microfluidique de cette publication en absence de télomérase et chez les mutants d'adaptation (Figures 1, 2, S1 et S2) étaient en partie effectuées. J'ai participé, en collaboration avec deux équipes (l'équipe de Karine Dubrana et l'équipe de Serge Pelet) à la mise en place et la caractérisation du rapporteur fluorescent de l'activation de la protéine Rad9 (Figures 4, 5, S4 et S5). J'ai aussi effectué la caractérisation de la taille des télomères et du taux de raccourcissement, la réponse checkpoint des cellules *cdc5-ad*, et surtout j'ai réalisé l'analyse et caractérisation de l'instabilité génomique.

C. Résultats complémentaires à cette étude

1. *Matériel et méthodes*

Pour les techniques suivantes : test de fluctuation et calcul du taux de mutation, Southern blot qui ont été utilisées dans la partie des résultats complémentaires, se référer à Coutelier *et al*, 2018 :

Les souches utilisées sont répertoriées dans le tableau suivant (Tableau 2).

Nom de la souche	Figure	Génotype
yT936	15	*Matα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc10::CDC10-mCherry-kanMX can1-100::CAN1 chrV(29898-29899)::URA3*
yT938	15	yT936 *cdc5::cdc5-ad can1-100::CAN1 chrV(29898-29899)::URA3*
yT1020	15	yT938 *POL32::leu2*
yT1022	15	yT936 *POL32::leu2*
yT861	16	*ura3-1/ura3-1 trp1-1/trp1-1 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/ his3-11,15 ADE2/ADE2 LYS2/LYS2 RAD5/RAD5 TLC1/tlc1::kanMX6 CDC5/cdc5-ad RAD51::leu2*

Tableau 2 : Liste des souches utilisées pour les résultats complémentaires.

a) Test de croissance en gouttes

La sénescence est analysée par un test de croissance en gouttes (Xu et al. 2013). Une souche diploïde hétérozygote pour *TLC1* et les gènes d'intérêt est mise à sporuler sur un milieu contenant 2% d'acétate de potassium pendant 3 à 5 jours à 30°C. Les spores de plusieurs tétrades sont micro-manipulées afin d'être placées sur milieu solide YPD, laissées à pousser pendant 48 heures à 30°C, puis leur génotype est déterminé. 8 spores isogéniques indépendantes de chaque génotype sont sélectionnées puis déposées sous forme de gouttes en série (4000 cellules dans la première goutte puis dilution au 1/10ème en série dans de l'eau). Pour chaque passage les cellules sont laissées à pousser pendant 48 heures à 30°C. Les boîtes sont ensuite scannées avec l'appareil EPSON Perfection V750 Pro puis les cellules de la goutte la plus concentrée sont déposées sur une nouvelle boîte selon le même protocole. Ces étapes sont répétées jusqu'à observation de la sénescence et la perte de potentiel prolifératif.

Afin de quantifier la viabilité cellulaire, l'intensité de chaque dépôt est mesurée en utilisant le plug-in « Microarray Profile » du logiciel Image J qui quantifie l'aire des colonies.

L'intensité du signal en fonction de la dilution peut être tracée. Une valeur seuil de l'intensité est déterminée pour correspondre à une culture en phase exponentielle et est ensuite appliquée. L'index de viabilité est le logarithme en base 10 de la dilution théorique nécessaire pour obtenir un signal d'intensité égal à la valeur seuil. L'index de croissance est ensuite représenté par des boîtes à moustache. Les p-values sont obtenues par tests de Wilcoxon.

b) PCR d'amplification des jonctions VI-R/Y′

Cette méthode permet de détecter par PCR des translocations entre le télomère VI-R et des éléments sous-télomériques Y′. J'ai suivi le protocole et les recommandations de (Churikov et al. 2014). Des amorces ont été conçues pour s'hybrider à environ 500 pb des répétitions TG (5′-ATCATTGAGGATCTATAATC-3′) et les amorces s'hybridant avec l'élément Y′ ont été choisies dans la partie proximale du centromère qui est la plus conservée (5′-CTATCTGCTTAGTCGAGGAGAAC-3′). La PCR a été réalisée avec la polymérase Phusion (Thermo Scientific) sur 50 ng d'ADN génomique.

2. Résultats

a) La voie de réparation BIR est impliquée dans l'augmentation d'instabilité génomique en sénescence réplicative

Lorsque je me suis intéressée à l'instabilité génomique en sénescence et ses causes, j'avais effectué des tests de fluctuation (Figure 16A et B) sur des cellules *pol32Δ* et des cellules double mutantes *cdc5-ad pol32Δ*. Ces tests avaient pour objectif de mettre en évidence un lien possible entre la réparation et l'augmentation de l'instabilité génomique et de tester si l'adaptation et la réparation sont deux voies indépendantes contribuant à l'instabilité génomique. Malgré la réussite du test lui même, il était difficile de reproduire de manière robuste les résultats observés. Le taux de mutation, au jour 6 de la sénescence, est toujours au moins deux fois inférieur à celui des cellules de référence en absence de télomérase pour les cellules *cdc5-ad* ou *pol32 Δ* et le taux de mutation des cellules *pol32 Δ cdc5-ad* semble ne pas augmenter ou très peu parraport au premier jour. En revanche la reproductibilité des résultats, en comparaison aux expériences réalisées pour (Coutelier et al, 2018) était plus difficile à obtenir. Cela ne transparaît pas vraiment sur la courbe présentée mais les expériences individuelles montraient des différences parfois compliquées à comprendre en

particulier pour la souche *pol32 Δ cdc5-ad.* J'ai dû appliquer, pour ces expériences, une dilution 10 fois inférieure à celle habituellement utilisée en sénescence pour l'analyse du taux de mutation du gène *CAN1* car les mutants *pol32 Δ* ont un défaut de croissance, ce qui entraîne des biais de calculs du taux de mutation. De plus les courbes de croissance présentaient une baisse élevée du potentiel proliférative au premier jour avec un retour à une courbe plus typique en absence de télomérase au second jour, phénomène que nous n'avons pas su expliquer. Néanmoins, de manière similaire au taux de mutation des cellules *cdc5-ad*, le taux de mutations des cellules *pol32Δ* est significativement diminué par rapport aux cellules exprimant *POL32* (Figure 16C). La voie du BIR est donc impliquée dans l'augmentation de l'instabilité génomique en sénescence. De plus, l'adaptation et la réparation semblent être additives dans l'augmentation de l'instabilité. Mais les difficultés de reproduction et de croissance rencontrées contraignent à rester vigilant sur cette conclusion.

En conclusion, la réparation par le BIR est impliquée dans l'augmentation de l'instabilité génomique en sénescence. Les résultats et la difficulté de reproduire les résultats dans les cellules mutantes *cdc5-ad pol32Δ* suggèrent que les deux voies peuvent être liées, par exemple en permettant, par l'adaptation, la propagation de l'instabilité résultant du BIR.

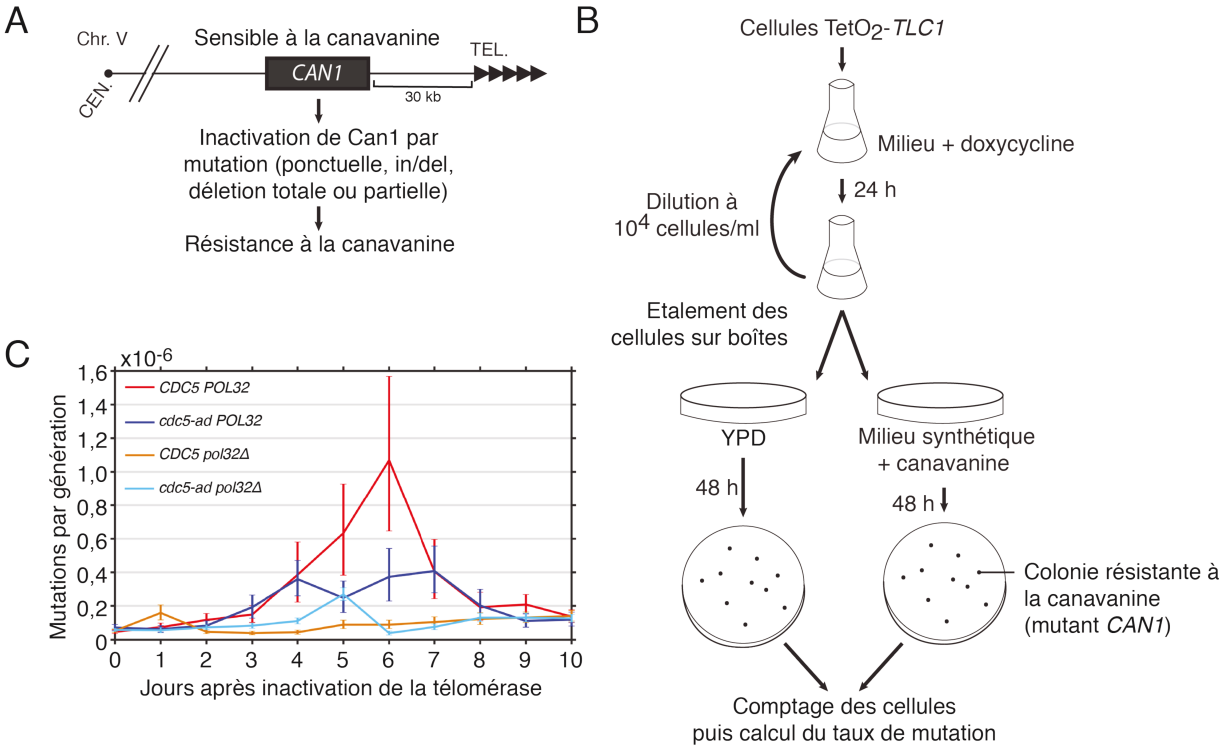


Figure 16 : La délétion de *POL32* diminue significativement le taux de mutation en sénescence réplicative. A. Schéma du gène rapporteur *CAN1*. **B.** Description des étapes expérimentales du test de fluctuation du taux de mutation du gène rapporteur *CAN1*. Les cellules sont placées en cultures liquides pendant 24 heures puis elles sont étalées sur des boîtes de milieu solide contenant de la canavanine afin de sélectionner les cellules mutantes devenues resistantes et des boîtes milieu YPD qui permettent de normaliser et d'appliquer une correction dans le calcul du taux de mutation. Après 48 heures, les colonies sont comptées. Ces données et celles de la concentration cellulaire de la culture servent à obtenir le taux de mutation. **C.** Représentation graphique du taux de mutation à partir de l'inactivation de la télomérase au cours de la sénescence chez des cellules *CDC5 POL32*, *CDC5 pol32Δ*, *cdc5-ad POL32* et *cdc5-ad pol32Δ*. Les barres d'erreur représentent un intervalle de confiance à 95%.

b) Cdc5 joue-t-elle un rôle dans les voies de recombinaison ?

L'un des résultats que nous ne parvenons pas à expliquer est que les cellules *cdc5-ad* tetO$_2$-*TLC1* dans les expériences de microfluidique ont une moyenne du nombre générations de survie similaire aux cellules de référence *CDC5* TetO$_2$-*TLC1* (30 contre 31 générations) en présence de doxycycline, résultat que l'on observe aussi en cultures liquides (Figure 6B et S6A-C). Par ailleurs, en utilisant des souches similaires, utilisées pour les tests de fluctuations, j'ai remarqué que les souches exprimant *cdc5-ad*, en présence de doxycycline, semblent former des survivants plus tôt (Figure 6B). C'est pourquoi nous nous sommes interrogés sur un potentiel rôle de Cdc5 dans la recombinaison qui confèrerait cet avantage prolifératif observé uniquement en absence de télomérase.

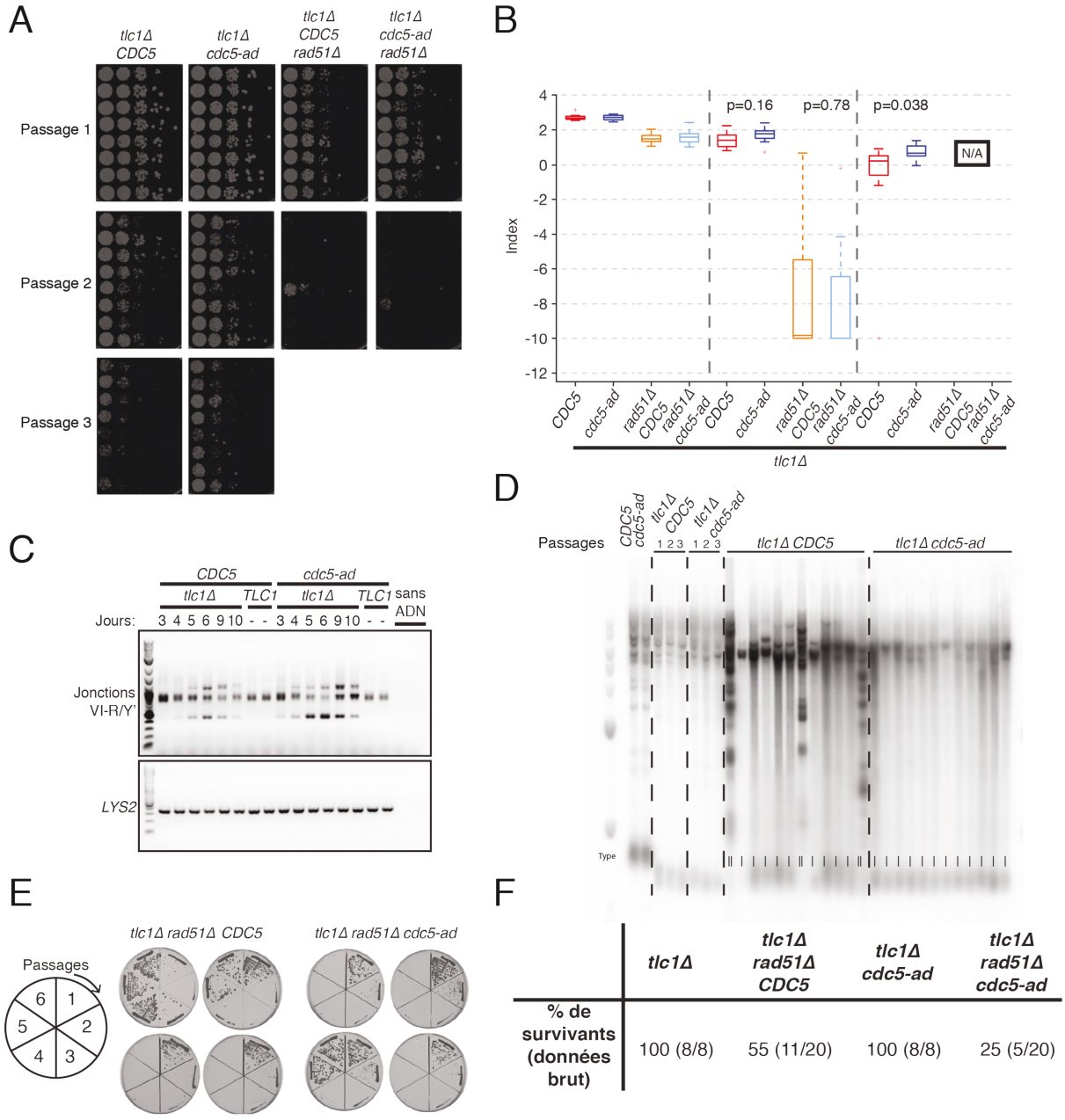
Des mécanismes de recombinaison homologue peuvent mener à la maintenance des télomères de manière indépendante à la télomérase en formant des survivants post-

sénescence. Bien que les cinétiques des évènements de réparation (inférieur à 4 heures) et d'adaptation (après environ 6 heures d'arrêt) soient différentes, il se peut que les deux mécanismes se chevauchent et interfèrent l'un avec l'autre. Une étude de biochimie couplée à de la bioinformatique suggère que Rad51, qui est impliquée dans les évènements de recombinaison, est une cible potentielle de Cdc5 (Snead et al. 2007). De plus, Plk1 peut phosphoryler Rad51 et cette phosphorylation joue un rôle dans la RH et à l'acquisition de résistance aux RI (Yata et al. 2012). C'est pourquoi j'ai étudié si la recombinaison, en particulier au niveau des régions télomériques peut être affectée par la mutation *cdc5-ad*. J'ai construit une souche diploïde hétérozygote *TLC1/tlc1*Δ *CDC5/cdc5-ad RAD51/rad51*Δ pour réaliser un test de croissance en gouttes (Figure 17A et B). 8 spores indépendantes de chaque génotype sont sélectionnées, poussent pendant 48 heures puis les cellules sont déposées en une série de gouttes 10 fois diluées à chaque goutte. Nous avons observé que les cellules *tlc1*Δ *cdc5-ad* poussent mieux que les cellules *tlc1*Δ *CDC5* dans les passages 2 et 3 (Figure 17A et B) comme en microfluidique et en culture liquide (Figures 2A et 6A). Cette différence est supprimée en absence de *RAD51* suggérant que l'augmentation de l'activité de recombinaison homologue peut contribuer à l'avantage proliferatif des cellules *cdc5-ad* en absence de télomérase. Cependant bien que la différence soit significative, la croissance des cellules *rad51*Δ est altérée et nous nous sommes alors demandés si la perte de différence apparente de croissance entre *CDC5* et *cdc5-ad* n'est pas due à cette baisse de croissance. De plus, les résultats obtenus par l'équipe de Karine Dubrana lors d'un test d'efficacité de recombinaison (Figure S3E), ne montraient pas de différence significative. C'est pourquoi nous avons préféré retirer ces résultats pour lesquels la conclusion était plus difficilement interprétable.

Afin de tester si des évènements de réparation au niveau des télomères ont eu lieu, j'ai essayé de détecter des évènements de translocation d'éléments Y′ aux télomères courts par la voie BIR ce qui permet de maintenir les télomères (Churikov et al. 2014). Les jonctions entre le télomère VI-R et les éléments Y′ qui peuvent survenir lors d'une de ces translocations peuvent être amplifiées par PCR. Après sporulation d'un diploïde *TLC1/tlc1*Δ *CDC5/cdc5-ad*, les spores *tlc1*Δ ont été sélectionnés puis étudiés. En absence de télomérase, on observe que ces jonctions augmentent avec le temps à partir du jour 4-5. Dans 2 expériences indépendantes sur 3, ces jonctions apparaissent un jour avant dans les cellules *cdc5-ad* en comparaison avec les cellules *CDC5*. Cdc5-ad semble donc dans certains cas légèrement favoriser les processus de recombinaison en sénescence. Cependant, la différence entre cellules *cdc5-ad* et cellules *CDC5* étant faible et fluctuante, nous préférons ne pas en tirer de conclusion définitive.

Nous souhaitions ensuite savoir si la mutation *cdc5-ad* interfère avec l'incidence du type de survivant en absence de télomérase. Il existe deux types de survivants (I et II) chez *S. cerevisiae* qui semblent recourir à des voies de recombinaison différentes.

À partir d'une souche diploïde *TLC1/tlc1*Δ *CDC5/cdc5-ad RAD51/rad51*Δ, j'ai sélectionné 4 spores indépendantes pour chacun des 4 génotypes différents *tlc1*Δ et testé leur capacité à former des survivants par stries successives toutes les 48 heures jusqu'à



	tlc1Δ	tlc1Δ rad51Δ CDC5	tlc1Δ cdc5-ad	tlc1Δ rad51Δ cdc5-ad
% de survivants (données brut)	100 (8/8)	55 (11/20)	100 (8/8)	25 (5/20)

Figure 17 : Cdc5-ad favorise légèrement la recombinaison homologue aux extrémités en absence de télomérase. **A.** Test de croissance cellulaire par gouttes sur des spores indépendantes pour chaque génotype : *tlc1*Δ, *cdc5-ad tlc1*Δ, *rad51*Δ *tlc1*Δ *et cdc5-ad rad51*Δ *tlc1*Δ. **B.** Analyse quantitative du test de croissance en gouttes de A. Les p-values ont été obternues par test de Wilcoxon **C.** PCR semi quantitative d'amplification des jonctions VI-R/Y'. Une PCR amplifiant le gène *LYS2* est utilisée comme contrôle de charge. **D.** Analyse par Southern blot en utilisant une sonde radioactive télomérique du type de survivants de colonies obtenues lors du test en **E.** Un échantillon de 12 survivants par génotype est montré sur les 36 sélectionnés. Le type de survivant est déterminé par le profil du signal télomérique et est indiqué par I ou II. **E.** Test de formation de survivant dans les souches *tlc1*Δ, *cdc5-ad tlc1*Δ, *rad51*Δ *tlc1*Δ *et cdc5-ad rad51*Δ *tlc1*Δ. 4 spores indépendantes pour chaque génotype ont été sélectionnées puis striées tous les deux jours sur 6 passages, seules les boîtes pour les souches *rad51*Δ sont montrées. **F.** Tableau contenant la quantification de l'expérience en E.

observation de la baisse de croissance associée à la sénescence réplicative suivie de l'apparition de survivants si elle a lieu (Figure 17E et F). J'ai ensuite sélectionné des colonies isolées (36 pour chaque génotype) des survivants *CDC5* et *cdc5-ad* et les ai analysés par Southern blot afin d'identifier le type de survivants qui sont formés. Pour étudier les télomères par Southern blot, nous digérons de l'ADN génomique qui permet de n'obtenir que les fragments terminaux des chromosomes qui sont séparés sur gel d'agarose puis transférés sur une membrane en nylon. Les télomères et éléments télomériques sont ensuite visualisés grâce à une sonde radiactive riche en TG (pour une description plus détaillée de la méthode, voir *Terminal restriction Southern blot analysis*). J'ai observé que les cellules *CDC5* et *cdc5-ad* sont capables de former les deux types de survivants. En revanche, la fréquence du nombre de survivant de type II semble légèrement diminué chez les cellules exprimant *cdc5-ad* (1/36 pour *cdc5-ad* contre 4/36 chez *CDC5*). Cependant, le nombre de survivants de type II dans les deux génotypes était faible. J'ai ensuite comparé la fréquence d'apparition de survivants dans des cellules *tlc1*Δ *rad51*Δ où les survivants de type I ne peuvent apparaître. La tendance précédente a été confirmée puisque les survivants, nécessairement de type II, apparaissent moins fréquemment dans les cellules *tlc1*Δ *rad51*Δ *cdc5-ad* que les cellules *tlc1*Δ *rad51*Δ *CDC5* (5/20 contre 11/20 respectivement) (Figure 179E et F). Ces expériences suggèrent une légère altération des voies de recombinaison qui permettent d'obtenir des survivants post-sénescents dans les cellules *cdc5-ad*.

Dans l'ensemble ces expériences suggèrent que le mutant *cdc5-ad* altère légèrement les mécanismes de recombinaison permettant l'émergence des survivants. Les effets observés dans ces résultats sont souvent faibles. Transposé à la phase de présénescence, ces résultats sont cohérents avec la meilleure capacité proliférative des cellules *cdc5-ad* en absence de télomérase mais n'excluent pas une autre explication.

D. Conclusion

Les différents processus mis en jeu en absence de télomérase sont complexes et difficiles à caractériser en population de cellules. C'est pourquoi, l'utilisation de méthodes en cellules uniques est pertinente et permet d'observer des évènements moléculaires particuliers, comme ici les évènements d'adaptation. En effet, ces évènements semblent plutôt rares mais ont des conséquences majeures sur l'ensemble de la population. L'instabilité génomique qui résulte des télomères courts (Hackett, Feldser, et Greider 2001; Hackett et Greider 2003), produite par exemple par des évènements de réparation de BIR, pourrait être transmise à la cellule fille par adaptation et ainsi contribuer à l'augmentation de l'instabilité génomique dans

la population. C'est pourquoi, nous suggérons que l'adaptation peut participer aux premières étapes de tumorigenèse. En effet, la Plk1 a été associée à des évènements d'adaptation et Plk1 est surexprimée dans de nombreuses tumeurs. En extrapolant nos résultats montrant que l'adaptation est possible en sénescence et sachant que le vieillissement est associé à l'augmentation du risque du cancer, nous pouvons imaginer un scénario où l'adaptation, dans des cellules humaines sénescentes, contribue à la transformation cancéreuse (Syljuåsen et al. 2006; Yamamoto et al. 2006).

Article n°2

Adaptation in replicative senescence: a risky business.

Héloïse Coutelier and Zhou Xu.

Current Genetics, 2019. 65 : 711-716

Current Genetics
https://doi.org/10.1007/s00294-019-00933-7

MINI-REVIEW

Adaptation in replicative senescence: a risky business

Héloïse Coutelier[1] · Zhou Xu[1,2]

Received: 31 December 2018 / Revised: 4 January 2019 / Accepted: 5 January 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract
Cell proliferation is tightly regulated to avoid propagating DNA damage and mutations, which can lead to pathologies such as cancer. To ensure genome integrity, cells activate the DNA damage checkpoint in response to genotoxic lesions to block cell cycle progression. This surveillance mechanism provides time to repair the damage before resuming cell cycle with an intact genome. When the damage is not repaired, cells can, in some conditions, override the cell cycle arrest and proceed with proliferation, a phenomenon known as adaptation to DNA damage. A subpopulation of adapted cells might eventually survive, but only at the cost of extensive genome instability. How and in which context adaptation operates the trade-off between survival and genome stability is a fascinating question. After a brief review of the current knowledge on adaptation to DNA damage in budding yeast, we will discuss a new role of adaptation in the context of telomerase-negative cells and replicative senescence. We highlight the idea that, in all settings studied so far, survival through adaptation is a double-edged sword as it comes with increased genomic instability.

Keywords Adaptation to DNA damage · Telomere · Repair · Genome instability · Polo kinase

DNA damage checkpoint and adaptation

DNA damage is a major challenge for eukaryotic cells, which must ensure genome integrity while proliferating. The assessment of the damage and the subsequent response are critical for survival and genome stability. Cells have developed a sophisticated safeguard mechanism, called the DNA damage checkpoint, which blocks cell cycle progression to provide time for repair (Weinert and Hartwell 1988; Hartwell and Weinert 1989). Among the variety of DNA lesions, double-strand breaks (DSBs) are particularly cytotoxic if left unrepaired and have served as a model to establish, in budding yeast, the general framework of the DNA damage response, which is conserved throughout eukaryotes. The first step of the DNA damage response is the detection of the break by the independent recruitment of the Ku complex (Yku70/Yu80) and the MRX complex (Mre11/Rad50/Xrs2). They in turn recruit protein kinases of the phosphoinositide 3-kinase-related kinase (PIKK) family, Tel1 and Mec1, which trigger the DNA damage checkpoint through a cascade of phosphorylation. The culminating step of the cascade is the activation of effector kinases, Rad53 and Chk1, which target multiple cellular processes to ultimately arrest the cell cycle (reviewed in Finn et al. 2012).

Two main pathways can repair the damage: non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). The decision between these two mechanisms depends on the phase of the cell cycle, through Cdk1 cyclin-dependent kinase activity. NHEJ is favored in G1 phase and ligates the two broken ends, while HR, which reseals the break using a homologous sequence, is initiated by 5′–3′ resection and exposure of single-stranded DNA (ssDNA), promoted in S/G2 phases.

When repair is successful, the entire DNA damage checkpoint signaling pathway is shut down since the lesion is no longer detected, allowing the cell cycle to resume in a process called recovery. In contrast, when the damage is unrepairable, yeast cells experience a much longer checkpoint

Communicated by M. Kupiec.

✉ Zhou Xu
zhou.xu@sorbonne-universite.fr

[1] Sorbonne Université, PSL Research University, CNRS, UMR8226, Institut de Biologie Physico-Chimique, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, 75005 Paris, France

[2] Present Address: Sorbonne Université, CNRS, UMR7238, Institut de Biologie Paris-Seine, Laboratory of Computational and Quantitative Biology, 75005 Paris, France

Published online: 12 January 2019

arrest (~5–15 h) but can eventually reenter the cell cycle despite the detectable presence of damage (Sandell and Zakian 1993; Toczyski et al. 1997; Lee et al. 1998). This process is known as adaptation to DNA damage. During adaptation, the checkpoint is partially relieved, thus allowing the cell cycle progression. More precisely, Rad53 is inactivated, which alleviates the downstream inhibition of the cell cycle progression (Pellicioli et al. 2001). The upstream part of the checkpoint remains largely unaffected, including the sensors Ddc1 (subunit of the 9-1-1 clamp complex) and Ddc2 (in complex with Mec1), and the adaptor Rad9, although a very slight drop in Ddc2 foci intensity in a subset of cells and in Rad9 hyperphosphorylation has been reported (Melo et al. 2001; Donnianni et al. 2010; Vidanes et al. 2010).

While many mutants defective for adaptation have been described and have contributed to its characterization, the molecular mechanisms underlying the process are not yet completely elucidated (Harrison and Haber 2006). The conserved family of Polo-like kinases has been implicated in adaptation and recovery to DNA damage checkpoint (Serrano and D'Amours 2014). In budding yeast, Cdc5 is the only Polo kinase and is essential for several cell cycle-related processes (Botchkarev and Haber 2018). The involvement of Cdc5 in adaptation was first demonstrated with the isolation of the L251W point mutant allele, called *cdc5-ad*, which is defective for adaptation (Toczyski et al. 1997). Cells carrying the *cdc5-ad* allele and challenged by an unrepairable DNA damage stay arrested in G2/M and maintain Rad53 in an activated state (Pellicioli et al. 2001). Other recently identified adaptation mutants of *CDC5* (*cdc5-16* and *cdc5*-T238A) have also contributed to the dissection of Cdc5's role in adaptation (Ratsima et al. 2011, 2016; Rawal et al. 2016). However, despite its central role in adaptation, the exact mechanisms by which Cdc5 exerts its function and which Cdc5 targets are affected in response to DNA damage are still unclear (Hu et al. 2001; Zhang et al. 2009; Donnianni et al. 2010; Dotiwala et al. 2010; Schleker et al. 2010; Vidanes et al. 2010; Valerio-Santiago et al. 2013; Ratsima et al. 2016; Rawal et al. 2016; Botchkarev et al. 2017).

Not all unrepairable DNA damages seem to be amenable to adaptation. For instance, while a single unrepaired DSB allows adaptation, two simultaneously induced DSBs do not (Lee et al. 1998). One important factor appears to be the amount of ssDNA that accumulates during the arrest, as supported by the fact that the adaptation defect of *yku70*Δ mutant, which exhibits increased resection, is suppressed by limiting resection through the deletion of *MRE11* (Lee et al. 1998). Consistently, *cdc13-1* mutant cells placed at restrictive temperature, in which telomeres are uncapped, resected and thus detected as DNA damage, is a widely used setting to study adaptation but the fraction of cells that are able to eventually adapt decreases with increasing temperatures (Toczyski 2006). However, the global amount of ssDNA induced at restrictive temperature in *cdc13-1* cells might exceed the amount found in cells with two DSBs (Garvik et al. 1995; Westmoreland et al. 2018), suggesting that the nature of the damage, and not only the amount of exposed ssDNA, might be important for adaptation. Besides, the *cdc13-1*-induced telomere dysfunction at higher temperature also involves more complex molecular mechanisms, such as defective nuclear homeostasis of Cdc13-1 proteins and confounding temperature-dependent defect of the telomeres themselves (Paschini et al. 2012; Mersaoui and Wellinger 2018), reinforcing the idea that the molecular nature of the damage might impact on adaptation efficiency. Other types of damage, induced by specific treatments, have also been used in vertebrate systems and suggest that adaptation operates only within a range of DNA damage load (Yoo et al. 2004; Syljuasen et al. 2006; Rezacova et al. 2011; Kubara et al. 2012).

We recently investigated whether telomerase-negative cells might also undergo adaptation when they activate the DNA damage checkpoint in response to critically short telomeres in a process known as replicative senescence. This new experimental setting we tested is physiologically relevant for human somatic tissues where telomerase is repressed and where cells eventually enter senescence due to telomere exhaustion.

Adaptation in telomere-induced replicative senescence

Telomeres are repeated sequences found at chromosome extremities. By nature, they resemble one side of a DSB but specific proteins are bound to telomeres and collectively form a capping structure that prevents DNA damage checkpoint activation, and unwanted repair by NHEJ or HR (Jain and Cooper 2010; Wellinger and Zakian 2012). The length of a telomere is dynamic and varies with each cell cycle. On the one hand, telomeres shorten due to the DNA-end-replication problem. Conversely, as they become shorter, telomeres can be extended by telomerase, a dedicated reverse transcriptase able to add de novo telomeric repeats. Telomeres are thus kept at a steady-state length distribution, the homeostasis of which is regulated by hundreds of genes (Kupiec 2014; Harari and Kupiec 2018). In the absence of telomerase, telomeres get continuously shorter as cells divide until the shortest one reaches a critical threshold, activating the DNA damage checkpoint and arresting the cells in replicative senescence (Teixeira 2013).

Replicative senescence is a heterogeneous process at several scales. Independent telomerase-negative cultures display variable senescence onset timings. Even within a telomerase-negative cell culture, subcloned single

cells give rise to colonies of heterogeneous sizes, reflecting complex cell proliferation dynamics (Lundblad and Szostak 1989; Enomoto et al. 2002). Thus, a telomerase-negative culture is always a mixture of cells at different stages of senescence. The lack of synchrony in reaching senescence precludes the use of standard assays to study the role of adaptation (Toczyski 2006).

To circumvent this issue, we took advantage of a single-cell microfluidics-based method coupled to live microscopy, which previously allowed us to characterize the dynamics of cell divisions in individual cell lineages in which telomerase activity was experimentally repressed (Xu et al. 2015). In particular, we evidenced in individual lineages the presence of frequent cell cycle arrests that were followed by more cell divisions and were consequently not terminal senescence arrests. We termed them non-terminal arrests and showed that they were, at least partially, Mec1- and Pol32-dependent. Combined with evidence that recombination factors such as Rad51 and Rad52 are important for cell growth not only as an alternative telomere maintenance mechanism but also early after telomerase inactivation (Lundblad and Blackburn 1993; Le et al. 1999; Khadaroo et al. 2009; Churikov et al. 2014; Fallet et al. 2014; Xu et al. 2015; Claussin and Chang 2016; Lue and Yu 2017), this result suggests that telomerase-negative cells frequently experience telomere-related damage, activate the DNA damage checkpoint and undergo repair events such as break-induced replication (BIR).

In a recent report, we demonstrated that, in addition to repair, adaptation is also a relatively frequent response to checkpoint arrests in telomerase-negative cells, occurring in 2–7% of all cell cycles (Coutelier et al. 2018). Two independent approaches were used: a genetic approach using the adaptation-deficient mutants *cdc5-ad* and *tid1*Δ, and a functional approach using a fluorescent reporter to assess cell division with maintenance of the upstream part of the checkpoint pathway, typical of adaptation. Importantly, we did not use strains impaired for repair pathways, as in some adaptation assays (Toczyski 2006). That telomerase-negative cells undergo adaptation even in the presence of functional repair mechanisms begs the question of the cell fate decision between the two pathways. It is possible that the choice simply depends on the type of detected telomeric damage and on how repairable it is. Regarding the nature of the damage, while we do not exclude progressively shortening telomeres reaching a critical threshold as a potential signal, the early timing of the non-terminal compared to terminal arrests makes them hard to reconcile with a model of progressive telomere shortening. We rather speculate that telomere breaks due to replication fork stalling and collapse might trigger these arrests. Whether the molecular nature of the telomere breaks somehow inhibits repair factors and thus channels the cell toward adaptation remains to be investigated further.

Cell survival and genome instability: adaptation as a double-edged sword

The body of evidence supporting a functional role of adaptation in yeast has grown over the past years. It was initially shown that adaptation is important for survival of irradiated diploid cells when HR is compromised, while at the same time promoting genomic instability in the surviving progeny (Galgoczy and Toczyski 2001). This is supported by a recent study showing that adaptation to genotoxic challenge of HR-deficient diploid cells leads to aneuploid progeny that develops some form of resistance to a second genotoxic challenge (Bender et al. 2018). To follow on a similar idea, in another setting, adaptation is required to survive telomere uncapping by the loss of Cdc13 in established telomerase-independent survivors (Mersaoui et al. 2015). The Cdc13-independent cells grow in the presence of permanent damage that is tolerated because of mutations in checkpoint genes. In contrast to surviving telomere uncapping, adaptation is dispensable for the emergence of post-senescence telomerase-independent survivors (Coutelier et al. 2018).

While adaptation can be thought of as a last-ditch effort to survive, it is also a strong commitment as the cost of bearing extensive genome instability is great. For instance, the longer the cells stay with uncapped telomeres (*cdc13-1* at restrictive temperature), the less viable they are once they return to permissive temperature with functional telomeres, and this loss of viability is partially rescued in an adaptation mutant (Toczyski et al. 1997; Klermund et al. 2014). Maintenance of the checkpoint arrest is thus beneficial for cell survival only if the initial damage is eventually removed or repaired. It is interesting to suggest that adaptation, with its typically long timescale, may be part of a bet-hedging mechanism to maximize survival in the face of DNA damage with unpredictable persistence. This possibility may be tested experimentally and mathematically.

Our recent study extends the functional role of adaptation to telomerase-negative cells and replicative senescence (Coutelier et al. 2018). After adapting to a prolonged cell cycle arrest, telomerase-negative cells still had a substantial proliferation potential, which added to the relatively high frequency of adaptation events makes post-adapted cells a non-negligible fraction of a heterogeneous population of senescing cells. Adaptation is thus a true survival mechanism for telomerase-negative cells experiencing telomere damage. Consistent with the notion that cell proliferation with unrepaired DNA damage is detrimental for genome stability, adaptation contributes to roughly half of the mutation rate observed in senescent cells (Coutelier et al. 2018).

Cells undergoing non-terminal arrests followed by adaptation, which occur with increasing frequency as cells divide, would mutate and progressively accumulate in the senescing population. This model partially explains the finding that the mutation rate of telomerase-negative cells increases over time as they lose proliferation potential (Hackett et al. 2001; Hackett and Greider 2003; Coutelier et al. 2018). Because precancerous cells can likewise accumulate high level of genome instability due to dysfunctional telomeres (Maciejowski and de Lange 2017), we suggest that similar adaptation events could occur in aging human cells, contributing to the early stages of tumorigenesis when checkpoints are still functional and leading to genome instability. Consistent with this idea, Plk1 overexpression has been found in numerous human tumors and seems to be involved in neoplastic transformation as well as in resistance to several chemotherapy drugs (Strebhardt and Ullrich 2006; Gutteridge et al. 2016). Plk1-induced genome instability might also be detrimental though if too important, even to cancer cells, as recently reported (de Carcer et al. 2018).

As for other types of damage, adaptation in telomerase-negative cells leads to a wide range of mutations and genome rearrangements (Coutelier et al. 2018). By promoting cell division, adaptation might cause global genome rearrangement starting at the telomeres and initiating a cascade of instabilities through a myriad of possible mechanisms (Galgoczy and Toczyski 2001; Hackett and Greider 2003; Kaye et al. 2004; Vasan et al. 2014; Lopez et al. 2015; Beyer and Weinert 2016; Millet and Makovets 2016). Adapted cells could also explore repair pathways that were not available or utilized during the initial G2/M arrest, such as NHEJ in G1 and BIR or microhomology-mediated end joining (MMEJ) in S/G2 (Galgoczy and Toczyski 2001; Wang et al. 2018). A direct link between the adaptation mechanism and repair pathway choice could be Cdc5/Plk1, since many repair factors are possible substrates for Cdc5 kinase activity, including Sae2 and Mms4 (Donnianni et al. 2010; Matos et al. 2011; Gallo-Fernandez et al. 2012; Schwartz et al. 2012; Szakal and Branzei 2013). Similarly, in human cells, CtIP (ortholog of Sae2), Mre11, Rad51 and BRCA1 are Plk1 targets (Yata et al. 2012; Chabalier-Taste et al. 2016; Li et al. 2017; Wang et al. 2018). Cdc5/Plk1 might, therefore, preferentially activate some repair pathways while concurrently enabling adaptation.

Overall, adaptation is a double-edged sword for cells experiencing unrepairable DNA damage. The trade-off is that adapted cells may eventually generate a viable progeny but only at the cost of widespread genome instability. The balance between survival and genome instability might depend on the type of damage. Notably, telomere damage in telomerase-negative cells seems amenable to adaptation with substantial survival rate in the progeny, despite extensive genome instability. For unicellular organisms, increased genomic and phenotypic diversity can drive evolution and "adaptation" in a broader sense. However, adapting to DNA damage that could potentially be repaired can be detrimental. In multicellular organisms and in particular mammals, the benefits of cell survival through adaptation appear to be largely outweighed by the potential for cancer development, although a positive role of adaptation in the elimination of damaged cells through defective cell cycle progression might also be plausible. The cell fate decision between repair and adaptation is thus critical and although it is achieved, as a first approximation, through timescale separation, more investigation is needed to understand the intricate relationship between adaptation, repair and genome instability.

Acknowledgements We thank Maria Teresa Teixeira and Karine Dubrana for their critical reading of the manuscript. This work was supported by "Fondation pour la Recherche Médicale" ("équipe labellisée") and the French National Research Agency (ANR) grant ANR-16-CE12-0026 to Maria Teresa Teixeira in whose lab the work was done, and ANR grant ANR-17-CE20-0002-01 to ZX. HC has been supported by a doctoral grant from the Paris Sciences et Lettres (PSL) Idex program implemented by the ANR (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Bender K, Vydzhak O, Klermund J, Busch A, Grimm S, Luke B (2018) Checkpoint adaptation in repair-deficient cells drives aneuploidy and resistance to genotoxic agents. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/464685

Beyer T, Weinert T (2016) Ontogeny of unstable chromosomes generated by telomere error in budding yeast. PLoS Genet 12:e1006345. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006345

Botchkarev VV, Garabedian MV, Lemos B, Paulissen E, Haber JE (2017) The budding yeast Polo-like kinase localizes to distinct populations at centrosomes during mitosis. Mol Biol Cell 28:1011–1020. https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0324

Botchkarev VV, Haber JE (2018) Functions and regulation of the Polo-like kinase Cdc5 in the absence and presence of DNA damage. Curr Genet 64:87–96. https://doi.org/10.1007/s00294-017-0727-2

Chabalier-Taste C, Brichese L, Racca C, Canitrot Y, Calsou P, Larminat F (2016) Polo-like kinase 1 mediates BRCA1 phosphorylation and recruitment at DNA double-strand breaks. Oncotarget 7:2269–2283. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6825

Churikov D, Charifi F, Simon MN, Geli V (2014) Rad59-facilitated acquisition of Y' elements by short telomeres delays the onset of senescence. PLoS Genet 10:e1004736. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004736

Claussin C, Chang M (2016) Multiple Rad52-mediated homology-directed repair mechanisms are required to prevent telomere attrition-induced senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet 12:e1006176. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006176

Coutelier H et al (2018) Adaptation to DNA damage checkpoint in senescent telomerase-negative cells promotes genome instability.

Genes Dev 32:1499–1513. https://doi.org/10.1101/gad.318485.118
de Carcer G et al (2018) Plk1 overexpression induces chromosomal instability and suppresses tumor development. Nat Commun 9:3012. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05429-5
Donnianni RA et al (2010) Elevated levels of the polo kinase Cdc5 override the Mec1/ATR checkpoint in budding yeast by acting at different steps of the signaling pathway. PLoS Genet 6:e1000763. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000763
Dotiwala F, Harrison JC, Jain S, Sugawara N, Haber JE (2010) Mad2 prolongs DNA damage checkpoint arrest caused by a double-strand break via a centromere-dependent mechanism. Curr Biol CB 20:328–332. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.033
Enomoto S, Glowczewski L, Berman J (2002) MEC3, MEC1, and DDC2 are essential components of a telomere checkpoint pathway required for cell cycle arrest during senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 13:2626–2638
Fallet E, Jolivet P, Soudet J, Lisby M, Gilson E, Teixeira MT (2014) Length-dependent processing of telomeres in the absence of telomerase. Nucleic Acids Res 42:3648–3665. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1328
Finn K, Lowndes NF, Grenon M (2012) Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. Cell Mol Life Sci 69:1447–1473. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0875-3
Galgoczy DJ, Toczyski DP (2001) Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. Mol Cell Biol 21:1710–1718
Gallo-Fernandez M, Saugar I, Ortiz-Bazan MA, Vazquez MV, Tercero JA (2012) Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. Nucleic Acids Res 40:8325–8335. https://doi.org/10.1093/nar/gks599
Garvik B, Carson M, Hartwell L (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. Mol Cell Biol 15:6128–6138
Gutteridge RE, Ndiaye MA, Liu X, Ahmad N (2016) Plk1 inhibitors in cancer therapy: from laboratory to clinics. Mol Cancer Ther 15:1427–1435. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0897
Hackett JA, Feldser DM, Greider CW (2001) Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. Cell 106:275–286
Hackett JA, Greider CW (2003) End resection initiates genomic instability in the absence of telomerase. Mol Cell Biol 23:8450–8461
Harari Y, Kupiec M (2018) Do long telomeres affect cellular fitness? Curr Genet 64:173–176. https://doi.org/10.1007/s00294-017-0746-z
Harrison JC, Haber JE (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. Annu Rev Genet 40:209–235
Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246:629–634
Hu F, Wang Y, Liu D, Li Y, Qin J, Elledge SJ (2001) Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. Cell 107:655–665
Jain D, Cooper JP (2010) Telomeric strategies: means to an end. Annu Rev Genet 44:243–269. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134841
Kaye JA, Melo JA, Cheung SK, Vaze MB, Haber JE, Toczyski DP (2004) DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. Curr Biol 14:2096–2106
Khadaroo B et al (2009) The DNA damage response at eroded telomeres and tethering to the nuclear pore complex. Nat Cell Biol 11:980–987. https://doi.org/10.1038/ncb1910
Klermund J, Bender K, Luke B (2014) High nutrient levels and TORC1 activity reduce cell viability following prolonged telomere dysfunction and cell cycle arrest. Cell Rep 9:324–335. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.053
Kubara PM, Kerneis-Golsteyn S, Studeny A, Lanser BB, Meijer L, Golsteyn RM (2012) Human cells enter mitosis with damaged DNA after treatment with pharmacological concentrations of genotoxic agents. Biochem J 446:373–381. https://doi.org/10.1042/BJ20120385
Kupiec M (2014) Biology of telomeres: lessons from budding yeast. FEMS Microbiol Rev 38:144–171. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12054
Le S, Moore JK, Haber JE, Greider CW (1999) RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. Genetics 152:143–152
Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umezu K, Kolodner RD, Haber JE (1998) Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. Cell 94:399–409
Li Z, Li J, Kong Y, Yan S, Ahmad N, Liu X (2017) Plk1 phosphorylation of Mre11 antagonizes the DNA damage response. Cancer Res 77:3169–3180. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2787
Lopez V, Barinova N, Onishi M, Pobiega S, Pringle JR, Dubrana K, Marcand S (2015) Cytokinesis breaks dicentric chromosomes preferentially at pericentromeric regions and telomere fusions. Genes Dev 29:322–336. https://doi.org/10.1101/gad.254664.114
Lue NF, Yu EY (2017) Telomere recombination pathways: tales of several unhappy marriages. Curr Genet 63:401–409. https://doi.org/10.1007/s00294-016-0653-8
Lundblad V, Szostak JW (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. Cell 57:633–643. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90132-3
Lundblad V, Blackburn EH (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1-senescence. Cell 73:347–360
Maciejowski J, de Lange T (2017) Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. Nat Rev Mol Cell Biol 18:175–186. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.171
Matos J, Blanco MG, Maslen S, Skehel JM, West SC (2011) Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis. Cell 147:158–172. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.032
Melo JA, Cohen J, Toczyski DP (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. Genes Dev 15:2809–2821
Mersaoui SY, Wellinger RJ (2018) Fine tuning the level of the Cdc13 telomere-capping protein for maximal chromosome stability performance. Curr Genet. https://doi.org/10.1007/s00294-018-0871-3
Mersaoui SY, Gravel S, Karpov V, Wellinger RJ (2015) DNA damage checkpoint adaptation genes are required for division of cells harbouring eroded telomeres. Microbial cell 2:394–405. https://doi.org/10.15698/mic2015.10.229
Millet C, Makovets S (2016) Aneuploidy as a mechanism of adaptation to telomerase insufficiency. Curr Genet 62:557–564. https://doi.org/10.1007/s00294-015-0559-x
Paschini M, Toro TB, Lubin JW, Braunstein-Ballew B, Morris DK, Lundblad V (2012) A naturally thermolabile activity compromises genetic analysis of telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 191:79–93. https://doi.org/10.1534/genetics.111.137869
Pellicioli A, Lee SE, Lucca C, Foiani M, Haber JE (2001) Regulation of Saccharomyces Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. Mol Cell 7:293–300
Ratsima H, Ladouceur AM, Pascariu M, Sauve V, Salloum Z, Maddox PS, D'Amours D (2011) Independent modulation of the kinase and polo-box activities of Cdc5 protein unravels unique roles in the maintenance of genome stability. Proc Natl Acad Sci USA 108:E914–E923. https://doi.org/10.1073/pnas.1106448108
Ratsima H, Serrano D, Pascariu M, D'Amours D (2016) Centrosome-dependent bypass of the DNA damage checkpoint by the polo

kinase Cdc5. Cell Rep 14:1422–1434. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.014

Rawal CC, Riccardo S, Pesenti C, Ferrari M, Marini F, Pellicioli A (2016) Reduced kinase activity of polo kinase Cdc5 affects chromosome stability and DNA damage response in *S. cerevisiae*. Cell Cycle 15:2906–2919. https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1222338

Rezacova M et al (2011) Accumulation of DNA damage and cell death after fractionated irradiation. Radiat Res 175:708–718. https://doi.org/10.1667/RR2478.1

Sandell LL, Zakian VA (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. Cell 75:729–739

Schleker T, Shimada K, Sack R, Pike BL, Gasser SM (2010) Cell cycle-dependent phosphorylation of Rad53 kinase by Cdc5 and Cdc28 modulates checkpoint adaptation. Cell Cycle 9:350–363. https://doi.org/10.4161/cc.9.2.10448

Schwartz EK, Wright WD, Ehmsen KT, Evans JE, Stahlberg H, Heyer WD (2012) Mus81-Mms4 functions as a single heterodimer to cleave nicked intermediates in recombinational DNA repair. Mol Cell Biol 32:3065–3080. https://doi.org/10.1128/MCB.00547-12

Serrano D, D'Amours D (2014) When genome integrity and cell cycle decisions collide: roles of polo kinases in cellular adaptation to DNA damage. Syst Synth Biol 8:195–203. https://doi.org/10.1007/s11693-014-9151-9

Strebhardt K, Ullrich A (2006) Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer 6:321–330. https://doi.org/10.1038/nrc1841

Syljuasen RG, Jensen S, Bartek J, Lukas J (2006) Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. Cancer Res 66:10253–10257. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2144

Szakal B, Branzei D (2013) Premature Cdk1/Cdc5/Mus81 pathway activation induces aberrant replication and deleterious crossover. EMBO J 32:1155–1167. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.67

Teixeira MT (2013) *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study replicative senescence triggered by telomere shortening. Front Oncol 3:101. https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00101

Toczyski DP, Galgoczy DJ, Hartwell LH (1997) CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. Cell 90:1097–1106

Toczyski DP (2006) Methods for studying adaptation to the DNA damage checkpoint in yeast. Methods Enzymol 409:150–165. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)09009-9

Valerio-Santiago M, de Los Santos-Velazquez AI, Monje-Casas F (2013) Inhibition of the mitotic exit network in response to damaged telomeres. PLoS Genet 9:e1003859. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003859

Vasan S, Deem A, Ramakrishnan S, Argueso JL, Malkova A (2014) Cascades of genetic instability resulting from compromised break-induced replication. PLoS Genet 10:e1004119. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004119

Vidanes GM, Sweeney FD, Galicia S, Cheung S, Doyle JP, Durocher D, Toczyski DP (2010) CDC5 inhibits the hyperphosphorylation of the checkpoint kinase Rad53, leading to checkpoint adaptation. PLoS Biol 8:e1000286. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000286

Wang H et al (2018) PLK1 targets CtIP to promote microhomology-mediated end joining. Nucleic Acids Res 46:10724–10739. https://doi.org/10.1093/nar/gky810

Weinert TA, Hartwell LH (1988) The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. Science 241:317–322

Wellinger RJ, Zakian VA (2012) Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. Genetics 191:1073–1105. https://doi.org/10.1534/genetics.111.137851

Westmoreland JW, Mihalevic MJ, Bernstein KA, Resnick MA (2018) The global role for Cdc13 and Yku70 in preventing telomere resection across the genome. DNA Repair 62:8–17. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.11.010

Xu Z, Fallet E, Paoletti C, Fehrmann S, Charvin G, Teixeira MT (2015) Two routes to senescence revealed by real-time analysis of telomerase-negative single lineages. Nat Commun 6:7680. https://doi.org/10.1038/ncomms8680

Yata K, Lloyd J, Maslen S, Bleuyard JY, Skehel M, Smerdon SJ, Esashi F (2012) Plk1 and CK2 act in concert to regulate Rad51 during DNA double strand break repair. Mol Cell 45:371–383. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.028

Yoo HY, Kumagai A, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG (2004) Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. Cell 117:575–588

Zhang T, Nirantar S, Lim HH, Sinha I, Surana U (2009) DNA damage checkpoint maintains CDH1 in an active state to inhibit anaphase progression. Dev Cell 17:541–551. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.006

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

II. Etude de la fonction et régulation de Cdc5 en réponse à un dommage télomérique

Cdc5 a été identifié comme un acteur majeur de l'adaptation au checkpoint. Les fonctions et régulations de Cdc5 qui peuvent être impliquées en adaptation sont multiples. Différentes études ont montré que : (i) l'activité kinase de Cdc5 est nécessaire à l'adaptation, (ii) Cdc5 présente plusieurs localisations cellulaires au cours du cycle qui peuvent jouer un rôle en réponse à un dommage de l'ADN (iii) l'intégrité du PBD de Cdc5 est importante pour l'adaptation, et (iv) la surexpression de Cdc5 accélère et favorise l'adaptation. Cependant, l'élément déclencheur de l'adaptation n'est pas connu, et le ou les substrats de Cdc5 impliqués dans l'adaptation ne sont pas complètement décrits.

Notre hypothèse est que Cdc5 est régulée à différents niveaux afin de contourner l'activation de Rad53 et de permettre la reprise du cycle cellulaire.

L'adaptation est hétérogène, en particulier au niveau de la cinétique. Notre stratégie est d'étudier l'adaptation en cellules uniques afin d'identifier les différentes régulations de Cdc5 et les potentiels substrats. Afin d'essayer de comprendre le mécanisme moléculaire de Cdc5 en adaptation, j'ai donc développé, au sein du laboratoire, une méthode qui permet de suivre les évènements d'adaptation en cellules uniques grâce à un système de microfluidique commercial (CellASIC) couplé à l'analyse des images de microscopie. Ce système permet de déterminer la durée entre l'arrêt des cellules en phase G2/M et le premier événement d'adaptation et d'évaluer précisément la cinétique d'adaptation. J'ai tiré partie de l'allèle spécifique *cdc5-ad* déficient en adaptation couplé à l'allèle mutant *cdc13-1* pour induire un dommage à l'ADN télomérique persistant de façon conditionnelle et synchrone entre les cellules. La comparaison de la réponse des cellules exprimant soit *CDC5* sauvage soit *cdc5-ad* à ce dommage permanent nous permet d'explorer les fonctions de Cdc5 impliquées dans le mécanisme de l'adaptation.

A. Matériel et méthodes utilisées pour l'étude de Cdc5

1. Méthodes de microbiologie

Toutes les souches utilisées ont un fond génétique W303 corrigé pour *RAD5* et *ADE2*. (Tableau 3).

Nom de la souche	Figure	Génotype
yT851	23	*Matα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc13-1 cdc5::CDC5-3HA-TRP1*
yT855	23	yT851 *cdc5::cdc5-ad-3HA-TRP1*
yT1120	19	*Matα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 hta2::HTA2-ECFP-KANMX6 ura3::caURA3-pRPS20-FHAIdomain-mCherry cdc13-1*
yT1124	19	yT1120 *cdc5::cdc5-ad*
yT1036	20	*Matα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc13-1 cdc5::CDC5-eGFP-TRP1*
yT1203	20	*Matα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc13-1 cdc5::cdc5-ad-eGFP-TRP1*
yT1251	20	*Matα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc13-1 spc42::SPC42-mCherry-KanMX cdc5::cdc5-ad-eGFP-TRP1*
yT1252	20	*Matα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc13-1 spc42::SPC42-mCherry-KanMX cdc5::CDC5-eGFP-TRP1*
yT1254	22	*Matα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc13-1 spc42::SPC42-mCherry-KanMX cdc5::cdc5-ad-eGFP-TRP1 bfa1Δ*
yT1261	22	*Matα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ADE2 LYS2 RAD5 can1-100 tlc1::HIS3MX6-PrTetO2-TLC1 cdc13-1 spc42::SPC42-mCherry-KanMX cdc5::CDC5-eGFP-TRP1 bfa1Δ*
yT1320	24	*yT851 leu2::NDD1-3HA*
yT1322	23 et 24	*yT851 leu2::NDD1-10A-3HA*
yt1324	24	*yT855 leu2::NDD1-3HA*
yT1326	23 et 24	*yT855 leu2::NDD1-10A-3HA*
yT1370	21	*yT1120 cdc5::CDC5-bbp1[243-385]::HIS3MX*
yT1371	21	*yT1124 cdc5::cdc5-ad-bbp1[243-385]::HIS3MX*
yT1388	24	*yT851 leu2::NDD1-S85E*
yT1389	24	*yT851 leu2::NDD1-10A-S85E-3HA*
yT1390	24	*yT855 leu2::NDD1-S85E*
yT1391	24	*yT855 leu2::NDD1-10A-S85E-3HA*
sans nom	22	*yT851 bfa1Δ*
sans nom	22	*yT855 bfa1Δ*

Tableau 3 : Liste des souches utilisées pour l'étude de Cdc5 en réponse à un dommage télomérique.

2. *Test de formation de microcolonies*

Une des mesures de la capacité à s'adapter est d'observer la formation de microcolonies, constitué de plus de 3 corps cellulaires, en présence d'un dommage persistant (Toczyski 2006). Ce test peut être réalisé en réponse à différents types de dommages : une coupure effectuée par une endonucléase ou en plaçant des cellules exprimant l'allèle thermosensible *cdc13-1* à température restrictive. Ce test consiste à étaler des cellules sur milieu solide tout en maintenant l'induction du dommage, soit par un milieu spécifique ou par la température pour les deux exemples de dommage que j'ai cités. La contrainte est de réussir à suffisamment séparer les cellules au moment de les étaler sans les endommager d'avantage. Au laboratoire, nous avons optimisé un protocole inspiré de (Toczyski 2006) pour nos expériences. J'ai donc suivi le protocole suivant : des cellules *cdc13-1* à 23°C sont cultivées sur la nuit sont diluées à DO_{600nm} = 0,1 le lendemain matin puis laissées en cultures liquides à 23°C pendant 3 heures. Les cellules sont ensuite diluées à DO_{600nm} = 0,04 et sont ensuite placées à 32°C pendant 3 heures. Les cellules sont séparées par vortex pendant 10 secondes afin de bien les séparer puis sont étalées sur milieu YPD et placées à 32°C. Enfin, les microcolonies sont comptées au moment de l'étalement soit après 3 heures à 32°C, puis après avoir passé 24 heures à 32°C (Figure 18).

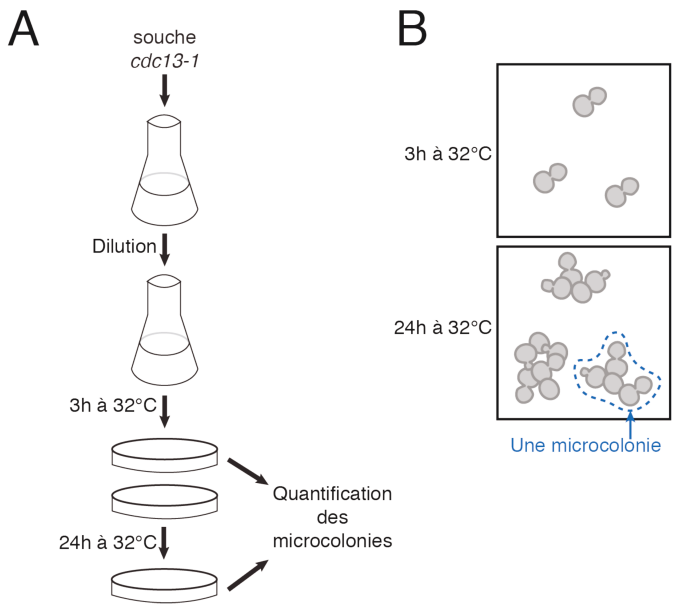


Figure 18 : Test de formation de microcolonies en réponse à un dommage télomérique persistant. A. Protocole expérimental afin de permettre de quantifier la capacité à former des microcolonies, donc de s'adapter en présence d'un dommage persistant. **B**. Images théoriques de microscopies obtenues pour une souche capable de s'adapter à un dommage télomérique**.** Après 3h à 32°C, les cellules sont arrêtées en phase G2/M, après 24h, la quasi totalité des cellules se sont adaptées et ont formé une microcolonie (≥ 3 corps cellulaires).

3. *Microscopie*

Les cellules sont observées avec un microscope inversé motorisé Axio Observer Z1 (Zeiss) avec un objectif 100X ou 63X. Les images sont acquises via une camera Hamamatsu Orca R2 et avec aide d'un stabilisateur de focus (Definite focus, Zeiss). Tous les paramètres

du microscope et la prise d'images sont gérés via le logiciel d'acquisition ZEN de Zeiss. Le fluorochrome eGFP est visualisé avec un filtre GFP (100% d'intensité de LED – 500ms d'exposition). Le fluorochrome mCherry est visualisé avec un filtre mCherry (100% d'intensité de LED – 200ms d'exposition).

4. Etude de l'adaptation en cellules uniques

La reprise du cycle cellulaire par l'adaptation peut prendre plusieurs heures. De plus, lors d'expérience préliminaires de microscopie, j'ai observé des phénotypes de division très hétérogènes. Certaines cellules présentaient des bourgeons surnuméraires, ou une pont entre les deux noyaux par exemple mais leur fréquence n'a pas été déterminée. En conséquence, pour une meilleure caractérisation de la cinétique des évènements d'adaptation, j'ai mis au point un protocole grâce auquel il est possible de suivre l'arrêt puis les évènements dans de nombreuses cellules individuelles. Pour cela, j'ai utilisé le système de microfluidique CellASIC de Millipore couplé à la microscopie résolue en temps. J'ai ainsi pu suivre simultanément entre 100 et 200 cellules de 4 génotypes différents (Figure 19A). Cet outil permet une caractérisation précise de la fréquence et de la cinétique des évènements d'adaptation, tout en tenant compte de leur variabilité.

La plaque contenant le circuit et dont les puits contiennent le milieu et les cellules est placée dans une chambre d'incubation associée au microscope afin de maintenir l'ensemble à 32°C. Les cellules sont préalablement cultivées dans un milieu synthétique pour atteindre une concentration de $5x10^6$ cellules/ml (concentration recommandée par le fabricant) au moment d'être injectées dans le circuit. Les champs de microscopie sont ensuite sélectionnés afin d'obtenir au moins 100 cellules par génotype. Des images de microscopie en contraste de phase sont réalisées toutes les 10 minutes (à l'exception des expériences avec fluorescence où j'ai paramétré la prise d'images avec un intervalle de 20 minutes) sur une durée de 24 heures.

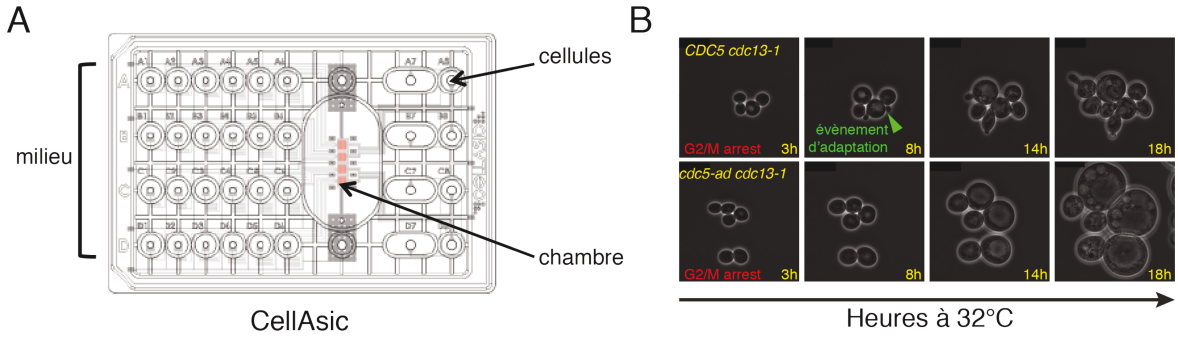


Figure 19 : Système de microfluidique CellASIC utilisé pour étudier les évènements d'adaptation. A. Schéma de la plaque utilisée qui contient le circuit de microfluidique. Les cellules sont chargées dans les puits correspondants (jusqu'à 4 génotypes différents) ainsi que le milieu. Le système permet ensuite d'injecter les cellules dans les chambres d'observation. Enfin, une pompe à air comprimé permet de maintenir un flux continu et constant de milieu dans les chambres. **B.** Images de microscopies réalisées toutes en time-lapse pour suivre les évènements d'adaptation dans des souches *cdc13-1* et *CDC5* ou *cdc5-ad*. Après 3 heures passées à 32°C, les cellules sont arrêtées. Dans les cellules *CDC5* on peut observer un événement de bourgeonnement donc d'adaptation suivi par d'autres dans les heures qui suivent. En revanche les cellules *cdc5-ad* restent arrêtées en phase G2/M.

Après 24 heures, les images sont récupérées puis analysées manuellement. Les images à laquelle chaque cellule s'est adaptée (séparation des deux cellules ou première apparition d'un bourgeon si la séparation des cellules est difficile à distinguer) (Figure 19B) sont répertoriées puis une correction concernant le temps passé à paramétrer les positions avant le lancement de la prise d'image est appliquée. Cela permet, entre autres, de comparer les différentes expériences entre elles. Pour chaque génotype est ensuite tracée une courbe cumulative représentant chaque premier événement d'adaptation en pourcentage de cellules adaptées par rapport à la population initiale totale de cellules arrêtées en G2/M.

5. Techniques utilisées pour l'étude des modifications post-traductionnelles

a) Western blot

Des extraits protéiques ont été préparés selon la méthode décrite dans l'article Coutelier et al, 2018 (paragraphe « SDS-PAGE and western blot analysis »).

Les protéines ont été séparés sur un gel dénaturant d'acrylamide 7,5% (SDS 0,1%, Tris-HCl 0,6 M pH 8.8, Acrylamide/Bis-acrylamide 37.5 :1, APS 0,1%, Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) 0,1%, après avoir été concentrés dans un gel de concentration 5% (SDS 0,1%, Tris-HCl 0,125 M pH 6.8, Acrylamide/bis-acrylamide 37,5 :1, APS 0,1%, Temed 0,1%) par SDS-PAGE sous une tension de 90 V puis 120 V une fois que le front de migration a dépassé le gel de concentration dans du tampon Tris Glycine SDS 10%.

Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau 4).

Cible de l'anticorps	Clone	Animal d'origine	Dilution	Fournisseur
Anticorps primaires				
HA	3F10	Rat	1/1000	Roche
Cdc5	4F10-11H12	Souris	1/500	Medimabs
Rad53	ab104232	Lapin	1/1500	Abcam
Pgk1	22C5D8	Souris	1/15000	Abcam
Anticorps secondaires				
IgG de souris HRP conjugué	A9044	Lapin	1/15000	Sigma Aldrich
IgG de rat HRP conjugué	A9542	Lapin	1/15000	Sigma Aldrich
IgG de lapin HRP conjugué	A9169	Chèvre	1/15000	Sigma Aldrich

Tableau 4 : Anticorps utilisés au cours de la thèse.

b) Traitement phosphatase

Un traitement à la phosphatase λ a été réalisé pour étudier les phosphorylations de Cdc5. Lors de l'extraction au TCA, les culots de protéines sont lavés avec du PBS 1X puis sont repris dans du tampon PMP (New England Biolabs) complémenté avec du $MnCl_2$. L 'échantillon est divisé en deux aliquots et la phosphatase λ est ajoutée dans l'un des deux(New England Biolabs) pour les échantillons appropriés. Les échantillons sont placés à 30°C pendant 1 heure puis sont repris dans du tampon Laemmli 2X final avant d'être dénaturés pendant 5 minutes à 95°C.

c) Immunoprécipitation

Des expériences de purification de Cad5 par immunoprécipitation (IP) ont été réalisées afin d'étudier les phosphorylations par spectrométrie de masse. Les cellules ont été lysées

dans du Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 150 mM, Triton x100 0,6% Glycérol 10%. Des billes magnétiques Dynabeads (Invitrogen) liées à l'anticorps α-HA (Roche) ont été utilisées pour purifier Cdc5. Les produits de l'IP ont été élués dans du Laemmli 4X.

d) Gel, coloration au nitrate d'argent et spectrométrie de masse

Les échantillons des IP ont migrés sur gel d'acrylamide 7,5%. Le gel a ensuite été coloré par nitrate d'argent. Pour cela, le gel est incubé sur la nuit dans une solution d'acide acétique 5% EtOH (Ethyle Hydroxyle) 30%. Le gel est ensuite lavé, une première fois avec une solution d'EtOH 20% pendant 10 minutes puis dans une deuxième fois dans une solution d'EtOH 10% pendant 10 minutes et enfin 2 fois 10 minutes dans de l'eau déminéralisée. Le gel est ensuite plongé dans une solution de sensibilisation de thiosulfate de sodium 0,02% (p/v). Le gel est lavé 2 fois 10 minutes dans de l'eau déminéralisée. Ensuite le gel est incubé dans une solution de nitrate d'argent 0,212% (p/v) pendant 30 minutes. Le gel est lavé avec de l'eau déminéralisée pendant 15 secondes. Le gel est ensuite plongé dans la solution de développement composée de carbonate de sodium 3% (p/v), thiosulfate de sodium 0,00125% (p/v) et formaline 0,03% (v/v). L'arrêt du développement se fait par l'ajout d'une solution d'acide acétique 5% pendant 30 minutes. Enfin le gel est rincé dans de l'eau déminéralisée pendant 30 minutes.

J'ai ensuite découpé les bandes d'intérêt qui ont été traitées pour la digestion des protéines par la trypsine pour l'analyse en spectrométrie de masse selon un protocole adapté réalisé par la plateforme.

Les échantillons extraits du gel sont réduits dans 10 mM de DTT (Dithiothréitol) Ambic (Bicarbonate d'ammonium) 50 mM pendant 30 min à 56°C à l'abri de la lumière, puis alkylés dans de l'iodoacétamide 50mM, AMBIC 50 mM pendant 30 min sans lumière. La digestion par la trypsine est réalisée sur la nuit à 37°C. Les peptides extraits sont séchés par "speedvac" et resuspendus dans 10µL de tampon de chargement (3% ACN (Acétonitrile), 0,1% AF (Acide formique)).

5µL d'échantillon sont analysés par nano LC-MS/MS en utilisant une chromatographie ultra haute pression EASY-nLC 1000 (Thermos Fisher Scientific) couplée à un spectromètre de masse QExactive plus (Thermo Scientific™). Les peptides sont préalablement dessalés sur une colonne C18 (Acclaim PepMap®, 75 µm x 2 cm nano viper Thermo Scientific) puis

séparés sur une colonne de 50 cm C18 (PepMap® RSLC, 2 µm, 100 Å, Thermo Scientific) par un gradient de 90 min de 0 à 32% de solvant B (100% ACN 0.1% AF).

L'analyse de spectrométrie de masse a été réalisée en utilisant une méthode top 10 avec 60 secondes d'exclusion dynamique. La recherche en banque de données Uniprot de *S cerevisiae* a été effectuée sous le serveur MASCOT (Matrix Science, London, UK) via le logiciel d'identification de proteines Proteome discoverer (Thermo Scientific™). Les paramètres de recherche utilisés autorisaient 2 coupures manquantes et avaient comme modification fixe la carbamidométhylation des cystéines et comme modifications variables l'oxydation des méthionines, l'acétylation N-terminal et les phosphorylations des sérines, thréonines et tyrosines avec une tolérance de masse de 10 ppm (partie par millions). Le taux d'erreur (ou FDR false discovery rate) pour l'identification des protéines a été fixé à 1% et les résultats ont été filtrés pour ne garder que les protéines identifiées avec au moins deux peptides.

B. Résultats

1. Localisation de Cdc5 en réponse à un dommage

La localisation de Cdc5 est régulée en fonction des phases du cycle cellulaire ce qui reflète ses nombreuses fonctions et substrats (Botchkarev et al. 2017). J'ai d'abord vérifié ces localisations au cours du cycle dans les souches que j'ai construites (Figure 21A). J'ai ensuite souhaité savoir si, après l'induction d'un dommage persistant, la régulation de la localisation de Cdc5 est impliquée dans l'adaptation et la reprise du cycle cellulaire. En G2/M, Cdc5 est localisée aux SPB, l'équivalent des centrosomes chez la levure, ainsi que dans le noyau. Lorsque Cdc5 est fusionnée au fluorophore eGFP, on observe effectivement en G2/M, deux *foci* qui correspondent aux deux SPB et un signal diffus dans le noyau (Figure 21B). Pour les cellules *CDC5-eGFP* et *cdc5-ad-eGFP*, j'ai observé un signal correspondant à des cellules en G2/M 3 et 6 heures après l'induction du dommage. Cependant, 9 heures après l'induction du dommage, alors que le signal eGFP est toujours équivalent dans les cellules *CDC5-eGFP* arrêtées, les cellules *cdc5-ad-eGFP* perdent le signal sous forme de *foci* au niveau des SPB. Par contre, le signal diffus dans le noyau est maintenu dans les deux génotypes. J'ai également vérifié que les SPB sont toujours présents dans les cellules *cdc5-ad* par colocalisation avec un marquage d'une sous-unité du SPB, Spc42-mCherry. La quantification des cellules avec ou sans *foci* sur l'ensemble des images montre une diminution marquée du

nombre de *foci* dans les cellules exprimant l'allèle *cdc5-ad-eGFP* (Figure 21C) qui n'est pas observée chez les cellules *CDC5-eGFP*. La capacité de Cdc5 d'être localisée aux SPB semble être corrélée à la capacité d'adaptation.

J'ai également testé ces souches par test de formation de microcolonies et puis j'ai analysé les évènements d'adaptation uniques par expérience de microfluidique afin d'observer la cinétique des évènements d'adaptation pour des cellules *CDC5 cdc13-1*, *cdc5-ad cdc13-1*, *CDC5-eGFP cdc13-1* et *cdc5-ad-eGFP cdc13-1* et la dynamique de Cdc5 pendant ces évènements pour les souches eGFP. Le test de formation de microcolonies permet de savoir si les cellules d'un génotype spécifique peuvent ou non s'adapter. Cependant, il y a un biais quant à la comptabilisation des cellules à 3 heures. En effet, les cellules viennent d'être étalées sur milieu solide. Le pourcentage de microcolonies doit théoriquement être de 0%, or ce n'est pas le cas car au moment de l'étalement des cellules, certaines sont agrégées et sont comptabilisées comme des microcolonies, c'est pourquoi leur pourcentage à 3 heures oscille entre 0 et 20%. De plus, même en multipliant les points de comptage il est difficile d'observer les évènements d'adaptation individuels. Néanmoins, 80% des cellules *CDC5 cdc13-1* forment des microcolonies,alors que le pourcentage de microcolonies des cellules *cdc5-ad cdc13-1* reste inchangé. C'est pourquoi je me suis tournée vers le système de microfluidique pour observer les évènements d'adaptation uniques. En ce qui concerne les cellules de référence où Cdc5 n'est pas fusionnée à la eGFP, *CDC5 cdc13-1*, on observe, après analyse en microfluidique, une courbe sigmoïdale avec une augmentation du nombre d'événements d'adaptation 8 heures après l'induction du dommage pour atteindre un plateau après 14-16 heures d'induction (Figure 20). Chez les cellules *cdc5-ad cdc13-1*, le pourcentage de cellules adaptées est quasiment nul (entre 0 et 1,1% pour les 3 réplicas) et est donc représenté par une courbe quasiment horizontale (Figure 20).

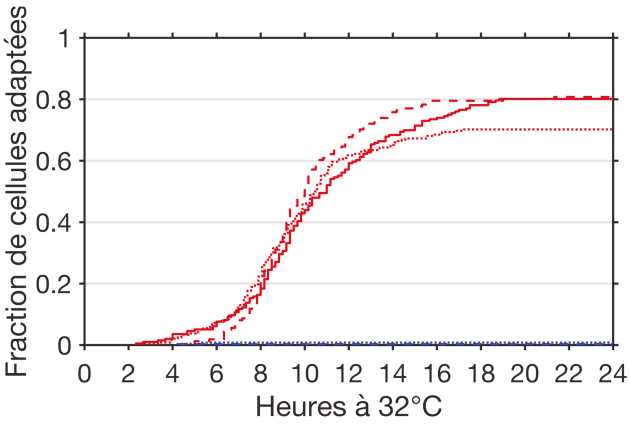


Figure 20 : Analyse par microfluidique d'évènements d'adaptation en cellules uniques. Des cellules exprimant *cdc13-1 CDC5* (courbes rouges, les courbes en pointillées représentent des expériences indépendantes) ou *cdc13-1 cdc5-ad* (courbes bleues, les courbes en pointillés représentent des expériences indépendantes) sont placées dans le circuit de microfluidique à 32°C. Chaque premier événement d'adaptation de chaque cellule est analysé puis les données sont rassemblées pour former une courbe cumulative pour chaque génotype (>150 cellules analysées par génotype et par expérience).

Malgré la différence que l'on pouvait observer en images de microscopie, il s'est avéré que les cellules *cdc5-ad-eGFP cdc13-1* sont capables de s'adapter à des niveaux assez élevés en test de formation de microcolonies (Figure 21D) voire similaires à ceux des cellules *CDC5-eGFP cdc13-1* en cellules uniques (Figure 21E). Le pourcentage maximum de cellules adaptées des cellules eGFP, en microfluidique, est assez bas, environ 30%. Ce niveau bas d'adaptation peut être expliqué car cette expérience a été menée pour visualiser la fluorescence, or l'exposition répétée à la lumière affecte la viabilité des cellules (la même expérience en absence de fluorescence a été réalisé mais l'analyse a été impossible à cause d'un problème technique et j'ai manqué de temps pour répéter l'expérience). Néanmoins, les courbes présentent une forme sigmoïdale et l'incidence des premiers et derniers évènements d'adaptation est similaire aux cellules de référence, entre 8 et 14 heures après l'induction du dommage. Mais le niveau similaire d'adaptation entre *CDC5* et *cdc5-ad* confirme que la version de la protéine fusionnée à eGFP affecte Cdc5-ad.

En conclusion, la fusion de Cdc5-ad avec eGFP semble affecter la capacité d'adaptation de façon positive ce qui est intéressant par le fait que la fusion avec la eGFP est à l'extrémité C-terminale de la protéine Cdc5 qui contient le PBD. Or on sait que la fonction du PBD est importante pour l'adaptation. En effet, la mutation *cdc5-16* qui altère le PBD conduit à un défaut prononcé d'adaptation (Ratsima et al. 2011; Ratsima et al. 2016). Cela suggère que non seulement la fonction du PBD est impliquée dans la régulation de l'adaptation mais aussi peut être la conformation de la partie C-terminale de Cdc5.

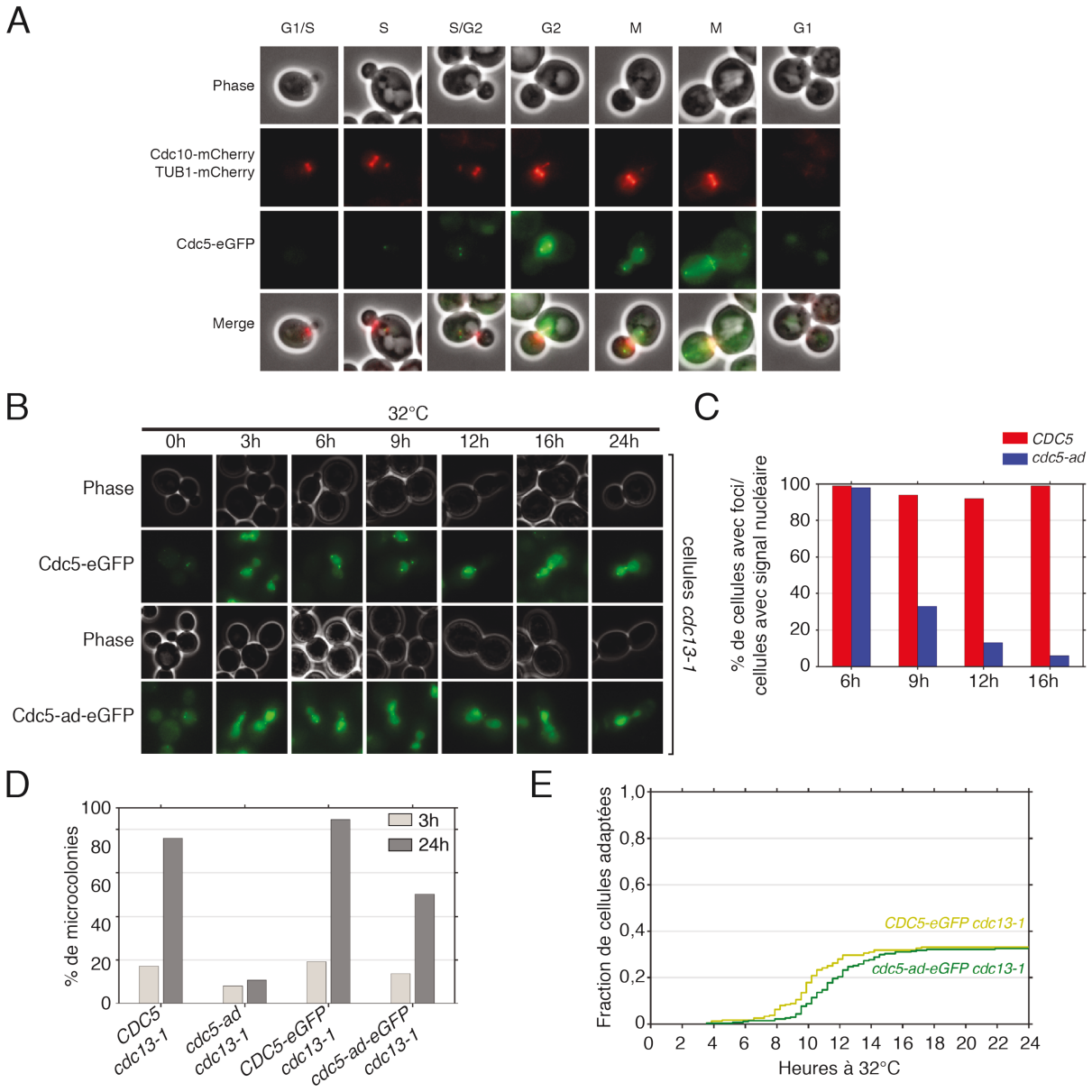


Figure 21 : Cdc5-ad-eGFP ne maintient pas sa localisation au SPB après 9h d'arrêt et la fusion à eGFP abolie le défaut d'adaptation de Cdc5-ad. A. Images de microscopie à fluorescence de cellules exprimant Cdc5-eGFP, Cdc10-mCherry et Tub1-mCherry **B**. Images de microscopie à fluorescence après que les cellules exprimant l'allèle mutant *cdc13-1* ont été placées à 32°C **C.** Quantification du nombre de cellules présentant au minimum un focus eGFP parmi les cellules qui présentent un signal diffus dans le noyau (n ≥ 100). **D.** Test de formation de microcolonies chez des cellules exprimant *CDC5* ou *cdc5-ad* avec ou sans étiquette eGFP. **E.** Représentation graphique de courbes cumulatives du nombre de cellules adaptées après avoir été placées à 32°C dans le système de microfluidique CellASIC chez des cellules exprimant *CDC5-eGFP* ou *cdc5-ad-eGFP*.

Avant de déceler le problème avec les souches eGFP, j'avais analysé la contribution du défaut de localisation de Cdc5-ad aux SPB à son défaut d'adaptation. Pour cela, Damien D'amours (Université d'Ottawa) m'avait conseillé de fusionner le gène de *CDC5* ou *cdc5-ad* au motif de localisation aux SPB du gène *BBP1* afin de « forcer » Cdc5 aux SPB (Figure 22A). Cette construction a été obtenue à partir d'une souche de (Ratsima et al. 2016), où la construction est placée en aval de l'allèle mutant *cdc5-16*. J'ai fusionné le peptide à Cdc5-ad puis j'ai testé les souches par le test de formation de microcolonies puis avec le système de microfluidique. Le test de formation de microcolonies présente des résultats attendus pour les

souches *CDC5 cdc13-1* et *cdc5-ad cdc13-1* : entre 70 et 80% de cellules arrêtées en G2/M forment une microcolonie 24 heures après l'induction du dommage pour les cellules exprimant *CDC5* contre moins de 20% d'adaptation pour les cellules exprimant *cdc5-ad*. Les cellules *CDC5-bbp1[243-385] cdc13-1* (abrégé *CDC5-bbp1* par la suite) présentent aussi un niveau basal d'adaptation, entre 70 et 80% de cellules adaptées 24 heures après l'induction du dommage. Concernant les cellules exprimant *cdc5-ad-bbp1[243-385] cdc13-1* (abrégé *cdc5-ad-bbp1* par la suite), on observe un défaut d'adaptation partiel. 24 heures après l'induction du dommage, entre 30 et 40% des cellules initialement arrêtées en G2/M ont formé une microcolonie (Figure 22B). En comparaison aux cellules *cdc5-ad* qui ne s'adaptent jamais à plus de 20%, le défaut d'adaptation des cellules où Cdc5-ad est ciblée aux SPB semble partiellement atténué.

Afin de savoir si la localisation de Cdc5 au niveau des SPB joue un rôle dans la cinétique d'adaptation, j'ai étudié les événements d'adaptation en cellules uniques des mêmes souches avec le système de microfluidique. Les courbes des cellules *cdc13-1 CDC5* et *cdc13-*

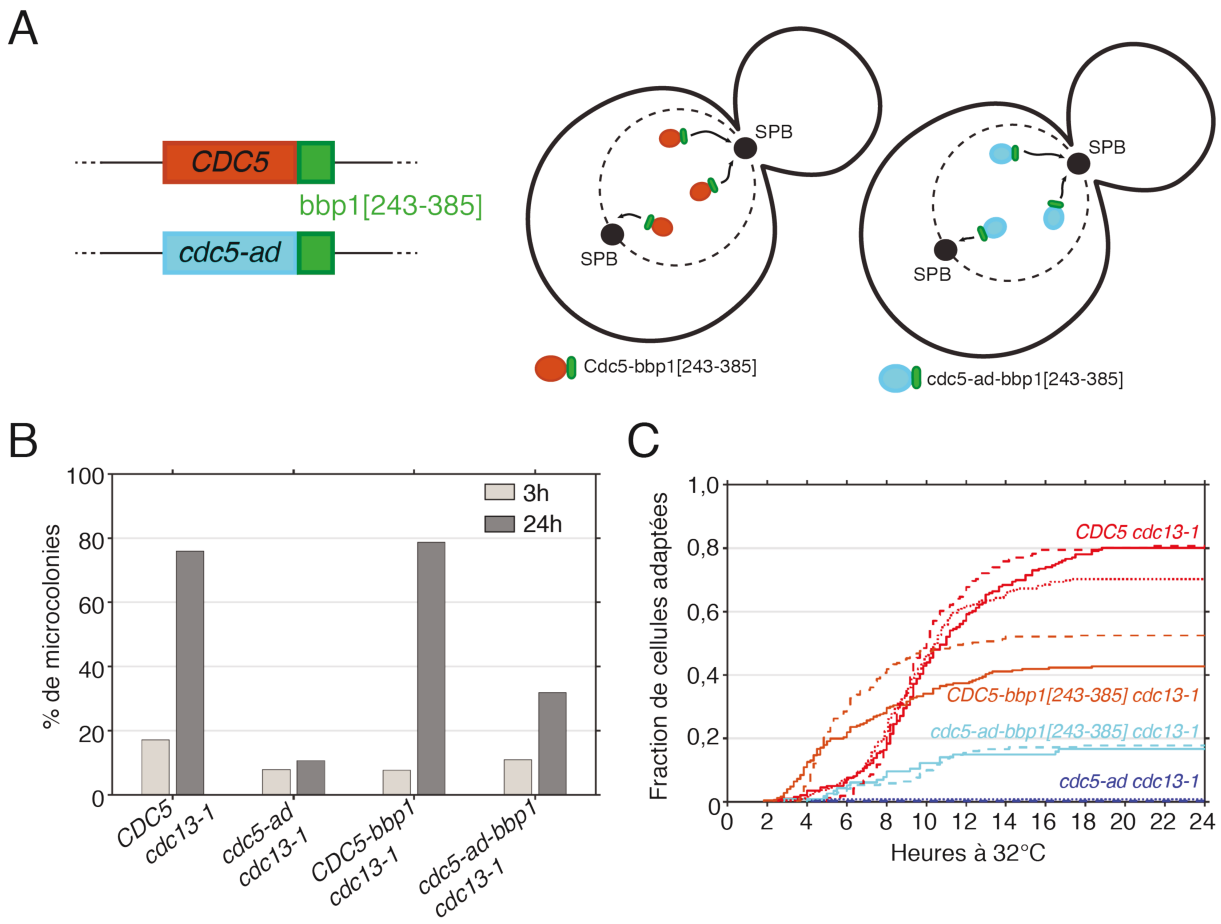


Figure 22 : Cibler Cdc5-ad aux SPB restaure partiellement la capacité d'adaptation. A. Représentation schématique de la construction où Cdc5 est fusionnée à la fraction du gène *BBP1* qui code un motif de localisation aux SPB. **B.** Test de formation de microcolonies. Les microcolonies ont été comptabilisées après 3 et 24 heures à 32°C. **C.** Courbes cumulatives de la fraction de cellules adaptées en fonction du temps passé à 32°C. Les génotypes suivant ont été analysés : *cdc13-1 CDC5, cdc13-1 cdc5-ad, cdc13-1 CDC5-bbp1[243-385]* et *cdc13-1 cdc5-ad-bbp1[243-385]*. Les courbes en pointillées correspondent à des expériences indépendantes.

1 cdc5-ad sont les mêmes que la figure 19. Les cellules *CDC5-bbp1* présentent un léger défaut d'adaptation puisque le maximum atteint de cellules adaptées est compris entre 40 et 60%. Ce léger défaut n'était pas mis en évidence dans le test de formation de microcolonies, probablement parce que dans le test de formation de microcolonies, les cellules qui meurent ne sont pas prises en compte puisqu'il n'est pas possible de distinguer les cellules qui meurent sous l'action mécanique de l'étalement sur milieu solide ou celles qui meurent en réponse au stress généré par l'induction du dommage, c'est d'ailleurs une des raisons pour lesquelles l'analyse en cellules unique est plus juste car elle présente moins de biais techniques. En comparaison, dans le système de microfluidique, les cellules peuvent être observées depuis l'induction du dommage et ne subissent *a priori* pas de dommage mécanique, les cellules qui meurent après plusieurs heures d'arrêt sans s'adapter sont prises en compte. Si la construction Bbp1[243-385] affecte la viabilité cellulaire cela n'a pas été pris en compte dans les tests de formation de microcolonies, d'où la différence avec l'expérience en cellules uniques. Néanmoins, les courbes cumulatives des cellules exprimant *CDC5-bbp1* sont intéressantes par le fait que la moitié des évènements d'adaptation est atteinte seulement 5-6 heures après l'induction du dommage et le plateau est atteint après environ 8 heures. Ces cellules présentent donc un petit défaut dans la capacité de s'adapter, mais en termes de cinétique, l'adaptation est accélérée suggérant que la localisation forcée de Cdc5 aux SPB favorise l'adaptation. Concernant les cellules *cdc5-ad-bbp1*, on observe, comme pour le test de formation de microcolonies, une légère augmentation du pourcentage de cellules qui s'adaptent, suggérant que le phénotype d'adaptation de Cdc5-ad pourrait être dû à un défaut de localisation aux SPB. Les premières cellules à s'adapter le font après environ 6 heures d'induction du dommage et le plateau est atteint vers 13 heures après l'induction. Mais à l'instar de la construction Cdc5-ad-eGFP, la fusion avec Bbp1[243-385] pourrait altérer la partie C-terminale de Cdc5-ad et sa fonction indépendamment de la localisation aux SPB.

En conclusion, la construction en C-terminale semble affecter la viabilité des cellules en présence d'un dommage. Toutefois, recruter Cdc5 aux SPB semble accélérer l'adaptation. De plus, amener Cdc5-ad aux SPB permet à une fraction de cellules de s'adapter. Ces expériences permettent donc de renforcer l'idée selon laquelle la localisation et la fonction de Cdc5 aux SPB sont importantes pour la cinétique et la capacité à s'adapter.

Puisque la localisation de Cdc5 aux SPB semble importante pour l'adaptation je me suis intéressée à un de ses substrats au niveau des SPB : Bfa1. Bfa1 est inhibée par phosphorylation par Cdc5 en phase M pour promouvoir la sortie de mitose. Lorsque *BFA1* est délété, le défaut d'adaptation des mutants *cdc5-T238A, cdc5-16* et *cdc5-ad* est supprimé

(Rawal et al. 2016; Ratsima et al. 2016). Je souhaitais étudier cette délétion en cellules uniques afin d'analyser la cinétique d'adaptation. En effet, Bfa1 est maintenu activé en réponse à l'activation du checkpoint des dommages de l'ADN pour bloquer le cycle cellulaire. La question est de savoir si les cellules *bfa1Δ* sont capables de s'arrêter en G2/M après activation du checkpoint, caractéristique que l'on peut vérifier grâce à la microfluidique. J'ai initialement délété le gène *BFA1* dans les souches exprimant *CDC5-eGFP* ou *cdc5-ad-eGFP*, puis j'ai testé ces souches dans leur capacité de former des microcolonies. Ces souches semblent présenter un défaut d'adaptation mais le niveau d'adaptation 24 heures après l'induction du dommage est équivalent entre les cellules exprimant *CDC5* ou *cdc5-ad* (Figure 23A). Ces souches avaient été testées en microfluidique, mais l'analyse s'est avérée compliquée due à la phototoxicité provoquée par l'exposition répétée à la fluorescence et ces souches étant *CDC5-* ou *cdc5-ad-eGFP*, elles sont problématiques car leur capacité d'adaptation est modifiée, en particulier pour les cellules *cdc5-ad-eGFP*. J'ai donc à nouveau délété le gène *BFA1* dans des souches *CDC5 cdc13-1* et *cdc5-ad cdc13-1* pour les expériences de microfluidique. On observe un léger défaut d'adaptation pour les cellules *CDC5 bfa1Δ cdc3-1* qui atteignent un maximum de cellules adaptées d'environ 60% (Figure 23B). La forme de la courbe est assez atypique. Elle présente une augmentation rapide du nombre de cellules adaptées 2 heures après l'induction du dommage pour atteindre 2/3 du nombre final d'évènements d'adaptation. On observe ensuite un ralentissement, presque un plateau, entre 4 et 8 heures puis le nombre de cellules qui s'adaptent augmente à nouveau plus rapidement pour atteindre le maximum après environ 12 heures d'induction du dommage. La forme de la courbe cumulative des évènements d'adaptation des cellules *cdc5-ad bfa1Δ cdc13-1* est similaire à celle des cellules exprimant *CDC5 bfa1Δ* à l'exception de l'augmentation rapide

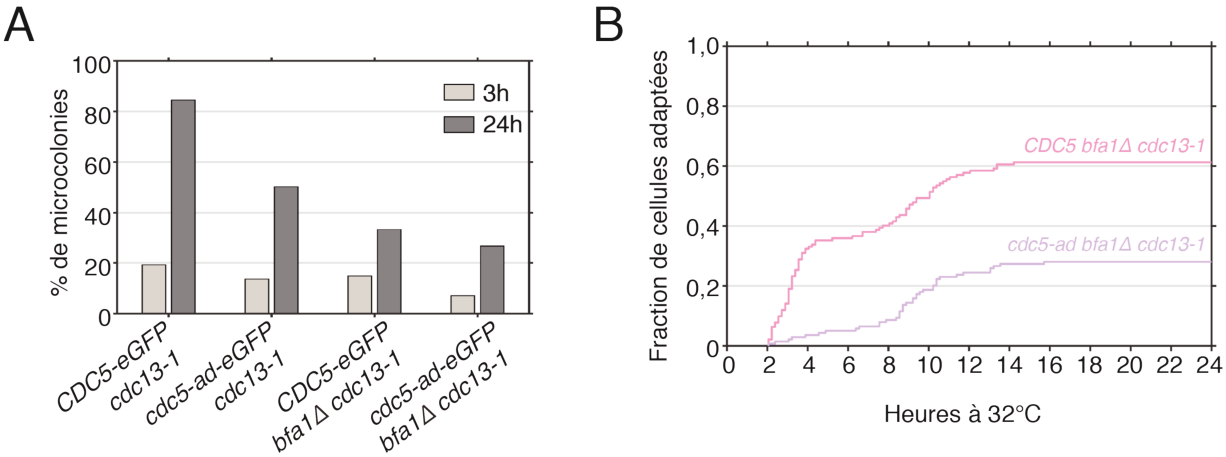


Figure 23 : *bfa1Δ* restaure partiellement le phénotype de *cdc5-ad*. A. Test de formation de microcolonies chez des cellules *CDC5* ou *cdc5-ad*, *bfa1Δ* ou non. B. Représentation graphique de courbes cumulatives du nombre de cellules adaptées après avoir été placées à 32°C dans le système de microfluidique CellASIC chez des cellules *cdc13-1* exprimant *CDC5-bfa1Δ* ou *cdc5-ad-bfa1Δ*.

du nombre d'évènements d'adaptation entre 2 et 4 heures après l'induction du dommage. Cependant, environ 30% de cellules *cdc5-ad bfa1Δ* s'adaptent suggérant la restauration partielle de la capacité d'adaptation (Figure 23B).

En conclusion, la délétion du gène *BFA1* ne semble pas affecter la capacité des cellules à s'arrêter en réponse à un dommage télomérique et semble permettre de partiellement contourner le défaut d'adaptation des cellules *cdc5-ad*. Cela renforce à nouveau l'importance de localisation de Cdc5 aux SPB, de ses fonctions aux SPB pour l'adaptation, et de la contribution du MEN pour la reprise du cycle cellulaire en cas de dommage persistant. Cependant, ces dernières expériences n'ont été réalisées qu'une fois, il est donc nécessaire de les reproduire.

2. Etude de Cdc5 et des modifications post-traductionnelles

Afin d'étudier les fonctions et régulations de Cdc5, j'ai analysé son expression au cours de l'adaptation. J'ai étudié par western blot la quantité de Cdc5, fusionnée avec l'étiquette HA en 3 exemplaires, dans des cellules exprimant l'allèle mutant *cdc13-1* afin d'induire un dommage télomérique persistant. Des analyse de l'expression et activité de Cdc5 en réponse d'un dommage ont déjà été réalisées mais les résultats sont parfois inconsistants (Cheng, Hunke, et Hardy 1998; Zhang et al. 2009; Vidanes et al. 2010; Rawal et al. 2016). Sur une cinétique où les cellules ont été récupérées après 0, 3, 6, 12, 16 et 24 heures après l'induction du dommage, la quantité de Cdc5 diminue progressivement pour les cellules exprimant l'allèle sauvage *CDC5* ou l'allèle muté *cdc5-ad* (Figure 23A). En revanche, la différence notoire entre les deux génotypes est que pour les cellules exprimant l'allèle *cdc5-ad-HA*, on observe une double bande à partir de 3 heures après induction du dommage qui persiste aux autres temps d'observation (Figure 24A). Cette double bande correspond à des phosphorylations de Cdc5, car elle disparaît à la suite d'un traitement à la phosphatase λ (Figure 24B). À noter qu'on observe aussi un léger décalage après traitement à la phosphatase λ pour les cellules exprimant *CDC5* sauvage qui correspond probablement à la perte des phosphorylations connues permettant la régulation de l'activité de Cdc5.

Pour identifier les résidus phosphorylés de Cdc5 et Cdc5-ad dans ces conditions, j'ai procédé à la purification de la protéine par immuno-précipitation (IP). Afin d'obtenir un meilleur rendement de la protéine, j'ai utilisé des souches *leu2::ndd1-10A* (Figure 24C et paragraphe sur la régulation transcriptionnelle de *CDC5*) pour réaliser les IP afin de

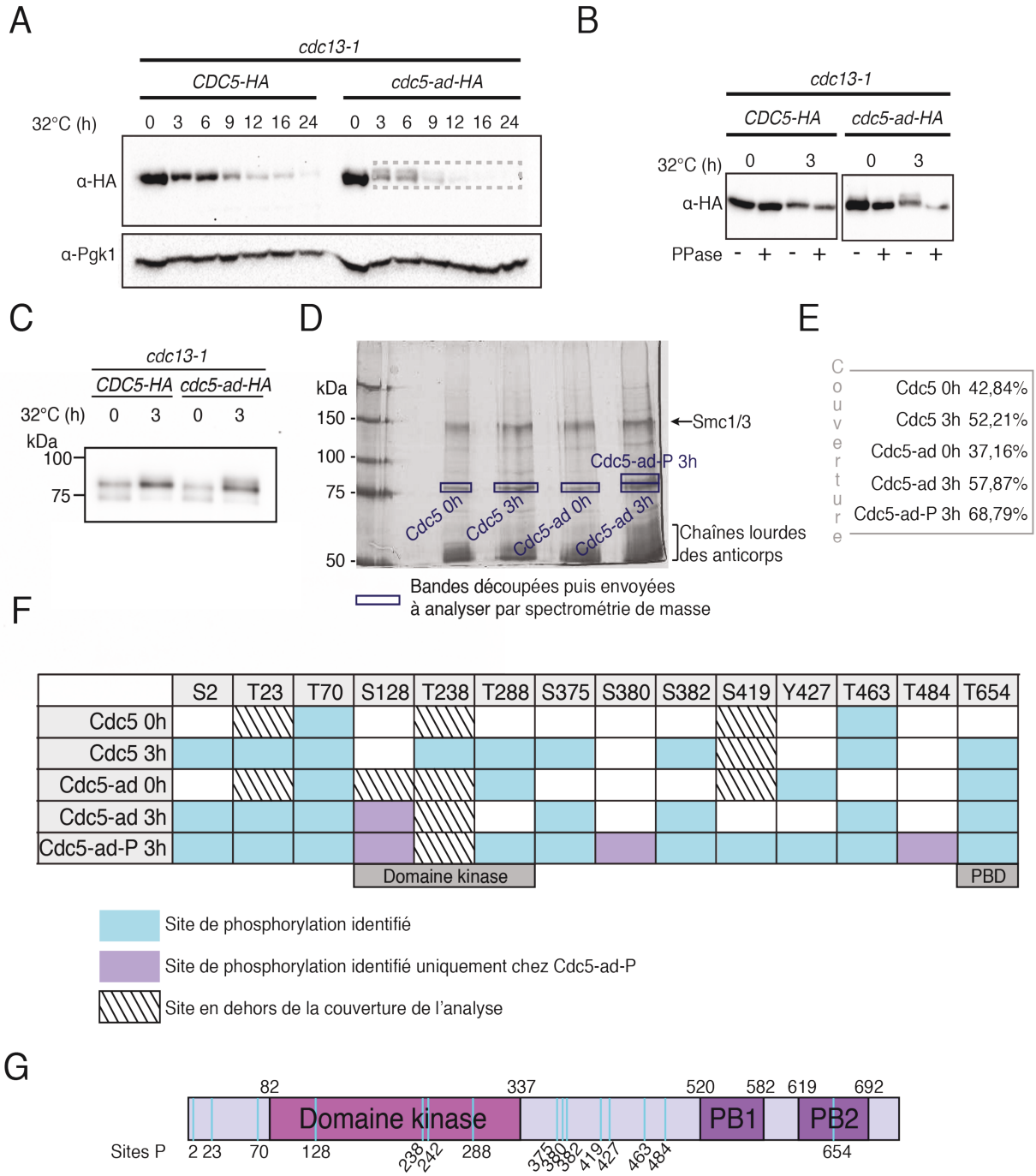


Figure 24 : Cdc5-ad est hyper-phosphorylée en comparaison à Cdc5 en réponse à un dommage télomérique. A. Analyse par western blot de la quantité de protéine Cdc5 en réponse à un dommage télomérique. Le gène *CDC5* ou *cdc5-ad* des souches utilisées est taggué avec 3 séquences HA, un anticorps dirigé contre HA a été utilisé. La quantité de protéine Pgk1 est utilisée comme témoin de charge. **B.** Analyse par western blot des modifications post-traductionnelles de Cdc5 et Cdc5-ad par traitement à la phosphatase λ **C.** IP réalisée avec un anticorps anti-HA sur des cellules *CDC5-HA* ou *cdc5-ad-HA* dans des souches mutées *leu2::ndd1-10A* **D.** Coloration au nitrate d'argent du gel d'acrylamide grâce auquel les produits de l'IP ont été séparés puis découpés pour analyse par spectrométrie de masse. **E.** Couverture en spectrométrie de masse par échantillon **F.** Sites de phosphorylation identifiés par spectrométrie de masse pour chaque échantillon **G.** Schéma de la protéine Cdc5 où sont récapitulés les sites de phosphorylation (sites P) identifiés.

s'affranchir de la diminution de la quantité de Cdc5 observée en réponse à un dommage. Les produits de cette IP ont ensuite été séparés par SDS-PAGE (Figure 23C). Le gel a été coloré au nitrate d'argent afin d'identifier les bandes d'intérêt pour qu'elles soient découpées puis analysées par spectrométrie de masse (Figure 23D). Les résultats préliminaires indiquent que toutes les bandes contiennent des peptides phosphorylés, et que la bande qui correspond à la forme de Cdc5-ad qui migre plus lentement après 3 heures d'induction du dommage contient d'avantage de peptides phosphorylés (Figure 23F). Un certain nombre des sites de phosphorylation identifiés sont déjà caractérisés : T238, S2 et T70. Cependant, la couverture n'a pas permis de couvrir l'ensemble de la protéine (Figure 23E). Par exemple, la phosphorylation de la T242 par Cdk1, connue pour être une phosphorylation essentielle à l'activité de Cdc5 (Mortensen et al. 2005; Rodriguez-Rodriguez et al. 2016) n'a pas pu être observée. Trois des sites de phosphorylation identifiés lors de cette première étude semblent être spécifiques de la bande d'hyperphosphorylation de Cdc5-ad (dénommée Cdc5-ad-P 3h) (Figure 23F et G).

La quantité de Cdc5 diminue de manière progressive en population après l'induction d'un dommage à l'ADN en particulier à partir de 6 heures après l'arrêt lorsque les évènements d'adaptation sont souvent observés, ce qui semble contre-intuitif si l'on considère que pour permettre l'adaptation, la quantité de Cdc5 devrait augmenter. Cdc5-ad présente un plus grand nombre de phosphorylations en réponse à un dommage, qui ne joue pas sur la quantité de protéine elle-même. Ces phosphorylations sont en partie similaires à Cdc5 en réponse à un dommage, cependant deux sites semblent se distinguer. Il serait intéressant de savoir si ces phosphorylations sont propres à Cdc5-ad ou si elles sont transitoires chez Cdc5 et donc difficiles à observer. Il serait également intéressant de savoir si leur présence est une conséquence ou la cause du défaut d'adaptation des cellules exprimant *cdc5-ad*. L'identification de ces sites de phosphorylation incite à identifier des phosphatases ou kinases impliquées dans le processus d'adaptation.

3. Etude de la régulation transcriptionnelle de Cdc5

J'ai observé que la quantité de Cdc5 diminue progressivement en présence d'un dommage à l'ADN. J'ai souhaité savoir quel type de régulation pouvait être responsable de cette diminution. Or il est connu que *CDC5* fait partie d'un cluster de gènes régulés par un complexe de facteurs de transcription : Mcm1/Fkh2/Ndd1. En présence d'un dommage à l'ADN, la kinase Rad53 est activée et phosphoryle plusieurs substrats dont Ndd1, ce qui inhibe l'expression du cluster de gènes *CLB2* qui sont principalement des gènes mitotiques

(Figure 25A). L'inhibition de leur transcription permet de contribuer à l'arrêt du cycle. Des cellules qui expriment une seconde copie du gène *NDD1*, au locus du gène *LEU2,* muté ou non pour les sites de phosphorylation par Rad53 a été décrit. Dans cette copie du gène *NDD1*, 10 sites de phosphorylation par Rad53 ont été mutés de telle sorte que les sérines/thréonines sont remplacées par des alanines (Yelamanchi et al. 2014). En cas de dommage, les cellules exprimant cet allèle *leu2::ndd1-10A* (*ndd1-10A* pour la suite du texte) sont donc insensibles à l'inhibition habituellement induite par la phosphorylation de Ndd1 par Rad53. J'ai analysé par western blot la quantité de Cdc5 ou Cdc5-ad après induction d'un dommage dans des cellules exprimant *leu2::NDD1* (*NDD1* pour la suite du texte) ou *ndd1-10A* (Figure 25B). La diminution d'expression de Cdc5 est récapitulée 3 heures et 6 heures après l'induction du dommage pour les cellules *CDC5* ou *cdc5-ad* exprimant une seconde copie de *NDD1*. En revanche, la diminution est abolie dans les cellules exprimant *ndd1-10A* en seconde copie du gène. La diminution d'expression de Cdc5 ou Cdc5-ad est donc dépendante de la phosphorylation de Ndd1 par Rad53. Par ailleurs, la phosphorylation de Cdc5-ad en réponse à un dommage à l'ADN est indépendante de la régulation transcriptionnelle par Ndd1.

Afin de tester si la régulation transcriptionnelle de *CDC5* par Ndd1 est importante pour l'adaptation, j'ai analysé l'impact de la mutation *ndd1-10A* sur le phénotype d'adaptation grâce au test de formation de microcolonies dans un premier temps puis grâce au système de microfluidique dans un second temps. Lors du test de formation de microcolonies, on observe qu'après 24 heures passées, environ 80% des cellules de référence exprimant l'allèle *CDC5* sauvage s'adaptent (Figure 25 D). En revanche les cellules exprimant l'allèle *cdc5-ad* ne s'adaptent pas puisque moins de 20% de microcolonies sont observées. Lorsque l'on s'intéresse aux cellules exprimant *ndd1-10A*, on observe que les cellules sont arrêtées en phase G2/M, 3 heures après l'induction du dommage. La construction ne semble donc pas affecter l'activation du checkpoint et l'arrêt du cycle cellulaire. Après 24 heures à 32°C, on observe un phénotype similaire aux cellules de référence pour les cellules exprimant *CDC5 ndd1-10A*. Le plus intéressant est que les cellules exprimant *cdc5-ad ndd1-10A* présentent aussi un phénotype similaire aux cellules de référence 24 heures après l'induction du dommage (Figure 25D). Cette mutation de *NDD1* semble donc restaurer la capacité de s'adapter pour les cellules *cdc5-ad*.

Grâce au système de microfluidique, j'ai comptabilisé les évènements d'adaptation chez des cellules *CDC5 leu2::NDD1*, *cdc5-ad leu2::NDD1*, *CDC5 leu2::ndd1-10A* et *cdc5-ad leu2::ndd1-10A*. Les cellules exprimant une seconde copie sauvage de *NDD1* présentent un phénotype similaire à la souche de référence (sans deuxième copie de *NDD1*) avec la plupart des évènements d'adaptation entre 8 et 14 heures après l'induction du dommage.

Cependant les cellules *CDC5 leu2::NDD1* ont un pourcentage maximum de cellules adaptées plus faible que les cellules de référence *CDC5 cdc13-1* ainsi que plus variable. Il est possible qu'une seconde copie du gène *NDD1* ne soit pas physiologique et affecte sensiblement la capacité de la cellule à s'adapter. En ce qui concerne les cellules exprimant la seconde copie *ndd1-10A*, comme lors du test de formation de microcolonies, j'ai observé que les cellules exprimant *cdc5-ad* deviennent capables de s'adapter (Figure 25E). Cependant, la forme des courbes est également modifiée. Premièrement, elle n'est plus de forme sigmoïdale alors qu'elle l'est encore chez les cellules exprimant une seconde copie sauvage de *NDD1*. De plus, les premiers évènements d'adaptation apparaissent plus tôt chez les cellules *ndd1-10A*, après seulement 2 heures d'arrêt. On observe ensuite une augmentation rapide du nombre de cellules adaptées pour atteindre 50% de cellules adaptées environ 4 heures après induction du dommage pour les cellules *CDC5* et 6 heures pour les cellules *cdc5-ad*. Le maximum de cellules adaptées de presque toujours 90% pour les cellules *CDC5* est atteint environ 7 heures après l'induction du dommage. Chez les cellules *cdc5-ad*, le maximum est d'environ 80% et est atteint environ 9 heures après l'induction du dommage (Figure 25E). La différence de forme de courbes et la différence des temps d'adaptation signifient une accélération marquée de l'adaptation chez les cellules *ndd1-10A* aussi bien chez les cellules exprimant l'allèle sauvage de *CDC5*, que l'allèle muté *cdc5-ad*.

S'affranchir de la régulation transcriptionnelle de Cdc5 par le biais du complexe facteur de transcription Mcm1/Fkh2/Ndd1 favorise la capacité d'adaptation au checkpoint en réponse à un dommage de l'ADN.

La régulation de Ndd1 en réponse à un dommage de l'ADN semble donc être impliquées dans la régulation des évènements d'adaptation et notamment de Cdc5. Or Ndd1 fait partie des substrats qui sont phosphorylés par Cdc5 et ce afin de promouvoir l'expression des gènes du cluster *CLB2* (Darieva et al. 2006). La sérine 85 de Ndd1 est la cible de Cdc5, différente des sérines cibles de Rad53. D'après les résultats du paragraphe précédent, maintenir la quantité de protéine de Cdc5-ad permet de maintenir un niveau d'adaptation basal. Nous avons donc pensé qu'en réponse à un dommage persistant, la quantité de Cdc5, et des autres facteurs mitotiques, pouvait être augmentée grâce à une boucle de rétroaction positive et permettre ainsi de promouvoir l'adaptation.

J'ai donc muté par mutagénèse dirigée la seconde copie du gène *leu2*::*NDD1* pour exprimer un glutamate à la place de la sérine 85 et ainsi tenter de construire un phospho-mimétique. Cette construction permet aussi d'avoir une condition plus proche d'une situation physiologique en comparaison avec l'allèle *ndd1-10A* puisque cette modification de la sérine

85 est observée *in vivo* au cours du cycle cellulaire. Comme pour les souches précédentes, j'ai testé ces souches d'abord en test de formation de colonies puis avec le système de microfluidique. Les cellules exprimant *CDC5 leu2::ndd1-S85E* (*ndd1-S85E* par la suite) ont un pourcentage de microcolonies légèrement plus bas que les cellules *CDC5 leu2::NDD1*, environ 60% comparé à environ 75-80% (Figure 25D). Les cellules *cdc5-ad ndd1-S85E* ne sont pas capables de s'adapter. Pour les résultats des évènements d'adaptation en cellules uniques, la courbe des cellules *CDC5 ndd1-S85E* a une forme correspondant aux cellules de référence et des temps similaires. Cependant, comme pour la souche *CDC5 leu2::NDD1*, le pourcentage maximum de cellules adaptées est de seulement 40% environ. Les cellules *cdc5-ad ndd1-S85E* ne sont pas capables de s'adapter. La mutation S85E, lorsqu'elle est combinée à la mutation 10A, *ndd1-S85E-10A* présente des phénotypes similaires aux cellules exprimant l'allèle *ndd1-10A* (Figure 25F). Comme pour *ndd1-10A*, il n'y a plus de différence entre les cellules *CDC5* et *cdc5-ad* confirmant les résultats précédents. Les résultats sur les souches où la S85 est mutée ne permettent pas de montrer l'existence de l'implication de la boucle de rétroaction positive entre Cdc5 et Ndd1 dans l'adaptation. En effet, il n'est pas certain que la mutation en glutamate ait permis de construire un phospho-mimétique comme souhaité et permette d'augmenter le niveau de Cdc5. J'ai tenté d'observer la quantité de Cdc5 chez ces souches en réponse à l'induction du dommage à 32°C par western blot mais j'ai rencontré un certain nombre de problèmes techniques qui ne m'a pas permis d'avoir de réponse à temps concernant cette question. En revanche, j'ai construit des souches similaires où la sérine 85 est remplacée par une alanine. Ces souches seront testées par la suite.

Pour conclure, la régulation transcriptionnelle de Cdc5 par le complexe facteur de transcription Mcm1/Fkh2/Ndd1 semble affecter la capacité et la cinétique d'adaptation au checkpoint. La régulation de Ndd1 par Rad53 pourrait expliquer le long délai qui est observé avant les premiers évènements d'adaptation puisque que cet arrêt prolongé n'est plus observé lorsque cette régulation est abolie.

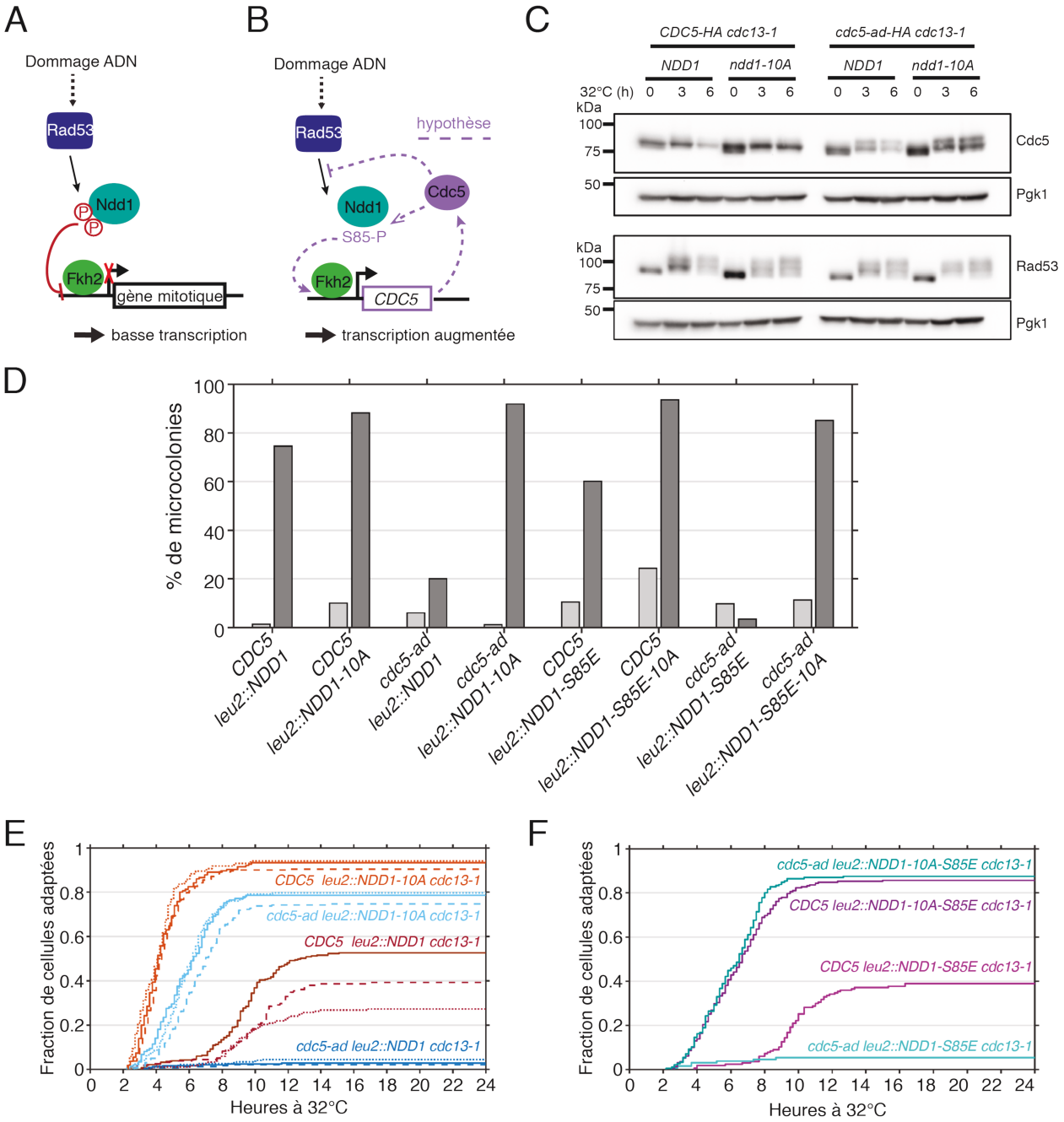


Figure 25 : Régulation transcriptionnelle de Cdc5 par le complexe Mcm1-Fkh2-Ndd1 en réponse à un dommage télomérique. A. Schéma représentant la régulation du cluster de gènes *CLB2* en réponse à un dommage de l'ADN. Rad53 lorsqu'il est activé, phosphoryle Ndd1 et empêche son interaction avec Fkh2 ce qui inhibe la transcription des gènes du cluster *CLB2* dont fait partie *CDC5*. **B.** Schéma représentant l'hypothèse selon laquelle Cdc5 pourrait réguler sa propre expression par une boucle de rétroaction positive afin de promouvoir l'adaptation au checkpoint. **C.** Western blot sur des souches exprimant *CDC5* ou *cdc5-ad* et une deuxième copie de *NDD1* mutée ou non en *ndd1-10A*, c'est-à-dire que les 10 sites de phosphorylation par Rad53 sont remplacés par des Ala. **D.** Test de formation de microcolonies avec des souches exprimant une deuxième copie de *NDD1*, sauvage, muté *ndd1-10A*, c'est-à-dire pour les 10 sites de phosphorylation par Rad53, ou muté *ndd1-S85E*, la Ser 85 étant le site de phosphorylation par Cdc5, la mutation en E permet de mimer la phosphorylation, ou le « double mutant » *ndd1-10A-S85E*. **E.** Représentation graphique de courbes cumulatives du nombre de cellules adaptées après avoir été placées à 32°C dans le système de microfluidique chez des souches *cdc13-1*, *CDC5* ou *cdc5-ad*, exprimant une deuxième copie de *NDD1* mutée ou non en 10A. **F.** Représentation graphique de courbes cumulatives du nombre de cellules adaptées après avoir été placées à 32°C dans le système de microfluidique chez des souches *cdc13-1*, *CDC5* ou *cdc5-ad*, exprimant une deuxième copie de *NDD1* mutée ou non pour la S85.

DISCUSSION

I. L'adaptation contribue à l'augmentation de l'instabilité génomique en absence de télomérase.

Les dommages de l'ADN sont un obstacle au maintien de l'intégrité du génome que la cellule doit éliminer afin permettre la transmission fidèle et équilibrée de l'information génétique aux générations suivantes. Pour cela, un ensemble de processus cellulaires contrent la survenue de ces dommages. Des facteurs spécifiques scrutent l'ADN afin de repérer les dommages de l'ADN et permettent ensuite le recrutement de la machinerie de réparation afin d'éliminer le dommage. Ces processus sont particulièrement efficaces. Cependant, certains dommages sont « non réparables », persistants. Cette situation est expliquée par la nature du dommage elle-même, par des circonstances environnementales ou un contexte génétique (lorsque les voies de réparation sont mutées par exemple). En réponse à ce dommage persistant, l'activation du checkpoint et le dommage peuvent être contournés par le processus d'adaptation au checkpoint. La cellule poursuit alors sa division en présence du dommage mettant en péril l'intégrité du génome.

L'adaptation peut être enclenchée en réponse à différents types de dommages : une coupure par endonucléase, en réponse à des radiations, à certains traitements génotoxiques ou à des dommages télomériques (mutant de protection des télomères). Cependant, l'adaptation n'a jamais été étudiée en réponse à l'activation du checkpoint en absence de télomérase. J'ai montré au cours de ce projet que l'adaptation est une réponse relativement fréquente à l'arrêt du cycle cellulaire induit par le raccourcissement ou la cassure des télomères.

A. La dynamique de sénescence

L'analyse de la dynamique de sénescence de lignées individuelles en absence de télomérase par microfluidique a permis de mettre en évidence la présence des arrêts appelés non terminaux prolongés, qui sont des arrêts du cycle cellulaire supérieurs à 6 heures. Ces arrêts sont partiellement dépendants de Mec1 et Pol32 suggérant que les télomères en absence de mécanisme de maintenance par la télomérase subissent des dommages qui sont parfois réparés par la voie BIR (Xu et al. 2015).

Pour caractériser la reprise du cycle cellulaire dans ces cellules qui présentent un arrêt prolongé, nous avons à nouveau utilisé le système de microfluidique. Premièrement, nous

avons utilisé une approche génétique en utilisant des mutants déficients en adaptation, *cdc5-ad* et *tid1*Δ. Le nombre d'arrêts non terminaux dans ces cellules baisse drastiquement, en particulier les arrêts prolongés en comparaison avec les cellules de référence exprimant l'allèle *CDC5* ou *TID1* sauvage suggérant l'implication de l'adaptation dans la dynamique de sénescence.

Lors de ces expériences de microfluidique, nous avons observé que la médiane du nombre de générations en sénescence des cellules *cdc5-ad* est similaire à celle des cellules *CDC5*. Or si les arrêts non terminaux ne sont plus observés, on imagine que ces arrêts se produisent toujours mais deviennent terminaux puisque l'adaptation n'est plus une option et que la médiane du nombre de générations en serait ainsi diminuée, ce qui est d'ailleurs observé pour les cellules exprimant *tid1*Δ dont la médiane est de 22 ± 12 générations contre 30 ± 13 pour les cellules *cdc5-ad*. Afin de comprendre cette différence, j'ai d'abord vérifié que la mutation *cdc5-ad* n'interfère pas avec la longueur des télomères et le taux de raccourcissement en absence de télomérase, l'activation du checkpoint et l'arrêt du cycle cellulaire en absence de télomérase. L'avantage proliferatif des cellules *cdc5-ad* en absence de télomérase est probablement dû à une fonction de Cdc5 indépendante de l'adaptation.

J'avais également observé qu'en cultures liquides, en absence de télomérase, les cellules *cdc5-ad* semblent former des survivants post-sénescents légèrement plus tôt que les cellules exprimant l'allèle sauvage de *CDC5.* C'est pourquoi, j'ai étudié si la mutation *cdc5-ad* affecte les mécanismes de recombinaison qui pourraient favoriser la prolifération en absence de télomérase. Nous avons réalisé en collaboration avec Karine Dubrana des expériences permettent de tester la capacité de recombinaison (Batté et al. 2017; Coutelier et al. 2018). En réponse à une coupure double brin dans la région subtélomérique, il ne semble pas y avoir de différence entre les cellules *CDC5* et les cellules *cdc5-ad* ou *tid1*Δ. En parallèle, j'ai réalisé d'autres expériences cherchant à mettre en évidence cette éventuelle implication de Cdc5 dans la recombinaison homologue, cette hypothèse étant notamment appuyée par le fait qu'une étude biochimique couplée à la bioinformatique présente Rad51 comme une cible potentielle de Cdc5 (Snead et al. 2007; Yata et al. 2012). J'ai analysé l'émergence et le type de survivants que l'on peut observer ou l'apparition de jonctions télomériques en présence ou absence du facteur de recombinaison Rad51. Comme les résultats n'étaient pas toujours reproductibles, avec des effets faibles ou à la limite d'être significatifs, il est difficile de conclure sur l'implication de Cdc5 et l'impact de la mutation *cdc5-ad* dans les voies de recombinaison conduisant à l'émergence des survivants post-sénescents.

B. L'adaptation est une réponse à l'activation du checkpoint en absence de télomérase

Pour poursuivre la caractérisation des arrêts prolongés non terminaux en sénescence et démontrer la possibilité de s'adapter à un dommage télomérique en absence de télomérase, nous avons développé, en collaboration avec Serge Pelet et Karine Dubrana, un rapporteur fluorescent qui permet de distinguer entre les évènements de recovery et d'adaptation au checkpoint. Afin de réussir cette tâche, nous avons tiré parti du fait que lors de l'adaptation au checkpoint, Rad53 est déphosphorylée alors qu'en cas de recovery suite à la réparation d'un dommage, c'est l'ensemble de la voie de signalisation du checkpoint qui est inactivée. Cette affirmation est légèrement remise en cause par une étude récente (Memisoglu et al. 2019) qui montre qu'en présence d'un dommage persistant, la kinase Mec1 est progressivement autophosphorylée sur la S1964 pour atteindre le maximum de phosphorylations après 9 à 12 heures d'arrêt et cette phosphorylation est dépendante de Dpb11 et Ddc1. Ce qui permet cette phosphorylation n'est pas connu. Cette phosphorylation semble conduire à la délocalisation de Mec1 du dommage ce qui diminue sa capacité à phosphoryler ses cibles et maintenir un checkpoint robuste. Cette étude semble donc montrer qu'en réponse à une coupure double brin, Mec1 et Ddc2 sont affectées et progressivement délocalisés du dommage après un arrêt prolongé ce qui affecte aussi l'activation de Rad9 après environ 9 heures d'arrêt. Rad9 et Rad53 interagissent par le biais des domaines FHA de Rad53 lorsque Rad9 est phosphorylée. Une protéine chimère, composée du domaine FHA1 de Rad53 combiné à la protéine fluorescente mCherry, constitue le rapporteur. Le rapporteur est exprimé de manière basale dans l'ensemble de la cellule. Lorsque Rad9 est activée, le rapporteur devient significativement enrichi dans le noyau. La variation du signal de fluorescence au sein du noyau en réponse à un dommage de l'ADN permet donc de détecter l'activation de Rad9. Suite à la réparation du dommage, en phase de recovery, Rad9 est désactivée et le signal de fluorescence retourne à son niveau basal. En revanche, dans le cas de l'adaptation, le signal de fluorescence dans le noyau est toujours enrichi dans les cellules filles, suggérant que Rad9 est toujours phosphorylée. Cette différence entre notre étude et celle de (Memisoglu et al. 2019) mérite une comparaison entre les différents types de dommages. Il se peut que la phosphorylation de Mec1 et Rad9 soient régulés de manière différente en réponse à une cassure double brin induite par une endonucléase et l'activation prolongée du checkpoint en condition de dommage persistant ou en réponse à l'activation du checkpoint qui découle de l'absence de télomérase.

Néanmoins, grâce au rapporteur et à la différence de localisation induite par la phosphorylation de Rad9, nous avons pu déterminer la fréquence d'évènements d'adaptation en absence de télomérase. En effet, les arrêts non terminaux prolongés sont suivis à 80% d'un événement d'adaptation. Un événement d'adaptation est donc observé dans environ 2 à 7% des divisions cellulaires en absence de télomérase. L'adaptation au checkpoint contribue donc de manière non négligeable à la dynamique de sénescence. Cette étude est d'ailleurs la première à montrer que l'adaptation peut intervenir en réponse à un arrêt du cycle cellulaire en absence de télomérase.

C. Les conséquences des évènements d'adaptation en absence de télomérase

Afin d'évaluer l'impact de ces évènements d'adaptation sur la population de cellules, nous nous sommes intéressés à leur capacité proliférative et l'enrichissement théorique de cellules ayant subi un événement d'adaptation dans la population de cellules. Nous avons alors montré que les cellules qui se sont adaptées une première fois peuvent retrouver une capacité proliférative normale et sont suivies jusqu'à un maximum de 33 générations (ce qui représente un total de 9 milliards de cellules), avec en moyenne un nombre de cycles égale à 9. Cette capacité à retrouver un certain potentiel prolifératif normal après un ou plusieurs événements d'adaptation semble spécifique de l'absence de télomérase comme source des arrêts. Plusieurs explications sont possibles. Des facteurs de réparation différents peuvent être présents dans le cycle cellulaire suivant et ainsi réparer le télomère endommagé. Il est aussi envisageable que plusieurs évènements d'adaptation peuvent se suivre puisque les dommages télomérique ne sont pas létaux. De plus, ceci n'a jamais été montré mais si la probabilité de s'adapter est plus élevée à la suite d'un précédent événement d'adaptation, cela expliquerait les séries de plusieurs évènements d'adaptation en réponse à un dommage télomérique. Ces arrêts prolongés suivi d'adaptation en série pourraient favoriser l'apparition de réarrangements chromosomiques n'affectant pas de gène essentiel et pourraient donc ne pas affecter la survie cellulaire en soi.

L'adaptation précède l'augmentation d'instabilité génomique (Galgoczy et Toczyski 2001) et les cellules sénescentes, en particulier lorsqu'elles atteignent la phase de crise, présentent une augmentation de l'instabilité génomique (Hackett, Feldser, et Greider 2001). Elle est causée en particulier par la résection exacerbée des télomères courts (Hackett et Greider 2003; Fallet et al. 2014). La présence d'ADN simple brin conduit ensuite à la réparation par recombinaison au niveau des télomères, par la voie BIR en particulier qui est

très mutagène (Sakofsky et al. 2014). Nous nous sommes donc interrogés sur la possibilité que l'instabilité génomique en sénescence soit en partie causée par l'adaptation.

La succession d'évènements de réparation et de cassures au niveau des télomères peut engendrer de l'instabilité qui s'étend sur l'ensemble du génome et conduire à l'activation du checkpoint des dommages de l'ADN (Murnane 2006). Cette explication est cohérente avec l'observation des arrêts non terminaux successifs (Xu et al. 2015) et de l'adaptation de ces cellules. L'adaptation pourrait participer à la propagation de ces dommages et donc contribuer à l'augmentation de l'instabilité génomique en sénescence. En absence d'adaptation, le taux de mutation, en crise de sénescence, est environ deux fois inférieur au taux observé dans les cellules capables de s'adapter. L'adaptation contribue donc pour la moitié de l'augmentation de l'instabilité génomique. J'ai ensuite vérifié si l'adaptation joue un rôle en faveur d'un type ou l'autre d'instabilité génomique. J'ai répertorié pour les cellules mutantes analysées plusieurs types d'instabilité tels que des réarrangements chromosomiques, des insertions/délétions ou des mutations ponctuelles. En revanche, d'après les quelques échantillons étudiés, il ne semble pas que l'adaptation joue un rôle dans le spectre de types de mutations et réarrangements mais plutôt offre l'opportunité de transmettre et propager ces instabilités.

Si l'adaptation est un phénomène qui permet la propagation d'instabilité génomique, la question suivante se pose donc, pourquoi cette voie n'a pas été contre-sélectionnée au cours de l'évolution puisque trop préjudiciable ? Certaines cellules humaines sont aussi capables de s'adapter et la protéine Plk1, orthologue de Cdc5, est impliquée dans le mécanisme. Plusieurs études ont soulevé la question de savoir quel est l'équilibre entre le rôle anti-tumoral et pro-cancérigène de Plk1 (de Cárcer 2019). En effet, Plk1 est surexprimé dans de nombreuses tumeurs et cette augmentation est associée à un faible pronostic (Yamamoto et al. 2006). Cependant, des études sur des modèles murins de cancer ont montré que Plk1 n'est pas toujours associé au développement tumoral et peut même parfois être considéré comme anti-cancéreux (de Cárcer 2019). Une des hypothèses du rôle de l'adaptation chez les organismes multicellulaires est de promouvoir la mort cellulaire des cellules instables par d'autres mécanismes tels que l'apoptose ou la nécrose (Swift et Golsteyn 2014). En permettant la division cellulaire, le cycle suivant serait suivi d'une mort certaine dans 98% des cas. Cependant, dans le cas où certaines cellules échappent à nouveau à la mort cellulaire, l'incidence de l'instabilité génomique augmente et l'adaptation devient alors mutagène. Le même type de schéma est aussi envisagé chez la levure où l'adaptation pourrait offrir l'opportunité de réparer le dommage grâce à des voies de réparation différentes disponibles en phase G1 dans le cycle suivant par exemple ou en permettant de diluer le dommage, c'est-à-

dire que le dommage ne soit présent que dans une des cellules filles et pas dans la seconde et ainsi permettre à la lignée d'être maintenue. Si le dommage persiste à nouveau et que la cellule s'adapte, l'instabilité génomique augmente et ce phénomène peut à nouveau se répéter. Pour les micro-organismes, l'adaptation et l'instabilité génomique peuvent permettre une meilleure survie dans un environnement fluctuant et favoriser l'évolution.

La possibilité de s'adapter dans des cellules sénescentes pourrait donc expliquer les premières étapes de la tumorigenèse pendant laquelle l'instabilité génomique augmente jusqu'à ce que des mécanismes essentiels tels que la voie du checkpoint soient affectés et conduise ainsi aux différentes étapes d'immortalisation et hyper prolifération des cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg 2011). De plus, l'accumulation de cellules sénescentes avec l'âge pourrait augmenter aussi l'incidence d'évènements d'adaptation et être corrélé avec l'augmentation du risque de cancer observé avec l'augmentation de l'âge (Smetana et al. 2016).

D. La réparation par la voie BIR et l'adaptation semblent être liées en absence de télomérase

J'ai également étudié si l'adaptation et la réparation sont deux voies indépendantes ou si elles sont partiellement liées dans l'émergence de l'instabilité en sénescence. Le laboratoire avait déjà montré que la voie de réparation BIR participe à la reprise du cycle cellulaire après un arrêt non terminal (Xu et al. 2015). La voie BIR est source d'instabilité génomique, cette voie de réparation est mutagène et favorise la formation de cluster de mutations ainsi que de réarrangements chromosomiques (Smith, Llorente, et Symington 2007; Vasan et al. 2014; Sakofsky et al. 2014; Sakofsky et Malkova 2017). De plus, cette voie est impliquée dans la voie de recombinaison indépendante de Rad51 qui permet la maintenance des télomères, voie en partie dépendante de Pol32 (Lydeard et al. 2007). Les télomères raccourcis sont, de par leur structure, de bons substrats du BIR et les cassures qui surviennent dans les régions subtélomériques sont préférentiellement réparées par la voie BIR malgré la présence de séquences homologues (Batté et al. 2017). C'est pourquoi j'ai analysé les taux de mutation de souches dans lesquelles le gène *POL32* est délété et dans le double mutant *pol32 Δ cdc5-ad* au cours de la sénescence. Le taux de mutation des souches dans lesquelles *POL32* est délété diminue significativement au cours de la sénescence suggérant l'implication de la voie BIR dans l'augmentation de l'instabilité génomique en absence de télomérase.

Les résultats du double mutant *cdc5-ad pol32 Δ*, en revanche, ne montrent pas une claire additivité en comparaison avec les deux simples mutants *cdc5-ad* ou *pol32 Δ*. On pourrait donc penser que l'adaptation et la voie BIR ne sont pas totalement indépendantes. En effet, un des types de réarrangements associés avec la voie BIR sont les semi-crossovers. Ils sont le résultat de la voie BIR interrompue, en particulier lorsque les voies de synthèse de l'ADN sont compromises, et que la résolution de la structure intermédiaire de réparation est suivie par de la recombinaison (Vasan et al. 2014). De plus, la mitose est prématurée pendant la réparation par BIR à cause d'une réponse checkpoint compromise permettent aussi la formation de semi-crossovers (Vasan et al. 2014). Cette situation pourrait se produire si la reprise du cycle cellulaire due à l'adaptation a lieu avant que la réparation ne soit achevée. En effet, il n'est pas exclu que la voie de BIR et l'adaptation puissent coexister et se superposer en temps. Il a été suggéré que les structures intermédiaires conduisant aux semi-crossovers sont habituellement résolues par le complexe Mus81-Mms4. En absence de télomérase, Mus81 intervient probablement au niveau des télomères puisque la délétion de *MUS81* conduit à l'accélération de la sénescence (Fallet et al. 2014). Or Mms4 est une cible de Cdc5, ce qui pourrait constituer un lien direct entre adaptation et formation de semi-crossovers. Cependant la cinétique de phosphorylation de Mms4 n'est pas affectée chez les cellules exprimant *cdc5-ad* (Rawal et al. 2016). Cdc5 ne participe donc peut-être pas directement à la formation de ces semi-crossovers mais plutôt à leur propagation.

En conclusion, ce projet démontre que des évènements d'adaptation sont observés en réponse aux dommages télomériques causés par l'absence de télomérase et qu'en conséquence, l'instabilité génomique augmente. De plus, l'adaptation et la réparation par la voie BIR pourraient interférer l'une avec l'autre, ce qui pourrait être une source d'instabilité génomique si l'adaptation favorise la mitose alors que des intermédiaires de réparation sont toujours présents. Cette hypothèse pourrait expliquer de manière simpliste que les cellules *cdc5-ad* ont le temps de réparer puisqu'elles ne peuvent pas s'adapter, et sont donc plus stables en comparaison avec les cellules *CDC5* ce qui est suggéré également en réponse à un dommage télomérique dans des cellules *cdc13-1* (Klermund, Bender, et Luke 2014).

II. L'adaptation en réponse aux télomères dysfonctionnels.

Le rôle de Cdc5 dans les voies de progression du cycle cellulaire a été largement étudié. Cependant, son rôle en réponse aux dommages de l'ADN est moins connu et en particulier les bases moléculaires de l'adaptation. J'ai choisi d'étudier les fonctions et

régulations de Cdc5 en réponse à une dysfonction télomérique grâce au mutant thermosensible *cdc13-1* dans lequel les cellules perdent la protection des télomères, à température restrictive, et activent le checkpoint des dommages de l'ADN. Afin de comprendre les mécanismes dans lesquels Cdc5 est impliquée spécifiquement en adaptation, j'ai comparé des cellules exprimant l'allèle *CDC5* sauvage à des cellules exprimant l'allèle mutant *cdc5-ad*. Au cours de cette étude j'ai étudié plusieurs niveaux de régulation de Cdc5 afin de déterminer les régulations et substrats de Cdc5 qui pourraient être à l'origine de la reprise du cycle cellulaire.

A. Le rôle de Cdc5 aux SPB en adaptation ?

Les fonctions de Cdc5 sont, entre autres, régulées par sa localisation dans la cellule. J'ai donc cherché à savoir si la localisation de Cdc5 est affectée dans le mutant *cdc5-ad*. J'ai fusionné Cdc5 à la protéine eGFP pour étudier sa localisation en réponse à un dommage télomérique. En absence de dommage, on n'observe pas de différence de localisation entre les cellules exprimant *CDC5* ou *cdc5-ad*. En revanche, les résultats de microscopie en présence d'un dommage prolongé semblaient indiquer que les cellules *cdc5-ad* présentent un défaut dans la maintenance de la protéine au niveau des SPB suggérant que le défaut d'adaptation induit par la mutation *cdc5-ad* est corrélé à sa localisation et ses fonctions aux SPB. En revanche, ce résultat est remis en doute par l'observation que les cellules *cdc5-ad-eGFP* sont capables de s'adapter par test de formation de microcolonies et par l'étude des évènements d'adaptation en cellules uniques. Malgré ce résultat invalidé par la souche, il conforte l'implication du PBD de Cdc5 dans l'adaptation et déstabiliser la partie C-terminale de Cdc5 semble altérer ses capacités d'adaptation de manière négative ou positive. Nous proposons que la mutation ponctuelle L251W pourrait affecter subtilement la conformation de la protéine, conformation qui serait restaurée avec la fusion eGFP. Il est important de noter que la fusion de Cdc5-ad avec l'étiquette 3HA ne permet pas aux cellules de s'adapter. Une autre hypothèse pour expliquer la capacité d'adaptation des cellules exprimant Cdc5-ad-eGFP pourrait être que la fusion de Cdc5-ad avec la eGFP stabilise la protéine et augmenterait sa quantité totale. La stabilité de la protéine pourrait être vérifiée par western blot, ce que j'ai tenté de faire mais des problèmes techniques liés aux anticorps ne m'ont pas permis de conclure. La quantité de protéine pourrait être mesurée par d'autres moyens, par fluorescence en cytométrie en flux par exemple. L'adaptation est donc dépendante de l'activité du PBD mais aussi peut-être de l'intégrité de sa conformation, ce qui est en adéquation avec l'étude du mutant *cdc5-16* (Ratsima et al. 2011; Ratsima et al. 2016). Cet allèle contient 3 mutations

ponctuelles dont deux dans le PBD et est déficient en adaptation. Le défaut des cellules exprimant cet allèle peut être supprimé si Cdc5 est ciblée aux SPB par le biais de la fusion avec un peptide de localisation aux SPB de la protéine Bbp1. J'ai testé la même construction adaptée à la souche *cdc5-ad*. Cette construction restaure partiellement le phénotype d'adaptation des cellules *cdc5-ad* et environ un tiers des cellules sont capables de s'adapter ce qui suggère que la mutation *cdc5-ad* confère peut-être un défaut de localisation. Chez les cellules *CDC5-bbp1*, la capacité d'adaptation est quelque peu altérée mais pour une sous-partie des cellules qui s'adaptent, la cinétique d'adaptation semble accélérée. Cela suggère que l'adaptation est un processus complexe où Cdc5 affecte de multiples voies. Une expérience de complémentation hétérologue effectuée par Zhou Xu soutient cette hypothèse (cf. annexe II). Dans des cellules diploïdes homozygotes pour *cdc13-1*, des combinaisons deux à deux de différents allèles de *CDC5* (*CDC5, cdc5-ad, cdc5-16* et *cdc5-ad-16* présentant à la fois les 3 mutation de *cdc5-16* et L251W) ont permis de montrer que le défaut d'adaptation de cdc5-ad est complémenté par cdc5-16 et vice versa, suggérant que ces deux mutants ne sont pas affectés dans les mêmes voies, malgré une implication des SPB dans les deux cas.

B. La fonction de Cdc5 en sortie de mitose est nécessaire mais pas suffisante à l'adaptation

Comme une fonction de Cdc5 au niveau des SPB semble nécessaire à l'adaptation, j'ai analysé la capacité de cellules *cdc5-ad bfa1Δ* à s'adapter. Cette fonction a plusieurs fois été analysée dans le passé (Valerio-Santiago, de Los Santos-Velázquez, et Monje-Casas 2013; F. Liang et Wang 2007; Hu et al. 2001; Hery Ratsima et al. 2016). Cependant Bfa1 étant un acteur majeur favorisant l'arrêt du cycle cellulaire, je souhaitais vérifier que les cellules *bfa1Δ* sont capables de provoquer l'arrêt du cycle cellulaire sous l'induction du checkpoint, ce qui est possible d'observer de manière particulièrement précise grâce au système de microfluidique. Les cellules *bfa1Δ* s'arrêtent effectivement en G2/M en réponse à un dommage télomérique et les premiers évènements d'adaptation sont observés après 2 heures d'arrêt mais sont néanmoins de véritables arrêts. Au cours de l'analyse en cellules uniques, la présence de la délétion *bfa1Δ* semble, comme pour la construction *bbp1*, contraindre partiellement la capacité d'adaptation des cellules *CDC5* indiquant à nouveau que l'adaptation est un mécanisme complexe et semble nécessiter plusieurs niveaux de régulation. Lors de cette expérience, les cellules *cdc5-ad bfa1Δ* ne perdent que très partiellement leur défaut d'adaptation. Cela suggère que rétablir la capacité à sortir de la mitose ne soit pas la

seule fonction nécessaire à la reprise du cycle pour les cellules *cdc5-ad* indiquant que l'adaptation semble nécessiter au moins une fonction supplémentaire de Cdc5. Ce qui est cohérent avec d'autres études montrant que Cdc5 peut promouvoir l'adaptation de façon partiellement indépendante de la phosphorylation de Bfa1 (Hu et al. 2001; Valerio-Santiago, de Los Santos-Velázquez, et Monje-Casas 2013; Ratsima et al. 2016).

C. L'expression et les modifications post-traductionnelles de Cdc5 en réponse à un dommage télomérique

La localisation de Cdc5 dans la cellule au cours du cycle est régulée mais son expression l'est aussi. De plus, lorsque Cdc5 est surexprimée, l'adaptation est accélérée (Vidanes et al. 2010). J'ai donc étudié la régulation de la quantité de Cdc5 en réponse à un dommage télomérique permanent et à l'arrêt prolongé qui en découle. Cette analyse a montré qu'en réponse au dommage, la quantité de Cdc5, en population, diminue au cours de l'arrêt. Auparavant, il avait été montré qu'en réponse à un dommage télomérique dans les cellules *cdc13-1*, la quantité de Cdc5 est inchangée mais une baisse de l'activité kinase de Cdc5 est observée (Zhang et al. 2009). Au contraire, une autre étude a montré que la quantité de Cdc5 n'est pas modifiée dans les cellules *cdc13-1* mais l'activité kinase augmente (Cheng, Hunke, et Hardy 1998). En revanche, mes résultats sont en adéquation avec les études sur cellules humaines où la quantité de Plk1 est diminuée en réponse à divers types de dommages de l'ADN (van Vugt et al. 2001; Smits et al. 2000). Néanmoins, la diminution est contre intuitive si l'on imagine que la quantité de Cdc5 doit augmenter pour permettre l'adaptation mais peut s'expliquer par le fait que la cinétique d'adaptation est très variable entre cellules.

On remarque aussi que lorsque la protéine mutante Cdc5-ad est présente dans les cellules, elle est hyper-phosphorylée en comparaison avec la protéine de référence. Plusieurs sites de phosphorylation déjà connus ont été identifiés par spectrométrie de masse dans les deux génotypes. En revanche, trois sites de phosphorylation ne sont apparus que pour la protéine Cdc5-ad en réponse au dommage télomérique. Ces phosphorylations peuvent apparaître pour plusieurs raisons. Soit ce sont des phosphorylations affectant aussi la protéine sauvage mais qui sont transitoires et donc rarement observées soit elles sont spécifiques de Cdc5-ad. Ces phosphorylations pourraient être maintenues/apparaître si l'interaction de Cdc5-ad avec une kinase ou phosphatase est favorisée ou affectée ou pour des problèmes de cinétique ou de localisation qui empêchent par exemple l'interaction de Cdc5 avec un de ses substrats. Il serait intéressant de muter ces sites de phosphorylation et de les introduire dans la

protéine sauvage ou mutée afin d'identifier si ces phosphorylations sont impliquées dans l'adaptation ou si c'est une conséquence du défaut d'adaptation.

D. Régulation transcriptionnelle de Cdc5 en réponse à un dommage télomérique

En réponse à un dommage de l'ADN, l'activation de Rad53 conduit à l'inhibition du complexe facteur de transcription Fkh2/Mcm1/Ndd1. Rad53 phosphoryle le cofacteur Ndd1 ce qui empêche l'interaction avec le facteur de transcription Fkh2 ce qui inhibe son activité (Yelamanchi et al. 2014; Edenberg et al. 2014). Fkh2 stimule la transcription d'un cluster de gènes mitotiques appelé cluster *CLB2*, dont fait partie le gène *CDC5*. Leur inhibition favorise le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire. Puisque j'ai observé que la quantité de Cdc5 diminue après induction de dommages télomériques et que cette régulation est dépendante de la régulation de Ndd1 par Rad53, j'ai ensuite analysé si, en l'absence de cette régulation, la cinétique d'adaptation est affectée. J'ai montré par deux méthodes que lorsque la diminution de Cdc5 n'est pas maintenue, le défaut d'adaptation des cellules *cdc5-ad* est totalement aboli puisque l'on peut observer entre 70 et 80% de cellules adaptées. De plus, pour les deux allèles de Cdc5, l'adaptation est accélérée d'environ 6 heures. La régulation de l'expression de Cdc5 joue un rôle dans la possibilité et la cinétique d'adaptation. En ce qui concerne Cdc5-ad, la capacité d'adaptation conférée par *ndd1-10A* suggère que la déficience en adaptation de *cdc5-ad* pourrait être due à une trop faible expression de cet allèle en condition de dommage à l'ADN. On sait d'ailleurs que la surexpression de Cdc5 accélère l'adaptation (Vidanes et al. 2010), ce qui est confirmé par l'analyse des expériences de microfluidique avec les cellules *CDC5 leu2 ::NDD1-10A*. Cependant, dans les conditions du mutant *NDD1-10A*, on ne peut pas écarter la possibilité que l'accélération de l'adaptation et la suppression du défaut d'adaptation des cellules *cdc5-ad* soit dû à l'augmentation de l'expression de l'ensemble des gènes pro-mitotiques du cluster *CLB2* et non pas spécifiquement de *CDC5*. C'est pourquoi il serait intéressant de surexprimer *cdc5-ad* et d'analyser l'adaptation pour tester cette hypothèse.

La reprise du cycle cellulaire permettant l'adaptation peut-être favorisée par le maintien de l'expression de plusieurs facteurs mitotiques qui sont sous la régulation de Fkh2. Même si d'après les expériences sur cellules uniques, les cellules semblent s'arrêter sous l'effet du checkpoint deux heures après l'induction du dommage, le checkpoint pourrait être affaibli par cette construction. Il serait intéressant de comparer ces cellules dans ce système à des cellules dans lesquelles le checkpoint est compromis, par une délétion de *RAD9* par

exemple. Néanmoins, ces expériences suggèrent que la régulation de Cdc5, en favorisant son expression en cellule unique peut promouvoir la reprise du cycle cellulaire par l'adaptation. Or le cofacteur Ndd1 est aussi la cible de Cdc5. En effet, Cdc5 phosphoryle Ndd1 sur la sérine 85 ce qui permet de promouvoir l'interaction avec Fkh2 et donc l'expression des gènes du cluster *CLB2* (Darieva et al. 2006). Cette boucle de rétroaction positive est impliquée dans le déroulement d'un cycle cellulaire normal. J'ai émis l'hypothèse que cette boucle puisse être utilisée en réponse à un dommage de l'ADN persistant afin de promouvoir l'adaptation. L'introduction dans une seconde copie d'un allèle muté *ndd1-S85E* n'a pas permis de restaurer la capacité d'adaptation dans les cellules *cdc5-ad*. Ces premiers résultats suggèrent que cette boucle de rétroaction n'est pas impliquée dans l'éventuelle augmentation de l'expression de Cdc5 afin de permettre l'adaptation. Cependant, le statut de phospho-mimétique recherché par le biais du mutant Ndd1-S85E n'est peut-être pas fonctionnel et de plus, la présence d'une seconde copie de *NDD1* semble affecter les cellules. Une souche qui n'a pas encore testée pour laquelle la Ser85 est remplacée par une alanine a été construite. Ces deux constructions couplées à la dégradation inductible de la protéine endogène permettront de montrer si la phosphorylation de Ndd1 par Cdc5 est impliquée dans le mécanisme d'adaptation.

E. Cdc5 est régulée à plusieurs niveaux afin de promouvoir l'adaptation

L'ensemble de ces résultats suggère une régulation complexe de Cdc5 à différents niveaux afin de permettre l'adaptation ainsi qu'un phénomène multi-étapes avec la contribution de différents acteurs en réponse à un dommage télomérique. Le modèle proposé est que la déphosphorylation de Rad53, par un mécanisme encore inconnu, lève l'inhibition sur Cdc5, et permet ainsi de favoriser la sortie de mitose entre autres par inhibition de Bfa1, reprise de l'activation de l'expression de *CDC5* par le biais de Fkh2/Mcm1/Ndd1 et le maintien de la localisation aux SPB. Lorsqu'un de ces 3 niveaux de régulation est affecté les cellules *cdc5-ad* peuvent partiellement ou totalement s'adapter.

La fonction que la mutation *cdc5-ad* affecte est peut être liée à la fonction qui permet d'enclencher l'affaiblissement du checkpoint et conduire à la déphosphorylation de Rad53 en réponse à un dommage de l'ADN persistant sur plusieurs heures si Cdc5 en est la cause. Cdc5 n'affecte pas l'interaction Rad53-Rad9 mais phosphoryle Sae2 qui peut déstabiliser cette interaction et la déphosphorylation de Rad53 en adaptation est indépendante de Ptc2 et Ptc3 (Vidanes et al. 2010; Colombo et al. 2019). Rad53 et Cdc5 pourraient interagir par le biais du domaine FHA1 de Rad53 selon Vidanes et al, 2010, et ils proposent que cette interaction offre

l'opportunité pour ces deux kinases de s'inhiber l'une ou l'autre. De plus, (Schleker et al. 2010) ont montré que Rad53 est phosphorylée au cours du cycle par Cdc28 et Cdc5. Tout récemment, comme énoncé plus haut dans la discussion, il a été montré que Mec1 s'autophosphoryle progressivement pour atteindre un maximum entre 9 et 12 heures après l'induction du dommage, cinétique qui correspond à la cinétique d'adaptation. Lorsque ce site de phosphorylation est muté, les cellules ne sont pas capables de recovery ou d'adaptation. Cette phosphorylation entraîne la dissociation de Mec1 du dommage et donc affaiblit la robustesse du checkpoint. Cela pourrait expliquer que la force du checkpoint diminue avec le temps d'arrêt du cycle cellulaire et permet donc d'ouvrir une fenêtre d'opportunité pour l'adaptation. Cependant cette phosphorylation a été démontrée en réponse à une cassure double brin et il serait intéressant de vérifier si c'est une réponse généralisée à tous les types de dommages et si la capacité de s'adapter des cellules *cdc5-ad* est affectée en présence de mutants de ce site de phosphorylation. Néanmoins, malgré de nouvelles indications sur la régulation des acteurs du checkpoint et de Cdc5 qui peuvent favoriser la survenue de l'adaptation, le plus grand mystère reste de savoir quel est l'élément déclencheur de l'adaptation qui permet de reprendre le cycle cellulaire en présence d'un dommage. Nous pourrons peut-être obtenir d'avantage de renseignements grâce aux expériences en cellules uniques. En effet, ces films contiennent un certain nombre d'informations qui n'ont pas encore été exploitées, comme par exemple la probabilité de faire un deuxième évènement d'adaptation en fonction du temps d'arrêt ou l'analyse de différents phénotypes que j'ai parfois observés lors des expériences de microfluidique mais dont l'analyse poussée n'a pas encore été réalisée.

CONCLUSION

Au cours de ces 3 ans de thèse, j'ai participé à la démonstration de la possibilité des cellules sénescentes de s'adapter en réponse à un arrêt prolongé du cycle cellulaire induit par l'activation du checkpoint en absence de télomérase. Cette découverte a été permise grâce à un système de microfluifluidique couplé à microscopie à fluorescence ce qui appuie l'importance d'étudier certains processus en cellules uniques pour mettre en évidence certains phénomènes hétérogènes parfois rares mais qui peuvent avoir des conséquences visibles en population. C'est le cas pour l'adaptation en sénescence. Moins de 10% des cellules s'adaptent en absence de télomérase. Cependant, l'adaptation est responsable de la moitié de l'augmentation de l'instabilité génomique en population. C'est pourquoi, nous avons maintenu cette stratégie d'étude en cellules uniques pour étudier les bases moléculaires de Cdc5 dans l'adaptation en réponse à un dommage télomérique.

L'adaptation est un phénomène complexe. Cdc5 semble régulée à plusieurs niveaux afin de permettre le déroulement du processus d'adaptation. Sa localisation, notamment aux SPB, semble primordiale mais la cinétique par laquelle elle est amenée à son potentiel substrat aux SPB semble également importante. Ensuite, la régulation par le cofacteur de transcription Ndd1 pourrait être impliquée dans la promotion de l'adaptation. Enfin, la protéine mutée Cdc5-ad possède des phosphorylations qui ne sont pas retrouvées sur la protéine sauvage Cdc5 en réponse à un dommage télomérique et il serait donc intéressant d'étudier si ces modifications sont impliquées dans l'adaptation.

Plus généralement, cette thèse m'a permis de réaliser la complexité des mécanismes qui régissent le cycle cellulaire, la sénescence et la voie de détection et réparation des dommages en comparaison aux cours un peu simplistes que l'on enseigne à l'université. Mais c'est ce qui m'a particulièrement plu et motivée au cours de ces 3 ans. Le défi de comprendre un mécanisme aussi hétérogène que l'adaptation et une protéine fascinante qu'est Cdc5 fut particulièrement enrichissant et gratifiant. J'espère que je verrai le jour où le mécanisme de l'adaptation, ou tout du moins une partie, sera résolu et je souhaite à Jeanne, qui prend la suite de ce projet, autant de plaisir et de surprises que j'ai pu avoir en travaillant sur ce sujet.

Enfin, la thèse fut pour moi une expérience particulière dont je garderai un souvenir phénoménal. Jamais je n'aurais pensé ressentir un tel panel d'émotions pendant ces 3 ans mais c'est ce qui en fait une expérience unique, scientifiquement bien sûr mais aussi pour tous les aspects transverses tels que les compétences que j'ai pu développer et les relations établies

avec mon entourage à l'institut ou avec les personnes travaillant dans le même domaine lors des congrès.

BIBLIOGRAPHIE

Abdallah, Pauline, Pierre Luciano, Kurt W. Runge, Michael Lisby, Vincent Géli, Eric Gilson, et M. Teresa Teixeira. 2009. « A Two-Step Model for Senescence Triggered by a Single Critically Short Telomere ». *Nature Cell Biology* 11 (8): 988-93. https://doi.org/10.1038/ncb1911.

Agarwal, Ritu, Zhanyun Tang, Hongtao Yu, et Orna Cohen-Fix. 2003. « Two Distinct Pathways for Inhibiting Pds1 Ubiquitination in Response to DNA Damage ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 45027-33. https://doi.org/10.1074/jbc.M306783200.

Alexandru, G., F. Uhlmann, K. Mechtler, M. A. Poupart, et K. Nasmyth. 2001. « Phosphorylation of the Cohesin Subunit Scc1 by Polo/Cdc5 Kinase Regulates Sister Chromatid Separation in Yeast ». *Cell* 105 (4): 459-72.

Armanios, Mary, et Elizabeth H. Blackburn. 2012. « The Telomere Syndromes ». *Nature Reviews. Genetics* 13 (10): 693-704. https://doi.org/10.1038/nrg3246.

Arnold, Lea, Sebastian Höckner, et Wolfgang Seufert. 2015. « Insights into the Cellular Mechanism of the Yeast Ubiquitin Ligase APC/C-Cdh1 from the Analysis of in Vivo Degrons ». *Molecular Biology of the Cell* 26 (5): 843-58. https://doi.org/10.1091/mbc.E14-09-1342.

Asano, Satoshi, Jung-Eun Park, Krisada Sakchaisri, Li-Rong Yu, Sukgil Song, Porntip Supavilai, Timothy D. Veenstra, et Kyung S. Lee. 2005. « Concerted Mechanism of Swe1/Wee1 Regulation by Multiple Kinases in Budding Yeast ». *The EMBO Journal* 24 (12): 2194-2204. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600683.

Atkins, Benjamin D., Satoshi Yoshida, Koji Saito, Chi-Fang Wu, Daniel J. Lew, et David Pellman. 2013. « Inhibition of Cdc42 during Mitotic Exit Is Required for Cytokinesis ». *The Journal of Cell Biology* 202 (2): 231-40. https://doi.org/10.1083/jcb.201301090.

Attner, Michelle A., Matthew P. Miller, Ly-sha Ee, Sheryl K. Elkin, et Angelika Amon. 2013. « Polo Kinase Cdc5 Is a Central Regulator of Meiosis I ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (35): 14278-83. https://doi.org/10.1073/pnas.1311845110.

Bardin, A. J., et A. Amon. 2001. « Men and Sin: What's the Difference? » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (11): 815-26. https://doi.org/10.1038/35099020.

Bartkova, Jirina, Zuzana Hořejší, Karen Koed, Alwin Krämer, Frederic Tort, Karsten Zieger, Per Guldberg, et al. 2005. « DNA Damage Response as a Candidate Anti-Cancer Barrier in Early Human Tumorigenesis ». *Nature* 434 (7035): 864-70. https://doi.org/10.1038/nature03482.

Batté, Amandine, Clémentine Brocas, Hélène Bordelet, Antoine Hocher, Myriam Ruault, Adouda Adjiri, Angela Taddei, et Karine Dubrana. 2017. « Recombination at Subtelomeres Is Regulated by Physical Distance, Double-Strand Break Resection and Chromatin Status ». *The EMBO Journal* 36 (17): 2609-25. https://doi.org/10.15252/embj.201796631.

Bauer, Nicholas C., Anita H. Corbett, et Paul W. Doetsch. 2015. « The current state of eukaryotic DNA base damage and repair ». *Nucleic Acids Research* 43 (21): 10083-101. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1136.

Benanti, Jennifer A. 2016. « Create, Activate, Destroy, Repeat: Cdk1 Controls Proliferation by Limiting Transcription Factor Activity ». *Current Genetics* 62 (2): 271-76. https://doi.org/10.1007/s00294-015-0535-5.

Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner, et W. E. Wright. 1998. « Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 279 (5349): 349-52. https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349.

Boiteux, Serge, et Sue Jinks-Robertson. 2013. « DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in Saccharomyces Cerevisiae ». *Genetics* 193 (4): 1025-64. https://doi.org/10.1534/genetics.112.145219.

Booth, Claire, Elen Griffith, Gerard Brady, et David Lydall. 2001. « Quantitative amplification of single-stranded DNA (QAOS) demonstrates that cdc13-1 mutants generate ssDNA in a telomere to centromere direction ». *Nucleic Acids Research* 29 (21): 4414-22.

Botchkarev, Vladimir V., Mikael V. Garabedian, Brenda Lemos, Eric Paulissen, et James E. Haber. 2017. « The Budding Yeast Polo-like Kinase Localizes to Distinct Populations at Centrosomes during Mitosis ». Édité par Orna Cohen-Fix. *Molecular Biology of the Cell* 28 (8): 1011-20. https://doi.org/10.1091/mbc.e16-05-0324.

Botchkarev, Vladimir V., et James E. Haber. 2018. « Functions and Regulation of the Polo-like Kinase Cdc5 in the Absence and Presence of DNA Damage ». *Current Genetics* 64 (1): 87-96. https://doi.org/10.1007/s00294-017-0727-2.

Boulton, S. J., et S. P. Jackson. 1996a. « Saccharomyces Cerevisiae Ku70 Potentiates Illegitimate DNA Double-Strand Break Repair and Serves as a Barrier to Error-Prone DNA Repair Pathways ». *The EMBO Journal* 15 (18): 5093-5103.

———. 1996b. « Identification of a Saccharomyces Cerevisiae Ku80 Homologue: Roles in DNA Double Strand Break Rejoining and in Telomeric Maintenance ». *Nucleic Acids Research* 24 (23): 4639-48. https://doi.org/10.1093/nar/24.23.4639.

Bourgeron, Thibault, Zhou Xu, Marie Doumic, et Maria Teresa Teixeira. 2015. « The

Asymmetry of Telomere Replication Contributes to Replicative Senescence Heterogeneity ». *Scientific Reports* 5 (octobre): 15326. https://doi.org/10.1038/srep15326.

Bruinsma, W., M. Aprelia, I. García-Santisteban, J. Kool, Y. J. Xu, et R. H. Medema. 2017. « Inhibition of Polo-like Kinase 1 during the DNA Damage Response Is Mediated through Loss of Aurora A Recruitment by Bora ». *Oncogene* 36 (13): 1840-48. https://doi.org/10.1038/onc.2016.347.

Bruinsma, Wytse, Jonne A. Raaijmakers, et René H. Medema. 2012. « Switching Polo-like Kinase-1 on and off in Time and Space ». *Trends in Biochemical Sciences* 37 (12): 534-42. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.09.005.

Burkard, Mark E., Catherine L. Randall, Stéphane Larochelle, Chao Zhang, Kevan M. Shokat, Robert P. Fisher, et Prasad V. Jallepalli. 2007. « Chemical Genetics Reveals the Requirement for Polo-like Kinase 1 Activity in Positioning RhoA and Triggering Cytokinesis in Human Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (11): 4383-88. https://doi.org/10.1073/pnas.0701140104.

Byrd, Alicia K., et Kevin D. Raney. 2017. « Structure and Function of Pif1 Helicase ». *Biochemical Society Transactions* 45 (5): 1159-71. https://doi.org/10.1042/BST20170096.

Cairns, B. R., Y. Lorch, Y. Li, M. Zhang, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Du, B. Laurent, et R. D. Kornberg. 1996. « RSC, an Essential, Abundant Chromatin-Remodeling Complex ». *Cell* 87 (7): 1249-60. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81820-6.

Campisi, Judith, et Fabrizio d'Adda di Fagagna. 2007. « Cellular Senescence: When Bad Things Happen to Good Cells ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (9): 729-40. https://doi.org/10.1038/nrm2233.

Cannavo, Elda, et Petr Cejka. 2014. « Sae2 Promotes DsDNA Endonuclease Activity within Mre11–Rad50–Xrs2 to Resect DNA Breaks ». *Nature* 514 (7520): 122-25. https://doi.org/10.1038/nature13771.

Cannavo, Elda, Petr Cejka, et Stephen C. Kowalczykowski. 2013. « Relationship of DNA Degradation by Saccharomyces Cerevisiae Exonuclease 1 and Its Stimulation by RPA and Mre11-Rad50-Xrs2 to DNA End Resection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (18): E1661-1668. https://doi.org/10.1073/pnas.1305166110.

Carballo, Jesús A., Juana Pincheira, et Consuelo de la Torre. 2006. « The G2 Checkpoint Activated by DNA Damage Does Not Prevent Genome Instability in Plant Cells ». *Biological Research* 39 (2): 331-40. https://doi.org/10.4067/s0716-97602006000200015.

Cárcer, Guillermo de. 2019. « The Mitotic Cancer Target Polo-Like Kinase 1: Oncogene or Tumor Suppressor? » *Genes* 10 (3). https://doi.org/10.3390/genes10030208.

Casjens, S., M. Murphy, M. DeLange, L. Sampson, R. van Vugt, et W. M. Huang. 1997. « Telomeres of the Linear Chromosomes of Lyme Disease Spirochaetes: Nucleotide Sequence and Possible Exchange with Linear Plasmid Telomeres ». *Molecular Microbiology* 26 (3): 581-96.

Chambers, Anna L., Peter M. Brownlee, Samuel C. Durley, Tracey Beacham, Nicholas A. Kent, et Jessica A. Downs. 2012. « The Two Different Isoforms of the RSC Chromatin Remodeling Complex Play Distinct Roles in DNA Damage Responses ». *PloS One* 7 (2): e32016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032016.

Chan, C. S., et B. K. Tye. 1983. « A Family of Saccharomyces Cerevisiae Repetitive Autonomously Replicating Sequences That Have Very Similar Genomic Environments ». *Journal of Molecular Biology* 168 (3): 505-23.

Charles, J. F., S. L. Jaspersen, R. L. Tinker-Kulberg, L. Hwang, A. Szidon, et D. O. Morgan. 1998. « The Polo-Related Kinase Cdc5 Activates and Is Destroyed by the Mitotic Cyclin Destruction Machinery in S. Cerevisiae ». *Current Biology: CB* 8 (9): 497-507.

Chatterjee, Nimrat, et Graham C. Walker. 2017. « Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58 (5): 235-63. https://doi.org/10.1002/em.22087.

Chen, Jingyang, et JoAnne Stubbe. 2005. « Bleomycins: Towards Better Therapeutics ». *Nature Reviews. Cancer* 5 (2): 102-12. https://doi.org/10.1038/nrc1547.

Chen, Q., A. Ijpma, et C. W. Greider. 2001. « Two Survivor Pathways That Allow Growth in the Absence of Telomerase Are Generated by Distinct Telomere Recombination Events ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (5): 1819-27. https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1819-1827.2001.

Cheng, L., L. Hunke, et C. F. Hardy. 1998. « Cell Cycle Regulation of the Saccharomyces Cerevisiae Polo-like Kinase Cdc5p ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (12): 7360-70. https://doi.org/10.1128/mcb.18.12.7360.

Churikov, Dmitri, Ferose Charifi, Marie-Noëlle Simon, et Vincent Géli. 2014. « Rad59-Facilitated Acquisition of Y' Elements by Short Telomeres Delays the Onset of Senescence ». *PLoS Genetics* 10 (11): e1004736. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004736.

Clerici, Michela, Davide Mantiero, Giovanna Lucchini, et Maria Pia Longhese. 2006. « The Saccharomyces Cerevisiae Sae2 Protein Negatively Regulates DNA Damage Checkpoint Signalling ». *EMBO Reports* 7 (2): 212-18.

https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400593.

Clyne, Rosemary K., Vittorio L. Katis, Lea Jessop, Kirsten R. Benjamin, Ira Herskowitz, Michael Lichten, et Kim Nasmyth. 2003. « Polo-like Kinase Cdc5 Promotes Chiasmata Formation and Cosegregation of Sister Centromeres at Meiosis I ». *Nature Cell Biology* 5 (5): 480-85. https://doi.org/10.1038/ncb977.

Cohen-Fix, O., et D. Koshland. 1997. « The Anaphase Inhibitor of Saccharomyces Cerevisiae Pds1p Is a Target of the DNA Damage Checkpoint Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (26): 14361-66. https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14361.

Cohen-Fix, O., J. M. Peters, M. W. Kirschner, et D. Koshland. 1996. « Anaphase Initiation in Saccharomyces Cerevisiae Is Controlled by the APC-Dependent Degradation of the Anaphase Inhibitor Pds1p ». *Genes & Development* 10 (24): 3081-93. https://doi.org/10.1101/gad.10.24.3081.

Colicino, Erica G., Alice M. Garrastegui, Judy Freshour, Peu Santra, Dawn E. Post, Leszek Kotula, et Heidi Hehnly. 2018. « Gravin Regulates Centrosome Function through PLK1 ». *Molecular Biology of the Cell* 29 (5): 532-41. https://doi.org/10.1091/mbc.E17-08-0524.

Colicino, Erica G., et Heidi Hehnly. 2018. « Regulating a Key Mitotic Regulator, Polo-like Kinase 1 (PLK1) ». *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 75 (11): 481-94. https://doi.org/10.1002/cm.21504.

Colombo, Chiara Vittoria, Luca Menin, Riccardo Ranieri, Diego Bonetti, Michela Clerici, et Maria Pia Longhese. 2019. « Uncoupling Sae2 Functions in Downregulation of Tel1 and Rad53 Signaling Activities ». *Genetics* 211 (2): 515-30. https://doi.org/10.1534/genetics.118.301830.

Coutelier, Héloïse, et Zhou Xu. 2019. « Adaptation in Replicative Senescence: A Risky Business ». *Current Genetics* 65 (3): 711-16. https://doi.org/10.1007/s00294-019-00933-7.

Coutelier, Héloïse, Zhou Xu, Mony Chenda Morisse, Maoussi Lhuillier-Akakpo, Serge Pelet, Gilles Charvin, Karine Dubrana, et Maria Teresa Teixeira. 2018. « Adaptation to DNA Damage Checkpoint in Senescent Telomerase-Negative Cells Promotes Genome Instability ». *Genes & Development* 32 (23-24): 1499-1513. https://doi.org/10.1101/gad.318485.118.

Crasta, Karen, Neil J. Ganem, Regina Dagher, Alexandra B. Lantermann, Elena V. Ivanova, Yunfeng Pan, Luigi Nezi, Alexei Protopopov, Dipanjan Chowdhury, et David Pellman. 2012. « DNA Breaks and Chromosome Pulverization from Errors in Mitosis ».

Nature 482 (7383): 53-58. https://doi.org/10.1038/nature10802.

Daley, James M., Phillip L. Palmbos, Dongliang Wu, et Thomas E. Wilson. 2005. « Nonhomologous End Joining in Yeast ». *Annual Review of Genetics* 39: 431-51. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.113340.

D'Amours, Damien, et Angelika Amon. 2004. « At the Interface between Signaling and Executing Anaphase--Cdc14 and the FEAR Network ». *Genes & Development* 18 (21): 2581-95. https://doi.org/10.1101/gad.1247304.

Darieva, Zoulfia, Richard Bulmer, Aline Pic-Taylor, Kathryn S. Doris, Marco Geymonat, Steven G. Sedgwick, Brian A. Morgan, et Andrew D. Sharrocks. 2006. « Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by targeting a coactivator protein ». *Nature* 444 (novembre): 494.

Darieva, Zoulfia, Aline Pic-Taylor, Joanna Boros, Adonis Spanos, Marco Geymonat, Richard J. Reece, Steven G. Sedgwick, Andrew D. Sharrocks, et Brian A. Morgan. 2003. « Cell Cycle-Regulated Transcription through the FHA Domain of Fkh2p and the Coactivator Ndd1p ». *Current Biology: CB* 13 (19): 1740-45.

Dewar, James M., et David Lydall. 2012. « Similarities and Differences between "Uncapped" Telomeres and DNA Double-Strand Breaks ». *Chromosoma* 121 (2): 117-30. https://doi.org/10.1007/s00412-011-0357-2.

Dias, Vera, Eunsung Junn, et M. Maral Mouradian. 2013. « The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease ». *Journal of Parkinson's Disease* 3 (4): 461-91. https://doi.org/10.3233/JPD-130230.

Donnianni, Roberto Antonio, Matteo Ferrari, Federico Lazzaro, Michela Clerici, Benjamin Tamilselvan Nachimuthu, Paolo Plevani, Marco Muzi-Falconi, et Achille Pellicioli. 2010. « Elevated Levels of the Polo Kinase Cdc5 Override the Mec1/ATR Checkpoint in Budding Yeast by Acting at Different Steps of the Signaling Pathway ». *PLoS Genetics* 6 (1): e1000763. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000763.

Dotiwala, F., J. Haase, A. Arbel-Eden, K. Bloom, et J. E. Haber. 2007. « The Yeast DNA Damage Checkpoint Proteins Control a Cytoplasmic Response to DNA Damage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (27): 11358-63. https://doi.org/10.1073/pnas.0609636104.

Durocher, D., J. Henckel, A. R. Fersht, et S. P. Jackson. 1999. « The FHA Domain Is a Modular Phosphopeptide Recognition Motif ». *Molecular Cell* 4 (3): 387-94.

Durocher, D., I. A. Taylor, D. Sarbassova, L. F. Haire, S. L. Westcott, S. P. Jackson, S. J. Smerdon, et M. B. Yaffe. 2000. « The Molecular Basis of FHA Domain:Phosphopeptide Binding Specificity and Implications for Phospho-Dependent Signaling Mechanisms ».

Molecular Cell 6 (5): 1169-82.

Eapen, Vinay V., Neal Sugawara, Michael Tsabar, Wei-Hua Wu, et James E. Haber. 2012. « The Saccharomyces Cerevisiae Chromatin Remodeler Fun30 Regulates DNA End Resection and Checkpoint Deactivation ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (22): 4727-40. https://doi.org/10.1128/MCB.00566-12.

Eberhard, Stephan, Sona Valuchova, Julie Ravat, Jaroslav Fulneček, Pascale Jolivet, Sandrine Bujaldon, Stéphane D. Lemaire, et al. 2019. « Molecular Characterization of Chlamydomonas Reinhardtii Telomeres and Telomerase Mutants ». *Life Science Alliance* 2 (3). https://doi.org/10.26508/lsa.201900315.

Edenberg, Ellen R., Ajay Vashisht, Jennifer A. Benanti, James Wohlschlegel, et David P. Toczyski. 2014. « Rad53 Downregulates Mitotic Gene Transcription by Inhibiting the Transcriptional Activator Ndd1 ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (4): 725-38. https://doi.org/10.1128/MCB.01056-13.

Elia, Andrew E. H., Peter Rellos, Lesley F. Haire, Jerry W. Chao, Frank J. Ivins, Katja Hoepker, Duaa Mohammad, Lewis C. Cantley, Stephen J. Smerdon, et Michael B. Yaffe. 2003. « The Molecular Basis for Phosphodependent Substrate Targeting and Regulation of Plks by the Polo-Box Domain ». *Cell* 115 (1): 83-95. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00725-6.

Elserafy, Menattallah, Mirela Šarić, Annett Neuner, Tien-chen Lin, Wanlu Zhang, Christian Seybold, Lavanya Sivashanmugam, et Elmar Schiebel. 2014. « Molecular Mechanisms That Restrict Yeast Centrosome Duplication to One Event per Cell Cycle ». *Current Biology: CB* 24 (13): 1456-66. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.032.

Emerson, Charlene H., et Alison A. Bertuch. 2016. « Consider the Workhorse: Nonhomologous End-Joining in Budding Yeast ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 94 (5): 396-406. https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0001.

Enomoto, Shinichiro, Lynn Glowczewski, et Judith Berman. 2002. « MEC3, MEC1, and DDC2 Are Essential Components of a Telomere Checkpoint Pathway Required for Cell Cycle Arrest during Senescence in Saccharomyces Cerevisiae ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (8): 2626-38. https://doi.org/10.1091/mbc.02-02-0012.

Evans, S. K., et V. Lundblad. 1999. « Est1 and Cdc13 as Comediators of Telomerase Access ». *Science (New York, N.Y.)* 286 (5437): 117-20. https://doi.org/10.1126/science.286.5437.117.

Fagagna, Fabrizio d'Adda di, Philip M. Reaper, Lorena Clay-Farrace, Heike Fiegler, Philippa Carr, Thomas Von Zglinicki, Gabriele Saretzki, Nigel P. Carter, et Stephen P. Jackson. 2003. « A DNA Damage Checkpoint Response in Telomere-Initiated Senescence ».

Nature 426 (6963): 194-98. https://doi.org/10.1038/nature02118.

Fallet, Emilie, Pascale Jolivet, Julien Soudet, Michael Lisby, Eric Gilson, et Maria Teresa Teixeira. 2014. « Length-Dependent Processing of Telomeres in the Absence of Telomerase ». *Nucleic Acids Research* 42 (6): 3648-65. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1328.

Faure, Virginie, Stéphane Coulon, Julien Hardy, et Vincent Géli. 2010. « Cdc13 and Telomerase Bind through Different Mechanisms at the Lagging- and Leading-Strand Telomeres ». *Molecular Cell* 38 (6): 842-52. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.016.

Feldser, David M., et Carol W. Greider. 2007. « Short Telomeres Limit Tumor Progression in Vivo by Inducing Senescence ». *Cancer Cell* 11 (5): 461-69. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.02.026.

Ferrari, Matteo, Benjamin Tamilselvan Nachimuthu, Roberto Antonio Donnianni, Hannah Klein, et Achille Pellicioli. 2013. « Tid1/Rdh54 Translocase Is Phosphorylated through a Mec1- and Rad53-Dependent Manner in the Presence of DSB Lesions in Budding Yeast ». *DNA Repair* 12 (5): 347-55. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.02.004.

Fiorani, Simona, Guendalina Mimun, Laura Caleca, Daniele Piccini, et Achille Pellicioli. 2008. « Characterization of the Activation Domain of the Rad53 Checkpoint Kinase ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (4): 493-99. https://doi.org/10.4161/cc.7.4.5323.

Galgoczy, D. J., et D. P. Toczyski. 2001. « Checkpoint Adaptation Precedes Spontaneous and Damage-Induced Genomic Instability in Yeast ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (5): 1710-18. https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1710-1718.2001.

Garvik, B, M Carson, et L Hartwell. 1995. « Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. » *Molecular and Cellular Biology* 15 (11): 6128-38.

Gasch, A. P., M. Huang, S. Metzner, D. Botstein, S. J. Elledge, et P. O. Brown. 2001. « Genomic Expression Responses to DNA-Damaging Agents and the Regulatory Role of the Yeast ATR Homolog Mec1p ». *Molecular Biology of the Cell* 12 (10): 2987-3003. https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.2987.

Geymonat, Marco, Ad Spanos, Philip A. Walker, Leland H. Johnston, et Steven G. Sedgwick. 2003. « *In Vitro* Regulation of Budding Yeast Bfa1/Bub2 GAP Activity by Cdc5 ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (17): 14591-94. https://doi.org/10.1074/jbc.C300059200.

Gilson, E., M. Roberge, R. Giraldo, D. Rhodes, et S. M. Gasser. 1993. « Distortion of the DNA Double Helix by RAP1 at Silencers and Multiple Telomeric Binding Sites ». *Journal of Molecular Biology* 231 (2): 293-310. https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1283.

Golsteyn, R. M., K. E. Mundt, A. M. Fry, et E. A. Nigg. 1995. « Cell Cycle Regulation

of the Activity and Subcellular Localization of Plk1, a Human Protein Kinase Implicated in Mitotic Spindle Function ». *The Journal of Cell Biology* 129 (6): 1617-28. https://doi.org/10.1083/jcb.129.6.1617.

Gorgoulis, Vassilis G., Leandros-Vassilios F. Vassiliou, Panagiotis Karakaidos, Panayotis Zacharatos, Athanassios Kotsinas, Triantafillos Liloglou, Monica Venere, et al. 2005. « Activation of the DNA Damage Checkpoint and Genomic Instability in Human Precancerous Lesions ». *Nature* 434 (7035): 907-13. https://doi.org/10.1038/nature03485.

Gottschling, Daniel E., Oscar M. Aparicio, Barbara L. Billington, et Virginia A. Zakian. 1990. « Position effect at S. cerevisiae telomeres: Reversible repression of Pol II transcription ». *Cell* 63 (4): 751-62. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90141-Z.

Granata, Magda, Federico Lazzaro, Daniele Novarina, Davide Panigada, Fabio Puddu, Carla Manuela Abreu, Ramesh Kumar, et al. 2010. « Dynamics of Rad9 Chromatin Binding and Checkpoint Function Are Mediated by Its Dimerization and Are Cell Cycle-Regulated by CDK1 Activity ». *PLoS Genetics* 6 (8). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001047.

Grandin, N., C. Damon, et M. Charbonneau. 2001. « Ten1 Functions in Telomere End Protection and Length Regulation in Association with Stn1 and Cdc13 ». *The EMBO Journal* 20 (5): 1173-83. https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.1173.

Grandin, N., S. I. Reed, et M. Charbonneau. 1997. « Stn1, a New Saccharomyces Cerevisiae Protein, Is Implicated in Telomere Size Regulation in Association with Cdc13 ». *Genes & Development* 11 (4): 512-27. https://doi.org/10.1101/gad.11.4.512.

Grandin, Nathalie, Aymeric Bailly, et Michel Charbonneau. 2005. « Activation of Mrc1, a Mediator of the Replication Checkpoint, by Telomere Erosion ». *Biology of the Cell* 97 (10): 799-814. https://doi.org/10.1042/BC20040526.

Gravel, S., M. Larrivée, P. Labrecque, et R. J. Wellinger. 1998. « Yeast Ku as a Regulator of Chromosomal DNA End Structure ». *Science (New York, N.Y.)* 280 (5364): 741-44. https://doi.org/10.1126/science.280.5364.741.

Greider, C. W., et E. H. Blackburn. 1985. « Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts ». *Cell* 43 (2 Pt 1): 405-13. https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9.

———. 1989. « A Telomeric Sequence in the RNA of Tetrahymena Telomerase Required for Telomere Repeat Synthesis ». *Nature* 337 (6205): 331-37. https://doi.org/10.1038/337331a0.

Grenon, Muriel, Thomas Costelloe, Sonia Jimeno, Aisling O'Shaughnessy, Jennifer Fitzgerald, Omar Zgheib, Linda Degerth, et Noel F. Lowndes. 2007. « Docking onto Chromatin via the Saccharomyces Cerevisiae Rad9 Tudor Domain ». *Yeast (Chichester,*

England) 24 (2): 105-19. https://doi.org/10.1002/yea.1441.

Gutteridge, Rosie Elizabeth Ann, Mary Ann Ndiaye, Xiaoqi Liu, et Nihal Ahmad. 2016. « Plk1 Inhibitors in Cancer Therapy: From Laboratory to Clinics ». *Molecular Cancer Therapeutics* 15 (7): 1427-35. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0897.

Hackett, J. A., D. M. Feldser, et C. W. Greider. 2001. « Telomere Dysfunction Increases Mutation Rate and Genomic Instability ». *Cell* 106 (3): 275-86. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00457-3.

Hackett, Jennifer A., et Carol W. Greider. 2003. « End Resection Initiates Genomic Instability in the Absence of Telomerase ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (23): 8450-61. https://doi.org/10.1128/mcb.23.23.8450-8461.2003.

Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.

Harley, C. B., A. B. Futcher, et C. W. Greider. 1990. « Telomeres Shorten during Ageing of Human Fibroblasts ». *Nature* 345 (6274): 458-60. https://doi.org/10.1038/345458a0.

Harrison, Jacob C., et James E. Haber. 2006. « Surviving the Breakup: The DNA Damage Checkpoint ». *Annual Review of Genetics* 40 (1): 209-35. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.051206.105231.

Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti, et M. Culotti. 1973. « Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of Cdc Mutants ». *Genetics* 74 (2): 267-86.

Hartwell, L., et T. Weinert. 1989. « Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events ». *Science* 246 (4930): 629-34. https://doi.org/10.1126/science.2683079.

Hastie, N. D., M. Dempster, M. G. Dunlop, A. M. Thompson, D. K. Green, et R. C. Allshire. 1990. « Telomere Reduction in Human Colorectal Carcinoma and with Ageing ». *Nature* 346 (6287): 866-68. https://doi.org/10.1038/346866a0.

Hayflick, L., et P. S. Moorhead. 1961. « The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains ». *Experimental Cell Research* 25 (décembre): 585-621. https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6.

Hirano, Yukinori, Kenzo Fukunaga, et Katsunori Sugimoto. 2009. « Rif1 and Rif2 inhibit localization of Tel1 to DNA ends ». *Molecular cell* 33 (3): 312-22. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.027.

Hu, Fenghua, et Stephen J. Elledge. 2002. « Bub2 Is a Cell Cycle Regulated Phospho-Protein Controlled by Multiple Checkpoints ». *Cell Cycle* 1 (5): 340-44. https://doi.org/10.4161/cc.1.5.154.

Hu, Fenghua, Yanchang Wang, Dou Liu, Yumei Li, Jun Qin, et Stephen J Elledge. 2001. « Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP Complex by Cdc5 and Cell Cycle Checkpoints ». *Cell* 107 (5): 655-65. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00580-3.

Huertas, Pablo. 2010. « DNA Resection in Eukaryotes: Deciding How to Fix the Break ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (1): 11-16. https://doi.org/10.1038/nsmb.1710.

Humpal, Stephen E., David A. Robinson, et Jocelyn E. Krebs. 2009. « Marks to Stop the Clock: Histone Modifications and Checkpoint Regulation in the DNA Damage Response ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 87 (1): 243-53. https://doi.org/10.1139/O08-109.

Huyen, Yentram, Omar Zgheib, Richard A. Ditullio, Vassilis G. Gorgoulis, Panayotis Zacharatos, Tom J. Petty, Emily A. Sheston, Hestia S. Mellert, Elena S. Stavridi, et Thanos D. Halazonetis. 2004. « Methylated Lysine 79 of Histone H3 Targets 53BP1 to DNA Double-Strand Breaks ». *Nature* 432 (7015): 406-11. https://doi.org/10.1038/nature03114.

IJpma, Arne S., et Carol W. Greider. 2003. « Short Telomeres Induce a DNA Damage Response in Saccharomyces Cerevisiae ». *Molecular Biology of the Cell* 14 (3): 987-1001. https://doi.org/10.1091/mbc.02-04-0057.

Ira, Grzegorz, Anna Malkova, Giordano Liberi, Marco Foiani, et James E. Haber. 2003. « Srs2 and Sgs1-Top3 Suppress Crossovers during Double-Strand Break Repair in Yeast ». *Cell* 115 (4): 401-11. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00886-9.

Ira, Grzegorz, Achille Pellicioli, Alitukiriza Balijja, Xuan Wang, Simona Fiorani, Walter Carotenuto, Giordano Liberi, et al. 2004. « DNA End Resection, Homologous Recombination and DNA Damage Checkpoint Activation Require CDK1 ». *Nature* 431 (7011): 1011-17. https://doi.org/10.1038/nature02964.

Ira, Grzegorz, Dominik Satory, et James E. Haber. 2006. « Conservative Inheritance of Newly Synthesized DNA in Double-Strand Break-Induced Gene Conversion ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (24): 9424-29. https://doi.org/10.1128/MCB.01654-06.

Ivessa, Andreas S., Jin-Qiu Zhou, Vince P. Schulz, Ellen K. Monson, et Virginia A. Zakian. 2002. « Saccharomyces Rrm3p, a 5' to 3' DNA Helicase That Promotes Replication Fork Progression through Telomeric and Subtelomeric DNA ». *Genes & Development* 16 (11): 1383-96. https://doi.org/10.1101/gad.982902.

Jaehnig, Eric J., Dwight Kuo, Hans Hombauer, Trey G. Ideker, et Richard D. Kolodner. 2013. « Checkpoint Kinases Regulate a Global Network of Transcription Factors in Response to DNA Damage ». *Cell Reports* 4 (1): 174-88. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.041.

Jeyapalan, Jessie C., Mark Ferreira, John M. Sedivy, et Utz Herbig. 2007. « Accumulation of Senescent Cells in Mitotic Tissue of Aging Primates ». *Mechanisms of Ageing and Development* 128 (1): 36-44. https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.008.

Joukov, Vladimir, et Arcangela De Nicolo. 2018. « Aurora-PLK1 Cascades as Key Signaling Modules in the Regulation of Mitosis ». *Science Signaling* 11 (543): eaar4195. https://doi.org/10.1126/scisignal.aar4195.

Kachaner, David, Damien Garrido, Haytham Mehsen, Karine Normandin, Hugo Lavoie, et Vincent Archambault. 2017. « Coupling of Polo Kinase Activation to Nuclear Localization by a Bifunctional NLS Is Required during Mitotic Entry ». *Nature Communications* 8 (1): 1701. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01876-8.

Kalsbeek, Danî, et Roy M. Golsteyn. 2017. « G2/M-Phase Checkpoint Adaptation and Micronuclei Formation as Mechanisms That Contribute to Genomic Instability in Human Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (11). https://doi.org/10.3390/ijms18112344.

Kaul, Zeenia, Anthony J. Cesare, Lily I. Huschtscha, Axel A. Neumann, et Roger R. Reddel. 2011. « Five Dysfunctional Telomeres Predict Onset of Senescence in Human Cells ». *EMBO Reports* 13 (1): 52-59. https://doi.org/10.1038/embor.2011.227.

Kaye, Julia A., Justine A. Melo, Stephanie K. Cheung, Moreshwar B. Vaze, James E. Haber, et David P. Toczyski. 2004. « DNA Breaks Promote Genomic Instability by Impeding Proper Chromosome Segregation ». *Current Biology: CB* 14 (23): 2096-2106. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.051.

Kazda, Anita, Barbara Zellinger, Max Rössler, Elisa Derboven, Branislav Kusenda, et Karel Riha. 2012. « Chromosome End Protection by Blunt-Ended Telomeres ». *Genes & Development* 26 (15): 1703-13. https://doi.org/10.1101/gad.194944.112.

Keogh, Michael-Christopher, Jung-Ae Kim, Michael Downey, Jeffrey Fillingham, Dipanjan Chowdhury, Jacob C. Harrison, Megumi Onishi, et al. 2006. « A Phosphatase Complex That Dephosphorylates GammaH2AX Regulates DNA Damage Checkpoint Recovery ». *Nature* 439 (7075): 497-501. https://doi.org/10.1038/nature04384.

Khadaroo, Basheer, M. Teresa Teixeira, Pierre Luciano, Nadine Eckert-Boulet, Susanne M. Germann, Marie Noelle Simon, Irene Gallina, et al. 2009. « The DNA Damage Response at Eroded Telomeres and Tethering to the Nuclear Pore Complex ». *Nature Cell Biology* 11 (8): 980-87. https://doi.org/10.1038/ncb1910.

Kim, Junwon, Guangming Luo, Young Yil Bahk, et Kiwon Song. 2012. « Cdc5-Dependent Asymmetric Localization of Bfa1 Fine-Tunes Timely Mitotic Exit ». Édité par Orna Cohen-Fix. *PLoS Genetics* 8 (1): e1002450.

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002450.

Klermund, Julia, Katharina Bender, et Brian Luke. 2014. « High Nutrient Levels and TORC1 Activity Reduce Cell Viability Following Prolonged Telomere Dysfunction and Cell Cycle Arrest ». *Cell Reports* 9 (1): 324-35. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.053.

Koranda, M., A. Schleiffer, L. Endler, et G. Ammerer. 2000. « Forkhead-like Transcription Factors Recruit Ndd1 to the Chromatin of G2/M-Specific Promoters ». *Nature* 406 (6791): 94-98. https://doi.org/10.1038/35017589.

Krejci, Lumir, Stephen Van Komen, Ying Li, Jana Villemain, Mothe Sreedhar Reddy, Hannah Klein, Thomas Ellenberger, et Patrick Sung. 2003. « DNA Helicase Srs2 Disrupts the Rad51 Presynaptic Filament ». *Nature* 423 (6937): 305-9. https://doi.org/10.1038/nature01577.

Kubara, Philip M., Sophie Kernéis-Golsteyn, Aurélie Studény, Brittany B. Lanser, Laurent Meijer, et Roy M. Golsteyn. 2012. « Human Cells Enter Mitosis with Damaged DNA after Treatment with Pharmacological Concentrations of Genotoxic Agents ». *The Biochemical Journal* 446 (3): 373-81. https://doi.org/10.1042/BJ20120385.

Kueng, Stephanie, Mariano Oppikofer, et Susan M. Gasser. 2013. « SIR Proteins and the Assembly of Silent Chromatin in Budding Yeast ». *Annual Review of Genetics* 47: 275-306. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-021313-173730.

Lam, Isabel, et Scott Keeney. 2014. « Mechanism and Regulation of Meiotic Recombination Initiation ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (1): a016634. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016634.

Larrivée, Michel, Catherine LeBel, et Raymund J. Wellinger. 2004. « The Generation of Proper Constitutive G-Tails on Yeast Telomeres Is Dependent on the MRX Complex ». *Genes & Development* 18 (12): 1391-96. https://doi.org/10.1101/gad.1199404.

Larrivée, Michel, et Raymund J. Wellinger. 2006. « Telomerase- and Capping-Independent Yeast Survivors with Alternate Telomere States ». *Nature Cell Biology* 8 (7): 741-47. https://doi.org/10.1038/ncb1429.

Le, S., J. K. Moore, J. E. Haber, et C. W. Greider. 1999. « RAD50 and RAD51 Define Two Pathways That Collaborate to Maintain Telomeres in the Absence of Telomerase ». *Genetics* 152 (1): 143-52.

Lee, Brian H., et Angelika Amon. 2003. « Polo Kinase--Meiotic Cell Cycle Coordinator ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 2 (5): 400-402.

Lee, Cheng-Sheng, Kihoon Lee, Gaëlle Legube, et James E. Haber. 2014. « Dynamics of Yeast Histone H2A and H2B Phosphorylation in Response to a Double-Strand Break ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (1): 103-9. https://doi.org/10.1038/nsmb.2737.

Lee, K. S., et R. L. Erikson. 1997. « Plk Is a Functional Homolog of Saccharomyces Cerevisiae Cdc5, and Elevated Plk Activity Induces Multiple Septation Structures. » *Molecular and Cellular Biology* 17 (6): 3408-17. https://doi.org/10.1128/MCB.17.6.3408.

Lee, S. E., J. K. Moore, A. Holmes, K. Umezu, R. D. Kolodner, et J. E. Haber. 1998. « Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50 and RPA Proteins Regulate Adaptation to G2/M Arrest after DNA Damage ». *Cell* 94 (3): 399-409.

Lee, Sang Eun, Achille Pellicioli, Anna Malkova, Marco Foiani, et James E. Haber. 2001. « The Saccharomyces Recombination Protein Tid1p Is Required for Adaptation from G2/M Arrest Induced by a Double-Strand Break ». *Current Biology* 11 (13): 1053-57. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00296-2.

Lee, Suk-Hee, et Chung-Hui Kim. 2002. « DNA-Dependent Protein Kinase Complex: A Multifunctional Protein in DNA Repair and Damage Checkpoint ». *Molecules and Cells* 13 (2): 159-66.

Lendvay, T. S., D. K. Morris, J. Sah, B. Balasubramanian, et V. Lundblad. 1996. « Senescence Mutants of Saccharomyces Cerevisiae with a Defect in Telomere Replication Identify Three Additional EST Genes ». *Genetics* 144 (4): 1399-1412.

Lepore, Dante, Olya Spassibojko, Gabrielle Pinto, et Ruth N. Collins. 2016. « Cell Cycle–Dependent Phosphorylation of Sec4p Controls Membrane Deposition during Cytokinesis ». *The Journal of Cell Biology* 214 (6): 691-703. https://doi.org/10.1083/jcb.201602038.

Leroy, Christophe, Sang Eun Lee, Moreshwar B. Vaze, Françoise Ochsenbein, Françoise Ochsenbien, Raphaël Guerois, James E. Haber, et Marie-Claude Marsolier-Kergoat. 2003. « PP2C Phosphatases Ptc2 and Ptc3 Are Required for DNA Checkpoint Inactivation after a Double-Strand Break ». *Molecular Cell* 11 (3): 827-35.

Levis, Robert W., Robin Ganesan, Kathleen Houtchens, Leigh Anna Tolar, et Fang-miin Sheen. 1993. « Transposons in place of telomeric repeats at a Drosophila telomere ». *Cell* 75 (6): 1083-93. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90318-K.

Lewis, Cody W., et Roy M. Golsteyn. 2016. « Cancer Cells That Survive Checkpoint Adaptation Contain Micronuclei That Harbor Damaged DNA ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 15 (22): 3131-45. https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1231287.

Liang, Bing, Jiajing Qiu, Kajan Ratnakumar, et Brehon C. Laurent. 2007. « RSC Functions as an Early Double-Strand-Break Sensor in the Cell's Response to DNA Damage ». *Current Biology: CB* 17 (16): 1432-37. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.035.

Liang, Fengshan, et Yanchang Wang. 2007. « DNA Damage Checkpoints Inhibit Mitotic Exit by Two Different Mechanisms ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (14):

5067-78. https://doi.org/10.1128/MCB.00095-07.

Lin, Jing-Jer, et Virginia A. Zakian. 1996. « The Saccharomyces CDC13 protein is a single-strand TG1–3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24): 13760-65.

Lingner, J., J. P. Cooper, et T. R. Cech. 1995. « Telomerase and DNA End Replication: No Longer a Lagging Strand Problem? » *Science (New York, N.Y.)* 269 (5230): 1533-34. https://doi.org/10.1126/science.7545310.

Lingner, J., T. R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad, et T. R. Cech. 1997. « Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase ». *Science (New York, N.Y.)* 276 (5312): 561-67. https://doi.org/10.1126/science.276.5312.561.

Linke, Christian, Edda Klipp, Hans Lehrach, Matteo Barberis, et Sylvia Krobitsch. 2013. « Fkh1 and Fkh2 Associate with Sir2 to Control CLB2 Transcription under Normal and Oxidative Stress Conditions ». *Frontiers in Physiology* 4: 173. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00173.

Lopes, Judith, Aurèle Piazza, Rodrigo Bermejo, Barry Kriegsman, Arianna Colosio, Marie-Paule Teulade-Fichou, Marco Foiani, et Alain Nicolas. 2011. « G-Quadruplex-Induced Instability during Leading-Strand Replication ». *The EMBO Journal* 30 (19): 4033-46. https://doi.org/10.1038/emboj.2011.316.

Lopez-Mosqueda, Jaime, Genevieve M. Vidanes, et David Toczyski. 2010. « Cdc5 Blocks in Vivo Rad53 Activity, but Not in Situ Activity (ISA) ». *Cell Cycle* 9 (21): 4266-68. https://doi.org/10.4161/cc.9.21.13637.

Loy, C. J., D. Lydall, et U. Surana. 1999. « NDD1, a High-Dosage Suppressor of Cdc28-1N, Is Essential for Expression of a Subset of Late-S-Phase-Specific Genes in Saccharomyces Cerevisiae ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3312-27. https://doi.org/10.1128/mcb.19.5.3312.

Lu, Xiongbin, Bonnie Nannenga, et Lawrence A. Donehower. 2005. « PPM1D Dephosphorylates Chk1 and P53 and Abrogates Cell Cycle Checkpoints ». *Genes & Development* 19 (10): 1162-74. https://doi.org/10.1101/gad.1291305.

Lundblad, V., et E. H. Blackburn. 1993. « An Alternative Pathway for Yeast Telomere Maintenance Rescues Est1- Senescence ». *Cell* 73 (2): 347-60. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90234-h.

Lundblad, V., et J. W. Szostak. 1989. « A Mutant with a Defect in Telomere Elongation Leads to Senescence in Yeast ». *Cell* 57 (4): 633-43. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90132-3.

Lustig, A. J., et T. D. Petes. 1986. « Identification of Yeast Mutants with Altered Telomere Structure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (5): 1398-1402. https://doi.org/10.1073/pnas.83.5.1398.

Lydall, D., et T. Weinert. 1995. « Yeast Checkpoint Genes in DNA Damage Processing: Implications for Repair and Arrest ». *Science (New York, N.Y.)* 270 (5241): 1488-91.

Lydeard, John R., Suvi Jain, Miyuki Yamaguchi, et James E. Haber. 2007. « Break-Induced Replication and Telomerase-Independent Telomere Maintenance Require Pol32 ». *Nature* 448 (7155): 820-23. https://doi.org/10.1038/nature06047.

Marcand, S., D. Wotton, E. Gilson, et D. Shore. 1997. « Rap1p and Telomere Length Regulation in Yeast ». *Ciba Foundation Symposium* 211: 76-93; discussion 93-103. https://doi.org/10.1002/9780470515433.ch6.

Marcand, Stéphane, Benjamin Pardo, Ariane Gratias, Sabrina Cahun, et Isabelle Callebaut. 2008. « Multiple Pathways Inhibit NHEJ at Telomeres ». *Genes & Development* 22 (9): 1153-58. https://doi.org/10.1101/gad.455108.

McGee, Jean S., Jane A. Phillips, Angela Chan, Michelle Sabourin, Katrin Paeschke, et Virginia A. Zakian. 2010. « Reduced Rif2 and Lack of Mec1 Target Short Telomeres for Elongation Rather than Double-Strand Break Repair ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (12): 1438-45. https://doi.org/10.1038/nsmb.1947.

McVey, Mitch, et Sang Eun Lee. 2008. « MMEJ Repair of Double-Strand Breaks (Director's Cut): Deleted Sequences and Alternative Endings ». *Trends in Genetics: TIG* 24 (11): 529-38. https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.08.007.

Mehta, Anuja, et James E. Haber. 2014. « Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (9). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428.

Meitinger, Franz, Martin E. Boehm, Astrid Hofmann, Birgit Hub, Hanswalter Zentgraf, Wolf D. Lehmann, et Gislene Pereira. 2011. « Phosphorylation-Dependent Regulation of the F-BAR Protein Hof1 during Cytokinesis ». *Genes & Development* 25 (8): 875-88. https://doi.org/10.1101/gad.622411.

Melo, J. A., J. Cohen, et D. P. Toczyski. 2001. « Two Checkpoint Complexes Are Independently Recruited to Sites of DNA Damage in Vivo ». *Genes & Development* 15 (21): 2809-21. https://doi.org/10.1101/gad.903501.

Memisoglu, Gonen, Michael C. Lanz, Vinay V. Eapen, Jacqueline M. Jordan, Kihoon Lee, Marcus B. Smolka, et James E. Haber. 2019. « Mec1ATR Autophosphorylation and Ddc2ATRIP Phosphorylation Regulates DNA Damage Checkpoint Signaling ». *Cell Reports*

28 (4): 1090-1102.e3. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.068.

Miné-Hattab, Judith, et Rodney Rothstein. 2012. « Increased Chromosome Mobility Facilitates Homology Search during Recombination ». *Nature Cell Biology* 14 (5): 510-17. https://doi.org/10.1038/ncb2472.

Mishra, Prashant K., Sultan Ciftci-Yilmaz, David Reynolds, Wei-Chun Au, Lars Boeckmann, Lauren E. Dittman, Ziad Jowhar, et al. 2016. « Polo Kinase Cdc5 Associates with Centromeres to Facilitate the Removal of Centromeric Cohesin during Mitosis ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (14): 2286-2300. https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0004.

Mishra, Prashant K., Gudjon Olafsson, Lars Boeckmann, Timothy J. Westlake, Ziad M. Jowhar, Lauren E. Dittman, Richard E. Baker, Damien D'Amours, Peter H. Thorpe, et Munira A. Basrai. 2019. « Cell Cycle-Dependent Association of Polo Kinase Cdc5 with CENP-A Contributes to Faithful Chromosome Segregation in Budding Yeast ». *Molecular Biology of the Cell* 30 (8): 1020-36. https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0584.

Molk, Jeffrey N., Scott C. Schuyler, Jenny Y. Liu, James G. Evans, E. D. Salmon, David Pellman, et Kerry Bloom. 2004. « The Differential Roles of Budding Yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p Protein Dynamics in Mitotic Exit ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (4): 1519-32. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0708.

Moretti, P., K. Freeman, L. Coodly, et D. Shore. 1994. « Evidence That a Complex of SIR Proteins Interacts with the Silencer and Telomere-Binding Protein RAP1 ». *Genes & Development* 8 (19): 2257-69. https://doi.org/10.1101/gad.8.19.2257.

Morrow, D. M., D. A. Tagle, Y. Shiloh, F. S. Collins, et P. Hieter. 1995. « TEL1, an S. Cerevisiae Homolog of the Human Gene Mutated in Ataxia Telangiectasia, Is Functionally Related to the Yeast Checkpoint Gene MEC1 ». *Cell* 82 (5): 831-40.

Mortensen, Eric M., Wilhelm Haas, Melanie Gygi, Steven P. Gygi, et Douglas R. Kellogg. 2005. « Cdc28-Dependent Regulation of the Cdc5/Polo Kinase ». *Current Biology: CB* 15 (22): 2033-37. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.046.

Murnane, John P. 2006. « Telomeres and chromosome instability ». *DNA Repair*, Mechanisms of chromosomal translocation, 5 (9): 1082-92. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.030.

Nagai, Shigeki, Karine Dubrana, Monika Tsai-Pflugfelder, Marta B. Davidson, Tania M. Roberts, Grant W. Brown, Elisa Varela, Florence Hediger, Susan M. Gasser, et Nevan J. Krogan. 2008. « Functional Targeting of DNA Damage to a Nuclear Pore-Associated SUMO-Dependent Ubiquitin Ligase ». *Science (New York, N.Y.)* 322 (5901): 597-602. https://doi.org/10.1126/science.1162790.

Nakada, Daisuke, Kunihiro Matsumoto, et Katsunori Sugimoto. 2003. « ATM-Related

Tel1 Associates with Double-Strand Breaks through an Xrs2-Dependent Mechanism ». *Genes & Development* 17 (16): 1957-62. https://doi.org/10.1101/gad.1099003.

Nakamura, Toru M., Li-Lin Du, Christophe Redon, et Paul Russell. 2004. « Histone H2A Phosphorylation Controls Crb2 Recruitment at DNA Breaks, Maintains Checkpoint Arrest, and Influences DNA Repair in Fission Yeast ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (14): 6215-30. https://doi.org/10.1128/MCB.24.14.6215-6230.2004.

Olovnikov, A. M. 1973. « A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon ». *Journal of Theoretical Biology* 41 (1): 181-90. https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7.

O'Neill, Bryan M., Shawn J. Szyjka, Ewa T. Lis, Aaron O. Bailey, John R. Yates, Oscar M. Aparicio, et Floyd E. Romesberg. 2007. « Pph3-Psy2 Is a Phosphatase Complex Required for Rad53 Dephosphorylation and Replication Fork Restart during Recovery from DNA Damage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (22): 9290-95. https://doi.org/10.1073/pnas.0703252104.

Papamichos-Chronakis, Manolis, Jocelyn E. Krebs, et Craig L. Peterson. 2006. « Interplay between Ino80 and Swr1 Chromatin Remodeling Enzymes Regulates Cell Cycle Checkpoint Adaptation in Response to DNA Damage ». *Genes & Development* 20 (17): 2437-49. https://doi.org/10.1101/gad.1440206.

Pâques, F., et J. E. Haber. 1999. « Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in Saccharomyces Cerevisiae ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 63 (2): 349-404.

Pardo, Benjamin, Laure Crabbé, et Philippe Pasero. 2017. « Signaling Pathways of Replication Stress in Yeast ». *FEMS Yeast Research* 17 (2). https://doi.org/10.1093/femsyr/fow101.

Pardo, Benjamin, et Stéphane Marcand. 2005. « Rap1 Prevents Telomere Fusions by Nonhomologous End Joining ». *The EMBO Journal* 24 (17): 3117-27. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600778.

Park, Chong J., Jung-Eun Park, Tatiana S. Karpova, Nak-Kyun Soung, Li-Rong Yu, Sukgil Song, Kyung H. Lee, et al. 2008. « Requirement for the Budding Yeast Polo Kinase Cdc5 in Proper Microtubule Growth and Dynamics ». *Eukaryotic Cell* 7 (3): 444-53. https://doi.org/10.1128/EC.00283-07.

Pellicioli, A., S. E. Lee, C. Lucca, M. Foiani, et J. E. Haber. 2001. « Regulation of Saccharomyces Rad53 Checkpoint Kinase during Adaptation from DNA Damage-Induced G2/M Arrest ». *Molecular Cell* 7 (2): 293-300.

Pintard, Lionel, et Vincent Archambault. 2018. « A Unified View of Spatio-Temporal Control of Mitotic Entry: Polo Kinase as the Key ». *Open Biology* 8 (8). https://doi.org/10.1098/rsob.180114.

Rahal, Rami, et Angelika Amon. 2008. « The Polo-like Kinase Cdc5 Interacts with FEAR Network Components and Cdc14 ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (20): 3262-72. https://doi.org/10.4161/cc.7.20.6852.

Raices, Marcela, Ramiro E. Verdun, Sarah A. Compton, Candy I. Haggblom, Jack D. Griffith, Andrew Dillin, et Jan Karlseder. 2008. « C. Elegans Telomeres Contain G-Strand and C-Strand Overhangs That Are Bound by Distinct Proteins ». *Cell* 132 (5): 745-57. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.039.

Ratsima, H., A.-M. Ladouceur, M. Pascariu, V. Sauve, Z. Salloum, P. S. Maddox, et D. D'Amours. 2011. « Independent Modulation of the Kinase and Polo-Box Activities of Cdc5 Protein Unravels Unique Roles in the Maintenance of Genome Stability ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (43): E914-23. https://doi.org/10.1073/pnas.1106448108.

Ratsima, Hery, Diego Serrano, Mirela Pascariu, et Damien D'Amours. 2016. « Centrosome-Dependent Bypass of the DNA Damage Checkpoint by the Polo Kinase Cdc5 ». *Cell Reports* 14 (6): 1422-34. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.014.

Rawal, Chetan C., Sara Riccardo, Chiara Pesenti, Matteo Ferrari, Federica Marini, et Achille Pellicioli. 2016. « Reduced Kinase Activity of Polo Kinase Cdc5 Affects Chromosome Stability and DNA Damage Response in S. Cerevisiae ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 15 (21): 2906-19. https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1222338.

Reusswig, Karl-Uwe, Fabian Zimmermann, Lorenzo Galanti, et Boris Pfander. 2016. « Robust Replication Control Is Generated by Temporal Gaps between Licensing and Firing Phases and Depends on Degradation of Firing Factor Sld2 ». *Cell Reports* 17 (2): 556-69. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.013.

Rock, Jeremy M., et Angelika Amon. 2011. « Cdc15 Integrates Tem1 GTPase-Mediated Spatial Signals with Polo Kinase-Mediated Temporal Cues to Activate Mitotic Exit ». *Genes & Development* 25 (18): 1943-54. https://doi.org/10.1101/gad.17257711.

Rodriguez-Rodriguez, Jose-Antonio, Yolanda Moyano, Soraya Játiva, et Ethel Queralt. 2016. « Mitotic Exit Function of Polo-like Kinase Cdc5 Is Dependent on Sequential Activation by Cdk1 ». *Cell Reports* 15 (9): 2050-62. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.079.

Rossio, Valentina, Elena Galati, Matteo Ferrari, Achille Pellicioli, Takashi Sutani, Katsuhiko Shirahige, Giovanna Lucchini, et Simonetta Piatti. 2010. « The RSC Chromatin-

Remodeling Complex Influences Mitotic Exit and Adaptation to the Spindle Assembly Checkpoint by Controlling the Cdc14 Phosphatase ». *The Journal of Cell Biology* 191 (5): 981-97. https://doi.org/10.1083/jcb.201007025.

Russell, P., S. Moreno, et S. I. Reed. 1989. « Conservation of Mitotic Controls in Fission and Budding Yeasts ». *Cell* 57 (2): 295-303. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90967-7.

Sabourin, Michelle, Creighton T. Tuzon, et Virginia A. Zakian. 2007. « Telomerase and Tel1p Preferentially Associate with Short Telomeres in S. Cerevisiae ». *Molecular Cell* 27 (4): 550-61. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.016.

Sakchaisri, Krisada, Satoshi Asano, Li-Rong Yu, Mark J. Shulewitz, Chong J. Park, Jung-Eun Park, Young-Wook Cho, Timothy D. Veenstra, Jeremy Thorner, et Kyung S. Lee. 2004. « Coupling Morphogenesis to Mitotic Entry ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (12): 4124-29. https://doi.org/10.1073/pnas.0400641101.

Sakofsky, Cynthia J., et Anna Malkova. 2017. « Break Induced Replication in Eukaryotes: Mechanisms, Functions, and Consequences ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52 (4): 395-413. https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1314444.

Sakofsky, Cynthia J., Steven A. Roberts, Ewa Malc, Piotr A. Mieczkowski, Michael A. Resnick, Dmitry A. Gordenin, et Anna Malkova. 2014. « Break-Induced Replication Is a Source of Mutation Clusters Underlying Kataegis ». *Cell Reports* 7 (5): 1640-48. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.053.

Sanchez, Y. 1999. « Control of the DNA Damage Checkpoint by Chk1 and Rad53 Protein Kinases Through Distinct Mechanisms ». *Science* 286 (5442): 1166-71. https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1166.

Sandell, L. L., et V. A. Zakian. 1993. « Loss of a Yeast Telomere: Arrest, Recovery, and Chromosome Loss ». *Cell* 75 (4): 729-39.

Schleker, Thomas, Kenji Shimada, Ragna Sack, Brietta L. Pike, et Susan M. Gasser. 2010. « Cell Cycle-Dependent Phosphorylation of Rad53 Kinase by Cdc5 and Cdc28 Modulates Checkpoint Adaptation ». *Cell Cycle* 9 (2): 350-63. https://doi.org/10.4161/cc.9.2.10448.

Schulz, V. P., et V. A. Zakian. 1994. « The Saccharomyces PIF1 DNA Helicase Inhibits Telomere Elongation and de Novo Telomere Formation ». *Cell* 76 (1): 145-55. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90179-1.

Seki, Akiko, Judith A. Coppinger, Chang-Young Jang, John R. Yates, et Guowei Fang. 2008. « Bora and the Kinase Aurora a Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control

Mitotic Entry ». *Science (New York, N.Y.)* 320 (5883): 1655-58. https://doi.org/10.1126/science.1157425.

Shah, Parisha P., Xiuzhong Zheng, Anastasiya Epshtein, Jeffrey N. Carey, Douglas K. Bishop, et Hannah L. Klein. 2010. « Swi2/Snf2-Related Translocases Prevent Accumulation of Toxic Rad51 Complexes during Mitotic Growth ». *Molecular Cell* 39 (6): 862-72. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.028.

Shampay, J., et E. H. Blackburn. 1988. « Generation of Telomere-Length Heterogeneity in Saccharomyces Cerevisiae ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (2): 534-38. https://doi.org/10.1073/pnas.85.2.534.

Shampay, J., J. W. Szostak, et E. H. Blackburn. 1984. « DNA Sequences of Telomeres Maintained in Yeast ». *Nature* 310 (5973): 154-57. https://doi.org/10.1038/310154a0.

Shirayama, M., W. Zachariae, R. Ciosk, et K. Nasmyth. 1998. « The Polo-like Kinase Cdc5p and the WD-Repeat Protein Cdc20p/Fizzy Are Regulators and Substrates of the Anaphase Promoting Complex in Saccharomyces Cerevisiae ». *The EMBO Journal* 17 (5): 1336-49. https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1336.

Shore, David, et Kim Nasmyth. 1987. « Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements ». *Cell* 51 (5): 721-32. https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90095-X.

Shroff, Robert, Ayelet Arbel-Eden, Duane Pilch, Grzegorz Ira, William M. Bonner, John H. Petrini, James E. Haber, et Michael Lichten. 2004. « Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-Strand Break ». *Current Biology: CB* 14 (19): 1703-11. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.047.

Singer, M. S., et D. E. Gottschling. 1994. « TLC1: Template RNA Component of Saccharomyces Cerevisiae Telomerase ». *Science (New York, N.Y.)* 266 (5184): 404-9. https://doi.org/10.1126/science.7545955.

Smetana, Karel, Lukáš Lacina, Pavol Szabo, Barbora Dvořánková, Prokop Brož, et Aleksi Šedo. 2016. « Ageing as an Important Risk Factor for Cancer ». *Anticancer Research* 36 (10): 5009-17. https://doi.org/10.21873/anticanres.11069.

Smith, Catherine E., Bertrand Llorente, et Lorraine S. Symington. 2007. « Template Switching during Break-Induced Replication ». *Nature* 447 (7140): 102-5. https://doi.org/10.1038/nature05723.

Smits, V. A., R. Klompmaker, L. Arnaud, G. Rijksen, E. A. Nigg, et R. H. Medema. 2000. « Polo-like Kinase-1 Is a Target of the DNA Damage Checkpoint ». *Nature Cell Biology* 2 (9): 672-76. https://doi.org/10.1038/35023629.

Snead, Jennifer L., Matthew Sullivan, Drew M. Lowery, Michael S. Cohen, Chao Zhang, David H. Randle, Jack Taunton, Michael B. Yaffe, David O. Morgan, et Kevan M. Shokat. 2007. « A Coupled Chemical-Genetic and Bioinformatic Approach to Polo-like Kinase Pathway Exploration ». *Chemistry & Biology* 14 (11): 1261-72. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.09.011.

Soudet, Julien, Pascale Jolivet, et Maria Teresa Teixeira. 2014. « Elucidation of the DNA End-Replication Problem in Saccharomyces Cerevisiae ». *Molecular Cell* 53 (6): 954-64. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.030.

Soulas-Sprauel, P., P. Rivera-Munoz, L. Malivert, G. Le Guyader, V. Abramowski, P. Revy, et J.-P. de Villartay. 2007. « V(D)J and Immunoglobulin Class Switch Recombinations: A Paradigm to Study the Regulation of DNA End-Joining ». *Oncogene* 26 (56): 7780-91. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210875.

Steensel, B. van, A. Smogorzewska, et T. de Lange. 1998. « TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions ». *Cell* 92 (3): 401-13. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80932-0.

Stegmeier, Frank, et Angelika Amon. 2004. « Closing Mitosis: The Functions of the Cdc14 Phosphatase and Its Regulation ». *Annual Review of Genetics* 38: 203-32. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.093051.

St-Pierre, Julie, Mélanie Douziech, Franck Bazile, Mirela Pascariu, Eric Bonneil, Véronique Sauvé, Hery Ratsima, et Damien D'Amours. 2009. « Polo Kinase Regulates Mitotic Chromosome Condensation by Hyperactivation of Condensin DNA Supercoiling Activity ». *Molecular Cell* 34 (4): 416-26. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.013.

Strathern, J. N., A. J. Klar, J. B. Hicks, J. A. Abraham, J. M. Ivy, K. A. Nasmyth, et C. McGill. 1982. « Homothallic Switching of Yeast Mating Type Cassettes Is Initiated by a Double-Stranded Cut in the MAT Locus ». *Cell* 31 (1): 183-92. https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90418-4.

Sun, Z., J. Hsiao, D. S. Fay, et D. F. Stern. 1998. « Rad53 FHA Domain Associated with Phosphorylated Rad9 in the DNA Damage Checkpoint ». *Science (New York, N.Y.)* 281 (5374): 272-74.

Sunkel, C. E., et D. M. Glover. 1988. « Polo, a Mitotic Mutant of Drosophila Displaying Abnormal Spindle Poles ». *Journal of Cell Science* 89 (1): 25-38.

Swift, Lucy H., et Roy M. Golsteyn. 2014. « Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (3): 3403-31. https://doi.org/10.3390/ijms15033403.

———. 2016. « Cytotoxic Amounts of Cisplatin Induce Either Checkpoint Adaptation or Apoptosis in a Concentration-Dependent Manner in Cancer Cells ». *Biology of the Cell* 108 (5): 127-48. https://doi.org/10.1111/boc.201500056.

Syljuåsen, Randi G., Sanne Jensen, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2006. « Adaptation to the Ionizing Radiation–Induced G_2 Checkpoint Occurs in Human Cells and Depends on Checkpoint Kinase 1 and Polo-like Kinase 1 Kinases ». *Cancer Research* 66 (21): 10253-57. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2144.

Tao, Ran, Hua Xue, Jianping Zhang, Jieyuan Liu, Haiteng Deng, et Ye-Guang Chen. 2013. « Deacetylase Rpd3 Facilitates Checkpoint Adaptation by Preventing Rad53 Overactivation ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (21): 4212-24. https://doi.org/10.1128/MCB.00618-13.

Teixeira, M. Teresa. 2013. « Saccharomyces Cerevisiae as a Model to Study Replicative Senescence Triggered by Telomere Shortening ». *Frontiers in Oncology* 3: 101. https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00101.

Teixeira, M. Teresa, Milica Arneric, Peter Sperisen, et Joachim Lingner. 2004. « Telomere Length Homeostasis Is Achieved via a Switch between Telomerase- Extendible and -Nonextendible States ». *Cell* 117 (3): 323-35. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00334-4.

Teng, S. C., J. Chang, B. McCowan, et V. A. Zakian. 2000. « Telomerase-Independent Lengthening of Yeast Telomeres Occurs by an Abrupt Rad50p-Dependent, Rif-Inhibited Recombinational Process ». *Molecular Cell* 6 (4): 947-52. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(05)00094-8.

Teng, S. C., et V. A. Zakian. 1999. « Telomere-Telomere Recombination Is an Efficient Bypass Pathway for Telomere Maintenance in Saccharomyces Cerevisiae ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8083-93. https://doi.org/10.1128/mcb.19.12.8083.

Terradas, Mariona, Marta Martín, et Anna Genescà. 2016. « Impaired Nuclear Functions in Micronuclei Results in Genome Instability and Chromothripsis ». *Archives of Toxicology* 90 (11): 2657-67. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1818-4.

Toczyski, David P. 2006. « Methods for Studying Adaptation to the DNA Damage Checkpoint in Yeast ». *Methods in Enzymology* 409: 150-65. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)09009-9.

Toczyski, David P., David J. Galgoczy, et Leland H. Hartwell. 1997. « CDC5 and CKII Control Adaptation to the Yeast DNA Damage Checkpoint ». *Cell* 90 (6): 1097-1106. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80375-X.

Tolliday, Nicola, Lynn VerPlank, et Rong Li. 2002. « Rho1 Directs Formin-Mediated

Actin Ring Assembly during Budding Yeast Cytokinesis ». *Current Biology* 12 (21): 1864-70. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01238-1.

Travesa, Anna, Alba Duch, et David G. Quintana. 2008. « Distinct Phosphatases Mediate the Deactivation of the DNA Damage Checkpoint Kinase Rad53 ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (25): 17123-30. https://doi.org/10.1074/jbc.M801402200.

Valerio-Santiago, Mauricio, Ana Isabel de Los Santos-Velázquez, et Fernando Monje-Casas. 2013. « Inhibition of the Mitotic Exit Network in Response to Damaged Telomeres ». *PLoS Genetics* 9 (10): e1003859. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003859.

Vasan, Soumini, Angela Deem, Sreejith Ramakrishnan, Juan Lucas Argueso, et Anna Malkova. 2014. « Cascades of Genetic Instability Resulting from Compromised Break-Induced Replication ». *PLoS Genetics* 10 (2): e1004119. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004119.

Vaze, Moreshwar B., Achille Pellicioli, Sang Eun Lee, Grzegorz Ira, Giordano Liberi, Ayelet Arbel-Eden, Marco Foiani, et James E. Haber. 2002. « Recovery from Checkpoint-Mediated Arrest after Repair of a Double-Strand Break Requires Srs2 Helicase ». *Molecular Cell* 10 (2): 373-85.

Vidanes, Genevieve M., Frédéric D. Sweeney, Sarah Galicia, Stephanie Cheung, John P. Doyle, Daniel Durocher, et David P. Toczyski. 2010. « CDC5 Inhibits the Hyperphosphorylation of the Checkpoint Kinase Rad53, Leading to Checkpoint Adaptation ». *PLoS Biology* 8 (1): e1000286. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000286.

Viguera, E., D. Canceill, et S. D. Ehrlich. 2001. « Replication Slippage Involves DNA Polymerase Pausing and Dissociation ». *The EMBO Journal* 20 (10): 2587-95. https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2587.

Villa, Matteo, Corinne Cassani, Elisa Gobbini, Diego Bonetti, et Maria Pia Longhese. 2016. « Coupling End Resection with the Checkpoint Response at DNA Double-Strand Breaks ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (19): 3655-63. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2262-6.

Visintin, R., E. S. Hwang, et A. Amon. 1999. « Cfi1 Prevents Premature Exit from Mitosis by Anchoring Cdc14 Phosphatase in the Nucleolus ». *Nature* 398 (6730): 818-23. https://doi.org/10.1038/19775.

Vugt, M. A. van, V. A. Smits, R. Klompmaker, et R. H. Medema. 2001. « Inhibition of Polo-like Kinase-1 by DNA Damage Occurs in an ATM- or ATR-Dependent Fashion ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 41656-60. https://doi.org/10.1074/jbc.M101831200.

Vydzhak, Olga, Katharina Bender, Julia Klermund, Anke Busch, Stefanie Reimann, et

Brian Luke. 2019. « Checkpoint Adaptation in Repair-Deficient Cells Drives Aneuploidy and Resistance to Genotoxic Agents ». *BioRxiv*, juillet, 464685. https://doi.org/10.1101/464685.

Walters, Alison D., Christopher K. May, Emma S. Dauster, Bertrand P. Cinquin, Elizabeth A. Smith, Xavier Robellet, Damien D'Amours, Carolyn A. Larabell, et Orna Cohen-Fix. 2014. « The Yeast Polo Kinase Cdc5 Regulates the Shape of the Mitotic Nucleus ». *Current Biology: CB* 24 (23): 2861-67. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.029.

Wang, Hailong, Zhiyu Qiu, Bo Liu, Yan Wu, Jianping Ren, Yaqing Liu, Yuqin Zhao, et al. 2018. « PLK1 Targets CtIP to Promote Microhomology-Mediated End Joining ». *Nucleic Acids Research* 46 (20): 10724-39. https://doi.org/10.1093/nar/gky810.

Wang, Xuejuan, Tingting Ran, Xuan Zhang, Jiyu Xin, Zhihui Zhang, Tengwei Wu, Weiwu Wang, et Gang Cai. 2017. « 3.9 Å Structure of the Yeast Mec1-Ddc2 Complex, a Homolog of Human ATR-ATRIP ». *Science* 358 (6367): 1206-9. https://doi.org/10.1126/science.aan8414.

Watson, J. D. 1972. « Origin of Concatemeric T7DNA ». *Nature New Biology* 239 (94): 197. https://doi.org/10.1038/newbio239197a0.

Weinert, T. A. 1992. « Dual Cell Cycle Checkpoints Sensitive to Chromosome Replication and DNA Damage in the Budding Yeast Saccharomyces Cerevisiae ». *Radiation Research* 132 (2): 141-43.

Weinert, T. A., et L. H. Hartwell. 1988. « The RAD9 Gene Controls the Cell Cycle Response to DNA Damage in Saccharomyces Cerevisiae ». *Science (New York, N.Y.)* 241 (4863): 317-22. https://doi.org/10.1126/science.3291120.

Weinert, T. A., G. L. Kiser, et L. H. Hartwell. 1994. « Mitotic Checkpoint Genes in Budding Yeast and the Dependence of Mitosis on DNA Replication and Repair ». *Genes & Development* 8 (6): 652-65. https://doi.org/10.1101/gad.8.6.652.

Wellinger, Raymund J. 2014. « In the End, What's the Problem? » *Molecular Cell* 53 (6): 855-56. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.008.

Wellinger, Raymund J, Katia Ethier, Pascale Labrecque, et Virginia A Zakian. 1996. « Evidence for a New Step in Telomere Maintenance ». *Cell* 85 (3): 423-33. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81120-4.

Wellinger, Raymund J., et Virginia A. Zakian. 2012. « Everything You Ever Wanted to Know about Saccharomyces Cerevisiae Telomeres: Beginning to End ». *Genetics* 191 (4): 1073-1105. https://doi.org/10.1534/genetics.111.137851.

Wloka, Carsten, et Erfei Bi. 2012. « Mechanisms of Cytokinesis in Budding Yeast ». *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 69 (10): 710-26. https://doi.org/10.1002/cm.21046.

Wotton, D., et D. Shore. 1997. « A Novel Rap1p-Interacting Factor, Rif2p, Cooperates

with Rif1p to Regulate Telomere Length in Saccharomyces Cerevisiae ». *Genes & Development* 11 (6): 748-60. https://doi.org/10.1101/gad.11.6.748.

Wright, J. H., D. E. Gottschling, et V. A. Zakian. 1992. « Saccharomyces Telomeres Assume a Non-Nucleosomal Chromatin Structure ». *Genes & Development* 6 (2): 197-210. https://doi.org/10.1101/gad.6.2.197.

Wyatt, Michael D., et Douglas L. Pittman. 2006. « Methylating Agents and DNA Repair Responses: Methylated Bases and Sources of Strand Breaks ». *Chemical Research in Toxicology* 19 (12): 1580-94. https://doi.org/10.1021/tx060164e.

Wyman, Claire, et Roland Kanaar. 2006. « DNA Double-Strand Break Repair: All's Well That Ends Well ». *Annual Review of Genetics* 40: 363-83. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451.

Xie, Zhengwei, Kyle A. Jay, Dana L. Smith, Yi Zhang, Zairan Liu, Jiashun Zheng, Ruilin Tian, Hao Li, et Elizabeth H. Blackburn. 2015. « Early Telomerase Inactivation Accelerates Aging Independently of Telomere Length ». *Cell* 160 (5): 928-39. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.002.

Xu, Jun, Chen Shen, Tao Wang, et Junmin Quan. 2013. « Structural Basis for the Inhibition of Polo-like Kinase 1 ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (9): 1047-53. https://doi.org/10.1038/nsmb.2623.

Xu, Zhou, Khanh Dao Duc, David Holcman, et Maria Teresa Teixeira. 2013. « The Length of the Shortest Telomere as the Major Determinant of the Onset of Replicative Senescence ». *Genetics* 194 (4): 847-57. https://doi.org/10.1534/genetics.113.152322.

Xu, Zhou, Emilie Fallet, Camille Paoletti, Steffen Fehrmann, Gilles Charvin, et Maria Teresa Teixeira. 2015. « Two Routes to Senescence Revealed by Real-Time Analysis of Telomerase-Negative Single Lineages ». *Nature Communications* 6 (1). https://doi.org/10.1038/ncomms8680.

Xu, Zhou, et Maria Teresa Teixeira. 2019. « The Many Types of Heterogeneity in Replicative Senescence ». *Yeast (Chichester, England)*, juillet. https://doi.org/10.1002/yea.3433.

Yaakov, Gilad, Kurt Thorn, et David O. Morgan. 2012. « Separase Biosensor Reveals That Cohesin Cleavage Timing Depends on Phosphatase PP2A(Cdc55) Regulation ». *Developmental Cell* 23 (1): 124-36. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.06.007.

Yamamoto, Yoshiaki, Hideyasu Matsuyama, Shigeto Kawauchi, Hiroaki Matsumoto, Kazuhiro Nagao, Chietaka Ohmi, Shigeru Sakano, et al. 2006. « Overexpression of Polo-like Kinase 1 (PLK1) and Chromosomal Instability in Bladder Cancer ». *Oncology* 70 (3): 231-37. https://doi.org/10.1159/000094416.

Yata, Keiko, Janette Lloyd, Sarah Maslen, Jean-Yves Bleuyard, Mark Skehel, Stephen J. Smerdon, et Fumiko Esashi. 2012. « Plk1 and CK2 Act in Concert to Regulate Rad51 during DNA Double Strand Break Repair ». *Molecular Cell* 45 (3): 371-83. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.028.

Yelamanchi, S. K., J. Veis, D. Anrather, H. Klug, et G. Ammerer. 2014. « Genotoxic Stress Prevents Ndd1-Dependent Transcriptional Activation of G2/M-Specific Genes in Saccharomyces Cerevisiae ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (4): 711-24. https://doi.org/10.1128/MCB.01090-13.

Yeung, Mantek, et Daniel Durocher. 2011. « Srs2 Enables Checkpoint Recovery by Promoting Disassembly of DNA Damage Foci from Chromatin ». *DNA Repair* 10 (12): 1213-22. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.09.005.

Yoo, Hae Yong, Akiko Kumagai, Anna Shevchenko, Andrej Shevchenko, et William G. Dunphy. 2004. « Adaptation of a DNA Replication Checkpoint Response Depends upon Inactivation of Claspin by the Polo-like Kinase ». *Cell* 117 (5): 575-88.

Yoshida, Satoshi, Keiko Kono, Drew M. Lowery, Sara Bartolini, Michael B. Yaffe, Yoshikazu Ohya, et David Pellman. 2006. « Polo-like Kinase Cdc5 Controls the Local Activation of Rho1 to Promote Cytokinesis ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5783): 108-11. https://doi.org/10.1126/science.1126747.

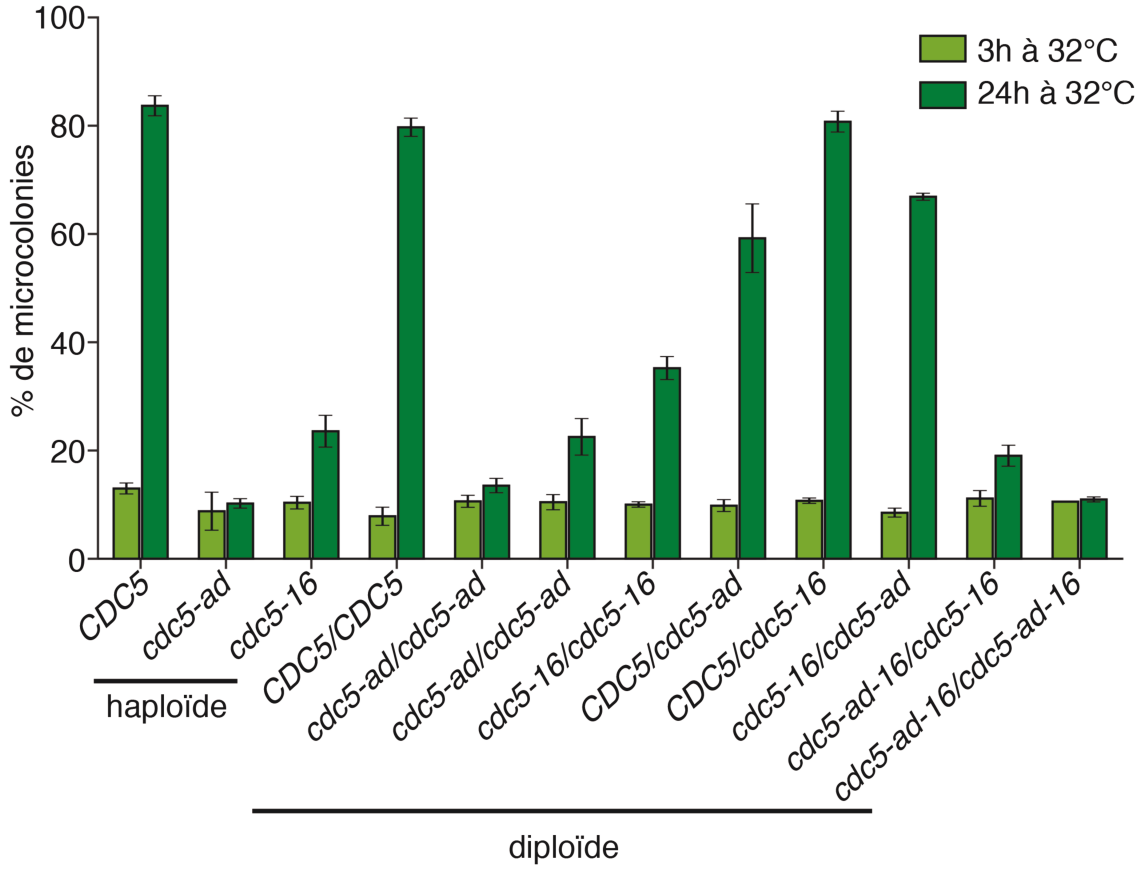
Yu, Tai-Yuan, Michael T. Kimble, et Lorraine S. Symington. 2018. « Sae2 Antagonizes Rad9 Accumulation at DNA Double-Strand Breaks to Attenuate Checkpoint Signaling and Facilitate End Resection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (51): E11961-69. https://doi.org/10.1073/pnas.1816539115.

Zhang, Tao, Saurabh Nirantar, Hong Hwa Lim, Indrajit Sinha, et Uttam Surana. 2009. « DNA Damage Checkpoint Maintains Cdh1 in an Active State to Inhibit Anaphase Progression ». *Developmental Cell* 17 (4): 541-51. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.006.

Zou, Lee, et Stephen J. Elledge. 2003. « Sensing DNA Damage through ATRIP Recognition of RPA-SsDNA Complexes ». *Science (New York, N.Y.)* 300 (5625): 1542-48. https://doi.org/10.1126/science.1083430.

I. Couverture du numéro de *Genes and Development* de Décembre 2018 Coutelier *et al*, 2018

II. Complémentation hétéroallèlique des mutants de Cdc5



Complémentation hétéroallèlique de la capacité d'adaptation de souches *cdc13-1* et mutées on non pour *CDC5*. La souche hétérozygote *cdc5-ad/cdc5-16* retrouve un phénotype d'adaptation équivalent à la souche *CDC5/CDC5*. Les allèles *cdc5-ad* et *cdc5-16* se complémentent suggérant que leur mutations n'affectent pas la même fonction de Cdc5, fonctions impliquées dans l'adaptation.

RÉSUMÉ

Les cellules eucaryotes activent un checkpoint spécifique qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN afin de permettre la réparation. Si la réparation n'est pas réussie, les cellules peuvent éviter la mort cellulaire et reprendre le cours du cycle malgré un dommage persistant grâce à un phénomène appelé l'adaptation au checkpoint. Ce processus offre l'opportunité de survie en permettant au dommage d'être réparé dans une autre phase du cycle et/ou en tolérant la présence d'un dommage non létal.

Les télomères sont des structures constituées de séquences répétées et de protéines spécifiques. Ils sont fondamentaux pour le maintien de la stabilité génomique. À chaque épisode de réplication, leur séquence est raccourcie. La télomérase, compense cette perte en ajoutant des répétitions *de novo*. La télomérase peut être réprimée de manière physiologique. Dans ce cas, le raccourcissement progressif des télomères enclenche une réponse checkpoint dépendante de la voie des dommages de l'ADN. Ce phénomène est appelé sénescence qui est accompagnée d'une augmentation de l'instabilité génomique.

J'ai montré au cours de ce projet de thèse que l'adaptation contribue à l'augmentation spécifique de l'instabilité génomique en senescence réplicative. J'ai également caractérisé certaines bases moléculaires de la protéine Cdc5, acteur majeur de l'adaptation, en réponse au dysfonctionnement télomérique en cellules uniques chez *Saccharomyces cerevisiae*.

MOTS CLÉS

Sénescence, télomère, adaptation, instabilité génomique, levure, microfluidique.

ABSTRACT

Eukaryotic cells respond to DNA damage by activation of a dedicated checkpoint that arrests the cell cycle. If repair is not successful, cells can avoid death by bypassing the checkpoint activation and undergoing cell division despite a persistant damage thanks to a process named checkpoint adaptation. This process is thought to provide the cell with an opportunity to survive by allowing repair to occur in the next cell cycle phase and/oy by tolerating non-lethal damage.

Telomeres are structures of repeated sequences coupled to specific proteins. They are fundamental in preserving genomic stability. At each round of replication, they shorten. A specific enzyme, telomerase, counteracts this loss of sequence. Telomerase can be physiologically repressed, in mammals' somatic cells for instance. In that case, the progressive shortening is associated with a checkpoint response dependent on the DNA damage pathway. This phenomenon is called replicative. Replicative senescence is associated with a specific increase of genomic instability.

During this PhD project, I showed that adaptation contributes to the specific increase of genomic instability in replicative senescence. I also characterized some of the molecular basis of the role of Cdc5 in adaptation upon telomeric dysfunction in single cells in *Saccharomyces cerevisiae*.

KEYWORDS

Replicative senescence, telomere, adaptation, genomic instability, yeast, microfluidics.