



HAL
open science

Couplage temporel entre la réplication et l'entrée en mitose en conditions normales ou perturbées : rôles de la signalisation Chk1

Vicente Lebrec

► **To cite this version:**

Vicente Lebrec. Couplage temporel entre la réplication et l'entrée en mitose en conditions normales ou perturbées : rôles de la signalisation Chk1. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL011 . tel-03506282

HAL Id: tel-03506282

<https://theses.hal.science/tel-03506282v1>

Submitted on 2 Jan 2022

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.

Couplage temporel entre la réplication et l'entrée en mitose en conditions normales ou perturbées : Rôles de la signalisation Chk1

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

ED n°582 : Cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Unité de recherche : CNRS UMR9019
Gustave Roussy, 114 rue Édouard Vaillant 94805 Villejuif
Réfèrent : Faculté de Médecine

Thèse soutenue en visioconférence totale,
Le 16 février 2021, par

Vicente LEBREC

Composition du Jury

Yea-Lih LIN

DR, Institut de Génétique Humaine

Renata BASTO

DR, Institut Curie

Franck TOLEDO

Professeur, Sorbonne Université

Stéphane KOUNDRIOUKOFF

MCU, Sorbonne Université

Gérald PEYROCHE

MCU, ENS Paris-Saclay

Présidente du Jury

Rapporteuse & Examinatrice

Rapporteur & Examineur

Examineur

Examineur

Oliver GAVET

MCU, Sorbonne Université

Directeur de thèse

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les différents organismes grâce auxquels j'ai pu être financé au cours de ces années : Gustave Roussy pour mon Master 2, l'IDEX Paris-Saclay pendant mes trois premières années de doctorat et la Ligue National contre le Cancer pour ma quatrième année.

Un grand merci à l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ma soutenance de thèse, mais également aux Dr Renata Basto et Pr Franck Toledo pour le temps consacré à l'évaluation de mon manuscrit, à mes examinateurs le Dr Philippe Pasero pour faire le déplacement depuis l'IGH et me consacrer son attention, le Dr Stéphane Koundrioukoff pour son suivi et ses conseils au cours de ces années de doctorat et le Dr Gérard Peyroche pour son aide précieuse ces derniers mois. Un grand merci également aux Dr Sarah Lambert et Dr Fabienne Mérola d'avoir fait partie de mes comités de suivi de thèse. Je suis particulièrement reconnaissant envers le Dr Fabienne Mérola, qui a été impliquée dans mon dossier de financement IDEX ce qui m'a permis d'être financé pendant mes trois premières années.

Toute ma reconnaissance va à mon directeur de thèse le Dr Olivier Gavet. Merci de m'avoir accueilli, soutenu et accompagné au cours de toutes ces années. Merci de m'avoir fait confiance en Master et en Doctorat, de m'avoir formé à la recherche, de m'avoir transmis ton expérience... et certaines lubies aussi (il faut croire que tu as déteint sur moi). Tu m'as donné une chance de faire de la recherche et une grande liberté pour accomplir ce projet passionnant dans les meilleures conditions imaginables, et pour cela je ne peux qu'être infiniment reconnaissant. Merci également au Dr Patricia Kannouche, directrice de l'unité, dont la bienveillance et la rigueur scientifique apporte énormément à tous.

J'ai adoré travailler avec notre équipe, avec Marion et Jean-Philippe qui sont géniaux, plein de ressources et toujours très sociables, avec Zaynab qui est malheureusement arrivée en plein Covid et n'a donc pas pu beaucoup être à la paillasse (mais à qui je souhaite le meilleur au Canada) et avec Lilia avec qui j'ai pu échanger sur l'expérience de la thèse alors que je débutais à peine au labo.

Toute mon affection à l'UMR9019, qui déborde de personnes géniales et dans laquelle j'ai été très heureux de passer toutes ces années. En particulier, plein de cœurs sur Quentin et Emma qui sont devenus des amis très cher : Quentin, tu es arrivé alors que je commençais mon doctorat et je n'arrive même pas à imaginer ce que celui-ci aurait été sans toi (beaucoup moins bien, assurément). Emma, je garde précieusement le petit Cthulhu et le monstre spaghetti volant en crochet, je leur ai fait un autel à leur gloire et leurs petits yeux surveillent mes cauchemars. La dernière année aura été pleine de changement (et pas juste pour la crise sanitaire mondiale) et le turn-over de l'unité fait que l'on s'en va tous à peu près en même temps. Hourra à Quentin pour sa carrière non-académique et plein de courage à Emma pour sa nouvelle vie de maitresse de conférences. J'en profite d'ailleurs pour saluer tous ceux qui ont déjà quitté l'unité : Arato, Franck, Caro Z, Mélanie, Gabriella, Kaja, l'équipe de Bernard Lopez...

En vrac, merci aux petites cellules fluorescentes, merci aux disques durs du PC du microscope de ne pas avoir complètement lâché à force d'être saturés en centaines de Teraoctets de données... et le plus spécial des mercis à Alexandra Elbakyan (*clin d'œil, clin d'œil*).

Mais le remerciement final est évidemment pour Julie, la personne avec qui je partage aujourd'hui ma vie. Je t'aime.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES ABREVIATIONS	4
TABLE DES FIGURES	5
AVANT-PROPOS	7
PREMIERE PARTIE : DEROULEMENT D'UN CYCLE CELLULAIRE EN CONDITIONS NON-PERTURBEES ...	8
LA PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE VUE COMME UNE CASCADE DE SIGNALISATION : CHAQUE ETAPE PERMETTANT LA SUIVANTE	9
<i>Point de restriction et entrée irréversible dans le cycle.....</i>	9
<i>Réplication du matériel génétique en phase S.....</i>	11
<i>Régulation de l'entrée en mitose au cours de la phase G2.....</i>	18
RETENIR LA PROGRESSION DU CYCLE POUR EN ASSURER L'ORDRE	28
<i>Rôle et activation de la voie ATR/Chk1 en phase S non-perturbée</i>	29
<i>Régulation de la transition S/G2 par l'inhibition des Cdk.....</i>	33
DEUXIEME PARTIE : IMPACTS D'UN STRESS GENOTOXIQUE SUR LE DEROULEMENT DU CYCLE CELLULAIRE, DE LA PHASE S JUSQU'A LA MITOSE ET AU-DELA	36
MECANISMES MOLECULAIRES D'ACTIVATION DE LA VOIE ATR/CHK1	37
<i>Recrutement et activation d'ATR à la chromatine</i>	37
<i>Activation de Chk1 par ATR et rôle de la Claspine</i>	41
<i>Activation de Chk1 par autophosphorylation</i>	42
<i>Libération de la chromatine.....</i>	42
<i>Changements de conformation de Chk1</i>	43
<i>Substrats de Chk1.....</i>	44
LE STRESS REPLICATIF	45
<i>Sources de stress réplicatif</i>	45
<i>Effets d'un stress réplicatif</i>	48
LES CIBLES DU CHECKPOINT G2/M POUR INHIBER LA TRANSITION EN MITOSE	51
<i>Les cibles Cdc25 pour inhiber l'activité Cdk</i>	52
<i>Impact sur Aurora-A, Bora et Plk1</i>	54
<i>Induction de p53 et p21 et arrêt irréversible du cycle en G2</i>	55
<i>Activation de l'axe p53-p21 en condition de stress réplicatif.....</i>	57
<i>Répression du checkpoint et de la réparation par p53 et p21</i>	57
PERSISTANCE EN MITOSE DE STRUCTURES LIEES A UNE REPLICATION INCOMPLETE	58
<i>Stress réplicatif et expression des sites fragiles communs</i>	58
<i>Prise en charge des CFS en fin de G2 et en mitose.....</i>	60
CONSEQUENCES D'UN STRESS REPLICATIF EN MITOSE ET AU-DELA	63
LIMITES FONCTIONNELLES DU CHECKPOINT G2/M : COMMENT DES LESIONS DE L'ADN PEUVENT-ELLES PERSISTER EN MITOSE ?	70
<i>Adaptation au checkpoint : découverte chez la levure.....</i>	70

<i>Seuil et dose-réponse chez les mammifères en présence de cassures double-brin de l'ADN</i>	<i>71</i>
<i>Y-a-t-il une adaptation au checkpoint G2/M chez les mammifères en réponse aux cassures double brin ?</i>	<i>72</i>
<i>... Et suite a un stress réplicatif ?.....</i>	<i>76</i>
OBJECTIFS DE MON PROJET DE THESE	77
RÉSULTATS	79
RESULTATS ADDITIONNELS	137
DISCUSSION.....	149
<i>Développement d'un senseur FRET d'activité Chk1 : avantages et inconvénients</i>	<i>150</i>
<i>Activité Chk1 en phase S normale</i>	<i>152</i>
<i>Inactivation et ré-activation de Chk1 à la transition S/G2</i>	<i>155</i>
<i>Régulation de l'entrée en mitose en présence d'aphidicoline</i>	<i>159</i>
<i>Impact au cycle cellulaire suivant et evolution</i>	<i>161</i>
BIBLIOGRAPHIE	163

LISTE DES ABREVIATIONS

9-1-1	<i>Rad9-Hus1-Rad1</i>	KI	<i>Knock-In</i>
14-3-3	<i>Protéine de la famille 14-3-3</i>	KA1	<i>Domaine Kinase-Associated-1</i>
AND	<i>Acide Désoxyribonucléique</i>	Mek	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
ARPP19	<i>cAMP-regulated phosphoprotein 19</i>	MiDAS	<i>Mitotic DNA Synthesis</i>
ATR	<i>Ataxia-telangiectasia and Rad3-related</i>	Mus81	<i>Crossover junction endonuclease MUS81</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia Mutated</i>	MuvB	<i>Complexe de Lin9/37/52/54 et RBBP4</i>
AAD	<i>ATR-activating domain</i>	MCM2-7	<i>Minichromosome Maintenance Complex</i>
APC/C	<i>Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome</i>	Myt1	<i>Membrane associated tyrosine and threonine specific cdc2 inhibitor kinase</i>
53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>	MMS	<i>Methyl Methanesulfonate</i>
BrdU	<i>Bromodeoxyuridine</i>	MPF	<i>M-phase promoting factor</i>
B-TRCP	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin ligase</i>	Mrc1	<i>Mediator of replication checkpoint protein 1</i>
B-Myb	<i>Myb-related protein B</i>	MLL	<i>Histone Lysine N methyltransferase 2A</i>
BIR	<i>Break-Induced Replication</i>	NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i>
CCND	<i>Gène codant pour Cycline D</i>	NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
Cdc6	<i>Cell division cycle 6</i>	N-ter	<i>Extrémité N-terminale</i>
Cdc7	<i>Cell division cycle 7</i>	ORC	<i>Origin Recognition Complex</i>
Cdc25	<i>Cell division cycle 25</i>	p21	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
Cdc45	<i>Cell division cycle 45</i>	p53	<i>Cellular Tumor Antigen p53</i>
Cdt1	<i>Chromatin Licensing and DNA replication factor 1</i>	p107	<i>Retinoblastoma-like protein 1</i>
Cdt2	<i>Cell division cycle protein Cdt2</i>	p130	<i>Retinoblastoma-like protein 2</i>
Cdh1	<i>APC/C activator protein CDH1 ou Fizzy-related protein homolog</i>	Plk1	<i>Polo-like kinase 1</i>
Cdk1/2/4/6	<i>Cyclin-dependent kinase 1/2/3/4/6</i>	Plx1	<i>Homologue chez le Xénope de Plk1</i>
Chk1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>	PP2A	<i>Protéine Phosphatase 2A</i>
Chk2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>	PRP19	<i>Pre mRNA processing factor 19</i>
CKBD ou CKAD domain	<i>Chk1-kinase binding domain ou Chk1-kinase activating domain</i>	PRR	<i>Réparation post-réplivative</i>
CPT	<i>Camptothécine</i>	QIBC	<i>Quantitative Image-based Cytometry</i>
CFS	<i>Site fragile commun</i>	Ras	<i>GTPase HRas</i>
CRL4	<i>Cullin-RING Ligase 4</i>	Raf	<i>RAF proto-oncogene serine/threonine kinase</i>
C-ter	<i>Extrémité C-terminale</i>	Rad9 (yeast)	<i>DNA repair protein Rad9</i>
DSB	<i>Cassure double brin de l'ADN</i>	Rad18	<i>E3 ubiquitin-protein ligase RAD18</i>
dsDNA	<i>ADN double brin</i>	Rad53	<i>Serine/Threonine protein kinase RAD53</i>
Dbf4	<i>Dbf4-type zinc finger-containing protein 1</i>	RPA	<i>Replication Protein A</i>
Drf1	<i>Dbf4-related factor 1</i>	Rb	<i>Protéine Rétinoblastome</i>
DUE-B	<i>DNA unwinding element-binding protein B</i>	RNF8	<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF8</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>	RNF168	<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF168</i>
E2F	<i>Transcription Factor E2F</i>	RPE1	<i>Retinal pigmental epithelium 1</i>
EdU	<i>5-Ethynyl-2'-deoxyuridine</i>	RRM2	<i>Sous-unité M2 de la ribonucléotide réductase</i>
Emi1	<i>Early mitotic inhibitor 1</i>	SCF	<i>SKP1-CUL1-F-box protein complex</i>
EME1	<i>Crossover junction endonuclease EME1</i>	siRNA	<i>Petit ARN interférent</i>
EME2	<i>Crossover junction endonuclease EME2</i>	Skp2	<i>S-phase kinase associated protein 2</i>
ETAA1	<i>Ewing's Tumor associated antigen 1</i>	SHPRH	<i>E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>	Slx4	<i>Structure-specific endonuclease subunit SLX4</i>
ER	<i>Récepteur aux Œstrogènes</i>	SLX-MUS	<i>Complexe de Slx4-Slx1 et Mus81-Eme1</i>
ERCC1	<i>DNA excision repair protein ERCC-1</i>	ssDNA	<i>ADN simple brin</i>
FANCD2	<i>Fanconi Anemia Group D2 protein</i>	S	<i>Phase S</i>
G1	<i>Gap Phase 1</i>	TBP	<i>TATA Box Protein</i>
G2	<i>Gap Phase 2</i>	TCTP	<i>Translationally-controlled tumor protein 1</i>
GIN5	<i>Go-Ichi-Ni-San (Sld5, Psf1, Psf2, et Psf3)</i>	Tresline	<i>TopBP1-interacting, replication-stimulating protein</i>
HU	<i>Hydroxyurée</i>	TRAIIP	<i>E3 ubiquitin-protein ligase TRAIIP</i>
HLTF	<i>Helicase-like Transcription Factor</i>	TopBP1	<i>DNA topoisomerase-2 binding protein 1</i>
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>	UV	<i>Rayonnement Ultra-Violet</i>
IR	<i>Radiation Ionisantes</i>	UFB	<i>Ultra-Fine Bridge</i>
yH2AX	<i>H2A histone family member X, pS139</i>	U2OS	<i>Human Bone Osteosarcoma epithelial cells</i>
K27MGwl	<i>Mutant K27M de Greatwall</i>	Wee1	<i>Wee1-like protein kinase</i>
KO	<i>Knock-Out</i>	Wip1	<i>Protein Phosphatase 1D</i>
		XP-V	<i>Xeroderma Pigmentosum Variant</i>

TABLE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Libération d'E2F et hyperphosphorylation de Rb par Cycline E/Cdk2	p9
Figure 2 : Point de restriction et contrôle du licensing des origines	p12
Figure 3 : Activation des origines par Cdc7 et Cdk	p14
Figure 4 : Distribution des foyers PCNA au cours de la phase S	p15
Figure 5 : La dégradation de Cycline A2 en G2 empêche la mitose	p18
Figure 6 : Cycline A2 s'accumule dans le cytoplasme en G2	p19
Figure 7 : Contrôle de l'entrée en mitose chez les métazoaires	p21
Figure 8 : Plk1 est nécessaire pour l'entrée en mitose	p23
Figure 9 : Régulation de l'expression en G2 par FoxM1	p25
Figure 10 : ATR/Chk1 régule l'activité Cdk en phase S	p28
Figure 11 : Pic d'activité ATR en phase S non-perturbée	p32
Figure 12 : ATR/Chk1 empêche l'activation de FoxM1 en phase S	p34
Figure 13 : Activation de Chk1 par de l'ADN simple brin	p37
Figure 14 : Schéma d'une réversion de fourche	p39
Figure 15 : Activation d'ATR par une cassure double brin	p40
Figure 16 : Structure et domaines de Chk1	p43
Figure 17 : Structures pouvant perturber la progression de la fourche	p45
Figure 18 : Inhibition du firing des origines tardives par ATR/Chk1	p49
Figure 19 : Inhibition de l'entrée en mitose par ATR/Chk1	p51
Figure 20 : Induction de la dégradation de Cdc25A par Chk1	p52
Figure 21 : Induction de la sénescence en G2	p55
Figure 22 : Cassures chromosomiques aux CFS en métaphase	p58
Figure 23 : Les CFS sont pauvres en origines de réplication	p59
Figure 24 : Structures d'ADN qui pourraient persister en mitose aux CFS	p61
Figure 25 : Modèle spéculatif pour les mécanismes du MiDAS	p62
Figure 26 : Problèmes de ségrégation des chromosomes induits par un stress réplicatif	p63

Figure 27 : Induction transitoire d'un fuseau multipolaire en conditions de stress répliatif	p65
Figure 28 : L'hyperphosphorylation de Rb ne corrèle pas avec les dommages en G1	p67
Figure 29 : L'induction transitoire de p21 en G2 induit la quiescence en G1	p67
Figure 30 : Induction d'un arrêt en G1	p69
Figure 31 : Entrée en mitose en présence de cassures double brin	p72
Figure 32 : Plk1 inactive le checkpoint mais sensibilise aux dommages en fin de G2	p74
Figure 33 : Dégradation de Cycline B1 après IR	p75

ARTICLE

(Figures non numérotées)

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Figure 34 : La déplétion des endonucléases n'empêche pas la ré-activation en G2	p141
Figure 35 : L'hydroxyurée active Chk1 en S mais ne conduit pas à une ré-activation en G2	p143
Figure 36 : En absence de stress, Chk1 ne s'active que transitoirement dans les HeLa	p144
Figure 37 : Chk1 en G2 ne corrèle pas avec les MN ou avec les 53BP1 bodies	p147
Figure 38 : Le niveau de p21 augmente linéairement en G2	p148

DISCUSSION

Figure 39 : Détection indirecte d'une activité ATR en phase S par (Saldivar, 2018)	p150
Figure 40 : Modes d'activation de Chk1 en phase S	p152
Figure 41 : Régulation de l'activité Chk1 dans les cellules cancéreuses	p153
Figure 42 : Couplage répliation/expression des inducteurs mitotiques	p155
Figure 43 : Contrôle de l'entrée en mitose en présence d'aphidicoline	p159
Figure 44 : Prolifération ou quiescence au cycle suivant la ré-activation de Chk1 en G2	p161

AVANT-PROPOS

Le stress réplicatif est une source majeure d'instabilité génétique et pourrait jouer un rôle clé dans le développement tumoral précoce. Des mécanismes de surveillance (checkpoints) de l'intégrité de l'ADN sont actifs de manière soutenue dans les lésions pré-néoplasiques, où ils pourraient agir comme une barrière à la tumorigenèse. Pourtant, de nombreux travaux suggèrent que les checkpoints ne sont pas "infaillibles" et que suite à divers stress génotoxiques, des altérations de l'ADN peuvent persister jusqu'en mitose malgré des checkpoints fonctionnels. De l'ADN incomplètement répliqué peut notamment persister au niveau des sites fragiles communs (CFS) jusqu'en début de mitose, favorisant l'apparition de gaps et/ou cassures chromosomiques pouvant affecter la stabilité génétique de la descendance cellulaire. Le but de mon doctorat a été de déterminer comment est régulée l'activité du checkpoint de la réplication de l'ADN dans des cellules qui entrent en mitose malgré un stress réplicatif et d'autre part de mieux caractériser les mécanismes par lesquels les cellules entrent en mitose malgré la persistance d'altérations génétiques.

Dans ce cadre, Je me suis intéressé à la signalisation Chk1-dépendante, dont j'ai suivi l'activation dans chaque cellule unique en combinant l'utilisation d'un biosenseur FRET et des approches de vidéo-microscopie. Mes principaux résultats sont (i) la caractérisation de l'activité Chk1 au cours d'une phase S non-perturbée, (ii) la mise en évidence qu'en conditions de stress réplicatif, une fraction des cellules ré-active Chk1 au cours de la phase G2 par des mécanismes qui restent à caractériser et (iii) qu'une faible proportion de cellules entre en mitose malgré l'activation soutenue du checkpoint Chk1-dépendant, démontrant une adaptation à celui-ci (« checkpoint adaptation »).

Afin de faciliter la compréhension de mes résultats, l'introduction de mon manuscrit présentera (i) la régulation de la progression du cycle cellulaire en conditions *non-perturbées*, notamment les rôles connus de la signalisation ATR/Chk1 pour coordonner la réplication de l'ADN et l'entrée des cellules en mitose, puis (ii) l'impact d'un stress réplicatif et de l'activation des signalisations Chk1 et p53-dépendantes sur la progression du cycle cellulaire, la persistance éventuelle de structures anormales de l'ADN en mitose et les conséquences au cycle cellulaire suivant sur le maintien de la stabilité génétique.

PREMIERE PARTIE : DEROULEMENT D'UN CYCLE CELLULAIRE EN CONDITIONS NON-PERTURBEES

Dans cette partie, je présenterai le déroulement d'un cycle cellulaire "non-perturbé", avec une attention toute particulière aux signalisations intracellulaires qui relie les phases S, G2 et M (Mitose). Dans un premier temps, les phases successives du cycle cellulaire et les mécanismes qui promeuvent le passage d'une phase à la suivante seront présentés. Puis dans un second temps, ces mêmes étapes seront ré-explorées, mais cette fois à travers les mécanismes ATR/Chk1-dépendants, récemment mis à jour, qui en régulent négativement la progression et pourraient ainsi participer à en garantir l'exécution ordonnée dans le temps.

Cette partie me permettra ainsi de présenter les rôles multiples de la signalisation ATR/Chk1 en conditions non-perturbées, mais également d'introduire les nombreuses cibles par lesquelles la voie ATR/Chk1 peut réguler la progression du cycle cellulaire en conditions de stress génotoxiques variées.

LA PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE VUE COMME UNE CASCADE DE SIGNALISATION : CHAQUE ETAPE PERMETTANT LA SUIVANTE

POINT DE RESTRICTION ET ENTREE IRREVERSIBLE DANS LE CYCLE

L'entrée dans le cycle cellulaire dépend notamment de l'activation de voies de signalisation spécifiques par des facteurs de croissance extracellulaires. Si la cellule est « suffisamment » engagée dans le cycle cellulaire, la progression du cycle n'est plus strictement dépendante des facteurs de croissance et on dit alors que la cellule a passé le *point de restriction*.

Très brièvement, la présence de facteurs de croissance extracellulaires stimule notamment la voie Ras-Raf-MEK-ERK qui stabilise les protéine c-Jun et c-Fos et permet l'expression des Cyclines de type D. Les Cyclines D s'associent aux sous-unités catalytiques Cdk4 et Cdk6 et vont phosphoryler la protéine du retinoblastome (Rb), qui séquestre les facteurs de transcription de la famille E2F. Rb possède 14 sites de phosphorylation par les Cdk et leur phosphorylation complète (appelée *hyperphosphorylation*) permet la libération d'E2F ainsi que l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'initiation de la phase S, notamment les Cyclines E1 et E2 (Pennycook et Barr 2020).

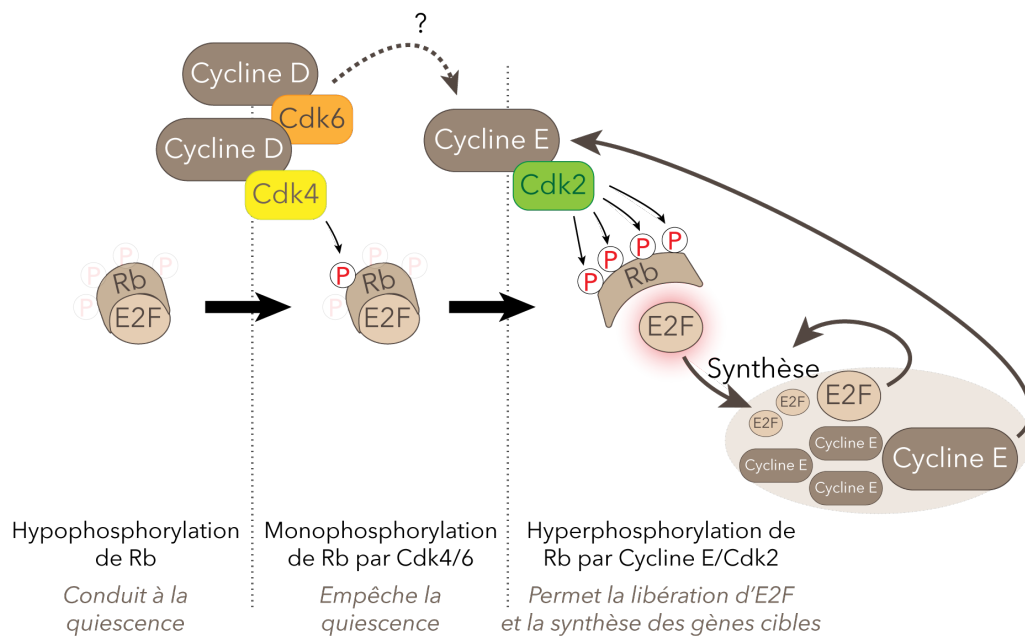


Figure 1 : Libération des facteurs de transcription E2F par l'activation de Cycline E1/Cdk2 et l'hyperphosphorylation de la protéine Rb (voir texte ci dessus)

Un modèle "ancien" proposait que la hausse de l'activité Cycline D/Cdk4-6 en phase G1 permettrait la phosphorylation progressive de la protéine Rb, entraînant la libération partielle d'E2F

(Henley et Dick 2012) et l'expression des Cyclines E (Pour revue (Bartek, Bartkova, et Lukas 1996)). Néanmoins, ce modèle est désormais en grande partie invalidé : il a en effet été montré via l'analyse des phospho-isoformes de Rb sur gels électrophorétiques à deux dimensions (2D) que Cycline D/Cdk4-6 ne peut que *mono*-phosphoryler Rb —ce qui n'est pas suffisant pour libérer le facteur E2F— et que les formes intermédiaires entre la mono-phosphorylation et l'hyperphosphorylation des 14 sites de Rb n'existent pas *in vivo* (Narasimha et al. 2014). La monophosphorylation de Rb survient dès 2h après stimulation par du sérum, mais l'hyperphosphorylation ne survient rapidement qu'entre 14h et 16h après stimulation et est strictement dépendante d'une activité Cdk2 (Narasimha et al. 2014). Cycline A2/Cdk2 ne joue pas de rôle dans le franchissement du point de restriction (Cappell et al. 2016; Spencer et al. 2013), mais la hausse de l'activité Cycline E/Cdk2 en G1 prédit parfaitement si la cellule va entrer en phase S ou en quiescence (Schwarz et al. 2018), **suggérant que seuls les complexes Cycline E/Cdk2 assurent l'hyperphosphorylation de Rb, la libération d'E2F et l'entrée des cellules en phase S. (Figure 1)**

Le rôle exact de Cycline D/Cdk4-6 dans l'entrée en phase S n'est pas totalement élucidé aujourd'hui, mais une activité Cdk4 est nécessaire pour maintenir une activité Cdk2 en G1 et permettre la prolifération cellulaire (Zerjatke et al. 2017; Chung et al. 2019; H. W. Yang et al. 2020). Par ailleurs, plusieurs hypothèses/modèles non détaillés ici ont été proposées pour expliquer comment Cycline E est exprimée et activée en phase G1, de manière *dépendante* ou *indépendante* d'une activité Cycline D/Cdk4-6, mais ceux-ci restent à confirmer expérimentalement (Pennycook et Barr 2020).

Une cible majeure en aval d'E2F est le gène codant pour Emi1 (Early mitotic inhibitor 1), un inhibiteur compétitif de l'E3 ubiquitine ligase APC/C^{Cdh1} (Frye et al. 2013; Hsu et al. 2002). L'inactivation d'APC/C^{Cdh1} précède la synthèse d'ADN (Cappell et al. 2016) et joue un rôle critique dans l'entrée et l'exécution de la phase S, vraisemblablement en permettant la stabilisation de cibles d'APC/C^{Cdh1} essentielles au déroulement de la phase S, comme Cycline A2 (Di Fiore et Pines 2007; Hsu et al. 2002; Cappell et al. 2016). L'inactivation d'APC/C^{Cdh1} est également promue via la phosphorylation de Cdh1 par Cdk2, ce qui empêche sa liaison à l'APC/C (Sørensen et al. 2001). Ce double mécanisme - expression d'Emi1 et activation de Cdk2 - permet en moins d'une 1h l'inhibition presque complète d'APC/C^{Cdh1} à la transition G1/S (Cappell et al. 2016).

L'ensemble de ces données converge vers le modèle actuel suivant où l'émergence d'une activité Cycline E/Cdk2 en G1 permet l'hyperphosphorylation de Rb et l'affranchissement de la dépendance aux facteurs de croissance. L'hyperphosphorylation de Rb libère les facteurs de transcription de la famille E2F, qui ciblent et permettent l'expression d'un très grand nombre de gènes impliqués dans la phase S, dont Cycline A2. Néanmoins, Cycline A2 est constamment dégradée par APC/C^{Cdh1}, ce qui empêche son accumulation. Emi1, une autre cible des facteurs E2F, va collaborer avec Cycline E/Cdk2 pour inhiber le complexe APC/C^{Cdh1}. Cette inhibition permet l'accumulation de Cycline A2 et l'initiation de la réplication du génome. (Figure 2)

REPLICATION DU MATERIEL GENETIQUE EN PHASE S

Notre connaissance de l'initiation de la réplication de l'ADN a fortement bénéficié du modèle levure *S. cerevisiae*, chez qui ce processus a pu être entièrement reconstitué *in vitro* à partir de protéines purifiées (Yeeles et al. 2015). Chez les eucaryotes, l'initiation de la réplication peut être divisée en au moins deux étapes distinctes : l'assemblage ou *licensing* puis l'activation ou le *firing* des origines de réplication. Au cours du *licensing*, des complexes de pré-réplication incluant notamment l'hélicase MCM2-7 sont recrutés au niveau de régions spécifiques du génome, puis au cours du *firing*, le recrutement de facteurs protéiques additionnels vont permettre l'activation d'une fraction de ces origines de réplication et la formation de deux fourches de réplication divergentes.

ÉTAPES PERMETTANT LE RECRUTEMENT DE L'HELICASE MCM2-7 AUX ORIGINES DE REPLICATION (« LICENSING » DES ORIGINES)

Chez la levure *S. cerevisiae*, des travaux précurseurs ont identifié des éléments de séquences spécifiques capables d'initier la réplication (Stinchcomb, Struhl, et Davis 1979), mais chez les métazoaires aucun élément de séquence « universel » n'a à ce jour été identifié permettant de prédire totalement la localisation d'une origine de réplication, bien que certaines propriétés de l'ADN y soient fréquemment enrichies (pour revues (Prioleau et MacAlpine 2016; Ganier et al. 2019)).

D'un point de vue mécanistique, les protéines du complexe de reconnaissance des origines de réplication ORC 1-6 (*Origin Recognition Complex*) se lient directement à l'ADN, puis collaborent avec les facteurs Cdc6 et Cdt1 pour permettre le recrutement d'un double hexamère de l'hélicase répllicative MCM2-7 (MCM – *Mini-Chromosome Maintenance protein complex*). L'hélicase MCM2-7 est indispensable à la réplication de l'ADN mais son simple recrutement (« *licensing* » des origines) ne suffit pas à son activation, et des étapes ultérieures sont nécessaires pour former un réplisome actif (voir ci-dessous; pour revues (Parker, Botchan, et Berger 2017; Fragkos et al. 2015; Masai et al. 2010)).

RESTRICTION DU RECRUTEMENT DE L'HELICASE MCM2-7 A LA PHASE G1 POUR EMPECHER LA RE-REPLICATION

Afin d'éviter une re-réplication de régions du génome déjà répliquées, il existe une séparation temporelle stricte entre le recrutement de MCM2-7 aux origines de réplication en phase G1 et l'activation de ces origines et le processus effectif de réplication du génome en phase S (**résumé en Figure 2**).

La libération d'E2F décrite précédemment permet l'expression de Cdc6 et Cdt1 et le recrutement de MCM2-7 aux origines de réplication en phase G1 (Grant et al. 2013; Leone et al. 1998; Yoshida et Inoue 2004; Nishitani et al. 2001), mais aboutit également à l'inactivation d'APC/C^{Cdh1} et à la stabilisation de ses substrats, notamment Skp2, induisant l'assemblage de l'E3 ubiquitine ligase SCF^{Skp2} (Bashir et al. 2004). Cdt1 et Orc1 sont des substrats de SCF^{Skp2}, ce qui participe à leur dégradation en phase S et limite ainsi le recrutement *de novo* de complexes MCM2-7 supplémentaires (Li et al. 2003, 2; Nishitani et al. 2006; Méndez et al. 2002).

L'E3 ubiquitine ligase CRL4^{cdt2} participe également à la régulation du niveau de Cdt1 chez le Xénope, *C. elegans* et l'homme. Cdt1 possède un domaine très conservé d'interaction à PCNA¹ et plusieurs indices suggèrent que la dégradation de Cdt1 par CRL4^{cdt2} est dépendante de la localisation de PCNA à la chromatine, et donc d'une réplication active ((Arias et Walter 2006; Hu 2006; Nishitani et al. 2001; Courtney G. Havens et Walter 2009; Nishitani et al. 2006); pour revue (C. G. Havens et Walter 2011)).

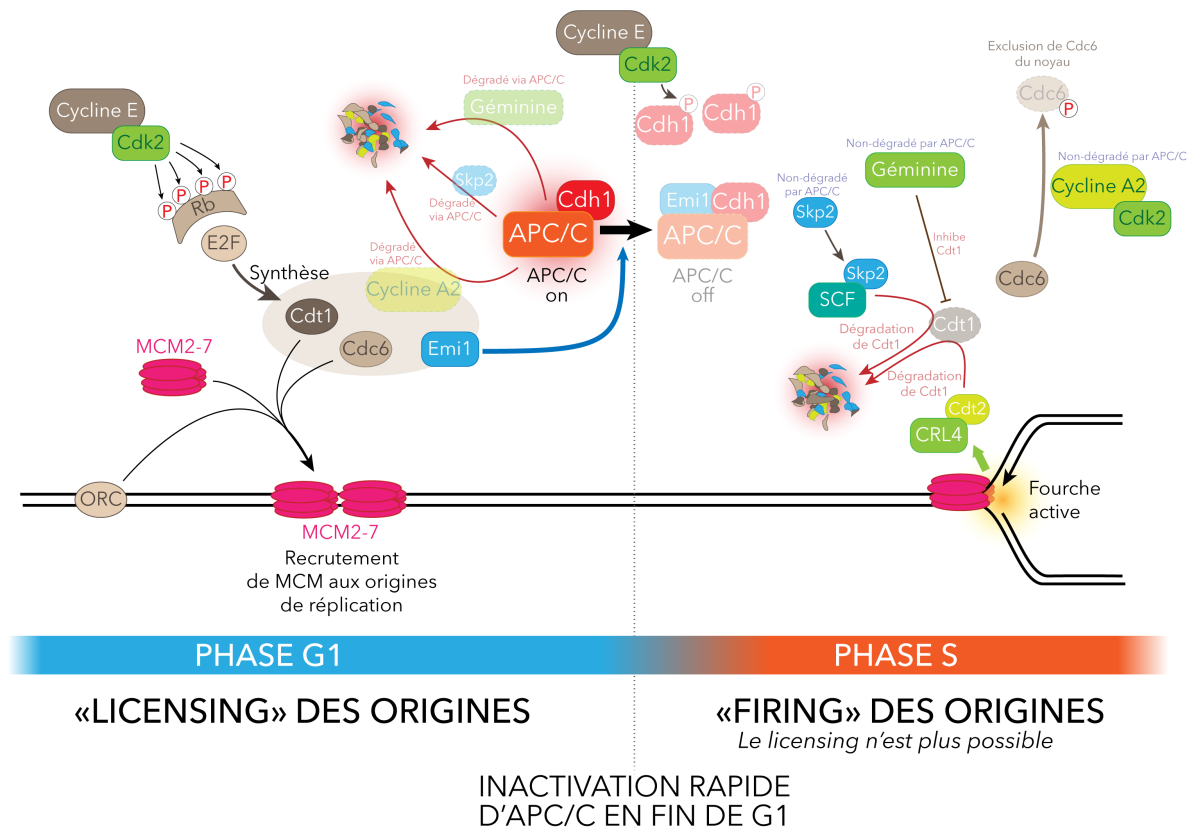


Figure 2 : Schéma récapitulatif des principales étapes du passage du point de restriction, de son couplage avec l'initiation de la réplication de l'ADN et des mécanismes pour éviter la re-réplication. La phosphorylation de Rb par Cycline E/Cdk2 induit la libération d'E2F et l'expression des gènes cibles, notamment Cdt1 et Cdc6. Cdt1 et Cdc6 vont participer avec le complexe ORC 1-6 au recrutement de l'hélicase MCM2-7 à la chromatine. La libération d'E2F permet également l'expression d'Emi1, dont l'accumulation (accompagnée de phosphorylations inhibitrices de Cdk2 sur Cdh1) va induire l'inactivation d'APC/C-Cdh1. L'inactivation d'APC/C-Cdh1 permet la stabilisation de la gémimine, de Skp2 et de Cycline A2 : Skp2 va interagir avec l'E3 ubiquitine ligase SCF pour induire l'ubiquitination et la dégradation de Cdt1, la gémimine va interagir avec Cdt1 pour l'inhiber, tandis que la phosphorylation de Cdc6 par Cycline A2/Cdk2 induit son export nucléaire. En parallèle, la présence de PCNA à la chromatine —qui indique l'activation d'origines de réplication— va permettre à l'ubiquitine ligase CRL4^{cdt2} d'induire également la dégradation de Cdt1. L'ensemble de ces processus permet d'empêcher un second recrutement de complexes MCM au niveau des origines de réplication et ainsi de garantir que le génome ne sera dupliqué qu'une seule fois par cycle cellulaire.

¹ Facteur de processivité des polymérase répliquatives. PCNA forme une structure en anneau et est nécessaire *in vivo* à la progression de la fourche de réplication.

Un troisième mécanisme d'inhibition de Cdt1 a été identifié : la protéine géminine interagit avec Cdt1 et inhibe son activité de recrutement de MCM2-7 à la chromatine (Tada et al. 2001; Wohlschlegel et al. 2000). L'expression de la géminine est également induite par E2F (Yoshida et Inoue 2004), mais est efficacement dégradée par APC/C^{Cdh1} (Sakaue-Sawano et al. 2008; McGarry et Kirschner 1998). L'inactivation d'APC/C^{Cdh1} permet donc l'accumulation de la géminine en phase S (Cappell et al. 2016) et son inhibition de Cdt1.

Enfin, Cdc6 est progressivement exclue du noyau en phase S, via sa phosphorylation par Cycline A2/Cdk2 (mais pas Cycline E1/Cdk2), contribuant à limiter le *licensing* des origines de réplication en phase G1 (Petersen 1999; Saha et al. 1998).

Ces résultats suggèrent un modèle dans lequel le recrutement de MCM2-7 aux origines de réplication commence avec l'activation de Cycline E/Cdk2 et la libération d'E2F mais est rapidement stoppé peu après l'inactivation d'APC/C^{Cdh1}; soit une fenêtre temporelle estimée d'environ une à deux heures (Cappell et al. 2016; Spencer et al. 2013). L'incorporation de BrdU n'ayant lieu qu'après l'inactivation d'APC/C^{Cdh1} (Cappell et al. 2016), **il existe donc une séparation temporelle stricte entre le recrutement de MCM2-7 à la chromatine (avant l'inactivation d'APC/C^{Cdh1}) et le processus de réplication en lui-même (après l'inactivation d'APC/C^{Cdh1}) (Figure 2).**

L'ACTIVATION (« FIRING ») DES ORIGINES DE REPLICATION

ÉTAPES MENANT AU RECRUTEMENT DU REPLISOME ET A L'ACTIVATION DE L'HELICASE MCM

Tout comme le recrutement de l'hélicase MCM2-7 aux origines de réplication, les processus moléculaires menant à l'activation de l'hélicase et à l'initiation effective de la réplication de l'ADN (« *firing* ») ont été récapitulés *in vitro* à l'aide de protéines de levure purifiées (Yeeles et al. 2015). En bref, l'hélicase MCM2-7 est recrutée aux origines de réplication par Cdc6, Cdt1 et les complexes ORC, mais les hexamères isolés de MCM2-7 ne possèdent que peu d'activité hélicase (Ishimi 1997; Ilves et al. 2010) et vont nécessiter leur interaction avec Cdc45 et le complexe GINS (Go-Ichi-Ni-San) pour être pleinement actifs ((Ilves et al. 2010); pour revue (Parker, Botchan, et Berger 2017)). **Le complexe moléculaire formé par Cdc45, MCM2-7 et GINS est appelé CMG, et son assemblage nécessite l'action concertée de deux kinases : Cdc7 (et ses sous unités régulatrices Dbf4 et Drf1) ainsi que les complexes Cycline/Cdk actifs en phase S.**

LES KINASES CDC7 ET CYCLINE E ET A2/CDK2 SONT NECESSAIRES A LA REPLICATION

Chez la souris, l'inactivation de Cdc7 est embryonique létale (J. M. Kim 2002) et l'injection d'un anticorps anti-Cdc7 en mitose dans des cellules HeLa empêche l'incorporation de BrdU, un analogue de la thymidine, au cycle cellulaire suivant (Jiang 1999), suggérant que Cdc7 est nécessaire à la réplication. Chez les métazoaires, Cdc7 phosphoryle MCM2 et MCM4 *in vitro* et *in vivo* (Jares et Blow 1999; H. Kumagai et al. 1999; Ishimi et al. 2001; Masai et al. 2000; 2006) ce qui pourrait participer à leur activation (Tsuji, Ficarro, et Jiang 2006). Pour être active, Cdc7 nécessite son association à une sous-unité régulatrice qui peut être Dbf4 (H. Kumagai et al. 1999; Jares, Luciani, et Blow 2004) ou Drf1 (A. Montagnoli 2002, 1; Yoshizawa-Sugata et al. 2005, 1; Silva et al. 2006).

Les complexes Cycline A2/Cdk présents en phase S sont également nécessaires à la réplication. Dans les cellules humaines, Cycline A2 et Cdk2 co-localisent avec les foyers d'incorporation BrdU (Cardoso, Leonhardt, et Nadal-Ginard 1993) et Cycline A2 interagit spécifiquement avec MCM7 (Chibazakura et al. 2011). De manière notable, l'expression ectopique d'un mutant de Cycline A2 incapable de lier MCM7 mais dont l'activité H1 kinase associée est équivalente au complexe Cycline A2/Cdk sauvage ne peut pas compenser l'arrêt à la transition G1/S observé après déplétion de Cycline A2 endogène par siRNA (Chibazakura et al. 2011), suggérant ainsi que la localisation de Cycline A2 à proximité de l'hélicase MCM joue un rôle important en phase S. Dans le même sens, la microinjection dans des cellules humaines d'anticorps ou d'oligonucléotides antisens dirigés contre Cycline A2 empêche durablement l'incorporation de BrdU (Girard, Lamb, et Fernandez 1991). On remarquera que la déplétion de Cycline A2 n'empêche pas l'inactivation d'APC/C^{Cdh1} (Spencer et al. 2013; Cappell et al. 2016) (Figure 2), l'absence de réplication suite à l'inactivation de Cycline A2 n'est donc pas due à un blocage *avant* la transition G1/S, mais bien à **une dépendance pour Cycline A2 en phase S**.

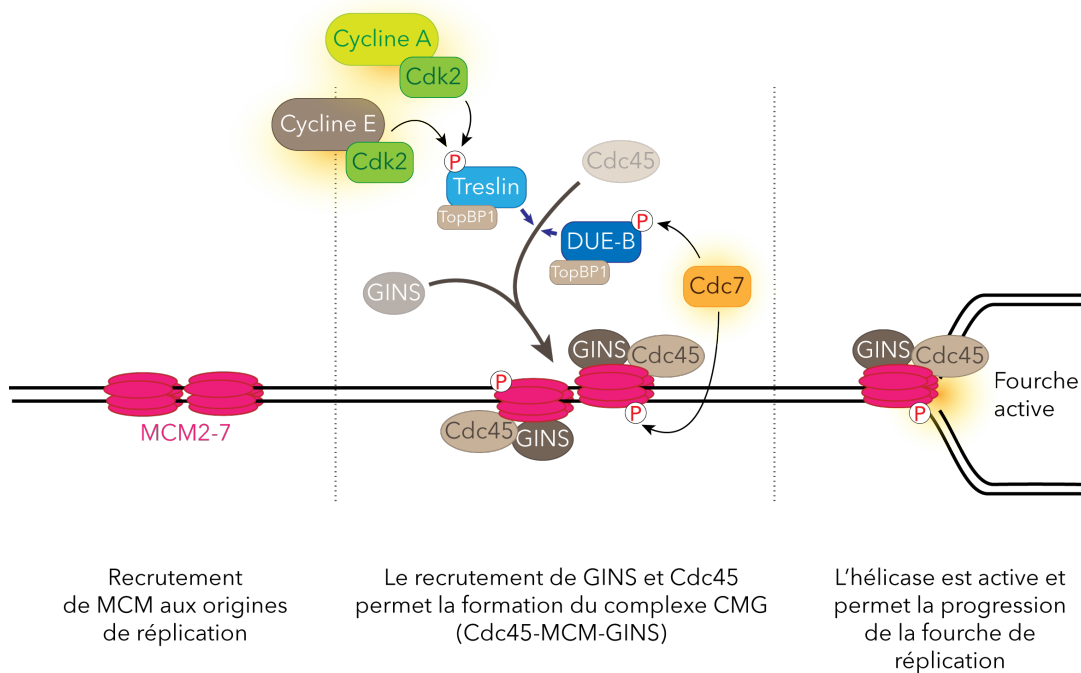


Figure 3 : Contrôle de l'activation (« firing ») des origines de réplication par Cdc7 et Cycline E/Cdk2 (alternativement Cycline A2/Cdk2). La phosphorylation de la Tresline par les complexes Cycline E/Cdk2 (puis Cycline A2/Cdk2 ou possiblement A2/Cdk1 plus tardivement en phase S) ainsi que de DUE-B par Cdc7 permet le recrutement de Cdc45 aux origines de réplication. Avec le recrutement additionnel du complexe GINS, cela permet la formation du complexe CMG (Cdc45-MCM-GINS) qui est indispensable à l'activité hélicase. Enfin, la phosphorylation de plusieurs sous-unités du complexe MCM par Cdc7 permet également l'activation de l'hélicase et l'initiation de la réplication.

REGULATION DE L'INITIATION PAR LES KINASES CDK ET CDC7

En plus de la phosphorylation des complexes MCM par Cdc7, les kinases Cdk et Cdc7 pourraient réguler l'initiation de la réplication via la phosphorylation de la **Tresline** et de **DUE-B**, dont les

homologues chez la levure jouent un rôle critique dans le recrutement de Cdc45 (Yeeles et al. 2015). Chez l'homme, la Tresline interagit avec Cdc45 et TopBP1 (Schmidt et al. 2008) et il a été montré dans des extraits d'ovocytes de Xénope que la Tresline et son interaction avec TopBP1 est nécessaire au recrutement de Cdc45 à la chromatine et à la réplication (A. Kumagai et al. 2010). Chez l'homme et le Xénope, cette interaction dépend de la phosphorylation de la Tresline par Cdk2 (Schmidt et al. 2008; A. Kumagai et al. 2011). DUE-B co-immunoprécipite également avec Cdc45 et TopBP1 dans les cellules humaines (Chowdhury et al. 2010) et la mutation en alanines de sites de DUE-B phosphorylables par Cdc7 supprime le recrutement de Cdc45 à la chromatine (Gao et al. 2014). Enfin, l'inhibition de Cdk2 ou la déplétion de Cdc7 perturbe la formation du complexe formé par MCM10, RECQ4 et And-1, qui est également indispensable à l'activation des fourches de réplication (Im et al. 2015). **L'ensemble de ces résultats indique que les kinases Cdc7 et Cycline E/cdk2 puis A2/Cdk2 régulent l'activation des origines de réplication (Figure 3).**

ORGANISATION SPATIO-TEMPORELLE DE LA REPLICATION

Après synchronisation en G0 par carence en sérum, la relâche des cellules en présence d'un inhibiteur pharmacologique de Cdc7 empêche l'entrée en S et l'incorporation de BrdU. D'autre part, l'inhibition de Cdc7 spécifiquement *en phase S* ralentit également fortement la progression du cycle cellulaire (Alessia Montagnoli et al. 2008), **indiquant que les fourches de réplication ne sont pas toutes activées simultanément par Cdc7 en début de S, mais qu'elles le sont également au cours de la progression en phase S.**

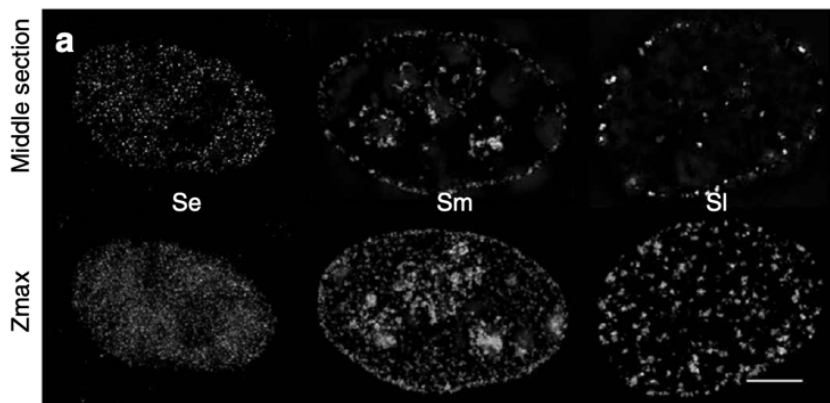


Figure 4 : Différence de localisation des foyers PCNA entre le début (Se), le milieu (Sm) et la fin (SI) de la phase S. Microscopie à super-résolution (3D-SIM). La ligne supérieure (« Middle Section ») montre une coupe optique, tandis que la ligne inférieure (« Zmax ») montre la projection en Z du maximum d'intensité de chaque coupe. Adapté de (Löb et al. 2016).

Le suivi de la réplication de l'ADN par incorporation de nucléosides synthétiques (EdU ou BrDU), ou alternativement via l'expression de formes étiquetées fluorescentes de protéines centrales de la réplication comme PCNA a permis d'observer qu'*in vivo*, la réplication du génome suit un programme spatial et temporel précis (O'Keefe 1992; Leonhardt et al. 2000). En début de phase S, apparaissent une multitude de petits foyers de réplication distribués quasi uniformément dans l'ensemble du volume du noyau. En milieu de S, les foyers de réplication apparents sont légèrement plus larges et intenses et sont distribués préférentiellement à la périphérie du noyau et/ou du nucléole. Puis, en fin de phase S, apparaissent de larges foci composés de nombreux foyers de

réplication individuels (Chagin, Stear, et Cardoso 2010; Chagin et al. 2016) (Figure 4). Les origines de réplication actives précocement sont préférentiellement enrichies dans l'euchromatine, tandis que l'hétérochromatine est répliquée plus tardivement (Rhind et Gilbert 2013). En accord avec ces données, l'hétérochromatine est plus périphérique, là où sont situés les foyers de réplication activés en milieu et fin de phase S. De manière notable, les différents patterns de réplication (couramment appelés « early », « mid » et « late ») n'ont pas la même durée et la distribution dite « early S » avec un grand nombre de petits foyers de réplication dure ainsi presque la moitié de la phase S (Dimitrova et Gilbert 1999).

Différentes approches de génomique ont permis de cartographier jusqu'à >100,000 origines de réplication chez différentes espèces de mammifères, mais seule une fraction de ces origines est effectivement utilisée au cours d'une phase S normale (Ganier et al. 2019; Prioleau et MacAlpine 2016; Cayrou et al. 2011). Dans les cellules HeLa, un article récent compare la taille du génome (mesurée à ~10 Gbp) à la distance inter-origine (mesurée à ~188 kbp) et estime ainsi que ~50,000 origines sont nécessaires à la réplication complète du génome dans cette lignée (Chagin et al. 2016), un nombre compatible avec de précédentes estimations chez les mammifères (Cayrou et al. 2011; Ganier et al. 2019). En rapportant la taille du génome (~10 Gbp) à la vitesse des fourches de réplication (mesurée à 1.65 kbp/min) et à la durée de la phase S (mesurée à ~570 min), les auteurs estiment qu'en moyenne 10,000 fourches sont actives simultanément à tout instant au cours de la phase S (Chagin et al. 2016).

CONTROLE DU TIMING DE REPLICATION

Bien que ceux-ci restent peu compris, les hypothèses sur les mécanismes régulant l'activation des origines de réplication dans l'espace et dans le temps sont multiples. Il est aujourd'hui clair que l'organisation spatiale de la chromatine corrèle avec les domaines qui organisent temporellement la réplication (Pope et al. 2014; Aladjem et Redon 2017; Gilbert et al. 2010). De manière notable, la déplétion ou l'inactivation de Rif1, une protéine enrichie au niveau de régions répliquées tardivement (Foti et al. 2016), conduit à *la fois* à des modifications de la structure de la chromatine et à la modification d'interactions entre certaines régions de l'ADN, *mais aussi* à une réplication plus précoce de certaines régions tardives (Yamazaki et al. 2012; Foti et al. 2016). L'organisation de la chromatine n'est cependant sans doute pas le seul facteur régulant le programme spatio-temporel de réplication et un certain nombre de modifications épigénétiques pourraient également être impliquées dans l'activation des origines de réplication (pour revue (Aladjem et Redon 2017)) et dans la régulation du *timing* de réplication (Brustel et al. 2017).

LA MECANIQUE GLOBALE DU CYCLE CELLULAIRE EST-ELLE EGALEMENT IMPLIQUEE DANS LE CONTROLE DU TIMING DE REPLICATION ?

Cycline A2 s'associe à Cdk2 tout au long de la phase S, mais ne commence à former des complexes avec la sous-unité catalytique Cdk1 qu'en milieu de S dû à une différence d'affinité pour Cdk2 versus Cdk1 (voir ci-dessous, (K. A. Merrick et al. 2008)). Allant dans le sens d'un rôle des Cycline/Cdk, notamment Cycline A2/Cdk1 ou Cdk2, dans la régulation *temporelle* de la réplication,

l'expression ectopique d'une fusion constitutivement active du complexe tardif Cycline A2-Cdk1 induit dès le début de phase S la réplication de certaines régions normalement répliquées tardivement, tandis qu'à l'inverse l'expression ectopique d'une fusion constitutivement active du complexe précoce Cycline A2-Cdk2 n'a pas d'effet sur ces mêmes régions tardives (Katsuno et al. 2009). De manière complémentaire, une immunoprécipitation de la chromatine (« ChIP ») par un anticorps anti-Cdk2 permet de récupérer essentiellement des régions répliquées précocement, alors qu'une ChIP anti-Cdk1 récupère également des régions plus tardives (Katsuno et al. 2009), **ce qui suggère que dans les cellules humaines, l'assemblage de complexes Cycline A2/Cdk1 en milieu de S pourrait promouvoir l'activation d'origines de réplication tardives.**

REGULATION DE L'ENTREE EN MITOSE AU COURS DE LA PHASE G2

La phase G2 a récemment connu un important regain d'intérêt, lié à la mise en évidence de voies de signalisation connectant la réplication de l'ADN en phase S et le contrôle de l'entrée des cellules en mitose.

CYCLINE A2 : LIEN ENTRE REPLICATION DE L'ADN ET ENTREE EN MITOSE

La cycline A2 est la principale cycline exprimée au cours de la phase S. Majoritairement nucléaire, elle co-localise avec les foyers de réplication (Cardoso, Leonhardt, et Nadal-Ginard 1993) et intervient, au moins en partie, via son activité Cdk dans l'activation spatio-temporelle des origines de réplication (Katsuno et al. 2009). De manière remarquable, les complexes Cycline A2/Cdk(1/2) jouent également un rôle majeur dans le contrôle de l'entrée en mitose : cette double fonction suggère que **la régulation spatio-temporelle de l'activité Cycline A2-Cdk est centrale dans le couplage mécanistique entre la réplication de l'ADN et l'entrée des cellules en mitose** (Gheghiani et al. 2017).

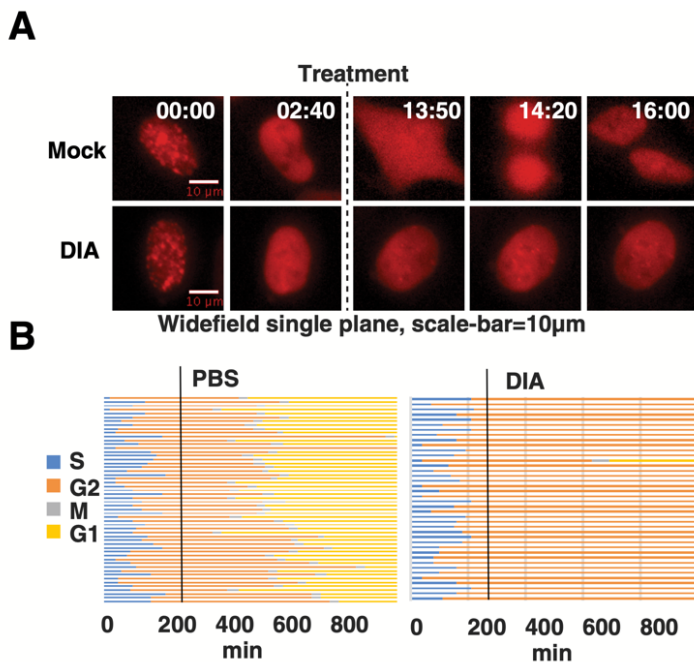


Figure 5 : Cycline A2 est nécessaire en phase G2 pour initier l'entrée des cellules en mitose.

A et B: Dans la lignée cellulaire humaine hTERT-RPE-1 exprimant de manière stable PCNA étiquetée avec un variant fluorescent et dont la protéine Cycline A2 endogène est fusionnée à un motif de dégradation (dégron) inducible, l'induction de la dégradation de Cycline A2 (+ DIA) en phase G2 (identifiable d'après la disparition des foyers PCNA) inhibe l'entrée des cellules en mitose. Adapté de (Hégarat et al. 2020)..

CYCLINE A2 ET ENTREE DES CELLULES EN MITOSE

Plusieurs équipes ont mis en évidence que la déplétion de Cycline A2 par ARN interférence retarde la condensation de l'ADN, la phosphorylation de l'histone H3 et l'entrée des cellules en mitose (D. Gong et al. 2007; D. Gong et Ferrell 2010; De Boer et al. 2008; Fung, Ma, et Poon 2007). Plus récemment, des travaux élégants ont montré que la dégradation inducible de Cycline A2 endogène dans des cellules humaines non-transformées (hTert-RPE-1) empêche l'entrée des cellules en mitose, y compris lorsque la dégradation est induite spécifiquement en G2 après la disparition des foyers PCNA (Figure 5) (Hégarat et al. 2020). Ces résultats suggèrent donc que Cycline A2 est nécessaire à l'entrée en mitose indépendamment de son rôle au cours de la phase S, une hypothèse renforcée par des expériences pionnières de micro-injection du complexe Cycline A2/Cdk2

purifié ou alternativement d'anticorps bloquant dans des cellules synchronisées en phase G2 (voir ci-dessous (Pagano et al. 1992; Furuno, den Elzen, et Pines 1999)).

Au cours de la progression S/G2, Cycline A2 est sujette à une modification de sa distribution intracellulaire et de ses partenaires Cdk (Cdk2 versus Cdk1), tandis que l'activité globale des complexes Cycline A2/Cdk augmente progressivement. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces changements et leurs conséquences en termes de signalisation ne sont pas complètement compris, mais leur timing suggère un rôle dans l'induction de l'entrée des cellules en mitose.

CHANGEMENT DE LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE CYCLINE A2 A LA TRANSITION S/G2

Cycline A2 est exprimée à partir de la transition G1/S, est localisée exclusivement dans le noyau en phase S et voit son expression augmenter au cours de la progression S et G2. **En phase G2, identifiée par la disparition des foyers de réplication PCNA+, Cycline A2 continue à s'accumuler dans le noyau, mais commence également à être localisée dans le cytoplasme** (Zerjatke et al. 2017; Cascales et al. 2017; Pines, Hunter, et Diego 1991) (**Figure 6**).

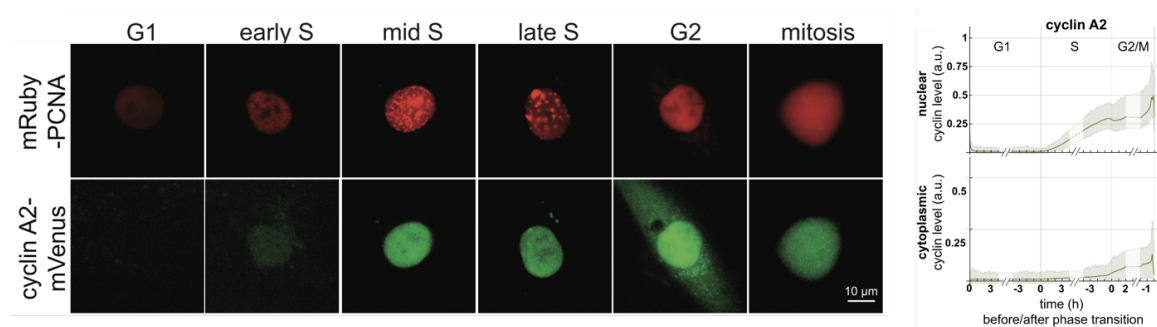


Figure 6 : Localisation cytoplasmique de Cycline A2 au cours de la phase G2. La localisation de Cycline A2 dans le noyau et le cytoplasme est suivie au cours du temps par vidéo-microscopie dans une lignée humaine non-transformée (hTert-RPE1) dont les protéines endogènes PCNA et Cycline A2 ont été étiquetées par des variants fluorescents différents. Adapté de (Zerjatke et al. 2017).

Le mécanisme par lequel Cycline A2 est adressée au cytoplasme reste mal compris. Bien que la délétion de certaines régions de Cycline A2 peut favoriser une localisation nucléaire ou cytoplasmique (Maridor et al. 1993), Cycline A2 ne contient pas de séquence NLS connue et sa localisation cytoplasmique en G2 est insensible aux inhibiteurs de l'exportine (Jackman et al. 2002). De manière notable, ni l'inhibition des Cdk en G2, ni leur stimulation via l'inhibition de la kinase inhibitrice Wee1 n'affecte le niveau de Cycline A2 dans le cytoplasme, suggérant que cette localisation n'est pas dépendante de l'activité Cdk globale (Cascales et al. 2017). Cependant, une Cycline A2 mutée au niveau du site d'interaction avec les Cdk est fortement cytoplasmique (Jackman et al. 2002), suggérant que son association progressive avec Cdk1 versus Cdk2 pourrait potentiellement jouer un rôle dans la localisation cytoplasmique, ce qui reste à démontrer.

Il est aujourd'hui inconnu si ce changement de localisation joue un rôle dans le contrôle et/ou le timing de l'entrée en mitose, mais plusieurs acteurs de l'entrée en mitose sont quasi-

exclusivement localisés dans le cytoplasme, notamment Bora (Wytse Bruinsma et al. 2015) et Cycline B1 (Pines, Hunter, et Diego 1991; Gavet et Pines 2010b), et plusieurs travaux supportent que l'activation initiale du complexe Cycline B1/Cdk1 (ou MPF, "Mitosis Promoting Factor") a lieu dans le cytoplasme (Jackman et al. 2003; Gavet et Pines 2010b). Allant dans le même sens, une pré-publication montre que l'interaction entre Cycline A2, Bora et Plk1, qui est critique pour promouvoir l'entrée en mitose (voir ci-dessous), a lieu spécifiquement dans le cytoplasme et non dans le noyau (Cascales et al. 2017). Si il se vérifie que cette interaction est uniquement cytoplasmique, cela donnerait une importance critique à la re-localisation cytoplasmique de Cycline A2 pour promouvoir l'entrée des cellules en mitose.

CHANGEMENT DE PARTENAIRE DE CYCLINE A2

De manière élégante, il a été montré via l'immunoprécipitation de Cdk2 ou Cdk1 dans des cellules humaines synchronisées par élutriation que **Cycline A2 interagit avec Cdk2 depuis le début de la phase S jusqu'à la mitose, mais n'interagit avec Cdk1 qu'à partir du milieu de la phase S** (K. A. Merrick et al. 2008). L'expression de Cdk1 et Cdk2 étant constante au cours du cycle cellulaire et Cdk1 étant environ dix fois en excès par rapport à Cdk2 (K. A. Merrick et al. 2008; Arooz et al. 2000), l'aspect séquentiel de l'association de Cycline A2 à Cdk2 puis Cdk1 est particulièrement remarquable. De manière notable, les complexes Cyclines A2/Cdk1 se forment au moment où l'interaction entre Cycline A2 et Cdk2 n'augmente plus, probablement dû à la diminution du pool de Cdk2 libre (K. A. Merrick et al. 2008), suggérant que Cycline A2 a une meilleure affinité pour Cdk2 que pour Cdk1. On notera que chez le Xénope, l'activité Cycline A2/Cdk1 est indispensable à l'activation de Plk1 et l'entrée en mitose, tandis que Cdk2 est totalement dispensable (Vigneron et al. 2018). A contrario, l'importance relative des complexes Cycline A2/Cdk1 et Cycline A2/Cdk2 pour l'entrée en mitose dans les cellules de mammifères reste mal comprise, compte tenu du fait que la micro-injection du complexe Cycline A2/Cdk2 purifié promeut une entrée prématurée en mitose (Pagano et al. 1992; Furuno, den Elzen, et Pines 1999).

AUGMENTATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE CYCLINE A2/CDK EN PHASE G2

Plusieurs travaux ont montré que l'activité Cdk2, mesurée par un test "H1 kinase" utilisant l'histone H1 purifié comme substrat *in vitro*, augmente au cours de la progression S et G2 (Gu, Rosenblatt, et Morgan 1992; Goldstone et al. 2001; Pagano et al. 1992). Cycline B1 ne forme pas de complexe *in vivo* avec Cdk2 (K. A. Merrick et al. 2008) et il a été déterminé avec un senseur FRET (Förster Resonance Energy Transfer) de Cycline B1-Cdk1 que l'activité de ce complexe augmente rapidement environ 30 min (27 ± 7 min) avant la NEBD dans des cellules humaines (Gavet et Pines 2010a; 2010b). Il est donc vraisemblable que l'activité Cdk2 observée en G2 corresponde intégralement à celle du complexe Cycline A2/Cdk2. Comme mentionné ci-dessus, Cycline A2 forme également un complexe avec Cdk1 et bien qu'il soit techniquement difficile de suivre *spécifiquement* l'activité Cycline A2/Cdk1, certaines données suggèrent que l'activité Cycline A2/Cdk1 augmente également en G2. En effet, le profil d'activité H1 kinase associée à Cycline A2 immunoprécipitée à différents temps de relâche après synchronisation en phase S est différent selon que Cdk1 soit ou non préalablement déplétée et suggère un pic d'activité Cycline A2/Cdk1 en fin de phase G2, mais avant le pic d'activité Cycline B1/Cdk1 (Pagano et al. 1992).

BORA, AURORA-A ET PLK1 FONT LE LIEN ENTRE CYCLINE A2/CDK ET CYCLINE B1/CDK1

Comme mentionné précédemment, Cycline A2 est nécessaire à l'entrée en mitose dans de nombreux systèmes biologiques. Des données récentes chez le Xénope, *C. elegans* et dans les cellules de mammifères suggèrent que le rôle de Cycline A2 serait de permettre l'interaction entre trois acteurs clés de la phase G2 : la kinase Aurora-A, son cofacteur Bora et la kinase Plk1, favorisant l'activation de Plk1 par Aurora-A. L'activité Plk1 étant nécessaire à l'activation du complexe Cycline B1/Cdk1 (Gheghiani et al. 2017), cette cascade de signalisation par activation successive fait pour la première fois le lien entre la machinerie moléculaire qui régule la réplication (Cycline A2/Cdk) et celle qui régule l'entrée des cellules en mitose (Cycline B1/Cdk1). Les données supportant l'existence d'une telle voie de signalisation sont présentées ci-après et résumées dans la **Figure 7**.

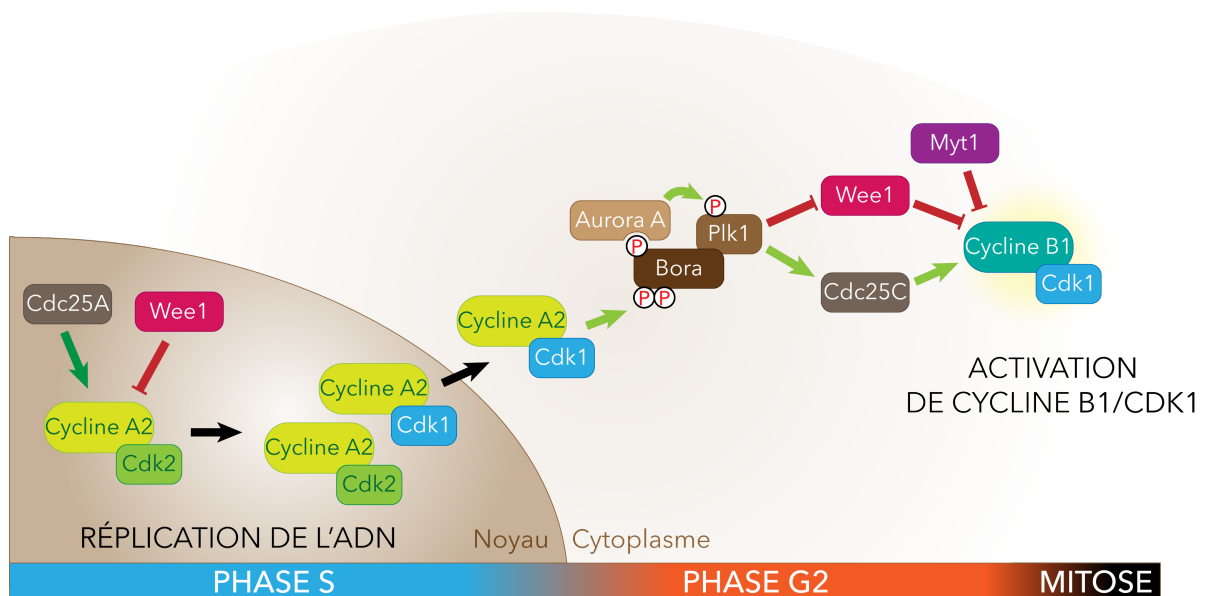


Figure 7 : Modèle du contrôle de l'entrée en mitose chez les métazoaires. Les complexes Cycline A2/Cdk assurent différentes fonctions liées à la régulation de la réplication en phase S. En milieu de phase S, les complexes Cycline A2/Cdk1 commencent à s'assembler. Au moment de la transition S/G2, Cycline A2 —majoritairement nucléaire— commence à être localisée également dans le cytoplasme. La protéine Bora cytoplasmique est phosphorylée par un complexe Cycline A2/Cdk (Cycline A2/Cdk1 chez le Xénope) sur plusieurs résidus conservés. Bora interagit avec Plk1 et la phosphorylation de Bora par une Cdk favorise l'activation de Plk1 par la kinase Aurora-A. Des travaux encore non publiés auxquels le laboratoire a contribué suggèrent que Bora est un co-facteur spécifique d'Aurora-A de façon à ce qu'un phosphate présent sur Bora soit apporté *en trans* au niveau de la boucle d'activation d'Aurora-A, ce qui permet l'activation d'Aurora-A et la phosphorylation activatrice de Plk1 par Aurora-A (N. Tavernier et al. Manuscrit en révision). Plk1 sous forme active inhibe Wee1 (au moins chez le Xénope) et stimule l'activité de la phosphatase Cdc25C, ce qui favorise l'activation de Cycline B1/Cdk1 et l'entrée des cellules en mitose.

UNE ACTIVITE CYCLINE A2/CDK EST EN AMONT DE PLK1 ET DE L'ACTIVATION DE CYCLINE B1/CDK1

Chez le Xénope, l'activité H1 kinase associée à Cycline A2 immunoprécipitée précède l'activation de Plx1 (l'homologue de Plk1), et la déplétion de Cycline A2 (mais pas de Cdk2) retarde fortement l'activation de Plx1 et de Cycline B1/Cdk1 (Vigneron et al. 2018). Chez l'homme, des expériences

de stimulation de l'activité Cdk à la transition S/G2 via l'inhibition de Wee1 montrent que l'inhibition de Wee1 n'active pas directement Cycline B1/Cdk1, mais stimule une activité Cycline A2/Cdk située *en amont* de Plk1, qui va elle permettre l'activation de Cycline B1/Cdk1 et l'entrée des cellules en mitose (Gheghiani et al. 2017). **Ces observations soutiennent un modèle où l'activité Cycline A2/Cdk présente en G2 permet l'activation de Plk1 chez les métazoaires**, ce modèle étant renforcé par des travaux sur la biochimie de l'activation de Plk1 (ci-dessous).

LA PHOSPHORYLATION DE BORA PAR UNE CYCLINE A2/CDK PERMET L'ACTIVATION DE PLK1 PAR AURORA-A

L'activation de Plk1 nécessite la phosphorylation de sa boucle d'activation sur le résidu thréonine 210 (T210) (Young-Joo Jang et al. 2002; Kelm et al. 2002; Y.-J. Jang et al. 2002) par la kinase Aurora-A qui phosphoryle ce résidu *in vitro* et *in vivo* (A. Seki et al. 2008; Thomas et al. 2016) et permet ainsi de soutenir l'activité Plk1 *in vivo* (Gheghiani et al. 2017). *In vitro* et *in vivo*, **la phosphorylation activatrice de Plk1 par Aurora-A dépend et est fortement stimulée par la présence de la protéine Bora** (également nommée Aurora borealis) (Macůrek et al. 2008; A. Seki et al. 2008; Tavernier et al. 2015), bien que Bora seule, qui ne possède pas d'activité catalytique, en absence d'Aurora-A n'a aucun effet sur la phosphorylation de la T210 de Plk1 *in vitro* (A. Seki et al. 2008).

Venant renforcer le lien entre une Cycline/Cdk agissant en amont et l'activation de Plk1, la pré-phosphorylation de Bora par Cdk1 *in vitro* augmente fortement la capacité d'Aurora-A à phosphoryler Plk1 (Thomas et al. 2016; Tavernier et al. 2015) et Plk1 interagit à la fois avec Bora et Cycline A2 *in vivo* (A. Seki et al. 2008; Gheghiani et al. 2017). Les multiples sites de phosphorylation (12 phospho-sites) Cdk-dépendant sur Bora ont été cartographiés et validés *in vivo*. Chez l'homme et *C. elegans*, une forme mutante de Bora non-phosphorylable par Cdk1 ne permet plus à Aurora-A d'activer Plk1, et son expression ectopique dans des cellules humaines ne stimule pas la phosphorylation pT210 de Plk1, contrairement à la forme sauvage (Thomas et al. 2016; Tavernier et al. 2015), **indiquant que la phosphorylation de Bora par les Cdk est nécessaire *in vivo* pour permettre l'activation de Plk1 par Aurora-A.**

L'ensemble des données présentées ici soutient le modèle suivant où le changement de sous-unité catalytique, de localisation intracellulaire et/ou de niveau d'activité de Cycline A2 permet la phosphorylation de Bora —une protéine exclusivement cytoplasmique—, ce qui promeut l'activation de Plk1 par Aurora-A (Figure 7).

ACTIVATION DE CYCLINE B1/CDK1 PAR PLK1 ET ENTREE DES CELLULES EN MITOSE

Une longue controverse a persisté sur l'importance de l'activité de la kinase Plk1 pour initier ou non l'entrée des cellules en mitose, certains travaux mettant en évidence que l'inhibition de Plk1 ou son inactivation chez la souris favorise un arrêt des cellules *en G2* (Lane et Nigg 1996; Lu et al. 2008) alors que d'autres suggérant que l'inhibition ou la déplétion de Plk1 induit un arrêt majoritairement *en mitose* (Burkard et al. 2007; van Vugt, Brás, et Medema 2004; X. Liu, Lei, et Erikson 2006; de Cárcer et al. 2018). Cette controverse repose en partie sur la difficulté expérimentale d'inhiber complètement l'activité kinase de Plk1 par siRNA ou de manière dose-dépendante par des agents pharmacologiques. Dans ce cadre, des travaux récents du laboratoire ont montré que l'inhibition complète de Plk1 par des inhibiteurs ou via l'expression d'une forme de Plk1 sensible à des analogues de l'ATP (cellules RPE-1 Plk1^{-/-} GFP-Plk1^{as}) inhibe massivement l'entrée en mitose

de cellules cancéreuses ou non-transformées (Gheghiani et al. 2017; Aspinall et al. 2015) (Figure 8). De manière remarquable, parmi les rares cellules cancéreuses entrant en mitose en présence d'inhibiteur de Plk1, il a été observé, via un senseur FRET spécifique de l'activité Plk1, que ces cellules avaient lentement accumulé en phase G2 une activité Plk1 faible mais suffisante pour déclencher l'entrée en mitose (Gheghiani et al. 2017). En résumé, **l'ensemble de ces résultats soutient que Plk1 joue un rôle central pour initier l'entrée des cellules en mitose en conditions physiologiques.**

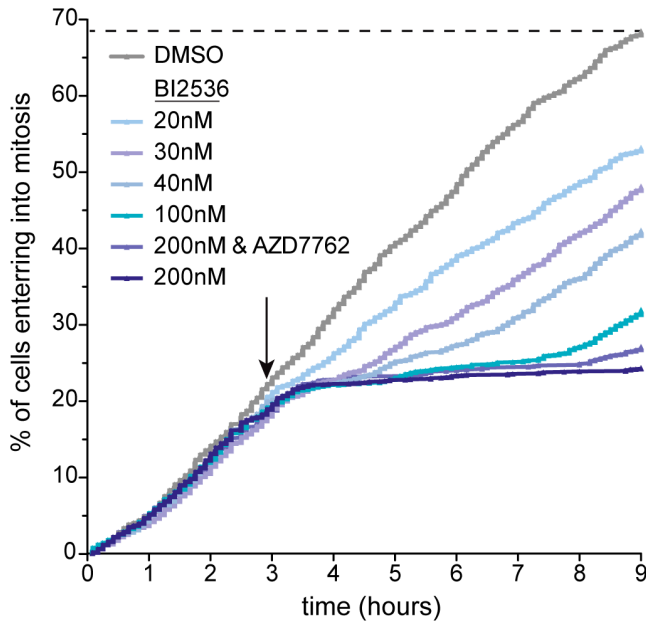


Figure 8 : L'inhibition de Plk1 inhibe l'entrée en mitose de manière dose-dépendante dans des cellules humaines non-transformées.

Une population asynchrone de cellules hTERT-RPE-1 a été suivie au cours du temps par vidéo-microscopie en contraste de phase. La flèche indique le moment où l'inhibiteur de Plk1 (BI2536) a été ajouté. L'ajout d'AZD7762 (un inhibiteur des kinases Chk1 et Chk2) montre que l'arrêt en G2 induit par l'inhibition de Plk1 n'est pas dû à l'activation d'un checkpoint de l'ADN. (adaptée de (Gheghiani et al. 2017))

De manière notable et importante pour la suite des données présentées dans cette introduction, deux senseurs FRET de l'activité Plk1 (basé d'abord sur un site de phosphorylation de Myt1 puis sur un site de c-Jun) ont été successivement développés qui possèdent des propriétés différentes *in vivo*. Le senseur FRET basé sur le site c-Jun dont la spécificité pour Plk1 est bien établie (D. Liu, Davydenko, et Lampson 2012; Gheghiani et al. 2017) révèle que l'activité Plk1 augmente soudainement ~40 minutes avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD), versus ~20-30 minutes pour le complexe Cycline B1/Cdk1 (Gavet et Pines 2010b), montrant ainsi que l'activation de Plk1 précède celle de Cycline B1-Cdk1. Le senseur FRET basé sur le site Myt1 n'est pas totalement spécifique de Plk1 et détecte également l'activité de la kinase Mps1 en fin de phase G2 et en mitose, ce qui ne la rend pas utilisable pour suivre la régulation de l'activité Plk1 spécifiquement à la transition G2/M (Macûrek et al. 2008, Wytse Bruinsma et al. 2014). Néanmoins, le site utilisé est peu sensible aux activités phosphatases qui s'opposent à l'action de Plk1 (Gheghiani et al. 2017). Cette propriété remarquable lui permet d'être sensible à de très faibles niveaux d'activité kinase en interphase, ce qui a permis de mettre en évidence qu'une faible activité Plk1 s'accumule très progressivement en phase G2 (Akopyan et al. 2014; Lemmens et al. 2018). Cette faible hausse d'activité dépend de la synthèse protéique (Gheghiani et al. 2017), suggérant qu'elle dérive de l'expression progressive de la protéine Plk1 à partir de la transition S/G2 qui pourrait posséder une

activité basale (Akopyan et al. 2014). Le rôle de Plk1 au cours de la progression en G2 n'est pas clairement défini bien que celle-ci soit recrutée au niveau des centromères de manière dépendante de son activité (McKinley et Cheeseman 2014).

De manière simplifiée, l'activation de Cycline B1/Cdk1 chez les métazoaires dépend de l'équilibre entre les activités des kinases inhibitrices Wee1 (qui phosphoryle le résidu Tyr15 de Cdk2/1) et Myt1 (qui phosphoryle les résidus Thr14 et Tyr15 de Cdk1) et des phosphatases activatrices Cdc25A, B et C (pour revue (Crncec et Hochegger 2019)), ces dernières possédant plusieurs variants d'épissage (Hélène Albert, 2011). *In vitro*, Plk1 phosphoryle les phosphatases Cdc25B et C ainsi que les kinases Wee1 et Myt1 (Roshak et al. 2000; Nakajima et al. 2003; Watanabe et al. 2005; Lobjois et al. 2011). Wee1 est également phosphorylée par Plk1 *in vivo* mais il reste inconnu si cette phosphorylation *précède* ou *suit* l'entrée des cellules en mitose (Watanabe et al. 2005). *In vivo*, des analyses par immunoblot à deux dimensions (2D) montrent que seule la phosphorylation de Cdc25C (forme longue, variant C1) et non celle de Cdc25A et B est sensible à inhibition de l'activité kinase Plk1. En accord, l'expression ectopique d'une forme mutante Cdc25C1 phosphomimétique pour les sites phosphorylés par Plk1 stimule fortement l'entrée des cellules en mitose, même après inhibition de Plk1 endogène (Gheghiani et al. 2017).

L'ensemble de ces résultats soutient un modèle selon lequel Cycline A2/Cdk (Cycline A2/Cdk1 chez le Xénope) phosphoryle Bora, permettant ainsi son interaction et l'activation d'Aurora-A. Dans la mesure où Bora interagit également avec Plk1, ce complexe protéique à trois partenaires permet à Aurora-A de phosphoryler et d'activer Plk1, qui va ensuite activer le complexe Cycline B1/Cdk1, via la phosphorylation de la phosphatase Cdc25C1. (Figure 7, page 21)

CONTROLE TRANSCRIPTIONNEL DES INDUCTEURS MITOTIQUES EN G2

Le contrôle de l'entrée en mitose n'est pas uniquement dû à des phosphorylations en cascades : l'expression de la plupart des inducteurs mitotiques est finement contrôlée et n'intervient que tardivement dans le cycle cellulaire (Grant et al. 2013; Whitfield et al. 2002). Par exemple, l'expression de Cycline B1 commence dès la transition G1/S mais n'augmente véritablement qu'à partir de la fin de la phase S (Zerjatke et al. 2017) et les protéines Aurora-A et Plk1 sont exprimées en phase G2 (Akopyan et al. 2014).

Comme détaillé au chapitre suivant (p34), la signalisation ATR/Chk1 pourrait jouer un rôle critique dans le contrôle temporel de l'expression des inducteurs mitotiques. Afin de faciliter la compréhension de mes travaux sur le rôle de la kinase Chk1 dans le couplage temporel entre la réplication de l'ADN et l'entrée des cellules en mitose, je présenterai ici les acteurs centraux du contrôle transcriptionnel en G2, notamment la facteur de transcription FoxM1 et sa régulation par les complexes Cycline A2/Cdk1-2 (Figure 9).

FOXM1 EST NECESSAIRE A LA PROLIFERATION CELLULAIRE

Au niveau transcriptionnel, de nombreux travaux pointent vers un rôle clé du facteur de transcription FoxM1 dans la régulation de l'expression de gènes nécessaires à l'entrée et à la progression des cellules en mitose. Ainsi, la déplétion ou l'inactivation de FoxM1, ou alternativement l'expression d'une forme mutante dominante négative dépourvue du domaine transactivateur, conduit à une prolifération réduite, à une accumulation des cellules en phase G2 et à des problèmes de ségrégation correcte des chromosomes et/ou de cytokinèse, favorisant l'émergence de sous-populations polyploïdes et aneuploïdes (Wonsey et Follettie 2005; Wang et al. 2005; Laoukili et al. 2005; Macedo et al. 2018). À l'inverse, la surexpression ectopique de FoxM1 stimule l'entrée des cellules en mitose, même lorsque les cellules sont ralenties en phase S par un traitement à la thymidine (Laoukili et al. 2005), soulignant le rôle clé de FoxM1 dans la promotion de la prolifération cellulaire.

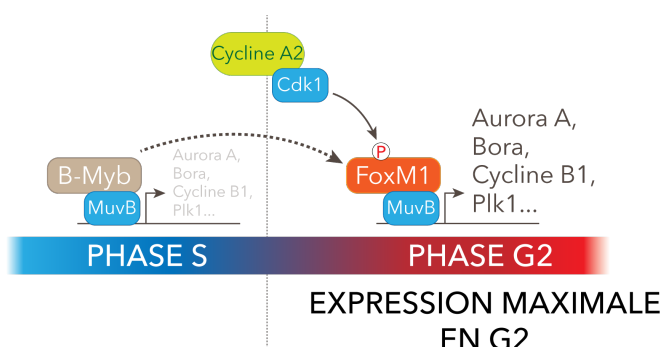


Figure 9 : Contrôle transcriptionnel des inducteurs mitotiques par FoxM1. B-Myb et FoxM1 s'associent aux promoteurs d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'entrée en mitose, via leur association au complexe MuvB qui reconnaît certains éléments de séquence spécifiques de ces promoteurs. B-Myb est dégradé en début de G2, mais contribue néanmoins au recrutement de FoxM1 au niveau de ces promoteurs en phase G2. D'autre part, la phosphorylation de FoxM1 par Cycline A2/Cdk en début de phase G2 permet son activation maximale et l'expression des inducteurs mitotiques.

À l'aide de différentes approches complémentaires, déplétion par siRNA ou shRNA ou alternativement activation inductible via l'utilisation d'une forme FoxM1-ER², il a été montré que FoxM1 est impliquée dans la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes en phase G2, parmi lesquels Cdk1, Cycline B1 et B2, Cycline A2, Aurora-A, Bora, Plk1, Cdc25A, B et C et Wee1 (Laoukili et al. 2005; Wang et al. 2005; Wonsey et Follettie 2005; Macedo et al. 2018). Cette régulation transcriptionnelle est directe et FoxM1 est présente au niveau de chacun de ces promoteurs (Müller et al. 2014).

FoxM1 montre une interaction, indirecte, avec certains éléments spécifiques du promoteur de ses gènes cibles, notamment les éléments CDE (Cell cycle-Dependent Element) et CHR (Cell cycle genes Homology Region) (X. Chen et al. 2013) et plus de la moitié des promoteurs avec lesquels FoxM1 interagit par ChIP contiennent un élément CHR, notamment les promoteurs des gènes codant pour Aurora-A, Bora, Cycline A2, Cycline B1, Cycline B2, Cdc25C, Cdk1, Cdk2 ou Wee1 (Müller et al. 2014).

INTERACTION DE FOXM1 AVEC SES GENES CIBLES ET COLLABORATION AVEC B-MYB

FoxM1 interagit avec les protéines du complexe MuvB (X. Chen et al. 2013) (**Figure 9**). MuvB interagit directement avec les éléments de séquence CDE et CHR (X. Chen et al. 2013; Müller et al. 2012) et sa déplétion conduit à une plus faible expression de nombreux gènes impliqués dans la progression G2/mitose (Knight, Notaridou, et Watson 2009; Osterloh et al. 2007). Une forme tronquée de FoxM1 ne pouvant s'associer à MuvB perd sa préférence pour les éléments de séquence CHR (X. Chen et al. 2013), suggérant que c'est le complexe MuvB qui adresse spécifiquement FoxM1 à ses promoteurs cibles en G2.

Le transactivateur B-Myb peut lui aussi s'associer à MuvB (Knight, Notaridou, et Watson 2009) et est localisé préférentiellement au niveau des éléments CHR (Müller et al. 2014). B-Myb participe également à la régulation de l'expression des inducteurs mitotiques, et sa déplétion conduit à une plus faible prolifération et à une expression réduite d'Aurora-A, Cdk1, Cycline B1 et Cycline A2 (Osterloh et al. 2007; Tarasov et al. 2008). Contrairement à FoxM1, B-Myb n'est présent au niveau de ses promoteurs cibles qu'en phase S et non en phase G2, où B-Myb est hyperphosphorylée et rapidement dégradée (Sadasivam, Duan, et DeCaprio 2012). B-Myb ne participe donc pas à l'expression *maximale* de ses gènes cibles en G2, mais l'interaction de manière séquentielle de B-Myb puis de FoxM1 aux promoteurs cibles est indispensable à l'expression des gènes correspondants par des mécanismes mal compris. En effet, la déplétion de B-Myb empêche l'interaction de FoxM1 avec ses promoteurs cibles en phase G2 (Sadasivam, Duan, et DeCaprio 2012) (**Figure 9**).

REGULATION DE L'ACTIVITE DE FOXM1 PAR PHOSPHORYLATION

L'activité de FoxM1 est stimulée par la surexpression de Cycline A2 (mais pas de Cycline B1) et inversement réduite suite à la déplétion de Cycline A2 ou via l'expression d'un mutant dominant négatif de Cdk1 ou Cdk2 (Laoukili et al. 2008). *In vitro*, Cycline A2/Cdk phosphoryle les résidus T600, T611 et S638 de FoxM1. De manière notable, la mutation de ces trois résidus en alanine réduit fortement l'activité de FoxM1 et l'expression ectopique de ce mutant ne restaure pas

² FoxM1 fusionnée au récepteur aux œstrogènes, dont l'activité est inductible par ajout de 4-OHT.

l'entrée des cellules en mitose après déplétion de FoxM1 endogène, contrairement à la forme sauvage (Laoukili et al. 2008); **suggérant fortement que l'activité FoxM1 est régulée en inter-phase par Cycline A2/Cdk**. Des résultats récents obtenus en QIBC³ montrent que la phosphorylation de FoxM1 sur la T600 est minimale en G1, augmente légèrement dès la transition G1/S mais reste faible jusqu'à la phase G2 où elle augmente fortement (Saldivar et al. 2018). Ces résultats rejoignent des données plus anciennes montrant que l'activité FoxM1 est faible en phases G1&S mais augmente significativement en G2 (Laoukili et al. 2008) et suggèrent fortement que **la phosphorylation de FoxM1 par un complexe Cycline A2/Cdk joue un rôle clé dans la restriction de l'activité FoxM1 à la phase G2, et donc dans celle de l'expression de différents inducteurs mitotiques à cette phase du cycle**.

Venant compléter la régulation de FoxM1 par des Cdk, il a été proposé que Plk1, une des cibles de FoxM1, pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de son activité transactivatrice en phase G2. En effet, l'expression ectopique de Plk1 WT (mais non d'une forme inactive, kinase-dead) augmente de manière dose-dépendante l'activité de FoxM1 sauvage, mais pas d'une forme mutante non-phosphorylable par Plk1. Le mutant de FoxM1 non-phosphorylable par Plk1 n'est pas capable de restaurer l'expression de Cycline B1, Plk1 et Aurora B après déplétion de FoxM1 endogène (Fu et al. 2008), **ce qui suggère que l'activation de FoxM1 est soumise à un rétrocontrôle positif à travers l'expression de sa cible Plk1**. Enfin, il est à noter que le promoteur de FoxM1 contient lui-même un élément CHR (Müller et al. 2014) et l'inhibition de l'activité FoxM1 par des agents pharmacologiques réduit le niveau d'expression de la protéine FoxM1 (Halasi et Gartel 2009), ce qui pourrait suggérer que FoxM1 régule, au moins en partie, sa propre expression.

L'ensemble de ces mécanismes moléculaires contribue à restreindre l'expression des inducteurs mitotiques spécifiquement pendant la phase G2.

³ **Quantitative Image-Based Cytometry (QIBC)** : cette technique consiste à acquérir en immunofluorescence un très grand nombre de cellules (généralement plusieurs milliers), puis à mesurer différents paramètres de fluorescence comme par exemple: l'intensité d'un signal ou un nombre de foyers dans le noyau. En parallèle, la quantité d'ADN présente dans chaque noyau (et donc sa position dans le cycle cellulaire) est déduite de l'intensité du DAPI (ou d'un autre intercalant). La population de cellules peut ainsi être représentée d'une manière analogue aux résultats en cytométrie en flux, avec en abscisse la quantité d'ADN et en ordonnée le paramètre d'intérêt. Un exemple d'une telle représentation peut être observé à la **Figure 12**.

RETENIR LA PROGRESSION DU CYCLE POUR EN ASSURER L'ORDRE

Une caractéristique majeure du cycle cellulaire est la succession dans le temps d'une phase pendant laquelle le matériel génétique est répliqué (phase S) suivie d'une phase pendant laquelle chacune des deux copies du matériel génétique est répartie entre deux cellules filles (phase M).

Afin d'expliquer comment cet ordre temporel est garanti au niveau moléculaire, Stern et Nurse ont proposé en 1996 un modèle dit de « seuil quantitatif » (Stern et Nurse 1996) dans lequel l'augmentation *quantitative* du niveau d'activité Cdk est le cœur de la régulation du cycle cellulaire: en phase G1, l'activité Cdk est minimale mais son augmentation à la transition G1/S jusqu'à un niveau intermédiaire initie la réplication du génome, tandis que son augmentation en G2 permet l'entrée et l'exécution de la mitose.

Ce modèle « simple » est, au moins en partie, pertinent chez les eucaryotes. En effet, il a été montré de manière élégante dans une souche de levure *S. pombe* dont les gènes codant pour les différentes Cyclines et Cdk ont été inactivés et exprimant un complexe Cycline-Cdk (Cdc13-Cdc2) de fusion sous le contrôle du promoteur *cdc13*, que l'accumulation au cours du temps de ce module Cycline-Cdk minimal suffit à ordonner l'entrée en phase S puis l'entrée en mitose (Coudreuse et Nurse 2010). Chez les mammifères, un article récent basé sur l'utilisation d'un système de dégradation inductible à l'auxine montre que des cellules somatiques humaines non-transformées continuent à entrer en mitose en absence de Cycline B et suggère qu'un simple module Cycline A2-Cdk est en mesure d'assurer le déroulement successif de la réplication du génome et de l'entrée en mitose (Hégarat et al. 2020). De manière complémentaire, des embryons de souris triple KO *Cdk2^{-/-} Cdk4^{-/-} Cdk6^{-/-}* se développent jusqu'au stade E13.5, et les cellules MEF triple KO dérivées de ces embryons sont capables de proliférer en culture en ne dépendant que de Cdk1 (Santamaría et al. 2007), **suggérant que chez les mammifères la régulation de l'activité Cdk1 suffit à assurer la progression ordonnée du cycle cellulaire.** Bien que correspondant à des situations expérimentales, ces modèles de cycle cellulaire « simplifié » soulignent la pertinence du concept de seuil quantitatif.

Dans les cellules somatiques adulte, la phase S est séparée de la mitose par une phase G2 d'une durée constante de plusieurs heures (Chagin et al. 2016; Araujo et al. 2016; Hahn, Jones, et Meyer 2009). La phase G2 pourrait permettre passivement à la réplication du génome de se poursuivre et ainsi rendre fortement probable que la mitose n'ait lieu qu'après la réalisation complète de la réplication, sans que ces deux événements : complétion de la réplication et entrée en mitose ne soient liés par une signalisation active. Des travaux récents contredisent ce modèle (Lemmens et al. 2018; Saldivar et al. 2018). Ces travaux réactualisent la notion de *checkpoint* telle que définie par Hartwell et Weinert en 1989, à savoir l'existence de mécanismes surveillant le déroulement de la réplication et empêchant activement l'entrée des cellules en mitose tant que celle-ci n'est pas achevée (Hartwell et Weinert 1989). Au niveau moléculaire, un faisceau d'argument suggère que la signalisation ATR/Chk1 joue un rôle déterminant dans cette régulation négative de la progression du cycle cellulaire et dans le couplage temporel entre la réplication de l'ADN et l'entrée des cellules en mitose au cours d'un cycle cellulaire « normal » (ou non perturbé). **Ce chapitre**

s'attardera à faire l'état de l'art sur le rôle de la *signalisation* ATR/Chk1 dans un cycle cellulaire normal, depuis la phase S jusqu'à la mitose.

Les aspects moléculaires et biochimiques sur l'activation de la voie ATR/Chk1 (non essentiels à la compréhension de cette partie) seront détaillés dans le prochain chapitre.

ROLE ET ACTIVATION DE LA VOIE ATR/CHK1 EN PHASE S NON-PERTURBEE

La voie ATR/Chk1 a été initialement identifiée pour son rôle dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, où elle contribue à inhiber l'entrée des cellules en mitose en réponse à une large variété de stress génotoxiques. Néanmoins, les souris KO Chk1^{-/-} présentent une létalité embryonnaire précoce entre les stades E3.5 et E7.5, associée à l'apparition dès le stade E3.5 de noyaux ayant une morphologie aberrante (Q. Liu et al. 2000; Takai et al. 2000), tandis que l'inactivation conditionnelle de Chk1 dans le tissu mammaire adulte conduit à une apoptose massive au sein de ce tissu (Lam et al. 2004), **suggérant que Chk1 est également active et nécessaire au cours d'un cycle cellulaire non-perturbé.**

L'INHIBITION/LA DEPLETION DE CHK1 EN PHASE S DEREGULE L'ACTIVITE DES CDK

Il a été observé qu'au cours d'une phase S non perturbée, ATR et son activateur TopBP1 se localisent à la chromatine (Dart et al. 2004; J.-E. Kim et al. 2005). Néanmoins, **L'argument majeur en faveur d'une activation constitutive de la voie ATR/Chk1 en phase S repose sur les effets de son inhibition ou de sa déplétion sur la réplication du génome au cours d'un cycle cellulaire normal.** Les effets de l'inhibition d'ATR sur la réplication de l'ADN diffèrent de ceux de l'inhibition de Chk1 sur plusieurs points (discutés à la p30) et pourraient partiellement dépendre du contexte cellulaire (Sakurikar et al. 2016; Montano et al. 2012). Il est cependant démontré que la déplétion, l'inhibition ou l'inactivation des kinases ATR ou Chk1 conduit à un ralentissement des fourches de réplication et à l'activation d'origines dormantes, et que l'inhibition de Chk1 induit des cassures double-brin (DSB) de l'ADN et l'apparition d'un signal γ -H2AX (Syljuåsen et al. 2005; Petermann et al. 2006; Maya-Mendoza et al. 2007; Katsuno et al. 2009; Scoria et McGowan 2009; Forment et al. 2011; Eykelenboom et al. 2013).

L'inactivation du gène Cdc25A restaure la survie des cellules et compense en partie la baisse de vitesse des fourches de réplication suite à l'inhibition pharmacologique d'ATR (Ruiz et al. 2016), **suggérant que l'inhibition de la voie ATR/Chk1 en phase S impacte la réplication de l'ADN au moins en partie à travers la dérégulation d'activité(s) Cdk.** Renforçant cette hypothèse, la suractivation des complexes Cyclines-Cdk en phase S, via l'inhibition de la kinase Wee1, conduit aux mêmes phénotypes que l'inhibition de Chk1 (Domínguez-Kelly et al. 2011; Beck et al. 2010). L'augmentation de l'activité Cdk en phase S suite à l'inactivation de la voie ATR/Chk1 a pu être mesurée par essais kinase *in vitro* sur les complexes Cycline A2-Cdk immunoprécipités (Katsuno et al. 2009), ou via l'utilisation d'un reporteur de l'activité Cdk2 (Cycline E et/ou Cycline A2-Cdk2) en cellules vivantes. Ainsi, il a pu être déterminé que suite à l'inhibition d'ATR ou Chk1, le niveau moyen d'activité Cdk2 est sensiblement plus élevé en phase S (**Figure 10**) (Lemmens et al. 2018; Daigh et al. 2018). En accord, la dégradation conditionnelle (degron auxine-dépendant) de Chk1 endogène

stabilise la phosphatase activatrice Cdc25A (Goto et al. 2019) **confirmant de façon élégante qu'une activité Chk1 restreint l'activité et l'effet régulateur des Cdk sur le processus de réplication en phase S.**

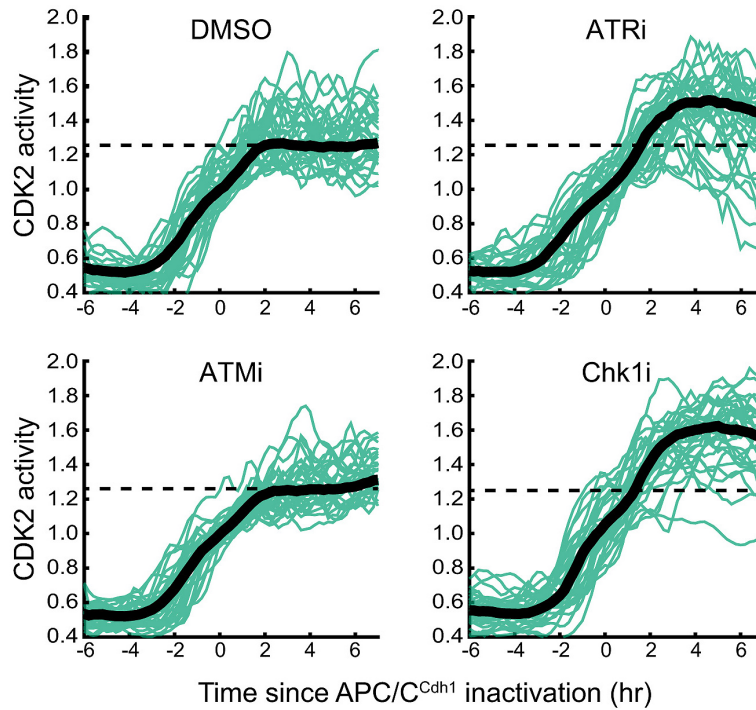


Figure 10 : l'inhibition de la voie ATR/Chk1 augmente l'activité Cdk2 en phase S.

L'activité Cdk2 est suivie au cours du temps par vidéo-microscopie avec un rapporteur de son activité kinase (Spencer et al. 2013) dans des cellules épithéliales non-transformées (MCF10A). Les cellules expriment également un rapporteur fluorescent de l'activité APC/C-Cdh1, permettant de les synchroniser *in silico* au moment de l'inhibition d'APC/C-Cdh1 en phase G1 (t=0h). L'inhibition de Chk1 ou d'ATR par des agents pharmacologiques augmente le niveau d'activité Cdk2 mesuré lors de la progression G1/S. Adapté de (Daigh et al. 2018).

LA SURACTIVATION DES CDK EN PHASE S ACTIVE DES ENDONUCLEASES

Il a été mis en évidence dans des lymphocytes B humain que la déplétion de l'endonucléase Mus81-EME2 (EME2 sous unité non-catalytique) réduit jusqu'à un niveau basal la quantité de cassures DSB observée suite à la déplétion de Chk1 et restaure la vitesse de progression des fourches de réplication ainsi que la distance inter-origine (Técher et al. 2016), **suggérant que les effets de l'inhibition/déplétion de Chk1 sur la dynamique de réplication sont une conséquence de l'induction de cassures DSB et non l'inverse.** De même, la sur-activation de Cdk induit un signal γ -H2AX, qui est fortement atténué par la co-déplétion de l'endonucléase Mus81 (Domínguez-Kelly et al. 2011), ainsi que la pulvérisation des chromosomes, peut-être via le clivage des fourches de réplication (Duda et al. 2016). Enfin, des cellules MEFs exprimant une forme de Cdk1 constitutivement active (Cdk1^{AF}; T14A - Y15F) exhibent un fort signal γ -H2AX qui peut être partiellement atténué par la déplétion de Mus81 (Szymd et al. 2019). **L'ensemble de ces résultats démontre que la sur-activation des Cdk en phase S conduit à l'activation de l'endonucléase Mus81 et à la genèse de cassures double brin.**

EFFETS PROPRES A ATR ET CHK1 EN PHASE S INDEPENDAMMENT DES CDK ?

Plusieurs travaux mettent en évidence des différences de phénotype suite à l'inhibition (ou à la déplétion) d'ATR plutôt que Chk1 en phase S. En effet, la déplétion d'ATR induit très peu de

cassures double brin, contrairement à celle de Chk1 (Técher et al. 2016), et l'inhibition de Chk1, contrairement à ATR, induit un fort signal γ -H2AX pan-nucléaire (Luis I Toledo et al. 2011). De manière intéressante, il a été observé que l'inhibition d'ATR induit la formation d'ADN simple brin (ssDNA) de manière plus marquée au bout de 2h plutôt que 8h post-inhibition. Cette récupération au cours du temps n'est pas observée suite à l'inhibition de Chk1, suggérant la mise en place de mécanismes d'adaptation spécifiquement en réponse à l'inhibition d'ATR (Buisson et al. 2015). Ces auteurs proposent que suite à l'inhibition d'ATR la kinase DNA-PK phosphoryle Chk1 (au niveau de la S317, un site d'ATR) et restaure la dégradation Chk1-dépendante de Cdc25A.

D'autre part, l'ajout de nucléosides dans le milieu de culture compense les effets de l'inhibition de Chk1 sur la distance inter-origine et la vitesse de réplication, mais pas les effets de l'inhibition d'ATR sur la vitesse de progression des fourches (Técher et al. 2016), **ce qui suggère qu'ATR pourrait réguler la dynamique de réplication d'une manière différente de Chk1**. Dans ce sens, on rappellera que, contrairement à Chk1, la forme active d'ATR est localisée à la chromatine (Smits, Reaper, et Jackson 2006). De plus, la déplétion d'ATR, mais pas de Chk1, affecte le maintien de la stabilité génétique aux sites fragiles communs (CFS – *Common Fragile Site*) en présence d'un stress réplicatif modéré (Koundrioukoff et al. 2013), renforçant l'idée qu'ATR et Chk1 pourraient avoir des rôles différents en phase S, y compris en présence d'un stress génotoxique.

Enfin, il a été mis en évidence que Chk1 interagit directement avec la Tresline et que l'expression ectopique dans des cellules humaines d'un mutant de la Tresline ne pouvant pas interagir avec Chk1 (mais pas de Tresline-WT) augmente le nombre d'évènements d'initiation (Guo et al. 2015). **Cette observation suggère qu'il pourrait exister des mécanismes par lesquels Chk1 régule l'activation des origines de réplication indépendamment de son contrôle des Cyclines/Cdk.**

ORIGINES DE L'ACTIVITE ATR/CHK1 EN PHASE S

La présence d'une activité ATR/Chk1 en phase S soulève la question de l'origine des mécanismes d'activation. La réplication du brin tardif au niveau des fourches de réplication implique la formation de fragments d'Okazaki dont l'extrémité 5' est libre, ainsi que la présence transitoire de régions de ssDNA pouvant correspondre à la taille d'un fragment d'Okazaki. Bien que ces structures soient en théorie capable de permettre l'activation de la voie ATR/Chk1 (*cf chapitre suivant*), il reste inconnu à ce jour si celles-ci sont nécessaires et suffisantes pour une activité ATR/Chk1 au cours d'une phase S normale. Une hypothèse alternative serait la présence d'un stress réplicatif modéré induisant l'activation d'ATR/Chk1. Dans ce cadre, il a été observé dans des cellules souches embryonnaires (ESC) de souris que prolonger la durée de la phase G1 (inhibiteurs de Cdk4/6 ou de Cdc7) réduit l'observation de marqueurs de stress réplicatif à la phase S suivante dont : des fourches de réplication ralenties, des "gaps" (trous) de ssDNA et des évènements de réversion de fourches (Ahuja et al. 2016), suggérant qu'une entrée trop précoce en phase S induit un stress réplicatif constitutif dans les cellules ESC. Néanmoins, ces différents marqueurs sont absents après expression de facteurs de différenciation (ESC-d) ainsi que dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (Ahuja et al. 2016), suggérant que ces cellules ne présentent pas de stress réplicatif constitutif.

Expérimentalement, le niveau d'activation de la voie ATR/Chk1 au cours d'un cycle cellulaire non perturbé est généralement trop faible pour être détecté par Western Blot via des anticorps dirigés contre les phosphorylations activatrices de Chk1. Néanmoins, il est possible d'avoir une estimation indirecte en mesurant la baisse du signal γ -H2AX (un substrat d'ATR) après traitement avec un inhibiteur d'ATR. En utilisant cette approche (**Figure 11**), **un pic d'activité ATR en phase S normale a été suggéré** dans différentes lignées humaines non-transformées (hTERT-RPE-1, MCF10A) et cancéreuses (HCT116) (Saldivar et al. 2018).

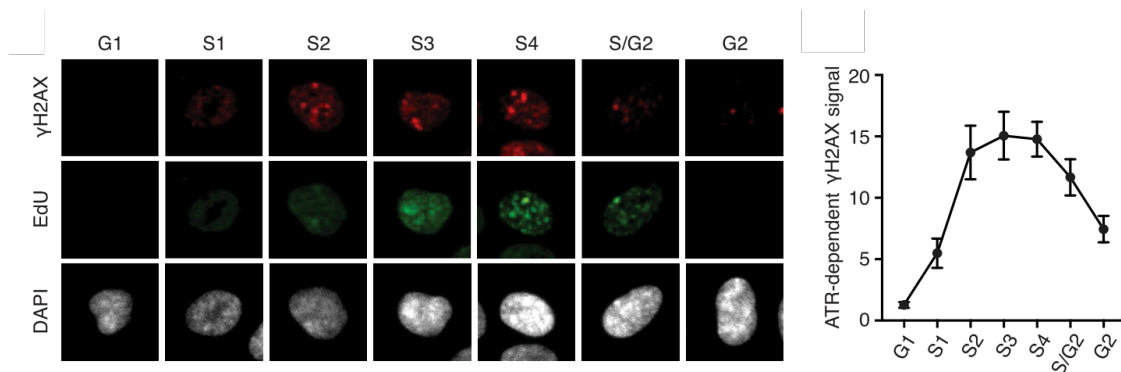


Figure 11 : Mise en évidence indirecte d'un pic d'activité ATR en phase S. Dans des cellules épithéliales non-transformées (RPE-1), La phase du cycle cellulaire est estimée en immunofluorescence à partir de l'intensité du signal DAPI et du marquage EdU. L'activité ATR moyenne de la population est estimée en comparant l'intensité du signal γ -H2AX en présence ou en absence d'un inhibiteur pharmacologique d'ATR. (adaptée de (Saldivar et al. 2018)).

Deux mécanismes moléculaires ont été décrits permettant l'activation d'ATR : le premier implique la protéine TopBP1, tandis que le second implique la protéine ETAA1. Il a été montré que l'activité basale d'ATR en phase S dépend de la voie ETAA1 mais pas de la voie TopBP1, au contraire la réponse ATR à un stress génotoxique en présence d'hydroxyurée dépend de la voie TopBP1 mais pas de la voie ETAA1 (Saldivar et al. 2018). Dans ce sens, le niveau basal d'autophosphorylation de Chk1 (résidu S296) au cours d'un cycle cellulaire non perturbé dépend d'ETAA1, alors que son augmentation en présence d'un stress génotoxique dépend de TopBP1 (Michelena et al. 2019). **Ces résultats apportent un début d'explication à l'existence de deux voies indépendantes d'activation d'ATR, en suggérant que la voie ETAA1 est majoritairement activée par le processus de réplication, tandis que la voie TopBP1 est plus sensible aux stress génotoxiques.**

REGULATION DE LA TRANSITION S/G2 PAR L'INHIBITION DES CDK

Dans un modèle de progression du cycle cellulaire via des seuils quantitatifs d'activité Cdk, il n'y a pas de nécessité que **l'entrée en phase G2 soit couplée à la terminaison (complétion) de la réplication du génome**. Dans un tel modèle, la phase G2 servirait de « tampon » temporel au processus de réplication.

Chez la levure *S. cerevisiae*, les mutations Smc5-Smc6⁴ ralentissent la réplication de l'ADN mais n'affectent pas le timing d'entrée en mitose, conduisant à la ségrégation du matériel génétique malgré un ADN incomplètement répliqué et un checkpoint Rad53-dépendent (Chk1 homologue) fonctionnel (Torres-Rosell et al. 2007). Toujours chez *S. cerevisiae*, il a été rapporté que ~20-40% des cellules commencent la ségrégation des chromosomes malgré un génome incomplètement répliqué, y compris en condition normales (Ivanova et al. 2020). Ces données suggèrent que chez *S. cerevisiae* l'entrée en mitose n'est pas couplée à une surveillance de la complétion de la réplication du génome et que la phase G2 n'y servirait effectivement que de « tampon » à la terminaison de la réplication.

COUPLAGE TEMPOREL ENTRE LA TERMINAISON DE LA REPLICATION ET L'EXPRESSION DES INDUCTEURS MITOTIQUES EN G2

Un faisceau d'arguments suggère que contrairement à *S. cerevisiae*, l'entrée en phase G2 chez les mammifères est fortement régulée. En effet, (i) le développement de lignées PCNA fluorescentes (Knock-In) révèle que le temps séparant la disparition des foyers PCNA de l'entrée des cellules en mitose est très reproductible au sein d'une même population cellulaire (Chagin et al. 2016; Araujo et al. 2016; Hahn, Jones, et Meyer 2009). (ii) la disparition des foyers PCNA coïncide avec l'expression et l'activation initiale de Plk1 (suivie avec le senseur FRET faiblement déphosphorylable de l'activité Plk1⁵), ainsi qu'avec la relocalisation de Cycline A2 au cytoplasme, où elle contribue à réguler l'entrée des cellules en mitose (Lemmens et al. 2018; Akopyan et al. 2014; Zerjatke et al. 2017). Similairement, la fin de la réplication coïncide avec l'induction des protéines Aurora-A, Plk1 et Cycline B2 (Akopyan et al. 2014; Lemmens et al. 2018).

Le couplage entre la terminaison de la réplication et l'expression d'inducteurs mitotiques n'est pas simplement corrélatif mais repose sur des bases moléculaires. En effet, l'inhibition du processus de réplication en combinant la dégradation du facteur Cdc6 (licensing) et l'inhibition de la kinase Cdc7 (firing) conduit à une entrée en mitose prématurée (Δ durée du cycle = 4h). Similairement, l'inhibition de Cdc7 avec la déplétion de Cdc45 (firing) ou de Cdc6 et Cdt1 (licensing) aboutit dans une fraction des cellules à un *cycle cellulaire raccourci dépourvu de foyers PCNA* et au cours duquel Plk1 s'active prématurément (Lemmens et al. 2018). **Ces résultats démontrent que la**

⁴ Avec les condensines et les cohésines, les complexes Smc5/Smc6 font partie des complexes impliqués dans la maintenance de la structure des chromosomes (Structural Maintenance of Chromosomes – SMC). Chez les eucaryotes, il a été proposé que les complexes Smc5/Smc6 puissent jouer de multiples rôles dans la réplication, en conditions normales ou perturbées (Palecek 2018).

⁵ Comme expliqué précédemment, ce senseur faiblement déphosphorylable permet de suivre une augmentation progressive de l'activité basale de Plk1, en lien avec l'expression de la protéine au cours du temps.

réplication de l'ADN joue un rôle actif en empêchant l'activation prématurée des inducteurs mitotiques.

ATR/CHK1 ET LA TRANSITION S/G2

L'inhibition de la voie ATR/Chk1 induit une entrée prématurée des cellules en mitose tandis que la surexpression de Chk1 retarde la transition mitotique (Matsuyama et al. 2011; Saldivar et al. 2018). Ces effets ont longtemps été attribués à une régulation directe de l'activité Cycline B1/Cdk1 (MPF), mais il a récemment été établi qu'ATR et Chk1 en phase S agissent vraisemblablement très en amont et contrôlent l'expression et l'activation des inducteurs mitotiques.

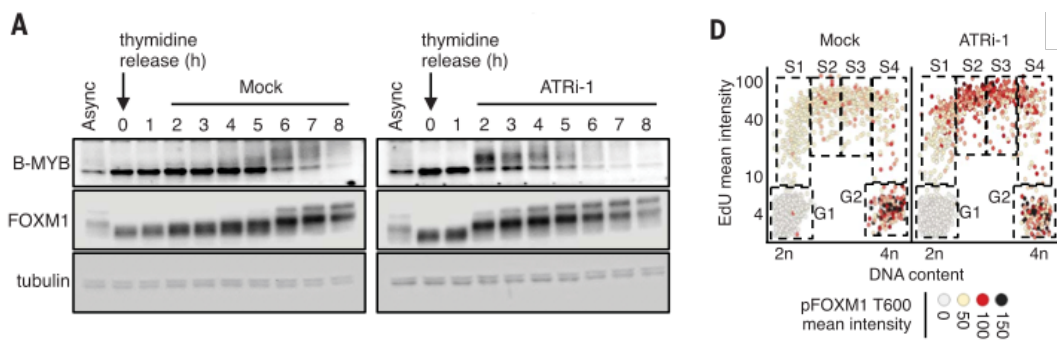


Figure 12 : L'inhibition d'ATR induit une activation prématurée de FoxM1. (A) Sur des cellules synchronisées à la thymidine, l'inhibition d'ATR induit la phosphorylation prématurée de FoxM1 et B-Myb, suggérant leur activation. (B) Dans chaque cellule est mesurée le signal DAPI, l'incorporation d'EdU et le niveau de phosphorylation de FoxM1 sur le résidu T600, un site impliqué dans l'activité transactivatrice de FoxM1. À droite, on peut voir que l'inhibition d'ATR induit la phosphorylation prématurée de FoxM1 sur la T600, normalement observée en G2. (adapté de (Saldivar et al. 2018))

En effet, l'inhibition d'ATR ou Chk1 en phase S conduit à une activation prématurée du facteur de transcription FoxM1 et à l'expression précoce des inducteurs mitotiques sous son contrôle (Figure 12) ainsi qu'à l'activation précoce de Plk1, ceci indépendamment de l'avancée de la réplication du génome (Lemmens et al. 2018; Saldivar et al. 2018). De même, la dégradation inducible d'ATR dans la lignée aviaire DT40 réduit considérablement la durée de la phase G2 et peut conduire à une entrée en mitose malgré la présence de foyers PCNA, un phénomène jamais observé en présence d'ATR (Eykelboom et al. 2013). **Ces données montrent que dans les cellules de vertébrés, l'activation de la voie ATR/Chk1 au cours de la phase S empêche l'induction du programme d'expression mitotique propre à la phase G2.**

DEUXIEME PARTIE : IMPACTS D'UN STRESS GENOTOXIQUE SUR LE DEROULEMENT DU CYCLE CELLULAIRE, DE LA PHASE S JUSQU'A LA MITOSE ET AU-DELA

En réponse à une large variété de stress génotoxiques, la progression du cycle cellulaire est ralentie, voire définitivement stoppée, et la dynamique de réplication de l'ADN adaptée en conséquence, limitant ainsi les conséquences potentielles sur le maintien de l'intégrité génétique. La voie ATR/Chk1 est la principale voie de signalisation (dite de « checkpoint ») activée en condition de stress réplcatif, et joue un rôle décisif pour réguler la progression du cycle cellulaire et préserver la stabilité génétique.

Cette partie s'attardera dans un premier temps à établir l'état de l'art sur l'activation de la voie ATR/Chk1, depuis la structure de l'ADN reconnue, jusqu'à la régulation de ses principaux substrats.

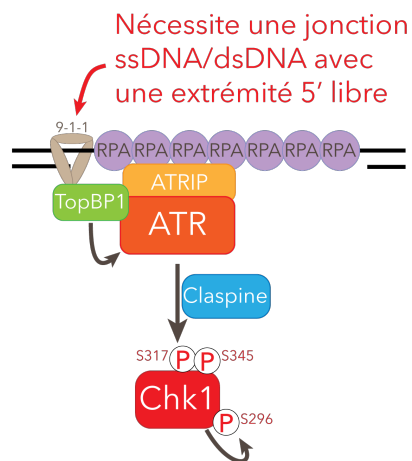
Dans un second temps, je décrirai l'impact d'un stress génotoxique —notamment un stress réplcatif—sur la dynamique de réplication, les cibles connues du checkpoint ATR/Chk1-dépendant pour stopper la progression du cycle cellulaire et les conséquences d'un stress réplcatif sur le déroulement de la mitose et le maintien de la stabilité génétique au cycle cellulaire suivant.

Enfin, dans une dernière partie, je présenterai l'état de l'art sur la tolérance/limitations des mécanismes de surveillance de l'ADN, notamment sur l'entrée des cellules en mitose en présence de dommages non réparés à l'ADN.

MECANISMES MOLECULAIRES D'ACTIVATION DE LA VOIE ATR/CHK1

Mon travail de thèse met en évidence une régulation différentielle de l'activité Chk1 au cours d'une phase S normale et au cours de la progression S/G2 en conditions de stress réplcatif. Afin d'aider à la compréhension de mes résultats, je présenterai ici les mécanismes et structures susceptibles d'activer la voie ATR/Chk1 au cours d'un cycle normal ou perturbé. Ce chapitre détaillera la cascade d'interactions et de phosphorylations aboutissant à l'activation de Chk1, résumée sur la **Figure 13**.

ACTIVATION D'ATR/CHK1 VIA 9-1-1 ET TOPBP1



ACTIVATION D'ATR/CHK1 VIA ETAA1

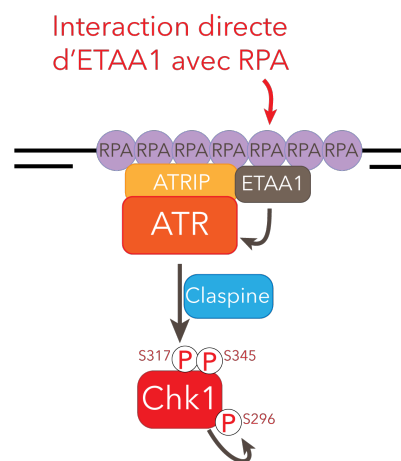


Figure 13 : Activation de la voie ATR/Chk1 par de l'ADN simple brin (ssDNA). RPA recouvre l'ADN simple brin et permet le recrutement d'ATRIP et ATR. Le complexe Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) est présent aux jonctions ssDNA/dsDNA terminées par une extrémité 5' libre et permet le recrutement de TopBP1. ETAA1 interagit directement avec RPA. Les protéines ETAA1 et TopBP1 peuvent toutes deux activer ATR via un domaine spécifique (AAD – ATR Activating Domain). ATR collabore avec la Claspine pour phosphoryler Chk1 sur les résidus S317 et S345 ce qui permet son activation. Enfin, l'autophosphorylation de Chk1 sur le résidu S296 est nécessaire pour inhiber l'entrée des cellules en mitose.

RECRUTEMENT ET ACTIVATION D'ATR A LA CHROMATINE

DEUX ACTIVATEURS D'ATR : TOPBP1 ET ETAA1

La protéine RPA (Replication Protein A) se lie à l'ADN simple brin et est indispensable au recrutement d'ATR à la chromatine (Costanzo et al. 2003, 7), notamment via ATRIP (*ATR-interacting protein*) qui interagit directement avec RPA et ATR (Cortez 2001; Zou 2003; Ball, Myers, et Cortez 2005; Ball et al. 2007). L'activation d'ATR nécessite alors son interaction avec un domaine AAD (*ATR-activating domain*), dont la présence ectopique suffit à activer ATR chez le Xénope. Deux

protéines porteuses d'un domaine AAD ont été identifiées : **ETAA1 et TopBP1** (A. Kumagai et al. 2006; Bass et al. 2016) (**Figure 13**).

ETAA1 interagit directement avec RPA — ce qui permet son recrutement *direct* à la chromatine— et active ATR via son domaine AAD (Feng et al. 2016; Bass et al. 2016; Haahr et al. 2016; Y.-C. Lee et al. 2016).

Contrairement à ETAA1, le recrutement de TopBP1 à la chromatine n'est pas direct et requiert l'interaction de TopBP1 avec le complexe Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1) (Joon Lee, Kumagai, et Dunphy 2007; Delacroix et al. 2007), lequel est spécifiquement recruté *in vitro* aux jonctions double brin - simple brin de l'ADN (ssDNA/dsDNA) avec une extrémité 5' libre (Ellison et Stillman 2003; Bermudez et al. 2003; Zou, Liu, et Elledge 2003; Majka et al. 2006). Certains travaux suggèrent que contrairement à ETAA1, la voie (9-1-1)-TopBP1 est critique dans la réponse ATR aux stress génotoxiques (Saldivar et al. 2018), ce qui pourrait expliquer l'observation initiale chez le Xénope d'une forte dépendance de la voie ATR/Chk1 envers cette structure particulière. En effet, dans des extraits d'ovocytes de Xénope, l'ajout de fragments de ssDNA n'active pas la voie ATR/Chk1, sauf si ceux-ci sont préalablement hybridés à un oligonucléotide ("primer") porteur d'une extrémité 5' libre (MacDougall et al. 2007). L'activation de la voie ATR/Chk1 augmente légèrement avec la taille des fragments de ssDNA, mais est fortement stimulée par la présence de *plusieurs* extrémités 5' libre (Van et al. 2010), suggérant que c'est la jonction entre un ssDNA et un dsDNA dont l'extrémité 5' est libre (ici appelée "*ssDNA-5'dsDNA*") qui permet l'activation de la voie ATR/Chk1 dans ces conditions.

GENERATION DE JONCTIONS *ssDNA-5'dsDNA* AU NIVEAU DE FOURCHES DE REPLICATION BLOQUEES

Le découplage fonctionnels des activités hélicases et polymérase à la fourche de réplication suite à un stress répliatif induit à l'aphidicoline, un inhibiteur des polymérase répliatives, aboutit à l'activation de la voie ATR/Chk1 (Byun 2005), peut-être suite à l'expansion d'une section (ou gap) de ssDNA entre la polymérase bloquée et l'hélicase qui poursuit l'ouverture de la double hélice d'ADN. Cependant, les mécanismes d'activation d'ATR/Chk1, en réponse à un stress répliatif, pourraient différer selon le brin considéré au niveau de la fourche de réplication.

En effet, *sur le brin tardif* la réplication discontinue de l'ADN, via les fragments d'Okazaki, fait qu'une extrémité 5' libre est disponible pour permettre l'activation de la voie ATR/Chk1 (**Fig. 14A**). *Sur le brin précoce*, c'est en revanche l'extrémité 3' du brin répliqué naissant qui est exposée, ce qui ne permet pas a priori l'activation d'ATR/Chk1. Néanmoins, la primase-polymérase PrimPol participe au redémarrage des fourches bloquées par une large variété d'altérations et il a été proposé qu'elle pourrait initier un nouveau priming en aval de la polymérase arrêtée sur le brin précoce (J. Bianchi et al. 2013; García-Gómez et al. 2013; Kobayashi et al. 2016; Mourón et al. 2013; Schiavone et al. 2016; Wan et al. 2013; Bai et al. 2020), ce qui pourrait participer à la formation de jonctions *ssDNA-5'dsDNA* et à l'activation d'ATR/Chk1 (**Fig. 14B**). En accord, il a été proposé, chez le Xénope, que la formation de primers jouait un rôle dans l'activation de la voie ATR/Chk1 après un blocage des fourches de réplication induit à l'aphidicoline (Van et al. 2010). Néanmoins, le rôle de PrimPol dans l'activation du checkpoint de la réplication est encore

spéculatif et la déplétion de PrimPol n'empêche pas l'activation d'ATR/Chk1 suite à un traitement à l'hydroxyurée (HU) (Wan et al. 2013).

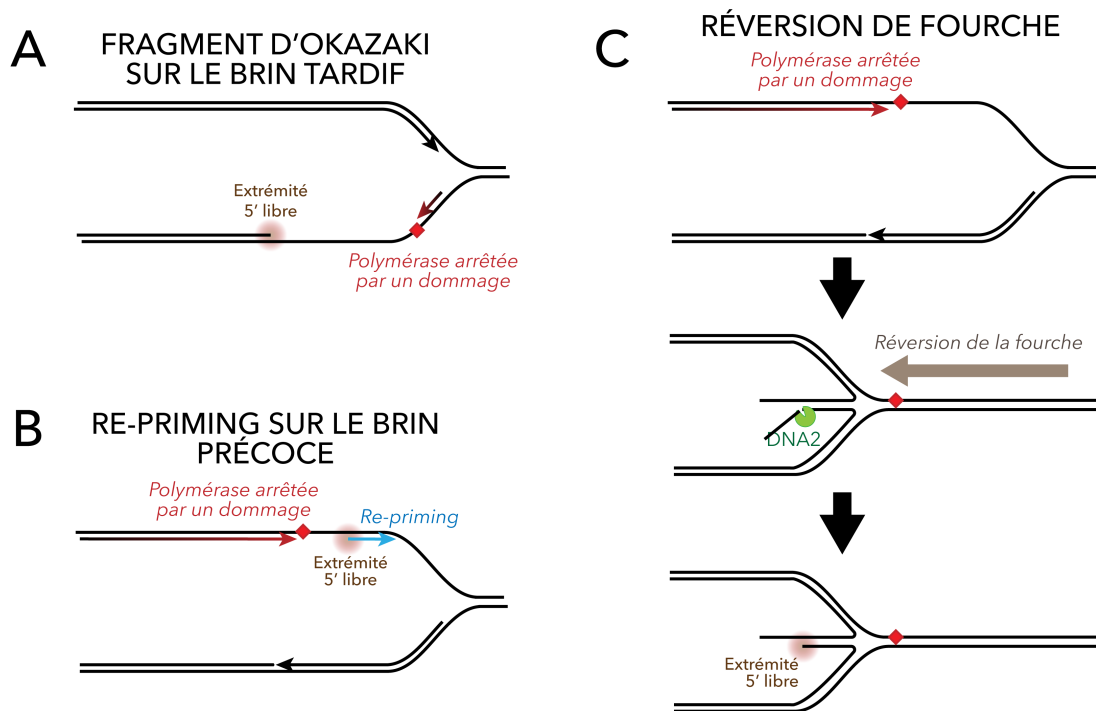


Figure 14 : Différents mécanismes générant une extrémité 5' libre à partir d'une fourche de réplication ralentie.

Dans certains cas, une fourche de réplication ralentie peut entraîner une réversion de fourche, une structure particulière dans laquelle les deux brins naissants se sont hybridés pour former un nouvel élément double brin (Figure 14C), ce qui permet une stabilisation de la fourche de réplication et/ou le passage ("bypass") du blocage de la fourche par un mécanisme de *template switching* (pour revues (Neelsen et Lopes 2015; Ait Saada, Lambert, et Carr 2018)). DNA2 joue un rôle dans le redémarrage des fourches de réplication après un blocage à l'HU (Thangavel et al. 2015) et la déplétion de DNA2 augmente (i) le nombre de fourches reversées, (ii) ainsi que la proportion de fourches reversées dont les extrémités n'ont pas subi de résection et sont formées uniquement de dsDNA plutôt que de ssDNA/dsDNA (Thangavel et al. 2015) (Figure 14C). L'activité hélicase/nuclease 5'>3' de DNA2 pourrait donc former une jonction ssDNA-5'dsDNA au niveau de l'ADN double brin reversé et participer à l'activation de la voie ATR/Chk1.

Suite à une large diversité de traitements génotoxiques, il a été observé en microscopie électronique chez la levure, le Xénope et dans les cellules de mammifères des structures pouvant correspondre à ces trois modes de genèse d'une jonction ssDNA-5'dsDNA à la fourche de réplication, **qui pourraient donc chacune contribuer à l'activation de la voie ATR/Chk1 *in vivo* en conditions de stress répliatif** (Zellweger et al. 2015; Lopes, Foiani, et Sogo 2006; Hashimoto et al. 2010).

ACTIVATION D'ATR/CHK1 VIA LA RESECTION DE CASSURES DOUBLE BRIN DE L'ADN

Indépendamment du processus de réplication de l'ADN, la voie ATR/Chk1 peut être activée de manière ATM et MRE11 dépendante suite à l'induction de cassures double brin (DSB) (Jazayeri et al. 2006). Brièvement, la réparation de cassures DSB peut impliquer deux types de mécanismes : l'"End-joining" —qui va fusionner les deux extrémités de la cassure double brin et n'entraîne pas à priori l'activation d'ATR/Chk1— et la recombinaison homologue, qui nécessite des étapes de résection des extrémités avant réparation de la cassure à l'aide d'une matrice homologe. Le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) est rapidement recruté au niveau des cassures DSB et permet de maintenir un lien physique entre les deux extrémités (Chu 2014). MRN recrute ATM, dont l'activation permet le recrutement de CtIP (CtBP-interacting protein). Mre11 possède à la fois une activité endonucléase et une activité exonucléase 3'>5' : l'activité endonucléase permet de générer une cassure simple brin en amont suivie d'une résection limitée par l'activité 3'>5' exonucléase (Shibata et al. 2014). Une résection plus étendue dans le sens 5'>3' sous la dépendance des exonucléases Exo1 et DNA2 et de l'hélicase BLM (Chu 2014) permet l'activation d'ATR et Chk1 (Figure 15). Les complexes Cycline A2/Cdk phosphorylent CtIP et Exo1, ce qui joue un rôle critique pour restreindre la recombinaison homologue aux phases S et G2 du cycle cellulaire (Huertas et Jackson 2009; Tomimatsu et al. 2014).

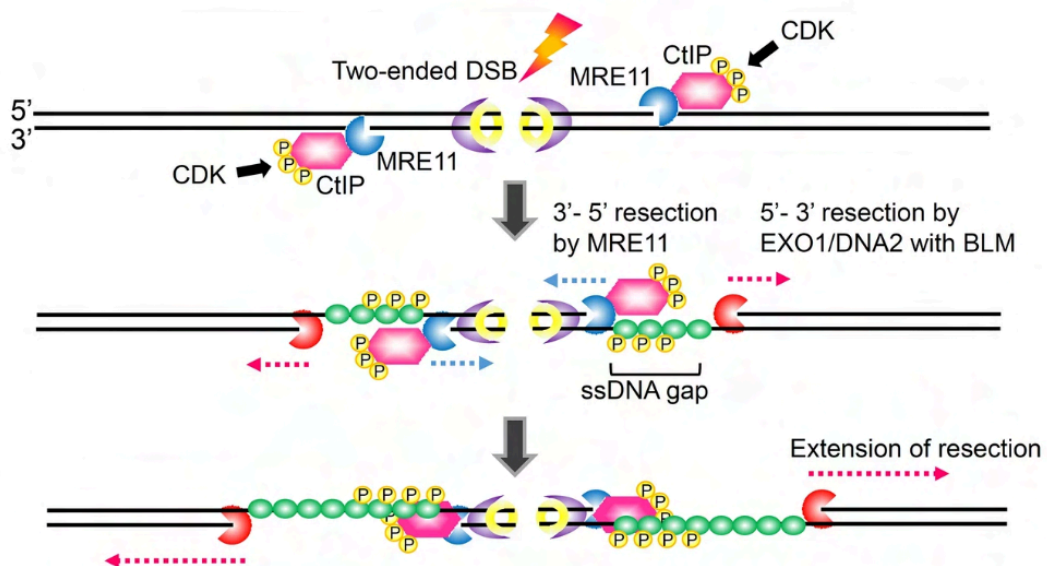


Figure 15 : Mécanismes de génération d'ADN simple brin à partir d'une cassure double brin. (adapté de (Katsuki et al. 2020))

AMPLIFICATION DU SIGNAL ATR

Suite à un traitement à la camptothécine (CPT, un inhibiteur sélectif de l'ADN topoisomérase I), l'E3 ubiquitine ligase PRP19 (Pre-mRNA-processing factor 19) est recrutée à la chromatine où elle

interagit avec RPA de manière ATR dépendante. PRP19 ubiquitine RPA et sa déplétion réduit l'apparition de foyers ATRIP ainsi que l'activation de la voie ATR/Chk1. D'autre part, un mutant de PRP19 déficient de l'activité E3 ubiquitine ligase est correctement recruté à RPA, mais ne restaure pas l'activation de la voie ATR/Chk1 suite à la déplétion de PRP19 endogène (Maréchal et al. 2014). Ces observations suggèrent un modèle d'amplification de l'activité ATR par un phénomène de rétrocontrôle positif : **l'activation d'ATR permet le recrutement de PRP19, qui va ubiquitiner RPA et promouvoir le recrutement de nouvelles sous-unités ATR-ATRIP, renforçant ainsi l'activation de la voie ATR/Chk1.**

ACTIVATION DE CHK1 PAR ATR ET ROLE DE LA CLASPINE

In vitro et *in vivo*, **ATR phosphoryle Chk1 au niveau des sérines S317 et S345, ce qui augmente son activité kinase** (Zhao et Piwnica-Worms 2001; Walker et al. 2009). Chez la souris, l'inactivation conditionnelle de Chk1 dans des cellules ES conduit à une entrée prématurée des cellules en mitose qui est compensée par l'expression de Chk1 WT ou d'un mutant Chk1 S317A mais pas par l'expression d'un mutant S345A (Niida et al. 2007), **suggérant que la phosphorylation du résidu S345 joue un rôle critique dans la régulation de l'activité Chk1.** Bien qu'il n'empêche pas l'entrée des cellules en mitose, l'expression du mutant S317A conduit à un nombre important d'anormalités chromosomiques en métaphase ainsi qu'à une plus grande proportion de cellules tétraploïdes en sortie de mitose (Niida et al. 2007), suggérant que la phosphorylation de la sérine S317 contribue néanmoins à la régulation correcte de Chk1.

Chez le Xénope et dans les cellules humaines, **la phosphorylation de Chk1 par ATR nécessite l'interaction de Chk1 avec une protéine adaptatrice, la claspine** (A. Kumagai et Dunphy 2000; Claudia Christiano Silva Chini et Chen 2003; A. Kumagai, Kim, et Dunphy 2004; H. Y. Yoo 2006; Lindsey-Boltz et al. 2009). La claspine interagit avec ATR même en absence de stress (Claudia Christiano Silva Chini et Chen 2003), alors que son interaction avec Chk1 augmente suite à un stress génotoxique (Claudia Christiano Silva Chini et Chen 2003). Chez le Xénope, la **région d'interaction entre Chk1 et la claspine** a été déterminée (A. Kumagai et Dunphy 2003) et **est dénommée CKBD** (Chk1-Binding Domain) ou CKAD (Chk1-Activating Domain). Cette région contient plusieurs résidus phosphorylables très conservés, dont le résidu T916, dont la mutation sous une forme non-phosphorylable empêche l'interaction de la claspine et Chk1 (A. Kumagai et Dunphy 2003; Claudia C. S. Chini et Chen 2006; Clarke et Clarke 2005).

La (les) kinase(s) responsable(s) de la phosphorylation du domaine CKBD reste controversée. *In vitro*, Chk1 peut phosphoryler le résidu T916 du CKBD et *in vivo*, Chk1 est nécessaire à la stabilité de la claspine (C C S Chini, Wood, et Chen 2006). Néanmoins, l'inhibition de Chk1 n'empêche pas la phosphorylation du résidu T916 de la claspine (Bennett et al. 2008), suggérant que Chk1 n'est pas responsable de cette phosphorylation *in vivo*, ou que d'autres kinases peuvent également assurer cette fonction. Deux autres candidats ont été proposés : la caséine kinase 1 gamma 1 (CK1y1) et Cdc7. CK1y1 phosphoryle la claspine au niveau du CKBD *in vitro* et sa déplétion réduit les phosphorylations S317 et S345 de Chk1 *in vivo* suite à un traitement à l'aphidicoline (Meng et

al. 2011). Néanmoins, ces conditions de déplétion conduisent à une plus faible proportion de cellule en phase S n'excluant pas que l'effet sur l'activation de la voie Chk1 soit indirect.

La claspine interagit également avec la kinase Cdc7 (C.-C. Yang et al. 2016; 2019) qui peut la phosphoryler au niveau du CKBD (C.-C. Yang et al. 2019; Rainey et al. 2013; J. M. Kim et al. 2008). L'inactivation de Cdc7 dans les cellules ES de souris ou sa déplétion dans les cellules humaines réduit fortement la phosphorylation S317 de Chk1 suite à un traitement à l'HU ou aux UV (C.-C. Yang et al. 2019; J. M. Kim et al. 2008). A l'inverse, l'inhibition de Cdc7 plusieurs heures après un traitement HU ne fait pas disparaître la phosphorylation S317 de Chk1 (Rainey et al. 2013). Compte-tenu du rôle de Cdc7 dans l'activation des origines de réplication, un effet indirect ne peut à nouveau pas être exclu.

En résumé, si l'importance de la claspine et de la phosphorylation du domaine CKBD dans l'activation de Chk1 sont bien établies, les modalités de cette phosphorylation *in vivo* reste partiellement élucidées.

ACTIVATION DE CHK1 PAR AUTOPHOSPHORYLATION

Chk1 s'autophosphoryle sur la sérine S296 (Kasahara et al. 2010) et en accord, l'inhibition de son activité par des agents pharmacologiques fait disparaître la phosphorylation de ce résidu, mais pas celle des résidus S317 et S345 (Kasahara et al. 2010; Massey et al. 2015). L'expression d'une forme mutante S296A dans des cellules ne restaure pas la réponse aux lésions de l'ADN après déplétion de la forme endogène (Kasahara et al. 2010), suggérant que **l'autophosphorylation de Chk1 sur le résidu S296 participe à ses fonctions biologiques.**

La régulation de ce résidu n'est pas clairement élucidée et des résultats contradictoires ont été obtenus. Dans des cellules HeLa et HT29, la phosphorylation du résidu S296 augmente avec celle des résidus S345 et S317 suite à un stress génotoxique (Kasahara et al. 2010; Massey et al. 2015; Clarke et Clarke 2005) alors que l'inhibition d'ATR diminue l'intensité du signal S296P uniquement dans les cellules HeLa (Kasahara et al. 2010), suggérant que la phosphorylation de Chk1 par ATR pourrait permettre l'autophosphorylation de Chk1 sur le résidu S296. A contrario, l'inhibition d'ATR dans les lignées U2OS et HT29 n'a qu'un effet très modeste sur la phosphorylation S296P, tandis que l'inhibition de Chk1 la fait totalement disparaître (Massey 2016). Enfin, le signal Chk1 S296P augmente suite à divers traitements génotoxiques dans les lignées HeLa, HT29 et U2OS (Kasahara et al. 2010; Massey et al. 2015; Michelena et al. 2019) mais pas dans les lignées Colo205, SW620 ou hTERT-RPE-1 (Massey et al. 2015; Michelena et al. 2019). **Ces données soulignent que la régulation du résidu S296 *in vivo* en présence ou en absence de stress génotoxique reste à approfondir.**

LIBERATION DE LA CHROMATINE

Il a été estimé par fractionnement biochimique qu'environ 20% de la quantité totale de Chk1 est localisée à la chromatine, mais que suite à un stress génotoxique (HU, UV ou radiations ionisantes)

la fraction chromatinienne est fortement réduite (Smits, Reaper, et Jackson 2006; Shimada et al. 2008; Kasahara et al. 2010). La relocalisation de Chk1 dans une fraction soluble, notamment le nucléoplasme, survient dès les premières minutes après traitement aux UV et dépend d'ATR (Smits, Reaper, et Jackson 2006). Par immunofluorescence, il a été observé que la forme Chk1 pS296 est localisée dans le nucléoplasme tandis que la forme Chk1 pS345 est principalement localisée à la chromatine (Kasahara et al. 2010). **Ces observations suggèrent un modèle selon lequel Chk1 est phosphorylée à la chromatine par ATR sur les résidus S345 et S317, ce qui induit sa relocalisation dans le nucléoplasme, où Chk1 s'autophosphoryle sur le résidu S296 alors que les résidus S345 et S317 sont rapidement déphosphorylés.**

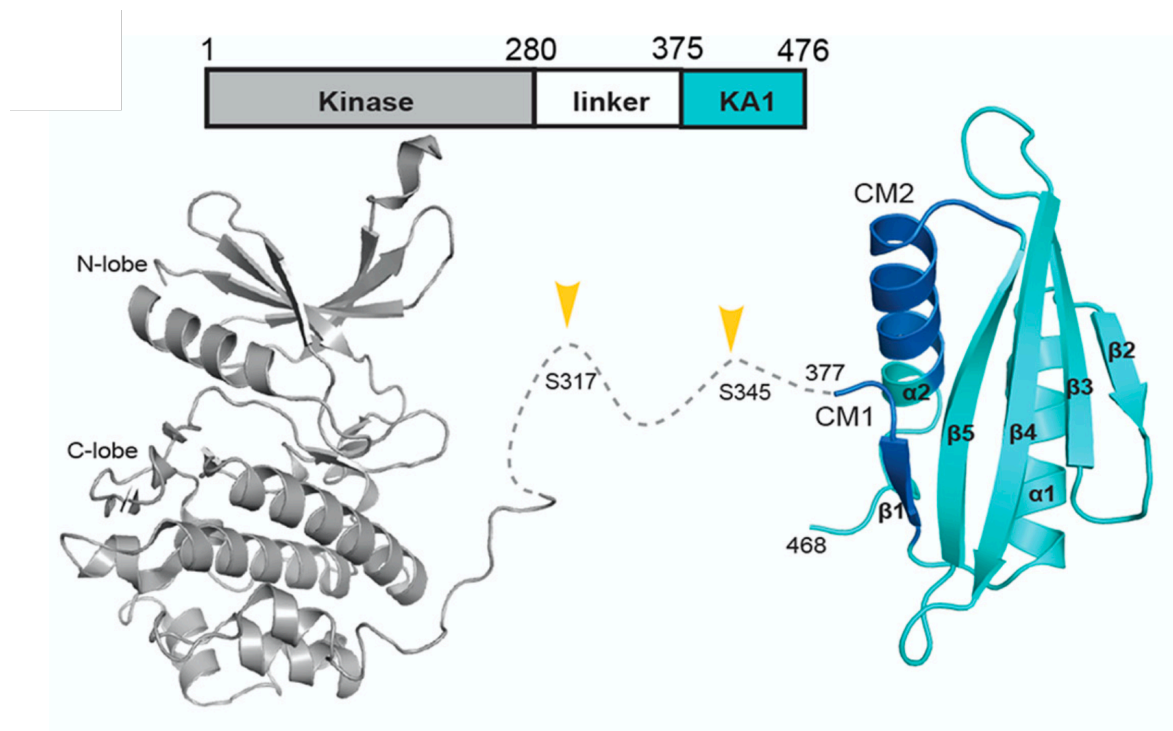


Figure 16 : Structure et domaines de Chk1 (adapté de (Emptage et al. 2017))

CHANGEMENTS DE CONFORMATION DE CHK1

Chez l'homme, Chk1 est une S/T kinase de 476 acides aminés constituée d'un domaine kinase (KD, Kinase Domain) en N-terminal dont la structure a été obtenue par cristallographie avec une résolution de 1.7 Å (P. Chen et al. 2000), suivi d'une région "linker" puis d'un domaine C-terminal dénommé Kinase Associated (KA1) domain (P. Chen et al. 2000; Emptage et al. 2017) (Figure 16). Le domaine kinase isolé possède une activité enzymatique ~20 fois plus élevée que la protéine entière (P. Chen et al. 2000; Katsuragi et Sagata 2004) et des mutations déstabilisant la structure du domaine KA1 rendent Chk1 constitutivement active, même en absence de phosphorylation du résidu S345 par ATR (E.-Y. Gong et al. 2015). Ces deux domaines interagissent *in vitro* et *in vivo* (Katsuragi et Sagata 2004; Walker et al. 2009; Emptage et al. 2017) et des données biochimiques par approche FRET suggèrent que suite à un traitement génotoxique, la distance entre les

domaines KD et KA1 augmente (Han et al. 2016). **Sur la base de ces observations, il a été proposé que la phosphorylation de Chk1 par ATR sur les résidus S345 et S317 modifie l'interaction entre les domaines N- et C-terminal, libérant ainsi le domaine kinase et permettant l'activation complète de Chk1.**

SUBSTRATS DE CHK1

Un crible phosphoprotéomique visant à identifier les substrats de la kinase Chk1 à partir d'une forme mutante pouvant utiliser des analogues de l'ATP (Chk1^{as}, *analogue sensitive*) a permis d'identifier 268 sites de phosphorylation sur 171 protéines différentes (Blasius et al. 2011). Environ 9% des substrats identifiés sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et 39% dans le métabolisme des nucléotides, ce qui inclut des protéines impliquées dans la réplication (Blasius et al. 2011; Shimada et al. 2008). Néanmoins, les substrats de Chk1 les mieux caractérisés sont les phosphatases Cdc25, notamment Cdc25A, dont Chk1 promeut la dégradation (Niels Mailand et al. 2000; Busino et al. 2003; Sørensen et al. 2003; Goto et al. 2019; Karlsson-Rosenthal et Millar 2006). La régulation des Cdc25 par Chk1 est développée par la suite.

LE STRESS REPLICATIF

Dans son acceptation la plus générale, le terme de « stress réplcatif » fait référence à l'ensemble des conditions et altérations pouvant mener à un dysfonctionnement du processus de réplication du génome. Ces altérations peuvent avoir des sources, des conséquences et des modalités extrêmement variables, rendant difficile l'élaboration d'une définition unique basée sur un ou plusieurs biomarqueurs. **Ici, le stress réplcatif fera référence à un état de la cellule où la progression des fourches de réplication est ralentie ou stoppée.**

Compte tenu de l'importance physiopathologique du stress réplcatif —notamment dans le développement tumoral— je présenterai ici les sources potentielles de stress réplcatif auxquelles une cellule peut être exposée, ainsi que l'impact de ce stress réplcatif sur la dynamique de la réplication, notamment les effets médiés par l'activation du checkpoint ATR/Chk1. Les effets de l'activation de ce checkpoint de la réplication sur l'entrée en mitose seront développés au chapitre suivant (p51).

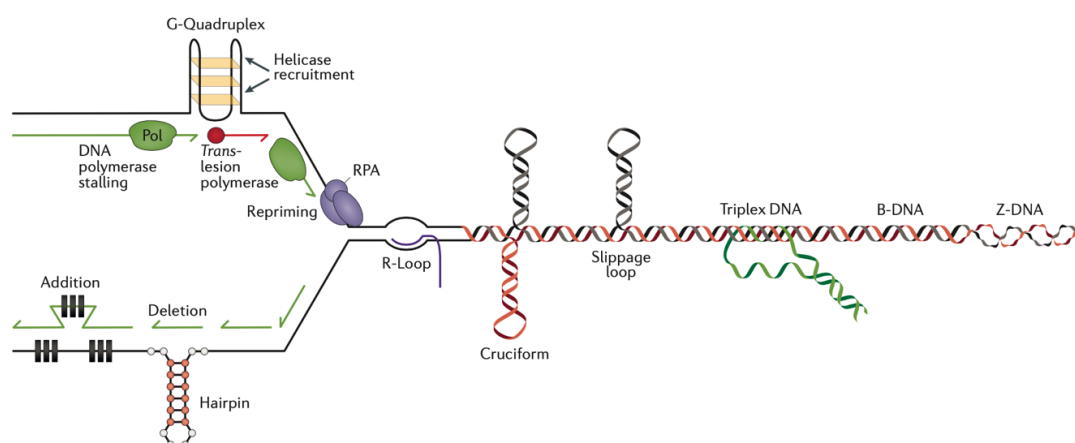


Figure 17 : Exemples de différentes structures perturbant la progression de la fourche de réplication. Adapté de (Técher et al. 2017).

SOURCES DE STRESS REPLICATIF

SOURCES ENDOGENES DE STRESS REPLICATIF

OBSTACLES « NATURELS » A LA PROGRESSION DE LA FOURCHE DE REPLICATION

Au niveau de la fourche de réplication, la progression de l'hélicase MCM ou de la polymérase peut être interrompue par une large variété d'obstacles, comme des lésions de l'ADN (sites abasiques, bases endommagées, pontages ("cross-link") inter- ou intra-brins (dimères de pyrimidines...) ou la présence de structures secondaires de l'ADN comme les épingles à cheveux ("hairpins") ou les G-quadruplexes (G4) (Pour revues (Lambert et Carr 2013; Mendoza et al. 2016; Técher et al. 2017)) (Figure 17).

La réplication et la transcription opèrent sur l'ADN et des conflits entre les deux machineries macromoléculaires sont une source potentielle d'instabilité génétique (García-Muse et Aguilera 2016; Hamperl et Cimprich 2016; Helmrich et al. 2013). La progression de la fourche de réplication peut être perturbée par des contraintes topologiques (Kouzine et al. 2013) ou par la présence d'hybrides ARN/ADN appelés **R-loops** issus de la ré-hybridation en arrière de l'ARN polymérase du brin d'ARN naissant (Helmrich, Ballarino, et Tora 2011). En l'absence de résolution, ces structures peuvent aboutir à une progression irrégulière des fourches de réplication, à l'accumulation de dommages à l'ADN et à la genèse de cassures chromosomiques en mitose (Tuduri et al. 2009).

Au sein de la chromatine, les sites les plus actifs de transcription et de réplication sont séparés dans l'espace et suivent un pattern d'activation précis dans le temps (Wei 1998), et les deux processus sont généralement couplés afin de favoriser la co-directionnalité de la réplication et de la transcription (Petryk et al. 2016). Ce biais de co-directionnalité permet d'éviter les collisions frontales entre les deux machineries macromoléculaires, lesquelles stabilisent les R-loops (Hamperl et al. 2017). Afin d'éviter leur formation ainsi que de favoriser leur résolution, de multiples mécanismes ont évolués pour prendre en charge les R-loops et limiter leurs conséquences sur le maintien de la stabilité du génome : pour une revue récente, (García-Muse et Aguilera 2019).

FACTEURS LIMITANTS LA REPLICATION

La réplication du génome diploïde des cellules humaines, soit $6,4 \cdot 10^9$ paires de bases, en quelques heures est un processus nécessitant une quantité importante de nombreux facteurs protéiques limitants. Un rôle critique de la quantité des hélicases Mcm2 et Mcm7 (Passerini et al. 2016), du niveau d'expression de RPA (Luis Ignacio Toledo et al. 2013), du pool de dNTPs (désoxynucléotides) (Poli et al. 2012), des histones (Mejlvang et al. 2014) ou encore de Cdc45 (Wong et al. 2011; Srinivasan et al. 2013; Köhler et al. 2016) a été mis en évidence, afin d'éviter une situation de stress réplcatif.

METABOLISME CELLULAIRE

Une autre source de dommages à l'ADN provient du métabolisme cellulaire, notamment de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Il est bien établi que le stress oxydant peut conduire à des événements de mutagénèse —notamment via la genèse de bases oxydées et de sites apuriques— mais la présence de ROS peut également affecter la vitesse de progression des fourches de réplication (Wilhelm et al. 2016). Une autre source de stress réplcatif liée au métabolisme est la génération d'aldéhydes, notamment via le métabolisme des alcools (Brooks et Theruvathu 2005), ce qui peut conduire à la formation d'adduits à l'ADN, de pontages ADN-protéine et de pontages entre deux brins d'ADN.

INDUCTION D'UN STRESS REPLICATIF VIA L'ACTIVATION D'ONCOGENES

Dans des tissus hyperplasiques ou dans des lésions tumorales précoces, il a été observé la présence récurrente de différentes marques d'une réponse aux dommages à l'ADN, telles que γ -H2AX, p-Chk2, p-ATM, p-P53 suggérant l'activation soutenue d'un point de contrôle (checkpoint) (Gorgoulis et al. 2005; Bartkova et al. 2005). En revanche, la présence de dommages à l'ADN n'est pas observée dans les tissus physiologiquement prolifératifs comme l'épithélium du colon,

suggérant que l'activation d'un checkpoint est vraisemblablement liée à la mise en place de mécanismes oncogéniques précoces. L'hypothèse d'un stress réplicatif et de l'activation du DNA Replication Checkpoint (DRC) a été émise, compte tenu de la surexpression fréquente de la Cycline E dans les tissus hyperplasiques (Gorgoulis et al. 2005).

En accord avec cette hypothèse, la surexpression expérimentale de proto-oncogènes (Cycline E, (Bartkova et al. 2006; Bester et al. 2011; Neelsen et al. 2013)), Cdc25A (Neelsen et al. 2013), c-Myc (Srinivasan et al. 2013; Maya-Mendoza et al. 2015) ou d'oncogènes (H-RasV12, Di Micco et al. 2006; Maya-Mendoza et al. 2015) (pour revue (Primo et Teixeira 2020)) perturbe la réplication, conduisant à l'activation des voies ATM/Chk2, ATR/Chk1 et/ou p53 ainsi qu'à l'accumulation de dommages à l'ADN (Bartkova et al. 2005; 2006; Di Micco et al. 2006; Dominguez-Sola et al. 2007), pouvant aboutir à la sénescence ou à la mort cellulaire (Halazonetis, Gorgoulis, et Bartek 2008).

Dans les étapes précoces du développement tumoral, l'activation de ces voies de signalisation, notamment p53, jouerait un rôle de « barrière » à la tumorigénèse en limitant la prolifération de cellules soumises à un stress réplicatif constitutif.

AGENTS PHARMACOLOGIQUES UTILISES POUR ETUDIER LE STRESS REPLICATIF

Bien que la surexpression expérimentale d'oncogènes soit plus proche de la physiopathologie humaine, le stress réplicatif et ses conséquences sur le maintien de l'intégrité du génome sont fréquemment étudiés via l'utilisation d'agents pharmacologiques comme l'aphidicoline ou l'hydroxyurée.

- L'aphidicoline est un inhibiteur des polymérase réplicatives alpha (Sheaff, Ilsley, et Kuchta 1991), delta (Wahl et al. 1986) et epsilon (Cheng et Kuchta' 1993) dont l'utilisation conduit de manière dose-dépendante à un ralentissement ou à un arrêt de la progression des fourches de réplication (Koundrioukoff et al. 2013). Le traitement à l'aphidicoline génère de nombreux gaps d'ADN simple brin (ssDNA) (Lonn et Lonn 1988) et active la voie ATR/Chk1 par un mécanisme impliquant vraisemblablement un découplage entre les activités hélicase et polymérase (Chang, Lupardus, et Cimprich 2006).

- L'hydroxyurée (HU) inhibe l'enzyme ribonucléotide réductase, ce qui modifie rapidement les pools cellulaires de dNTPs (V. Bianchi, Pontis, et Reichard 1986). Tout comme l'aphidicoline, l'hydroxyurée a d'importants effets sur la dynamique de réplication (Anglana, Bensimon, et Debatisse 2003). Le traitement à l'aphidicoline favorise l'apparition de gaps ssDNA et de cassures double brin en métaphase au niveau de régions particulières du génome appelées sites fragiles communs (CFS). L'hydroxyurée favorise également l'apparition de tels gaps et cassures en métaphase, mais à des loci différents et donc vraisemblablement via des mécanismes distincts (Barlow et al. 2013). Enfin, des données chez la levure montrent que l'addition d'hydroxyurée induit en quelques dizaines de minutes la production de ROS (Huang et al. 2016).

EFFETS D'UN STRESS REPLICATIF

NOTION DE CHECKPOINT INTRA-S

La notion de point de contrôle ou « checkpoint » de l'ADN fait référence aux voies de signalisation liant la détection de lésions de l'ADN à l'induction d'un arrêt transitoire ou définitif de la progression du cycle cellulaire. Selon que le stress génotoxique a lieu en phase G1, en S ou en G2, les voies de signalisation activées pourront être différentes, tout comme les mécanismes de réparation et les conséquences sur le devenir cellulaire (pour revue (Shaltiel et al. 2015)). Dans un but de clarté, dans ce manuscrit, la dénomination « *checkpoint G2/M* » fera référence à la réponse cellulaire empêchant l'entrée des cellules en mitose en présence d'un stress génotoxique, tandis que « *checkpoint intra-S* » fait référence à celle mise en place pour répondre à la présence d'un stress réplcatif en phase S.

IMPACT SUR LA DYNAMIQUE DE REPLICATION

Suite à l'induction d'un stress réplcatif, deux effets apparemment contradictoires ont été décrits : **l'inhibition globale au sein du génome de l'activation d'origines de réplication, mais l'activation locale d'origines dormantes à proximité des fourches de réplication ralenties.**

La présence simultanée de ces deux phénomènes a notamment pu être mise en évidence en observant la dynamique des foyers d'incorporation d'EdU (un analogue de nucléoside) et en la comparant à la vitesse de progression des fourches de réplication mesurée sur fibres d'ADN étirées (peignage moléculaire ou DNA combing) (Xin Quan Ge et Blow 2010). Dans des cellules humaines en début de phase S, un traitement avec de faibles doses d'HU réduit l'intensité des foyers d'incorporation d'EdU, mais pas autant qu'attendu compte tenu de la baisse de vitesse des fourches de réplication, suggérant que le nombre d'origines actives a augmenté localement au sein de chaque foyer EdU. En revanche, des expériences de "pulse-chase" montrent que l'apparition de nouveaux foyers EdU est inhibée en présence d'HU, suggérant que l'activation de nouvelles origines de réplication est inhibée à *distance* des fourches actives (Xin Quan Ge et Blow 2010). La coexistence de ces deux phénomènes a été confirmée par des approches de génomique : dans des cellules en phase S et traitée à l'HU, on observe dans les régions précoces des regroupements ("clusters") d'origines actives plus rapprochées qu'en conditions normales, tandis que les origines de réplication plus tardives ne sont pas activées (Karnani et Dutta 2011). Enfin, en microscopie à super-résolution, la comparaison des foyers PCNA avec ou sans traitement à l'HU, montre que suite à un stress réplcatif, les foyers PCNA sont ~40% moins nombreux mais ~30% plus larges (Cseresnyes, Schwarz, et Green 2009), ce qui est compatible avec une inhibition globale de l'activation d'origines de réplication mais une augmentation locale de leur nombre.

ACTIVATION D'ORIGINES DORMANTES

Chez les métazoaires, le nombre de complexes de pré-réplication assemblés ("licensed") est en large excès par rapport au nombre d'origines activées (Cayrou et al. 2011). La réduction du nombre de complexes de pré-réplication assemblés via la déplétion des protéines du complexe MCM2-7 n'a qu'un effet modeste sur la dynamique de réplication ou la viabilité cellulaire en conditions non-perturbées, mais potentialise fortement la sensibilité à un stress réplcatif (X. Q. Ge, Jackson, et Blow 2007; Ibarra, Schwob, et Méndez 2008; Gineau et al. 2012).

Un traitement à l’HU réduit la vitesse des fourches de réplication mais également la distance inter-origine (IOD), alors que la déplétion de MCM5 supprime partiellement cette diminution de l’IOD (X. Q. Ge, Jackson, et Blow 2007), **suggérant que les origines de réplication surnuméraires (ou "dormantes") sont mobilisées pour compenser le ralentissement des fourches de réplication dû à un stress réplcatif**. L’activation d’origines dormantes est un mécanisme rapide intervenant dans les 30 minutes suivant le ralentissement des fourches de réplication (Courbet et al. 2008). Il reste débattu si l’activation des origines dormantes dépend d’une signalisation active liée au checkpoint intra-S (Y.-H. Chen et al. 2015) et/ou si il s’agit d’une conséquence indirecte du ralentissement des fourches de réplication favorisant l’activation d’origines dormantes situées entre deux origines de réplication ralenties. La vitesse de progression des fourches et la densité en évènements d’initiation semblent en effet liées et moduler l’un affecte l’autre en retour (Rodriguez-Acebes, Mourón, et Méndez 2018; Köhler et al. 2016).

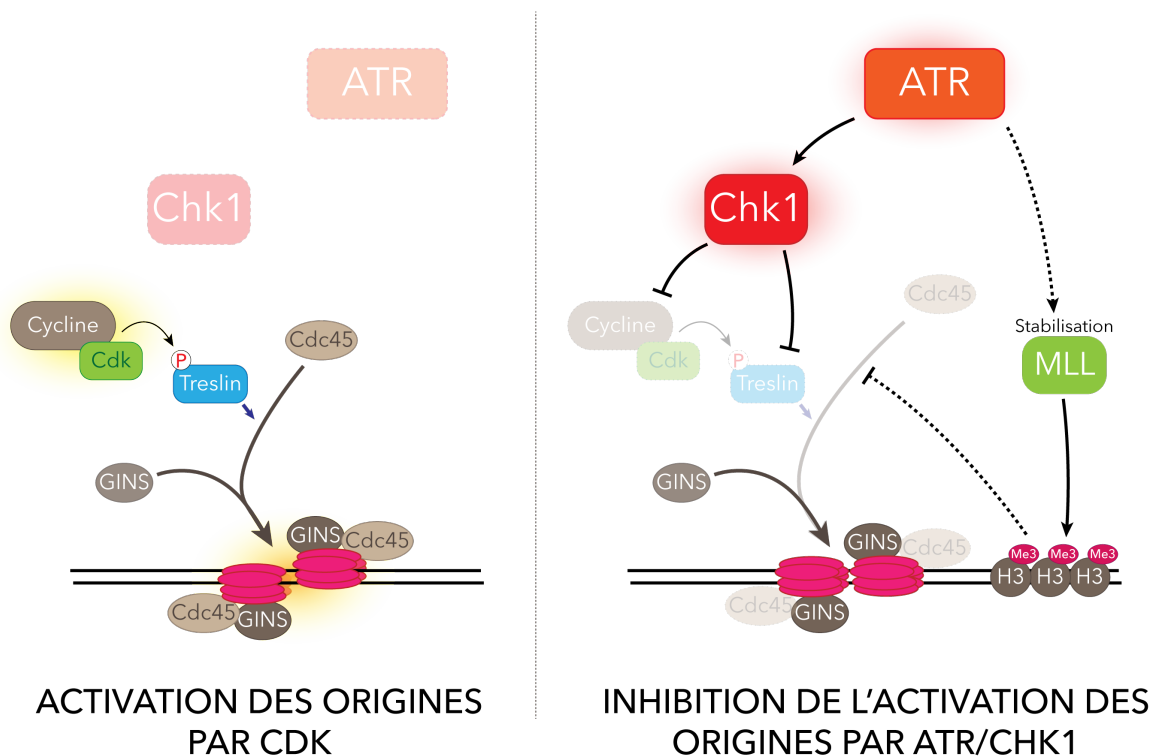


Figure 18 : Mécanismes possibles d’inhibition des origines tardives par la voie ATR/Chk1. Chk1 peut empêcher le recrutement de Cdc45 et l’activation d’origines de réplication en inhibant les complexes Cyclines/Cdk qui phosphorylent la Tresline, ou en interagissant directement avec la Tresline. Par ailleurs, ATR favorise la stabilité de l’histone méthyl-transférase MLL, ce qui pourrait limiter le recrutement de Cdc45 en favorisant la modification épigénétique H3K4me3.

INHIBITION DES ORIGINES TARDIVES

L’analyse d’intermédiaires de réplication sur gels à 2D (Kramarz et al. 2021) montre que chez la levure *S. cerevisiae*, un traitement au MMS (Methyl methanesulfonate) bloque l’apparition de nouveaux yeux de réplication bien avant que l’ADN ne soit totalement répliqué (Shirahige et al. 1998). Similairement, chez le Xénope ou dans les cellules de mammifères, des traitements avec des agents ou radiations génotoxiques réduisent la synthèse globale d’ADN ainsi que l’initiation

de nouvelles origines de réplication analysées par peignage moléculaire (Falck et al. 2002; Costanzo et al. 2003; Luciani 2004; C. J. Merrick, Jackson, et Diffley 2004; Chastain II et al. 2006). L'inhibition de la synthèse d'ADN peut être compensée par l'inhibition ou la déplétion d'ATR ou Chk1 (Falck et al. 2002; Chastain II et al. 2006), suggérant que **l'activation de la voie ATR/Chk1 inhibe l'activation de nouvelles origines de réplication.**

Plusieurs mécanismes moléculaires ont été proposés pour expliquer cet effet inhibiteur sur les origines de réplication tardives (**Figure 18**) :

ATR peut phosphoryler Dbf4, une sous unité régulatrice de Cdc7 (A. Y.-L. Lee et al. 2012), mais chez le Xénope ou dans les cellules humaines, le recrutement de Cdc7 ou de ses sous unités régulatrices Drf1 et Dbf4 à la chromatine est maintenu en présence d'un stress génotoxique et l'activité enzymatique de Cdc7 n'est pas diminuée (Yanow et al. 2003; Tenca et al. 2007; Tsuji et al. 2008; Yamada et al. 2013). Il est donc **peu probable que chez les vertébrés la voie ATR/Chk1 régule directement l'activité Cdc7 afin d'inhiber l'activation d'origines de réplication tardives en conditions de stress réplicatif.**

Il a été mis en évidence par ChIP, suite à un traitement à l'HU, que les origines de réplication tardives recrutent MCM10 mais pas Cdc45, alors que l'inhibition d'ATR/ATM dans ces conditions permet le recrutement de Cdc45 à ces origines (Karnani et Dutta 2011), suggérant que le check-point de la réplication agit en empêchant le recrutement de Cdc45 aux complexes de pré-réplication. En accord, l'inhibition des activités Cdk supprime le recrutement de Cdc45 à la chromatine (Falck et al. 2002). Au cours d'un cycle cellulaire normal, l'activité Cdk2 favorise le recrutement de Cdc45 via la phosphorylation de la Tresline (voir p14), mais Chk1 en interagissant avec la Tresline module le recrutement de Cdc45 (Guo et al. 2015). **Chk1 pourrait donc empêcher le recrutement de Cdc45 et l'activation d'origines par deux mécanismes distincts : soit à travers la régulation de l'activité Cdk, soit en interagissant directement avec la Tresline.**

Enfin, suite à un traitement HU, ATR phosphoryle l'histone méthyltransférase MLL, ce qui empêche son interaction avec SCF^{Skp2} et permet son accumulation. Dans ces conditions, l'accumulation de marques H3K4me3 pourrait empêcher le recrutement de Cdc45 aux origines de réplication (H. Liu et al. 2010).

LES CIBLES DU CHECKPOINT G2/M POUR INHIBER LA TRANSITION EN MITOSE

Suite à une variété de stress génotoxiques, l'entrée des cellules en mitose est rapidement inhibée. Cet effet repose sur une réponse *rapide* visant spécifiquement l'activité d'un ensemble d'inducteurs mitotiques, mais également sur une réponse p53-dépendante *plus lente*, qui peut promouvoir l'arrêt irréversible (senescence) du cycle cellulaire ou la mort cellulaire.

Au cours de mon doctorat, je me suis intéressé au contrôle de l'entrée en mitose en conditions de stress réplcatif dans des cellules *non-transformées* où ces deux réponses *rapides* et *lentes* prennent place. L'impact de la voie ATR/Chk1 sur les inducteurs mitotiques est résumé **figure 19**, tandis que les mécanismes permettant un arrêt p53 et p21 dépendant en G2 sont présentés **figure 21** (p55).

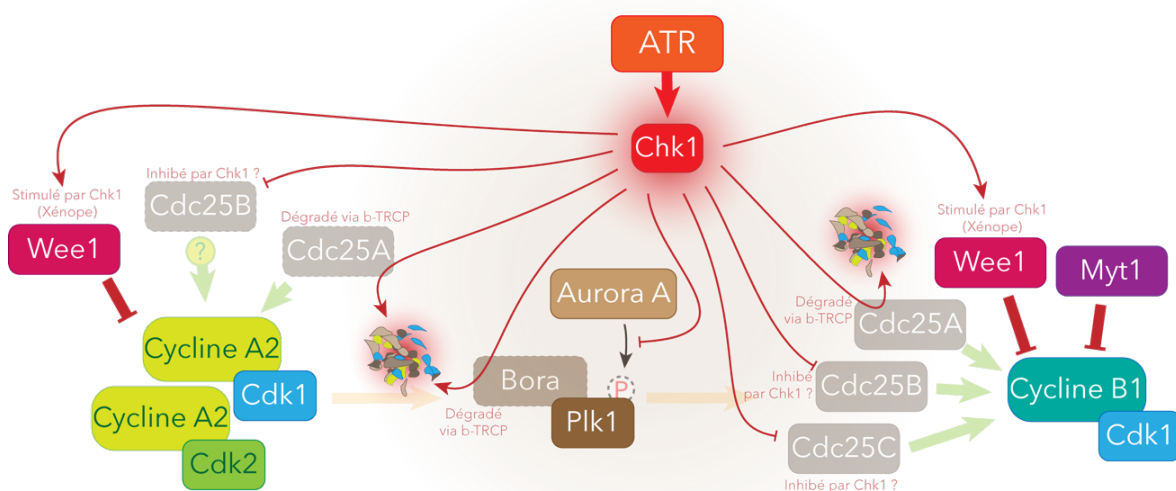


Figure 19 : Inhibition de l'entrée en mitose suite à l'activation de la voie ATR/Chk1. Chk1 induit la dégradation β -TRCP-dépendante de la phosphatase Cdc25A et inhibe également l'activité enzymatique de Cdc25B et Cdc25C, deux autres phosphatases activatrices des Cdk. Chez le Xénope, Chk1 phosphoryle également la kinase Wee1, ce qui stimule son activité et participe à l'inhibition des complexes Cyclines/Cdk. L'activation de la voie ATR/Chk1 déclenche également la dégradation de Bora, un co-activateur d'Aurora-A, et inhibe l'interaction transitoire d'Aurora-A avec Plk1, ce qui empêche l'activation de cette dernière. L'ensemble de ces mécanismes participe à l'induction d'un arrêt ATR/Chk1-dépendant en phase G2 suite à un stress génotoxique.

LES CIBLES CDC25 POUR INHIBER L'ACTIVITE CDK

Les phosphatases Cdc25 (Cdc25A, B et C) régulent l'activité de plusieurs complexes Cyclines/Cdk et sont les cibles de la voie ATR/Chk1. *In vitro*, Cdc25A, B et C sont phosphorylées par Chk1 au niveau de plusieurs résidus dont certains pourraient jouer un rôle dans la régulation de leur activité phosphatase (pour revue, (Karlsson-Rosenthal et Millar 2006)). Cdc25A et Cdc25B interagissent à la fois avec Cycline A2, Cycline B1 et Cycline E, alors que Cdc25C n'interagit qu'avec la Cycline B1 (Uto et al. 2004). En accord, Cdc25C stimule l'activité Cycline B1-Cdk1 (Gheghiani et al. 2017; Gabrielli et al. 1997) alors que Cdc25B stimule les complexes Cycline A2-Cdk2 et Cycline B1-Cdk1 (Gabrielli et al. 1997; Goldstone et al. 2001). La déplétion (partielle par siRNA) de Cdc25A ou Cdc25B, mais pas de Cdc25C, retarde l'entrée des cellules en mitose (Lindqvist et al. 2005; N. Mailand 2002), alors que leur surexpression respective favorise une entrée prématurée (Gheghiani et al. 2017; Karlsson et al. 1999; Varmeh et Manfredi 2009; N. Mailand 2002). Les Cdc25 ont une forte redondance fonctionnelle, mise en évidence par leur inactivation (knock-out) respective chez la souris. L'inactivation de Cdc25A est létale chez l'embryon de souris alors que son absence est compensée par les deux autres Cdc25 dans les tissus adultes (Jinho Lee et al. 2009), tandis que les souris double KO Cdc25B^{-/-} Cdc25C^{-/-} sont viables et que les fibroblastes dérivés (MEFs) ont un cycle cellulaire normal et un checkpoint G2/M fonctionnel en réponse à des radiations ionisantes (Ferguson et al. 2005; M.-S. Chen et al. 2001). De manière notable, l'exposition aux UV induit la dégradation Chk1-dépendante de Cdc25A, mais pas de Cdc25B ou Cdc25C, dont les niveaux d'expression restent inchangés (Niels Mailand et al. 2000). L'importance de la phosphorylation Chk1-dépendante de Cdc25A dans les mécanismes de checkpoint est solidement étayée tandis que la contribution effective de la phosphorylation Chk1-dépendante de Cdc25B et Cdc25C reste partiellement élucidée.

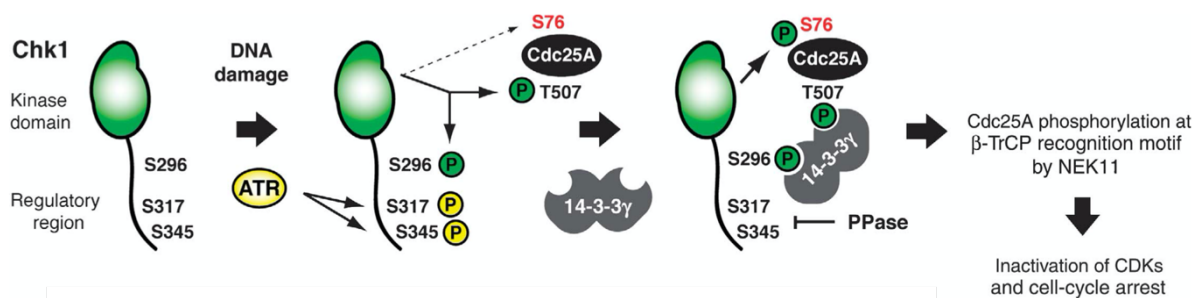


Figure 20 : Modèle d'induction de la dégradation de Cdc25A suite à sa phosphorylation par Chk1. La kinase Chk1 active s'auto-phosphoryle sur le résidu S296 et phosphoryle Cdc25A sur la T507. Une protéine 14-3-3 reconnaît et interagit avec chacun de ces deux résidus phosphorylés. 14-3-3 ayant tendance à former des homodimères, la reconnaissance des résidus Chk1 pS296 et Cdc25A pT507 rapproche spatialement les deux protéines et permet à Chk1 de phosphoryler plusieurs résidus de Cdc25A dont la S76, localisée à proximité d'un site reconnu par le complexe β -TRCP. La phosphorylation de la S76 permet à NEK11 de phosphoryler d'autres résidus nécessaires au recrutement de β -TRCP, ce qui induit à l'ubiquitination et la dégradation de Cdc25A. Adapté de (Kasahara et al. 2010).

Cdc25A

Suite à différents stress génotoxiques induits par des radiations ionisantes, des UV ou des agents pharmacologiques, Cdc25A est rapidement dégradée (Niels Mailand et al. 2000; Falck et al. 2001; N. Mailand 2002; Xiao et al. 2003; Busino et al. 2003; Molinari et al. 2000; Jianping Jin et al. 2008; Kasahara et al. 2010) de manière Chk1-dépendante (Sørensen et al. 2003; Xiao et al. 2003; Jianping Jin et al. 2008). Le modèle actuel est que (i) l'autophosphorylation de Chk1 sur la serine S296 et la phosphorylation par Chk1 du résidu T507 de Cdc25A permet la formation d'un complexe ternaire via le recrutement d'une protéine 14-3-3 (M.-S. Chen, Ryan, et Piwnica-Worms 2003; Kasahara et al. 2010). Cette triple association permet (ii) à Chk1 de phosphoryler d'autres sites de Cdc25A, notamment la S76 (Kasahara et al. 2010), ce qui (iii) facilite la phosphorylation par NEK11 (NIMA (Never In Mitosis gene A)-related Kinase 11) des résidus S79, S82 et S88 de Cdc25A (Melixetian et al. 2009), promouvant l'ubiquitination et à la dégradation β -TRCP-dépendante de Cdc25A (J. Jin 2003; Busino et al. 2003)(Figure 20).

Cdc25C

Cdc25C est *majoritairement cytoplasmique* mais contient à la fois des éléments de séquence favorisant son export et son import nucléaire (Graves et al. 2001). Chk1 phosphoryle le résidu S216 de Cdc25C (Sanchez 1997) et la mutation S216A ou l'inhibition pharmacologique de Chk1 favorise une localisation nucléaire partielle de Cdc25C, suggérant que la phosphorylation de Cdc25C par Chk1 favorise son exclusion du noyau (Graves et al. 2001). D'autre part, l'inhibition de Chk1 supprime l'interaction entre Cdc25C et une protéine 14-3-3 (Graves et al. 2000; Dalal et al. 1999). Ces différentes données ont suggéré que l'interaction Chk1-dépendante de Cdc25C à 14-3-3 participe à sa localisation cytoplasmique. Dans la mesure où Cdc25C sous sa forme phosphorylée par Plk1 active Cycline B1-Cdk1 dans le cytoplasme (Gheghiani et al. 2017), l'importance d'une séquestration de Cdc25C dans le cytoplasme suite à un stress génotoxique est sujet à débat. Il est possible que la phosphorylation de Cdc25C par Chk1 et/ou son interaction avec 14-3-3 empêche sa phosphorylation par Plk1.

Cdc25B

Cdc25B pourrait également être régulée par un mécanisme de surveillance (checkpoint) de l'ADN. En effet, Cdc25B est phosphorylée, au moins *in vitro*, par Chk1 sur différents résidus S230, S549 et S563 (Uto et al. 2004; Schmitt et al. 2006) et interagit avec une protéine 14-3-3 (Giles, Forrest, et Gabrielli 2003). La mutation du site d'interaction à 14-3-3 augmente l'activité phosphatase de Cdc25B sur Cycline B1-Cdk1 (Forrest et Gabrielli 2001).

WEE1

Enfin, chez le Xénope, Chk1 phosphoryle XWee1, l'homologue de Wee1, et un mutant non-phosphorylable de Xwee1 phosphoryle moins efficacement Cdk1 *in vitro* sur un résidu inhibiteur, Tyr15 (Joon Lee, Kumagai, et Dunphy 2001). Il est inconnu si ce mécanisme existe également chez les mammifères.

IMPACT SUR AURORA-A, BORA ET PLK1

La régulation de l'activité des phosphatases Cdc25 n'est pas le seul mécanisme pour inhiber l'entrée des cellules en mitose et l'axe Aurora-A/Bora/Plk1 a également été identifié comme une cible de la réponse aux dommages à l'ADN.

Plusieurs travaux ont mis en évidence que les activités Aurora-A et Plk1 sont inhibées suite à divers traitements génotoxiques, mais peuvent être restaurées par l'ajout de caféine, un inhibiteur non spécifique des kinases ATM et ATR, suggérant qu'Aurora-A et Plk1 pourraient être des cibles du checkpoint G2/M (Smits et al. 2000; van Vugt et al. 2001; Tsvetkov et Stern 2005; Marumoto et al. 2002; Krystyniak et al. 2006).

L'utilisation d'un senseur FRET de Plk1 (site Myt1) suffisamment sensible pour suivre son activité basale en phase G2⁶ (Macůrek et al. 2008) a permis de montrer qu'un stress génotoxique (traitement étoposide) induit l'inhibition de l'activité Plk1 (W Bruinsma et al. 2017). Cette inhibition de Plk1 par l'étoposide dépend de l'activité Chk1. De manière notable, l'expression ectopique d'une forme constitutivement active d'Aurora-A ne suffit pas à empêcher l'inhibition de Plk1 dans ces conditions. En revanche, l'expression d'une protéine de fusion *Aurora-A-Bora* suffit à empêcher l'inhibition de l'activité Plk1 après traitement à l'étoposide, contrairement à l'expression d'une fusion *Aurora-A-Plk1*, **suggérant que Bora ou l'interaction Aurora-A/Bora sont des cibles préférentielles du checkpoint G2/M pour inhiber l'activation de Plk1.**

Plus récemment, il a été observé après traitement UV ou camptothécine que Bora est dégradée en ~1-2h, de manière β -TRCP dépendante (Qin et al. 2013). D'un point de vue mécanistique, Bora est phosphorylée sur la T501 après traitement UV, un résidu dont la mutation empêche l'ubiquitination de Bora, son interaction avec le complexe β -TRCP et sa dégradation par le protéasome. Ce résidu T501 est normalement phosphorylé en mitose par Plk1 (Akiko Seki et al. 2008), mais suite à un traitement UV, la phosphorylation de ce résidu est insensible à l'inhibition de Plk1 mais est sensible à la caféine ou à la déplétion d'ATR (Qin et al. 2013). Son importance est confortée par l'observation que l'expression d'un mutant non-phosphorylable T501A restaure en partie la cinétique d'entrée des cellules en mitose en conditions de stress (Qin et al. 2013). En résumé, ces résultats **suggèrent que la dégradation de Bora est un mécanisme important pour inhiber l'activation de l'axe Aurora-A-Bora-Plk1 suite à l'activation du checkpoint G2/M.**

⁶ Voir p23 pour le détail des différents senseurs d'activité Plk1 existant dans la littérature.

INDUCTION DE P53 ET P21 ET ARRÊT IRREVERSIBLE DU CYCLE EN G2

Après induction de dommages à l'ADN par un agent radiomimétique (bléomycine), la déplétion ou l'inhibition de Chk1 facilite l'entrée des cellules en mitose. Cependant, dans un contexte p53⁺ et p21⁺ une fraction importante de la population cellulaire reste arrêtée de manière persistante en phase G2 (Lossaint et al. 2011). La co-déplétion Chk1&Chk2 n'empêche pas l'arrêt persistant des cellules en G2, alors que la déplétion de p21 le supprime totalement (Lossaint et al. 2011; Krenning et al. 2014), bien que la cinétique d'entrée en mitose reste ralentie de façon Chk1-dépendante (Lossaint et al. 2011). D'autre part, l'arrêt persistant en phase G2 observé après exposition à des radiations ionisantes peut être en partie levé par l'addition de caféine, mais uniquement si celle-ci est ajoutée rapidement (Krenning et al. 2014). En revanche, après déplétion de p53, un traitement à la caféine restaure totalement la cinétique d'entrée en mitose même plusieurs heures après irradiation (Krenning et al. 2014). Ces différents travaux indiquent que dans un contexte p53⁺/p21⁺, **Chk1 peut dans un premier temps ralentir l'entrée des cellules en mitose mais qu'ensuite, un arrêt durable en phase G2 ne dépend plus de Chk1 mais de p53 et p21.**

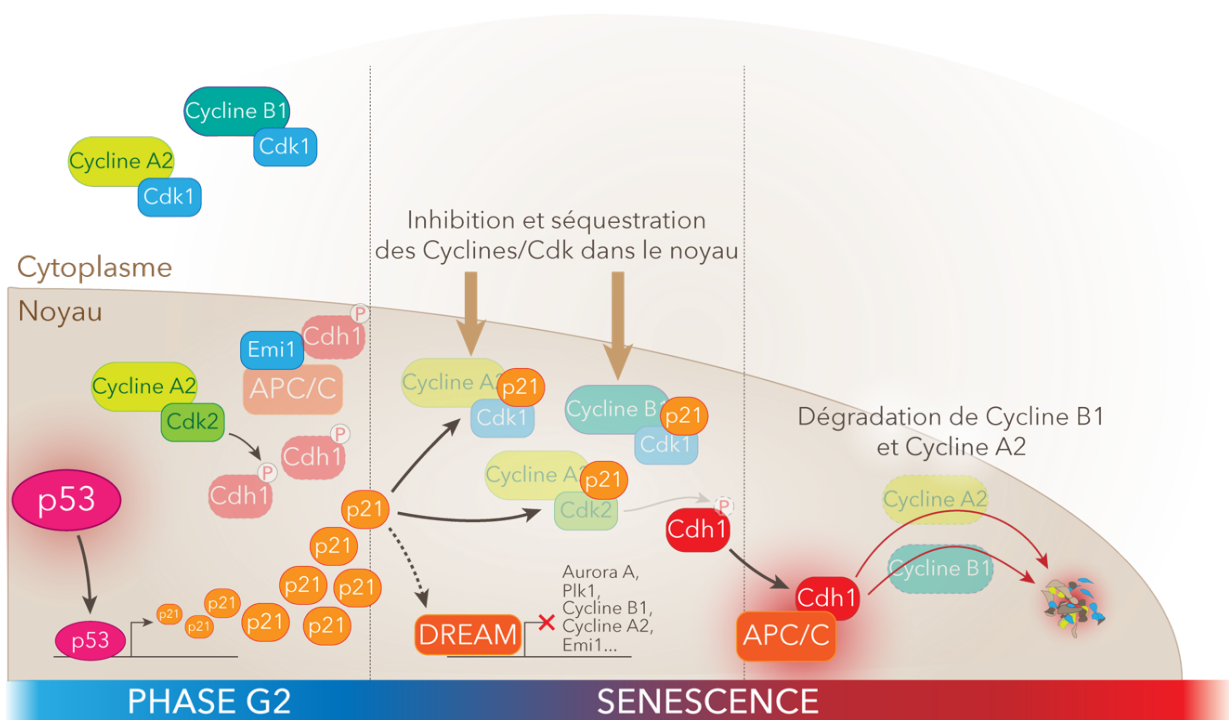


Figure 21 : Induction de la sénescence en phase G2 via l'activation de p53 et p21. P53 induit la transcription de p21, dont l'accumulation inhibe et séquestre les complexes Cyclines/Cdk dans le noyau. En parallèle, p21 promeut l'interaction entre le complexe DREAM et les promoteurs de gènes codant pour différents inducteurs mitotiques, Aurora-A, Plk1, Cycline B1 et Cycline A2, ce qui induit leur répression transcriptionnelle. DREAM induit également la répression transcriptionnelle d'Emi1, un inhibiteur de l'ubiquitine ligase APC/C^{Cdh1}, et la co-inhibition des Cdk par p21 permet la formation d'un complexe APC/C^{Cdh1} actif. APC/C^{Cdh1} induit la dégradation de Cycline A2 et Cycline B1, inhibant de manière permanente l'entrée des cellules en mitose.

La protéine p21 est un inhibiteur des complexes Cyclines/Cdk (Harper et al. 1995) dont la transcription est stimulée par p53 (El-Deiry et al. 1994; 1993). De manière notable, p21 est dégradée en phase S par l'action conjointe des complexes SCF^{skp2} et CRL4^{cdt2} ce qui restreint sa fenêtre d'expression aux phases G1 et G2 (Barr et al. 2017). En accord, un arrêt irréversible de la progression du cycle cellulaire suite à différentes stress génotoxiques peut être induit en phases G1 et G2 mais pas en S (Chao et al. 2017; Johmura et al. 2014; Krenning et al. 2014). Par l'utilisation du système FUCCI⁷ (Sakaue-Sawano 2008), il a été mis en évidence que les cellules arrêtées en G2 finissent par réactiver le complexe APC/C^{Cdh1}, et entrent dans un état « G1-like », où elle peuvent expérimentalement être forcées à entrer en phase S via l'expression de l'antigène grand T, avant la mise en place de l'état sénescence (Johmura et al. 2014; Krenning et al. 2014).

L'entrée en sénescence en phase G2 est précédée par la suppression des inducteurs mitotiques, notamment Cycline A2 et Cycline B1 (Krenning et al. 2014; Johmura et al. 2014). L'utilisation d'une lignée Cycline B1 étiquetée (Knock-In fluorescent) a mis en évidence que des radiations ionisantes (IR) en G2 induisent l'import nucléaire de Cycline B1 (2 à 3h après IR) suivi de sa dégradation (4 à 8h après) (Krenning et al. 2014; Müllers et al. 2014). La déplétion de p53 ou p21 empêche l'import et la dégradation de Cycline B1 (Krenning et al. 2014; Müllers et al. 2014) alors que la déplétion de Cdh1 empêche uniquement sa dégradation (Krenning et al. 2014). p21 est une protéine nucléaire (Barr et al. 2017; Krenning et al. 2014) qui interagit fortement avec Cycline B1 (Krenning et al. 2014; Müllers et al. 2014), **suggérant que suite à l'induction de p21, l'interaction entre p21 et Cycline B1 séquestre cette dernière au noyau où elle est dégradée par APC/C^{Cdh1}**. Cycline A2 est également importée et dégradée dans le noyau suite à un traitement génotoxique en G2 (Cascales et al. 2017, Jinho Lee et al. 2009). La réactivation d'APC/C^{Cdh1} en phase G2 est p53 et p21-dépendante et passe par la suppression p21-dépendante d'Emi1⁸ (Jinho Lee et al. 2009; Wiebusch et Hagemeier 2010), peut-être via l'interaction directe entre le promoteur d'Emi1 et le complexe de répression transcriptionnelle DREAM, qui est activé en aval de p21 (Löhr et al. 2003; Fischer et al. 2016; Engeland 2018). Par ailleurs, l'inhibition des activités Cdk contribue à l'activation d'APC/C^{Cdh1} en empêchant les phosphorylations inhibitrices de Cdh1 par les Cdk (Sørensen et al. 2001).

Ces mécanismes d'inhibition (p21) et de dégradation des Cyclines (APC/C^{Cdh1}) sont complétés de manière plus large par la répression transcriptionnelle des inducteurs mitotiques. Ainsi, le complexe DREAM, composé notamment de p107 et p130 (deux protéines apparentées à Rb) associées à MuvB, interagit avec les promoteurs des gènes codant pour Aurora-A, Bora, Cycline A, Cycline B, les Cdc25, Cdk1, Cdk2 ou encore FoxM1 (Litovchick et al. 2007; Fischer et al. 2016, 53; Engeland 2018).

En conclusion, l'ensemble de ces données suggère un modèle où l'activation de p53 induit l'accumulation de p21 en phase G2, qui va inhiber et séquestrer les complexes Cycline/Cdk au noyau. En parallèle, l'activation de l'axe p53/p21 permet la réactivation d'APC/C^{Cdh1} et la dégradation des Cyclines. De plus, p53 et p21 vont promouvoir la répression transcriptionnelle de

⁷ Basé sur des domaines des protéines Cdt1 et géminine fusionnés à des variants fluorescents permettant de distinguer les cellules en G1 (Cdt1⁺) des cellules en S, G2 et M (Geminin⁺).

⁸ Emi1 est un inhibiteur du complexe APC/C^{Cdh1} (voir p9).

différents inducteurs mitotiques à travers le complexe de répression transcriptionnelle DREAM qui se lie à leurs promoteurs. (Figure 21)

ACTIVATION DE L'AXE P53-P21 EN CONDITION DE *STRESS REPLICATIF*

L'entrée en sénescence de cellules en phase G2 a été essentiellement étudiée suite à des radiations ionisantes, mais peut également avoir lieu suite à un stress répliatif. Ainsi, un stress répliatif induit par l'oncogène H-Ras^{V12} entraîne l'import et la dégradation de Cycline B1 en G2 (Krenning et al. 2014), ainsi que l'induction de la β -galactosidase, un marqueur de la sénescence (Johmura et al. 2014). D'autre part, l'inactivation de p53 permet la prolifération de cellules MEFs en présence d'aphidicoline ou d'HU (Taylor et al. 1999). L'ajout d'aphidicoline en phase S induit l'accumulation de p21 (visualisable par un Knock-In fluorescent) à la phase G2 suivante ainsi qu'un arrêt du cycle p21-dépendant, au moins pour une fraction de la population cellulaire (Barr et al. 2017). *In vitro*, Chk1 peut phosphoryler les résidus S15 et S20 de p53 (Shieh et al. 2000; Craig et al. 2007), tandis qu'ATR peut phosphoryler les résidus S15 et S37 (Tibbetts et al. 1999), ce qui pourrait contribuer à sa stabilisation, bien que la régulation de p53 soit complexe et que chez la souris la mutation de ces résidus n'ait qu'un effet partiel et tissu-dépendant (F. Toledo et Wahl 2006; Kruse et Gu 2009).

REPRESSION DU CHECKPOINT ET DE LA REPARATION PAR P53 ET P21

Il a été mis en évidence par ChIP que le complexe DREAM est également associé au promoteur de Chk1 (Engeland 2018) et que suite à un traitement par un intercalant de l'ADN, les cellules s'arrêtent en phase G2 tandis que l'expression de Chk1 est inhibée de façon p53, p21 et Rb-dépendante (Gottifredi et al. 2001). En accord, l'expression inductible de p21 ou p53 suffit à induire l'inhibition de Chk1 (Gottifredi et al. 2001).

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec l'observation qu'une forme mutante stable de p53 ou un traitement à la nutlin-3a activant p53, inhibent, via p21, l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, notamment les protéines de la famille FANC (Jaber et al. 2016, 53; Toufektchan et Toledo 2018). En accord, le complexe DREAM s'associe au promoteur de gènes impliqués dans le checkpoint G2/M ou la réparation de l'ADN (Engeland 2018). **Ces résultats pourraient suggérer qu'il existe, suite à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2, une fenêtre de temps pendant laquelle la réparation de l'ADN et la reprise du cycle est possible, mais au-delà de laquelle l'accumulation de p21 induit la sénescence et met fin au processus de réparation de l'ADN et à l'activation du checkpoint Chk1-dépendant.**

PERSISTANCE EN MITOSE DE STRUCTURES LIEES A UNE REPLICATION INCOMPLETE

Une importante littérature indique qu'en présence d'un stress répliatif *modéré*, certaines régions du génome peuvent demeurer non-répliquées jusqu'à l'entrée des cellules en mitose où elles peuvent, au moins en partie, être prises en charge par des mécanismes spécialisés, limitant l'apparition d'anomalies génétique au sein de la descendance. Une classe particulière de ces régions difficiles à répliquer correspond aux sites fragiles communs (CFS). D'excellentes revues récentes sur les CFS, leurs origines et leur résolution étant disponibles (Técher et al. 2017; Debatisse et Rosselli 2019; Özer et Hickson 2018; Fragkos et Naim 2017), ne seront abordés ici que les points les plus essentiels.

STRESS REPLICATIF ET EXPRESSION DES SITES FRAGILES COMMUNS

Les CFS ont été initialement identifiés par marquage de l'ADN et étalement chromosomique comme des régions du génome promptes à former **des gaps** (interruption du marquage de l'ADN) **et des cassures chromosomiques, dénommées *expression des CFS***, un phénomène accentué par la présence d'un stress répliatif (Glover et al. 1984) (**Figure 22**). Une proportion importante de réarrangements chromosomiques observés dans des cellules tumorales est localisée au niveau de sites fragiles (Burrow et al. 2009; Le Tallec et al. 2013), suggérant que les CFS sont une source majeure d'instabilité génétique au cours de la tumorigénèse.

La cartographie des CFS dans différentes lignées cellulaires montre que la fragilité de ces loci ne peut pas simplement être prédite à partir d'éléments en cis et varie d'un type cellulaire à l'autre (Le Tallec et al. 2013; Hosseini et al. 2013; Letessier et al. 2011; Le Tallec et al. 2011). Néanmoins, les CFS arborent certaines propriétés communes dont le rôle dans la fragilité de ces régions a été abondamment étudié (pour revues (Debatisse et Rosselli 2019; Glover, Wilson, et Arlt 2017)).

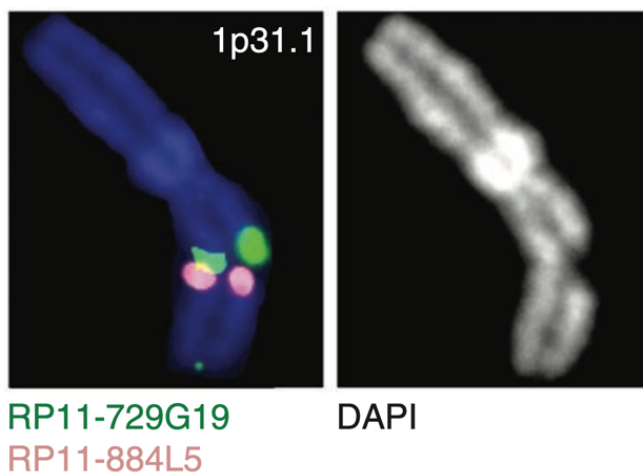


Figure 22 : Un stress répliatif à l'aphidicoline induit au niveau de CFS, identifiable par hybridation *in situ*, des cassures chromosomiques visualisables par étalement métaphasique. (adapté de (Le Tallec et al. 2011)).

La protéine FANCD2 (Fanconi anemia group D2 protein) peut se localiser au niveau des CFS en interphase et en mitose (K. L. Chan et al. 2009; Naim et Rosselli 2009). En accord, les loci avec lesquels FANCD2 interagit le plus par ChIP en interphase après traitement aphidicoline sont significativement plus sujet à des cassures en mitose (Pentzold et al. 2018; Okamoto et al. 2018). L'identification de CFS potentiels par ChIP de FANCD2 puis séquençage ou leur cartographie par des approches cytogénétiques en présence d'aphidicoline, indique qu'une majorité de CFS sont localisés au niveau de longs gènes (>300 kb) (Okamoto et al. 2018; Pentzold et al. 2018; Le Tallec et al. 2013). Dans différents organismes et/ou tissus, il existe une corrélation entre la transcription de grands gènes et leur interaction avec FANCD2 (Pentzold et al. 2018; Okamoto et al. 2018) et la proportion de cellules arborant des cassures au niveau de divers CFS est modifiée par l'expression ectopique de la RNase H1 (Helmrich, Ballarino, et Tora 2011), suggérant un **rôle des R-Loops et des conflits avec la machinerie de transcription dans l'expression de la fragilité des CFS**. Néanmoins, plusieurs grands gènes ne sont pas des sites fragiles (Pentzold et al. 2018; Le Tallec et al. 2013), suggérant que la transcription de ceux-ci n'est pas *suffisante* pour induire leur fragilité.

Des expériences pionnières de suivi du timing de répliation de certains loci au cours du cycle cellulaire via l'utilisation de sondes FISH (Le Beau 1998; Hellman et al. 2000), depuis renforcées par le développement d'approches sur le génome entier (Hansen et al. 2010), ont permis de déterminer que **les gènes de grande taille, notamment les CFS, sont en grande majorité répliqués tardivement au cours de la phase S** (Le Tallec et al. 2013; Letessier et al. 2011) **et que le timing de répliation des CFS est d'autant plus retardé par la présence d'aphidicoline** (Letessier et al. 2011; Brison et al. 2019).

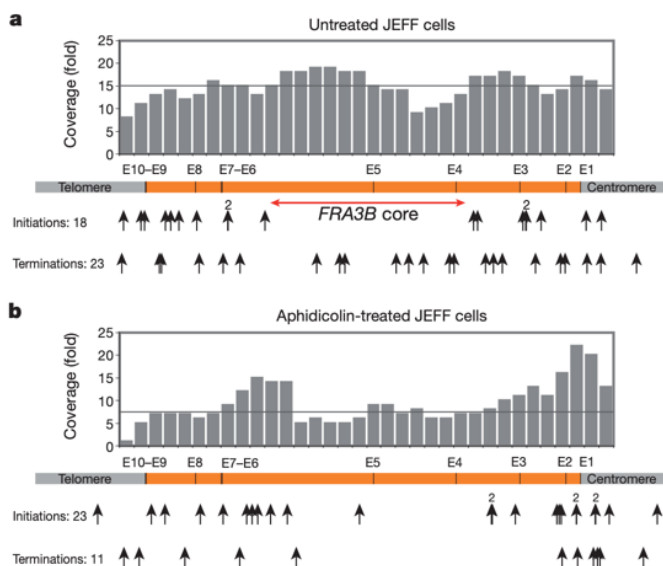


Figure 23 : Les sites fragiles communs sont des régions pauvres en origines de répliation et suite à un stress répliatif, peu d'origines dormantes peuvent être recrutées (adapté de (Letessier et al. 2011)).

De manière notable, l'analyse de la répliation de différents sites fragiles par peignage moléculaire de l'ADN montre qu'il s'agit de **régions pauvres en origines de répliation** (Letessier et al. 2011; Ozeri-Galai et al. 2011) et que la fragilité d'un CFS donné d'un type cellulaire à un autre corrèle avec la densité d'origines de répliation à ce locus (Letessier et al. 2011). Ainsi, au niveau

des sites fragiles, les fourches de réplication doivent parcourir de plus longues distances pour répliquer ces loci, mais surtout en présence d'un stress réplicatif qui ralentit la progression des fourches de réplication **peu d'origines dormantes adjacentes peuvent être activées pour compenser ce ralentissement (Figure 23).**

PRISE EN CHARGE DES CFS EN FIN DE G2 ET EN MITOSE

Plusieurs travaux suggèrent qu'en conditions de stress réplicatif, la réplication des CFS peut demeurer incomplète jusqu'en mitose. En effet, les phénotypes observés au niveau des CFS en mitose pourraient refléter la persistance d'intermédiaires de réplication ou de réparation ou alternativement la persistance d'ADN non décaténé.

LES CASSURES METAPHASIQUES AUX CFS SONT UN PROCESSUS ACTIF

Un faisceau de données suggère que les cassures chromosomiques observées en métaphase au niveau des CFS sont un processus *actif*, et non un processus *passif* lié aux différentes forces s'exerçant sur les chromosomes. En effet, différentes protéines composant les endonucléases *structure-sélectives* Mus81-EME1 et ERCC1-XPF ont été observées co-localisées en mitose avec plusieurs CFS, où elles sont généralement situées entre deux foyers FANCD2 adjacents (Naim et al. 2013; Ying et al. 2013; Minocherhomji et al. 2015). La déplétion de celles-ci (siRNA Mus81, EME1 ou ERCC1) en présence d'un stress réplicatif réduit fortement la proportion de cellules arborant des cassures métaphasiques aux CFS, mais augmente la proportion d'*ultra fine bridges* (UFB) et de ponts chromatinien en anaphase, ainsi que de micronoyaux et de « corps nucléaires » (foci ou « nuclear bodies ») 53BP1 positifs à la phase G1 suivante (Naim et al. 2013; Ying et al. 2013; Pepe et West 2014; Minocherhomji et al. 2015). Les micronoyaux et les corps nucléaires 53BP1 positifs sont reconnus par des sondes FISH dirigées contre plusieurs CFS (Naim et al. 2013; Ying et al. 2013). **Ces résultats suggèrent que les cassures chromosomiques observées au niveau des CFS en métaphase sont dues à un processus actif médié par des endonucléases, ce qui permettrait d'éviter une ségrégation anormale des chromosomes en sortie de mitose, reflétée notamment par l'apparition de micronoyaux.**

REGULATION DES ENDONUCLEASES EN FIN DE G2 OU EN DEBUT DE MITOSE

En mitose, FANCD2, Mus81 et ERCC1 co-localisent avec SLX4 (Guervilly et al. 2015), une protéine jouant un rôle de "plateforme" de recrutement. En effet, sa déplétion empêche le recrutement de Mus81 et ERCC1 aux CFS en prométaphase et augmente la proportion de ségrégations aberrantes après traitement aphidicoline (Guervilly et al. 2015; Duda et al. 2016; Minocherhomji et al. 2015).

Les structures d'ADN clivées par Mus81-EME1 ou par XPF-ERCC1 au niveau des CFS en mitose (ou en phase G2 tardive) restent mal connues. Il pourrait s'agir de structures intermédiaires de réparation/recombinaison comme une jonction de Holliday (HJ), ou encore de fourches de réplication bloquées et/ou réversées (Figure 24). Dans tous les cas, l'interaction avec SLX4 semble

nécessaire : soit pour permettre la formation d'un complexe entre les endonucléases Mus81-EME1 et SLX4-SLX1 qui est capable de cliver les HJ (Wyatt et al. 2013), soit pour l'adressage de Mus81 aux fourches de réplication (Duda et al. 2016).

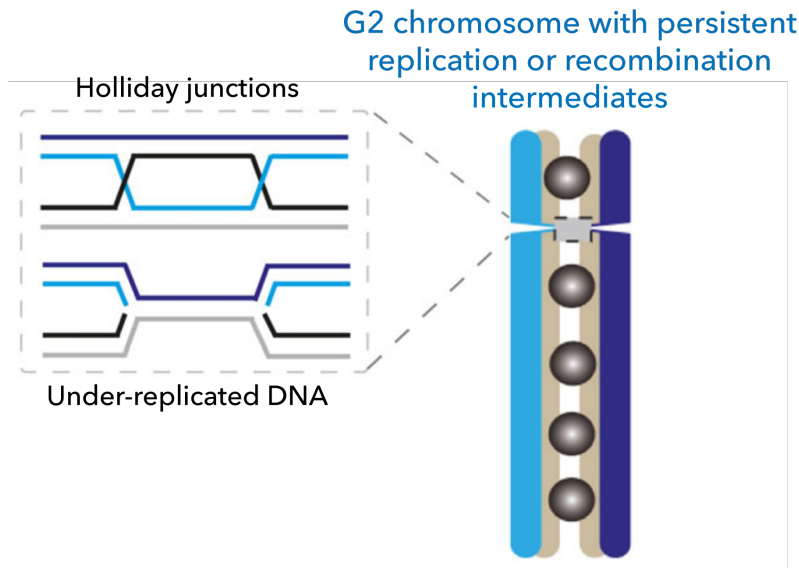


Figure 24 : Structures de l'ADN qui pourraient persister jusqu'en mitose où elles seraient notamment clivées par des endonucléases (Adapté de (Pfander et Matos 2017)).

Mus81 et les complexes multiprotéiques auxquels elle participe sont régulés par phosphorylation. SLX4 possède 42 sites "consensus minimal" (S/TP) pour Cdk1, et la mutation non-phosphorylable de six d'entre eux suffit à empêcher l'interaction entre SLX4 et Mus81, mais pas entre SLX4 et SLX1 (Duda et al. 2016). D'autre part, l'inhibition de Plk1 supprime la capacité de Mus81 immunoprécipitée en mitose à cliver des jonctions de Holliday *in vitro* (Wyatt et al. 2013). A l'opposé, la stimulation en phase S des activités Cdk, en inhibant Wee1, induit une interaction prématurée entre Mus81 et SLX4 qui semble induire un clivage des fourches de réplication et résulte en une pulvérisation des chromosomes (Duda et al. 2016).

SYNTHÈSE D'ADN EN MITOSE (MITOTIC DNA SYNTHESIS OR MIDAS)

Après un court pulse d'EdU (30 minutes), des foyers d'incorporation peuvent être observés dans les cellules mitotiques, notamment après traitement par de faibles doses d'aphidicoline (Bergoglio et al. 2013; Minocherhomji et al. 2015; Naim et al. 2013). Plus précisément, sur des cellules synchronisées en phase G2 par l'ajout d'un inhibiteur de Cdk1, puis relâchées, l'incorporation d'EdU est observée uniquement dans les cellules entrant en mitose. Il est cependant à noter que l'inhibition de Cdk1 pourrait induire un biais expérimental⁹. A contrario, l'ajout d'EdU sur des cellules arrêtées en prométaphase (nocodazole) n'entraîne pas d'incorporation (Minocherhomji et al. 2015).

⁹ En plus d'être impliquée dans la régulation des endonucléases clivant les CFS (voir ci-dessus), Cdk1 est également impliquée dans les processus de résection de l'ADN (Tomimatsu et al. 2014; Huertas et Jackson 2009) ainsi que dans certains aspects de la réplication (voir p12).

Cette synthèse d'ADN en début de mitose ou MiDAS (Mitotic DNA Synthesis), notamment au niveau des CFS, dépend (i) de Mus81, EME1 et SLX4 (Minocherhomji et al. 2015) suggérant qu'elle est induite par l'action d'endonucléases, (ii) et de Rad52 et PolD3 (Bhowmick, Minocherhomji, et Hickson 2016) suggérant qu'elle relève d'un mécanisme particulier appelé *Break-Induced Repair* (BIR) (Figure 25). D'autre part, le processus de MiDAS nécessite TRAIP (Sonneville et al. 2019), une ubiquitine ligase permettant le désassemblage du réplisome en mitose (Priego Moreno et al. 2019; Sonneville et al. 2019; Deng et al. 2019) et une perturbation de la condensation de l'ADN ou de la cohésion des chromatides sœurs via la déplétion des protéines Smc2 ou WAPL empêche le recrutement de Mus81 et l'incorporation d'EdU (Minocherhomji et al. 2015), suggérant que la machinerie de synthèse de l'ADN en mitose est fortement dépendante de la structure et de la compaction de la chromatine.

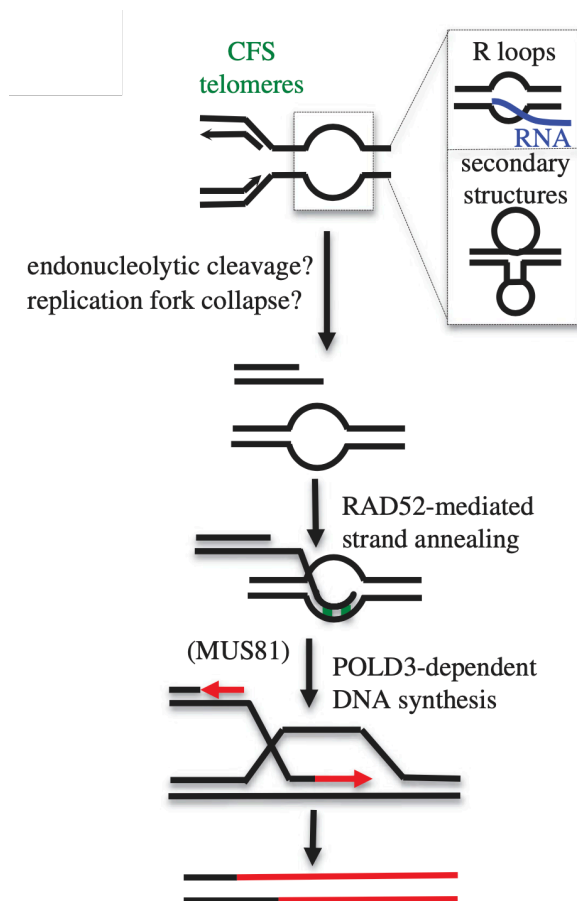


Figure 25 : Modèle spéculatif des mécanismes moléculaires à l'origine du MiDAS. L'induction d'une cassure double brin de l'ADN au niveau d'une fourche de réplication précédemment bloquée par une endonucléase pourrait permettre une invasion de brin médiée par la protéine Rad52 et la synthèse d'un nouveau brin d'ADN par PolD3 (en rouge). A noter que la synthèse d'ADN double brin (en rouge) dans ces conditions est conservative.

CONSEQUENCES D'UN STRESS REPLICATIF EN MITOSE ET AU-DELA

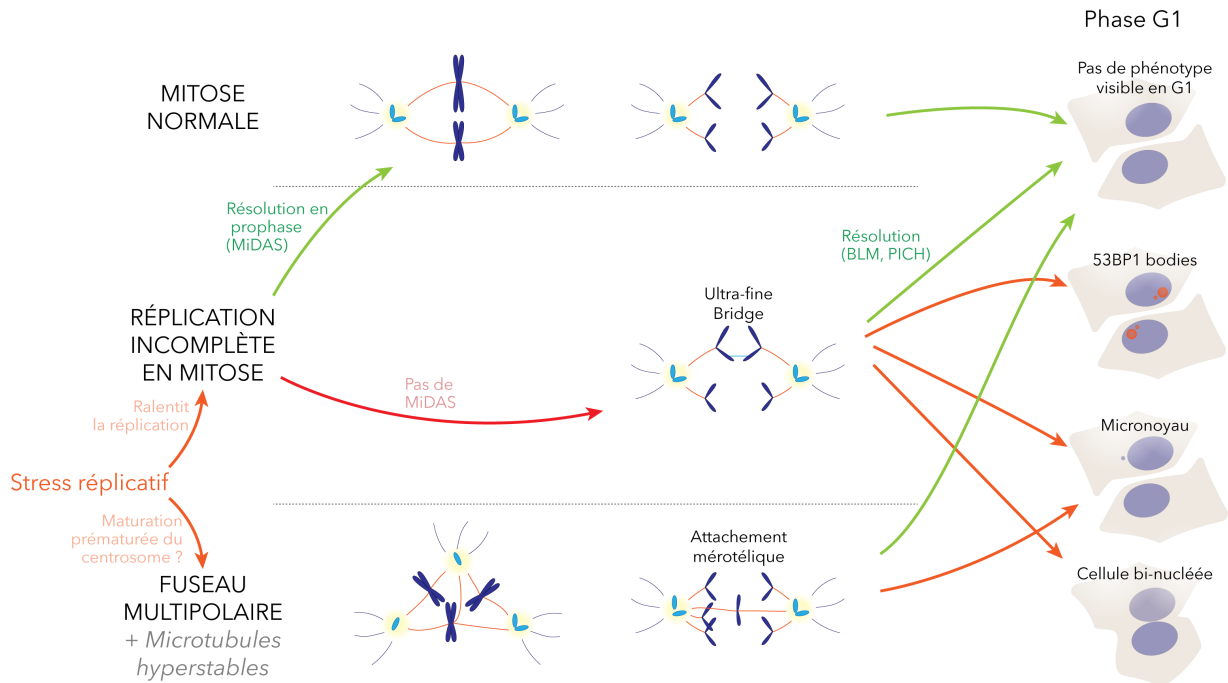


Figure 26 : Impact d'un stress réplcatif sur la ségrégation des chromosomes en mitose et conséquences phénotypiques observées à la phase G1 suivante. En conditions de stress réplcatif, certaines régions du génome peuvent demeurer incomplètement réplquées/réparées au moment de l'entrée des cellules en mitose. Une partie au moins de ces régions seront pris en charge par le MiDAS, permettant la ségrégation correcte des chromosomes, mais d'autres pourraient persister et évoluer en ponts anaphasiques particuliers appelés *Ultra-fine Bridges* (UFB). Les UFB peuvent être résolus en mitose par des mécanismes spécifiques ou résulter à la phase G1 suivante en des corps nucléaires 53BP1. La non-résolution d'UFB peut également conduire à des défauts de cytokinèse (Nielsen et al. 2015) et a également été associée à la présence de micronoyaux. Un stress réplcatif peut également conduire à un désengagement prématuré des centrioles, peut-être lié à l'allongement de l'interphase, induisant la formation d'un fuseau multipolaire, ce qui favorise la formation d'attachements mérotéliques et la présence de chromosomes dont la ségrégation est retardée.

PONT ANAPHASQUES ET UFB EN MITOSE

Des liens ou ponts d'ADN peuvent persister entre deux chromatides sœurs, notamment suite à un stress réplcatif, affectant leur ségrégation correcte en anaphase. Ces structures dites « ponts anaphasiques » peuvent être visibles (pont de chromatine) ou non (Ultra Fine Bridges ou UFB) avec des intercalants fluorescents de l'ADN, en fonction de la structure de la double hélice d'ADN et de la présence d'histones (K. L. Chan et Hickson 2011). Les UFB peuvent être détectés via leur interaction avec l'hélicase BLM et la translocase PICH (K.-L. Chan, North, et Hickson 2007; Baumann et al. 2007) qui jouent un rôle dans leur résolution (Fernández-Casañas et Chan 2018). Différents types d'UFB ont été observés reliant les télomères de deux chromatides sœurs (T-UFB),

les régions centromériques (C-UFB) et enfin des UFB reliant deux foyers FANCD2 au niveau des CFS (CFS-UFB) (Y. Liu et al. 2014).

Les UFB centromériques sont les plus fréquents même en absence de stress (K.-L. Chan, North, et Hickson 2007; Baumann et al. 2007; K. L. Chan et al. 2009) et peuvent être induits par des inhibiteurs des topoisomérases II (K.-L. Chan, North, et Hickson 2007; Baumann et al. 2007; K. L. Chan et al. 2009) mais pas par des inhibiteurs de la réplication comme l'aphidicoline (K. L. Chan et al. 2009), suggérant qu'ils surviennent majoritairement suite à des problèmes de décaténation de l'ADN des deux chromatides sœurs. En revanche, les UFB reliant deux foyers FANCD2 sont rares en conditions normales mais peuvent être induits par l'aphidicoline ou la mitomycine C, mais pas par des inhibiteurs de topoisomérases (K. L. Chan et al. 2009). Ces **UFB associés à FANCD2 co-localisent avec les CFS** (K. L. Chan et al. 2009) **et sont enrichis lorsque Mus81 est déplétée** (Ying et al. 2013), **suggérant qu'ils sont une conséquence de la non-résolution d'intermédiaires de réplication/réparation au niveau des CFS en prophase par MiDAS**. Enfin, le troisième type d'UFB identifié relie les régions télomériques et a été essentiellement observé dans des lignées déficientes dans le maintien et la réplication des télomères (Barefield et Karlseder 2012; Stagno d'Alcontres et al. 2014; Nera et al. 2015; Zaaier et al. 2016).

LES CFS NON-RESOLUS INDUISENT DES CORPS NUCLEAIRES 53BP1 EN G1

La protéine 53BP1 forme des foyers (foci) co-localisant avec des acteurs de la signalisation des cassures double brin (Fernandez-Vidal, Vignard, et Mirey 2017), mais peut également former des structures plus volumineuses appelées corps nucléaires 53BP1 (53BP1-NB). Les 53BP1-NB sont préférentiellement observés en phase G1 suite à un stress réplicatif (Lukas et al. 2011; Arora et al. 2017; Lezaja et Altmeyer 2018) et sont résolus durant la phase S suivante (Lukas et al. 2011; Harrigan et al. 2011, 1; Arora et al. 2017; Spies et al. 2019). Les données actuelles suggèrent que **les 53BP1-NB pourraient dériver, au moins en partie, de la non-résolution en mitose de régions incomplètement répliquées/réparées**. En effet, la déplétion de Mus81, ERCC1 ou EME1 augmente le nombre de corps nucléaires 53BP1 en G1 (Ying et al. 2013; Naim et al. 2013) qui co-localisent avec des régions CFS identifiées par FISH (Naim et al. 2013). Bien que les mécanismes précis permettant la formation de 53BP1-NB en G1 ne sont pas totalement compris, il est généralement supposé que ceux-ci dérivent au moins en partie de la non-résolution d'UFB. En ce sens, la déplétion de BLM qui participe à la résolution des UFB augmente le nombre de corps nucléaires 53BP1 en G1 (Lukas et al. 2011). De manière notable, suite à un stress réplicatif, les corps nucléaires arborent fréquemment un pattern symétrique entre les deux cellules filles en G1 (Lukas et al. 2011), ce qui pourrait refléter une origine structurelle commune entre deux chromatides sœurs. Les UFB reliant deux chromatides sœurs, il est possible que leur non-résolution participe à la distribution symétrique des corps nucléaires en G1.

STRESS REPLICATIF, CENTRIOLES, MICRONOYAUX ET ANEUPLOIDIE NUMERIQUE

Comme précédemment évoqué, une situation de stress réplicatif peut induire des cassures chromosomiques en mitose et la présence de fragments acentriques en anaphase pouvant former des micronoyaux. Néanmoins, il a été observé qu'un stress réplicatif pouvait également induire la présence de chromosomes en retard (ou *lagging chromosomes*) en anaphase (Wilhelm et al. 2019; Burrell et al. 2013), ce qui est surprenant dans la mesure où les *lagging chromosomes* sont

généralement considérés comme résultant d'un attachement mérotélique (un kinétochore est ancré à des microtubules émanant des deux pôles du fuseau) au fuseau mitotique (Cimini et al. 2001; Bakhoun et al. 2014; Bizard et Hickson 2018).

Au niveau mécanistique, un article récent montre qu'un traitement à l'aphidicoline peut induire la formation de manière transitoire d'un fuseau multipolaire via le désengagement prématuré des deux centrioles aux pôles du fuseau, ce qui augmente significativement la probabilité d'attachement mérotélique et de *lagging* chromosomes (Wilhelm et al. 2019) (**Figure 27**). L'inhibition partielle et/ou transitoire de Cdk1 ou Plk1 (Plk1 est nécessaire au désengagement des centrioles en mitose (Shukla et al. 2015)) compense partiellement ces phénotypes et réduit la proportion de micronoyaux CENP-A positifs (dû à un chromosome entier avec un centromère) sans affecter la proportion de micronoyaux CENP-A négatifs (dû à un fragment chromosomique acentrique). **Un stress réplicatif —peut-être en allongeant la durée de l'interphase— pourrait donc favoriser un désengagement prématuré des centrioles père et fils favorisant des erreurs de ségrégation de chromosomes entiers en mitose.**

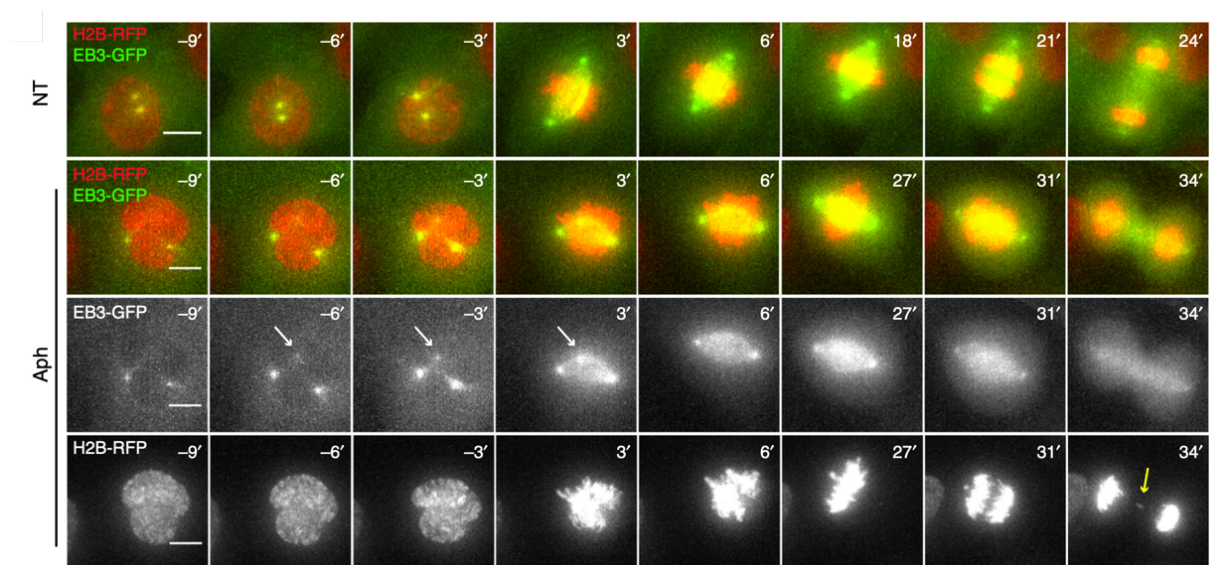


Figure 27 : Un stress réplicatif peut induire de manière transitoire l'apparition d'un fuseau multipolaire pouvant favoriser une mauvaise ségrégation de chromosomes. (Adapté de (Wilhelm et al. 2019)).

SIGNALISATION EN G1 : P53, P21 ET RE-ENTREE EN PHASE S

Suite à un stress réplicatif induit, une fraction des cellules s'arrête en phase G0/G1 suivante de manière p53 et p21 dépendante et n'active pas Cdk2, nécessaire à l'entrée en phase S (Barr et al. 2017, 201; Arora et al. 2017). Bien que la nature exacte de l'élément de signalisation permettant l'activation de l'axe p53-p21 et un arrêt dès la phase G1 suivante ne soit pas complètement élucidée, plusieurs hypothèses non-exclusives sont envisageables :

ANEUPLOÏDIE ET SENESCENCE EN G1

La présence de chromosomes surnuméraires dans un contexte p53 *déficient* favorise une instabilité chromosomique au cours des cycles cellulaires suivants (Passerini et al. 2016; Nicholson et al. 2015). A l'opposé, une ségrégation anormale des chromosomes en contexte p53 *proficient* conduit majoritairement à un arrêt des cellules aneuploïdes en phase G1 (Thompson et Compton 2010). En se focalisant sur les cellules ayant acquis un micronoyau après induction expérimentale d'une ségrégation chromosomique anormale (inhibiteurs du SAC (Spindle Assembly Checkpoint) et de la kinésine Cenp-E), il a été observé qu'environ 60% des cellules s'arrêtent en G1 (Soto et al. 2017). Le séquençage du génome de ces cellules montre que la population cellulaire arrêtée en G1 présente une aneuploïdie structurale alors que la population cellulaire présentant une aneuploïdie numérique continue à proliférer (Soto et al. 2017), suggérant que le gain d'un chromosome entier n'induit pas *nécessairement* un arrêt en phase G1. Dans le contexte d'un stress réplicatif, il est possible que la formation de fragments acentriques — par exemple après cassure au niveau des CFS— induise l'expression de p53 à la phase G1 suivante et l'entrée en sénescence.

53BP1 ET SENESCENCE EN G1

Le lien entre stress réplicatif et arrêt de la prolifération à la phase G1 suivante pourrait impliquer la présence de corps nucléaires 53BP1. En conditions de croissance *non*-perturbée, les cellules s'arrêtant spontanément en phase G1 ont tendance *en moyenne* à avoir légèrement plus de foyers 53BP1 (Arora et al. 2017), et plusieurs travaux montrent une certaine corrélation entre le niveau d'expression de p21 et le nombre de corps nucléaires 53BP1 en phase G1 au cours d'une croissance cellulaire *non*-perturbée (Barr et al. 2017; Arora et al. 2017). Un traitement à l'aphidicoline augmente à la fois la proportion de cellules 53BP1 positives en G1 (Lukas et al. 2011; Harrigan et al. 2011; Barr et al. 2017; Arora et al. 2017) et la proportion de cellules s'arrêtant en G1 (Barr et al. 2017; Arora et al. 2017). Bien que ce lien ne soit que corrélatif, on notera qu'ATM co-localise au niveau des corps nucléaires 53BP1 (Lukas et al. 2011) et pourrait ainsi stimuler p53.

FACTEURS PROTEIQUES HERITES DU CYCLE CELLULAIRE PRECEDENT ET ARRET EN G1

Venant nuancer, au moins en partie, le modèle selon lequel la présence de lésions ponctuelles de l'ADN ou d'altérations chromosomiques en G1 serait le seul déterminant d'un arrêt en phase G1, il a été observé dans des cellules non-transformées qu'un traitement court avec un agent radiomimétique induit d'avantage l'arrêt des cellules en G1 lorsque celui-ci est réalisé *à la phase G2 précédente* plutôt qu'en phase G1 elle-même (H. W. Yang et al. 2017). Bien que ce traitement radiomimétique en phase G2 induise la présence de foyers 53BP1 et γ -H2AX à la phase G1 suivante : (i) on n'observe pas de corrélation entre le niveau de ces dommages et l'hyperphosphorylation ou l'hypophosphorylation de la protéine Rb (**Figure 28**), et (ii) l'inhibition pharmacologique

de la kinase ATM (ou DNA-PK) responsables des foyers 53BP1 n'a pas d'impact sur la proportion de cellules capables de réactiver Cdk2 (H. W. Yang et al. 2017). **Ces résultats suggèrent donc que la présence de dommages à l'ADN et l'activation d'une signalisation (checkpoint ATM-dépendant) en G1 ne sont pas nécessairement déterminantes pour contrôler la réentrée des cellules en phase S. Une hypothèse alternative et indépendante de la transmission de dommages à l'ADN pourrait impliquer la transmission de facteurs antiprolifératifs de la phase G2 à la phase G1 suivante, dont p21 est un candidat majeur.**

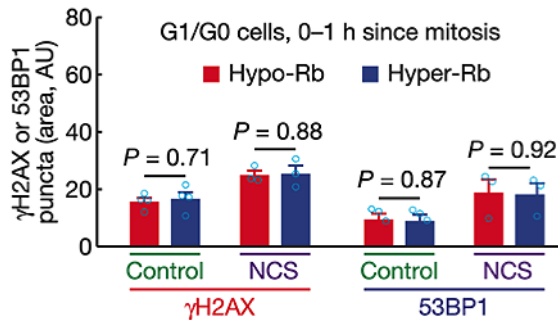


Figure 28 : L'induction de dommages à l'ADN en phase G2 par un agent radiomimétique conduit à la persistance de dommages à la phase G1 suivante. Cependant, dans ces conditions, le niveau de dommages à l'ADN en G1 (γ H2AX, 53BP1) ne corrèle pas avec le niveau de phosphorylation de la protéine Rb et la réentrée des cellules en phase S. (Adapté de (H. W. Yang et al. 2017)).

En effet, la protéine p21 n'est pas dégradée en mitose (Barr et al. 2017) et l'utilisation de lignées cellulaires p21 ou p53 étiquetée (Knock-In fluorescent) met en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de p21 et p53 en phase G2 et la réentrée des cellules en phase S au cycle cellulaire suivant (Barr et al. 2017; H. W. Yang et al. 2017). Dans le même sens, la stabilisation transitoire de p53 (+ nutlin-3a) et/ou p21 (Figure 29) en G2 empêche la réactivation de la kinase Cdk2 à la phase G1 suivante (Spencer et al. 2013; H. W. Yang et al. 2017), suggérant que **l'accumulation transitoire de p53/p21 en phase G2 peut suffire à induire un arrêt à la phase G1 suivante, même en absence de dommages persistants de l'ADN.**

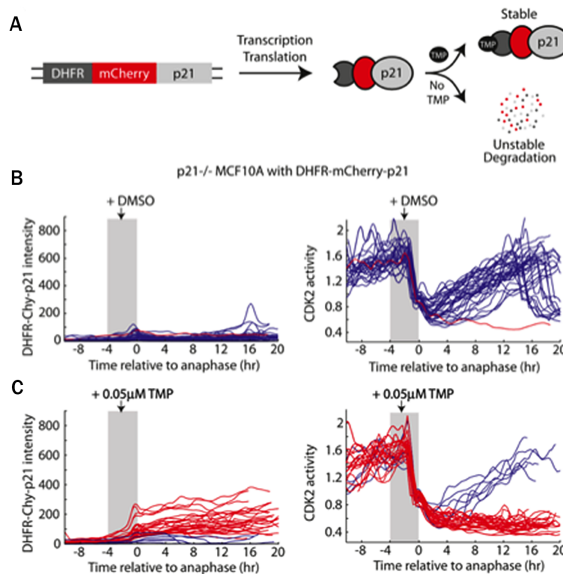


Figure 29 : L'induction transitoire de la protéine p21 en phase G2 suffit à empêcher la réentrée des cellules en phase S au cycle cellulaire suivant.

(A) Des cellules MCF10A p21^{-/-} expriment une protéine p21 ectopique, étiquetée avec un variant mCherry, fortement instable mais pouvant être stabilisée par l'ajout de TMP (TriMethoPrim). (B) L'activité de la kinase Cdk2 est suivie au cours du temps avec un senseur d'activité (basée sur une redistribution nucléo-cytoplasmique) qui permet de discriminer entre les cellules qui continuent à proliférer après la mitose (en bleu, majoritaires) et les cellules qui s'arrêtent en G1 (en rouge, minoritaires). (C) Un pulse de TMP en phase G2 stabilise l'expression de p21 (panel de gauche) et empêche massivement la ré-entrée des cellules en phase S au cycle cellulaire suivant (panel de droite). (Adapté de (Spencer et al. 2013)).

Ces données rejoignent des observations faites en conditions de croissance non perturbée. En effet, la présence ou non d'une activité Cdk4/6 et Cdk2 résiduelle dès la sortie de mitose conditionne une entrée rapide en phase S au cycle cellulaire suivant ou un arrêt prolongé en G1. (Spencer et al. 2013; H. W. Yang et al. 2020). D'autre part, la voie RAS-MEK-ERK participe au passage du point de contrôle, mais pour empêcher la réactivation de Cdk2 en phase G1, MEK doit être inhibée au cycle cellulaire précédent, ce qui affecte l'accumulation de l'ARNm Cycline D (Min et al. 2020; H. W. Yang et al. 2017). **L'ensemble de ces données démontre que le contrôle de l'entrée en S n'est pas un processus restreint à la phase G1 et qu'il est vraisemblable que suite à un stress génotoxique en phases S ou G2 précédentes, le mécanisme de prise de décision entre la prolifération et la quiescence soit déjà, au moins partiellement, initié.**

En résumé, l'arrêt p21-dépendant des cellules en phase G1 suite à un stress réplicatif est vraisemblablement la conséquence de l'intégration de l'ensemble des signaux développés dans ce chapitre, comme résumé sur la **Figure 30**.

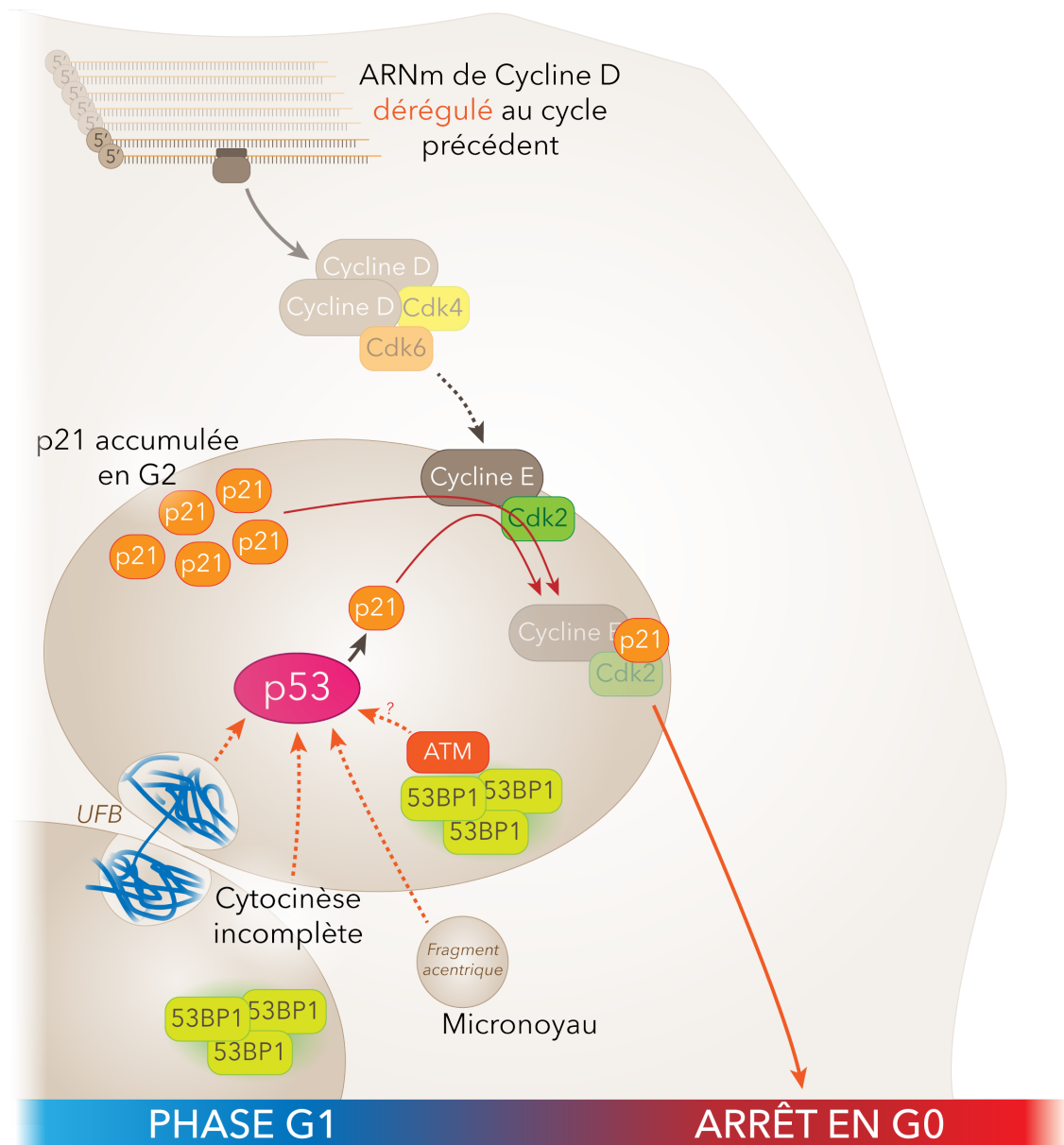


Figure 30 : Schéma récapitulatif des mécanismes capables d'induire un arrêt p53 et p21 dépendant en phase G1, suivant l'induction d'un stress génotoxique au cycle cellulaire précédent.

La présence d'un stress génotoxique même transitoire favorise l'accumulation de p21, qui n'est pas dégradée en mitose et est donc transmise aux cellules filles au cycle cellulaire suivant.

D'autre part, dans le cas spécifiquement d'un stress répliatif, celui-ci favorise la présence en phase G1 suivante de corps nucléaires 53BP1, de micronoyaux contenant des fragments chromosomiques acentriques et/ou une polyploïdisation due à une cytokinèse abortive. Ces différentes altérations du génome peuvent conduire à l'activation de p53 et à la stabilisation de p21, avec pour conséquence un arrêt permanent des cellules en G1.

LIMITES FONCTIONNELLES DU CHECKPOINT G2/M : COMMENT DES LÉSIONS DE L'ADN PEUVENT-ELLES PERSISTER EN MITOSE ?

Après induction de cassures double brin de l'ADN, une fraction d'une population cellulaire donnée peut entrer en mitose malgré la persistance de ces lésions et un checkpoint G2/M fonctionnel (Liang et al. 2014; Syljuåsen et al. 2006). Deux modèles non-exclusifs ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Premièrement, il est possible qu'il existe un seuil de dommages en dessous duquel la réponse aux dommages à l'ADN en phase G2 ne s'active pas ou que son niveau d'activité soit trop faible pour inhiber l'entrée des cellules en mitose. Alternativement, il est possible que les dommages à l'ADN soient effectivement détectés et déclenchent l'activation du checkpoint G2/M, mais qu'une signalisation *pro*-mitotique vienne surmonter et/ou inactiver celui-ci, forçant ainsi l'entrée des cellules en mitose. Ce second modèle est appelé *adaptation au checkpoint*.

Des arguments soutenant ces deux modèles existent dans la littérature et il est possible que les deux mécanismes coexistent *in vivo* et/ou que certains types de lésions soient prompts à induire plutôt l'un ou l'autre mécanisme. L'état de l'art sur le sujet est développé ci-dessous.

ADAPTATION AU CHECKPOINT : DECOUVERTE CHEZ LA LEVURE

Des levures *Saccharomyces cerevisiae* déficientes dans des mécanismes de réparation et soumise à un dommage de l'ADN —comme par exemple une cassure double brin générée par l'induction ectopique d'une endonucléase— s'arrêtent en G2 pendant plusieurs heures avant d'éventuellement entrer en mitose (Sandell 1993; Toczyski, Galgoczy, et Hartwell 1997; S. E. Lee et al. 1998). **La cassure double brin générée demeurant non-réparée lors de l'entrée en mitose, ce phénomène a été appelé "adaptation au checkpoint".**

Des travaux complémentaires montrent que des levures n'ayant qu'une seule cassure double brin de l'ADN non réparable peuvent s'adapter au checkpoint G2/M pour entrer en mitose, mais pas celles ayant deux cassures (S. E. Lee et al. 1998), suggérant qu'il existe un seuil de lésions au-delà duquel ce phénomène d'échappement n'est plus possible. De manière notable, l'élément clef semble ne pas être le nombre de cassures de l'ADN détecté, mais la quantité d'ADN simple brin produite par la résection de ces cassures. En effet, une stimulation de la résection de l'ADN en inactivant Ku70¹⁰ empêche l'adaptation au checkpoint même après induction d'une seule cassure double brin, tandis qu'une diminution de l'activité de résection via l'inactivation de l'exonucléase Mre11 compense le défaut d'adaptation des levures *ku70Δ* et de plus permet aux levures présentant deux cassures double brin de l'ADN non réparables d'entrer en mitose (S. E. Lee et al. 1998).

¹⁰ Ku70 est impliquée dans la réparation par NHEJ des cassures double brin de l'ADN.

La recherche de mutants déficients dans ce phénomène d'adaptation au checkpoint G2/M a permis d'identifier Cdc5 (l'homologue de Plk1) comme impliquée dans ce processus. Spécifiquement, des levures porteuses de la mutation ponctuelle *cdc5 L251W*, appelée *cdc5-ad*, ne sont pas capable de s'adapter au checkpoint et s'arrêtent de manière permanente en G2 (Toczyski, Galgoczy, et Hartwell 1997), tandis que la surexpression de Cdc5 (mais pas de Cdc5 Kinase Dead ou Cdc5-ad) accélère le phénomène d'adaptation (Vidanes et al. 2010). Le checkpoint G2/M Rad53-dépendent (homologue de Chk1) s'inactive de manière *concomitante* à l'adaptation, ce qui n'est pas le cas dans un contexte *cdc5-ad* ou *ku70Δ* (Pellicoli et al. 2001). En accord, la surexpression de Cdc5 (mais pas de Cdc5-ad) conduit à l'inhibition prématurée de la phosphorylation activatrice de Rad53 (Vidanes et al. 2010; Donnianni et al. 2010), suggérant que Cdc5 inactive Rad53 pour permettre l'entrée des cellules en mitose.

SEUIL ET DOSE-REPONSE CHEZ LES MAMMIFERES EN PRESENCE DE CASSURES DOUBLE-BRIN DE L'ADN

Dans les cellules humaines, l'entrée en mitose est inhibée de manière dose-dépendante suite à l'induction de cassures double brin en G2 par des radiations ionisantes ou des agents radiomimétiques (Ishikawa et al. 2010; Tkacz-Stachowska et al. 2011). La majorité des cellules sont initialement arrêtées pendant plusieurs heures en G2, indiquant que le checkpoint G2/M est fonctionnel (Deckbar et al. 2007; Liang et al. 2014). Le nombre moyen de cassures double brin en G2 diminue avec le temps tandis que l'index mitotique augmente en conséquence (Deckbar et al. 2007; Loefer et al. 2013), suggérant fortement que la réparation progressive des cassures DSB permet la reprise du cycle cellulaire. **Cependant, une fraction importante de cellules, y compris dans des cultures primaires, entre en mitose avant d'avoir complètement réparé ces lésions**, visualisables par des cassures métaphasiques ou des foyers γ -H2AX (Deckbar et al. 2007; Ishikawa et al. 2010; Tkacz-Stachowska et al. 2011).

Ces résultats pourraient suggérer qu'il existe un seuil minimum de cassures en dessous duquel les cassures DSB ne sont plus détectées par le checkpoint G2/M. Cependant, il a pu être montré de manière élégante via l'utilisation d'un système CRISPR-Cas9 inductible que bien que l'entrée des cellules en mitose ne soit pas inhibée par la présence d'un faible nombre de DSB, le checkpoint G2/M est activé par *une seule* cassure double brin et ralentit significativement la cinétique d'entrée en mitose (van den Berg et al. 2018). **Il semble donc que le checkpoint G2/M soit activé même par un nombre très faible de cassures DSB, mais que le niveau d'activation ne soit pas suffisant pour empêcher durablement l'entrée des cellules en mitose en présence de lésions persistantes non réparées.**

Y-A-T-IL UNE ADAPTATION AU CHECKPOINT G2/M CHEZ LES MAMMI-FERES EN REPOSE AUX CASSURES DOUBLE BRIN ?

Une hypothèse attractive pour expliquer l'entrée des cellules en mitose malgré la présence de cassures DSB persistantes et l'activation du checkpoint G2/M serait que celui-ci est surmonté par les mécanismes pro-mitotiques, autrement dit un phénomène d'adaptation au checkpoint G2/M analogue à ce qui a été décrit chez la levure *S cerevisiae*.

MEME ACTIF, LE CHECKPOINT G2/M PERMET L'ACCUMULATION D'INDUCTEURS MITO-TIQUES

L'étude de la cinétique d'entrée en mitose de lignées humaines cancéreuses ou non-transformées suite à induction de cassures double brin (IR ou étoposide) montre: (i) que la majorité des cellules sont retardées en G2 puis entrent en mitose avec un petit nombre de lésions persistantes, (ii) qu'une petite fraction de cellules entre très rapidement en mitose après IR mais avec un nombre de lésions beaucoup plus important (**Figure 31**) (Deckbar et al. 2007; Liang et al. 2014), suggérant que **l'état de progression des cellules au sein de la phase G2 joue un rôle clef dans leur capacité à retarder l'entrée en mitose en présence de lésions.**

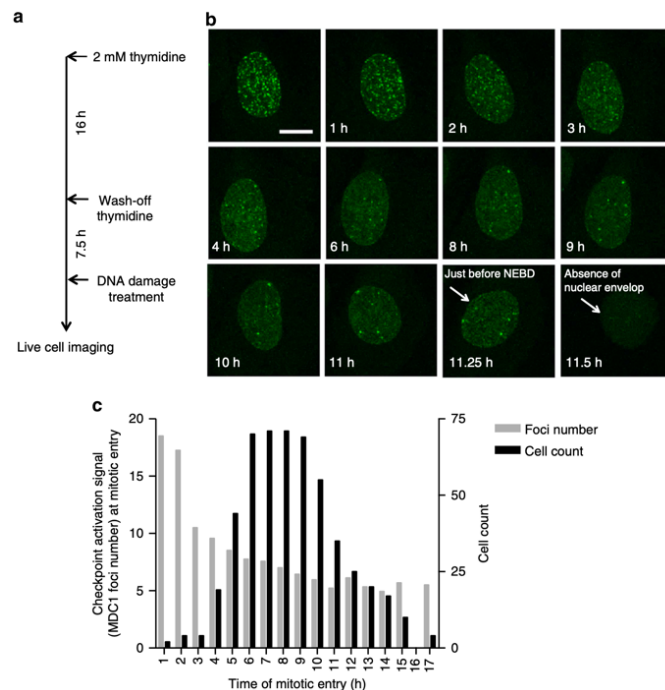


Figure 31 : Suite à l'induction de cassures double-brin de l'ADN en phase G2, un petit nombre de cellules entre rapidement en mitose malgré la présence d'un très grand nombre de lésions. A contrario, la majorité des cellules sont transitoirement arrêtées en G2, ce qui contribue à la réparation de ces lésions avant la transition mitotique.

Des cellules U2OS exprimant de manière stable la protéine étiquetée GFP-MDC1, un marqueur des cassures double brin se liant à γ -H2AX, ont été synchronisées en phase G2 (**a**), traitées par un pulse d'étoposide puis suivies par vidéo-microscopie (**b**) afin de dénombrer le nombre de lésions persistantes en mitose (**c**) (adapté de (Liang et al. 2014)).

Le lien entre la capacité d'une cellule à entrer en mitose en présence de cassures double brin de l'ADN et le niveau d'activation de kinases pro-mitotiques a été étudié à l'aide d'une lignée U2OS co-exprimant GFP-MDC1 (pour dénombrer le nombre de lésions) et le senseur FRET faiblement déphosphorylable de Plk1 (site Myt1). Il a ainsi pu être observé que *plus le niveau d'activité Plk1 est élevé* au moment où les dommages sont induits, *plus l'arrêt en phase G2 est court* et plus les cellules entrent en mitose avec un nombre élevé de lésions MDC1 positives (Liang et al. 2014). D'autre part, la présence de cassures double brin ralentit mais ne supprime pas l'augmentation

progressive de l'activité Plk1 lors de l'arrêt en phase G2 (Liang et al. 2014; Jaiswal et al. 2017). **Ces données suggèrent donc un modèle selon lequel le checkpoint G2/M ralentit mais ne supprime pas l'accumulation progressive de la protéine Plk1 et l'augmentation de son activité kinase, ce qui permettrait de surmonter le checkpoint G2/M conduisant à l'entrée des cellules en mitose en présence de lésions persistantes.**

En accord avec ce modèle, il a été montré suite à l'activation du checkpoint G2/M, que l'activité transactivatrice de FoxM1 reste fonctionnelle dû à une activité (CyclinA2-)Cdk résiduelle, ce qui permet de maintenir l'expression et l'accumulation au cours de l'arrêt en phase G2 de facteurs pro-mitotiques, tels que Cycline B1 et Plk1 (Alvarez-Fernández et al. 2010).

L'ensemble de ces données suggère que le contrôle de l'entrée en mitose en présence d'un stress génotoxique est un processus dynamique au cours du temps, soumis aux signalisations opposées du checkpoint G2/M et des facteurs/kinases pro-mitotiques.

LES KINASES MITOTIQUES INACTIVENT LE CHECKPOINT G2/M CHEZ LES MAMMIFERES

L'observation que le checkpoint G2/M ne supprime pas l'accumulation au cours du temps et l'activation de facteurs/kinases pro-mitotiques pourrait suffire pour initier l'entrée des cellules en mitose malgré la présence de lésions de l'ADN. Additionnellement, les données actuelles montrent que la signalisation en réponse aux dommages à l'ADN est inactivée par les kinases pro-mitotiques au moment de la transition en mitose.

En effet, l'induction de cassures double brin de l'ADN sur des cellules synchronisées en mitose montre que la signalisation en réponse aux dommages à l'ADN est partiellement inactivée à ce stade du cycle cellulaire. Les acteurs précoces de cette signalisation sont recrutés à la chromatine, comme MDC1, ATM, DNA-PK, γ -H2AX et MRN, mais des acteurs plus tardifs comme 53BP1, RNF8, RNF168 et BRCA1 en sont absents (Giunta, Belotserkovskaya, et Jackson 2010). Dans le cas de 53BP1 et RNF8, il a été montré que leur phosphorylation par Plk1 et/ou Cycline B1/Cdk1 perturbe leur recrutement aux sites de cassures de l'ADN (Orthwein et al. 2014; Benada et al. 2015; van Vugt et al. 2010) (**Figure 32, haut**).

Cette régulation par les kinases mitotiques ne concerne pas uniquement les protéines recrutées à la chromatine. En effet, Plk1 promeut la dégradation β -TRCP-dépendante de la claspine, laquelle est nécessaire à l'activation de Chk1 par ATR (Niels Mailand et al. 2006; Peschiaroli et al. 2006; Mamely et al. 2006) et induit l'inactivation de Chk2 (van Vugt et al. 2010). Un rôle de la kinase Akt dans l'inactivation de Chk1 en fin de G2 a également été rapporté (Xu et al. 2010). Enfin, Plk1 interagit avec p53 et sa surexpression réduit l'activité transactivatrice de p53 (Ando et al. 2004).

Comme déjà détaillé, suite à l'induction de cassures double brin, une fraction limitée de cellules entre rapidement en mitose mais avec un niveau élevé de lésions persistantes. **Ce résultat suggère que les cellules en fin de G2 sont particulièrement tolérantes aux dommages à l'ADN, ce qui semble cohérent avec une inactivation de la réponse aux lésions suite à l'activation de Plk1 ou de Cycline B1/Cdk1**, respectivement 40 min et 20-30 min avant la NEBD (Gheghiani et al. 2017; Gavet et Pines 2010a).

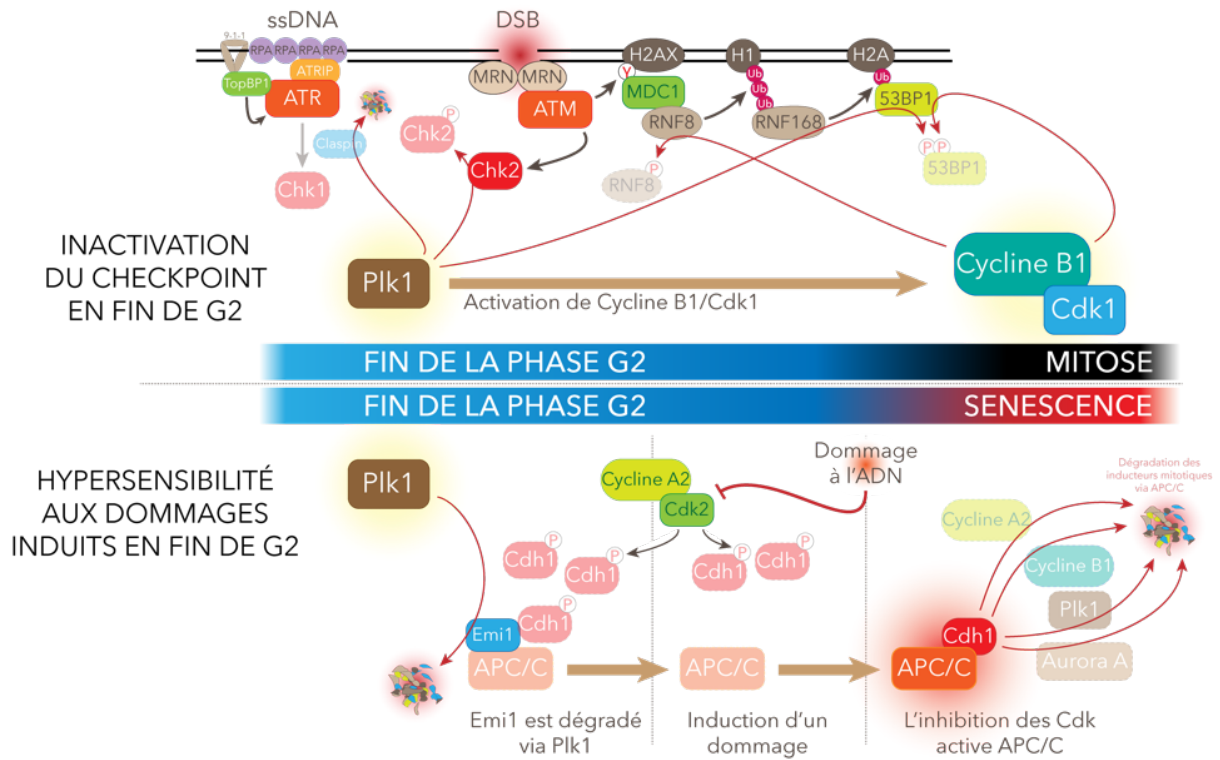


Figure 32 : Rôles de la kinase Plk1 dans la réponse aux lésions de l'ADN en fin de phase G2.

(**Panel du haut**) L'activation de Plk1 en fin de phase G2 inactive Chk2 par phosphorylation et induit la dégradation β -TRCP-dépendante de la claspine, ce qui inhibe l'activation de Chk1, rendant ces cellules moins compétentes pour l'activation du checkpoint G2/M. Plk1 permet l'activation de Cycline B1/Cdk1 et l'entrée des cellules en mitose. La phosphorylation de 53BP1 par Plk1 et Cycline B1 et de RNF8 par cette dernière empêche leur recrutement à la chromatine.

(**Panel du bas**) L'activation de Plk1 en fin de G2 favorise la dégradation d'Emi1, un inhibiteur du complexe APC/C. En l'absence d'Emi1, les cellules sont particulièrement sensibles à l'inhibition des Cdk qui normalement phosphorylent Cdh1 et empêchent son interaction au complexe APC/C. L'induction de dommages à l'ADN en fin de phase G2 peut activer le checkpoint G2/M et inhiber les Cdk, conduisant à l'activation du complexe APC/C-Cdh1 et à la dégradation rapide des inducteurs mitotiques, dont les Cyclines A et B.

MODELE OPPOSE ET HYPERSENSIBILITE DES CELLULES EN FIN DE G2 AUX LESIONS DE L'ADN

La sensibilité différentielle de cellules en fin de phase G2 aux dommages de l'ADN est cependant *controversée* et la littérature sur ce sujet est contradictoire. En effet, à l'opposé des données mentionnées ci-dessus, il a été observé dans des cellules humaines non-transformées RPE-1 possédant un Knock-In fluorescent de Cycline B1 que lorsque une irradiation est réalisée en toute fin de G2 (identifiable par le niveau d'expression de Cycline B1), Cycline B1 est rapidement dégradée dans le cytoplasme et l'entrée en mitose est massivement inhibée (Femke M. Feringa et al. 2016). Cette dégradation cytoplasmique de Cycline B1 en fin de G2 (i) implique des mécanismes moléculaires différents de sa translocation nucléaire p21-dépendante suivie de sa dégradation observées en phase G2 précoce (Krenning et al. 2014) et (ii) survient même pour de faibles doses d'IR, **suggérant que les cellules en toute fin de phase G2 sont hypersensibles à l'induction de cassures DSB (Figure 33).**

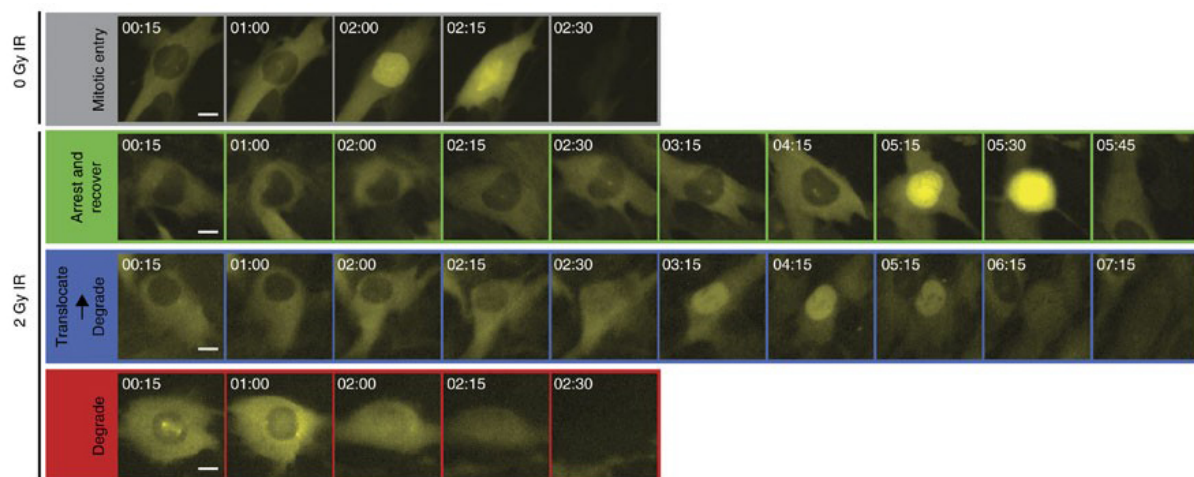


Figure 33 : Dégradation cytoplasmique (ligne rouge) ou nucléaire (ligne bleue) de Cycline B1 après traitement IR en phase G2. D'après Feringa et al. 2016.

L'irradiation de ces cellules en toute fin de G2 étant associée à une baisse mesurable de l'activité Cdk2 — indiquant que le checkpoint G2/M est activé —, les auteurs proposent que la dégradation Plk1-dépendante d'Emi1¹¹ en fin de phase G2 rend ces cellules particulièrement sensibles à une baisse d'activité Cdk. En effet, le complexe APC/C^{Cdh1} en interphase est normalement inhibé par Emi1 et par la phosphorylation Cdk-dépendante de Cdh1 (Sørensen et al. 2001). En absence d'Eme1, une baisse d'activité Cdk suite à l'activation du checkpoint G2/M conduirait à la dégradation rapide des inducteurs mitotiques par APC/C^{Cdh1} inhibant l'entrée des cellules en mitose (**Figure 32, bas**).

Ce rôle de Plk1 dans l'induction d'une *hypersensibilité* aux dommages en fin de phase G2 est surprenant compte tenu des observations mentionnées ci-dessus selon lesquelles les cellules dont l'activité Plk1 est la plus élevée au moment de l'induction des dommages entrent rapidement en mitose (Liang et al. 2014). Cette différence d'observation pourrait être liée à l'approche expérimentale, Liang et al. ne suivant que les cellules entrant en mitose au cours du temps. Il ne peut pas être exclu qu'une fraction de la population cellulaire en toute fin de G2 reste définitivement arrêtée après irradiation mais ne soit pas étudiée par ces auteurs. Il est également possible que les deux mécanismes de régulation de l'entrée en mitose en réponse aux lésions de l'ADN coexistent en fin de phase G2 et repose (i) sur la dynamique temporelle de la dégradation d'Emi1 Plk1-dépendante, versus (ii) l'activation Plk1-dépendante de Cycline B1-Cdk1.

¹¹ Inhibiteur d'APC/C-Cdh1 (voir p8).

... ET SUITE A UN STRESS REPLICATIF ?

Des travaux ont cherché à mieux caractériser l'activation du checkpoint de la réplication (DRC) en phase S en réponse à un stress réplicatif croissant (Koundrioukoff et al. 2013). Il a été mis en évidence qu'en réponse à des doses croissantes d'aphidicoline, la vitesse de progression des fourches de réplication diminue de manière dose dépendante tandis qu'en parallèle, la kinase ATR est fortement recrutée à la chromatine dès les doses les plus faibles. De manière inattendue, la phosphorylation des substrats d'ATR, en particulier Chk1, reste non détectable jusqu'à des doses importantes d'aphidicoline. De faibles doses d'aphidicoline n'affectent que partiellement l'entrée des cellules en mitose (Koundrioukoff et al. 2013; Wilhelm et al. 2019) mais sont suffisantes pour induire des cassures chromosomiques en métaphase aux niveau des sites fragiles communs (Glover et al. 1984; Koundrioukoff et al. 2013). Ces observations ont permis de proposer un modèle où un stress réplicatif modéré n'active pas la signalisation ATR/Chk1 malgré le ralentissement des fourches de réplication, ce qui permet l'entrée des cellules en mitose et l'expression des CFS (Técher et al. 2017).

Un mécanisme d'adaptation à l'activation du checkpoint de la réplication permettant la transition en mitose, malgré la persistance de fourches de réplication actives mais ralenties, a pu être mis en évidence dans des extraits d'ovocyte de Xénope (Hae Yong Yoo et al. 2004). Dans ce système, l'induction d'un stress réplicatif induit la phosphorylation ATR-dépendante de la claspine sur le résidu T906, permettant son interaction et sa phosphorylation par Plx1 (homologue de Plk1) qui promeut sa dissociation de la chromatine. La claspine étant nécessaire chez le Xénope pour maintenir l'activité kinase de Chk1 (A. Kumagai et Dunphy 2000), son inactivation par Plx1 promeut la transition en mitose alors que la primase pol alpha est toujours détectable à la chromatine, indiquant qu'au moins une partie des fourches de réplication est toujours fonctionnelle et ralentie.

Il est possible que ces deux mécanismes, non-activation de la signalisation ATR/Chk1 en présence de fourches de réplication ralenties et adaptation au checkpoint de la réplication, coexistent *in vivo* dans des cellules soumises à un stress réplicatif, bien que ce dernier mécanisme d'adaptation au stress réplicatif n'ait jamais été mis en évidence dans les cellules humaines.

OBJECTIFS DE MON PROJET DE THESE

La progression de la fourche de réplication en phase S peut fréquemment être perturbée par des sources endogènes ou exogènes, comme la présence de structures secondaires de l'ADN, une carence en un facteur limitant ou l'expression/activation d'oncogènes comme Cycline E ou Ras oncogénique. Cette situation, appelée *stress réplicatif*, est couramment observée dans divers contextes tumoraux et pourrait jouer un rôle décisif dans les étapes précoces de la progression tumorale en favorisant l'apparition d'une instabilité génétique. La voie de signalisation ATR/Chk1 activée en conditions de stress réplicatif est un mécanisme de contrôle (ou *checkpoint*) clef pour retarder l'entrée des cellules en mitose et favoriser des mécanismes permettant la terminaison du processus de réplication. Néanmoins, de nombreux travaux suggèrent que ce checkpoint de la réplication n'est pas "infaillible" et que de l'ADN incomplètement répliqué peut persister, notamment au niveau des sites fragiles commun (CFS), jusqu'en mitose, entraînant l'apparition de gaps et/ou cassures chromosomiques pouvant affecter la stabilité du contenu génétique transmis à la descendance cellulaire.

Au moins deux scénarios non-exclusifs peuvent expliquer ce phénomène : (i) l'existence d'un seuil de dommages à l'ADN ou de fourches de réplication ralenties en dessous duquel la voie ATR/Chk1 n'est pas fonctionnelle, ou (ii) l'existence d'un équilibre dynamique au cours du temps entre des voies anti- (ATR/Chk1) et pro-mitotiques qui pourrait résulter en une entrée des cellules en mitose malgré une signalisation ATR/Chk1 soutenue.

Cependant, le caractère *rare* de tels événements et l'importance d'un suivi temporel du comportement de cellules individuelles au sein de populations hétérogènes limitent l'utilisation d'approches biochimiques ou sur cellules fixées. **Déterminer les conditions et les mécanismes par lesquels une cellule possédant des mécanismes de contrôle (checkpoints) fonctionnels effectue une entrée en mitose malgré la persistance d'ADN incomplètement répliqué/réparé a d'importantes implications dans notre compréhension des événements précoces à l'origine de la tumorigenèse.**

Dans ce cadre, les objectifs de ma thèse ont été : (i) de développer des outils et approches méthodologiques permettant d'étudier la dynamique de régulation d'un checkpoint —en l'occurrence de l'activité de la kinase Chk1— sur cellules vivantes analysées individuellement, (ii) de caractériser le comportement de l'activité Chk1 au cours de la prolifération cellulaire en conditions de croissance normale ou en présence d'un stress réplicatif, (iii) d'analyser l'existence potentielle de mécanismes d'échappement au checkpoint de la réplication, (iii) et enfin de déterminer les conséquences sur les capacités de prolifération et le devenir de la descendance cellulaire.

RÉSULTATS

Chk1 dynamics during cell cycle resumption from replication stress underlie cell fate

Vicente Lebec², Marion Poteau^{1,2}, Jean-Philippe Morreton² and Olivier GAVET^{1,2*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Paris VI, UFR927, F-75005, Paris, France

² UMR9019 - CNRS, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif France

X Characters

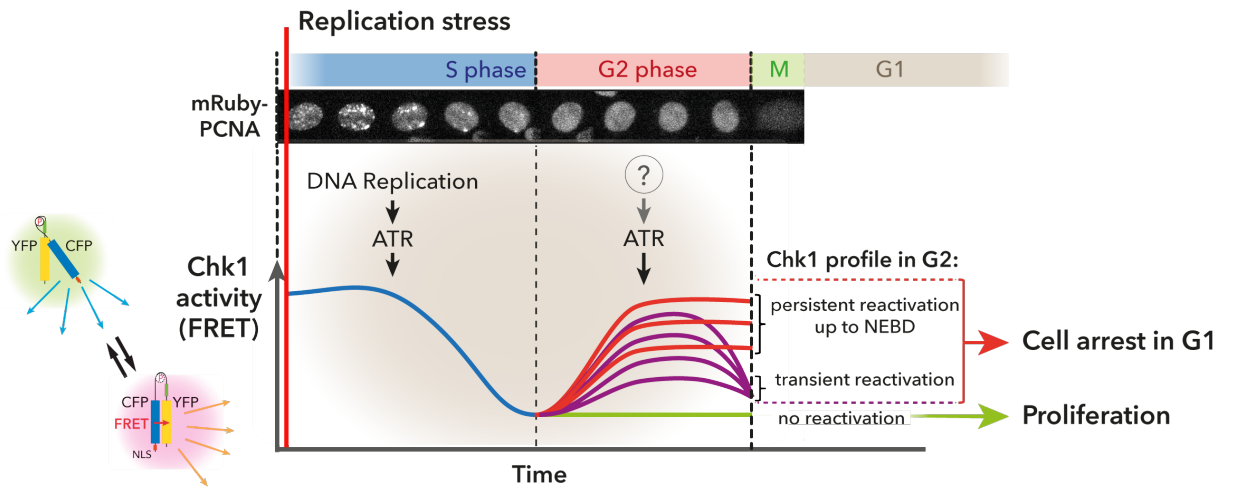
* Corresponding author: Dr. Olivier GAVET

Running title: Chk1 dynamics underlie cell fate

Keywords: Replication stress, cell cycle recovery, checkpoint adaptation, Checkpoint kinase 1, FRET biosensor

Abbreviations: DRC (DNA replication checkpoint), RS (replication stress), FRET (Förster Resonance Energy Transfer), NEBD (Nuclear Envelope Breakdown)

GRAPHICAL ABSTRACT



Highlights

- DNA replication sustains basal Chk1 activity along S phase
- Cells entering mitosis during cell cycle resumption upon replication stress do so after a genuine prolonged G2 phase
- Upon replication stress, Chk1 inactivates with the termination of bulk DNA replication, but can re-activate in the following G2 phase
- Chk1 reactivation in G2 phase prevents premature mitotic entry but a subset of cells divides despite persistent Chk1 activity supporting checkpoint adaptation
- Mitotic entry following Chk1 reactivation in G2 phase results in G1 arrest

Summary

The ATR/Chk1 pathway prevents mitotic entry upon replication stress and was recently proposed to play a key role during non-perturbed cell cycle to couple termination of S phase with the expression of mitotic inducers. Here, we developed a FRET probe to follow Chk1 activity in live single cell assays and show that Chk1 activation in non-perturbed S phase is strictly dependent on the replication process. Upon induction of replication stress, the coupling of Chk1 activity with replication is conserved and a subset of cells eventually terminates DNA replication, resulting in Chk1 inactivation. Surprisingly, Chk1 can then re-activate in G2 phase independently of bulk DNA replication to prevent premature mitotic entry, but some cells manage to divide despite active Chk1 signaling and end up arrested in the following G1. Our work thus provides the first direct evidence of checkpoint adaptation to replication stress in human cells and describes checkpoint kinetics with unprecedented time- and single cell resolution.

Introduction

Commitment to mitosis must be exquisitely coordinated with the completion of DNA replication to maintain the integrity of the transmitted genetic content during around 10 quadrillion-cell divisions in a human lifetime. Recent findings reveal that this coordination crucially relies on both signaling mechanisms and regulation of protein expression (Crncec and Hochegger, 2019; Lemmens and Lindqvist, 2019). Indeed, we previously reported that abrupt CyclinB1-Cdk1 activation, which sets up entry into mitosis, is dependent on upstream Polo-like kinase 1 (Plk1) (Gavet and Pines, 2010a; Gheghiani et al., 2017). Plk1 activation during G2 requires both upstream regulators Aurora-A kinase and hBora (Macurek et al., 2008; Seki et al., 2008), the latter we recently determine is a specific co-activator of Aurora-A (Tavernier et al.). hBora-Aurora-A interaction is temporally regulated by hBora phosphorylation from CyclinA2-Cdk, an S-promoting factor, whose kinase activity build up during S/G2 progression (Goldstone et al., 2001; Pagano et al., 1992; Thomas et al., 2016; Vigneron et al., 2018). Together, these data highlights signaling events, referred to mitotic entry network (MEN), linking commitment to mitosis to the machinery controlling DNA replication.

Additionally, expression of several mitotic inducers, notably Aurora A, Plk1 and CyclinB1, around S/G2 transition (Akopyan et al., 2014; Zerjatke et al., 2017) is dependent on the Forkhead box protein M1 (FoxM1) transcription factor, whose activity is stimulated by CyclinA2-Cdk1/2 phosphorylation (Laoukili et al., 2005, 2008; Müller et al., 2014). A number of previous studies reported that the ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) - Chk1 signaling pathway is active during unperturbed S phase. Indeed, inhibiting ATR or Chk1 activity induces extra origin firing during DNA replication, which can be reversed by partial Cdk inhibition (Buisson et al., 2015; Eykelenboom et al., 2013; Maya-Mendoza et al., 2007; Petermann et al., 2010a). Supporting that ATR-Chk1 pathway may restrain CyclinA2-Cdk activity during unperturbed S phase, Auxin-dependent degradation of endogenous Chk1 stabilizes Cdc25A activating phosphatase (Goto et al., 2019) and ATR/Chk1 inhibition results in increased phosphorylation of a Cdk2 activity reporter in S phase (Daigh et al., 2018).

Importantly, ATR (or Chk1) inhibition promotes premature Cdk-dependent FoxM1 phosphorylation, earlier CyclinB1 expression during S phase and premature mitosis (Saldivar et al., 2018). Altogether, it indicates that DNA replication up to completion prevents the expression and/or activation of MEN. Further supporting this conclusion, Lindqvist's group elegantly showed that entry into mitosis is accelerated when S phase is abrogated (Lemmens et al., 2018). It remains however unclear how mechanistically DNA replication can activate the ATR-Chk1 DNA damage pathway.

Replication fork progression during S phase routinely face threats originating from various endogenous or exogenous sources, including nucleotide shortage, DNA damage by metabolism by-products or DNA secondary structures, leading to a situation referred to as replication stress (RS). Replication stress is commonly observed in various tumors and precancerous lesions, linked to the overexpression or constitutive activation of oncogenes, and is associated with chromosome instability (Burrell et al., 2013; Zeman and Cimprich, 2014). Cell response to replication stress primarily relies on ATR-Chk1 signaling, which delays cell cycle progression and allows firing of dormant origins (Ciardo et al., 2019; Zhang and Hunter, 2014). Contrasting with the view that cell cycling will resume only following DNA replication completion, several work revealed that incompletely replicated DNA can persist at mitosis even in DNA replication checkpoint (DRC)-proficient cells, leading to chromosome breakage, notably at common fragile sites (CFSs), ultra-fine DNA bridges and chromosome missegregation (Debatisse and Rosselli, 2019; Naim et al., 2013; Wilhelm et al., 2019). How cells achieve entry into mitosis in spite of persistent unreplicated DNA regions remains a main answered question.

Here, we develop a specific FRET-based biosensor of Chk1 kinase and report that replication origin firing is intrinsically sufficient and necessary to activate Chk1 to a basal level along unperturbed S phase progression. Upon incremental RS, stepwise Chk1 overactivation is triggered that persists during a prolonged S phase up to a genuine S/G2 transition, allowing the accumulation of mitotic inducers. Unexpectedly, individual cells display considerable

heterogeneity in Chk1 reactivation profiles from G2 phase onwards that underline their ability to either reenter S phase in the next cell cycle or remain arrested in G1. Single-cell tracking assays also reveal that a sub-fraction of cells, related to RS stringency, reach mitosis regardless of functional Chk1 signaling, providing the first direct observation of checkpoint adaptation upon RS in human cells.

Results

Development and characterization of a FRET-based Chk1 phosphorylation sensor.

To address the regulation of Chk1 kinase activity during an unperturbed cell cycle and upon various genotoxic stresses, we designed a genetically encoded FRET (Förster Resonance Energy Transfer)-based phosphorylation sensor to be used as a Chk1 pseudo-substrate in live single cell assays (Gheghiani and Gavet, 2016) (**Figure 1A**). Taking advantage of a previous work that identified a list of Chk1 substrates and their phosphorylation sites using an as-Chk1 (analogue sensitive) form and thio-phosphate ATP analogue (N6B-ATP γ S) (Blasius et al., 2011), we tested several phosphorylation sequences. Because a significant fraction of Chk1 protein localizes to chromatin during all phases of the cell cycle and rapidly dissociates into the nucleoplasm upon activation (Smits et al., 2006), FRET constructs were targeted to the nucleus by the addition of a SV40 NLS motif. Fluorescent nuclear signal was used for automated segmentation, single cell tracking and FRET quantification (see Experimental procedures). Our screening assays were based on transient transfection in either adenocarcinoma HeLa or nontransformed immortalized hTert-RPE-1 cells, recording FRET signals over time before and upon replication stress (RS) induced by aphidicolin, an inhibitor of B-family DNA polymerases. This drug treatment rapidly triggers the activation of the ATR-Chk1 pathway (Baranovskiy et al., 2014; Koundrioukoff et al., 2013). Of several sequences tested, the construct containing the selected motif displayed a remarkable FRET dynamic range of up to 80%, reached as fast as ~5 min upon aphidicolin addition (**Figure 1B**). FRET changes observed were fully reversed upon subsequent Chk1 inhibition (**Figure 1B**), using CHIR-124 inhibitory compound that exhibits a 2,000-fold selectivity for Chk1 over Chk2 *in vitro* (Tse et al., 2007). The use of a non-phosphorylatable variant (Thr to Ala point mutation) confirmed that FRET changes recorded relied on the phosphorylation of the sequence (**Supplemental Figure S1A**). Because only a subset of the cell population exhibited a FRET response upon aphidicolin treatment (**Figure 1B and 1C**), the FRET construct, thereafter referred to as Chk1 sensor, was expressed in K-In mRuby-PCNA RPE-1 cells to identify S-phase cells based on

PCNA foci appearance (Leonhardt et al., 2000). Recording asynchronous cell populations, we determined that S-phase cells (PCNA foci +), but neither the G1 or G2 subpopulations, specifically exhibited FRET changes upon aphidicolin addition (**Figure 1D**), consistent with a requirement on DNA replication for replication stress-associated ATR/Chk1 activation. To assess the specificity of the newly developed sensor toward Chk1 kinase activity, multiple experiments were conducted. Upon aphidicolin treatment, sensor phosphorylation was fully reversed by adding inhibitory compounds targeting Chk1 (CHIR-124) or upstream acting ATR (AZD6738) but not against ATM (KU55933) or Chk2 (PV1019) kinases (**Figure S1B & C**). Because ATM and Chk2 could be only minimally activated upon RS, cells were alternatively treated with a topoisomerase II inhibitor (etoposide) that activates both ATR/Chk1 and ATM/Chk2 signaling (Swift and Golsteyn, 2014). Sensor phosphorylation increased following etoposide treatment but with slower kinetics than upon induction of RS, which we speculate might reflect the time needed for DNA double strand break-end resection that promotes ATR recruitment and activation (Jazayeri et al., 2006). More importantly, sensor phosphorylation was rapidly reversed upon Chk1i (CHIR-124) and ATRi (AZD6738) but not Chk2i (PV1019) treatment (**Figure S1C**). Consistent with a role of ATM in promoting ATR activation following double-strand break induction (Jazayeri et al., 2006), partial reversion of sensor phosphorylation was observed following ATM inhibition upon etoposide treatment (**Figure S1D**). Western blot analyses using comparable settings confirmed that the ATR, ATM and Chk1 inhibitors used suppress the phosphorylation of Chk1 S345, Chk2 T68 and Chk1 T296 (auto-phosphorylation site), respectively (**Figure S2**). As alternative sources of replication stress, we also tested the addition of hydroxyurea (HU), an inhibitor of the ribonucleotide reductase, or of an excess of thymidine (Thy) (Bjursell and Reichard, 1973). Both treatments induced a comparable FRET response to aphidicolin addition but only after a reproducible ~10 minutes lag period (**Figure S3**), which possibly reflects the time required to affect the nucleotide pools. Altogether, our results support that sensor phosphorylation is specifically induced by

ATR/Chk1 and not ATM/Chk2 signaling, and is suitable to monitor checkpoint activation dynamics upon different genotoxic conditions, notably replication stress.

DNA replication activates Chk1 signaling along the duration of S phase.

As already mentioned, previous studies support that Chk1 restrain Cdk activity during normal S phase, notably through Cdc25A destabilization (Daigh et al., 2018; Goto et al., 2019), which might contribute to prevent a premature commitment to mitosis before the complete achievement of DNA replication. To further explore this model, we recorded Chk1 sensor phosphorylation along the cell cycle in unperturbed cell populations. Chk1 sensor was stably expressed in K-In mRuby-PCNA/+ RPE-1 cells and we used either the appearance of small replication (PCNA foci +) foci to define entry into S phase or alternatively the increase of mRuby-PCNA expression as a surrogate marker (Zerjatke et al., 2017), whereas the total disappearance of PCNA foci was used to identify the S/G2 transition (Leonhardt et al., 2000). Live cell recordings showed that Chk1 sensor phosphorylation was minimal during G1 phase, progressively built up after the initiation of PCNA expression, and reached a near steady state level that persisted along S phase progression (**Figure 2A, bottom left panel**). Importantly, in unperturbed conditions, Chk1 sensor phosphorylation level reproducibly decreased at the time of S/G2 transition to reach a minimal level persisting up to entry into mitosis (**Figure 2A, central panel**). A transient FRET increase was observed at mitotic entry (**Figure 2A, right panel**), but was also present in cells expressing a non-phosphorylatable form (**Figure S4A**), indicating that it does not originate from sensor phosphorylation. Importantly, an identical Chk1 sensor phosphorylation profile was observed in non-genetically modified parental hTert-RPE-1 WT cells, ruling out that Chk1 signal in S phase was due to any perturbation of DNA replication caused by mRuby cassette integration at PCNA locus (**Figures S4B**). Conversely, we observed significantly higher and more variable Chk1 phosphorylation levels during S phase progression in osteosarcoma U2OS cells (average Δ FRET~35% in U2OS with highest values at 70% versus ~25% in RPE-1 cells) possibly reflecting a constitutive

replication stress, a point that will require supplemental investigation (Hills and Diffley, 2014). To further analyze local Chk1 activity at chromatin during normal cell cycle, Chk1 sensor was fused to histone H2B and stably expressed in K-In mRuby-PCNA/+ RPE-1 cells. Chk1 activity variations exhibited a similar profile, as a Chk1 signal increase was reproducibly taking place from S phase onset and rapidly reversed at S/G2 transition, although the maximal extent of H2B-Chk1 sensor FRET signal along S phase was slightly reduced (**Figure S4D**). Notably, the non-specific transient FRET increase at mitotic entry observed in cells expressing either nuclear targeted (NLS-) Chk1 phosphorylation sensor or the corresponding non-phosphorylatable (inactive) form was never observed recording chromatin-targeted H2B-Chk1 sensor, suggesting it might be linked to sudden sensor redistribution in the whole cell volume at NEBD.

Because PCNA expression initiated around G1/S transition might significantly precede the activation of replication origins, we next carefully compared Chk1 sensor phosphorylation levels with the detection of PCNA positive replication foci. A close temporal correlation was observed both at S phase onset between Chk1 sensor phosphorylation increase and sudden PCNA foci appearance (**Figure S4E**) and at S/G2 transition between sensor dephosphorylation and foci disappearance (**Figure S4F**). We sought that Chk1 sensor phosphorylation in S phase might rely on some DNA damage produced during the replication process, as γ -H2AX foci can be observed in S-phase RPE-1 cells (Saldivar et al., 2018), or rely on the activation of replication origins through single strand DNA tracks generated at progressing forks. To distinguish between these two possibilities, asynchronous cells were treated with DDK (Dbf4-dependent Cdc7-kinase) inhibitory compound XL-413, which inhibits Cdc7-dependent Mcm2-7 complex phosphorylation and DNA replication initiation during S phase (Alver et al., 2017). Remarkably, Chk1 phosphorylation signal was strongly suppressed following Cdc7i addition and with comparable inactivation kinetics between early, mid or late S phase cells (**Figure 2B**). We ruled out that Chk1 sensor dephosphorylation observed in asynchronous S phase cells following Cdc7i treatment was due to a requirement of DDK to fully activate Chk1,

as was previously reported upon replication fork stalling or DNA damage conditions (Sasi et al., 2018). Indeed, addition of aphidicolin in the next hour following Cdc7i treatment immediately induced the re-increase of Chk1 phosphorylation signal (**Figure 2C, left and central panels**), demonstrating that the kinetics of Chk1 activation upon fork stalling is not affected by Cdc7 inhibition. To further confirm that Cdc7 inhibition mainly reduce Chk1 activity through the suppression of new origin firing, cells were pretreated for an hour with aphidicolin before inhibiting Cdc7. Local dormant origin firing occurs within the first 30 min upon RS (Courbet et al., 2008), whereas distant origin firing is otherwise inhibited (Dimitrova and Gilbert, 2000; Karnani and Dutta, 2011; Técher et al., 2017). Therefore, Cdc7 inhibition is thus not expected to further reduce new origin firing following RS induction. Accordingly, aphidicolin treatment resulted in rapid Chk1 activation, but subsequent Cdc7 inhibition had little effect on Chk1 activity (**Figure 2C, right panel**). Finally, sensor inactivation kinetics upon Cdc7i addition (~45-60 min) agree with the measured average lifetime of already active replication foci (Berezney et al., 2000; Chagin et al., 2016) and appears similar to the one observed at S/G2 transition (**Figure S4G**). Hence, although we cannot completely rule out that DNA damage might contribute, at least to a small extent, to Chk1 sensor phosphorylation, our results strongly suggest that Chk1 activation along unperturbed S phase relies on replication firing *per se*. Taken together, these data support the conclusion that activation of DNA replication checkpoint is intrinsically linked to the DNA replication process.

Chk1 activity level in S phase is exquisitely sensitive to replication stress stringency

We next carefully assessed how replication stress affects Chk1 activity in S-phase cells. As already mentioned, we observed that Chk1 sensor phosphorylation level during normal S phase (FRET dynamic range of 20-30%) could be rapidly increased upon stringent RS conditions (Δ FRET ~60% at 1 μ M Aphi) (**Figure 3A**), but previous work reported that a mild RS could be insufficient to trigger Chk1-dependent DNA replication checkpoint (Koundrioukoff et al., 2013). To further explore this point, Chk1 sensor phosphorylation was recorded upon

incremental mild to stringent RS induced using a broad range of aphidicolin doses, from 0.03 to 2 μ M. As displayed on **Figure 3B**, Chk1 sensor phosphorylation almost immediately increased at any dose used, even at the lowest one, and reached a near steady state after a few dozen minutes. We determined that Chk1 signal at near-steady state was tightly correlated to the strength of RS (**Figure 3C**). Importantly, in any condition tested, S-phase Chk1 phosphorylation levels were rapidly reversed to a G1-like state upon Chk1 inhibition. Investigating local Chk1 activation at chromatin provided similar observations with H2B-Chk1 steady state phosphorylation levels increasing relative to RS strength (**Figure S5**). We further assessed whether the ability to activate Chk1 upon RS might be differentially modulated along S phase progression but observed identical sensor phosphorylation kinetics in early, mid and late S with a maximum FRET signal reached \sim 4min after drug addition (**Figure S6**).

We conclude that, at least in non-transformed RPE-1 cells, S-phase Chk1-dependent DRC signaling is activated linearly upon incremental RS. We hypothesize that the linear relationship between Chk1 phosphorylation level and RS strength might be related to the length of single strand DNA tracks generated upon uncoupling between replicative polymerases and helicase.

Chk1 profiles from G2 onset support the temporal uncoupling of DNA replication and G2-specific DNA processing mechanisms

We next addressed Chk1 regulation over time during cell cycle resumption upon RS. Using phase contrast microscopy, we first observed upon a broad range of aphidicolin doses that entry into mitosis of asynchronously growing cells was delayed in a dose-dependent manner but only after a reproducible lag period of \sim 2.5 hours, which fit with mean G2 phase duration in RPE-1 cells (**Figure S7A**). Even under the most stringent RS conditions, a small subset of cells reached mitosis, and sporadic cell divisions could be observed up to $>$ 20h following 2 μ M aphidicolin addition (**Figure S7A**). To analyze cell cycle resumption in more details, we performed single cell tracking following moderate to stringent RS (aphi. doses at 0.3, 0.5 and 1

μM) and used mRuby-PCNA marker to identify cell cycle phase transitions. Cells that entered into G2 phase even shortly before aphidicolin addition did not display any perturbation in the kinetics of mitotic entry (data not shown). Conversely, most S-phase cells (PCNA+ foci) were delayed or arrested upon aphidicolin treatment, and the proportion of cells that reached S/G2 transition, defined by stereotypical late S PCNA foci pattern disappearance, decreased with RS strength (**Figure S7B**). Among the cells that reached S/G2 transition upon RS, the majority remained arrested in G2 and only a subset entered into mitosis and divided during the time of recording (**Figure S7C**). Importantly, no cell entered into mitosis in absence of a G2 phase.

Rapid Chk1 inactivation was reproducibly taking place at the S/G2 transition upon RS conditions (**Figure 4A**) and closely correlated with the kinetics of PCNA foci disappearance (**Figure S8A**). We found that, while the time needed for Chk1 inactivation at the S/G2 transition increases with RS strength as expected, the rate of Chk1 activity decrease is closely similar between control and aphidicolin-treated cells (**Figure S8B & C**), suggesting that the joint inactivation of Chk1 and the disappearance of PCNA foci occurring upon aphidicolin treatment reflects the termination of bulk DNA replication. Importantly, we confirmed that PCNA foci disappearance upon RS corresponds to a genuine S/G2 transition by recording endogenous Plk1 expression, using a K-In Venus-Plk1 RPE-1 cell line. Indeed, expression of Plk1 that is stimulated at S/G2 transition (Akopyan et al., 2014) was taking place shortly after PCNA foci disassembly with relative kinetics undistinguishable between control and upon RS conditions (**Figure S8D**).

Unexpectedly, single-cell tracking revealed cell-to-cell heterogeneous Chk1 activity profiles during the next G2 phase. First, among cells that successfully reached mitosis and divided, three different Chk1 profiles could be defined: (i) no significant Chk1 reactivation up to mitosis, (referred to as 'no Chk1 reactivation'), (ii) a transient reactivation that ended-up shortly before entry into mitosis ('transient Chk1 reactivation'), and (iii) a Chk1 reactivation

profile that persisted up to NEBD ('persistent Chk1 reactivation') (**Figure 4A and 4B**). Second, among cells that remain arrested in G2, we observed either no Chk1 reactivation or a transient reactivation rapidly initiated after S/G2 transition for up to ~5h duration (**Figure 4C**). Chk1 reactivation in G2 phase was not restrained to non-transformed RPE-1 cells and was also observed in osteosarcoma U2OS cells during cell cycle resumption upon RS (**Figure S9**).

Among dividing cells, the three different Chk1 activity profiles observed during G2 appeared related to RS strength. Indeed, the fraction of cells exhibiting a 'no Chk1 reactivation' profile up to mitosis onset progressively decreased to the benefit of the two others upon increasing aphidicolin doses (from 50% at 0.3 μ M to 15% at 1 μ M aphidicolin), and upon 1 μ M aphidicolin most cells entered mitosis despite persistent Chk1 activity (**Figure 4D**), which represent a subset of ~2.5% of the overall cell population (**Figure S7C**).

We further determined that among dividing cells, the three different Chk1 activity profiles observed during G2 appeared related to the time spent in S phase upon aphidicolin addition before the S/G2 transition. Indeed, 'no Chk1 reactivation' profile was predominant in the first wave of cells that reached G2 phase upon RS (**Figure 4E and S10, green lanes**), while cells that exhibited both Chk1 'reactivation' profiles tend to have spent a longer time in S phase (**Figure 4E and S10, red and purple lanes**). Notably, cells that were arrested in G2 phase exhibited the longest resident times in S phase upon aphidicolin treatment.

We conclude that higher exposure to replication stress in S phase, either through higher doses of aphidicolin or by increased time spent in S phase upon aphidicolin treatment, directly translates to a higher probability of Chk1 reactivation in G2 phase.

p53 drives permanent arrest and silencing of the ATR/Chk1 pathway in G2 phase

As described above, cells that have spent the longest time in S phase upon RS arrested in G2 phase (**Figure 4E and S10**), with either a transient Chk1 reactivation for up to ~5h or no reactivation related to the resident time in S phase (**Figure 4E and S10, "no M-phase"**,

purple and grey lanes). RPE-1 cells in G2 phase can irreversibly exit cell cycle upon DNA damage insult, which is primarily determined by ATR/Chk1 activation and relies on induction of p53 (Bunz et al., 1998; Hastak et al., 2008; Krenning et al., 2014). Suspecting the time-dependent distribution of G2 phase Chk1 profiles might be partially driven by the kinetics of p53 activation upon RS, we tracked individual cells in a p53 knockdown context. Depletion of p53 caused the majority of cells that reached S/G2 transition to enter into mitosis during the time of recording (from 50% of cells in siCtrl condition to 80% upon p53 depletion) (**Figure 5A**), consistent with previous report showing a p53/p21-dependent G2 arrest following RS in S phase (Barr et al., 2017). Remarkably, this was accompanied by a massive and specific increase of G2 cells exhibiting Chk1 reactivation, whereas the percentage of G2 cells with no Chk1 reactivation remained constant (**Figure 5B**). We also performed the opposite experiment by treating cells with high dose of aphidicolin (1 μ M) to maximize Chk1 reactivation in G2 phase, then activating p53 using the drug Nutlin-3a (Vassilev et al., 2004). Around ~4h after Nutlin-3a treatment, entry into mitosis was completely inhibited, consistent with (Krenning et al., 2014). More importantly, cells in S phase upon Nutlin-3a treatment massively did not re-activated Chk1 in the subsequent G2 phase. (**Figure 5C**). Finally, we assessed p53 levels in a G2 subpopulation upon RS by treating hTERT-RPE-1 WT cells with 0.5 μ M aphidicolin for increasing durations, before incubation with EdU to label S phase cells, fixation and p53 staining. G2 phase cells were identified based on the intensity of DAPI signals and EdU-negative staining. As represented in **Figure 5D**, increasing incubation time with aphidicolin resulted in higher expression levels of p53 in the following G2 phase. Together, these results suggest that during cell cycle resumption and related to the duration and strength of RS before S/G2 transition, cells bifurcate between two decisions at the S/G2 transition: No or low initial p53 induction and the competence to re-activate Chk1 in G2 phase, or high initial p53 induction promoting Chk1 activity silencing in early G2 phase and cell cycle exit.

During cell cycle resumption upon RS, a subset of cells overcome active checkpoint signaling to enter mitosis

We were intrigued that a limited subset of G2 cells exhibited a 'persistent Chk1 reactivation' profile up to early mitosis (NEBD), which suggest that some cells might overcome DNA damage response (DDR). We found that the G2 phase duration in the overall cell population is significantly longer following RS induction in S phase (**Figure 6A**), and notably in the subset of cells exhibiting either Chk1 reactivation profiles during G2 (**Figure 6B**), suggesting that Chk1 reactivation might delay entry into mitosis. To assess the contribution of Chk1 activity in G2 phase to functional checkpoint mechanisms, Chk1 or ATR inhibitors were added at a set time during recording and the effect on G2 duration and Chk1 sensor phosphorylation levels monitored over time. In normal conditions, ATR inhibition laid no effect on G2 phase duration, while the addition of Chk1 inhibitor induced a minimal (~20 min median) shortening (Mean G2 duration CT: 180 min; Chk1i: 160 min), possibly reflecting residual Chk1 activity during non-perturbed G2 phase (**Figure S11A**). More importantly, upon replication stress both ATR and Chk1 inhibition immediately suppressed Chk1 sensor phosphorylation, which was rapidly followed by commitment to mitosis in all cells analyzed (**Figure 6C and S11B**). Quantification of the time intervals between the addition of Chk1i (or ATRi) versus DMSO (Ctrl) and mitotic entry indicates that inhibition of ATR/Chk1 signaling triggered a premature entry into mitosis (**Figure 6D and S11C**). Chk1 inhibition could force mitotic entry up to 7h after G2 onset, following which no more Chk1 activity could be detected in any persistently arrested G2 cell (**Figure S11D**), suggesting that Chk1 inhibition can trigger mitotic entry during the window of time when residual activity persists. Notably, we observe a direct correlation between the level of Chk1 activity in G2 at drug addition and the time needed for the cell to enter mitosis upon Chk1 inhibition (**Figure S11E**), further supporting an active role of ATR/Chk1 signaling during G2 to prevent unscheduled mitosis upon RS. Together, we conclude that upon RS a subset of cells can override active ATR/Chk1 signaling to achieve mitotic

entry, providing to our knowledge the first direct observation of checkpoint adaptation in human cells.

Dividing cells following Chk1 reactivation in G2 arrest in the next G1 phase

To analyze the fate of daughter cells following or not Chk1 reactivation during G2 phase, dividing cells upon mild replication stress (aphidicolin 0.5 μM) were followed over the next cell cycle, and both mRuby-PCNA staining and Chk1 activity used to identify cells re-entering into S phase. No second mitosis was observed during long-term recording (48h), certainly as a consequence of the continuous presence of aphidicolin that will affect the whole duration of the second S phase. Re-entry into S phase during the second cell cycle was frequently observed among daughters cells originating from a mother cell without Chk1 reactivation during G2 phase. Conversely, the majority of daughter cells originating from a mother cell exhibiting Chk1 reactivation during G2 phase, whether transient or persistent, remained permanently arrested in G0/G1 (**Figure 6E**). Together, our data suggest that Chk1 reactivation during G2 underlines DNA processing/repair mechanisms as a consequence of perturbed S phase upon RS that favor proliferation withdrawal in the next G1 phase.

Discussion

In this study, we developed a specific FRET-based Chk1 phosphorylation sensor and sought to characterize Chk1 activity fluctuations in asynchronous individual cells during unperturbed growth conditions and upon replication stress. It has been previously proposed that the ATR/Chk1 pathway plays a role in the temporal coupling of DNA replication with entry into mitosis by enabling the expression and activation of several mitotic inducers from the S/G2 transition (Lemmens et al., 2018; Saldivar et al., 2018). Accordingly, we demonstrate that the kinetics of Chk1 activation during a normal cell cycle tightly matches the spatio-temporal appearance and disappearance of PCNA positive replication foci, and provide evidence that endogenous Chk1 activity is sustained by the constant activation of new replication origins along S phase.

Upon RS conditions that are still compatible with cell growth (Supplemental Figure 7A), the slowing down of replication forks results in a prolonged S phase that might possibly overlaps with the G2 phase up to mitosis onset to achieve the completion of DNA replication, consistent with the persistence of some replication intermediates at CFSs up to mitosis (Debatisse and Rosselli, 2019; Mankouri et al., 2013). Contrary to this speculative model, our results show that a several hours long G2 phase is reproducibly taking place in each cell during cell cycle resumption upon RS. Exit from prolonged S phase is characterized by the complete disappearance of late S PCNA foci pattern tightly associated with marked Chk1 inactivation, whose kinetics is closely similar to the one during unperturbed cell cycle. Importantly, we show that this transition allows the accumulation of mitotic inducers, such as Plk1, up to mitotic entry. Hence, it supports the notion that their expression is controlled in a similar way by ATR/Chk1 signaling during normal and upon RS growth conditions.

Unexpectedly, live cell recordings reveal that following its inactivation at the S/G2 transition, Chk1 re-activates in a subset of cells during G2, whose proportion is related to RS strength during preceding S phase. Importantly, no S phase-like PCNA foci pattern could be detected in any G2 phase cell as Chk1 re-activated. Each PCNA foci detectable in S phase by

widefield microscopy is constituted of multiple active replication forks (Chagin et al., 2016). While we cannot completely rule out the persistence in G2 phase of some isolated active forks, Chk1 reactivated in G2 cells to a similar level (Δ FRET ~20%) as during non-perturbed S phase, when thousands of replication forks are simultaneously active at any time (Chagin et al., 2016). Hence, we speculate that Chk1 re-activation is not sustained by active replication forks but by DNA processing/repair mechanisms timely activated during G2 phase. This will suggest the existence of temporal uncoupling between bulk DNA replication in S phase and DNA processing/repair mechanisms specific to G2 phase.

While the underlying mechanisms sustaining Chk1 re-activation in G2 phase will require further investigation, two possible post-replicative DNA repair processes could be involved: (i) resection/filling of ssDNA gaps left behind replication forks (Lopes et al., 2006; Zellweger et al., 2015) or (ii) homology-directed repair of collapse forks following double strand breaks (DSBs) induction (Minocherhomji et al., 2015; Petermann et al., 2010b). Supporting the first hypothesis, ssDNA gaps were shown in budding yeast to activate the Rad53-dependent checkpoint in G2 phase, and the post-replicative repair of those structures can be delayed in G2 phase without major impact on replication dynamics, suggesting uncoupling of this repair process with fork progression (Callegari et al., 2010; Daigaku et al., 2010; Hishida et al., 2009; Karras and Jentsch, 2010). Also, DSBs are only induced after many hours upon RS in human cells and might be strongly restrained up to the G2/M transition (Minocherhomji et al., 2015; Petermann et al., 2010b).

We demonstrate that Chk1 re-activation during G2 phase underline functional signaling preventing a premature entry into mitosis. Strikingly, a limited subset of cells reaches mitosis despite the persistent high Chk1 activity. Cells exhibiting 'transient' or 'persistent Chk1 re-activation' profiles along G2 arrest in the next G1 phase, in sharp contrast to cells with a 'no reactivation' profile that progress further into S phase, suggesting the transmission of altered DNA structures to the cell progeny that activate DNA damage response in G1. Our observation that non-transformed checkpoint proficient cells can enter into mitosis despite high Chk1

activity provides the first direct evidence of checkpoint override or 'adaptation' to replication stress in human cells. Notably, we observed no sign of Chk1 activity attenuation up to mitotic entry that might have contributed to promote the transition to mitosis, agreeing with the notion of checkpoint adaptation (Toczyski et al., 1997) that the checkpoint signal must be present at the time cell cycle arrest is alleviated. We estimated that checkpoint adaptation phenotype represent ~1 to 3% of the overall cell population from 0.3 to 1 μ M aphidicolin treatment, respectively. Checkpoint adaptation was initially identified in yeast following prolonged G2 arrest in the presence of unrepairable DNA damage (Sandell and Zakian, 1993), and more recently in haploid strains having an extra copy of one chromosome, which favors DNA replication defects (Blank et al., 2015). Mimicking replication defects with low doses of MMS (methyl methanesulfonate) led to as many as 40% of WT strain exhibiting checkpoint adaptation, indicating that it might be a frequent phenotype, at least in unicellular organisms. Consistent with our observations, the majority of these cells rapidly cease to proliferate within one or two cell divisions (Blank et al., 2015).

In both yeast and human cells, checkpoint adaptation to DSBs was proposed to depend on Plk1 (Cdc5 in *S. cerevisiae*) (Liang et al., 2014; Pellicioli et al., 2001; Syljuasen et al., 2006; Toczyski et al., 1997), whose activity is necessary for commitment to mitosis (Gheghiani et al., 2017). Plk1 induces the degradation of Claspin upon mitotic entry, a mediator for ATR-dependent Chk1 activation (Mailand et al., 2006; Mamely et al., 2006; Peschiaroli et al., 2006). Also, Plx1 (Plk1 homologue) phosphorylation of Claspin allows mitotic entry despite persistent fork stalling in *Xenopus* egg extracts (Yoo et al., 2004). Together, these data makes Plk1 the prime candidate to drive mitotic entry despite persistent Chk1 activation up to the G2/M transition. During a normal cell cycle, Plk1 activates ~40 minutes before NEBD and promotes Cyclin B1/Cdk1 activation ~20 minutes later (Gavet and Pines, 2010b, 2010a; Gheghiani et al., 2017), while it is currently unknown whether those activation kinetics remain unchanged upon incremental RS.

Replication stress is a major source of genetic instability in cancer cells (Burrell et al., 2013) and DRC activation was proposed to act early on as a barrier to tumorigenesis (Bartkova et al., 2005; Halazonetis et al., 2008; Hills and Diffley, 2014). Deciphering the spatio-temporal regulation and complex interplay between anti- and pro-mitotic signaling pathways will contribute to better understand how genetic alterations can be initially established in checkpoint-proficient non-tumoral cells.

Experimental procedures

Cell culture, reagents, siRNA and antibodies

hTert-RPE-1 WT (ATCC), hTert-RPE-1 mRuby-PCNA/+ Plk1-mVenus/+, hTert-RPE-1 mRuby-PCNA/+, a gift from J. Mansfeld's laboratory, and derivatives were maintained in DMEM/F12 medium (Life Technologies) supplemented with 10% FCS, 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin. HeLa and U2OS (ATCC) cells were maintained in DMEM high glucose medium (Life Technologies), supplemented with 10% FCS, 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin.

Reagents

Chemical compounds dissolved in DMSO were used at the following concentrations unless stated otherwise: CHIR-124 200nM and KU55933 10 µM (Axon MedChem), Etoposide 5 µM, XL-413 15 µM and AZD6738 1µM (Selleckchem), PV1019 5 µM or 25 µM, Nutlin-3a 10 µM, Cdk1/2 inhibitor III 600 nM and CVT313 5 µM (Calbiochem), Hydroxyurea 1 mM, Thymidine 1 mM and Aphidicolin from 0.03 to 2 µM (Sigma-Aldrich), RO3306 5 µM (MedChemExpress).

Primary antibodies used were p53 (DO-1), Chk1 (G-4) and actin (C4) from Santa Cruz biotechnology, Chk2 (1C12, #3440), Chk1 pS296 (#2349), Chk1 pS345 (#2341), Chk2 pS516 (#2669) and Chk2 pT68 (C13C1,#2197) from Cell signaling. Secondary antibodies were goat anti-rabbit IgG-HRP (A120-201P, Bethyl laboratories), goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa-Cruz biotechnology), Donkey anti-mouse IgG-Alexa 488 (A21202, Invitrogen).

Plasmid constructs and generation of stable cell lines

To generate the FRET-based Chk1 phosphorylation sensor used in this publication, coding sequences for YPet (Nguyen and Daugherty, 2005), FHA2 domain (residues 572-730) from ScRad53 (NM_001183967) and mTurquoise2 (Goedhart et al., 2012) tagged in C-terminal with SV40 NLS sequence (SPKKKRKVE) were cloned in that order on a pIRES-puro2

backbone (Clontech). Coding sequences for YPet and FHA2 domain originate from (Gheghiani et al., 2017), while mTurquoise2 sequence originates from a mTurquoise2-N1 plasmid (Addgene #54843). A sequence for Chk1 phosphorylation derived from (Blasius et al., 2011) or a non-phosphorylatable version (Thr to Ala mutation) were then inserted between FHA2 domain and mTurquoise2. To generate chromatin targeted H2B-Chk1 sensor, H2B coding sequence was inserted upstream of YPet in pIRES-puro2 backbone. Complete sequences are available on request.

To generate hTert-RPE-1 WT or hTert-RPE-1 mRuby-PCNA/+ cell lines stably expressing Chk1 sensor or its derivatives, 10^6 cells were electroporated with 10 μ g of the plasmid constructs using the Amaxa Cell Line Nucleofector kit V (Lonza) on an Amaxa Nucleofector II device (Lonza, program X-001). Transfected cells were selected 48h later with 0.5 – 2 μ g/mL puromycin or alternatively YFP and CFP double positives cells were first sorted on a BD FACS Aria III (BD Bioscience) before drug selection. After a minimum of two weeks of selection, isolated clones were picked up using cloning discs (Sigma) and amplified before characterization.

To generate U2OS cells stably expressing Chk1 sensor, transfection was performed with Jet PRIME (Polyplus Transfection) with a 150 000 cells/1 μ g DNA/4 μ l reagent ratio, before selection of isolated clones as described above. For transient expression assays in HeLa cells (Figure S3), 30 000 cells/well were seeded on 8-well glass bottom plates (μ -Dish, IBIDI) on J-2 and transfected using Jet PRIME reagent (Polyplus Transfection) according to manufacturer's instructions on J-1 before imaging.

Time-lapse imaging

RPE-1 Cells were seeded at least 24h prior to imaging in phenol red-free DMEM/F12 medium (Life Technologies), supplemented with 5% FCS, 100U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, in either 8-well glass-bottom plates (μ -Dish, IBIDI) or in 35mm glass-bottom dishes (Fluorodish, World Precision Instruments), both pre-coated with fibronectin (Sigma)

at 1 μ g/cm². HeLa and U2OS cells were seeded in DMEM without phenol red, supplemented with 5% FCS and antibiotics. To avoid cellular stress, no medium change was performed in the 24h preceding imaging, except for siRNA experiments where medium was changed at least 1h before image acquisition. For all experiments (except on Fig. S6), live imaging was performed using an Eclipse Ti-e inverted microscope (Nikon) controlled by Metamorph software and equipped with Perfect Focus System, fast emission filter wheel (λ 10-3, Sutter), EMCCD camera (iXon Ultra 888, Andor) and LED-based illumination system (Spectra X-light engine, Lumencor). A Plan Fluor 40x/NA 1.30 oil immersion lens was used for all experiments, except on Fig 1D, 2A, S4E and S4F which were performed using a higher magnification 60x/NA 1.4 Plan Apochromat oil immersion lens. For FRET imaging assays, filters used (Chroma Technology) were ET434/21x excitation filter, 69008bs dichroic mirror, ET470/24m and ET535/30m emission filters for CFP and YFP channels, respectively. For mRuby-PCNA imaging, filters used were ET550/15x excitation filter, T565lp dichroic mirror and ET600/50m emission filter. During recordings, cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

For phase contrast imaging assays (Fig. S7A), RPE-1 cells were seeded on 12-well tissue culture plates in DMEM/F12 medium without phenol red, supplemented with 10% FBS and antibiotics, then recorded 24h later. Analyses of the kinetics of mitotic entry were performed as described in (Gheghiani et al., 2017).

Timelapse on Fig S6 was acquired on a Spinning Disk microscope based on a Yokugawa CSU-W1 head mounted on the lateral port of Nikon Eclipse Ti-2 inverted microscope equipped with a sCMOS PRIME 95B camera (Photometrics) and piloted by Metamorph Software. CFP (FRET) and mRuby (PCNA) were respectively excited with a 445nm and 515nm laser source.

Immunofluorescence and EdU incorporation assays

hTert-RPE-1 wild-type cells were seeded on glass coverslips pre-coated with fibronectin (Sigma) at 1 μ g/cm² on J-1. Cells were washed once with PBS then fixed for 6 min at -20°C in methanol before being washed three times in PBS, then blocked 45 min in PBS+BSA 3%. Coverslips were incubated 1h with primary antibody in PBS + BSA 3%, washed three times in PBS + 0.1% tween (PBST) and incubated one hour with Alexa 488 secondary antibody (Invitrogen). Coverslips were washed 3x in PBST then mounted with ProLong Gold AntiFade reagent with DAPI (Invitrogen).

EdU incorporation assays, 10 μ M EdU for 60 min before fixation, were done using Click-It Plus EdU imaging Kit (Thermofisher) according to manufacturer's instructions.

siRNA transfection assays

For RNAi assays, 75 000 RPE-1 cells were seeded on J-3 in 35 mm glass-bottom dishes or in 6-well plates. On J-2, cells were transfected with siRNA pool targeting p53, HSS186390, HSS186391 and HSS110905 10nM each (Thermofisher), or ON-TARGET plus Non-targeting siRNA pool, D-001810 30nM (Dharmacon), using Dharmafect-1 reagent (Dharmacon). Live imaging assays or cell extractions were proceeded 48h later.

Western blotting

Cells were lysed in RIPA buffer (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% Sodium deoxycholate with complete EDTA-free protease inhibitor cocktail and anti-phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma-Aldrich). Protein quantification was performed in triplicate using BCA Protein Assay Kit (Thermofisher). Protein samples were separated on 4-15% Mini-Protean TGX precast gels (Bio-Rad). Western Blot images (16-bit) were acquired using an Amersham imager 600 (GE Healthcare) and quantified using ImageJ software (NIH).

Segmentation and tracking of cell nuclei

Segmentation: Cell nuclei were segmented using CFP excitation/YFP emission from NLS-tagged Chk1 sensor. After Gaussian blur filtering and rolling-ball background subtraction to smooth background noise, a Mexican-hat filter was applied to enhance individual objects boundaries. Resulting images were thresholded based on fluorescence intensity to isolate nuclei, and further processed with a distance-based watershed to allow splitting of under-segmented nuclei.

Frame to frame nuclei matching: Nuclei detected in frame n were matched with the ones detected in frame $n+1$ using a custom implementation of a Gale-Shapley algorithm for Fiji. Briefly:

- 1- For each objects (nuclei) in frame n , are listed all potential matches in frame $n+1$, ranked to maximize overlap area and/or minimize distance.
- 2- For each objects in frame $n+1$, are listed all potential matches in frame n , ranked to maximize overlap area and/or minimize distance.
- 3- Ranked preference lists are used to optimize matching of objects from frame n with objects with frame $n+1$ (Gale-Shapley algorithm).

Any remaining non-matched objects in frame $n+1$ are then used to identify potential over-segmentation and/or cytokinesis events by comparing between the two successive frames distance and area of objects involved in putative splitting events. If an over-segmentation is indeed detected in frame $n+1$, objects in frame n are fused together. Conversely, any non-matched objects in frame n could reflect the under-segmentation of nuclei in frame $n+1$. This possibility is assessed by comparing between the two successive frames areas of all objects involved in the putative fusion event. If confirmed, detection of under-segmentation results in the automated splitting of the under-segmented nuclei in frame $n+1$ using marker-controlled watershed. This approach allows to automatically segment and track next to all nuclei during long-term live imaging assays of high-density populations.

Measure pixel intensities: Following segmentation and tracking of each single nuclei over time, original raw images were processed with a carefully adjusted Rolling Ball background subtraction algorithm and pixel intensities were measured over time for all detected nuclei. All resulting data is saved in tables that can be further processed using custom python pandas scripts.

Classification of cell cycle phases and G2 phase Chk1 activity profiles

Nuclear mRuby-PCNA mean and max intensity over time were used to automatically identify cell cycle transitions:

G1/S transition: Mean PCNA expression is minimal in G1 and starts to increase at S phase transition (Zerjatke et al., 2017). To identify this inflexion point, we used a broken-stick approach by comparing slopes before and after all time points. To this end, for each time point, a local linear regression was calculated using all measurements 2.5h before and another one using all measurements 2.5h after. G1/S transition was determined as the time point that minimizes the calculated angle between the two linear regressions.

S/G2 transition: at the end of S phase, PCNA forms broad and very bright foci that disappear at G2 onset. This transition can be detected by extreme variations in the measured max mRuby-PCNA intensity in the nucleus. Two different algorithms were used: for asynchronous untreated cells, G2 onset was defined as the first local minimum following the highest measured peak in mRuby-PCNA max intensity in S phase. For cells treated with aphidicolin, a broken-stick approach was used to detect the inflexion point, as described above.

NEBD: At mitosis, the nuclear envelope is disassembled and soluble nuclear proteins are diluted in the whole volume of the cell. By measuring mRuby-PCNA signal over time, this is easily detectable by a sudden drop of mean intensity. Hence, mean mRuby-PCNA intensity was compared between all successive time point, and NEBD was defined as the time point when the maximal mean intensity drop occurred.

Automated classifications were systematically double-checked. An interface in Fiji was developed to manually review each cell and check for consistency between automatically determined cell cycle transitions and foci appearance/disappearance observed by eyes. Classification of G2 Chk1 activity profiles was performed manually using the same interface, this time to systematically plot and review FRET variations during G2.

Automated PCNA foci counting

To automatically count nuclear PCNA foci over time, images were processed with a Laplacian of Gaussian filter followed by local maxima detection to identify PCNA foci.

Segmentation and identification of G2 cells by immunofluorescence

Cell nuclei segmentation using DAPI fluorescent signals was processed as described for NLS-tagged Chk1 sensor cells. DAPI intensities per nuclei were measured on raw images. To discriminate between G1, S and G2 cells, DAPI intensities in the absence of aphidicolin treatment were plotted against mean EdU signal to identify a low DAPI EdU⁻ subpopulation (G1), a EdU⁺ subpopulation (S) and a high DAPI EdU⁻ subpopulation (G2). The identified DAPI thresholds separating G1, S and G2 cells were then used in different conditions to identify EdU negative high DAPI (G2) cells.

Data visualization

Data were plotted using GraphPad Prism or with custom python scripts relying on pandas for data manipulation and matplotlib or seaborn for data visualization. All scripts are available on request. Ratiometric FRET images on Fig 1C, 2A, 3A and S9A were generated using Fiji software by pixel-wise division of CFP over YFP images. An image mask was computed from the segmented nuclei and all pixels outside were defined as 0 (black). Ratiometric images are displayed using Fiji *mpl inferno* Look-Up Table.

Author contributions

O.G conceived the project and designed experiments with V.L. V.L performed experiments, M.P optimized siRNA conditions and J.PM helped establish stable cell lines. O.G and V.L wrote the manuscript.

Acknowledgements

We thank all lab members for critical reading of the manuscript. This project was funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE13-0011-03). V.L was supported by PhD fellowships from IDEX Paris-Saclay Initiative Doctorale Interdisciplinaire and Ligue Nationale Contre le Cancer.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Bibliography

- Akopyan, K., Cascales, H.S., Hukasova, E., Saurin, A.T., Mu, E., Jaiswal, H., Medema, H., Lindqvist, A., Hollman, D.A.A., Kops, G.J.P.L., et al. (2014). Assessing kinetics from fixed cells reveals activation of the mitotic entry network at the S/G2 transition. *Mol. Cell* 53, 843–853.
- Alver, R.C., Chadha, G.S., Gillespie, P.J., and Blow, J.J. (2017). Reversal of DDK-Mediated MCM Phosphorylation by Rif1-PP1 Regulates Replication Initiation and Replisome Stability Independently of ATR/Chk1. *Cell Rep.* 18, 2508–2520.
- Baranovskiy, A.G., Babayeva, N.D., Suwa, Y., Gu, J., Pavlov, Y.I., and Tahirov, T.H. (2014). Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin. *Nucleic Acids Res.* 42, 14013–14021.
- Barr, A.R., Cooper, S., Heldt, F.S., Butera, F., Stoy, H., Mansfeld, J., Novák, B., and Bakal, C. (2017). DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nat. Commun. Publ. Online* 20 March 2017; | Doi10.1038/Ncomms14728 30, 39–49.
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864–870.
- Berezney, R., Dubey, D.D., and Huberman, J.A. (2000). Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma* 108, 471–484.
- Bjursell, G., and Reichard, P. (1973). Effects of thymidine on deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 248, 3904–3909.
- Blank, H.M., Sheltzer, J.M., Meehl, C.M., and Amon, A. (2015). Mitotic entry in the presence of DNA damage is a widespread property of aneuploidy in yeast. *Mol. Biol. Cell* 26, 1440–1451.
- Blasius, M., Forment, J. V., Thakkar, N., Wagner, S.A., Choudhary, C., and Jackson, S.P. (2011). A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome Biol.* 12, R78.
- Buisson, R., Boisvert, J.L., Benes, C.H., and Zou, L. (2015). Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. *Mol. Cell* 59, 1011–1024.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J., Sedivy, J., Kinzler, K., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage. *Science (80-.)*. 282, 1497–1501.
- Burrell, R.A., McClelland, S.E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M.C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S.M., Gronroos, E., et al. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494, 492–496.
- Callegari, A.J., Clark, E., Pneuman, A., and Kelly, T.J. (2010). Postreplication gaps at UV lesions are signals for checkpoint activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8219–8224.
- Chagin, V.O., Casas-Delucchi, C.S., Reinhart, M., Schermelleh, L., Markaki, Y., Maiser, A., Boliu, J.J., Bensimon, A., Fillies, M., Domaing, P., et al. (2016). 4D Visualization of replication foci in mammalian cells corresponding to individual replicons. *Nat. Commun.* 7, 11231.
- Ciardo, D., Goldar, A., and Marheineke, K. (2019). On the interplay of the DNA replication program and the Intra-S phase checkpoint pathway. *Genes (Basel)*. 10.
- Courbet, S., Gay, S., Arnoult, N., Wronka, G., Anglana, M., Brison, O., and Debatisse, M. (2008). Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* 455, 557–560.
- Crncec, A., and Hochegger, H. (2019). Triggering mitosis. *FEBS Lett.* 593, 2868–2888.
- Daigaku, Y., Davies, A.A., and Ulrich, H.D. (2010). Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. *Nature* 465, 951–955.
- Daigh, L.H., Liu, C., Chung, M., Cimprich, K.A., and Meyer, T. (2018). Stochastic Endogenous Replication Stress Causes ATR-Triggered Fluctuations in CDK2 Activity that Dynamically Adjust Global DNA Synthesis Rates. *Cell Syst.* 7, 17–27.e3.
- Debatisse, M., and Rosselli, F. (2019). A journey with common fragile sites: From S phase to telophase. *Genes Chromosom. Cancer* 58, 305–316.
- Dimitrova, D.S., and Gilbert, D.M. (2000). Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis. *Nat. Cell Biol.* 2, 686–694.
- Eykelenboom, J.K., Harte, E.C., Canavan, L., Pastor-Peidro, A., Calvo-Asensio, I., Llorens-Agost, M., and Lowndes, N.F. (2013). ATR Activates the S-M Checkpoint during Unperturbed Growth to Ensure Sufficient Replication Prior to Mitotic Onset. *Cell Rep.* 5, 1095–1107.
- Gavet, O., and Pines, J. (2010a). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev. Cell* 18, 533–543.
- Gavet, O., and Pines, J. (2010b). Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J. Cell Biol.* 189, 247–259.
- Gheghiani, L., and Gavet, O. (2016). Spatiotemporal investigation of phosphorylation events during cell cycle progression. *Methods Mol. Biol.* 1342, 157–171.
- Gheghiani, L., Loew, D., Lombard, B., Mansfeld, J., and Gavet, O. (2017). PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis. *Cell Rep.* 19, 2060–2073.
- Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.A., Van Weeren, L., Gadella, T.W.J., Royant, A., Gadella Jr., T.W., et al. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* 3, 751.
- Goldstone, S., Pavey, S., Forrest, A., Sinnamon, J., and Gabrielli, B. (2001). Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene* 20, 921–932.
- Goto, H., Natsume, T., Kanemaki, M.T., Kaito, A., Wang, S., Gabazza, E.C., Inagaki, M., and Mizoguchi, A. (2019). Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 132.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. (2008). An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science (80-.)*. 319, 1352–1355.
- Hastak, K., Paul, R.K., Agarwal, M.K., Thakur, V.S., Amin, A.R.M.R., Agrawal, S., Sramkoski, R.M., Jacobberger, J.W., Jackson, M.W., Stark, G.R., et al. (2008). DNA synthesis from unbalanced nucleotide pools causes limited DNA damage that triggers ATR-CHK1-dependent p53 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6314–6319.
- Hills, S.A., and Diffley, J.F.X. (2014). DNA Replication and Oncogene-Induced Replicative Stress. *Curr. Biol.* 24, R435–R444.
- Hishida, T., Kubota, Y., Carr, A.M., and Iwasaki, H. (2009). RAD6-RAD18-RAD5-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light. *Nature* 457, 612–615.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C.M., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent

regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* *8*, 37–45.

Karnani, N., and Dutta, A. (2011). The effect of the intra-S-phase checkpoint on origins of replication in human cells. *Genes Dev.* *25*, 621–633.

Karras, G.I., and Jentsch, S. (2010). The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell* *141*, 255–267.

Koundrioukoff, S., Carignon, S., Técher, H., Letessier, A., Brison, O., and Debatisse, M. (2013). Stepwise activation of the ATR signaling pathway upon increasing replication stress impacts fragile site integrity. *PLoS Genet.* *9*, e1003643.

Krenning, L., Feringa, F.M., Shaltiel, I.A., vandenBerg, J., and Medema, R.H. (2014). Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence. *Mol. Cell* *55*, 59–72.

Laoukili, J., Kooistra, M.R.H., Brás, A., Kauw, J., Kerkhoven, R.M., Morrison, A., Clevers, H., and Medema, R.H. (2005). FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat. Cell Biol.* *7*, 126–136.

Laoukili, J., Alvarez, M., Meijer, L. a T., Stahl, M., Mohammed, S., Kleij, L., Heck, A.J.R., and Medema, R.H. (2008). Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3076–3087.

Lemmens, B., and Lindqvist, A. (2019). DNA replication and mitotic entry: A brake model for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* *218*, 3892–3902.

Lemmens, B., Hegarat, N., Akopyan, K., Sala-Gaston, J., Bartek, J., Hochegger, H., and Lindqvist, A. (2018). DNA Replication Determines Timing of Mitosis by Restricting CDK1 and PLK1 Activation. *Mol. Cell* *71*, 117–128.e3.

Leonhardt, H., Rahn, H.P., Weinzierl, P., Sporb, a, Cremer, T., Zink, D., and Cardoso, M.C. (2000). Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J. Cell Biol.* *149*, 271–280.

Liang, H., Esposito, A., De, S., Ber, S., Collin, P., Surana, U., and Venkitaraman, A.R. (2014). Homeostatic control of polo-like kinase-1 engenders non-genetic heterogeneity in G2 checkpoint fidelity and timing. *Nat. Commun.* *5*, 1–13.

Lopes, M., Foiani, M., and Sogo, J.M. (2006). Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol. Cell* *21*, 15–27.

Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* *455*, 119–123.

Mailand, N., Bekker-jensen, S., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Destruction of Claspin by SCF b TrCP Restrains Chk1 Activation and Facilitates Recovery from Genotoxic Stress. *Mol. Cell* 307–318.

Mamely, I., van Vugt, M.A., Smits, V.A.J., Semple, J.I., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R.H., and Freire, R. (2006). Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. *Curr. Biol.* *16*, 1950–1955.

Mankouri, H.W., Huttner, D., and Hickson, I.D. (2013). How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *EMBO J.* *32*, 2661–2671.

Maya-Mendoza, A., Petermann, E., Gillespie, D.A.F., Caldecott, K.W., and Jackson, D.A. (2007). Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *EMBO J.* *26*, 2719–2731.

Minocherhomji, S., Ying, S., Bjerregaard, V.A., Bursomanno, S., Aleiunaite, A., Wu, W., Mankouri, H.W., Shen, H., Liu, Y., and Hickson, I.D. (2015). Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature* *528*, 286–290.

Müller, G.A., Wintsche, A., Stangner, K., Prohaska, S.J., Stadler, P.F., and Engeland, K. (2014). The CHR site: Definition and genome-wide identification of a cell cycle transcriptional element. *Nucleic Acids Res.* *42*, 10331–10350A.

Naim, V., Wilhelm, T., Debatisse, M., and Rosselli, F. (2013). ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1008–1015.

Nguyen, A.W., and Daugherty, P.S. (2005). Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat. Biotechnol.* *23*, 355–360.

Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* *11*, 961–971.

Pellicoli, A., Lee, S.E., Lucca, C., Foiani, M., and Haber, J.E. (2001). Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol. Cell* *7*, 293–300.

Peschiaroli, A., Dorrello, N.V., Guardavaccaro, D., Venere, M., Halazonetis, T., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. *Mol. Cell* *23*, 319–329.

Petermann, E., Woodcock, M., and Helleday, T. (2010a). Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 16090–16095.

Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010b). Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Mol. Cell* *37*, 492–502.

Saldívar, J.C., Hamperl, S., Bocek, M.J., Chung, M., Bass, T.E., Cisneros-Soberanis, F., Samejima, K., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., et al. (2018). An intrinsic S/G2 checkpoint enforced by ATR. *Science (80-.)*. *361*, 806–810.

Sandell, L.L., and Zakian, V.A. (1993). Loss of a Yeast Telomere : Arrest, Recovery , and Chromosome Loss. *Cell* *75*, 729–739.

Sasi, N.K., Coquel, F., Lin, Y.L., MacKeigan, J.P., Pasero, P., and Weinreich, M. (2018). DDK Has a Primary Role in Processing Stalled Replication Forks to Initiate Downstream Checkpoint Signaling. *Neoplasia (United States)* *20*, 985–995.

Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C., Iii, J.R.Y., and Fang, G. (2008). Bora and the Kinase Activate Cooperatively Plk1 and Control Mitotic the Kinase Entry. *Science (80-.)*. *320*, 1655–1658.

Smits, V.A.J.J., Reaper, P.M., and Jackson, S.P. (2006). Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr. Biol.* *16*, 150–159.

Swift, L.H., and Golsteyn, R.M. (2014). Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 3403–3431.

Syljuasen, R.G., Jensen, S., Bartek, J., and 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.

Técher, H., Koundrioukoff, S., Nicolas, A., and Debatisse, M. (2017). The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat. Rev. Genet.* *18*, 535–550.

Thomas, Y., Cirillo, L., Panbianco, C., Martino, L., Tavernier, N., Schwager, F.F., Van Hove, L., Joly, N., Santamaria, A., Pintard, L., et al. (2016). Cdk1 Phosphorylates SPAT-1/Bora to Promote Plk1 Activation in *C. elegans* and Human Cells. *Cell Rep.* *15*, 510–518.

Toczyski, D.P., Galgoczy, D.J., Hartwell, L.H., and N, F.A. (1997). CDC5 and CKII Control Adaptation to the Yeast DNA Damage Checkpoint. *Cell* *90*, 1097–1106.

Tse, A.N., Rendahl, K.G., Sheikh, T., Cheema, H., Aardalen, K., Embry, M., Ma, S., Moler, E.J., Zhi, J.N., De Menezes, D.E.L., et al.

(2007). CHIR-124, a novel potent inhibitor of Chk1, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase I poisons in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* *13*, 591–602.

Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* (80-.). *303*, 844–848.

Vigneron, S., Sundermann, L., Labbé, J.C., Pintard, L., Radulescu, O., Castro, A., and Lorca, T. (2018). Cyclin A-cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry. *Dev. Cell* *45*, 637–650.

Wilhelm, T., Olziersky, A.-M., Harry, D., De Sousa, F., Vassal, H., Eskat, A., and Meraldi, P. (2019). Mild replication stress causes chromosome mis-segregation via premature centriole disengagement. *Nat. Commun.* *10*, 1–14.

Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. (2004). Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* *117*, 575–588.

Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *J. Cell Biol.* *208*, 563–579.

Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* *16*, 2–9.

Zerjatke, T., Gak, I.A., Kirova, D., Fuhrmann, M., Daniel, K., Gonciarz, M., Müller, D., Glauche, I., and Mansfeld, J. (2017). Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification. *Cell Rep.* *19*, 1953–1966.

Zhang, Y., and Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int. J. Cancer* *134*, 1013–1023.

MAIN FIGURES

Figure 1: Development of a FRET-based Chk1 phosphorylation sensor.

(A) Schematic outline of the FRET-based Chk1 phosphorylation sensor developed in the present work. Phosphorylation of Chk1 target sequence (P) leads to its recognition by FHA2 phospho-binding domain (green), resulting in a global conformation change and an increase of non-radiative energy transfer between CFP and YFP fluorescent variants upon CFP excitation wavelength.

(B) CFP/YFP ratio, hereafter referred as $1/\text{FRET}$, variations were recorded over time in asynchronous hTERT-RPE-1 cells transiently expressing Chk1 sensor. Aphidicolin ($1\ \mu\text{M}$) was added at the indicated timepoint before addition of Chk1 inhibitor (CHIR-124). Each single cell is plotted. Cells that responded to aphidicolin are represented in red, others in grey. $1/\text{FRET}$ values are normalized to last time point.

(C) Asynchronous hTERT-RPE-1 cells transiently expressing Chk1 sensor were treated with aphidicolin ($1\ \mu\text{M}$) at the indicated time point. Red arrow points to a cell exhibiting FRET response to aphidicolin treatment while grey arrows point to cells with no FRET variations.

(D) Representative galleries of cells in G1 (first lane), S (second lane) or G2 (third and fourth lanes) upon aphidicolin addition. Note that only the cell in S phase (PCNA foci positive) displays a $1/\text{FRET}$ variation. Bars, $10\ \mu\text{m}$.

Figure 2: Chk1 activity along S phase relies on replication origin firing.

(A-C) $1/\text{FRET}$ variations were recorded over time in asynchronous RPE-1 mRuby-PCNA/+ cells stably expressing Chk1 sensor.

(A) Asynchronous cells were synchronized *in silico* either to PCNA expression (S phase onset), PCNA foci disappearance (S/G2 transition) or nuclear envelope breakdown (NEBD) at mitosis. Each single cell is plotted and bold line represents mean values. In the top gallery, a representative cell undergoing S/G2 transition is displayed. Bar, $10\ \mu\text{m}$.

(B) Asynchronous cells were treated with Cdc7 inhibitor (XL-413 $15\ \mu\text{M}$) to prevent new origin firing. The subpopulation of cells in S phase at the time of inhibitor addition was sorted in three groups based on the time spent in S phase. Each single cell is plotted and bold line represents mean values. For each cell, S phase entry, as determined by PCNA expression, is represented as a vertical line. (A-B) $1/\text{FRET}$ values are normalized to G1 levels.

(C) Cells in S phase (t_0) were treated sequentially with Cdc7i (XL-413 $15\ \mu\text{M}$) then aphidicolin ($0.5\ \mu\text{M}$) or aphidicolin then Cdc7i, before addition of a Chk1 inhibitor (CHIR-124). Each single cell is plotted. $1/\text{FRET}$ values are normalized to after Chk1 inhibition.

Figure 3: Chk1 activity in S phase is highly sensitive to replication stress

(A) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with aphidicolin (1 μ M) either in S phase (left panel) or in G1 (right panel) and 1/FRET variations of each single cell plotted over time. For each cell, S phase entry is indicated as a vertical line. All values are normalized to 1/FRET value 15 minutes before S phase onset.

(B) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with increasing doses of aphidicolin at the indicated timepoint then treated with a Chk1 inhibitor (CHIR-124). Only cells that responded to Chk1 inhibitor addition are plotted. Each single cell is plotted and bold line represents mean values. In red, cells that were in S phase at t_0 and in purple, cells that entered S phase after aphidicolin addition. 1/FRET values are normalized to after Chk1 inhibition.

(C) Cells were treated as in (B) and 1/FRET values 45 minutes after aphidicolin addition are plotted for increasing doses of aphidicolin. Bold red lines represent median values. >100 cells per condition.

Figure 4: Chk1 reactivates in G2 phase cells during cell cycle resumption upon RS.

1/FRET variations were recorded over time in asynchronous RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells.

(A) Representative gallery of a cell treated in S phase with aphidicolin (1 μ M) and exhibiting Chk1 reactivation in the next G2 phase persisting up to mitotic entry (NEBD). Bar, 10 μ m.

(B and C) Cells treated with aphidicolin (0.5 μ M) in S phase were synchronized *in silico* to S/G2 transition (PCNA foci disappearance) and sorted into five classes: (B) Cells that entered mitosis displayed no (left), persistent (middle) or transient (right) Chk1 reactivation during G2 phase. (C) Cells that stayed arrested in G2 displayed transient (left) or no Chk1 reactivation (right). Each line represents a single cell and color changes according to cell cycle progression: blue in S phase, red in G2, dark green in mitosis and G1, orange as cells re-enter S phase in the next cell cycle. 1/FRET values are normalized to G2 onset levels.

(D) Proportions of each G2 phase Chk1 activity profile among cells reaching mitosis upon indicated aphidicolin doses. $n \geq 2$ for each condition.

(E) Cell cycle progression and pseudo-color Chk1 activity profiles during G2 phase of RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells treated with aphidicolin (0.3 μ M) at the indicated time (red vertical line). Each row represents a single cell. Cells are ordered according to the time of S/G2 transition. $n = 441$ cells.

Figure 5: p53 expression prevents Chk1 reactivation during G2 phase.

(A) Following or not p53 depletion (sip53) for 48 hours, RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with aphidicolin (0.3 μ M) at t_0 and recorded over time. Each row represents a single cell.

(B) In conditions described in (A), proportions of cells re-activating Chk1 in G2 phase among the subpopulations that stay arrested in G2 (left) or reaches mitosis (right) are displayed.

(C) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with aphidicolin (1 μ M) then by DMSO (left) or nutlin-3a (10 μ M, right). Each row represents a single cell. Respective Chk1 activity profiles in G2 phase are plotted as in Fig. 4E.

(D) HTert-RPE-1 WT cells were treated with aphidicolin (0.5 μ M) for the indicated time and incubated with EdU (10 μ M) for the last hour before fixation. G2 cells were identified by the intensity of DAPI signal and absence of EdU staining. The nuclear levels of p53 signal are displayed. An arbitrary threshold was defined based on the nuclear levels of p53 signal in 90% of control G2 cells. Percent of p53-positive cells in each condition are displayed. $n > 2000$ cells per condition.

Figure 6: Chk1 activity in G2 phase prevents premature mitotic entry.

(A) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with the indicated dose of aphidicolin. G2 phase duration is plotted for all cells entering mitosis.

(B) Similar cells were treated with 0.3 μ M aphidicolin and G2 phase duration plotted according to Chk1 activity profile during G2 (see Fig. 4B). Mean and 95% confidence interval. t test: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

(C) Similar cells as in (A) were treated with aphidicolin (0.5 μ M) then with either DMSO or Chk1 inhibitor (CHIR-124). 1/FRET variations of each single cell are plotted over time, normalized to level at G2 onset. Color changes from blue to red as cell reaches G2 phase and from red to dark green as cell enter mitosis.

(D) Time from inhibitor addition in G2 phase to nuclear envelope breakdown (NEBD) is plotted for each cell from (C). Bold red line is median.

(E) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with aphidicolin (0.5 μ M) at t_0 . Chk1 activity profiles in G2 phase, as in Fig. 4E, and cell cycle transitions monitored over the first and the second cell cycle are displayed. Re-entry into S phase during the second cell cycle is displayed in orange.

SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1: Specificity of the FRET sensor for the ATR/Chk1 pathway.

(A) FRET variations were recorded over time in RPE-1 mRuby-PCNA/+ cells stably expressing either phosphorylable or non-phosphorylable Chk1 sensor. DMSO or aphidicolin (1 μ M) is added at the indicated timepoint. Each line represents a single cell and cells that responded to aphidicolin treatment are plotted in red, others in grey.

(B-D) FRET variations were recorded over time in RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells. Cells were first treated by aphidicolin (1 μ M, B-C) or etoposide (5 μ M, D), then by either DMSO or inhibitors targeting Chk1 (CHIR-124, 200 nM), Chk2 (PV1019, 5 or 25 μ M), ATR (AZD6738, 1 μ M) or ATM (KU55933, 10 μ M). Only the aphidicolin or etoposide responding cells are displayed and cells that responded to second inhibitor addition are plotted in red, others in grey. Each line represents a single cell, bold curve is mean.

Figure S2: Activation of the ATR/Chk1 and ATM/Chk2 following genotoxic stresses.

RPE-1 cells were incubated with aphidicolin (1 μ M) or etoposide (5 μ M) and treated 3h later with either ATR, ATM, Chk1 or Chk2 inhibitors as in Fig S1B-D. Cells were lysed 15 min after inhibitor addition and the autophosphorylation of Chk1 (S296P), Chk2 (S516P) or their phosphorylation by resp. ATR (Chk1 S345P) or ATM (Chk2 T68P) was assessed by immunoblot.

Figure S3: Various replication stress sources induce Chk1 sensor phosphorylation.

(A) Schematic of the effects of the different drugs used.

(B) FRET variations were recorded over time in asynchronous HeLa cells transiently expressing Chk1 sensor and first treated with either DMSO, aphidicolin (1 μ M), Thymidine (1 mM) or hydroxyurea (1 mM) and subsequently with Chk1 inhibitor (CHIR-124). 1/FRET values are normalized to level at the last time point. Each line represents a single cell and cells that responded to the treatments are plotted in red or green, others in grey. n >100 cells per condition.

Figure S4: Basal Chk1 activity along S phase correlates with the dynamics of PCNA positive replication foci.

(A-D) Each line represents a single cell, bold line is mean value. 1/FRET values are normalized to level at G2 onset.

(A) FRET variations recorded over time in asynchronous RPE-1 mRuby-PCNA/+ cells expressing non-phosphorylable Chk1 sensor. Cells were synchronized *in silico* to NEBD.

(B) FRET variations recorded in asynchronous hTert-RPE-1 wild-type cells stably expressing Chk1 sensor. Cells were synchronized *in silico* to the time of Chk1 minimal value preceding entry into mitosis.

(C and D) FRET variations recorded in asynchronous U2OS Chk1 sensor and RPE-1 mRuby-PCNA/+ H2B-Chk1 sensor cells. (D) RPE-1 Cells were synchronized *in silico* to G2 onset, as determined by PCNA foci disappearance.

(E and F) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were tracked over time with a high-magnification 60x objective. FRET variations were monitored and PCNA foci counted at each timepoint using automated image-processing algorithms (see Experimental Procedures). Cells were synchronized *in silico* to the time of Chk1 activation in early S phase (E) or to the last maximum of Chk1 activity before transition into G2 phase (F). Data are means \pm SD.

(G) Asynchronous RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells. Slopes of Chk1 activity decrease during S/G2 transition or following Cdc7 inhibition (XL-413 15 μ M) in S phase. t test, ns stands for $p > 0.05$.

Figure S5: Local Chk1 activation on chromatin upon incremental RS

RPE-1 mRuby-PCNA/+ chromatin-targeted H2B-Chk1 sensor cells were first treated with increasing doses of aphidicolin then with a Chk1 inhibitor (CHIR-124). Only cells that responded to Chk1 inhibitor addition are plotted. FRET values are normalized to after Chk1 inhibition.

Figure S6: Chk1 activation kinetics upon RS is similar along S phase

RPE-1 mRuby-PCNA/+ H2B-Chk1 sensor cells were imaged at high frequency (1 image/20 sec) and high magnification (100x) on a spinning disk microscope. (A) Cells were treated with 1 μ M aphidicolin and distribution of PCNA foci was used to discriminate between early, mid or late S phase cells at the time of drug addition (B) 1/FRET variations over time. Data are means \pm SD. Bar, 10 μ m.

Figure S7: A subset of cells enter into mitosis even upon stringent RS

(A) hTert-RPE-1 wild-type cells were treated with increasing aphidicolin doses and mitotic entry monitored over time by phase-contrast video-microscopy (1 image/5 min). Entry into mitosis for each cell was defined at NEBD. Graphs represent the percentage of cells that have entered into mitosis over time, normalized to cell density. $n > 1000$ cells for each condition.

(B) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with the indicated doses of aphidicolin and monitored over time. Data represents the percentage of cells reaching G2 phase (left) or NEBD (right) during the first 24h following drug addition. Percentages are normalized to control (DMSO) condition and to cell density at t_0 .

Figure S8: A genuine S/G2 transition is taking place during cell cycle resumption upon RS

(A-C) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells.

(A) FRET variations were monitored over time and PCNA foci counted at each time point using automated image-processing algorithms. Cells were synchronized *in silico* to the last Chk1 activity maximum before S/G2 transition. Curves are mean (in bold) \pm SD.

(B and C) FRET variations were monitored over time upon increasing aphidicolin doses. Time needed for Chk1 inactivation (B) and the slopes of Chk1 activity decrease (C) at S/G2 transition are displayed in the different conditions.

(D) Asynchronous hTert-RPE-1 mRuby-PCNA/+ Plk1-mVenus/+ double knock-in cells were treated with either DMSO or aphidicolin (0.5 μ M). Only cells in S phase at the time of drug addition are shown. Cells were synchronized *in silico* to G2 onset (PCNA foci disappearance). Plk1-mVenus intensity levels over time are displayed, normalized to the value at G2 onset. Data are means \pm SD.

Figure S9: Chk1 reactivates during G2 phase in U2OS cells upon RS and persists up to mitosis onset

(A) Representative gallery of a U2OS cell entering mitosis despite persistent Chk1 reactivation during G2. Bar, 10 μ M.

(B and C) U2OS cells treated with aphidicolin (0.4 μ M) were synchronized *in silico* to S/G2 transition (B) or NEBD (C) and sorted into two classes depending on Chk1 re-activation profile before mitosis. S/G2 transition is estimated by steeply Chk1 activity decrease few hours before mitosis (See Fig. S4C). Each line represents a single cell and color changes according to cell cycle progression (blue in S phase, red in G2, dark green in mitosis and for the next cell cycle). Note that U2OS Cells exhibit either a minimal Chk1 activity in G2 phase (top) or Chk1 reactivation during G2 persisting up to mitosis onset (bottom).

Figure S10: Chk1 re-activation profiles in G2 phase related to RS stringency

Cell cycle progression and pseudo-color Chk1 activity profiles in G2 phase of RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells treated with aphidicolin (0.5 or 1 μ M) or DMSO (CT) at the indicated time (red vertical line). Each row represents a single cell. Cells are ordered according to the time of S/G2 transition. $n > 140$ cells for each condition.

Figure S11: Upon replication stress, G2 phase is longer in cells that re-activated Chk1 but ATR or Chk1 inhibition rapidly trigger mitosis as long as Chk1 activity persists

(A) Asynchronous RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with DMSO, Chk1 (CHIR-124) or ATR inhibitor (AZD6738). Duration of G2 phase was measured for all cells in G2 at the time of inhibitor addition. t test: *** $p < 0.001$, *ns* $p > 0.05$.

(B) Asynchronous RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated first with aphidicolin (1 μ M) then with ATR inhibitor (AZD6738). FRET variations are plotted over time. Each line represents a single cell and plot color changes from blue to red as cell reaches G2 phase and from red to dark green as cell reaches mitosis.

(C) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with 0.5 μ M aphidicolin then with either DMSO, ATR (AZD6738) or Chk1 (CHIR-124) inhibitor 9 hours later. For all cells in G2 phase at the time of inhibitor addition, time to NEBD was measured and plotted. Red line is median.

(D) RPE-1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor cells were treated with aphidicolin (1 μ M) then Chk1 (CHIR-124) inhibitor. (Left) Cells in G2 phase at the time of Chk1 inhibition are displayed. Note that a subset of cells in G2 phase for >7h could not reach mitosis despite Chk1 inhibition. (right) FRET variations over time in this subpopulation of G2 phase cells are shown.

(E) Time from Chk1i (or DMSO) addition to NEBD of all cells from Fig. 6D is plotted against relative FRET variation in the 15 minutes following inhibitor addition. Linear regressions were performed and for Chk1i condition, slope is significantly not zero (F test, $p < 0.0001$).

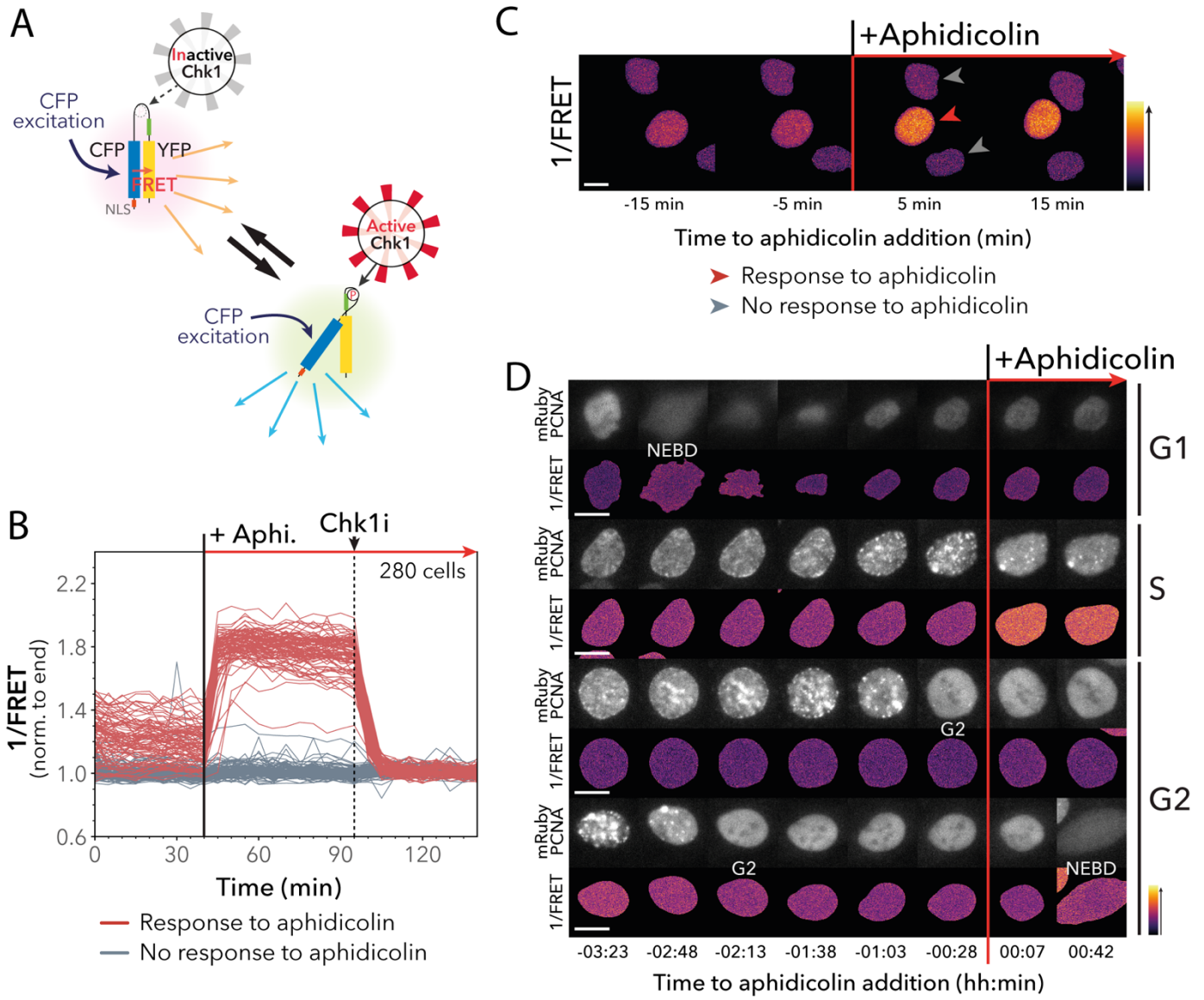
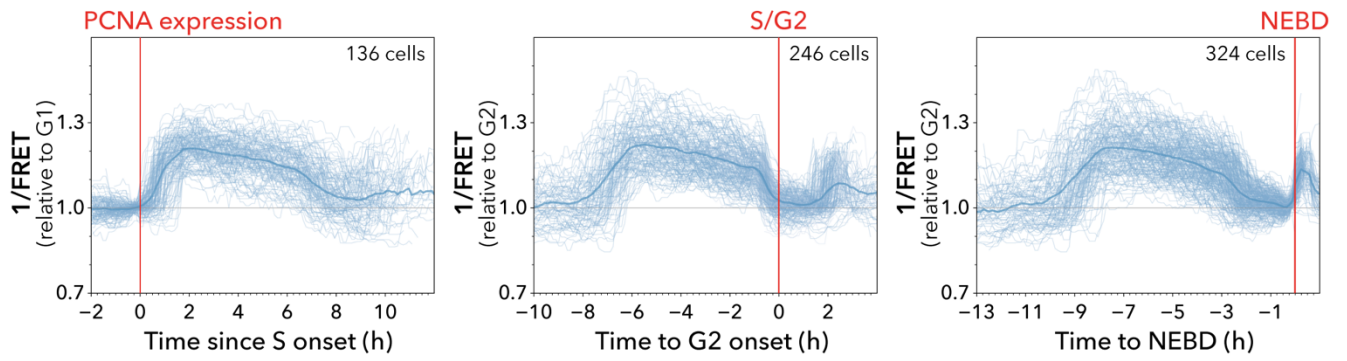
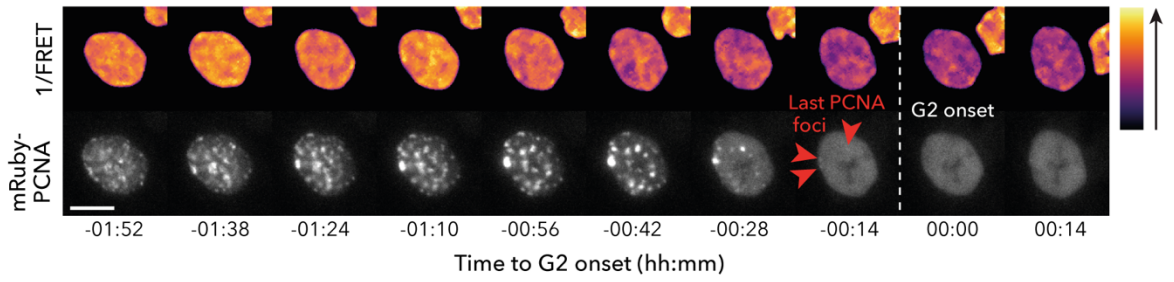
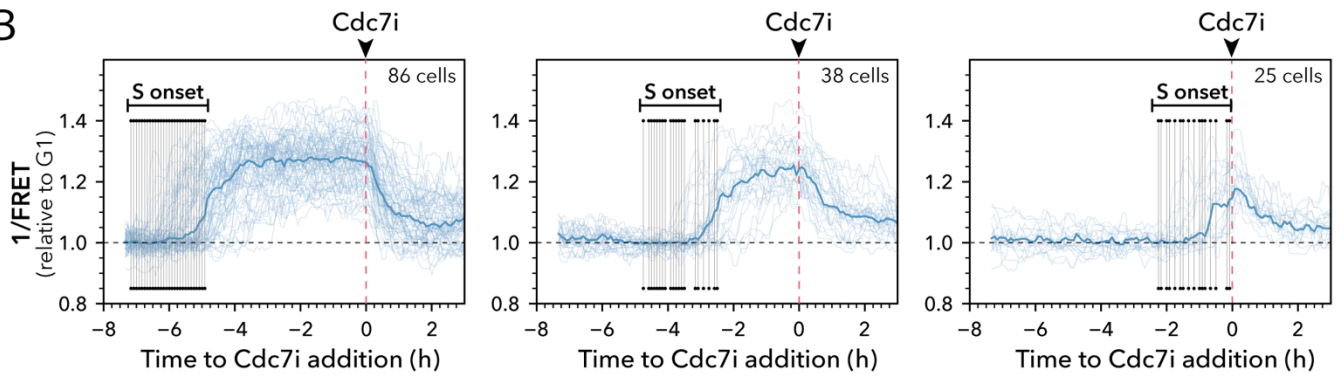


Figure 1: Development of a FRET-based Chk1 phosphorylation sensor.

A



B



C

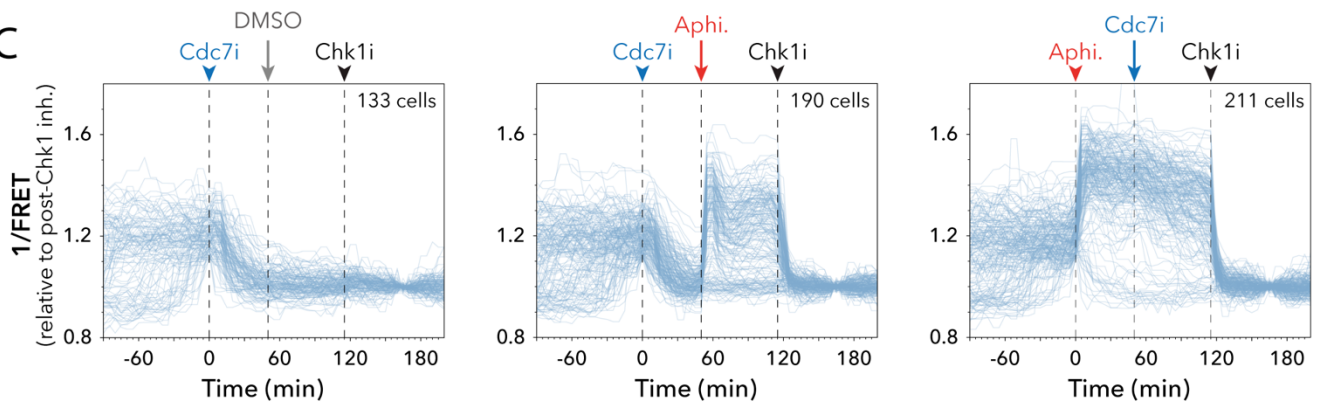
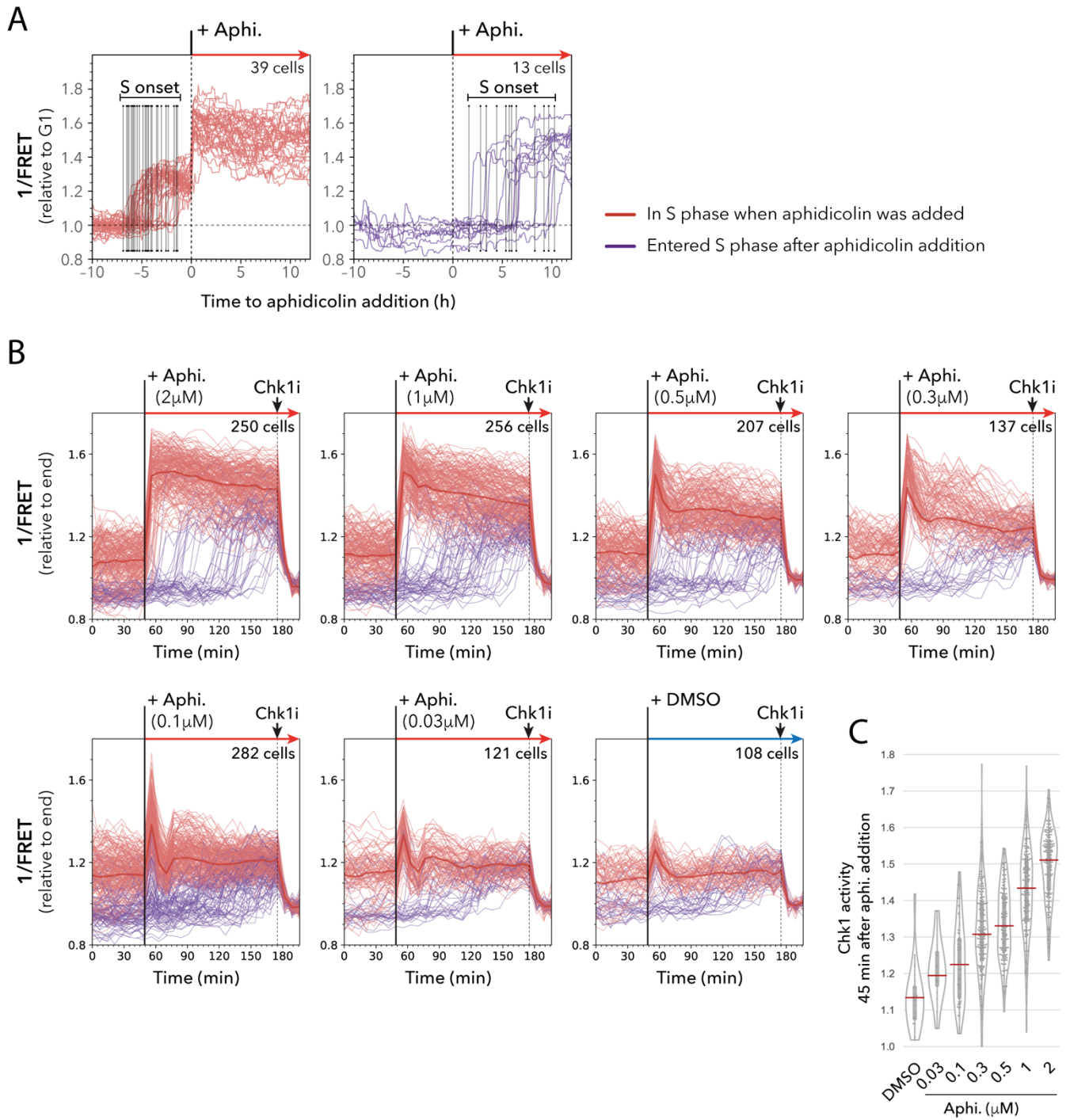


Figure 2: Chk1 activity along S phase relies on replication origin firing.



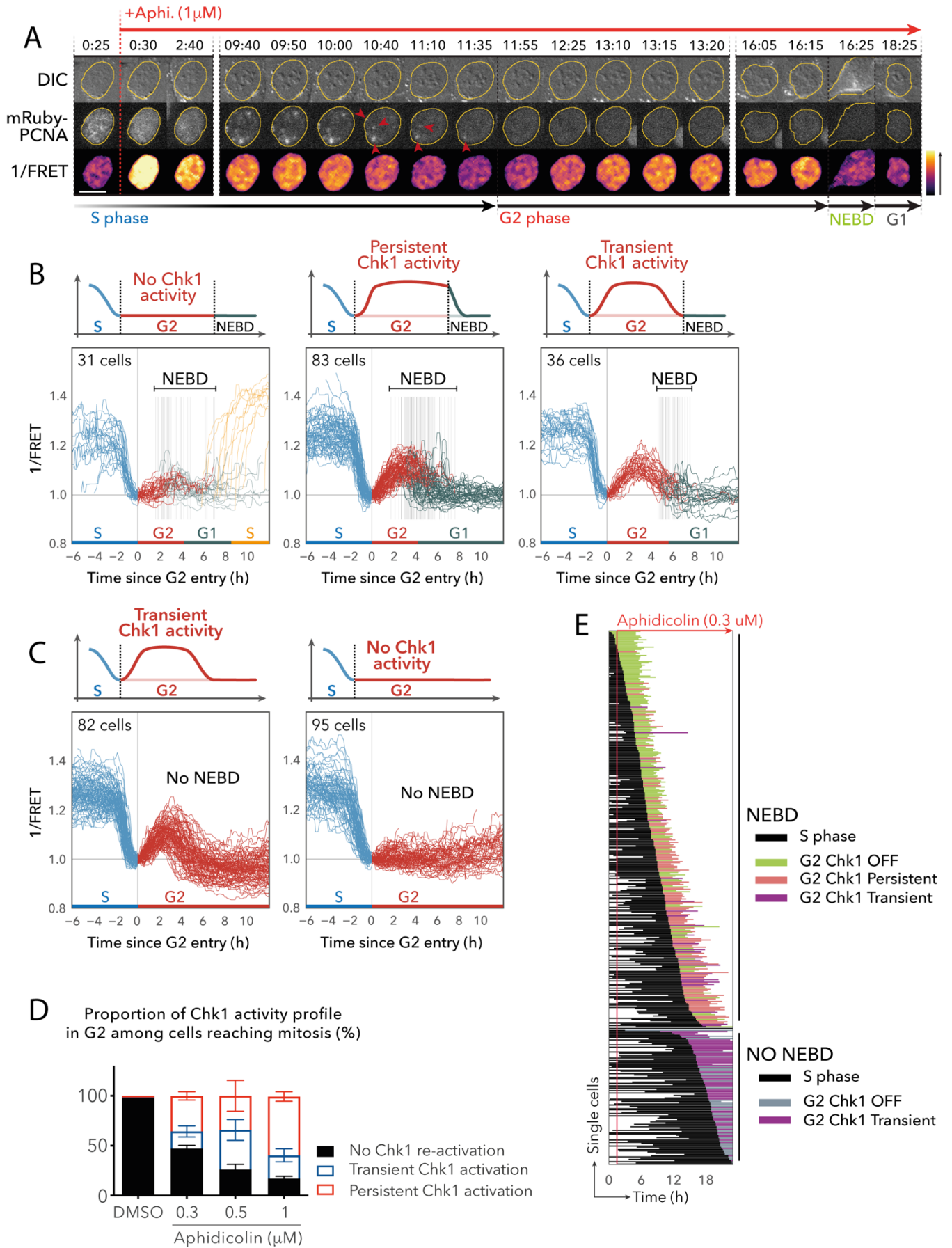


Figure 4: Chk1 reactivates in G2 phase cells during cell cycle resumption upon RS.

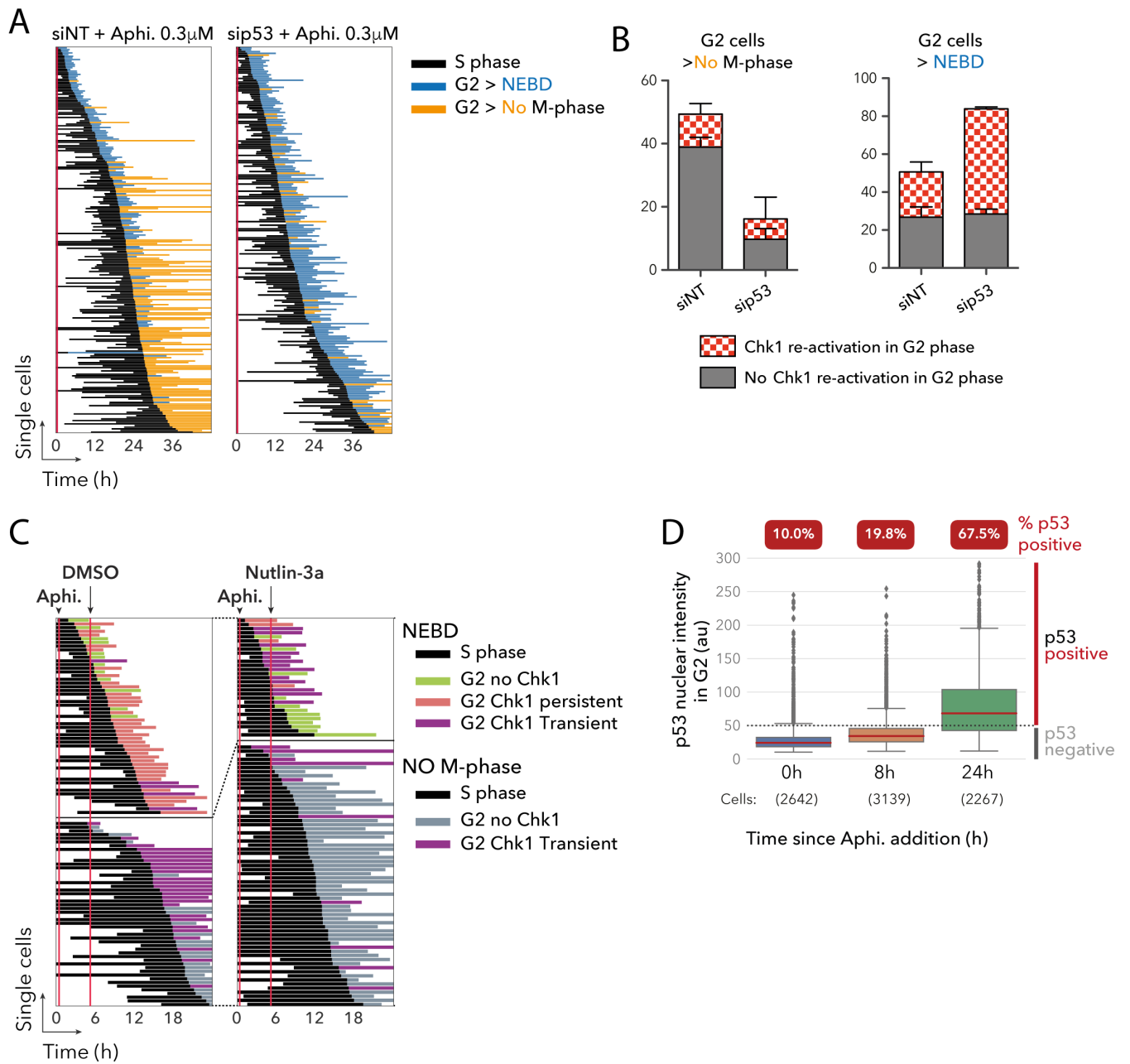


Figure 5: p53 expression prevents Chk1 reactivation during G2 phase.

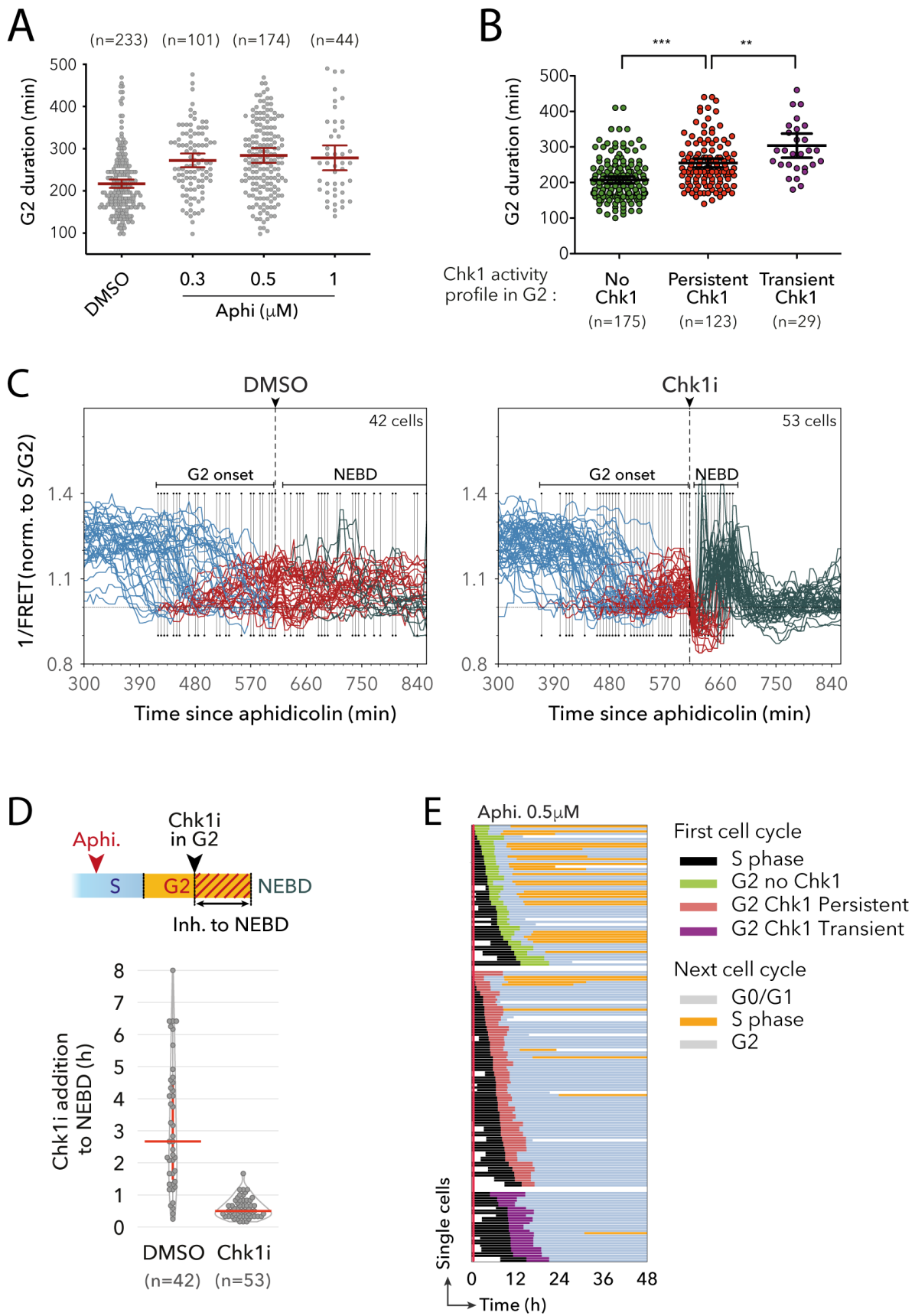


Figure 6: Chk1 activity in G2 phase prevents premature mitotic entry.

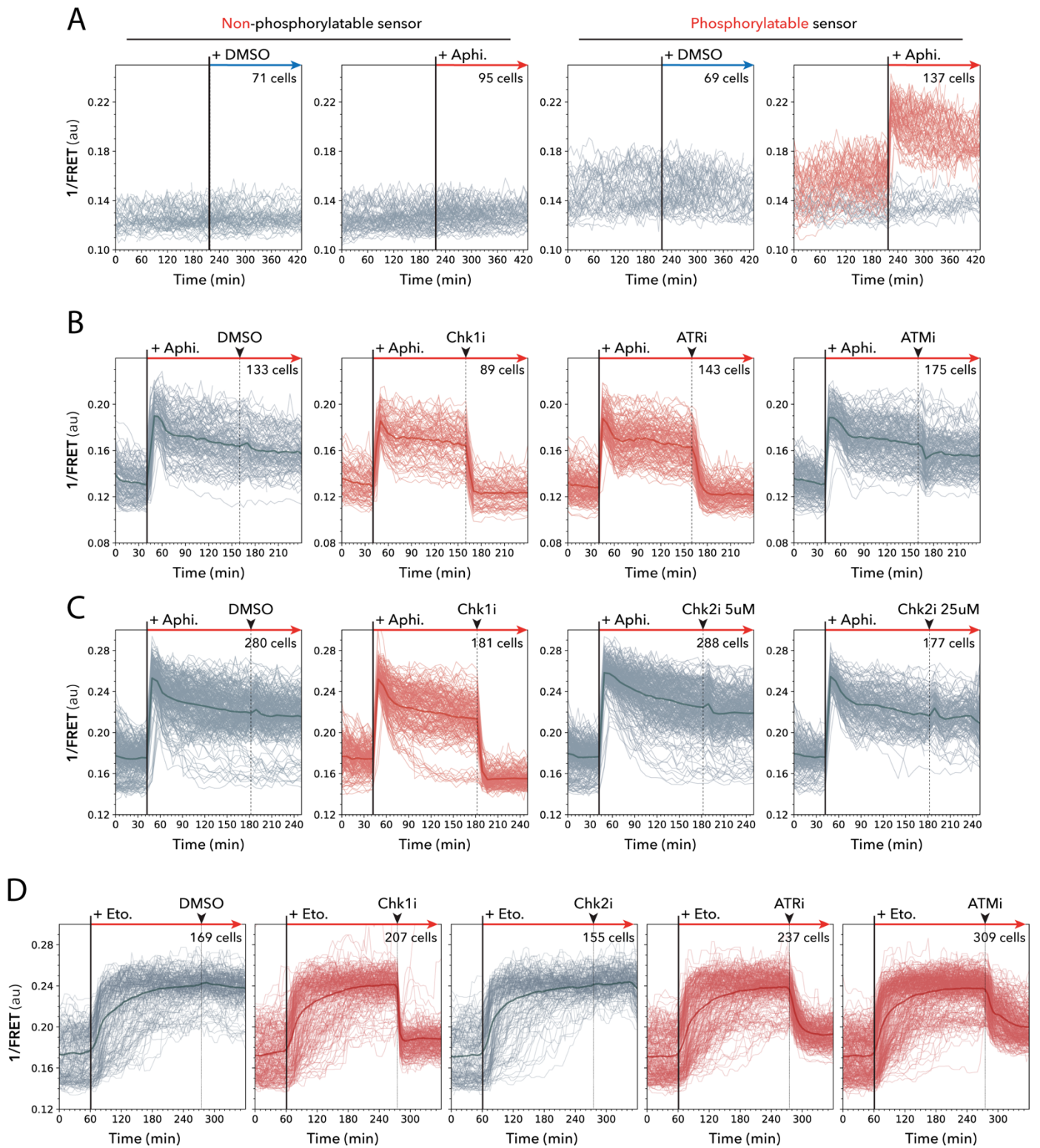


Figure S1: Specificity of the FRET sensor for the ATR/Chk1 pathway.

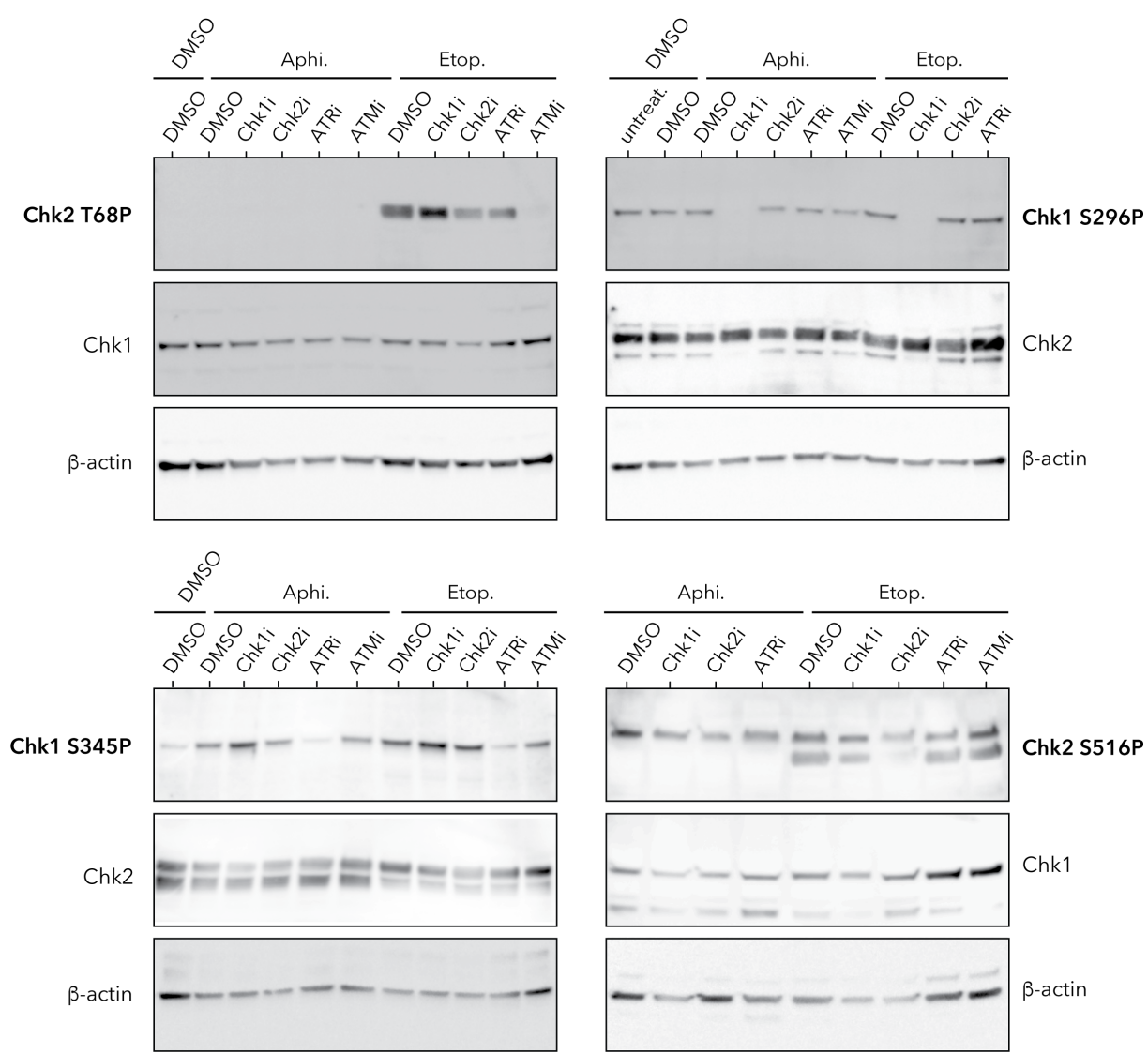


Figure S2: Activation of the ATR/Chk1 and ATM/Chk2 following genotoxic stresses.

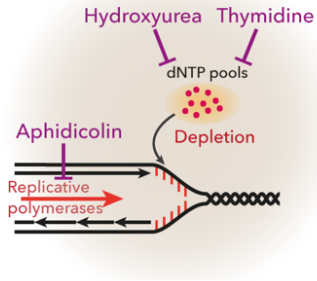
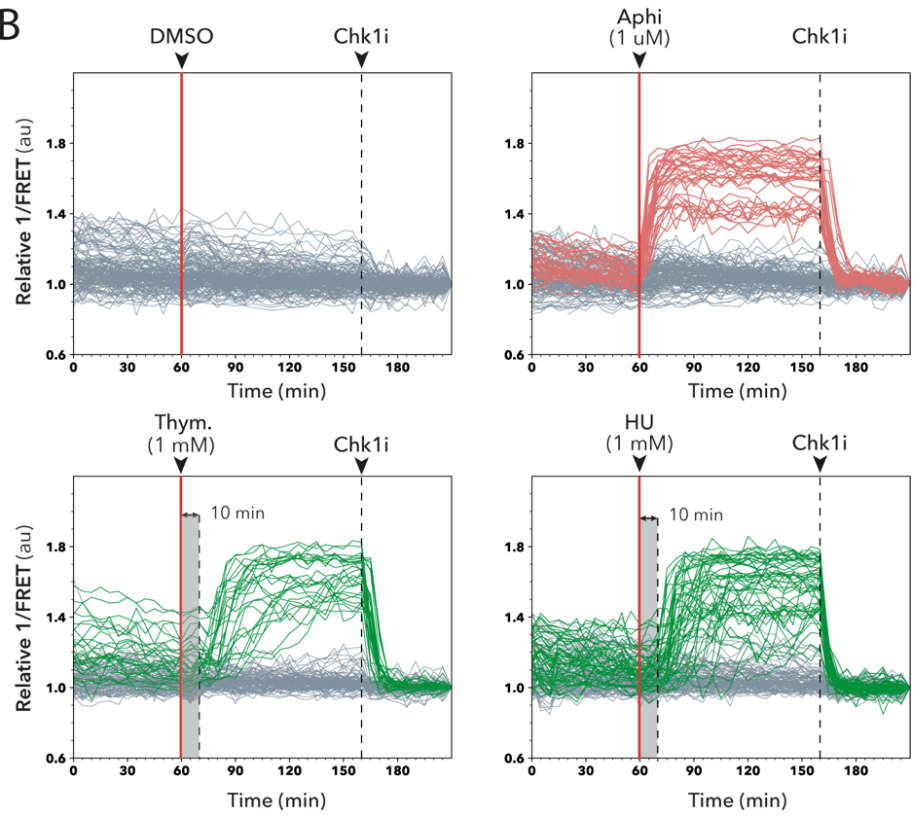
A**B**

Figure S3: Various replication stress sources induce Chk1 sensor phosphorylation.

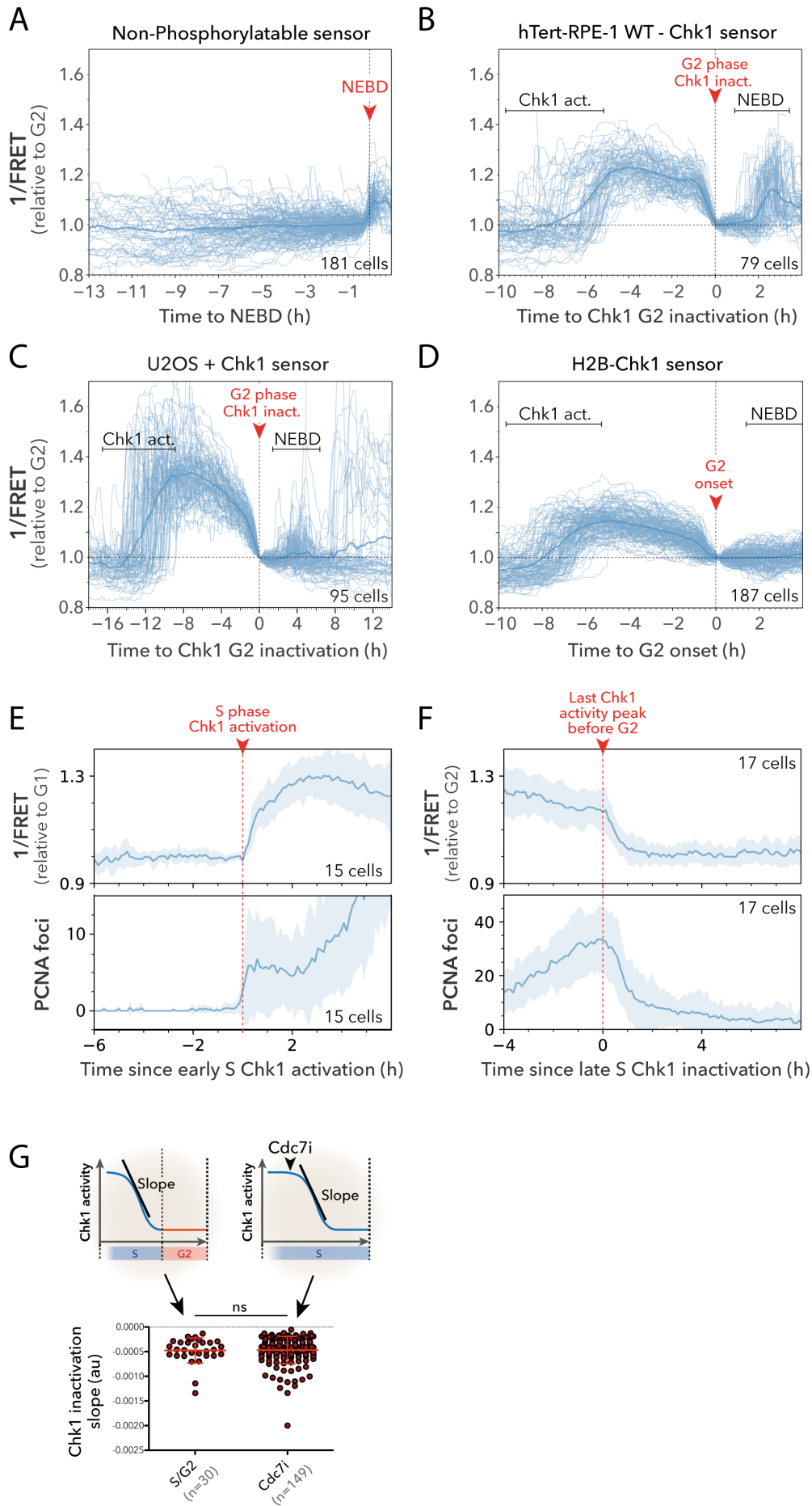


Figure S4: Basal Chk1 activity along S phase correlates with the dynamics of PCNA positive replication foci.

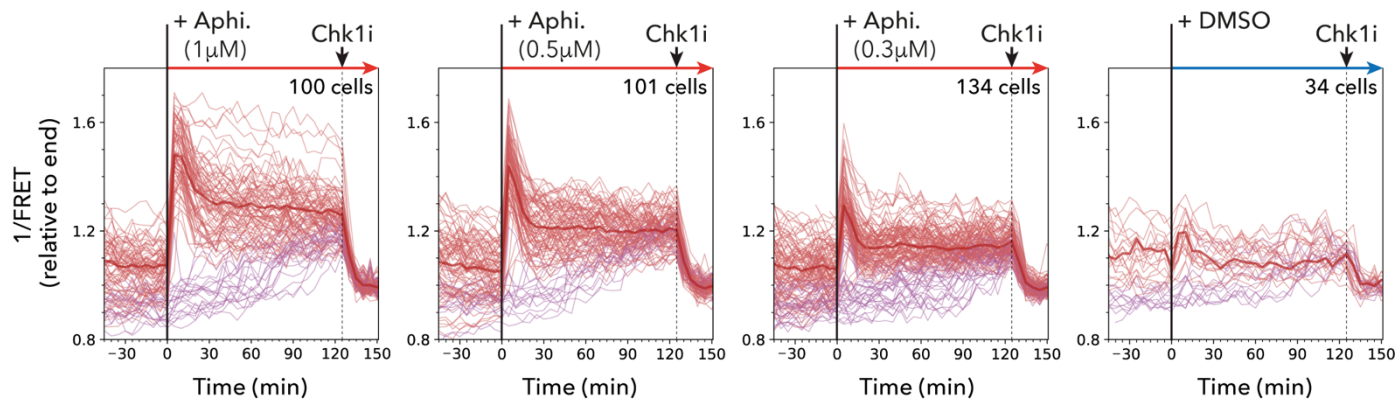


Figure S5: Local Chk1 activation on chromatin upon incremental RS

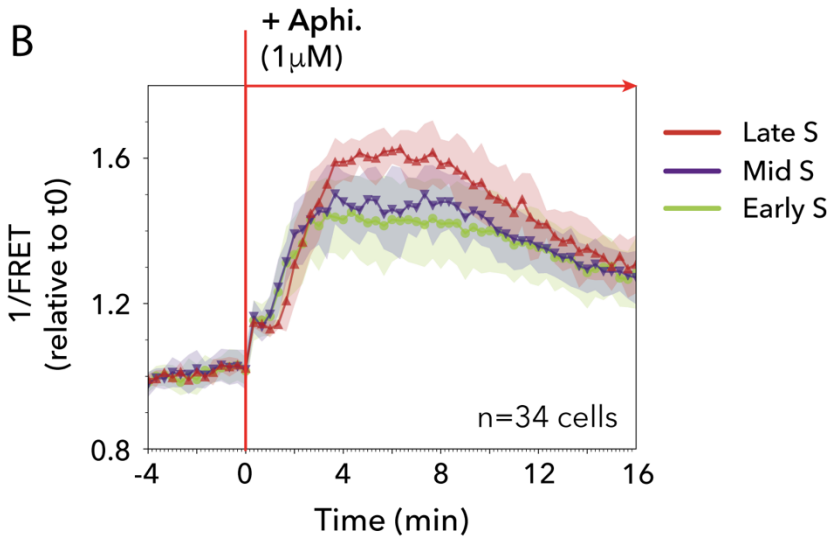
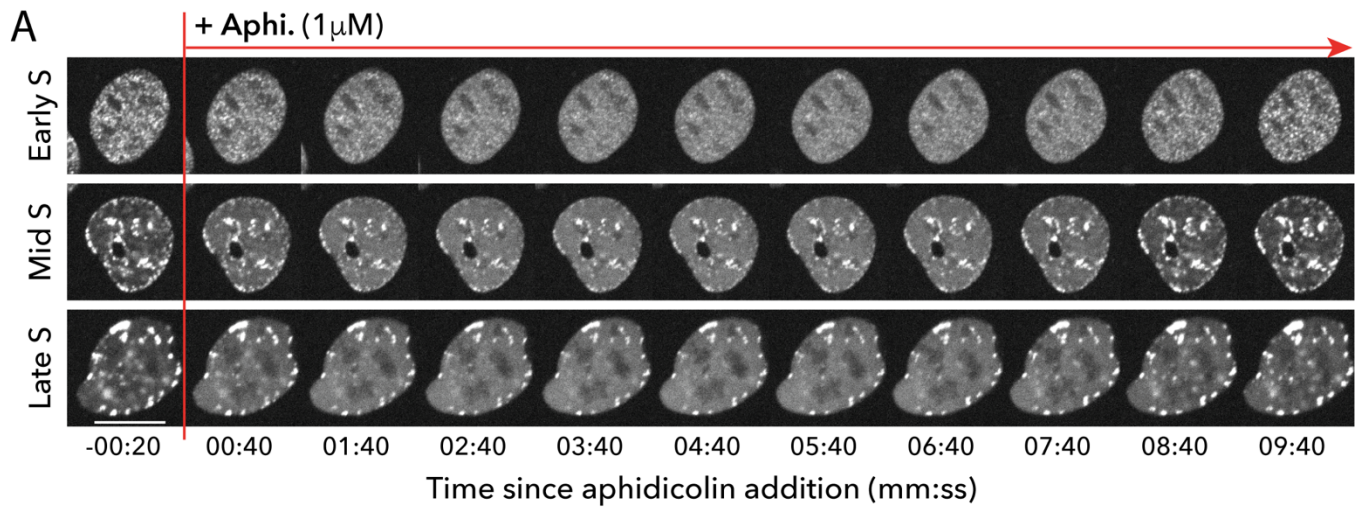
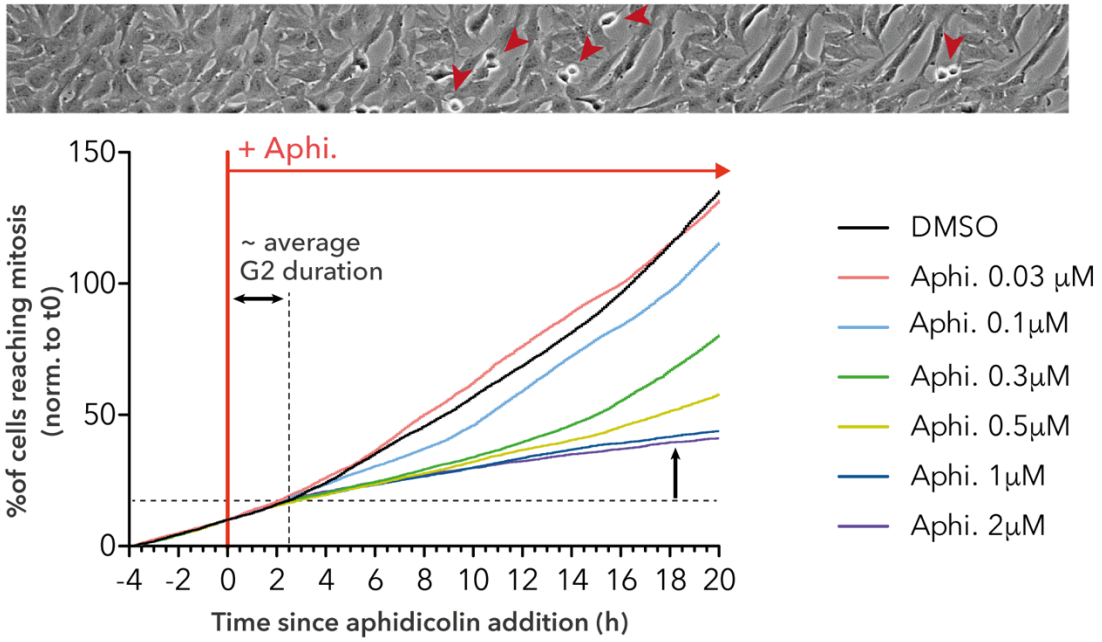


Figure S6: Chk1 activation kinetics upon RS is similar along S phase

A



B

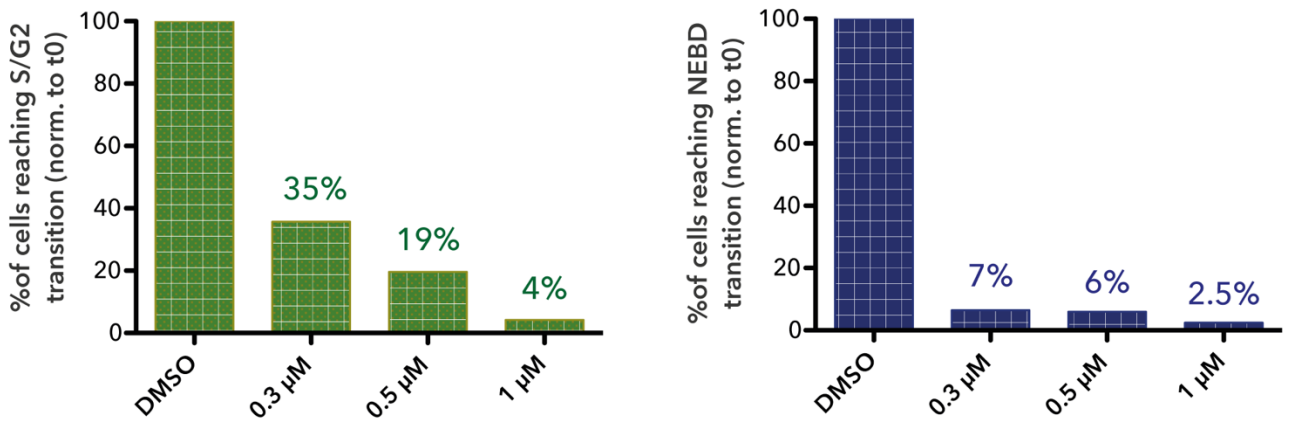


Figure S7: A subset of cells enter into mitosis even upon stringent RS

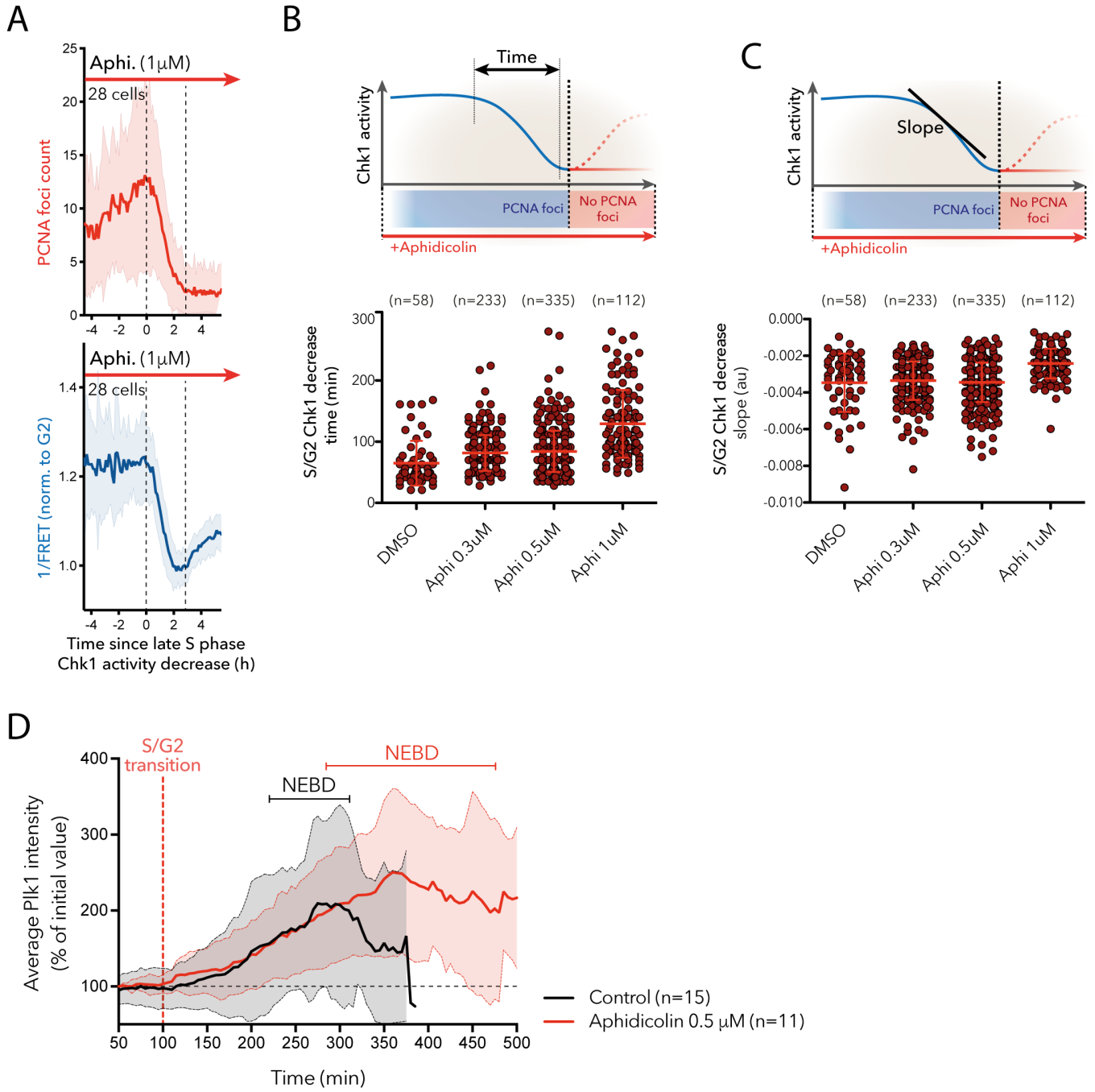


Figure S8: A genuine S/G2 transition is taking place during cell cycle resumption upon RS

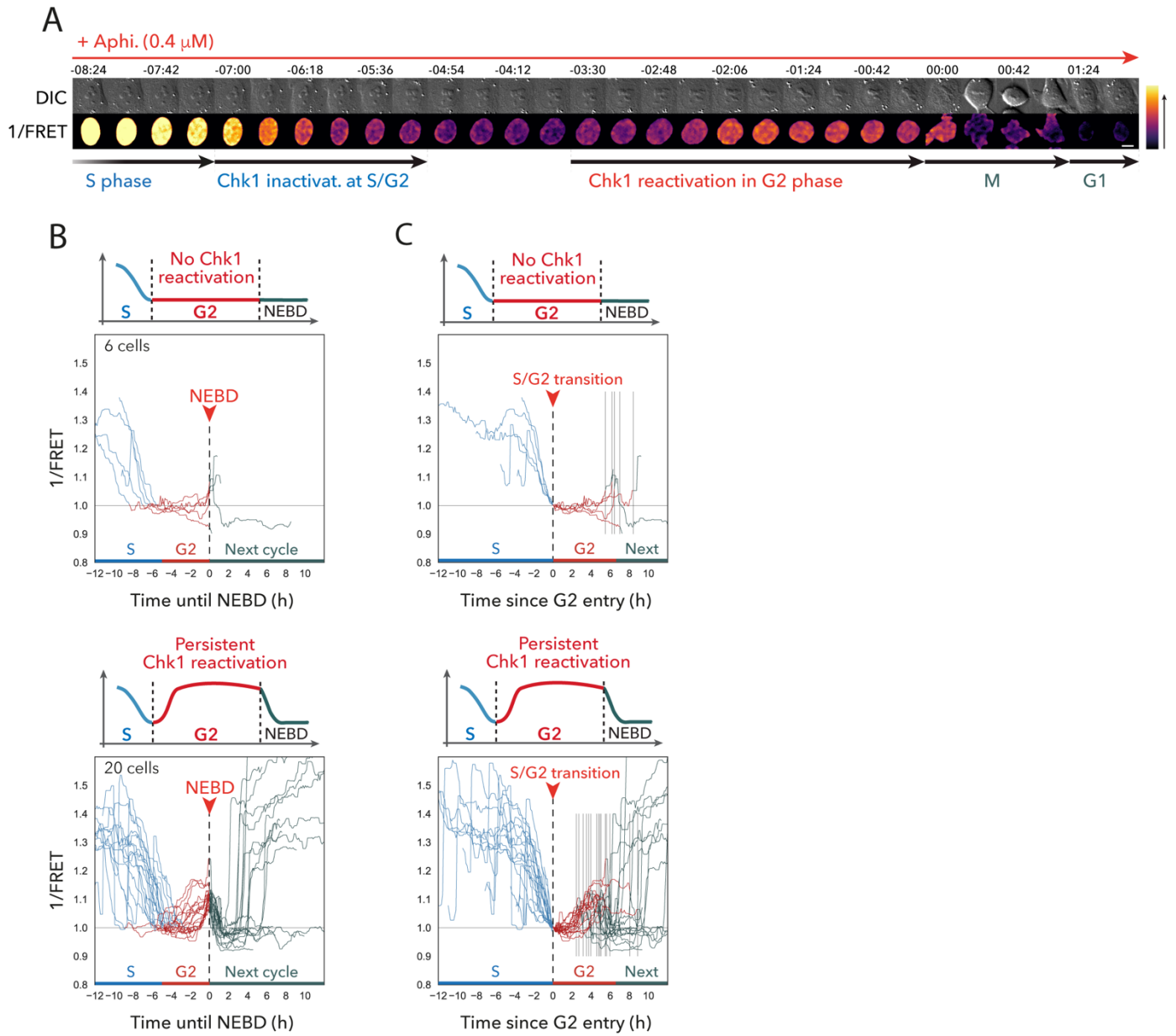


Figure S9: Chk1 reactivates during G2 phase in U2OS cells upon RS and persists up to mitosis onset

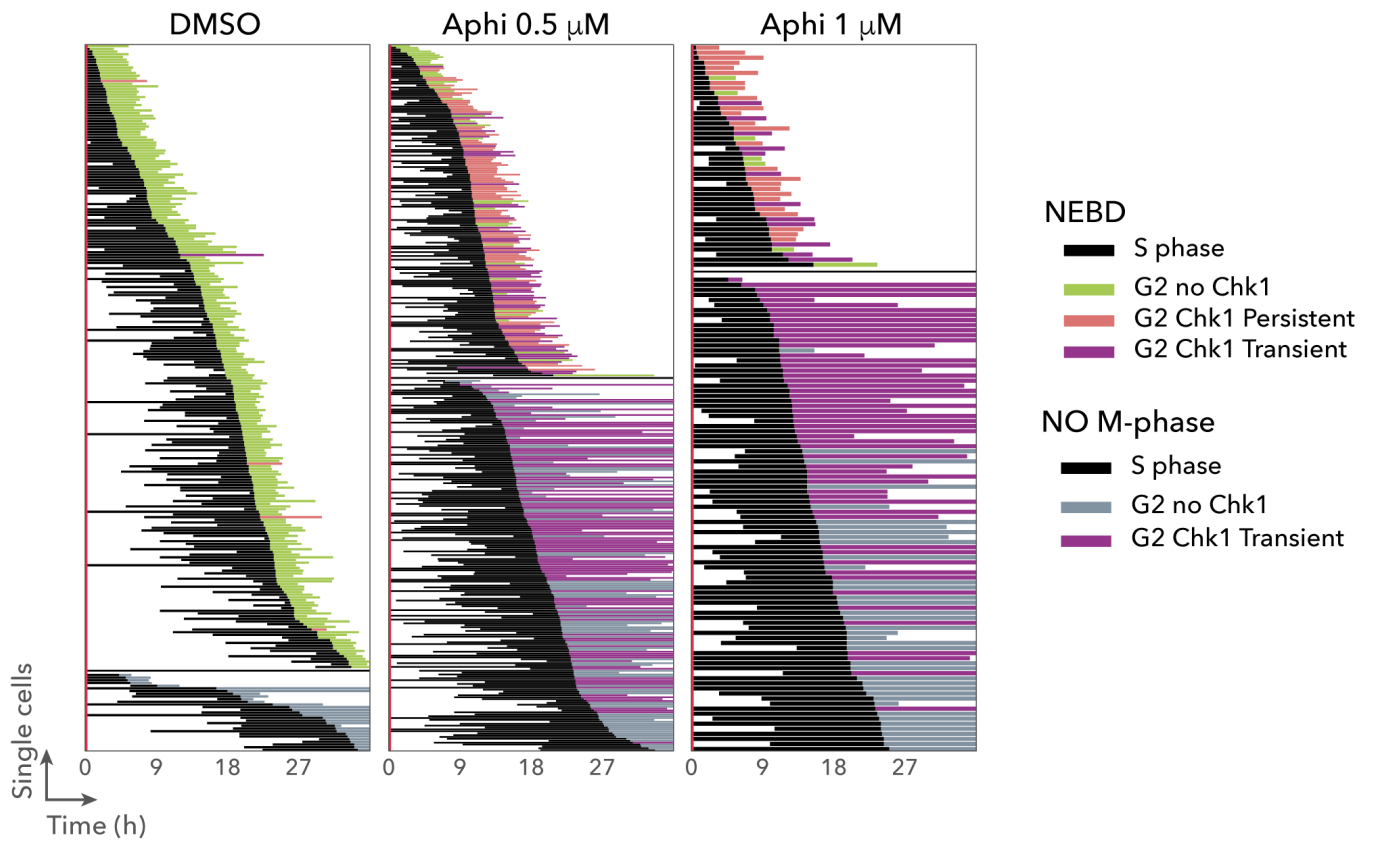


Figure S10: Chk1 re-activation profiles in G2 phase related to RS stringency

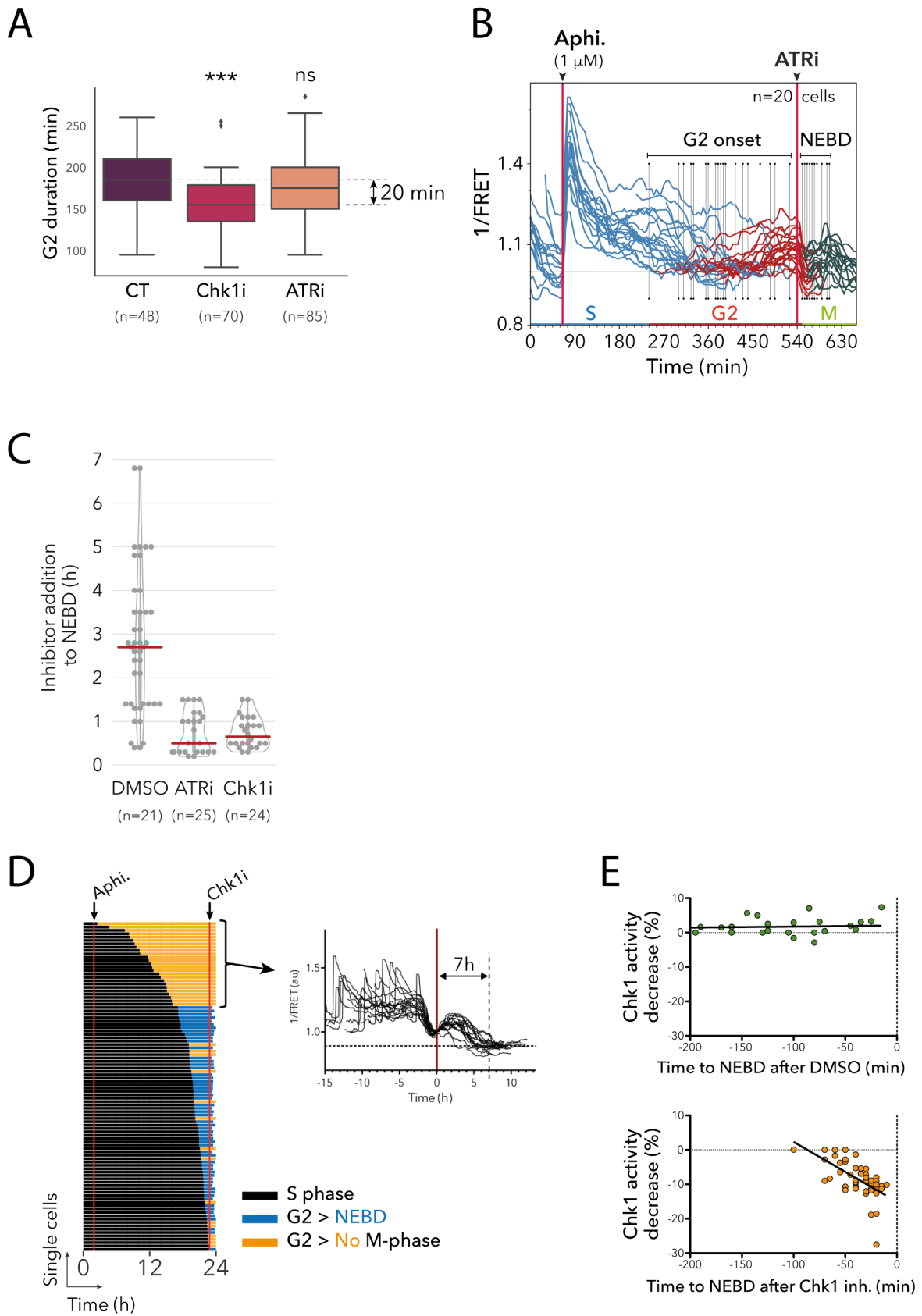


Figure S11: Upon replication stress, G2 phase is longer in cells that re-activated Chk1 but ATR or Chk1 inhibition rapidly trigger mitosis as long as Chk1 activity persists

RESULTATS ADDITIONNELS

Lignées cellulaires et agents pharmacologiques

Pour générer les lignées hTERT-RPE1 exprimant de façon stable le senseur Chk1 et H2B-mCherry ou mApple-53BP1trunc, la lignée hTERT-RPE1 Chk1 sensor (voir article) a été transfectée par des lentivirus contenant les plasmides mApple-53BP1trunc (Addgene #69531) ou H2B-mCherry (Addgene #89766). Les cellules fluorescentes ont été sélectionnées par cytométrie en flux sur un BD FACS Aria III (BD Bioscience) et réparties en cellule unique dans une plaque 96 puits pour isoler et amplifier les clones positifs. Pour générer la lignée HeLa exprimant stablement PCNA-mCherry et le senseur Chk1, le senseur Chk1 a été transfecté au JetPrime (Polyplus) dans la lignée HeLa PCNA-RFP (cadeau du laboratoire de J. Pines) avec le protocole décrit précédemment (voir article). Les clones positifs ont été sélectionnés tel que décrit précédemment pour la lignée U2OS Chk1 sensor (voir article). Les lignées dérivées hTERT-RPE1 et les lignées HeLa sont cultivées et filmées dans les mêmes milieux que, respectivement, les cellules hTERT-RPE1 Chk1 sensor et les cellules U2OS Chk1 sensor (voir article). Les drogues suivantes ont été utilisées : DNA2i (C5, Kumar, 2017), Cdk1i (RO3306, MedChem Express), Cdk2i (CVT-313, Calbiochem), Cdk1/2i (Cdk Inhibitor III, Calbiochem). Les siRNA suivants ont été utilisés : Exo1 (OnTARGETplus SmartPool L-013120-00-0005, Dharmacon), CtIP (UCCACAACAUAUCCUAAUUU, Dharmacon), Mus81 (Combinaison de HSS129458, HSS129459, HSS188391 de chez Thermo), Mre11 (Combinaison de HSS142960, HSS142961, HSS181171 de chez Thermo).

Vidéomicroscopie couplée à l'immunofluorescence

Pour les Figures 37E, 37F et 38, 300 000 cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor ont été ensemencées dans une microDish 35 mm high Grid-50 à fond en verre avec une grille gravée (IBIDI) 24h avant de filmer les cellules sur un Nikon Ti-E Eclipse (voir article). À la fin du film, les cellules sont immédiatement rincées une fois au PBS, incubées 10 min dans du paraformaldéhyde 4% puis rincées trois fois au PBS avant de poursuivre avec le blocage et les incubations d'anticorps (voir article). La révélation est faite avec un anticorps secondaire AlexaFluor 647 (Invitrogen). Après rinçage de l'anticorps secondaire, les cellules sont déshydratées 10 secondes avec de l'éthanol 100% et une goutte de milieu de montage ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) est déposée au centre de la boîte en dessous d'une lamelle de verre. Au moment de l'acquisition des cellules en immunofluorescence, la grille est utilisée pour orienter la boîte de la même façon que pendant le film et une mosaïque recouvrant l'ensemble de la zone filmée est acquise. Anticorps utilisés : 53BP1 (Santa-Cruz, H300), p21 (Santa-Cruz, F-5).

Correspondance semi-automatique des cellules entre la vidéo et l'immunofluorescence

Les noyaux sont segmentés dans le film et la mosaïque tel que décrit précédemment (voir article) afin de binariser les images. La transformée de Fourier de la dernière image de chaque position du film est alors cross-corrélée à la transformée de Fourier de la mosaïque afin de retrouver la position du film sur la mosaïque. Pour faire correspondre automatiquement les cellules en G2 du film avec les cellules de la mosaïque, l'algorithme de matching précédemment décrit pour le tracking des noyaux en vidéomicroscopie est utilisé (voir article). Le tracking et la segmentation étant rendus complexe par la mitose, le tracking des noyaux au cours du temps n'est généralement pas

capable de suivre les deux cellules filles après la mitose. La correspondance entre la mosaïque en immunofluorescence et les cellules filles d'intérêt du film a donc été réalisée manuellement à l'aide d'une interface spécialement développée dans Fiji. Les corps nucléaires 53BP1 et les micronoyaux ont également été comptés à la main dans une interface spécialement développée dans Fiji. Le timing d'apparition et le nombre de bodies 53BP1 tel qu'observé dans la lignée hTERT-RPE1 Apple-53BP1trunc Chk1 sensor a été déterminé à la main dans Fiji.

I. LA DEPLETION OU L'INHIBITION *INDIVIDUELLE* D'EXONUCLEASES/ENDONUCLEASES N'EST PAS SUFFISANTE POUR EMPECHER LA REACTIVATION DE CHK1 EN G2

Nous avons supposé que la ré-activation de Chk1 spécifiquement après l'entrée en G2 pourrait être déclenchée par l'augmentation d'une activité Cdk1 ou Cdk2 au-delà d'un seuil critique. Les données actuelles suggèrent que la transition S/G2 devrait s'accompagner d'une hausse de l'activité Cdk (Lemmens et al. 2018; Saldivar et al. 2018; Goto et al. 2019), conduisant possiblement à l'activation d'un ou plusieurs facteurs susceptibles de générer des structures capables d'activer Chk1. L'hyperactivation des Cdk en phase S via l'inhibition de Wee1 conduit en effet au clivage Mus81-dépendant des fourches de réplication (Duda et al. 2016) et plusieurs facteurs impliqués dans la recombinaison homologue (CtIP, Rad51, Rad52) ou dans la résection (Exo1, DNA2) sont stimulés par les activités Cdk1 ou Cdk2 (Xuefeng Chen et al. 2011; Huertas et Jackson 2009; Lim, Chang, et Huh 2020; Palermo et al. 2016; Tomimatsu et al. 2014). Supportant cette hypothèse, la ré-activation de Chk1 en G2 est rapidement inactivée suite à l'ajout d'un inhibiteur pan-Cdk1/2 (Cdk Inhibitor III), ou d'inhibiteurs ciblant Cdk1 (RO3306) ou Cdk2 (CVT-313) (**Figure 34A**).

Le clivage des fourches de réplication par Mus81 pourrait conduire à une résection des extrémités de la cassure double brin et à la réactivation de la voie ATR/Chk1. Chez les mammifères, la résection des cassures doubles brin est initiée par CtIP (CtBP-interacting protein) dont l'activité est régulée de manière Cdk-dépendante en phases S et G2 (Huertas et Jackson 2009) et Mre11 (Chu 2014). Afin de tester l'hypothèse d'un rôle de ces protéines (CtIP, Mre11 et Mus81) dans la réactivation de Chk1, celles-ci ont été déplétées individuellement par siRNA pendant 48h, puis les variations de l'activité Chk1 suivies au cours du temps en présence d'aphidicoline (0.3 μ M) (**Figure 34B**). La combinaison de ces différents siRNA et de l'aphidicoline affecte probablement fortement la phase S dans la lignée non-transformée RPE1 car peu de cellules sont entrées en phase G2, encore moins en mitose (Données non montrées). Néanmoins, le niveau de réactivation de Chk1 en phase G2 ne diffère pas entre la condition contrôle (siCT) et les différents siRNA (**Figure 34B, gauche**), et aucun des siRNA testés n'a diminué significativement la proportion de cellules réactivant Chk1 en G2 (**Figure 34B, droite**). Ces résultats ne permettent donc pas de conclure à un rôle *unique* de Mus81, CtIP ou Mre11 dans la réactivation de Chk1 en G2.

Alternativement, Chk1 pourrait être réactivée en G2 par la résection d'interruption ou gaps de ssDNA accumulés en arrière des fourches de réplication en conditions de stress réplicatif (Zellweger et al. 2015). Il a été proposé chez la levure bourgeonnante que l'exonucléase Exo1 pourrait participer à la résection de gaps en arrière des fourches de réplication et à l'activation du checkpoint Rad53 (García-Rodríguez et al. 2018). Afin d'évaluer un rôle éventuel d'Exo1 dans la

réactivation de Chk1 en G2, Exo1 a été déplétée par siRNA pendant 48h puis les cellules filmées pendant 24h en présence d'aphidicoline (0.5 μ M) (**Figure 34C**). L'absence d'Exo1 n'affecte pas ni le niveau d'activité Chk1 en G2 parmi les cellules s'étant divisées (**Figure 34C, gauche**), ni la proportion des cellules s'étant divisées avec un checkpoint actif (ON) ou inactif (OFF) en G2 (**Figure 34C, droite**). Un rôle d'Exo1 dans la réactivation de Chk1 en G2 n'a donc pas pu être démontré.

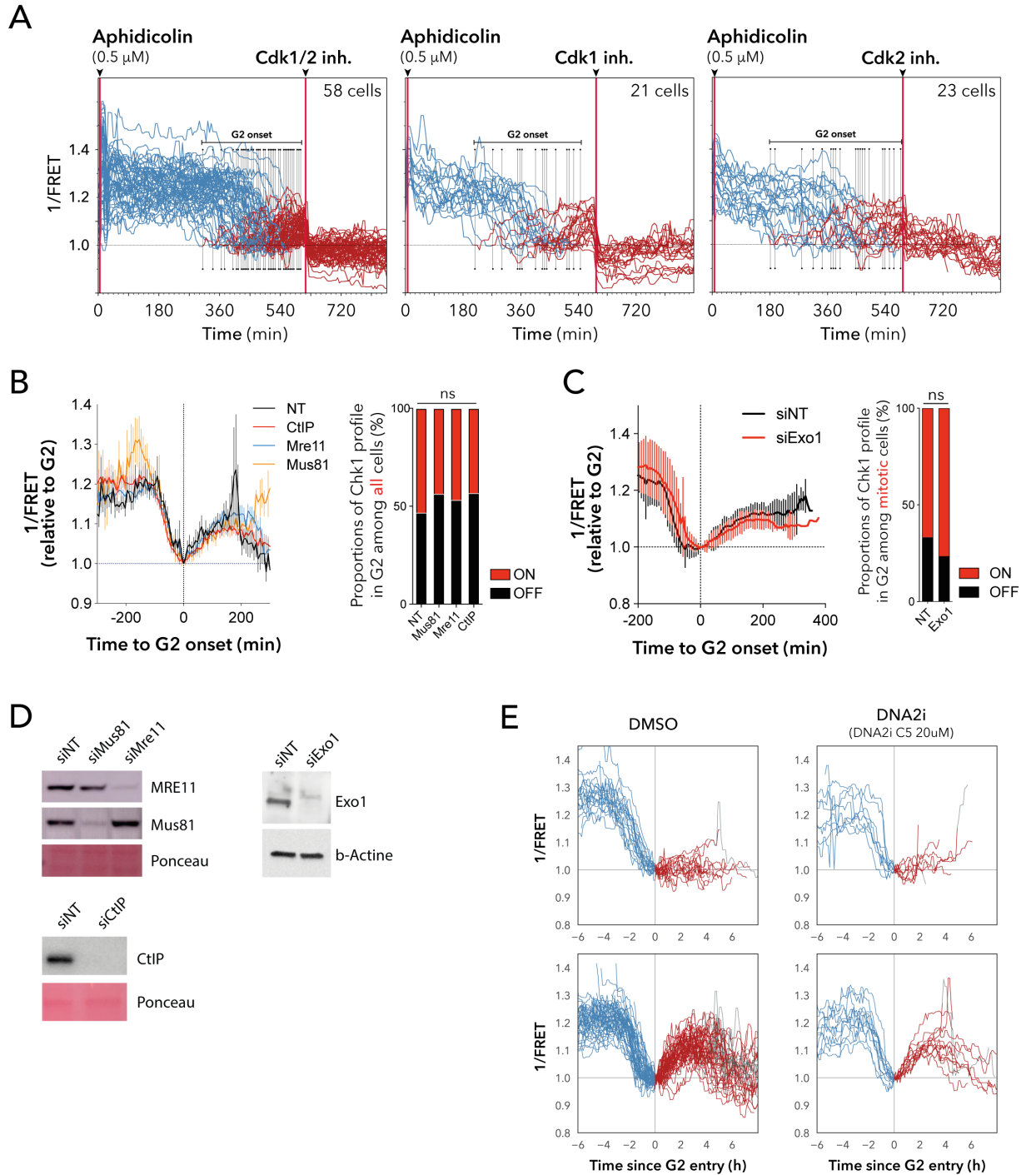
DNA2 est une autre nucléase impliquée dans la résection de cassures double brin (Chu 2014). Afin d'évaluer un rôle éventuel de DNA2 en G2, des cellules RPE1 ont été traitées avec une dose relativement élevée d'aphidicoline (1 μ M), afin d'augmenter la proportion de cellules présentant une réactivation de Chk1, puis un inhibiteur de DNA2 ("C5", 20 μ M) ou du DMSO ont été ajoutés 6 heures plus tard. L'inhibition de DNA2 en phase S n'empêche pas la ré-activation de Chk1 en G2 (**Figure 34E**). Un rôle de DNA2 dans la ré-activation de Chk1 en G2 n'a donc pas pu être démontré.

(Figure sur la page de droite) >

Figure 34 : La déplétion ou l'inhibition d'exo/endonucléases n'affecte pas la ré-activation de Chk1 en phase G2

(A) Des cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ exprimant le senseur Chk1 ont été traitées avec de l'aphidicoline (1 μ M) puis avec des inhibiteurs pharmacologiques pan-Cdk1/2, ou ciblant spécifiquement Cdk1 ou Cdk2. Les variations de signal FRET ont été suivies au cours du temps et synchronisées *in silico* à la transition S/G2. Chaque courbe représente une cellule unique, dont la couleur passe de bleu à rouge avec la transition S/G2. (B et C) Des cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ exprimant le senseur Chk1 ont été traitées par des siRNA ciblant Mus81, CtIP, Mre11 (B) ou Exo1 (C) ou alternativement par des siRNA contrôle (NT). 48h après transfection, les cellules ont été traitées avec 0.3 (A) ou 0.5 μ M (B) d'aphidicoline puis filmées pendant 24h. Les cellules ont été synchronisées *in silico* à la transition S/G2 et les variations de FRET parmi les cellules ayant ré-activé Chk1 en phase G2 sont présentées sur les courbes de gauche (Moyenne + SEM), alors que les histogrammes à droite indiquent les proportions de cellules ayant ré-activé (ON) ou non (OFF) Chk1 en G2 parmi l'ensemble des cellules entrées en G2 (B) ou parmi les cellules entrées en division au cours de l'enregistrement (C). Les données ont été analysées par un test exact de Fisher (*ns* : p-value > 0.05). Les Western-Blots correspondants aux différents siRNA sont représentés en (D).

(E) Des cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ exprimant le senseur Chk1 ont été traitées avec de l'aphidicoline (1 μ M) puis ~6h plus tard avec du DMSO ou un inhibiteur pharmacologique de DNA2 ("C5" 20 μ M). Les variations de signal FRET ont été suivies au cours du temps et synchronisées *in silico* à la transition S/G2. Les cellules présentant une réactivation de Chk1 en G2 sont sur les panneaux du bas, tandis que les cellules ayant une activité Chk1 minimale en G2 sont sur les panneaux du haut. Chaque courbe représente une cellule unique, dont la couleur passe de bleu à rouge avec la transition S/G2 et de rouge à vert foncé avec l'entrée en mitose.



II. L'HYDROXYUREE STIMULE L'ACTIVITE CHK1 EN PHASE S MAIS NE CONDUIT PAS A SA REACTIVATION EN G2

Suite à l'observation d'une réactivation de Chk1 en G2 après traitement à l'aphidicoline, j'ai étudié l'effet d'autres agents pharmacologiques induisant un stress réplicatif, en particulier l'hydroxyurée (HU) qui conduit à une déplétion des pools de nucléotides.

L'hydroxyurée stimule l'activité de Chk1 en phase S de manière dose dépendante, mais après un court délai probablement lié au temps nécessaire à la déplétion des pools de nucléotides (**Figure 35A**). Comme observé pour les traitements aphidicoline, l'activité Chk1 en phase S est initialement élevée avant de se stabiliser en quelques heures à un niveau plus faible (**Figure 35A**). D'autre part, le niveau d'activité Chk1 en phase S à 0.5 mM HU (Δ FRET ~30%) est proche de celui observé après 0.3-0.5 μ M d'aphidicoline, suggérant que ces deux traitements conduisent à un niveau de stress réplicatif équivalent.

Dans ces conditions de stress réplicatif induit à l'hydroxyurée, Chk1 s'inactive à la transition S/G2 (**Figure 35B**). De manière notable, une réactivation de Chk1 dans les cellules en G2 n'a pas été observée (**Figure 35B**) et en accord avec ce résultat la durée de la phase G2 n'est pas différente par rapport aux conditions contrôle (**Figure 35C**). **En résumé, le ralentissement des fourches de réplication en phase S via une déplétion des pools de nucléotides ne conduit pas à une réactivation de Chk1 en G2** (voir discussion).

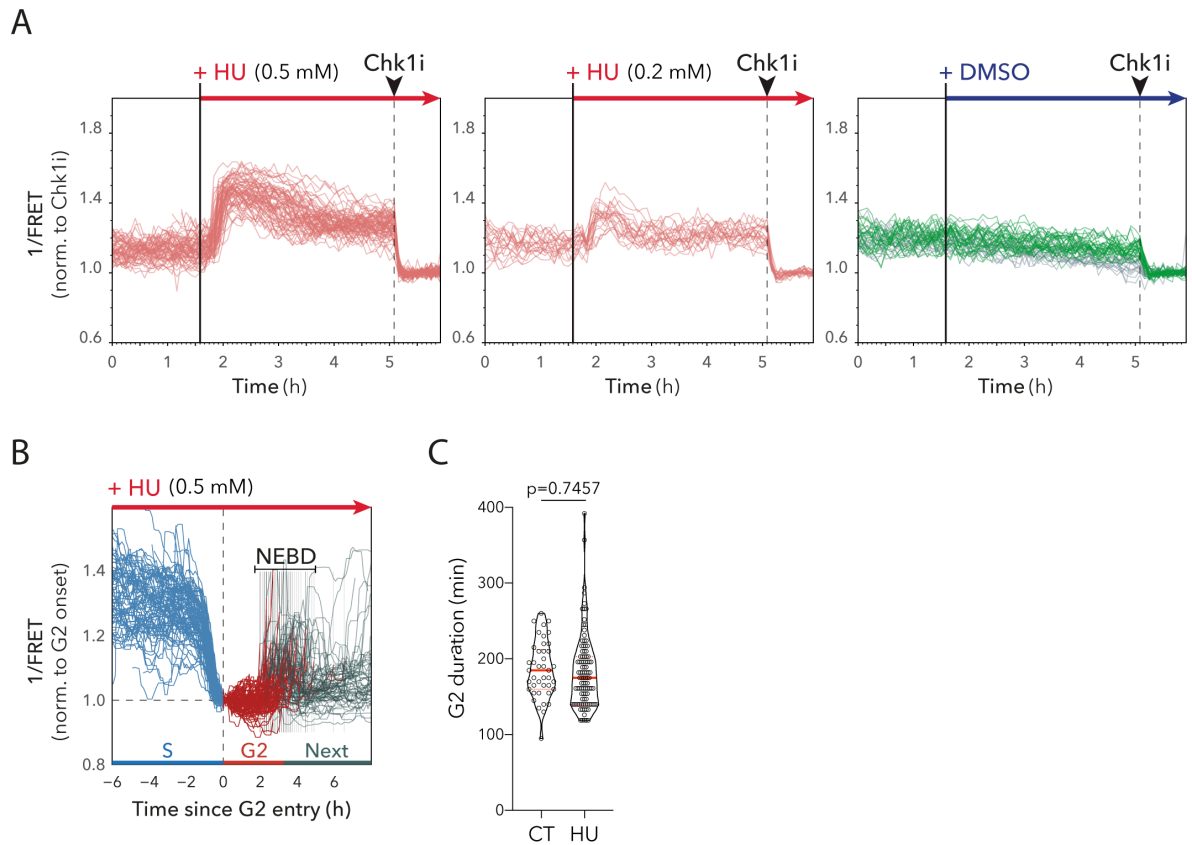


Figure 35 : Un traitement à l'hydroxyurée augmente l'activité de Chk1 en phase S mais ne conduit pas à une réactivation de Chk1 en phase G2

(A) Des cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ exprimant le senseur Chk1 ont été traitées par la dose indiquée d'hydroxyurée (HU) ou par du DMSO (Contrôle), puis par un inhibiteur de Chk1 (CHIR-124 200nM) et les variations du signal FRET analysées au cours du temps. Chaque ligne représente une cellule unique. >100 cells/condition.

(B) Des cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ exprimant le senseur Chk1 ont été traitées avec de l'hydroxyurée (0.5 mM). Les variations du signal FRET ont été analysées au cours du temps pendant 24h et toutes les cellules entrant en G2 pendant l'enregistrement sont synchronisées *in silico* à la transition S/G2 et représentées sur le graphe. Chaque courbe correspond à une cellule unique, dont la couleur passe de bleu à rouge avec la transition S/G2 et de rouge à vert foncé avec l'entrée en mitose.

(C) Comparaison de la durée de la phase G2 entre des cellules traitées avec du DMSO (CT) ou comme en (B) avec 0.5 mM d'hydroxyurée (HU) puis suivie par vidéo-microscopie pendant 24h. Représentation *Violin plot*, la médiane est en rouge. Les données ont été comparées par un t-test et la p-value est affichée.

III. EN ABSENCE DE STRESS REPLICATIF, CHK1 NE S'ACTIVE QUE TRANSITOIREMENT EN PHASE S DANS LES CELLULES HELA.

J'ai observé dans la lignée cellulaire humaine non-transformée RPE1 ainsi que dans la lignée cellulaire issue d'un ostéosarcome U2OS que la kinase Chk1 s'active tout le long de la phase S au cours d'un cycle cellulaire non perturbé et que cette activation reflète la dynamique des foyers de réplication PCNA positifs. Dans le but de poursuivre la caractérisation de la régulation de Chk1 en phase S, j'ai également suivi les variations de son activité dans la lignée cellulaire HeLa issue d'un adénocarcinome.

De manière notable, j'ai observé dans ces cellules que Chk1 s'active au moment de l'apparition des foyers de réplication PCNA positifs à la transition G1/S (**Figure 36A, gauche**), mais que cette activation est transitoire et retourne à un niveau minimal de type G1-like ~3h avant la disparition des foyers PCNA et l'entrée des cellules en G2 (**Figure 36A, droite**). En revanche, suite à l'induction d'un stress réplicatif modéré (aphidicoline 0.3 μ M), une activité Chk1 relativement faible (Δ FRET ~10%) persiste jusqu'à la disparition des foyers PCNA en fin de phase S (**Figure 36B**). On remarquera qu'aucune réactivation de Chk1 n'est observée en G2 dans les cellules HeLa. **Par conséquent, ces résultats préliminaires pourraient suggérer que les mécanismes conduisant à l'activation de Chk1 sont atténués dans la lignée cancéreuse HeLa (voir discussion).**

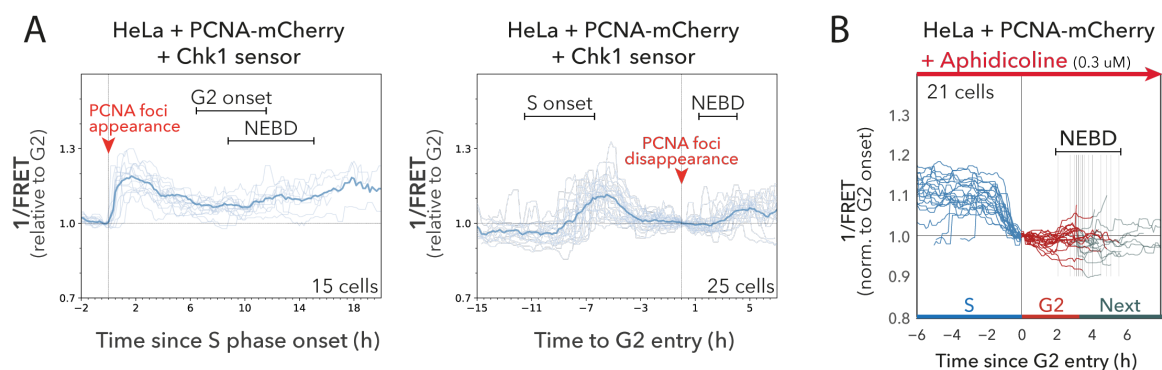


Figure 36 : En absence de stress réplicatif, Chk1 ne s'active que transitoirement en début de phase S dans les cellules HeLa

(A) Les variations de signal FRET ont été enregistrées au cours du temps dans des cellules HeLa asynchrones exprimant de manière stable PCNA-RFP et le senseur Chk1. Les durées de phase étant assez variables d'une cellule à l'autre, afin de bien illustrer les variations de signal FRET les cellules ont été synchronisées *in silico* soit à la transition G1/S (apparition des foyers PCNA) ou à la transition S/G2 (disparition des foyers PCNA). Chaque ligne correspond à une cellule unique et la courbe moyenne est affichée en gras.

(B) Des cellules HeLa asynchrones exprimant de manière stable PCNA-RFP et le senseur Chk1 ont été suivies pendant 24h après ajout d'aphidicoline (0.3 μ M) puis synchronisées *in silico* à la transition S/G2. Chaque courbe est une cellule unique, dont la couleur passe de bleu à rouge avec la transition S/G2 et de rouge à vert foncé avec l'entrée en mitose.

IV. LA REACTIVATION DE CHK1 EN PHASE G2 NE CORRELE PAS AVEC LA PRESENCE OU L'ABSENCE D'ANOMALIES CHROMOSOMIQUES EN MITOSE

Le stress réplicatif peut perturber le déroulement de la mitose suivante, y compris au sein de cellules non-tranformées, via la persistance de régions non-répliquées de l'ADN favorisant (i) la présence d'UFB et de cassures double brin notamment au niveau des CFS (ii) la présence de chromosomes retardés ou lagging chromosomes; ces différents évènements pouvant contribuer à l'apparition de lésions localisées (corps nucléaires 53BP1) et micronoyaux à la phase G1 suivante (Wilhelm et al. 2019). Afin de déterminer si la réactivation de Chk1 en phase G2 se traduit par des anomalies de ségrégation des chromosomes à la mitose suivante, un stress réplicatif modéré a été induit sur des cellules RPE1 exprimant le senseur Chk1 ainsi qu'un marqueur de la chromatine H2B-mCherry. De manière importante et comme mentionné précédemment, la réactivation de Chk1 en G2 dans une sous-population de cellules s'accompagne d'une durée de phase G2 plus longue qui pourrait permettre la résolution d'anomalies de l'ADN (**Figure 37A**). J'ai observé que les cellules réactivant Chk1 en G2 ne restent pas significativement plus longtemps en prométophase (**Figure 37B**) et n'ont pas une plus grande proportion de chromosomes retardés en anaphase (**Figure 37C**). De plus, les cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor ayant réactivé Chk1 en G2 n'ont pas une plus grande proportion de micronoyaux au cycle cellulaire suivante (**Figure 37E**). L'ensemble de ces résultats préliminaires suggère que les cellules entrant en mitose suite à la réactivation de Chk1 en G2 n'ont pas a priori un nombre plus important de problèmes de ségrégation des chromosomes que les cellules dont l'activité Chk1 reste minimale en G2.

La présence de corps nucléaires 53BP1 en G1 est un marqueur d'un stress réplicatif au cycle cellulaire précédent et est une des conséquences de la persistance de régions incomplètement répliquées en mitose (Lukas et al. 2011; Spies et al. 2019). Pour évaluer la présence de corps nucléaires 53BP1 en G1 parmi les cellules ayant ou non ré-activé Chk1 en G2, des cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor ont été traitées par une dose faible d'aphidocoline, filmées pendant 20h sur des grilles de localisation puis fixées (**Figure 37D**). Le nombre de corps nucléaires 53BP1 par cellule a alors été évalué par immunofluorescence. Les corps nucléaires 53BP1 présents en G1 sont normalement résolus à la phase S suivante (Spies et al. 2019) : en excluant de comptabiliser les cellules qui ont déjà effectué la transition G1/S *au moment de la fixation*, la différence du nombre de corps nucléaires 53BP1 n'est pas significative entre les cellules dont la mère a ou non ré-activé Chk1 à la phase G2 précédente (**Figure 37F**).

Afin de mieux prendre en compte la dimension transitoire de la présence de corps nucléaires 53BP1 en G1, une lignée RPE1 Chk1 sensor co-exprimant le marqueur Apple-53BP1 a été générée. L'analyse par vidéo-microscopie ne montre pas de différence claire de l'apparition de corps nucléaires 53BP1 entre les deux catégories de cellules réactivant ou non Chk1 en phase G2 au cycle cellulaire précédent (**Figure 37G**).

En conclusion de ces expériences qui restent à confirmer, nos résultats suggèrent que la réactivation de Chk1 en phase G2 n'est pas associée à une plus grande fréquence d'altérations mitotiques, bien que la présence d'UFB reste à analyser, ou post-mitotiques. Comme précédemment mentionné, Il est possible que la réactivation de Chk1 associée à un allongement de la phase G2

permette la résolution (quasi-)complète des anomalies persistantes (tels que les gaps d'ADNss) de l'ADN dû aux perturbations du processus de réplication (voir Discussion).

(Figure sur la page de droite) >

Figure 37 : La réactivation de Chk1 en phase G2 ne corrèle ni avec une durée de mitose plus longue ou la présence de "lagging chromosomes", ni avec la présence de corps nucléaires 53BP1 ou de micronoyaux au cycle cellulaire suivant.

(A, B et C) Des cellules RPE1 H2B-mCherry, Chk1 sensor asynchrones ont été traitées avec 0.3 μ M d'aphidicoline puis filmées pendant 24h.

(A et B): La durée de la phase G2 (A) ou le temps séparant la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD) de l'anaphase (B) sont présentés pour ces deux catégories: (ON) pour les cellules ayant ré-activé Chk1, (OFF) pour les cellules dont l'activité Chk1 est restée minimale, et sont comparés par un t-test dont la p-value est affichée.

(C): La proportion de cellules en anaphase présentant un chromosome retardé (lagging chromosome) est représentée pour les deux catégories décrites en (A).

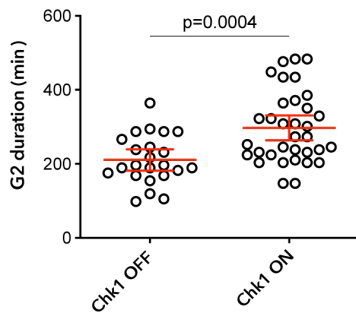
(D) Disposition de la grille gravée au fond des boîtes utilisées pour filmer et identifier en IF les cellules dans les figures (E) et (F)

(E): Des cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor ont été traitées avec 0.3 μ M d'aphidicoline puis filmées pendant 20h. Après fixation des cellules, la proportion de cellules filles possédant un micronoyau a été comparée entre les cellules filles issues d'une cellule mère ayant eu une réactivation (ON) ou non (OFF) de Chk1 en phase G2. Moyenne + SEM. N=3, chaque réplica est affiché.

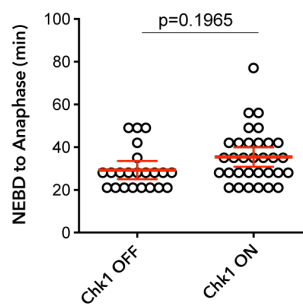
(F): Des cellules RPE1 mRuby-PCNA/+, Chk1 sensor ont été traitées avec 0.3 μ M d'aphidicoline puis filmées pendant 20h. À la fin de l'enregistrement, les cellules ont été fixées et le nombre de corps nucléaires 53BP1 analysé par immunofluorescence dans les cellules filles après division cellulaire. Le nombre de corps nucléaires 53BP1 a été comparé au sein de cellules filles issues de cellules (i) ayant eu une activité Chk1 minimale en G2 ("No Chk1 act."), ou ayant eu une réactivation de Chk1 en G2 (ii) de manière persistante ("persistent Chk1 act.") ou (iii) transitoire ("transient Chk1 act."). Les corps nucléaires 53BP1 étant résolus en phase S, seules les cellules encore en G1 au moment de la fixation ont été considérées. Le nombre de corps nucléaires 53BP1/cellule est systématiquement comparé à la condition "No Chk1 act." par un t-test et la p-value est indiquée.

(G): Des cellules RPE1 53BP1-mCherry, Chk1 sensor ont été suivies par vidéo-microscopie pendant 24h et traitées par 0.3 μ M d'aphidicoline au temps indiqué (Trait vertical rouge). La progression S -> G2 et G2 -> M est représentée pour le premier cycle cellulaire. Pour le second cycle, le timing d'apparition et le nombre de corps nucléaires 53BP1 est représenté. Chaque ligne horizontale représente une cellule unique. Les cellules ayant eu une réactivation de Chk1 en G2 sont en haut, celles restées avec une activité Chk1 minimale en G2 sont en bas.

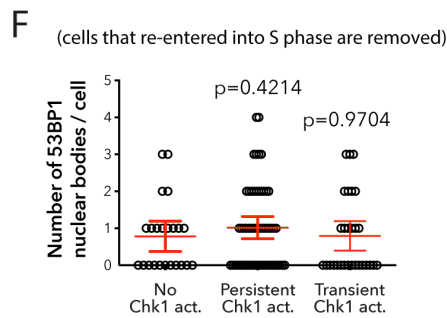
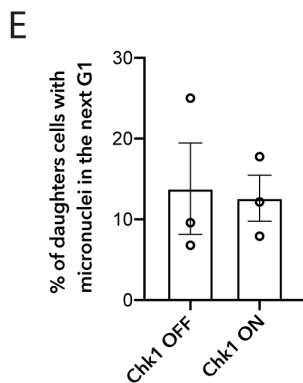
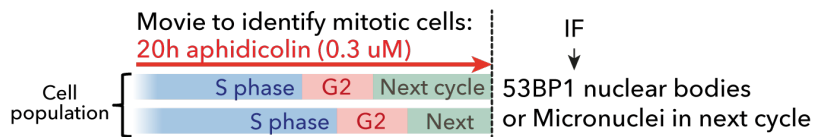
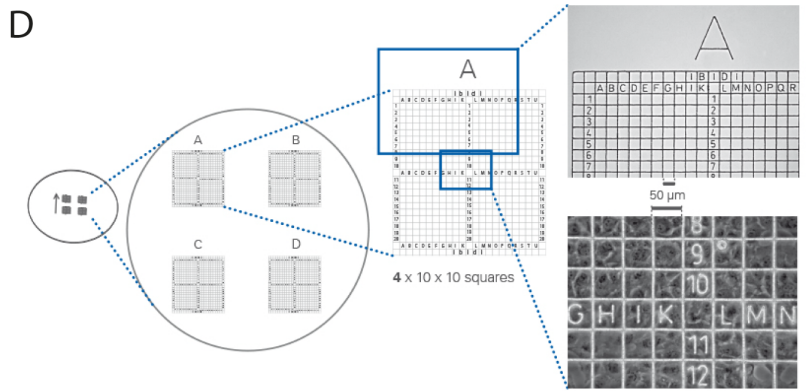
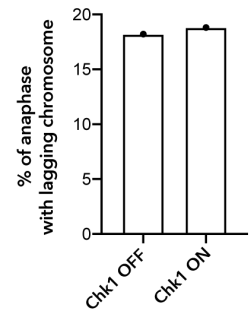
A hTERT-RPE1
Chk1 sensor - H2B-mCherry
(+aphidicolin 0.3 μ M)



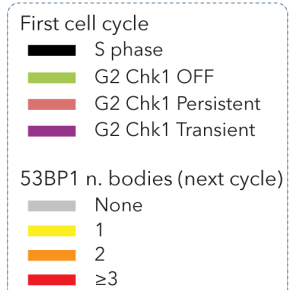
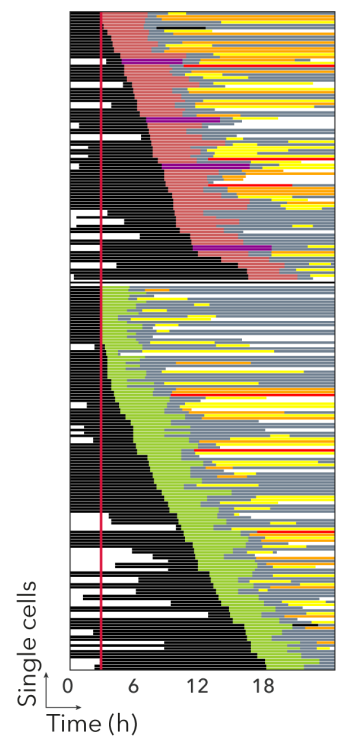
B hTERT-RPE1
Chk1 sensor - H2B-mCherry
(+aphidicolin 0.3 μ M)



C hTERT-RPE1
Chk1 sensor - H2B-mCherry
(+aphidicolin 0.3 μ M)



G hTERT-RPE1 Chk1 sensor
Apple-53BP1
(+aphidicolin 0.3 μ M)



V. La protéine p21 s'accumule en phase G2 suite à un stress répliatif et pourrait être à l'origine des différentes catégories de cellules observées

L'accumulation prononcée de la protéine p21 en phase G2 suite à des radiations ionisantes ou à un traitement à l'étoposide conduit à l'entrée des cellules en sénescence en phase G2 (Krenning et al. 2014). D'autre part, il a été proposé que l'activation de la voie p53-p21 en G2 pourrait également influencer le choix entre prolifération et quiescence au cycle cellulaire suivant (H. W. Yang et al. 2017; Spencer et al. 2013). Pour tester si la protéine p21 s'accumule en phase G2 *en conditions de stress répliatif*, des cellules RPE1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor ont été traitées avec 0.3 μ M d'aphidicoline, filmées pendant 24h puis fixées afin de mesurer par immunofluorescence le niveau de la protéine p21 dans les cellules en G2 *au moment de la fixation*.

Mes résultats préliminaires, qui restent à reproduire, montre qu'il existe une corrélation linéaire entre le temps passé en phase G2 et le niveau d'expression de p21 (**Figure 38**). Par conséquent, il est possible qu'au-dessus d'un certain seuil d'expression les cellules entrent en sénescence en phase G2, ce qui pourrait correspondre aux cellules que nous avons classifiées comme "No NEBD", alors qu'un seuil plus faible dû à un allongement modéré de la phase G2 pourrait favoriser l'entrée en quiescence au cycle cellulaire suivant, correspondant au comportement des cellules classifiées comme ayant un profil Chk1 en G2 de type "transient" et "persistent Chk1 re-activation".

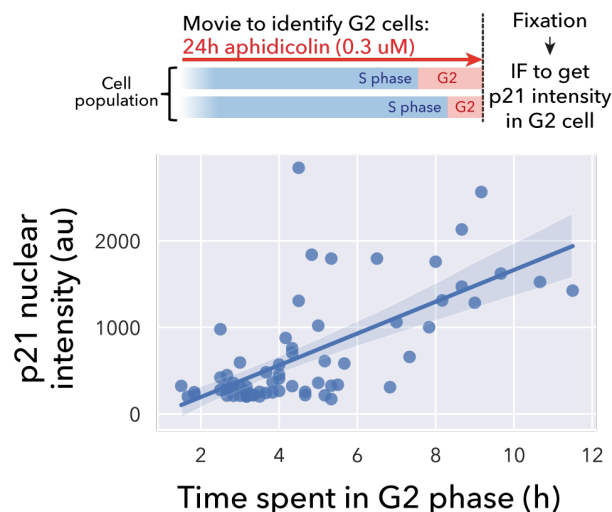


Figure 38 : Le niveau d'expression de p21 augmente linéairement en phase G2 suite à un stress répliatif.

Des cellules **RPE1 mRuby-PCNA/+ Chk1 sensor** ont été traitées avec 0.3 μ M d'aphidicoline puis filmées pendant 24h. Après fixation des cellules, le niveau de p21 dans chaque cellule en phase G2, à la fin du film, est déterminé par immunofluorescence et est représenté en fonction du temps que la cellule a déjà passé en G2 au moment de la fixation.

DISCUSSION

DEVELOPPEMENT D'UN SENSEUR FRET D'ACTIVITE CHK1 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Au cours de mon doctorat, j'ai développé un senseur d'activité kinase codé génétiquement et basé sur des variations de transfert d'énergie entre deux protéines fluorescentes (FRET ou Förster Resonance Energy Transfer). Cet outil fluorescent, dont j'ai montré la spécificité pour la kinase Chk1 versus Chk2, m'a permis d'étudier la dynamique d'activité Chk1 au sein de chaque cellule vivante au cours de la prolifération de populations cellulaires asynchrones. Les principaux résultats obtenus par cette approche sont (i) la caractérisation de l'activité Chk1 au cours du cycle cellulaire, (ii) la mise en évidence qu'en présence d'un stress répliatif, une fraction des cellules ré-activer Chk1 au cours de la phase G2 avec différents profils de réactivation par des mécanismes qui restent à caractériser, (iii) qu'une faible proportion de cellules entre en mitose malgré la présence d'un mécanisme de contrôle Chk1-dépendent en G2, démontrant une adaptation à celui-ci (ou "checkpoint adaptation").

Concernant le premier point, une publication récente a pu estimer l'activité d'ATR en phase S en mesurant le niveau de phosphorylation de l'histone H2AX (signal γ -H2AX), un de ses substrats, par immunofluorescence. En analysant en parallèle le niveau d'incorporation d'EdU et l'intensité du signal DAPI, ces auteurs ont pu mettre en évidence une augmentation de l'activité d'ATR de la phase G1 à S, puis une décroissance en G2 (**Figure 39**) (Saldivar et al. 2018). Cette approche repose sur une comparaison entre deux populations cellulaires traitée ou non par un inhibiteur d'ATR, afin d'identifier la composante ATR-dépendante du signal γ -H2AX, et donne accès à un niveau *moyen* d'activité ATR dans des sous-populations de cellules, bien que l'aspect cinétique soit absent et qu'il reste délicat d'identifier de manière précise les transitions du cycle cellulaire, notamment G1/S et S/G2. L'approche de vidéo-microscopie développée ici n'est pas sujette à ces limitations et m'a permis de déterminer que dans chaque cellule unique et de manière parfaitement reproductible, l'activité Chk1 augmente avec l'apparition des foyers de réplication PCNA positifs à la transition G1/S puis diminue progressivement avec une cinétique corrélée à la disparition de ces foyers à la transition S/G2.

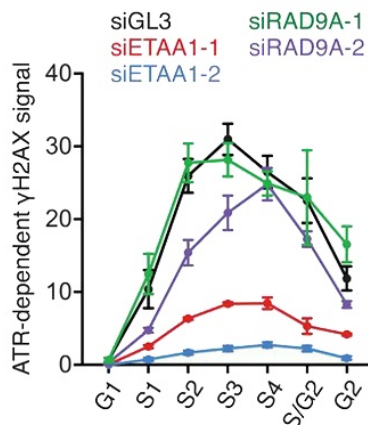


Figure 39 : Mesure d'un niveau d'activité ATR en phase S dans différents contextes de déplétion par siRNA (adapté de (Saldivar et al. 2018))

De manière notable, cette approche m'a permis de mettre en évidence une hétérogénéité non génétique de la réponse cellulaire au sein d'une population homogène en réponse à un stress réplicatif, ce qui n'aurait pas pu être observé par un autre dispositif expérimental. Dans ce cadre, nous avons pu démontrer l'existence d'une très faible population de cellules, représentant ~1 à 3% des cellules totales, capables de surmonter une signalisation Chk1 active en phase G2 pour entrer en mitose, et mis en évidence une corrélation entre les différents profils Chk1 observés en G2 et le devenir des cellules au cycle cellulaire suivant.

Bien que puissante et précise pour des informations temporelles et quantitatives, notre choix d'une approche de suivi de population de cellules par vidéo-microscopie s'est heurtée à la lourdeur de l'analyse des données générées. Ce problème a été exacerbé dans les cellules hTert-RPE1 par rapport à d'autres lignées cellulaires (HeLa, U2OS) du fait de leur mobilité importante qui complique la segmentation de chaque cellule ou cours du temps pour des mesures quantitatives. Pour résoudre ce problème, j'ai développé et implémenté au sein du laboratoire des algorithmes de suivi automatique suffisamment robustes pour fonctionner dans une population dense observée pendant plusieurs jours d'acquisition, ainsi que des algorithmes pour détecter automatiquement les transitions S/G2 et G2/mitose. Ces approches d'analyse automatique sont cependant imparfaites et nécessitent fréquemment de procéder à une vérification manuelle de la segmentation, du suivi et de l'annotation de la phase du cycle de chaque cellule.

ACTIVITE CHK1 EN PHASE S NORMALE

L'ACTIVATION DE CHK1 EN PHASE S NORMALE (OU NON-PERTURBEE) EST-ELLE DUE A UN STRESS REPLICATIF ENDOGENE OU EST INTRINSEQUEMENT LIEE AUX ORIGINES DE REPLICATION ACTIVES ?

L'inhibition de l'activité kinase Cdc7 en phase S conduit en ~50 minutes à l'inactivation de Chk1, soit un temps correspondant à la durée de vie moyenne d'un foyer de réplication (Berezney, Dubey, et Huberman 2000) ainsi qu'au temps nécessaire pour que deux fourches de réplication opposées se rejoignent (Chagin et al. 2016). La kinase Cdc7 jouant un rôle critique dans l'activation ("firing") de nouvelles origines, ces résultats suggèrent que le niveau d'activité Chk1 dépend directement de l'activation d'origines de réplication et donc du nombre de fourches actives à tout instant. Dans ce cadre, il a été observé en microscopie à super-résolution que le nombre de foyers de réplication actifs simultanément est constant au cours de la phase S (Chagin et al. 2016) et, en accord, j'ai observé que le niveau d'activité Chk1 se maintient pendant la durée du processus de réplication et ne décroît qu'en fin de phase S lorsque les foyers de réplication PCNA positifs se désassemblent.

Récemment, il a été proposé chez la levure bourgeonnante que l'initiation de la réplication active transitoirement la voie Mec1/Rad53, via l'induction d'un stress réplcatif dû à l'utilisation massive du stock de dNTP préexistant (Forey et al. 2020). Dans les cellules RPE-1, le niveau d'activité Chk1 étant constant au cours de la phase S, il est peu probable qu'il soit une conséquence d'un stress transitoire à la transition G1/S. Néanmoins, cette possibilité reste envisageable dans d'autres types cellulaires que nous avons utilisés. J'ai ainsi pu observer un pic transitoire d'activation de Chk1 en début de phase S spécifiquement dans les cellules HeLa, dérivées d'un adénocarcinome. De manière inattendue, ce pic d'activation constitue la seule activité Chk1 notable au cours de la phase S dans ces cellules. Ces résultats suggèrent que plusieurs mécanismes indépendants pourraient participer à l'activation de Chk1 : (i) Chk1 pourrait être transitoirement activée en début de S via un stress réplcatif dû à l'épuisement rapide d'un facteur limitant, comme proposé chez la levure (Forey et al. 2020), (ii) son niveau activation est directement lié au nombre d'origines actives à tout instant, en relation avec la présence d'ADN simple brin au niveau des fourches de réplication (Figure 40).

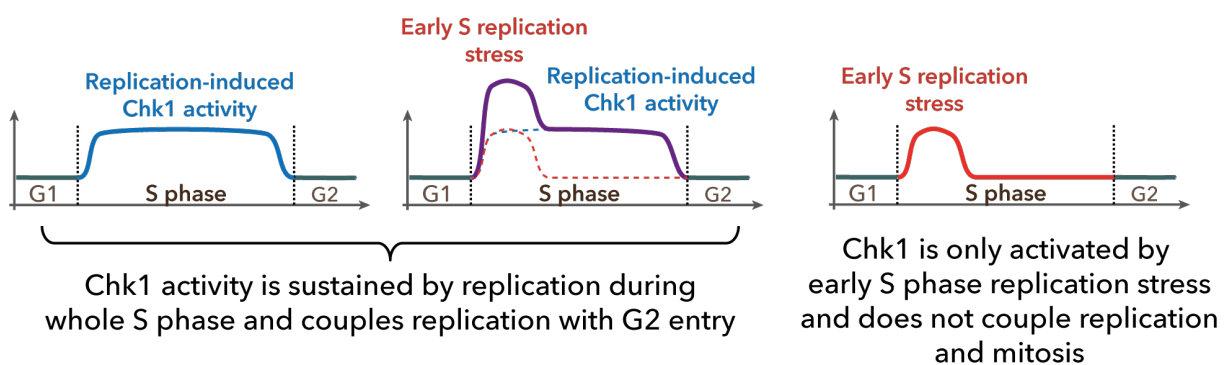


Figure 40 : Différents modèles possibles d'activation temporelle de la voie ATR/Chk1 au cours de la progression en phase S.

STRUCTURES ET VOIES DE SIGNALISATION PERMETTANT L'ACTIVATION DE CHK1 EN PHASE S NORMALE

Comme mentionné ci-dessus, j'ai pu observer une activité Chk1 constante pendant la progression en phase S dans les cellules U2OS et RPE-1, mais pas dans la lignée cancéreuse HeLa. Cependant, la voie ATR/Chk1 reste fonctionnelle dans ces dernières et peut être activée par divers stress génotoxiques (**Figure 36, page 144**), suggérant que cette absence d'activation dans les cellules HeLa pourrait éventuellement refléter l'inactivation d'un élément de signalisation intervenant spécifiquement au cours d'une phase S normale. Deux voies principales permettant l'activation de la signalisation ATR/Chk1 ont été décrites : la première dépend de TopBP1 et serait préférentiellement impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, tandis que la seconde dépend du facteur ETAA1 et permettrait de maintenir une activité Chk1 basale en phase S (**Figure 41**) (Saldivar et al. 2018). Une hypothèse possible mais restant à tester expérimentalement serait que la voie ETAA1 est atténuée dans la lignée cellulaire HeLa. La présence de la voie TopBP1 permettrait d'activer Chk1 en réponse à un stress réplcatif, y compris transitoire en début de S, mais pas de maintenir une activité Chk1 constante au cours de la réplication. Cette hypothèse est cependant à nuancer par l'observation que la déplétion d'ETAA1 dans les cellules HeLa diminue le niveau d'auto-phosphorylation de Chk1 observé par Western-blot (résidu S296P) en absence de stress (Michelena et al. 2019), suggérant que la voie ETAA1 y conserve un rôle, même partiel. Une hypothèse alternative, serait une sur-activation dans ces cellules de phosphatases opposées à l'activation de la voie ETAA1 et/ou à la phosphorylation de notre senseur Chk1 et qui restent à identifier.

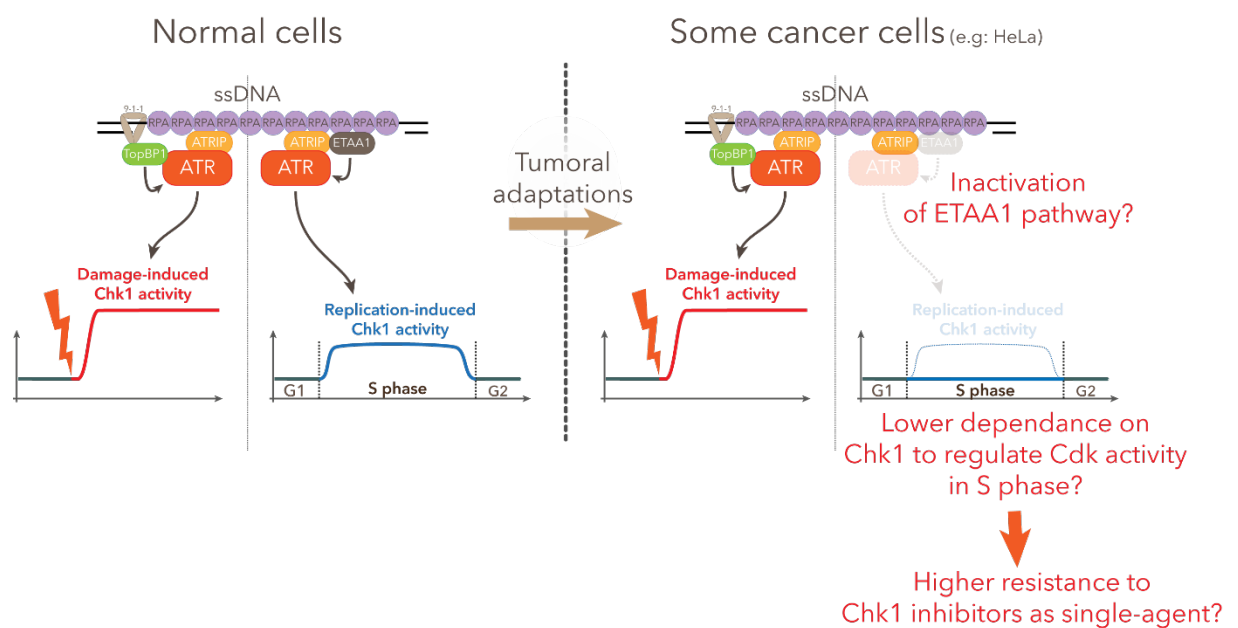


Figure 41 : Mécanismes spéculatifs d'activation de la voie ATR/Chk1 en conditions normales et de stress génotoxique.

VARIATIONS DE L'ACTIVITE CHK1 BASALE OU INDUITE DANS LES CELLULES CANCEREUSES ?

ATR et Chk1 sont des gènes essentiels dont l'inactivation est associée à une létalité embryonnaire précoce (Liu et al. 2000; Takai et al. 2000, Brown et al. 2000). Il n'existe pas à priori de cellules au sein desquelles la voie ATR/Chk1 est complètement inactivée, bien qu'une mutation hypomorphe (A2101G) affectant le niveau d'expression d'ATR ait été identifiée dans le syndrome de Seckel (O'Driscoll et al. 2003). La présence d'un stress réplcatif étant une caractéristique récurrente des lésions cancéreuses et pré-cancéreuses, il est possible que certaines cellules cancéreuses soient particulièrement dépendantes de la voie ATR/Chk1 pour maintenir la réplication du génome et leur survie (Rundle et al. 2017). L'inactivation de la voie ATR/Chk1 étant une stratégie potentielle pour augmenter l'effet cytotoxique d'agents induisant des lésions de l'ADN, notamment dans un contexte p53 déficient qui pourrait permettre de forcer l'entrée des cellules en mitose, de nombreux inhibiteurs pharmacologiques sont en cours de caractérisation. Dans ce cadre, il a été rapporté que la cytotoxicité d'inhibiteurs de Chk1 utilisés en agents uniques (ou "monothérapie") varie fortement sur un ensemble de 66 lignées cancéreuses testées et permet d'identifier au moins deux groupes dits résistant ou sensible (Montano et al. 2012; Sakurikar et al. 2016). L'approche que j'ai développée au cours de mon doctorat pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la sensibilité et/ou de la résistance des cellules cancéreuses, en caractérisant la régulation de l'activité Chk1 au cours de la prolifération, en absence ou suite à l'introduction d'agents génotoxiques, ceci afin d'optimiser des approches ciblant la voie ATR/Chk1 et/ou d'identifier des marqueurs prédictifs de l'efficacité de cette stratégie.

INACTIVATION ET RE-ACTIVATION DE CHK1 A LA TRANSITION S/G2

Lorsque un dommage est induit *spécifiquement* en phase G2 par des radiations ionisantes ou un agent pharmacologique génotoxique (ex: etoposide), l'arrêt ou le ralentissement du cycle cellulaire peut être en partie compensé par l'inhibition de la voie ATR/Chk1 (F. M. Feringa et al. 2018; Krenning et al. 2014; W Bruinsma et al. 2017; Jaiswal et al. 2017), indiquant que la voie ATR/Chk1 peut-être activée en phase G2. De même, suite à un stress réplicatif induit à l'aphidicoline ou à l'hydroxyurée, l'inhibition pharmacologique de la voie ATR/Chk1 induit une entrée prématurée en mitose. Cependant, dans le contexte d'un stress réplicatif, la voie ATR/Chk1 est vraisemblablement activée par des structures liées au processus de réplication (fourches bloquées, réparation et redémarrage des fourches) et il n'est pas évident que l'activité ATR/Chk1 puisse perdurer une fois que la réplication est terminée. Afin d'expliquer comment la voie ATR/Chk1 pourrait inhiber l'entrée en mitose en conditions de stress réplicatif, le consensus actuel tend à supposer que la réplication de l'ADN continue jusqu'à des étapes très tardives du cycle et "déborde" sur la phase G2, indépendamment de l'expression des inducteurs mitotiques.

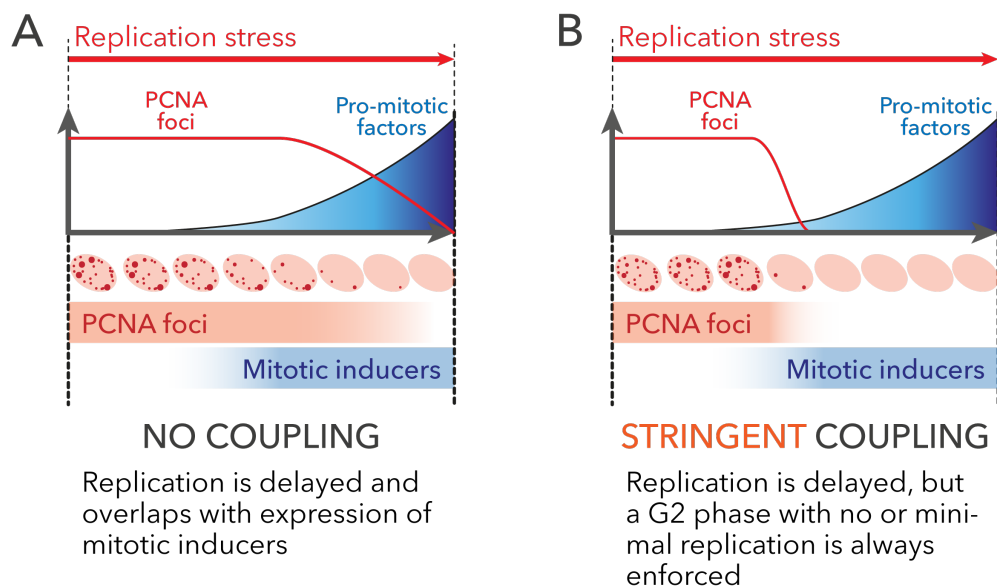


Figure 42 : Couplage entre la réplication de l'ADN et l'induction des inducteurs mitotiques en conditions de stress réplicatif.

(A) Modèle précédent: la phase G2 permet de terminer la réplication de l'ADN jusqu'à l'entrée des cellules en mitose.

(B) Modèle alternatif : même lorsque la réplication est retardée en conditions de stress, l'expression des inducteurs mitotiques est couplée à la fin de la réplication de l'ADN et à la transition S/G2.

Mon travail remet fortement en cause ce modèle et démontre qu'en présence d'un stress réplicatif Chk1 est initialement activée, de manière dose-dépendante à l'intensité du stress, mais que son activité chute systématiquement à la transition S/G2 qui marque la terminaison du processus de réplication, avant éventuellement de ré-augmenter dans une fraction des cellules au cours

d'une phase G2 prolongée, inhibant ainsi le processus d'entrée en mitose. De plus, mes résultats suggèrent fortement que la transition S/G2 associée à l'inactivation de Chk1 est un passage obligatoire, aussi bien en conditions normales que en présence d'un stress réplicatif, pour initier l'activation du facteur de transcription FoxM1, et permettre l'exécution de son programme de transcription des inducteurs mitotiques, dont Plk1 (Figure 42) (Saldivar et al. 2018; Gheghiani et al. 2017).

MECANISMES PERMETTANT LA REACTIVATION DE CHK1 EN G2 ?

Suite à un stress réplicatif, on n'observe pas de réapparition de foyers de réplication PCNA positifs en phase G2. Cependant, dans la mesure où les foyers PCNA positifs en phase S sont constitués de plusieurs dizaines de fourches de réplication actives (Chagin et al. 2016), il n'est pas possible d'exclure totalement la persistance d'un nombre *réduit* de fourches de réplication isolées et toujours actives en G2. Plus surprenant, le niveau d'activité de Chk1 en G2 en conditions de stress réplicatif est très similaire à celui observé au cours d'une phase S normale, où plusieurs milliers de fourches de réplication sont actives à tout instant (Chagin et al. 2016). Plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de cette réactivation :

STRESS REPLICATIF INDUIT A L'APHIDICOLINE VERSUS L'HYDROXYUREE

Les sites fragiles communs (CFS) sont des régions du génome répliquées tardivement au cours de la phase S, caractérisées par une faible densité d'origines de réplication et particulièrement sensibles à un stress réplicatif (pour revue, (Debatisse et Rosselli 2019)). Les différentes altérations observables au niveau de ces régions, comme les UFB, suggèrent fortement la persistance d'intermédiaires de réplication et/ou de réparation, de la phase S à l'entrée des cellules en mitose (voir Introduction).

Dans mes travaux, j'ai observé qu'un traitement à l'aphidicoline conduisait, dans une fraction des cellules, à la réactivation de Chk1 en phase G2, contrairement à un traitement à l'hydroxyurée (HU). Cette différence d'effet entre ces deux types d'agents génotoxiques est surprenante, mais pourrait donner certains indices sur les événements conduisant à la ré-activation de Chk1 en G2. L'expression (cassures) des CFS est fortement induite en mitose suite à un traitement à l'aphidicoline (Glover et al. 1984), alors qu'elle est moins prononcée par d'autres traitements, comme l'HU. Plus précisément, un traitement par de fortes doses d'HU peut induire des cassures de l'ADN en mitose, mais à d'autres loci que ceux observés en présence d'aphidicoline et vraisemblablement via des mécanismes différents (Barlow et al. 2013). En accord et contrairement à l'aphidicoline, l'HU n'induit que très peu la présence de corps nucléaires 53BP1 à la phase G1 suivante (Harrigan et al. 2011; Ercilla et al. 2020). Il est possible que dans nos conditions expérimentales :

(i) Le traitement à l'HU versus l'aphidicoline ait favorisé l'*arrêt* des fourches de réplication et le désassemblage de la machinerie de réplication plutôt qu'un *ralentissement* des fourches de réplication, respectivement. Dans les conditions HU, le redémarrage des fourches pourrait impliquer l'apparition de cassures double brin et des mécanismes de recombinaison (Petermann et al. M. Cell 2010). En accord, un traitement HU induit un signal γ -H2AX beaucoup plus prononcé que sous traitement aphidicoline (Koundrioukoff et al. 2013). A l'inverse, le ralentissement des fourches en conditions aphidicoline pourrait favoriser des événements de re-priming en aval des polymérase

ralenties, qui chez les vertébrés impliquent la primase-polymérase PrimPol (J. Bianchi et al. 2013; García-Gómez et al. 2013; Kobayashi et al. 2016; Mourón et al. 2013; Schiavone et al. 2016; Wan et al. 2013; Bai et al. 2020; Šviković et al. 2019). Les événements de re-priming conduisent à la formation de sections d'ADN simple brin ou "gaps" en arrière des fourches de réplication qui peuvent persister en phase G2 (Zellweger et al. 2015; Lopes, Foiani, et Sogo 2006) comme discuté au paragraphe suivant.

(ii) A concentration égale, le traitement HU a induit à un stress répliatif plus élevé, visualisable par le niveau d'activité Chk1 (Koundrioukoff et al. 2013)(voir **Figure 32**) qui pourrait conduire à une inhibition plus prononcée des activités Cdk, i.e. Cycline A2-Cdk2 et Cycline A2-Cdk1, ou d'une de ces activités plus spécifiquement. Comme discuté ci-dessous, différents mécanismes de réparation en phase G2 sont Cdk-dépendants.

PRISE EN CHARGE EN G2 DE GAPS D'ADN SIMPLE BRIN EN ARRIERE DES FOURCHES DE REPLICATION ?

Les mécanismes de résolution de gaps d'ADN simple brin en arrière des fourches de réplication ont été particulièrement étudiés chez la levure (Pour revue (Branzei et Szakal 2016; Gao et al. 2017)) et peuvent impliquer une synthèse d'ADN par une polymérase translésionnelle ou, alternativement, des mécanismes d'échanges de brin d'ADN afin d'assurer la réplication de la région lésée (Lopes, Foiani, et Sogo 2006).

Il est important de noter que chez la levure différents travaux suggèrent que la prise en charge de ces gaps peut avoir lieu à distance de la fourche de réplication et peut être initiée en phase G2 sans qu'il n'y ait d'impact majeur sur le déroulement de la phase S (Hishida et al. 2009; Karras et Jentsch 2010; Daigaku, Davies, et Ulrich 2010)), suggérant la possibilité d'un *découplage temporel* entre la réplication de l'ADN et la résolution de ces structures. En absence de résolution de ces gaps par des mécanismes post-répliatifs, les levures se bloquent en phase G2 avec une activation constitutive du checkpoint Rad53-dépendent (Hishida et al. 2009; Callegari et al. 2010; Daigaku, Davies, et Ulrich 2010). L'activation de Rad53 dans ces conditions dépend d'Exo1 (García-Rodríguez et al. 2018), suggérant une résection et un agrandissement transitoire des portions d'ADN simple brin (gaps) à l'origine de l'activation du checkpoint.

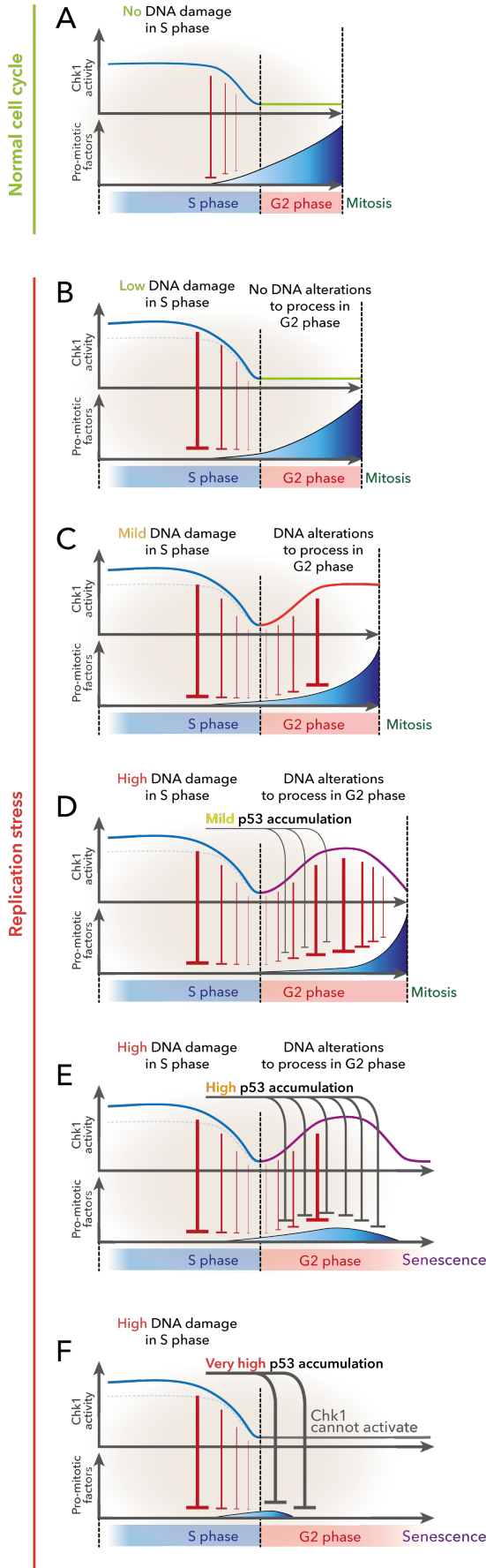
Dans notre système basé sur les cellules humaines RPE-1, il est possible que des gaps d'ADN simple brin s'accumulent en arrière des fourches de réplication en conditions de stress répliatif induit spécifiquement à l'aphidicoline et que le passage en phase G2 s'accompagne de l'activation de mécanismes de résection, augmentant la quantité totale d'ADN simple brin et le niveau d'activité de la voie ATR/Chk1. Nous émettons l'hypothèse, que l'initiation de ces mécanismes de réparation spécifiquement en phase G2 serait due à une augmentation du niveau d'activité Cdk (ou d'une Cdk spécifique, Cycline A2-Cdk2 versus Cycline A2-Cdk1) à la transition S/G2 liée à la terminaison du processus de réplication (Pagano et al. 1992; Goldstone et al. 2001). Dans les cellules humaines, la résection d'ADN simple brin peut être accomplie par Exo1, DNA2 ou CtIP-Mre11 dont l'activité est régulée par Cdk2 et/ou Cdk1 (Tomimatsu et al. 2014; Xuefeng Chen et al. 2011; Huertas et Jackson 2009; Anand et al. 2016). Dans ce cadre, mes travaux préliminaires montrent que la déplétion par siRNA ou l'inhibition *individuelle* de ces exonucléases n'empêche pas la

réactivation de Chk1 en G2, suggérant soit que celles-ci ne sont pas impliquées, soit l'existence d'une importante redondance fonctionnelle entre ces acteurs qui nous reste à approfondir.

Enfin, il sera important de confirmer que la réactivation de Chk1 en phase G2 peut survenir dans des contextes plus proches de la physiopathologie humaine, comme suite à la surexpression ou à l'activation d'oncogènes. Cet aspect est en cours de réalisation.

REGULATION DE L'ENTREE EN MITOSE EN PRESENCE D'APHIDICOLINE

Mes travaux mettent en évidence une hétérogénéité des profils d'activité Chk1 en phase G2 entre



les cellules d'une même population, suggérant que la régulation de l'entrée en mitose en présence d'aphidicoline est le produit de l'intégration de multiples signaux. Basé sur les données collectées, je propose le modèle spéculatif ci-contre (Figure 43) et détaillé ci-dessous.

Figure 43 : Modèle du contrôle de l'entrée des cellules en mitose en présence d'aphidicoline.

(A) Au cours d'un cycle cellulaire normal, l'inactivation de Chk1 en fin de phase S permet l'expression et l'activation de facteurs pro-mitotiques.

En conditions de stress répliatif plusieurs phénotypes distincts surviennent *séquentiellement*, reliés à la durée passée en phase S sous stress répliatif :

(B) « No réactivation » phénotype: Chk1 s'inactive à la transition S/G2, mais le niveau d'activité plus élevé de Chk1 en fin de phase S retarde l'accumulation des facteurs pro-mitotiques, conduisant à une phase G2 légèrement plus longue.

(C) « Persistent réactivation » phénotype : La réactivation de Chk1 en phase G2 retarde fortement, mais n'empêche pas l'accumulation lente et l'activation de facteurs pro-mitotiques. Dans ces conditions, les facteurs pro-mitotiques finissent par surmonter le checkpoint ATR/Chk1-dépendent et induisent une entrée des cellules en mitose.

(D) « Transient réactivation » phénotype : La réactivation de Chk1 en phase G2 et l'expression *modérée* de p53 (et p21) retarde d'autant plus l'accumulation de facteurs pro-mitotiques et pourrait également conduire à la répression progressive de l'activité Chk1 en fin de phase G2. L'accumulation de facteurs pro-mitotiques finit par forcer l'entrée des cellules en mitose.

(E) « Transient réactivation and G2 arrest » phénotype : Alternativement, l'accumulation à un niveau plus prononcé de p53 et p21 peut être suffisante pour inhiber totalement les activités Cdk et empêcher l'entrée en mitose.

(F) « No reactivation and G2 arrest » phénotype : Enfin, l'accumulation forte de p53 et p21 peut être suffisante pour inhiber la réactivation de Chk1 en G2 et l'entrée des cellules en mitose, deux évènements Cdk-dépendant.

PARMI LES CELLULES QUI RE-ACTIVENT CHK1, QUELS MECANISMES INDUISENT UNE CHUTE D'ACTIVITE CHK1 EN FIN DE G2 DANS UNE FRACTION DE LA POPULATION ?

J'ai observé dans une fraction de cellules une réactivation transitoire de Chk1 en phase G2 (Phénotype « Transient reactivation », Figure 43) avant l'entrée en mitose, suggérant que Chk1 pourrait s'inactiver tandis que les altérations de l'ADN sous-jacentes sont progressivement réparées. A l'encontre de ce modèle, la grande majorité de ces cellules s'arrêtent à la phase G1 suivante, suggérant que les altérations de l'ADN, au moins en partie, pourraient toujours être non résolues en G1. L'inactivation progressive de Chk1 observée en fin de G2 ne reflèterait donc pas la réparation effective de l'ADN, mais plutôt une inactivation de la voie ATR/Chk1 avant l'entrée en mitose.

Dans le sens de cette hypothèse, la kinase pro-mitotique Plk1 peut induire la dégradation β -TRCP dépendante de la claspine, un cofacteur nécessaire pour l'activation de Chk1 par ATR (Niels Mailand et al. 2006; Mamely et al. 2006; Peschiaroli et al. 2006). Néanmoins, l'activation de Plk1, au moins en conditions normales, ne survient que ~40 minutes avant l'entrée en mitose (Gheghiani et al. 2017), ce qui est trop tardif pour induire la baisse d'activité Chk1 observable ~2h avant la NEBD.

Un mécanisme alternatif repose sur l'axe p53-p21. En effet, l'induction ectopique de p53 ou p21 est suffisante pour induire la répression *transcriptionnelle* de Chk1 (Gottifredi et al. 2001) et, suite à un stress réplicatif, la protéine p21 endogène (Knock-In fluorescent) s'accumule en phase G2 (Barr et al. 2017), suggérant que l'accumulation de p53 et p21 pourrait conduire à l'inactivation progressive de Chk1. En accord avec cette hypothèse, les cellules ayant une réactivation transitoire de Chk1 avant d'entrer en mitose ont la phase G2 la plus longue, suggérant que la mitose pourrait être retardée à la fois par l'action de Chk1 et p21.

FACTEURS PRO-MITOTIQUES QUI FORCENT LA TRANSITION EN MITOSE MALGRE LA PRESENCE D'UN CHECKPOINT ACTIF ?

L'observation de cellules entrant en mitose malgré une signalisation active d'un checkpoint ATR/Chk1-dépendant implique l'existence de mécanismes capables d'induire l'adaptation à celui-ci et de *forcer* l'entrée en mitose. Comme mentionné ci-dessus, Plk1 pourrait permettre l'inactivation de la signalisation ATR/Chk1 en induisant la dégradation de la claspine (Mamely et al. 2006; Niels Mailand et al. 2006; Peschiaroli et al. 2006). En accord, Cdc5 et Plk1 ont été impliquées dans l'adaptation au checkpoint G2/M induit par des cassures double brin chez la levure bourgeonnante et l'homme respectivement (Toczyski, Galgoczy, et Hartwell 1997; Syljuåsen et al. 2006; Liang et al. 2014), alors que Plx1 contribue à l'adaptation à un stress réplicatif dans des extraits d'ovocytes de Xénope (Hae Yong Yoo et al. 2004). Identifier les mécanismes moléculaires et les facteurs protéiques capables de forcer l'entrée de cellules en mitose malgré des checkpoints de l'intégrité de l'ADN actifs constitue un champ d'investigation particulièrement excitant dans la compréhension des événements liés à la tumorigénèse.

IMPACT AU CYCLE CELLULAIRE SUIVANT ET EVOLUTION

QUELLE INFORMATION EST TRANSMISE AU CYCLE CELLULAIRE SUIVANT POUR INHIBER L'ENTREE EN PHASE S ?

J'ai observé que la grande majorité des cellules entrant en mitose suite à une réactivation de Chk1 en G2 ont tendance à s'arrêter à la phase G1 du cycle cellulaire suivant, contrairement aux cellules n'ayant pas eu cette réactivation. Une hypothèse séduisante serait que les cellules ayant ré-activé Chk1 en G2 aient transmis, au moins une partie, des dommages de l'ADN à leurs cellules filles, lesquels induisent un arrêt en phase G1 au cycle cellulaire suivant. A l'encontre de ce modèle, je n'ai pas pu mettre en évidence de corrélation entre la réactivation de Chk1 en phase G2 et la présence de corps nucléaires 53BP1 ou de micronoyaux au cycle cellulaire suivant, des structures décrites suite à un stress réplcatif, suggérant que la présence de dommages de l'ADN n'est pas *l'unique facteur* pouvant induire l'arrêt des cellules en G1.

En présence d'un stress réplcatif, l'accumulation des protéines p53 et p21 est observable dès la transition S/G2 (Arora et al. 2017; Barr et al. 2017). P21 n'étant pas dégradée en mitose, il a été proposé que l'induction de dommages de l'ADN puisse inhiber la prolifération au cycle cellulaire suivant via la transmission aux cellules filles de niveaux élevés de p21 (H. W. Yang et al. 2017; Barr et al. 2017). Dans ce cadre, j'ai observé que la réactivation de Chk1 conduit à une phase G2 plus longue, ce qui pourrait contribuer à l'accumulation à des niveaux élevés de p21 qui, transmis à la descendance cellulaire, favoriseraient un arrêt définitif en G1 (**Figure 44**).

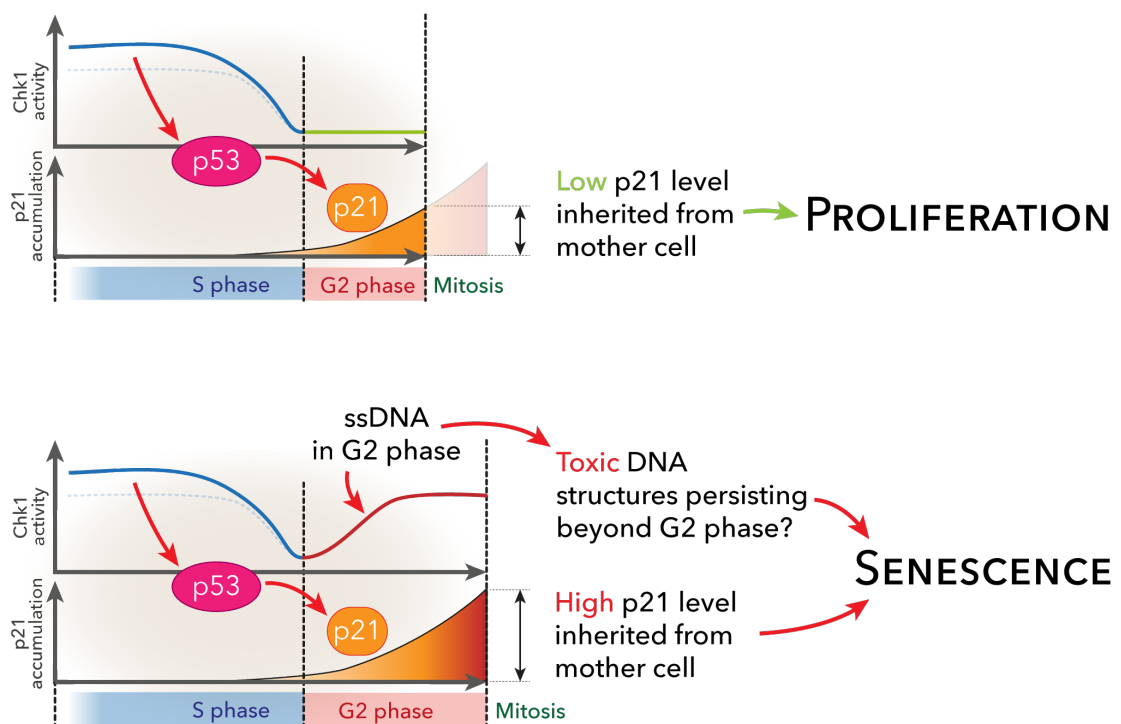


Figure 44 : Modèle hypothétique des mécanismes à l'origine du devenir cellulaire en fonction de la réactivation ou non de Chk1 en phase G2.

L'ADAPTATION AUX CHECKPOINTS DE L'ADN PERMET-ELLE AUX CELLULES DE CONTINUER A PROLIFERER ?

Chez la levure bourgeonnante, il a été observé que jusqu'à ~40% de levures WT pouvait surmonter un stress génotoxique induit au MMS (Methyl methanesulfonate) pour entrer en anaphase malgré la présence de lésions persistantes (Blank et al. 2015), et il a été proposé que l'adaptation au checkpoint pourrait permettre à cet organisme unicellulaire de maintenir une descendance malgré une intégrité génétique compromise, contribuant ainsi au processus évolutif. Chez un organisme multicellulaire, l'intérêt évolutif potentiel et le rôle d'une adaptation aux checkpoints de l'intégrité de l'ADN apparaissent moins évident dans la mesure où ce phénomène pourrait permettre la multiplication de cellules porteuses d'altérations génétique et *in fine* menacer la survie de l'organisme.

Comme discuté précédemment, l'entrée des cellules en mitose en présence d'anomalies persistantes de l'ADN, telles que des intermédiaires de réplication, est susceptible d'induire des cassures chromosomiques et/ou des erreurs de ségrégation des chromosomes, amplifiant la présence de lésions du génome et favorisant l'induction de mécanismes de mort cellulaire ou un arrêt irréversible de la prolifération (sénescence). Dans mon système expérimental, je n'ai jamais observé d'arrêt prolongé des cellules en mitose, de "catastrophe mitotique", ou d'apoptose au cycle cellulaire suivant. En revanche, l'extrême majorité des cellules entrées en mitose suite à la réactivation de Chk1 en G2 vont définitivement s'arrêter à la phase G1 suivante. Ainsi, l'adaptation au checkpoint de l'ADN en G2 pourrait contribuer à éliminer de la population cyclante (i) des cellules dont l'ADN est trop endommagé, ou comme déjà mentionné (ii) des cellules ayant subi un stress génotoxique au cycle cellulaire précédent et ayant accumulé des niveaux de p21 trop élevé. Sachant que l'entrée des cellules en sénescence peut également prendre place en phase G2 de manière p53 et p21-dépendant (Johmura et al. 2014; Krenning et al. 2014; Mao et al. 2012), l'arrêt irréversible de la prolifération préférentiellement *en phase G2* versus *en phase G1* est probablement une résultante de la cinétique d'accumulation de ces facteurs au sein de chaque cellule individuelle.

En conclusion, les outils et approches que j'ai développé pendant ma thèse m'ont permis de décrire la dynamique de la signalisation Chk1, que ce soit en conditions normales ou perturbées, de mettre en évidence l'hétérogénéité de cette signalisation au sein d'une population cellulaire homogène, et d'appréhender les interactions entre les voies de signalisation ATR/Chk1, pro-mitotiques et p53-dépendant et comment la résultante affecte le comportement et devenir cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahuja, Akshay K., Karolina Jodkowska, Federico Teloni, Anna H. Bizard, Ralph Zellweger, Raquel Herrador, Sagrario Ortega, et al. 2016. « A Short G1 Phase Imposes Constitutive Replication Stress and Fork Remodelling in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nature Communications* 7 (1): 10660. <https://doi.org/10.1038/ncomms10660>.
- Ait Saada, Anissia, Sarah A.E. Lambert, et Antony M. Carr. 2018. « Preserving Replication Fork Integrity and Competence via the Homologous Recombination Pathway ». *DNA Repair* 71 (novembre): 135-47. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.017>.
- Akopyan, Karen, Helena Silva Cascales, Elvira Hukasova, Adrian T. Saurin, Erik Müllers, Himjyot Jaiswal, Danielle A.A. Hollman, Geert J.P.L. Kops, René H. Medema, et Arne Lindqvist. 2014. « Assessing Kinetics from Fixed Cells Reveals Activation of the Mitotic Entry Network at the S/G2 Transition ». *Molecular Cell* 53 (5): 843-53. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.031>.
- Aladjem, Mirit I., et Christophe E. Redon. 2017. « Order from Clutter: Selective Interactions at Mammalian Replication Origins ». *Nature Reviews Genetics* 18 (2): 101-16. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.141>.
- Alvarez-Fernández, Mónica, Vincentius A Halim, Lenno Krenning, Melinda Aprelia, Shabaz Mohammed, Albert J Heck, et René H Medema. 2010. « Recovery from a DNA-damage-induced G2 Arrest Requires Cdk-dependent Activation of FoxM1 ». *EMBO Reports* 11 (6): 452-58. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.46>.
- Anand, Roopesh, Lepakshi Ranjha, Elda Cannavo, et Petr Cejka. 2016. « Phosphorylated CtIP Functions as a Co-Factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection ». *Molecular Cell* 64 (5): 940-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.017>.
- Ando, Kiyohiro, Toshinori Ozaki, Hideki Yamamoto, Kazushige Furuya, Mitsuchika Hosoda, Syunji Hayashi, Masahiro Fukuzawa, et Akira Nakagawara. 2004. « Polo-like Kinase 1 (Plk1) Inhibits P53 Function by Physical Interaction and Phosphorylation ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (24): 25549-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314182200>.
- Anglana, Mauro, Aaron Bensimon, et Michelle Debatisse. 2003. « Dynamics of DNA Replication in Mammalian Somatic Cells: Nucleotide Pool Modulates Origin Choice and Interorigin Spacing ». *Cell*, 10.
- Araujo, Ana Rita, Lendert Gelens, Rahuman S.M. Sheriff, et Silvia D.M. Santos. 2016. « Positive Feedback Keeps Duration of Mitosis Temporally Insulated from Upstream Cell-Cycle Events ». *Molecular Cell* 64 (2): 362-75. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.018>.
- Arias, Emily E., et Johannes C. Walter. 2006. « PCNA Functions as a Molecular Platform to Trigger Cdt1 Destruction and Prevent Re-Replication ». *Nature Cell Biology* 8 (1): 84-90. <https://doi.org/10.1038/ncb1346>.
- Arooz, Talha, Cain H. Yam, Wai Yi Siu, Anita Lau, Kay K. W. Li, et Randy Y. C. Poon. 2000. « On the Concentrations of Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases in Extracts of Cultured Human Cells[†] ». *Biochemistry* 39 (31): 9494-9501. <https://doi.org/10.1021/bi0009643>.
- Arora, Mansi, Justin Moser, Harsha Phadke, Ashik Akbar Basha, et Sabrina L. Spencer. 2017. « Endogenous Replication Stress in Mother Cells Leads to Quiescence of Daughter Cells ». *Cell Reports* 19 (7): 1351-64. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.055>.
- Aspinall, Claire F., Daniella Zheleva, Anthony Tighe, et Stephen S. Taylor. 2015. « Mitotic Entry: Non-Genetic Heterogeneity Exposes the Requirement for Plk1 ». *Oncotarget* 6 (34): 36472-88. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5507>.
- Bai, Gongshi, Chames Kermi, Henriette Stoy, Carl J. Schiltz, Julien Bacal, Angela M. Zaino, M. Kyle Hadden, Brandt F. Eichman, Massimo Lopes, et Karlene A. Cimprich. 2020. « HLTf Promotes Fork Reversal, Limiting Replication Stress Resistance and Preventing Multiple Mechanisms of Unrestrained DNA Synthesis ». *Molecular Cell* 78 (6): 1237-1251.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.031>.
- Bakhoun, Samuel F., William T. Silkworth, Isaac K. Nardi, Joshua M. Nicholson, Duane A. Compton, et Daniela Cimini. 2014. « The Mitotic Origin of Chromosomal Instability ». *Current Biology* 24 (4): R148-49. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.019>.
- Ball, Heather L., Mark R. Ehrhardt, Daniel A. Mordes, Gloria G. Glick, Walter J. Chazin, et David Cortez. 2007. « Function of a Conserved Checkpoint Recruitment Domain in ATRIP Proteins ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (9): 3367-77. <https://doi.org/10.1128/MCB.02238-06>.
- Ball, Heather L., Jeremy S. Myers, et David Cortez. 2005. « ATRIP Binding to Replication Protein A-Single-Stranded DNA Promotes ATR-ATRIP Localization but Is Dispensable for Chk1 Phosphorylation ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (5): 2372-81. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-1006>.
- Barefield, Colleen, et Jan Karlseder. 2012. « The BLM Helicase Contributes to Telomere Maintenance through Processing of Late-Replicating Intermediate Structures ». *Nucleic Acids Research* 40 (15): 7358-67. <https://doi.org/10.1093/nar/gks407>.
- Barlow, Jacqueline H., Robert B. Faryabi, Elsa Callén, Nancy Wong, Amy Malhowski, Hua Tang Chen, Gustavo Gutierrez-Cruz, et al. 2013. « Identification of Early Replicating Fragile Sites That Contribute to Genome Instability ». *Cell* 152 (3):

620-32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.006>.

Barr, Alexis R., Samuel Cooper, Frank S. Heldt, Francesca Butera, Henriette Stoy, Jörg Mansfeld, Béla Novák, et Chris Bakal. 2017. « DNA Damage during S-Phase Mediates the Proliferation-Quiescence Decision in the Subsequent G1 via P21 Expression ». *Nature Communications* 8 (1): 14728. <https://doi.org/10.1038/ncomms14728>.

Bartek, Jiri, Jirina Bartkova, et Jiri Lukas. 1996. « The retinoblastoma protein pathway and the restriction point ». *Current Opinion in Cell Biology*.

Bartkova, Jirina, Zuzana Hořejší, Karen Koed, Alwin Krämer, Frederic Tort, Karsten Zieger, Per Guldborg, 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>.

Bartkova, Jirina, Nousin Rezaei, Michalis Liontos, Panagiotis Karakaidos, Dimitris Kletsas, Natalia Issaeva, Leandros-Vassilios F. Vassiliou, et al. 2006. « Oncogene-Induced Senescence Is Part of the Tumorigenesis Barrier Imposed by DNA Damage Checkpoints ». *Nature* 444 (7119): 633-37. <https://doi.org/10.1038/nature05268>.

Bashir, Tarig, N. Valerio Dorrello, Virginia Amador, Daniele Guardavaccaro, et Michele Pagano. 2004. « Control of the SCF-Skp2-Cks1 Ubiquitin Ligase by the APC/CCdh1 Ubiquitin Ligase ». *Nature* 428 (6979): 190-93. <https://doi.org/10.1038/nature02330>.

Bass, Thomas E., Jessica W. Luzwick, Gina Kavanaugh, Clinton Carroll, Huzefa Dungrawala, Gloria G. Glick, Michael D. Feldkamp, Reid Putney, Walter J. Chazin, et David Cortez. 2016. « ETAA1 Acts at Stalled Replication Forks to Maintain Genome Integrity ». *Nature Cell Biology* 18 (11): 1185-95. <https://doi.org/10.1038/ncb3415>.

Baumann, Christoph, Roman Körner, Kay Hofmann, et Erich A. Nigg. 2007. « PICH, a Centromere-Associated SNF2 Family ATPase, Is Regulated by Plk1 and Required for the Spindle Checkpoint ». *Cell* 128 (1): 101-14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.041>.

Beck, Halfdan, Viola Nähse, Marie Sofie Yoo Larsen, Petra Groth, Trevor Clancy, Michael Lees, Mette Jørgensen, Thomas Helleday, Randi G. Syljuåsen, et Claus Storgaard Sørensen. 2010. « Regulators of Cyclin-Dependent Kinases Are Crucial for Maintaining Genome Integrity in S Phase ». *The Journal of Cell Biology* 188 (5): 629-38. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905059>.

Benada, Jan, Kamila Burdová, Tomáš Lidak, Patrick von Morgen, et Libor Macurek. 2015. « Polo-like Kinase 1 Inhibits DNA Damage Response during Mitosis ». *Cell Cycle* 14 (2): 219-31. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.977067>.

Bennett, Lara N., Conor Larkin, David A. Gillespie, et Paul R. Clarke. 2008. « Claspin Is Phosphorylated in the Chk1-Binding Domain by a Kinase Distinct from Chk1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 369 (3): 973-76. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.154>.

Berezney, Ronald, Dharani D. Dubey, et Joel A. Huberman. 2000. « Heterogeneity of Eukaryotic Replicons, Replicon Clusters, and Replication Foci ». *Chromosoma* 108 (8): 471-84. <https://doi.org/10.1007/s004120050399>.

Bergoglio, Valérie, Anne-Sophie Boyer, Erin Walsh, Valeria Naim, Gaëlle Legube, Marietta Y.W.T. Lee, Laurie Rey, et al. 2013. « DNA Synthesis by Pol η Promotes Fragile Site Stability by Preventing Under-Replicated DNA in Mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 201 (3): 395-408. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207066>.

Bermudez, V. P., L. A. Lindsey-Boltz, A. J. Cesare, Y. Maniwa, J. D. Griffith, J. Hurwitz, et A. Sancar. 2003. « Loading of the Human 9-1-1 Checkpoint Complex onto DNA by the Checkpoint Clamp Loader HRad17-Replication Factor C Complex in Vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (4): 1633-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437927100>.

Bester, Assaf C., Maayan Roniger, Yifat S. Oren, Michael M. Im, Dan Sarni, Malka Chaoat, Aaron Bensimon, Gideon Zamir, Donna S. Shewach, et Batsheva Kerem. 2011. « Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development ». *Cell* 145 (3): 435-46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.044>.

Bhowmick, Rahul, Sheroy Minocherhomji, et Ian D. Hickson. 2016. « RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress ». *Molecular Cell* 64 (6): 1117-26. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.037>.

Bianchi, Julie, Sean G. Rudd, Stanislaw K. Jozwiakowski, Laura J. Bailey, Violetta Soura, Elaine Taylor, Irena Stevanovic, et al. 2013. « PrimPol Bypasses UV Photoproducts during Eukaryotic Chromosomal DNA Replication ». *Molecular Cell* 52 (4): 566-73. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.035>.

Bianchi, Vera, Elisabet Pontis, et Peter Reichard. 1986. « Changes of Deoxyribonucleoside Triphosphate Pools Induced by Hydroxyurea and Their Relation to DNA Synthesis ». *Journal of Biological Chemistry*, 6.

Bizard, Anna H, et Ian D Hickson. 2018. « Anaphase: A Fortune-Teller of Genomic Instability ». *Current Opinion in Cell Biology* 52 (juin): 112-19. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2018.02.012>.

Blank, Heidi M., Jason M. Sheltzer, Colleen M. Meehl, et Angelika Amon. 2015. « Mitotic Entry in the Presence of DNA Damage Is a Widespread Property of Aneuploidy in Yeast ». Édité par Orna Cohen-Fix. *Molecular Biology of the Cell* 26 (8): 1440-51. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-10-1442>.

Blasius, Melanie, Josep V Forment, Neha Thakkar, Sebastian A Wagner, Chunaram Choudhary, et Stephen P Jackson. 2011. « A Phospho-Proteomic Screen Identifies Substrates of the Checkpoint Kinase Chk1 ». *Genome Biology* 12 (8): R78. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-8-r78>.

Branzei, Dana, et Barnabas Szakal. 2016. « DNA Damage Tolerance by Recombination: Molecular Pathways and DNA Structures ». *DNA Repair* 44 (août): 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.008>.

- Brisson, Olivier, Sami El-Hilali, Dana Azar, Stéphane Koundrioukoff, Mélanie Schmidt, Viola Nähse, Yan Jaszczyszyn, et al. 2019. « Transcription-Mediated Organization of the Replication Initiation Program across Large Genes Sets Common Fragile Sites Genome-Wide ». *Nature Communications* 10 (1): 5693. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13674-5>.
- Brooks, Philip J., et Jacob A. Theruvathu. 2005. « DNA Adducts from Acetaldehyde: Implications for Alcohol-Related Carcinogenesis ». *Alcohol* 35 (3): 187-93. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.03.009>.
- 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, Melinda Aprelia, Jolanda Kool, Libor Macurek, Arne Lindqvist, et René H. Medema. 2015. « Spatial Separation of Plk1 Phosphorylation and Activity ». *Frontiers in Oncology* 5 (juin). <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00132>.
- Bruinsma, Wytse, Libor Macurek, Raimundo Freire, Arne Lindqvist, et René H. Medema. 2014. « Bora and Aurora-A Continue to Activate Plk1 in Mitosis ». *Journal of Cell Science* 127 (4): 801-11. <https://doi.org/10.1242/jcs.137216>.
- Brustel, Julien, Nina Kirstein, Fanny Izard, Charlotte Grimaud, Paulina Prorok, Christelle Cayrou, Gunnar Schotta, et al. 2017. « Histone H4K20 Tri-methylation at Late-firing Origins Ensures Timely Heterochromatin Replication ». *The EMBO Journal* 36 (18): 2726-41. <https://doi.org/10.15252/embj.201796541>.
- Buisson, Rémi, Jessica L. Boisvert, Cyril H. Benes, et Lee Zou. 2015. « Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase ». *Molecular Cell* 59 (6): 1011-24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.029>.
- Burkard, M. E., C. L. Randall, S. Laroche, C. Zhang, K. M. Shokat, R. P. Fisher, et P. 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* 104 (11): 4383-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701140104>.
- Burrell, Rebecca A., Sarah E. McClelland, David Endesfelder, Petra Groth, Marie-Christine Weller, Nadeem Shaikh, Enric Domingo, et al. 2013. « Replication Stress Links Structural and Numerical Cancer Chromosomal Instability ». *Nature* 494 (7438): 492-96. <https://doi.org/10.1038/nature11935>.
- Burrow, Allison A, Laura E Williams, Levi CT Pierce, et Yuh-Hwa Wang. 2009. « Over Half of Breakpoints in Gene Pairs Involved in Cancer-Specific Recurrent Translocations Are Mapped to Human Chromosomal Fragile Sites ». *BMC Genomics* 10 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-59>.
- Busino, Luca, Maddalena Donzelli, Massimo Chiesa, Daniele Guardavaccaro, Dvora Ganoth, N Valerio Dorrello, Avram Hershko, Michele Pagano, et Giulio F Draetta. 2003. « Degradation of Cdc25A by B-TrCP during S Phase and in Response to DNA Damage ». *Nature* 426: 5.
- Byun, T. S. 2005. « Functional Uncoupling of MCM Helicase and DNA Polymerase Activities Activates the ATR-Dependent Checkpoint ». *Genes & Development* 19 (9): 1040-52. <https://doi.org/10.1101/gad.1301205>.
- Callegari, A. J., E. Clark, A. Pneuman, et T. J. Kelly. 2010. « Postreplication Gaps at UV Lesions Are Signals for Checkpoint Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (18): 8219-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003449107>.
- Cappell, Steven D., Mingyu Chung, Ariel Jaimovich, Sabrina L. Spencer, et Tobias Meyer. 2016. « Irreversible APC Cdh1 Inactivation Underlies the Point of No Return for Cell-Cycle Entry ». *Cell* 166 (1): 167-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.077>.
- Cárcer, Guillermo de, Sharavan Vishan Venkateswaran, Lorena Salgueiro, Aicha El Bakkali, Kalman Somogyi, Konstantina Rowald, Pablo Montañés, et al. 2018. « Plk1 Overexpression Induces Chromosomal Instability and Suppresses Tumor Development ». *Nature Communications* 9 (1): 3012. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05429-5>.
- Cardoso, M. Cristina, Heinrich Leonhardt, et Bernardo Nadal-Ginard. 1993. « Reversal of Terminal Differentiation and Control of DNA Replication: Cyclin A and Cdk2 Specifically Localize at Subnuclear Sites of DNA Replication ». *Cell* 74 (6): 979-92. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90721-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90721-2).
- Cascales, Helena Silva, Kamila Burdova, Erik Müllers, Henriette Stoy, Patrick von Morgen, Libor Macurek, et Arne Lindqvist. 2017. « Cyclin A2 Localises in the Cytoplasm at the S/G2 Transition to Activate Plk1 ». Preprint. *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/191437>.
- Cayrou, C., P. Coulombe, A. Vigneron, S. Stanojic, O. Ganier, I. Peiffer, E. Rivals, et al. 2011. « Genome-Scale Analysis of Metazoan Replication Origins Reveals Their Organization in Specific but Flexible Sites Defined by Conserved Features ». *Genome Research* 21 (9): 1438-49. <https://doi.org/10.1101/gr.121830.111>.
- Chagin, V. O., C. S. Casas-Delucchi, M. Reinhart, L. Schermelleh, Y. Markaki, A. Maiser, J. J. Bolius, et al. 2016. « 4D Visualization of Replication Foci in Mammalian Cells Corresponding to Individual Replicons ». *Nature Communications* 7 (1): 11231. <https://doi.org/10.1038/ncomms11231>.
- Chagin, V. O., J. H. Stear, et M. C. Cardoso. 2010. « Organization of DNA Replication ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (4): a000737-a000737. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000737>.
- Chan, Kok Lung, et Ian D. Hickson. 2011. « New Insights into the Formation and Resolution of Ultra-Fine Anaphase Bridges ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22 (8): 906-12. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.001>.
- Chan, Kok Lung, Timea Palmai-Pallag, Songmin Ying, et Ian D. Hickson. 2009. « Replication Stress Induces Sister-Chromatid Bridging at Fragile Site Loci in Mitosis ». *Nature Cell Biology* 11 (6): 753-60. <https://doi.org/10.1038/ncb1882>.
- Chan, Kok-Lung, Phillip S North, et Ian D Hickson. 2007. « BLM Is Required for Faithful Chromosome Segregation and Its

- Localization Defines a Class of Ultrafine Anaphase Bridges ». *The EMBO Journal* 26 (14): 3397-3409.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601777>.
- Chang, Debbie J., Patrick J. Lupardus, et Karlene A. Cimprich. 2006. « Monoubiquitination of Proliferating Cell Nuclear Antigen Induced by Stalled Replication Requires Uncoupling of DNA Polymerase and Mini-Chromosome Maintenance Helicase Activities ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (43): 32081-88.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M606799200>.
- Chao, Hui Xiao, Cere E. Poovey, Ashley A. Privette, Gavin D. Grant, Hui Yan Chao, Jeanette G. Cook, et Jeremy E. Purvis. 2017. « Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle ». *Cell Systems* 5 (5): 445-459.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.015>.
- Chastain II, Paul D., Timothy P. Heffernan, Kathleen Nevis, Li Lin, William K. Kaufmann, David G. Kaufman, et Marila Cordeiro-Stone. 2006. « Checkpoint Regulation of Replication Dynamics in UV-Irradiated Human Cells ». *Cell Cycle* 5 (18): 2160-67.
<https://doi.org/10.4161/cc.5.18.3236>.
- Chen, Mei-Shya, Jonathan Hurov, Lynn S. White, Terry Woodford-Thomas, et Helen Piwnicka-Worms. 2001. « Absence of Apparent Phenotype in Mice Lacking Cdc25C Protein Phosphatase ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (12): 3853-61.
<https://doi.org/10.1128/MCB.21.12.3853-3861.2001>.
- Chen, Mei-Shya, Christine E. Ryan, et Helen Piwnicka-Worms. 2003. « Chk1 Kinase Negatively Regulates Mitotic Function of Cdc25A Phosphatase through 14-3-3 Binding ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (21): 7488-97.
<https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7488-7497.2003>.
- Chen, Ping, Chun Luo, Yali Deng, Kevin Ryan, James Register, Stephen Margosiak, Anna Tempczyk-Russell, et al. 2000. « The 1.7 Å Crystal Structure of Human Cell Cycle Checkpoint Kinase Chk1: Implications for Chk1 Regulation ». *Cell*, mars, 12.
- Chen, X., G. A. Muller, M. Quaas, M. Fischer, N. Han, B. Stutchbury, A. D. Sharrocks, et K. Engeland. 2013. « The Forkhead Transcription Factor FOXM1 Controls Cell Cycle-Dependent Gene Expression through an Atypical Chromatin Binding Mechanism ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (2): 227-36.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00881-12>.
- Chen, Xuefeng, Hengyao Niu, Woo-Hyun Chung, Zhu Zhu, Alma Papusha, Eun Yong Shim, Sang Eun Lee, Patrick Sung, et Grzegorz Ira. 2011. « Cell Cycle Regulation of DNA Double-Strand Break End Resection by Cdk1-Dependent Dna2 Phosphorylation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (9): 1015-19.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2105>.
- Chen, Yu-Hung, Mathew J.K. Jones, Yandong Yin, Sarah B. Crist, Luca Colnaghi, Robert J. Sims, Eli Rothenberg, Prasad V. Jallepalli, et Tony T. Huang. 2015. « ATR-Mediated Phosphorylation of FANCI Regulates Dormant Origin Firing in Response to Replication Stress ». *Molecular Cell* 58 (2): 323-38.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.031>.
- Cheng, Chung-Hui, et Robert D Kuchta. 1993. « DNA Polymerase ϵ : Aphidicolin Inhibition and the Relationship between Polymerase and Exonuclease Activity? » *Biochemistry*, 7.
- Chibazakura, T., K. Kamachi, M. Ohara, S. Tane, H. Yoshikawa, et J. M. Roberts. 2011. « Cyclin A Promotes S-Phase Entry via Interaction with the Replication Licensing Factor Mcm7 ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (2): 248-55.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00630-10>.
- Chini, C C S, J Wood, et J Chen. 2006. « Chk1 Is Required to Maintain Claspin Stability ». *Oncogene* 25 (30): 4165-71.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209447>.
- Chini, Claudia C. S., et Junjie Chen. 2006. « Repeated Phosphopeptide Motifs in Human Claspin Are Phosphorylated by Chk1 and Mediate Claspin Function ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (44): 33276-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604373200>.
- Chini, Claudia Christiano Silva, et Junjie Chen. 2003. « Human Claspin Is Required for Replication Checkpoint Control ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (32): 30057-62.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M301136200>.
- Chowdhury, A., G. Liu, M. Kemp, X. Chen, N. Katrangli, S. Myers, M. Ghosh, et al. 2010. « The DNA Unwinding Element Binding Protein DUE-B Interacts with Cdc45 in Preinitiation Complex Formation ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (6): 1495-1507.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00710-09>.
- Chu, Gilbert. 2014. « Double-Strand Break Repair ». In *Molecular Life Sciences*, édité par Ellis Bell, 1-15. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6436-5_63-3.
- Chung, Mingyu, Chad Liu, Hee Won Yang, Marielle S. Köberlin, Steven D. Cappell, et Tobias Meyer. 2019. « Transient Hysteresis in CDK4/6 Activity Underlies Passage of the Restriction Point in G1 ». *Molecular Cell* 76 (4): 562-573.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.020>.
- Cimini, Daniela, Bonnie Howell, Paul Maddox, Alexey Khodjakov, Francesca Degrossi, et E.D. Salmon. 2001. « Merotelic Kinetochore Orientation Is a Major Mechanism of Aneuploidy in Mitotic Mammalian Tissue Cells ». *The Journal of Cell Biology* 153 (3): 517-28. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.517>.
- Clarke, Catriona A. L., et Paul R. Clarke. 2005. « DNA-Dependent Phosphorylation of Chk1 and Claspin in a Human Cell-Free System ». *Biochemical Journal* 388 (2): 705-12.
<https://doi.org/10.1042/BJ20041966>.
- Cortez, D. 2001. « ATR and ATRIP: Partners in Checkpoint Signaling ». *Science* 294 (5547): 1713-16. <https://doi.org/10.1126/science.1065521>.
- Costanzo, Vincenzo, David Shechter, Patrick J Lupardus, Karlene A Cimprich, Max Gottesman, et Jean Gautier. 2003. « An ATR- and Cdc7-Dependent DNA Damage Checkpoint That Inhibits Initiation of DNA Replication ». *Molecular Cell* 11 (1): 203-13.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00799-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00799-2).
- Coudreuse, Damien, et Paul Nurse. 2010. « Driving the Cell Cycle with a Minimal CDK Control Network ». *Nature* 468 (7327): 1074-79. <https://doi.org/10.1038/nature09543>.

- Courbet, Sylvain, Sophie Gay, Nausica Arnoult, Gerd Wronka, Mauro Anglana, Olivier Brison, et Michelle Debatisse. 2008. « Replication Fork Movement Sets Chromatin Loop Size and Origin Choice in Mammalian Cells ». *Nature* 455 (7212): 557-60. <https://doi.org/10.1038/nature07233>.
- Craig, Ashley L., Jennifer A. Chrystal, Jennifer A. Fraser, Nathalie Sphyris, Yao Lin, Ben J. Harrison, Mary T. Scott, Irena Dornreiter, et Ted R. Hupp. 2007. « The MDM2 Ubiquitination Signal in the DNA-Binding Domain of P53 Forms a Docking Site for Calcium Calmodulin Kinase Superfamily Members ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (9): 3542-55. <https://doi.org/10.1128/MCB.01595-06>.
- Crncec, Adrijana, et Helfrid Hochegger. 2019. « Triggering Mitosis ». *FEBS Letters* 593 (20): 2868-88. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13635>.
- Cseresnyes, Zoltan, Ulf Schwarz, et Catherine M Green. 2009. « Analysis of Replication Factories in Human Cells by Super-Resolution Light Microscopy ». *BMC Cell Biology* 10 (1): 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-88>.
- Daigaku, Yasukazu, Adelina A. Davies, et Helle D. Ulrich. 2010. « Ubiquitin-Dependent DNA Damage Bypass Is Separable from Genome Replication ». *Nature* 465 (7300): 951-55. <https://doi.org/10.1038/nature09097>.
- Daigh, Leighton H., Chad Liu, Mingyu Chung, Karlene A. Cimprich, et Tobias Meyer. 2018. « Stochastic Endogenous Replication Stress Causes ATR-Triggered Fluctuations in CDK2 Activity That Dynamically Adjust Global DNA Synthesis Rates ». *Cell Systems* 7 (1): 17-27.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.05.011>.
- Dalal, Sorab N., Colleen M. Schweitzer, Jianmin Gan, et James A. DeCaprio. 1999. « Cytoplasmic Localization of Human Cdc25C during Interphase Requires an Intact 14-3-3 Binding Site ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (6): 4465-79. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.6.4465>.
- Dart, D. Alwyn, Kate E. Adams, Ildem Akerman, et Nicholas D. Lakin. 2004. « Recruitment of the Cell Cycle Checkpoint Kinase ATR to Chromatin during S-Phase ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (16): 16433-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314212200>.
- De Boer, L, V Oakes, H Beamish, N Giles, F Stevens, M So-modevilla-Torres, C DeSouza, et B Gabrielli. 2008. « Cyclin A/Cdk2 Coordinates Centrosomal and Nuclear Mitotic Events ». *Oncogene* 27 (31): 4261-68. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.74>.
- Debatisse, Michelle, et Filippo Rosselli. 2019. « A Journey with Common Fragile Sites: From S Phase to Telophase ». *Genes, Chromosomes and Cancer* 58 (5): 305-16. <https://doi.org/10.1002/gcc.22704>.
- Deckbar, Dorothee, Julie Birraux, Andrea Krempler, Leopoldine Tchouandong, Andrea Beucher, Sarah Walker, Tom Stiff, Penny Jeggo, et Markus Löbrich. 2007. « Chromosome Breakage after G2 Checkpoint Release ». *Journal of Cell Biology* 176 (6): 749-55. <https://doi.org/10.1083/jcb.200612047>.
- Delacroix, S., J. M. Wagner, M. Kobayashi, K.-i. Yamamoto, et L. M. Karnitz. 2007. « The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) Clamp Activates Checkpoint Signaling via TopBP1 ». *Genes & Development* 21 (12): 1472-77. <https://doi.org/10.1101/gad.1547007>.
- Deng, Lin, R. Alex Wu, Remi Sonnevill, Olga V. Kochenova, Karim Labib, David Pellman, et Johannes C. Walter. 2019. « Mitotic CDK Promotes Replisome Disassembly, Fork Breakage, and Complex DNA Rearrangements ». *Molecular Cell* 73 (5): 915-929.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.021>.
- Di Fiore, Barbara, et Jonathon Pines. 2007. « Emi1 Is Needed to Couple DNA Replication with Mitosis but Does Not Regulate Activation of the Mitotic APC/C ». *Journal of Cell Biology* 177 (3): 425-37. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611166>.
- Di Micco, Raffaella, Marzia Fumagalli, Angelo Cicalese, Sara Piccinin, Patrizia Gasparini, Chiara Luise, Catherine Schurra, et al. 2006. « Oncogene-Induced Senescence Is a DNA Damage Response Triggered by DNA Hyper-Replication ». *Nature* 444 (7119): 638-42. <https://doi.org/10.1038/nature05327>.
- Dimitrova, Daniela S, et David M Gilbert. 1999. « The Spatial Position and Replication Timing of Chromosomal Domains Are Both Established in Early G1 Phase ». *Molecular Cell* 4 (6): 983-93. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80227-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80227-0).
- Domínguez-Kelly, Raquel, Yusé Martín, Stephane Koundrioukoff, Marvin E. Tanenbaum, Veronique A.J. Smits, René H. Medema, Michelle Debatisse, et Raimundo Freire. 2011. « Wee1 Controls Genomic Stability during Replication by Regulating the Mus81-Eme1 Endonuclease ». *The Journal of Cell Biology* 194 (4): 567-79. <https://doi.org/10.1083/jcb.201101047>.
- Dominguez-Sola, David, Carol Y. Ying, Carla Grandori, Luca Ruggerio, Brenden Chen, Muyang Li, Denise A. Galloway, Wei Gu, Jean Gautier, et Riccardo Dalla-Favera. 2007. « Non-Transcriptional Control of DNA Replication by c-Myc ». *Nature* 448 (7152): 445-51. <https://doi.org/10.1038/nature05953>.
- Donnianni, Roberto Antonio, Matteo Ferrari, Federico Lazzaro, Michela Clerici, Benjamin Tamilselvan Nachimuthu, Paolo Plevani, Marco Muzi-Falconi, et Achille Pellicoli. 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 ». Édité par Sue Biggins. *PLoS Genetics* 6 (1): e1000763. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000763>.
- Duda, Heike, Meret Arter, Jiradet Gloggnitzer, Federico Teloni, Philipp Wild, Miguel G. Blanco, Matthias Altmeyer, et Joao Matos. 2016. « A Mechanism for Controlled Breakage of Under-Replicated Chromosomes during Mitosis ». *Developmental Cell* 39 (6): 740-55. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.11.017>.
- El-Deiry, Wafik S, J Wade Harper, Patrick M O'Connor, Victor E Velculescu, Christine E Canman, Joany Jackman, Jennifer A Pietsenpol, et al. 1994. « WAF1/CIP1 Is Induced in P53-Mediated G1 Arrest and Apoptosis ». *Cancer Research*, 7.
- El-Deiry, Wafik S, Takashi Tokino, Victor E Velculescu, Daniel B Levy, Ramon Parsons, et Bert Vogelstein. 1993. « WAF1, a Potential Mediator of ~53 Tumor Suppression ». *Cell*.

- Ellison, Viola, et Bruce Stillman. 2003. « Biochemical Characterization of DNA Damage Checkpoint Complexes: Clamp Loader and Clamp Complexes with Specificity for 5' Recessed DNA ». Édité par James E. Haber. *PLoS Biology* 1 (2): e33. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000033>.
- Emptage, Ryan P., Megan J. Schoenberger, Kathryn M. Ferguson, et Ronen Marmorstein. 2017. « Intramolecular Autoinhibition of Checkpoint Kinase 1 Is Mediated by Conserved Basic Motifs of the C-Terminal Kinase-Associated 1 Domain ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (46): 19024-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.811265>.
- Engeland, Kurt. 2018. « Cell Cycle Arrest through Indirect Transcriptional Repression by P53: I Have a DREAM ». *Cell Death & Differentiation* 25 (1): 114-32. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.172>.
- Ercilla, Amaia, Sonia Feu, Sergi Aranda, Alba Llopis, Sólveig Hlín Brynjólfssdóttir, Claus Storgaard Sørensen, Luis Ignacio Toledo, et Neus Agell. 2020. « Acute Hydroxyurea-Induced Replication Blockade Results in Replisome Components Disengagement from Nascent DNA without Causing Fork Collapse ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 77 (4): 735-49. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03206-1>.
- Eykelenboom, John Kenneth, Emma Christina Harte, Lynn Cavanaugh, Ana Pastor-Peidro, Irene Calvo-Asensio, Marta Llorens-Agost, et Noel Francis Lowndes. 2013. « ATR Activates the S-M Checkpoint during Unperturbed Growth to Ensure Sufficient Replication Prior to Mitotic Onset ». *Cell Reports* 5 (4): 1095-1107. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.027>.
- Falck, Jacob, Niels Mailand, Randi G. Syljuåsen, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2001. « The ATM-Chk2-Cdc25A Checkpoint Pathway Guards against Radioresistant DNA Synthesis ». *Nature* 410 (6830): 842-47. <https://doi.org/10.1038/35071124>.
- Falck, Jacob, John H.J. Petrini, Bret R. Williams, Jiri Lukas, et Jiri Bartek. 2002. « The DNA Damage-Dependent Intra-S Phase Checkpoint Is Regulated by Parallel Pathways ». *Nature Genetics* 30 (3): 290-94. <https://doi.org/10.1038/ng845>.
- Feng, Sumin, Yichao Zhao, Yixi Xu, Shaokai Ning, Wei Huo, Mei Hou, Ge Gao, Jianguo Ji, Rong Guo, et Dongyi Xu. 2016. « Ewing Tumor-Associated Antigen 1 Interacts with Replication Protein A to Promote Restart of Stalled Replication Forks ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (42): 21956-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.C116.747758>.
- Ferguson, Angela M., Lynn S. White, Peter J. Donovan, et Helen Piwnicka-Worms. 2005. « Normal Cell Cycle and Checkpoint Responses in Mice and Cells Lacking Cdc25B and Cdc25C Protein Phosphatases ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (7): 2853-60. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.7.2853-2860.2005>.
- Feringa, F. M., J. A. Raaijmakers, M. A. Hadders, C. Vaarting, L. Macurek, L. Heitink, L. Krenning, et R. H. Medema. 2018. « Persistent Repair Intermediates Induce Senescence ». *Nature Communications* 9 (1): 3923. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06308-9>.
- Feringa, Femke M., Lenno Krenning, André Koch, Jeroen van den Berg, Bram van den Broek, Kees Jalink, et René H. Medema. 2016. « Hypersensitivity to DNA Damage in Antephase as a Safeguard for Genome Stability ». *Nature Communications* 7 (1): 12618. <https://doi.org/10.1038/ncomms12618>.
- Fernández-Casañas, María, et Kok-Lung Chan. 2018. « The Unresolved Problem of DNA Bridging ». *Genes* 9 (12): 623. <https://doi.org/10.3390/genes9120623>.
- Fernandez-Vidal, Anne, Julien Vignard, et Gladys Mirey. 2017. « Around and beyond 53BP1 Nuclear Bodies ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (12): 2611. <https://doi.org/10.3390/ijms18122611>.
- Fischer, Martin, Marianne Quaas, Lydia Steiner, et Kurt Engeland. 2016. « The P53-P21-DREAM-CDE/CHR Pathway Regulates G₂/M Cell Cycle Genes ». *Nucleic Acids Research* 44 (1): 164-74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv927>.
- Forey, Romain, Ana Poveda, Sushma Sharma, Antoine Barthe, Ismael Padioleau, Claire Renard, Robin Lambert, et al. 2020. « Mec1 Is Activated at the Onset of Normal S Phase by Low-DNTP Pools Impeding DNA Replication ». *Molecular Cell* 78 (3): 396-410.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.021>.
- Forment, Josep V., Melanie Blasius, Ilaria Guerini, et Stephen P. Jackson. 2011. « Structure-Specific DNA Endonuclease Mus81/Eme1 Generates DNA Damage Caused by Chk1 Inactivation ». Édité par Marco Muzi-Falconi. *PLoS ONE* 6 (8): e23517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023517>.
- Forrest, Alistair, et Brian Gabrielli. 2001. « Cdc25B Activity Is Regulated by 14-3-3 ». *Oncogene* 20 (32): 4393-4401. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204574>.
- Foti, Rossana, Stefano Gnan, Daniela Cornacchia, Vishnu Dileep, Aydan Bulut-Karslioglu, Sarah Diehl, Andreas Bunes, et al. 2016. « Nuclear Architecture Organized by Rif1 Underpins the Replication-Timing Program ». *Molecular Cell* 61 (2): 260-73. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.001>.
- Fragkos, Michalis, Olivier Ganier, Philippe Coulombe, et Marcel Méchali. 2015. « DNA Replication Origin Activation in Space and Time ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (6): 360-74. <https://doi.org/10.1038/nrm4002>.
- Fragkos, Michalis, et Valeria Naim. 2017. « Rescue from Replication Stress during Mitosis ». *Cell Cycle* 16 (7): 613-33. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1288322>.
- Frye, Jeremiah J, Nicholas G Brown, Georg Petzold, Edmond R Watson, Christy R R Grace, Amanda Nourse, Marc A Jarvis, et al. 2013. « Electron Microscopy Structure of Human APC/CCDH1-EM1 Reveals Multimodal Mechanism of E3 Ligase Shutdown ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (7): 827-35. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2593>.
- Fu, Zheng, Liviu Malureanu, Jun Huang, Wei Wang, Hao Li, Jan M. van Deursen, Donald J. Tindall, et Junjie Chen. 2008. « Plk1-Dependent Phosphorylation of FoxM1 Regulates a Transcriptional Programme Required for Mitotic Progression ». *Nature Cell Biology* 10 (9): 1076-82. <https://doi.org/10.1038/ncb1767>.

- Fung, Tsz Kan, Hoi Tang Ma, et Randy Y C Poon. 2007. « Specialized Roles of the Two Mitotic Cyclins in Somatic Cells: Cyclin A as an Activator of M Phase–Promoting Factor \square D ». *Molecular Biology of the Cell* 18: 13.
- Furuno, Nobuaki, Nicole den Elzen, et Jonathon Pines. 1999. « Human Cyclin a Is Required for Mitosis until Mid Prophase ». *Journal of Cell Biology* 147 (2): 295-306. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.295>.
- Gabrielli, Brian G., Joanne M. Clark, Andrew K. McCormack, et Kay A. O. Ellem. 1997. « Hyperphosphorylation of the N-Terminal Domain of Cdc25 Regulates Activity toward Cyclin B1/Cdc2 But Not Cyclin A/Cdk2 ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (45): 28607-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28607>.
- Ganier, Olivier, Paulina Prorok, Ildem Akerman, et Marcel Méchali. 2019. « Metazoan DNA Replication Origins ». *Current Opinion in Cell Biology* 58 (juin): 134-41. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2019.03.003>.
- Gao, Yanzhe, Elizabeth Mutter-Rottmayer, Anastasia Zlatanou, Cyrus Vaziri, et Yang Yang. 2017. « Mechanisms of Post-Replication DNA Repair ». *Genes* 8 (2): 64. <https://doi.org/10.3390/genes8020064>.
- Gao, Yanzhe, Jianhong Yao, Sumeet Poudel, Eric Romer, Lubna Abu-Niaaj, et Michael Leffak. 2014. « Protein Phosphatase 2A and Cdc7 Kinase Regulate the DNA Unwinding Element-Binding Protein in Replication Initiation ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (52): 35987-0. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589119>.
- García-Gómez, Sara, Aurelio Reyes, María I. Martínez-Jiménez, E. Sandra Chocrón, Silvana Mourón, Gloria Terrados, Christopher Powell, et al. 2013. « PrimPol, an Archaic Primase/Polymerase Operating in Human Cells ». *Molecular Cell* 52 (4): 541-53. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.025>.
- García-Muse, Tatiana, et Andrés Aguilera. 2016. « Transcription–Replication Conflicts: How They Occur and How They Are Resolved ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (9): 553-63. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.88>.
- . 2019. « R Loops: From Physiological to Pathological Roles ». *Cell* 179 (3): 604-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.055>.
- García-Rodríguez, Néstor, Magdalena Morawska, Ronald P Wong, Yasukazu Daigaku, et Helle D Ulrich. 2018. « Spatial Separation between Replisome- and Template-induced Replication Stress Signaling ». *The EMBO Journal* 37 (9). <https://doi.org/10.15252/embj.201798369>.
- Gavet, Olivier, et Jonathon Pines. 2010a. « Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to Mitosis ». *Developmental Cell* 18 (4): 533-43. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.013>.
- . 2010b. « Activation of Cyclin B1–Cdk1 Synchronizes Events in the Nucleus and the Cytoplasm at Mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 189 (2): 247-59. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909144>.
- Ge, X. Q., D. A. Jackson, et J. J. Blow. 2007. « Dormant Origins Licensed by Excess Mcm2 7 Are Required for Human Cells to Survive Replicative Stress ». *Genes & Development* 21 (24): 3331-41. <https://doi.org/10.1101/gad.457807>.
- Ge, Xin Quan, et J. Julian Blow. 2010. « Chk1 Inhibits Replication Factory Activation but Allows Dormant Origin Firing in Existing Factories ». *The Journal of Cell Biology* 191 (7): 1285-97. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007074>.
- Gheghiani, Lilia, Damarys Loew, Bérangère Lombard, Jörg Mansfeld, et Olivier Gavet. 2017. « PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis ». *Cell Reports* 19 (10): 2060-73. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.031>.
- Gilbert, D. M., S.-I. Takebayashi, T. Ryba, J. Lu, B. D. Pope, K. A. Wilson, et I. Hiratani. 2010. « Space and Time in the Nucleus: Developmental Control of Replication Timing and Chromosome Architecture ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 75 (0): 143-53. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.011>.
- Giles, Nichole, Alistair Forrest, et Brian Gabrielli. 2003. « 14-3-3 Acts as an Intramolecular Bridge to Regulate Cdc25B Localization and Activity ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (31): 28580-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304027200>.
- Gineau, Laure, Céline Cognet, Nihan Kara, Francis Peter Lach, Jean Dunne, Uma Veturi, Capucine Picard, et al. 2012. « Partial MCM4 Deficiency in Patients with Growth Retardation, Adrenal Insufficiency, and Natural Killer Cell Deficiency ». *Journal of Clinical Investigation* 122 (3): 821-32. <https://doi.org/10.1172/JCI61014>.
- Girard, Franck, Ned J C Lamb, et Anne Fernandez. 1991. « Cyclin A Is Required for the Onset of DNA Replication in Mammalian Fibroblasts ». *Cell*, décembre, 11.
- Giunta, Simona, Rimma Belotserkovskaya, et Stephen P. Jackson. 2010. « DNA Damage Signaling in Response to Double-Strand Breaks during Mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 190 (2): 197-207. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911156>.
- Glover, Thomas W, Carol Berger, Jane Coyle, et Barbara Echo. 1984. « DNA Polymerase α Inhibition by Aphidicolin Induces Gaps and Breaks at Common Fragile Sites in Human Chromosomes ». *Hum Genet*, 7.
- Glover, Thomas W., Thomas E. Wilson, et Martin F. Arlt. 2017. « Fragile Sites in Cancer: More than Meets the Eye ». *Nature Reviews Cancer* 17 (8): 489-501. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.52>.
- Goldstone, S, S Pavey, A Forrest, J Sinnamon, et B Gabrielli. 2001. « Cdc25-Dependent Activation of Cyclin A/Cdk2 Is Blocked in G2 Phase Arrested Cells Independently of ATM/ATR ». *Oncogene* 20 (8): 921-32. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204177>.
- Gong, Delquin, et James E. Ferrell. 2010. « The Roles of Cyclin A2, B1, and B2 in Early and Late Mitotic Events ». Édité par Daniel J. Lew. *Molecular Biology of the Cell* 21 (18): 3149-61. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-05-0393>.
- Gong, Delquin, Joseph R. Pomerening, Jason W. Myers, Christer

- Gustavsson, Joshua T. Jones, Angela T. Hahn, Tobias Meyer, et James E. Ferrell. 2007. « Cyclin A2 Regulates Nuclear-Envelope Breakdown and the Nuclear Accumulation of Cyclin B1 ». *Current Biology* 17 (1): 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.066>.
- Gong, Eun-Yeung, Veronique A. J. Smits, Felipe Fumagallo, Desiree Piscitello, Nick Morrice, Raimundo Freire, et David A. Gillespie. 2015. « KA1-Targeted Regulatory Domain Mutations Activate Chk1 in the Absence of DNA Damage ». *Scientific Reports* 5 (1): 10856. <https://doi.org/10.1038/srep10856>.
- Gorgoulis, Vassilis G, Leandros-Vassilios F Vassiliou, Panagiotis Karakaidos, Panayotis Zacharatos, Athanassios Kotsinas, Triantafillos Liloglou, Monica Venere, et al. 2005. « Checkpoint and Genomic Instability in Human Precancerous Lesions » 434: 7.
- Goto, Hidemasa, Toyooki Natsume, Masato T. Kanemaki, Aika Kaito, Shujie Wang, Esteban C. Gabazza, Masaki Inagaki, et Akira Mizoguchi. 2019. « Chk1-Mediated Cdc25A Degradation as a Critical Mechanism for Normal Cell Cycle Progression ». *Journal of Cell Science* 132 (2): jcs223123. <https://doi.org/10.1242/jcs.223123>.
- Gottifredi, Vanesa, Orit Karni-Schmidt, Sheau-Yann Shieh, et Carol Prives. 2001. « P53 Down-Regulates CHK1 through P21 and the Retinoblastoma Protein ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (4): 1066-76. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1066-1076.2001>.
- Grant, Gavin D., Lionel Brooks, Xiaoyang Zhang, J. Matthew Mahoney, Viktor Martyanov, Tammara A. Wood, Gavin Sherlock, Chao Cheng, et Michael L. Whitfield. 2013. « Identification of Cell Cycle-Regulated Genes Periodically Expressed in U2OS Cells and Their Regulation by FOXM1 and E2F Transcription Factors ». Édité par Mark J. Solomon. *Molecular Biology of the Cell* 24 (23): 3634-50. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-05-0264>.
- Graves, Paul R, Christine M Lovly, Geoffrey L Uy, et Helen Piwnicka-Worms. 2001. « Localization of Human Cdc25C Is Regulated Both by Nuclear Export and 14-3-3 Protein Binding ». *Oncogene* 20 (15): 1839-51. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204259>.
- Graves, Paul R., Lijia Yu, Julie K. Schwarz, Janis Gales, Edward A. Sausville, Patrick M. O'Connor, et Helen Piwnicka-Worms. 2000. « The Chk1 Protein Kinase and the Cdc25C Regulatory Pathways Are Targets of the Anticancer Agent UCN-01 ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (8): 5600-5605. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5600>.
- Gu, Y., J. Rosenblatt, et D.O. Morgan. 1992. « Cell Cycle Regulation of CDK2 Activity by Phosphorylation of Thr160 and Tyr15. » *The EMBO Journal* 11 (11): 3995-4005. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05493.x>.
- Guervilly, Jean-Hugues, Arato Takedachi, Valeria Naim, Sarah Scaglione, Charly Chawhan, Yoann Lovera, Emmanuelle Despras, et al. 2015. « The SLX4 Complex Is a SUMO E3 Ligase That Impacts on Replication Stress Outcome and Genome Stability ». *Molecular Cell* 57 (1): 123-37. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.014>.
- Guo, Cai, Akiko Kumagai, Katharina Schlacher, Anna Shevchenko, Andrej Shevchenko, et William G. Dunphy. 2015. « Interaction of Chk1 with Treslin Negatively Regulates the Initiation of Chromosomal DNA Replication ». *Molecular Cell* 57 (3): 492-505. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.003>.
- Haahr, Peter, Saskia Hoffmann, Maxim A. X. Tollenaere, Teresa Ho, Luis Ignacio Toledo, Matthias Mann, Simon Bekker-Jensen, Markus Räschle, et Niels Mailand. 2016. « Activation of the ATR Kinase by the RPA-Binding Protein ETAA1 ». *Nature Cell Biology* 18 (11): 1196-1207. <https://doi.org/10.1038/ncb3422>.
- Hahn, Angela T., Joshua T. Jones, et Tobias Meyer. 2009. « Quantitative Analysis of Cell Cycle Phase Durations and PC12 Differentiation Using Fluorescent Biosensors ». *Cell Cycle* 8 (7): 1044-52. <https://doi.org/10.4161/cc.8.7.8042>.
- Halasi, Marianna, et Andrei L. Gartel. 2009. « A Novel Mode of FoxM1 Regulation: Positive Auto-Regulatory Loop ». *Cell Cycle* 8 (12): 1966-67. <https://doi.org/10.4161/cc.8.12.8708>.
- Halazonetis, T. D., V. G. Gorgoulis, et J. Bartek. 2008. « An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development ». *Science* 319 (5868): 1352-55. <https://doi.org/10.1126/science.1140735>.
- Hamperl, Stephan, Michael J. Bocek, Joshua C. Saldivar, Tomek Swigit, et Karlene A. Cimprich. 2017. « Transcription-Replication Conflict Orientation Modulates R-Loop Levels and Activates Distinct DNA Damage Responses ». *Cell* 170 (4): 774-786.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.043>.
- Hamperl, Stephan, et Karlene A. Cimprich. 2016. « Conflict Resolution in the Genome: How Transcription and Replication Make It Work ». *Cell* 167 (6): 1455-67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.053>.
- Han, Xiangzi, Jinshan Tang, Jingna Wang, Feng Ren, Jinhua Zheng, Megan Gragg, Philip Kiser, et al. 2016. « Conformational Change of Human Checkpoint Kinase 1 (Chk1) Induced by DNA Damage ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (25): 12951-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.713248>.
- Hansen, R. S., S. Thomas, R. Sandstrom, T. K. Canfield, R. E. Thurman, M. Weaver, M. O. Dorschner, S. M. Gartler, et J. A. Stamatoyannopoulos. 2010. « Sequencing Newly Replicated DNA Reveals Widespread Plasticity in Human Replication Timing ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (1): 139-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912402107>.
- Harper, J W, S J Elledge, K Keyomarsi, B Dynlacht, L H Tsai, P Zhang, S Dobrowolski, C Bai, L Connell-Crowley, et E Swindell. 1995. « Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by P21. » *Molecular Biology of the Cell* 6 (4): 387-400. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.4.387>.
- Harrigan, Jeanine A., Rimma Belotserkovskaya, Julia Coates, Daniela S. Dimitrova, Sophie E. Polo, Charles R. Bradshaw, Peter Fraser, et Stephen P. Jackson. 2011. « Replication Stress Induces 53BP1-Containing OPT Domains in G1 Cells ». *Journal of Cell Biology* 193 (1): 97-108. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011083>.
- 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>.
- Hashimoto, Yoshitami, Arnab Ray Chaudhuri, Massimo Lopes, et Vincenzo Costanzo. 2010. « Rad51 Protects Nascent DNA from Mre11-Dependent Degradation and Promotes Continuous DNA Synthesis ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (11): 1305-11. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1927>.
- Havens, C. G., et J. C. Walter. 2011. « Mechanism of CRL4Cdt2, a PCNA-Dependent E3 Ubiquitin Ligase ». *Genes & Development* 25 (15): 1568-82. <https://doi.org/10.1101/gad.2068611>.
- Havens, Courtney G., et Johannes C. Walter. 2009. « Docking of a Specialized PIP Box onto Chromatin-Bound PCNA Creates a Degron for the Ubiquitin Ligase CRL4Cdt2 ». *Molecular Cell* 35 (1): 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.012>.
- Hégarat, Nadia, Adrijana Crncec, Maria F Suarez Peredo Rodriguez, Fabio Echegaray Iturra, Yan Gu, Oliver Busby, Paul F Lang, et al. 2020. « Cyclin A Triggers Mitosis Either via the Greatwall Kinase Pathway or Cyclin B ». *The EMBO Journal* 39 (11). <https://doi.org/10.15252/embj.2020104419>.
- Hellman, Asaf, Ayelet Rahat, Stephen W. Scherer, Ariel Darvasi, Lap-Chee Tsui, et Batsheva Kerem. 2000. « Replication Delay along FRA7H, a Common Fragile Site on Human Chromosome 7, Leads to Chromosomal Instability ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (12): 4420-27. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.12.4420-4427.2000>.
- Helmrich, Anne, Monica Ballarino, Evgeny Nudler, et Laszlo Tora. 2013. « Transcription-Replication Encounters, Consequences and Genomic Instability ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (4): 412-18. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2543>.
- Helmrich, Anne, Monica Ballarino, et Laszlo Tora. 2011. « Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes ». *Molecular Cell* 44 (6): 966-77. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.013>.
- Henley, Shauna A, et Frederick A Dick. 2012. « The Retinoblastoma Family of Proteins and Their Regulatory Functions in the Mammalian Cell Division Cycle ». *Cell Division* 7 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-7-10>.
- Hishida, Takashi, Yoshino Kubota, Antony M. Carr, et Hiroshi Iwasaki. 2009. « RAD6–RAD18–RAD5–Pathway-Dependent Tolerance to Chronic Low-Dose Ultraviolet Light ». *Nature* 457 (7229): 612-15. <https://doi.org/10.1038/nature07580>.
- Hosseini, Seyed Ali, Susan Horton, Joshua C. Saldivar, Satoshi Miuma, Martha R. Stampfer, Nyla A. Heerema, et Kay Huebner. 2013. « Common Chromosome Fragile Sites in Human and Murine Epithelial Cells and FHT/FRA3B Loss-Induced Global Genome Instability: Mapping Fragile Sites in Epithelial Cells ». *Genes, Chromosomes and Cancer* 52 (11): 1017-29. <https://doi.org/10.1002/gcc.22097>.
- Hsu, Jerry Y., Julie D.R. Reimann, Claus S. Sørensen, Jiri Lukas, et Peter K. Jackson. 2002. « E2F-Dependent Accumulation of HEmi1 Regulates S Phase Entry by Inhibiting APCdh1 ». *Nature Cell Biology* 4 (5): 358-66. <https://doi.org/10.1038/ncb785>.
- Hu, J. 2006. « An Evolutionarily Conserved Function of Proliferating Cell Nuclear Antigen for Cdt1 Degradation by the Cul4-Ddb1 Ubiquitin Ligase in Response to DNA Damage ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (7): 3753-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500464200>.
- Huang, Meng-Er, Céline Facca, Zakaria Fatmi, Dorothée Baille, Safia Bénakli, et Laurence Vernis. 2016. « DNA Replication Inhibitor Hydroxyurea Alters Fe-S Centers by Producing Reactive Oxygen Species in Vivo ». *Scientific Reports* 6 (1): 29361. <https://doi.org/10.1038/srep29361>.
- Huertas, Pablo, et Stephen P. Jackson. 2009. « Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (14): 9558-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808906200>.
- Ibarra, Arkaitz, Etienne Schwob, et Juan Méndez. 2008. « Excess MCM Proteins Protect Human Cells from Replicative Stress by Licensing Backup Origins of Replication ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (26): 8956-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803978105>.
- Ilves, Ivar, Tatjana Petojevic, James J. Pesavento, et Michael R. Botchan. 2010. « Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins ». *Molecular Cell* 37 (2): 247-58. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.030>.
- Im, Jun-Sub, Soon-Young Park, Won-Ho Cho, Sung-Ho Bae, Jerard Hurwitz, et Joon-Kyu Lee. 2015. « RecQL4 Is Required for the Association of Mcm10 and Ctf4 with Replication Origins in Human Cells ». *Cell Cycle* 14 (7): 1001-9. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1007001>.
- Ishikawa, Aya, Motohiro Yamauchi, Keiji Suzuki, et Shunichi Yamashita. 2010. « Image-Based Quantitative Determination of DNA Damage Signal Reveals a Threshold for G2 Checkpoint Activation in Response to Ionizing Radiation ». *Genome Integrity* 1 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/2041-9414-1-10>.
- Ishimi, Yukio. 1997. « A DNA Helicase Activity Is Associated with an MCM4, -6, and -7 Protein Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (39): 24508-13. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24508>.
- Ishimi, Yukio, Yuki Komamura-Kohno, Ken-ichi Arai, et Hisao Masai. 2001. « Biochemical Activities Associated with Mouse Mcm2 Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (46): 42744-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106861200>.
- Ivanova, Tsvetomira, Michael Maier, Alsu Missarova, Céline Ziegler-Birling, Monica Dam, Mercè Gomar-Alba, Lucas B. Carey, et Manuel Mendoza. 2020. « Budding Yeast Complete DNA Synthesis after Chromosome Segregation Begins ». *Nature Communications* 11 (1): 2267. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16100-3>.
- Jaber, Sara, Eléonore Toufektchan, Vincent Lejour, Boris Bardot, et Franck Toledo. 2016. « P53 Downregulates the Fanconi Anemia DNA Repair Pathway ». *Nature Communications* 7 (1): 11091. <https://doi.org/10.1038/ncomms11091>.

- Jackman, Mark, Yumiko Kubota, Nicole den Elzen, Anja Hagting, et Jonathon Pines. 2002. « Cyclin A- and Cyclin E-Cdk Complexes Shuttle between the Nucleus and the Cytoplasm ». Édité par Pamela A. Silver. *Molecular Biology of the Cell* 13 (3): 1030-45. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0361>.
- Jackman, Mark, Catherine Lindon, Erich A. Nigg, et Jonathon Pines. 2003. « Active Cyclin B1-Cdk1 First Appears on Centrosomes in Prophase ». *Nature Cell Biology* 5 (2): 143-48. <https://doi.org/10.1038/ncb918>.
- Jaiswal, Himjyot, Jan Benada, Erik Müllers, Karen Akopyan, Kamila Burdova, Tobias Koolmeister, Thomas Helleday, René H Medema, Libor Macurek, et Arne Lindqvist. 2017. « ATM/Wip1 Activities at Chromatin Control Plk1 Re-activation to Determine G2 Checkpoint Duration ». *The EMBO Journal* 36 (14): 2161-76. <https://doi.org/10.15252/embj.201696082>.
- Jang, Y.-J., C.-Y. Lin, S. Ma, et R. L. Erikson. 2002. « Functional Studies on the Role of the C-Terminal Domain of Mammalian Polo-like Kinase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (4): 1984-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.042689299>.
- Jang, Young-Joo, Sheng Ma, Yasuhiko Terada, et Raymond L. Erikson. 2002. « Phosphorylation of Threonine 210 and the Role of Serine 137 in the Regulation of Mammalian Polo-like Kinase ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 44115-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202172200>.
- Jares, Pedro, et J Julian Blow. 1999. « Xenopus Cdc7 Function Is Dependent on Licensing but Not on XORC, XCdc6, or CDK Activity and Is Required for XCdc45 Loading ». *Genes & Development*, 13.
- Jares, Pedro, M Gloria Luciani, et J Julian Blow. 2004. « [No Title Found] ». *BMC Molecular Biology* 5 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-5-5>.
- Jazayeri, Ali, Jacob Falck, Claudia Lukas, Jiri Bartek, Graeme C. M. Smith, Jiri Lukas, et Stephen P. Jackson. 2006. « ATM- and Cell Cycle-Dependent Regulation of ATR in Response to DNA Double-Strand Breaks ». *Nature Cell Biology* 8 (1): 37-45. <https://doi.org/10.1038/ncb1337>.
- Jiang, W. 1999. « Mammalian Cdc7-Dbf4 Protein Kinase Complex Is Essential for Initiation of DNA Replication ». *The EMBO Journal* 18 (20): 5703-13. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.20.5703>.
- Jin, J. 2003. « SCF-TRCP Links Chk1 Signaling to Degradation of the Cdc25A Protein Phosphatase ». *Genes & Development* 17 (24): 3062-74. <https://doi.org/10.1101/gad.1157503>.
- Jin, Jianping, Xiaolu L. Ang, Xin Ye, Mark Livingstone, et J. Wade Harper. 2008. « Differential Roles for Checkpoint Kinases in DNA Damage-Dependent Degradation of the Cdc25A Protein Phosphatase ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (28): 19322-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802474200>.
- Johmura, Yoshikazu, Midori Shimada, Toshinori Misaki, Aya Naiki-Ito, Hiroyuki Miyoshi, Noboru Motoyama, Naoko Ohtani, et al. 2014. « Necessary and Sufficient Role for a Mitosis Skip in Senescence Induction ». *Molecular Cell* 55 (1): 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.003>.
- Karlsson, Christina, Stephanie Katich, Anja Hagting, Ingrid Hoffmann, et Jonathon Pines. 1999. « Cdc25b and Cdc25c Differ Markedly in Their Properties as Initiators of Mitosis ». *Journal of Cell Biology* 146 (3): 573-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.3.573>.
- Karlsson-Rosenthal, Christina, et Jonathan B.A. Millar. 2006. « Cdc25: Mechanisms of Checkpoint Inhibition and Recovery ». *Trends in Cell Biology* 16 (6): 285-92. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.04.002>.
- Karnani, Neerja, et Anindya Dutta. 2011. « The Effect of the Intra-S-Phase Checkpoint on Origins of Replication in Human Cells ». *Genes & Development* 25 (6): 621-33. <https://doi.org/10.1101/gad.2029711>.
- Karras, Georgios I., et Stefan Jentsch. 2010. « The RAD6 DNA Damage Tolerance Pathway Operates Uncoupled from the Replication Fork and Is Functional Beyond S Phase ». *Cell* 141 (2): 255-67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.028>.
- Kasahara, Kousuke, Hidemasa Goto, Masato Enomoto, Yasuko Tomono, Tohru Kiyono, et Masaki Inagaki. 2010. « 14-3-3 γ Mediates Cdc25A Proteolysis to Block Premature Mitotic Entry after DNA Damage ». *The EMBO Journal* 29 (16): 2802-12. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.157>.
- Katsuki, Yoko, Penny A. Jeggo, Yuki Uchihara, Minoru Takata, et Atsushi Shibata. 2020. « DNA Double-Strand Break End Resection: A Critical Relay Point for Determining the Pathway of Repair and Signaling ». *Genome Instability & Disease* 1 (4): 155-71. <https://doi.org/10.1007/s42764-020-00017-8>.
- Katsuno, Y., A. Suzuki, K. Sugimura, K. Okumura, D. H. Zineldeen, M. Shimada, H. Niida, T. Mizuno, F. Hanaoka, et M. Nakanishi. 2009. « Cyclin A-Cdk1 Regulates the Origin Firing Program in Mammalian Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (9): 3184-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809350106>.
- Katsuragi, Yoshinori, et Noriyuki Sagata. 2004. « Regulation of Chk1 Kinase by Autoinhibition and ATR-Mediated Phosphorylation ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (4): 1680-89. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-12-0874>.
- Kelm, Olaf, Mathias Wind, Wolf D. Lehmann, et Erich A. Nigg. 2002. « Cell Cycle-Regulated Phosphorylation of the *Xenopus* Polo-like Kinase Plx1 ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (28): 25247-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202855200>.
- Kim, J. M. 2002. « Inactivation of Cdc7 Kinase in Mouse ES Cells Results in S-Phase Arrest and P53-Dependent Cell Death ». *The EMBO Journal* 21 (9): 2168-79. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2168>.
- Kim, J M, N Kakusho, M Yamada, Y Kanoh, N Takemoto, et H Masai. 2008. « Cdc7 Kinase Mediates Claspin Phosphorylation in DNA Replication Checkpoint ». *Oncogene* 27 (24): 3475-82. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210994>.

- Kim, Ja-Eun, Sarah A. McAvoy, David I. Smith, et Junjie Chen. 2005. « Human TopBP1 Ensures Genome Integrity during Normal S Phase ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (24): 10907-15. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.10907-10915.2005>.
- Knight, A S, M Notaridou, et R J Watson. 2009. « A Lin-9 Complex Is Recruited by B-Myb to Activate Transcription of G2/M Genes in Undifferentiated Embryonal Carcinoma Cells ». *Oncogene* 28 (15): 1737-47. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.22>.
- Kobayashi, Kaori, Thomas A. Guillian, Masataka Tsuda, Junpei Yamamoto, Laura J. Bailey, Shigenori Iwai, Shunichi Takeda, Aidan J. Doherty, et Kouji Hirota. 2016. « Repriming by PrimPol Is Critical for DNA Replication Restart Downstream of Lesions and Chain-Terminating Nucleosides ». *Cell Cycle* 15 (15): 1997-2008. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1191711>.
- Köhler, Carsten, Dennis Koalick, Anja Fabricius, Ann Christin Parplys, Kerstin Borgmann, Helmut Pospiech, et Frank Grosse. 2016. « Cdc45 Is Limiting for Replication Initiation in Humans ». *Cell Cycle* 15 (7): 974-85. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1152424>.
- Koundrioukoff, Stéphane, Sandra Carignon, Hervé Técher, Anne Letessier, Olivier Brison, et Michelle Debatisse. 2013. « Stepwise Activation of the ATR Signaling Pathway upon Increasing Replication Stress Impacts Fragile Site Integrity ». Édité par Sharon E. Plon. *PLoS Genetics* 9 (7): e1003643. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003643>.
- Kouzine, Fedor, Ashutosh Gupta, Laura Baranello, Damian Wojtowicz, Khadija Ben-Aissa, Juhong Liu, Teresa M Przytycka, et David Levens. 2013. « Transcription-Dependent Dynamic Supercoiling Is a Short-Range Genomic Force ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (3): 396-403. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2517>.
- Krenning, Lenno, Femke M. Feringa, Indra A. Shaltiel, Jeroen van den Berg, et René H. Medema. 2014. « Transient Activation of P53 in G2 Phase Is Sufficient to Induce Senescence ». *Molecular Cell* 55 (1): 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.007>.
- Kruse, Jan-Philipp, et Wei Gu. 2009. « Modes of P53 Regulation ». *Cell* 137 (4): 609-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.050>.
- Krystyniak, A, C Garcia-Echeverria, C Prigent, et S Ferrari. 2006. « Inhibition of Aurora A in Response to DNA Damage ». *Oncogene* 25 (3): 338-48. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209056>.
- Kumagai, Akiko, et William G Dunphy. 2000. « Claspin, a Novel Protein Required for the Activation of Chk1 during a DNA Replication Checkpoint Response in Xenopus Egg Extracts ». *Molecular Cell*, octobre, 11.
- Kumagai, Akiko, et William G. Dunphy. 2003. « Repeated Phosphopeptide Motifs in Claspin Mediate the Regulated Binding of Chk1 ». *Nature Cell Biology* 5 (2): 161-65. <https://doi.org/10.1038/ncb921>.
- Kumagai, Akiko, Soo-Mi Kim, et William G. Dunphy. 2004. « Claspin and the Activated Form of ATR-ATRIP Collaborate in the Activation of Chk1 ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (48): 49599-608. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408353200>.
- Kumagai, Akiko, Joon Lee, Hae Yong Yoo, et William G. Dunphy. 2006. « TopBP1 Activates the ATR-ATRIP Complex ». *Cell* 124 (5): 943-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.041>.
- Kumagai, Akiko, Anna Shevchenko, Andrej Shevchenko, et William G. Dunphy. 2010. « Treslin Collaborates with TopBP1 in Triggering the Initiation of DNA Replication ». *Cell* 140 (3): 349-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.049>.
- . 2011. « Direct Regulation of Treslin by Cyclin-Dependent Kinase Is Essential for the Onset of DNA Replication ». *The Journal of Cell Biology* 193 (6): 995-1007. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102003>.
- Kumagai, Hiroyuki, Noriko Sato, Masayuki Yamada, Daniel Mahony, Wolfgang Seghezzi, Emma Lees, Ken-Ichi Arai, et Hisao Masai. 1999. « A Novel Growth- and Cell Cycle-Regulated Protein, ASK, Activates Human Cdc7-Related Kinase and Is Essential for G1/S Transition in Mammalian Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (7): 5083-95. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.7.5083>.
- Lam, Michael H, Qinghua Liu, Stephen J Elledge, et Jeffrey M Rosen. 2004. « Chk1 Is Haploinsufficient for Multiple Functions Critical to Tumor Suppression ». *Cancer Cell* 6 (1): 45-59. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.015>.
- Lambert, Sarah, et Antony M. Carr. 2013. « Impediments to Replication Fork Movement: Stabilisation, Reactivation and Genome Instability ». *Chromosoma* 122 (1-2): 33-45. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0398-9>.
- Lane, Heidi A, et Erich A Nigg. 1996. « Antibody Microinjection Reveals an Essential Role for Human Polo-like Kinase 1 (Plk1) in the Functional Maturation of Mitotic Centrosomes ». *Journal of Cell Biology*, 13.
- Laoukili, Jamila, Monica Alvarez, Lars A. T. Meijer, Marie Stahl, Shabaz Mohammed, Livio Kleij, Albert J. R. Heck, et René H. Medema. 2008. « Activation of FoxM1 during G2 Requires Cyclin A/Cdk-Dependent Relief of Autorepression by the FoxM1 N-Terminal Domain ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (9): 3076-87. <https://doi.org/10.1128/MCB.01710-07>.
- Laoukili, Jamila, Matthijs R. H. Kooistra, Alexandra Brás, Jos Kauw, Ron M. Kerkhoven, Ashby Morrison, Hans Clevers, et René H. Medema. 2005. « FoxM1 Is Required for Execution of the Mitotic Programme and Chromosome Stability ». *Nature Cell Biology* 7 (2): 126-36. <https://doi.org/10.1038/ncb1217>.
- Le Beau, M. 1998. « Replication of a Common Fragile Site, FRA3B, Occurs Late in S Phase and Is Delayed Further upon Induction: Implications for the Mechanism of Fragile Site Induction ». *Human Molecular Genetics* 7 (4): 755-61. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.4.755>.
- Le Tallec, Benoît, Bernard Dutrillaux, Anne-Marie Lachages, Gael Armel Millot, Olivier Brison, et Michelle Debatisse. 2011. « Molecular Profiling of Common Fragile Sites in Human

- Fibroblasts ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (12): 1421-23. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2155>.
- Lee, Alan Yueh-Luen, Takuya Chiba, Lan N. Truong, An Ning Cheng, Johnny Do, Michael Jeffrey Cho, Longchuan Chen, et Xiaohua Wu. 2012. « Dbf4 Is Direct Downstream Target of Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) and Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related (ATR) Protein to Regulate Intra-S-Phase Checkpoint ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (4): 2531-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291104>.
- Lee, Jinho, Jin Ah Kim, Valerie Barbier, Arun Fotedar, et Rati Fotedar. 2009. « DNA Damage Triggers P21^{WAF1}-Dependent Emi1 Down-Regulation That Maintains G2 Arrest ». Édité par Daniel J. Lew. *Molecular Biology of the Cell* 20 (7): 1891-1902. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0818>.
- Lee, Joon, Akiko Kumagai, et William G. Dunphy. 2001. « Positive Regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 Proteins ». Édité par Tim Hunt. *Molecular Biology of the Cell* 12 (3): 551-63. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.3.551>.
- . 2007. « The Rad9-Hus1-Rad1 Checkpoint Clamp Regulates Interaction of TopBP1 with ATR ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (38): 28036-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704635200>.
- Lee, Sang Eun, J. Kent Moore, Allyson Holmes, Keiko Umezu, Richard D Kolodner, et James E Haber. 1998. « Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50, and RPA Proteins Regulate Adaptation to G2/M Arrest after DNA Damage ». *Cell* 94 (3): 399-409. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81482-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81482-8).
- Lee, Yuan-Cho, Qing Zhou, Junjie Chen, et Jingsong Yuan. 2016. « RPA-Binding Protein ETAA1 Is an ATR Activator Involved in DNA Replication Stress Response ». *Current Biology* 26 (24): 3257-68. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.030>.
- Lemmens, Bennie, Nadia Hegarat, Karen Akopyan, Joan Sala-Gaston, Jiri Bartek, Helfrid Hochegger, et Arne Lindqvist. 2018. « DNA Replication Determines Timing of Mitosis by Restricting CDK1 and PLK1 Activation ». *Molecular Cell* 71 (1): 117-128.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.026>.
- Leone, G., J. DeGregori, Z. Yan, L. Jakoi, S. Ishida, R. S. Williams, et J. R. Nevins. 1998. « E2F3 Activity Is Regulated during the Cell Cycle and Is Required for the Induction of S Phase ». *Genes & Development* 12 (14): 2120-30. <https://doi.org/10.1101/gad.12.14.2120>.
- Leonhardt, Heinrich, Hans-Peter Rahn, Peter Weinzierl, Anje Sporbert, Thomas Cremer, Daniele Zink, et M. Cristina Cardoso. 2000. « Dynamics of DNA Replication Factories in Living Cells ». *Journal of Cell Biology* 149 (2): 271-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.271>.
- Le Tallec, Benoît, Gaël Armel Millot, Marion Esther Blin, Olivier Brison, Bernard Dutrillaux, et Michelle Debatisse. 2013. « Common Fragile Site Profiling in Epithelial and Erythroid Cells Reveals That Most Recurrent Cancer Deletions Lie in Fragile Sites Hosting Large Genes ». *Cell Reports* 4 (3): 420-28. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.003>.
- Letessier, Anne, Gaël A. Millot, Stéphane Koundrioukoff, Anne-Marie Lachagès, Nicolas Vogt, R. Scott Hansen, Bernard Malfoy, Olivier Brison, et Michelle Debatisse. 2011. « Cell-Type-Specific Replication Initiation Programs Set Fragility of the FRA3B Fragile Site ». *Nature* 470 (7332): 120-23. <https://doi.org/10.1038/nature09745>.
- Lezaja, Aleksandra, et Matthias Altmeyer. 2018. « Inherited DNA Lesions Determine G1 Duration in the next Cell Cycle ». *Cell Cycle* 17 (1): 24-32. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1383578>.
- Li, Xianghong, Qiping Zhao, Rong Liao, Peiqing Sun, et Xiaohua Wu. 2003. « The SCF^{Skp2} Ubiquitin Ligase Complex Interacts with the Human Replication Licensing Factor Cdt1 and Regulates Cdt1 Degradation ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (33): 30854-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300251200>.
- Liang, Hongqing, Alessandro Esposito, Siddharth De, Suzan Ber, Philippe Collin, Uttam Surana, et Ashok R. Venkitaraman. 2014. « Homeostatic Control of Polo-like Kinase-1 Engenders Non-Genetic Heterogeneity in G2 Checkpoint Fidelity and Timing ». *Nature Communications* 5 (1): 4048. <https://doi.org/10.1038/ncomms5048>.
- Lim, Gyubum, Yeonji Chang, et Won Ki Huh. 2020. « Phosphoregulation of Rad51/Rad52 by CDK1 functions as a molecular switch for cell cycle-specific activation of homologous recombination ». *Science Advances* 6 (6). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay2669>.
- Lindqvist, Arne, Helena Källström, Andreas Lundgren, Emad Barsoum, et Christina Karlsson Rosenthal. 2005. « Cdc25B Cooperates with Cdc25A to Induce Mitosis but Has a Unique Role in Activating Cyclin B1-Cdk1 at the Centrosome ». *Journal of Cell Biology* 171 (1): 35-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503066>.
- Lindsey-Boltz, Laura A., Özdemirhan Serçin, Jun-Hyuk Choi, et Aziz Sancar. 2009. « Reconstitution of Human Claspin-Mediated Phosphorylation of Chk1 by the ATR (Ataxia Telangiectasia-Mutated and Rad3-Related) Checkpoint Kinase ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (48): 33107-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.064485>.
- Litovchick, Larisa, Subhashini Sadasivam, Laurence Florens, Xiaopeng Zhu, Selene K. Swanson, Soundarapandian Velmurugan, Runsheng Chen, Michael P. Washburn, X. Shirley Liu, et James A. DeCaprio. 2007. « Evolutionarily Conserved Multisubunit RBL2/P130 and E2F4 Protein Complex Represses Human Cell Cycle-Dependent Genes in Quiescence ». *Molecular Cell* 26 (4): 539-51. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.015>.
- Liu, Dan, Olga Davydenko, et Michael A Lampson. 2012. « Polo-like Kinase-1 Regulates Kinetochore-Microtubule Dynamics and Spindle Checkpoint Silencing ». *Journal of Cell Biology*, 9.
- Liu, Han, Shugaku Takeda, Rakesh Kumar, Todd D. Westergard, Eric J. Brown, Tej K. Pandita, Emily H.-Y. Cheng, et James J.-D. Hsieh. 2010. « Phosphorylation of MLL by ATR Is Required for Execution of Mammalian S-Phase Checkpoint ». *Nature* 467 (7313): 343-46. <https://doi.org/10.1038/nature09350>.
- Liu, Qinghua, Saritha Guntuku, Xian-Shu Cui, Shuhei Matsuoka,

- David Cortez, Katsuyuki Tamai, Guangbin Luo, et al. 2000. « Chk1 Is an Essential Kinase That Is Regulated by Atr and Required for the G2/M DNA Damage Checkpoint », *mai*, 13.
- Liu, Xiaohui, Ming Lei, et Raymond L. Erikson. 2006. « Normal Cells, but Not Cancer Cells, Survive Severe Plk1 Depletion ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (6): 2093-2108. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2093-2108.2006>.
- Liu, Ying, Christian F Nielsen, Qi Yao, et Ian D Hickson. 2014. « The Origins and Processing of Ultra Fine Anaphase DNA Bridges ». *Current Opinion in Genetics & Development* 26 (juin): 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.03.003>.
- Löb, D., N. Lengert, V. O. Chagin, M. Reinhart, C. S. Casas-Delucchi, M. C. Cardoso, et B. Drossel. 2016. « 3D Replicon Distributions Arise from Stochastic Initiation and Domino-like DNA Replication Progression ». *Nature Communications* 7 (1): 11207. <https://doi.org/10.1038/ncomms11207>.
- Lobjois, Valérie, Carine Froment, Emmanuelle Braud, Fanny Grimal, Odile Bulet-Schiltz, Bernard Ducommun, et Jean-Pierre Bouche. 2011. « Study of the Docking-Dependent PLK1 Phosphorylation of the CDC25B Phosphatase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410 (1): 87-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.110>.
- Loewer, Alexander, Ketki Karanam, Caroline Mock, et Galit Lahav. 2013. « The P53 Response in Single Cells Is Linearly Correlated to the Number of DNA Breaks without a Distinct Threshold ». *BMC Biology* 11 (1): 114. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-114>.
- Löhr, Kristina, Constanze Möritz, Ana Contente, et Matthias Döbelstein. 2003. « P21/CDKN1A Mediates Negative Regulation of Transcription by P53 ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 32507-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212517200>.
- Lonn, Ulf, et Sigrid Lonn. 1988. « Extensive Regions of Single-Stranded DNA in Aphidicolin-Treated Melanoma Cellst ». *Biochemistry*, 5.
- Lopes, Massimo, Marco Foiani, et José M. Sogo. 2006. « Multiple Mechanisms Control Chromosome Integrity after Replication Fork Uncoupling and Restart at Irreparable UV Lesions ». *Molecular Cell* 21 (1): 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.015>.
- Lossaint, G, E Besnard, D Fisher, J Piette, et V Dulić. 2011. « Chk1 Is Dispensable for G2 Arrest in Response to Sustained DNA Damage When the ATM/P53/P21 Pathway Is Functional ». *Oncogene* 30 (41): 4261-74. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.135>.
- Lu, Lin-Yu, Jamie L. Wood, Katherine Minter-Dykhhouse, Lin Ye, Thomas L. Saunders, Xiaochun Yu, et Junjie Chen. 2008. « Polo-Like Kinase 1 Is Essential for Early Embryonic Development and Tumor Suppression ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (22): 6870-76. <https://doi.org/10.1128/MCB.00392-08>.
- Luciani, M. G. 2004. « Characterization of a Novel ATR-Dependent, Chk1-Independent, Intra-S-Phase Checkpoint That Suppresses Initiation of Replication in Xenopus ». *Journal of Cell Science* 117 (25): 6019-30. <https://doi.org/10.1242/jcs.01400>.
- Lukas, Claudia, Velibor Savic, Simon Bekker-Jensen, Carsten Doil, Beate Neumann, Ronni Sølvhøj Pedersen, Merete Grøfte, et al. 2011. « 53BP1 Nuclear Bodies Form around DNA Lesions Generated by Mitotic Transmission of Chromosomes under Replication Stress ». *Nature Cell Biology* 13 (3): 243-53. <https://doi.org/10.1038/ncb2201>.
- MacDougall, C. A., T. S. Byun, C. Van, M.-c. Yee, et K. A. Cimprich. 2007. « The Structural Determinants of Checkpoint Activation ». *Genes & Development* 21 (8): 898-903. <https://doi.org/10.1101/gad.1522607>.
- Macedo, Joana Catarina, Sara Vaz, Bjorn Bakker, Rui Ribeiro, Petra Lammigje Bakker, Jose Miguel Escandell, Miguel Godinho Ferreira, René Medema, Floris Fojier, et Elsa Logarinho. 2018. « FoxM1 Repression during Human Aging Leads to Mitotic Decline and Aneuploidy-Driven Full Senescence ». *Nature Communications* 9 (1): 2834. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05258-6>.
- Macůrek, Libor, Arne Lindqvist, Dan Lim, Michael A. Lampson, Rob Klompaker, Raimundo Freire, Christophe Clouin, Stephen S. Taylor, Michael B. Yaffe, et René H. Medema. 2008. « Polo-like Kinase-1 Is Activated by Aurora A to Promote Checkpoint Recovery ». *Nature* 455 (7209): 119-23. <https://doi.org/10.1038/nature07185>.
- Mailand, N. 2002. « Regulation of G2/M Events by Cdc25A through Phosphorylation-Dependent Modulation of Its Stability ». *The EMBO Journal* 21 (21): 5911-20. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf567>.
- Mailand, Niels, Simon Bekker-Jensen, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2006. « Destruction of Claspin by SCF β TrCP Restrains Chk1 Activation and Facilitates Recovery from Genotoxic Stress ». *Molecular Cell* 23 (3): 307-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.016>.
- Mailand, Niels, Jacob Falck, Claudia Lukas, Markus Welcker, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2000. « Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA » 288: 5.
- Majka, Jerzy, Sara K. Binz, Marc S. Wold, et Peter M. J. Burgers. 2006. « Replication Protein A Directs Loading of the DNA Damage Checkpoint Clamp to 5'-DNA Junctions ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (38): 27855-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605176200>.
- Mamely, Ivan, Marcel ATM van Vugt, Veronique AJ Smits, Jennifer I. Semple, Bennie Lemmens, Anastassis Perrakis, René H. Medema, et Raimundo Freire. 2006. « Polo-like Kinase-1 Controls Proteasome-Dependent Degradation of Claspin during Checkpoint Recovery ». *Current Biology* 16 (19): 1950-55. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.026>.
- Mao, Zhiyong, Zhonghe Ke, Vera Gorbunova, et Andrei Seluanov. 2012. « Replicatively Senescent Cells Are Arrested in G1 and G2 Phases ». *Aging* 4 (6): 431-35. <https://doi.org/10.18632/aging.100467>.
- Maréchal, Alexandre, Ju-Mei Li, Xiao Ye Ji, Ching-Shyi Wu,

- Stephanie A. Yazinski, Hai Dang Nguyen, Shizhou Liu, Amanda E. Jiménez, Jianping Jin, et Lee Zou. 2014. « PRP19 Transforms into a Sensor of RPA-SsDNA after DNA Damage and Drives ATR Activation via a Ubiquitin-Mediated Circuitry ». *Molecular Cell* 53 (2): 235-46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.002>.
- Maridor, G, P Gallant, R Golsteyn, et E A Nigg. 1993. « Nuclear Localization of Vertebrate Cyclin A Correlates with Its Ability to Form Complexes with Cdk Catalytic Subunits ». *Journal of Cell Science*, 10.
- Marumoto, Tomotoshi, Toru Hirota, Tetsuro Morisaki, Naoko Kunitoku, Dongwei Zhang, Yasuko Ichikawa, Takashi Sasayama, et al. 2002. « Roles of Aurora-A Kinase in Mitotic Entry and G2 Checkpoint in Mammalian Cells ». *Genes to Cells* 7 (11): 1173-82. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00592.x>.
- Masai, Hisao, Etsuko Matsui, Zhiying You, Yukio Ishimi, Katsuyuki Tamai, et Ken-ichi Arai. 2000. « Human Cdc7-Related Kinase Complex: *IN VITRO* PHOSPHORYLATION OF MCM BY CONFIRMED ACTIONS OF Cdk7 AND Cdc7 AND THAT OF A CRITICAL THREONINE RESIDUE OF Cdc7 BY Cdk7 ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (37): 29042-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002713200>.
- Masai, Hisao, Seiji Matsumoto, Zhiying You, Naoko Yoshizawa-Sugata, et Masako Oda. 2010. « Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? » *Annual Review of Biochemistry* 79 (1): 89-130. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.103205>.
- Masai, Hisao, Chika Taniyama, Keiko Ogino, Etsuko Matsui, Naoko Kakusho, Seiji Matsumoto, Jung-Min Kim, et al. 2006. « Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 Kinase Facilitates Its Interaction with Cdc45 on the Chromatin ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (51): 39249-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608935200>.
- Massey, Andrew J. 2016. « Inhibition of ATR-Dependent Feedback Activation of Chk1 Sensitises Cancer Cells to Chk1 Inhibitor Monotherapy ». *Cancer Letters* 383 (1): 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.024>.
- Massey, Andrew J, Stephen Stokes, Helen Browne, Nicolas Foloppe, Simon Scrase, Mandy Fallowfield, Simon Bedford, et al. 2015. « Identification of Novel, *In Vivo* Active Chk1 Inhibitors Utilizing ». *Oncotarget*, 16.
- Matsuyama, M., H. Goto, K. Kasahara, Y. Kawakami, M. Nakaniishi, T. Kiyono, N. Goshima, et M. Inagaki. 2011. « Nuclear Chk1 Prevents Premature Mitotic Entry ». *Journal of Cell Science* 124 (13): 2113-19. <https://doi.org/10.1242/jcs.086488>.
- Maya-Mendoza, Apolinar, Jitka Ostrakova, Martin Kosar, Arndur Hall, Pavlina Duskova, Martin Mistrik, Joanna Maria Merchut-Maya, et al. 2015. « Myc and Ras Oncogenes Engage Different Energy Metabolism Programs and Evoke Distinct Patterns of Oxidative and DNA Replication Stress ». *Molecular Oncology* 9 (3): 601-16. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.11.001>.
- Maya-Mendoza, Apolinar, Eva Petermann, David A F Gillespie, Keith W Caldecott, et Dean A Jackson. 2007. « Chk1 Regulates the Density of Active Replication Origins during the Vertebrate S Phase ». *The EMBO Journal* 26 (11): 2719-31. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601714>.
- McGarry, Thomas J, et Marc W Kirschner. 1998. « Geminin, an Inhibitor of DNA Replication, Is Degraded during Mitosis ». *Cell* 93 (6): 1043-53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81209-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81209-X).
- McKinley, Kara L., et Iain M. Cheeseman. 2014. « Polo-like Kinase 1 Licenses CENP-A Deposition at Centromeres ». *Cell* 158 (2): 397-411. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.016>.
- Mejlvang, Jakob, Yunpeng Feng, Constance Alabert, Kai J. Neelsen, Zuzana Jasencakova, Xiaobei Zhao, Michael Lees, et al. 2014. « New Histone Supply Regulates Replication Fork Speed and PCNA Unloading ». *The Journal of Cell Biology* 204 (1): 29-43. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305017>.
- Melixetian, Marina, Ditte Kjærsgaard Klein, Claus Storgaard Sørensen, et Kristian Helin. 2009. « NEK11 Regulates CDC25A Degradation and the IR-Induced G2/M Checkpoint ». *Nature Cell Biology* 11 (10): 1247-53. <https://doi.org/10.1038/ncb1969>.
- Méndez, Juan, X.Helena Zou-Yang, So-Young Kim, Masumi Hidaka, William P. Tansey, et Bruce Stillman. 2002. « Human Origin Recognition Complex Large Subunit Is Degraded by Ubiquitin-Mediated Proteolysis after Initiation of DNA Replication ». *Molecular Cell* 9 (3): 481-91. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00467-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00467-7).
- Mendoza, Oscar, Anne Bourdoncle, Jean-Baptiste Boulé, Robert M. Brosh, et Jean-Louis Mergny. 2016. « G-Quadruplexes and Helicases ». *Nucleic Acids Research* 44 (5): 1989-2006. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw079>.
- Meng, Zheng, Luisa Capalbo, David M. Glover, et William G. Dunphy. 2011. « Role for Casein Kinase 1 in the Phosphorylation of Claspin on Critical Residues Necessary for the Activation of Chk1 ». Édité par Daniel Lew. *Molecular Biology of the Cell* 22 (16): 2834-47. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-01-0048>.
- Merrick, Catherine J., Dean Jackson, et John F. X. Diffley. 2004. « Visualization of Altered Replication Dynamics after DNA Damage in Human Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (19): 20067-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400022200>.
- Merrick, Karl A., Stéphane Laroche, Chao Zhang, Jasmina J. Allen, Kevan M. Shokat, et Robert P. Fisher. 2008. « Distinct Activation Pathways Confer Cyclin-Binding Specificity on Cdk1 and Cdk2 in Human Cells ». *Molecular Cell* 32 (5): 662-72. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.022>.
- Michelena, Jone, Marco Gatti, Federico Teloni, Ralph Imhof, et Matthias Altmeyer. 2019. « Basal CHK1 Activity Safeguards Its Stability to Maintain Intrinsic S-Phase Checkpoint Functions ». *Journal of Cell Biology* 218 (9): 2865-75. <https://doi.org/10.1083/jcb.201902085>.
- Min, Mingwei, Yao Rong, Chengzhe Tian, et Sabrina L. Spencer. 2020. « Temporal Integration of Mitogen History in Mother Cells Controls Proliferation of Daughter Cells ». *Science* 368 (6496): 1261-65. <https://doi.org/10.1126/science.aay8241>.

- Minocherhomji, Sheroy, Songmin Ying, Victoria A. Bjerregaard, Sara Bursomanno, Aiste Aleliunaite, Wei Wu, Hocine W. Mankouri, Huahao Shen, Ying Liu, et Ian D. Hickson. 2015. « Replication Stress Activates DNA Repair Synthesis in Mitosis ». *Nature* 528 (7581): 286-90. <https://doi.org/10.1038/nature16139>.
- Molinari, Marta, Ciro Mercurio, Jorge Dominguez, Françoise Goubin, et Giulio F Draetta. 2000. « Human Cdc25 A Inactivation in Response to S Phase Inhibition and Its Role in Preventing Premature Mitosis ». *EMBO Reports* 1 (1): 71-79. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd018>.
- Montagnoli, A. 2002. « Drf1, a Novel Regulatory Subunit for Human Cdc7 Kinase ». *The EMBO Journal* 21 (12): 3171-81. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf290>.
- Montagnoli, Alessia, Barbara Valsasina, Valter Croci, Maria Menichincheri, Sonia Rainoldi, Vanessa Marchesi, Marcello Tibolla, et al. 2008. « A Cdc7 Kinase Inhibitor Restricts Initiation of DNA Replication and Has Antitumor Activity ». *Nature Chemical Biology* 4 (6): 357-65. <https://doi.org/10.1038/nchembio.90>.
- Montano, R., I. Chung, K. M. Garner, D. Parry, et A. Eastman. 2012. « Preclinical Development of the Novel Chk1 Inhibitor SCH900776 in Combination with DNA-Damaging Agents and Antimetabolites ». *Molecular Cancer Therapeutics* 11 (2): 427-38. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0406>.
- Mourón, Silvana, Sara Rodriguez-Acebes, María I Martínez-Jiménez, Sara García-Gómez, Sandra Chocrón, Luis Blanco, et Juan Méndez. 2013. « Repriming of DNA Synthesis at Stalled Replication Forks by Human PrimPol ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (12): 1383-89. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2719>.
- Müller, Gerd A., Marianne Quaas, Michael Schümann, Eberhard Krause, Megha Padi, Martin Fischer, Larisa Litovchick, James A. DeCaprio, et Kurt Engeland. 2012. « The CHR Promoter Element Controls Cell Cycle-Dependent Gene Transcription and Binds the DREAM and MMB Complexes ». *Nucleic Acids Research* 40 (4): 1561-78. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr793>.
- Müller, Gerd A., Axel Wintsche, Konstanze Stangner, Sonja J. Prohaska, Peter F. Stadler, et Kurt Engeland. 2014. « The CHR Site: Definition and Genome-Wide Identification of a Cell Cycle Transcriptional Element ». *Nucleic Acids Research* 42 (16): 10331-50. <https://doi.org/10.1093/nar/gku696>.
- Müllers, Erik, Helena Silva Cascales, Himjyot Jaiswal, Adrian T Saurin, et Arne Lindqvist. 2014. « Nuclear Translocation of Cyclin B1 Marks the Restriction Point for Terminal Cell Cycle Exit in G2 Phase ». *Cell Cycle* 13 (17): 2733-43. <https://doi.org/10.4161/15384101.2015.945831>.
- Naim, Valeria, et Filippo Rosselli. 2009. « The FANCD1 Pathway and BLM Collaborate during Mitosis to Prevent Micro-Nucleation and Chromosome Abnormalities ». *Nature Cell Biology* 11 (6): 761-68. <https://doi.org/10.1038/ncb1883>.
- Naim, Valeria, Therese Wilhelm, Michelle Debatisse, et Filippo Rosselli. 2013. « ERCC1 and MUS81-EME1 Promote Sister Chromatid Separation by Processing Late Replication Intermediates at Common Fragile Sites during Mitosis ». *Nature Cell Biology* 15 (8): 1008-15. <https://doi.org/10.1038/ncb2793>.
- Nakajima, Hiroyuki, Fumiko Toyoshima-Morimoto, Eri Taniguchi, et Eisuke Nishida. 2003. « Identification of a Consensus Motif for Plk (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (28): 25277-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300126200>.
- Narasimha, Anil M, Manuel Kaulich, Gary S Shapiro, Yoon J Choi, Piotr Sicinski, et Steven F Dowdy. 2014. « Cyclin D Activates the Rb Tumor Suppressor by Mono-Phosphorylation ». *eLife* 3 (juin): e02872. <https://doi.org/10.7554/eLife.02872>.
- Neelsen, Kai J., et Massimo Lopes. 2015. « Replication Fork Reversal in Eukaryotes: From Dead End to Dynamic Response ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (4): 207-20. <https://doi.org/10.1038/nrm3935>.
- Neelsen, Kai J., Isabella M.Y. Zanini, Raquel Herrador, et Massimo Lopes. 2013. « Oncogenes Induce Genotoxic Stress by Mitotic Processing of Unusual Replication Intermediates ». *The Journal of Cell Biology* 200 (6): 699-708. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212058>.
- Nera, Bernadette, Hui-Shun Huang, Thao Lai, et Lifeng Xu. 2015. « Elevated Levels of TRF2 Induce Telomeric Ultrafine Anaphase Bridges and Rapid Telomere Deletions ». *Nature Communications* 6 (1): 10132. <https://doi.org/10.1038/ncomms10132>.
- Nicholson, Joshua M, Joana C Macedo, Aaron J Mattingly, Darawalee Wangsa, Jordi Camps, Vera Lima, Ana M Gomes, et al. 2015. « Chromosome Mis-Segregation and Cytokinesis Failure in Trisomic Human Cells ». *eLife* 4 (mai): e05068. <https://doi.org/10.7554/eLife.05068>.
- Nielsen, Christian F., Diana Huttner, Anna H. Bizard, Seiki Hirano, Tian-Neng Li, Timea Palmal-Pallag, Victoria A. Bjerregaard, et al. 2015. « PICH Promotes Sister Chromatid Disjunction and Co-Operates with Topoisomerase II in Mitosis ». *Nature Communications* 6 (1): 8962. <https://doi.org/10.1038/ncomms9962>.
- Niida, Hiroyuki, Yuko Katsuno, Birendranath Banerjee, M. Prakash Hande, et Makoto Nakanishi. 2007. « Specific Role of Chk1 Phosphorylations in Cell Survival and Checkpoint Activation ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (7): 2572-81. <https://doi.org/10.1128/MCB.01611-06>.
- Nishitani, Hideo, Nozomi Sugimoto, Vassilis Roukos, Yohsuke Nakanishi, Masafumi Saijo, Chikashi Obuse, Toshiki Tsurimoto, et al. 2006. « Two E3 Ubiquitin Ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, Target Human Cdt1 for Proteolysis ». *The EMBO Journal* 25 (5): 1126-36. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601002>.
- Nishitani, Hideo, Stavros Taraviras, Zoi Lygerou, et Takeharu Nishimoto. 2001. « The Human Licensing Factor for DNA Replication Cdt1 Accumulates in G₁ and Is Destabilized after Initiation of S-Phase ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 44905-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105406200>.
- O'Driscoll, Mark, Victor L. Ruiz-Perez, C. Geoffrey Woods, Penny A. Jeggo, et Judith A. Goodship. 2003. « A Splicing Mutation Affecting Expression of Ataxia-Telangiectasia and Rad3-Related

- Protein (ATR) Results in Seckel Syndrome ». *Nature Genetics* 33 (4): 497-501. <https://doi.org/10.1038/ng1129>.
- Okamoto, Yusuke, Watal M Iwasaki, Kazuto Kugou, Kazuki K Takahashi, Arisa Oda, Koichi Sato, Wataru Kobayashi, et al. 2018. « Replication Stress Induces Accumulation of FANCD2 at Central Region of Large Fragile Genes ». *Nucleic Acids Research* 46 (6): 2932-44. <https://doi.org/10.1093/nar/gky058>.
- O'Keefe, Raymond T. 1992. « Dynamic Organization of DNA Replication in Mammalian Cell Nuclei: Spatially and Temporally Defined Replication of Chromosome-Specific a-Satellite DNA Sequences ». *The Journal of Cell Biology* 116: 16.
- Orthwein, A., A. Fradet-Turcotte, S. M. Noordermeer, M. D. Canny, C. M. Brun, J. Strecker, C. Escribano-Diaz, et D. Durocher. 2014. « Mitosis Inhibits DNA Double-Strand Break Repair to Guard Against Telomere Fusions ». *Science* 344 (6180): 189-93. <https://doi.org/10.1126/science.1248024>.
- Osterloh, Lisa, Björn von Eyss, Fabienne Schmit, Lena Rein, Denise Hübner, Birgit Samans, Stefanie Hauser, et Stefan Gaubatz. 2007. « The Human SynMuv-like Protein LIN-9 Is Required for Transcription of G2/M Genes and for Entry into Mitosis ». *The EMBO Journal* 26 (1): 144-57. <https://doi.org/10.1038/sj-emboj.7601478>.
- Özer, Özgün, et Ian D. Hickson. 2018. « Pathways for Maintenance of Telomeres and Common Fragile Sites during DNA Replication Stress ». *Open Biology* 8 (4): 180018. <https://doi.org/10.1098/rsob.180018>.
- Ozeri-Galai, Efrat, Ronald Lebofsky, Ayelet Rahat, Assaf C. Bester, Aaron Bensimon, et Batsheva Kerem. 2011. « Failure of Origin Activation in Response to Fork Stalling Leads to Chromosomal Instability at Fragile Sites ». *Molecular Cell* 43 (1): 122-31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.019>.
- Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, et G. Draetta. 1992. « Cyclin A Is Required at Two Points in the Human Cell Cycle. » *The EMBO Journal* 11 (3): 961-71. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05135.x>.
- Palecek, Jan. 2018. « SMC5/6: Multifunctional Player in Replication ». *Genes* 10 (1): 7. <https://doi.org/10.3390/genes10010007>.
- Palermo, Valentina, Sara Rinalducci, Massimo Sanchez, Francesca Grillini, Joshua A. Sommers, Robert M. Brosh, Lello Zolla, Annapaola Franchitto, et Pietro Pichierri. 2016. « CDK1 Phosphorylates WRN at Collapsed Replication Forks ». *Nature Communications* 7 (1): 12880. <https://doi.org/10.1038/ncomms12880>.
- Parker, Matthew W., Michael R. Botchan, et James M. Berger. 2017. « Mechanisms and Regulation of DNA Replication Initiation in Eukaryotes ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52 (2): 107-44. <https://doi.org/10.1080/10409238.2016.1274717>.
- Passerini, Verena, Efrat Ozeri-Galai, Mirjam S. de Pagter, Neysan Donnelly, Sarah Schmalbrock, Wigard P. Kloosterman, Batsheva Kerem, et Zuzana Storchová. 2016. « The Presence of Extra Chromosomes Leads to Genomic Instability ». *Nature Communications* 7 (1): 10754. <https://doi.org/10.1038/ncomms10754>.
- Pellicoli, Achille, Sang Eun Lee, Chiara Lucca, Marco Foiani, et James E Haber. 2001. « Regulation of Saccharomyces Rad53 Checkpoint Kinase during Adaptation from DNA Damage-Induced G2/M Arrest ». *Molecular Cell* 7 (2): 293-300. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00177-0).
- Pennycook, Betheny R., et Alexis R. Barr. 2020. « Restriction Point Regulation at the Crossroads between Quiescence and Cell Proliferation ». *FEBS Letters* 594 (13): 2046-60. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13867>.
- Pentzold, Constanze, Shiraz Ali Shah, Niels Richard Hansen, Benoît Le Tallec, Andaine Seguin-Orlando, Michelle Debatisse, Michael Lisby, et Vibe H Oestergaard. 2018. « FANCD2 Binding Identifies Conserved Fragile Sites at Large Transcribed Genes in Avian Cells ». *Nucleic Acids Research* 46 (3): 1280-94. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1260>.
- Pepe, Alessandra, et Stephen C. West. 2014. « MUS81-EME2 Promotes Replication Fork Restart ». *Cell Reports* 7 (4): 1048-55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.007>.
- Peschiaroli, Angelo, N. Valerio Dorrello, Daniele Guardavaccaro, Monica Venere, Thanos Halazonetis, Nicholas E. Sherman, et Michele Pagano. 2006. « SCF β TrCP-Mediated Degradation of Claspin Regulates Recovery from the DNA Replication Checkpoint Response ». *Molecular Cell* 23 (3): 319-29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.013>.
- Petermann, Eva, Apolinar Maya-Mendoza, George Zachos, David A. F. Gillespie, Dean A. Jackson, et Keith W. Caldecott. 2006. « Chk1 Requirement for High Global Rates of Replication Fork Progression during Normal Vertebrate S Phase ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (8): 3319-26. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.3319-3326.2006>.
- Petersen, B. O. 1999. « Phosphorylation of Mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 Regulates Its Subcellular Localization ». *The EMBO Journal* 18 (2): 396-410. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.396>.
- Petryk, Nataliya, Malik Kahli, Yves d'Aubenton-Carafa, Yan Jaszczyszyn, Yimin Shen, Maud Silvain, Claude Thermes, Chun-Long Chen, et Olivier Hyrien. 2016. « Replication Landscape of the Human Genome ». *Nature Communications* 7 (1): 10208. <https://doi.org/10.1038/ncomms10208>.
- Pfander, Boris, et Joao Matos. 2017. « Control of Mus81 Nuclease during the Cell Cycle ». *FEBS Letters* 591 (14): 2048-56. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12727>.
- Pines, Jonathon, Tony Hunter, et San Diego. 1991. « Human Cyclins A and B1 Are Differentially Located in the Cell and Undergo Cell Cycle-Dependent Nuclear Transport ». *The Journal of Cell Biology* 115: 17.
- Poli, Jérôme, Olga Tsaponina, Laure Crabbé, Andrea Keszthelyi, Véronique Pantesco, Andrei Chabes, Armelle Lengronne, et Philippe Pasero. 2012. « DNTP Pools Determine Fork Progression and Origin Usage under Replication Stress: S-Phase Progression

- under Replication Stress ». *The EMBO Journal* 31 (4): 883-94. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.470>.
- Pope, Benjamin D., Tyrone Ryba, Vishnu Dileep, Feng Yue, Weisheng Wu, Olgert Denas, Daniel L. Vera, et al. 2014. « Topologically Associating Domains Are Stable Units of Replication-Timing Regulation ». *Nature* 515 (7527): 402-5. <https://doi.org/10.1038/nature13986>.
- Priego Moreno, Sara, Rebecca M Jones, Divyasree Poovathumkadavil, Shaun Scaramuzza, et Agnieszka Gambus. 2019. « Mitotic Replisome Disassembly Depends on TRAI Ubiquitin Ligase Activity ». *Life Science Alliance* 2 (2): e201900390. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900390>.
- Primo, Luiza M. F., et Leonardo K. Teixeira. 2020. « DNA Replication Stress: Oncogenes in the Spotlight ». *Genetics and Molecular Biology* 43 (1 suppl 1): e20190138. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0138>.
- Pringleau, Marie-Noëlle, et David M. MacAlpine. 2016. « DNA Replication Origins—Where Do We Begin? ». *Genes & Development* 30 (15): 1683-97. <https://doi.org/10.1101/gad.285114.116>.
- Qin, Bo, Bowen Gao, Jia Yu, Jian Yuan, et Zhenkun Lou. 2013. « Ataxia Telangiectasia-Mutated- and Rad3-Related Protein Regulates the DNA Damage-Induced G₂/M Checkpoint through the Aurora A Cofactor Bora Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (22): 16139-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.456780>.
- Rainey, Michael, Brendan Harhen, Guan-Nan Wang, Paul Murphy, et Corrado Santocanale. 2013. « Cdc7-Dependent and -Independent Phosphorylation of Claspin in the Induction of the DNA Replication Checkpoint ». *Cell Cycle* 12 (10): 1560-68. <https://doi.org/10.4161/cc.24675>.
- Rhind, N., et D. M. Gilbert. 2013. « DNA Replication Timing ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (8): a010132-a010132. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010132>.
- Rodriguez-Acebes, Sara, Silvana Mourón, et Juan Méndez. 2018. « Uncoupling Fork Speed and Origin Activity to Identify the Primary Cause of Replicative Stress Phenotypes ». *Journal of Biological Chemistry* 293 (33): 12855-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003740>.
- Roshak, Amy K, Elizabeth A Capper, Christina Imburgia, James Fornwald, Gilbert Scott, et Lisa A Marshall. 2000. « The Human Polo-like Kinase, PLK, Regulates Cdc2/Cyclin B through Phosphorylation and Activation of the Cdc25C Phosphatase ». *Cellular Signalling* 12 (6): 405-11. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(00)00080-2).
- Ruiz, Sergio, Cristina Mayor-Ruiz, Vanesa Lafarga, Matilde Murga, Maria Vega-Sendino, Sagrario Ortega, et Oscar Fernandez-Capetillo. 2016. « A Genome-Wide CRISPR Screen Identifies CDC25A as a Determinant of Sensitivity to ATR Inhibitors ». *Molecular Cell* 62 (2): 307-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.006>.
- Rundle, Stuart, Alice Bradbury, Yvette Drew, et Nicola Curtin. 2017. « Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy ». *Cancers* 9 (12): 41. <https://doi.org/10.3390/cancers9050041>.
- Sadasivam, S., S. Duan, et J. A. DeCaprio. 2012. « The MuvB Complex Sequentially Recruits B-Myb and FoxM1 to Promote Mitotic Gene Expression ». *Genes & Development* 26 (5): 474-89. <https://doi.org/10.1101/gad.181933.111>.
- Saha, Partha, Junjie Chen, Kelly C. Thome, Stephanie J. Lawlis, Zhi-hui Hou, Marvin Hendricks, Jeffrey D. Parvin, et Anindya Dutta. 1998. « Human CDC6/Cdc18 Associates with Orc1 and Cyclin-Cdk and Is Selectively Eliminated from the Nucleus at the Onset of S Phase ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (5): 2758-67. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.5.2758>.
- Sakaue-Sawano, Asako, Hiroshi Kurokawa, Toshifumi Morimura, Aki Hanyu, Hiroshi Hama, Hatsuki Osawa, Saori Kashiwagi, et al. 2008. « Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression ». *Cell* 132 (3): 487-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.033>.
- Sakurikar, Nandini, Ruth Thompson, Ryan Montano, et Alan Eastman. 2016. « A Subset of Cancer Cell Lines Is Acutely Sensitive to the Chk1 Inhibitor MK-8776 as Monotherapy Due to CDK2 Activation in S Phase ». *Oncotarget* 7 (2): 1380-94. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6364>.
- Saldívar, Joshua C., Stephan Hamperl, Michael J. Bocek, Mingyu Chung, Thomas E. Bass, Fernanda Cisneros-Soberanis, Kumiko Samejima, et al. 2018. « An Intrinsic S/G2 Checkpoint Enforced by ATR ». *Science* 361 (6404): 806-10. <https://doi.org/10.1126/science.aap9346>.
- Sanchez, Y. 1997. « Conservation of the Chk1 Checkpoint Pathway in Mammals: Linkage of DNA Damage to Cdk Regulation Through Cdc25 ». *Science* 277 (5331): 1497-1501. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1497>.
- Sandell, L. 1993. « Loss of a Yeast Telomere: Arrest, Recovery, and Chromosome Loss ». *Cell* 75 (4): 729-39. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90493-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90493-A).
- Santamaría, David, Cédric Barrière, Antonio Cerqueira, Sarah Hunt, Claudine Tardy, Kathryn Newton, Javier F. Cáceres, Pierre Dubus, Marcos Malumbres, et Mariano Barbacid. 2007. « Cdk1 Is Sufficient to Drive the Mammalian Cell Cycle ». *Nature* 448 (7155): 811-15. <https://doi.org/10.1038/nature06046>.
- Schiavone, Davide, Stanislaw K. Jozwiakowski, Marina Romanello, Guillaume Guilbaud, Thomas A. Guillian, Laura J. Bailey, Julian E. Sale, et Aidan J. Doherty. 2016. « PrimPol Is Required for Replicative Tolerance of G Quadruplexes in Vertebrate Cells ». *Molecular Cell* 61 (1): 161-69. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.038>.
- Schmidt, Uta, Yvonne Wollmann, Claudia Franke, Frank Grosse, Hans-Peter Saluz, et Frank Hänel. 2008. « Characterization of the Interaction between the Human DNA Topoisomerase II β -Binding Protein 1 (TopBP1) and the Cell Division Cycle 45 (Cdc45) Protein ». *Biochemical Journal* 409 (1): 169-77. <https://doi.org/10.1042/BJ20070872>.

- Schmitt, E., R. Boutros, C. Froment, B. Monsarrat, B. Ducommun, et C. Dozier. 2006. « CHK1 Phosphorylates CDC25B during the Cell Cycle in the Absence of DNA Damage ». *Journal of Cell Science* 119 (20): 4269-75. <https://doi.org/10.1242/jcs.03200>.
- Schwarz, Clayton, Amy Johnson, Mardo Kõivomägi, Evgeny Zatulovskiy, Carolyn J. Kravitz, Andreas Doncic, et Jan M. Skotheim. 2018. « A Precise Cdk Activity Threshold Determines Passage through the Restriction Point ». *Molecular Cell* 69 (2): 253-264.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.017>.
- Scorah, Jennifer, et Clare H. McGowan. 2009. « Claspin and Chk1 Regulate Replication Fork Stability by Different Mechanisms ». *Cell Cycle* 8 (7): 1036-43. <https://doi.org/10.4161/cc.8.7.8040>.
- Seki, A., J. A. Coppinger, C.-Y. Jang, J. R. Yates, et G. Fang. 2008. « Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry ». *Science* 320 (5883): 1655-58. <https://doi.org/10.1126/science.1157425>.
- Seki, Akiko, Judith A. Coppinger, Haining Du, Chang-Young Jang, John R. Yates, et Guowei Fang. 2008. « Plk1- and β -TrCP-Dependent Degradation of Bora Controls Mitotic Progression ». *Journal of Cell Biology* 181 (1): 65-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712027>.
- Shaltiel, I. A., L. Krenning, W. Bruinsma, et R. H. Medema. 2015. « The Same, Only Different - DNA Damage Checkpoints and Their Reversal throughout the Cell Cycle ». *Journal of Cell Science* 128 (4): 607-20. <https://doi.org/10.1242/jcs.163766>.
- Sheaff, Robert, Diane Ilsey, et Robert Kuchta. 1991. « Mechanism of DNA Polymerase Alpha Inhibition by Aphidicolin ». *Biochemistry*, 8.
- Shibata, Atsushi, Davide Moiani, Andrew S. Arvai, Jefferson Perry, Shane M. Harding, Marie-Michelle Genois, Ranjan Maity, et al. 2014. « DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities ». *Molecular Cell* 53 (1): 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003>.
- Shieh, Sheau-Yann, Jinwoo Ahn, Katsuyuki Tamai, Yoichi Taya, et Carol Prives. 2000. « The Human Homologs of Checkpoint Kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) Phosphorylate P53 at Multiple DNA Damage-Inducible Sites ». *Genes & Development*, 12.
- Shimada, Midori, Hiroyuki Niida, Doaa H. Zineldeen, Hideaki Tagami, Masafumi Tanaka, Hiroyuki Saito, et Makoto Nakanishi. 2008. « Chk1 Is a Histone H3 Threonine 11 Kinase That Regulates DNA Damage-Induced Transcriptional Repression ». *Cell* 132 (2): 221-32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.013>.
- Shirahige, Katsuhiko, Yuji Hori, Katsuya Shiraishi, Minoru Yamashita, Keiko Takahashi, Chikashi Obuse, Toshiki Tsurimoto, et Hiroshi Yoshikawa. 1998. « Regulation of DNA-Replication Origins during Cell-Cycle Progression ». *Nature* 395 (6702): 618-21. <https://doi.org/10.1038/27007>.
- Shukla, Anil, Dong Kong, Meena Sharma, Valentin Magidson, et Jadranka Loncarek. 2015. « Plk1 Relieves Centriole Block to Reduplication by Promoting Daughter Centriole Maturation ». *Nature Communications* 6 (1): 8077. <https://doi.org/10.1038/ncomms9077>.
- Silva, Tania, Rachael H. Bradley, Yuefeng Gao, et Martine Coue. 2006. « *Xenopus* CDC7/DRF1 Complex Is Required for the Initiation of DNA Replication ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (17): 11569-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510278200>.
- Smits, Veronique A. J., Rob Klompmaaker, Lionel Arnaud, Gert Rijksen, Erich A. Nigg, et René 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>.
- Smits, Veronique A.J., Philip M. Reaper, et Stephen P. Jackson. 2006. « Rapid PIKK-Dependent Release of Chk1 from Chromatin Promotes the DNA-Damage Checkpoint Response ». *Current Biology* 16 (2): 150-59. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.066>.
- Sonneville, Remi, Rahul Bhowmick, Saskia Hoffmann, Niels Mailand, Ian D Hickson, et Karim Labib. 2019. « TRAIIP Drives Replicative Disassembly and Mitotic DNA Repair Synthesis at Sites of Incomplete DNA Replication ». *ELife* 8 (septembre): e48686. <https://doi.org/10.7554/eLife.48686>.
- Sørensen, Claus Storgaard, Claudia Lukas, Edgar R. Kramer, Jan-Michael Peters, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2001. « A Conserved Cyclin-Binding Domain Determines Functional Interplay between Anaphase-Promoting Complex-Cdh1 and Cyclin A-Cdk2 during Cell Cycle Progression ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (11): 3692-3703. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.11.3692-3703.2001>.
- Sørensen, Claus Storgaard, Randi G. Syljuåsen, Jacob Falck, Tine Schroeder, Lars Rønnstrand, Kum Kum Khanna, Bin-Bing Zhou, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2003. « Chk1 Regulates the S Phase Checkpoint by Coupling the Physiological Turnover and Ionizing Radiation-Induced Accelerated Proteolysis of Cdc25A ». *Cancer Cell* 3 (3): 247-58. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00048-5).
- Soto, Mar, Jonne A. Raaijmakers, Bjorn Bakker, Diana C.J. Spierings, Peter M. Lansdorp, Floris Fojier, et René H. Medema. 2017. « P53 Prohibits Propagation of Chromosome Segregation Errors That Produce Structural Aneuploidies ». *Cell Reports* 19 (12): 2423-31. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.055>.
- Spencer, Sabrina L., Steven D. Cappell, Feng-Chiao Tsai, K. Wesley Overton, Clifford L. Wang, et Tobias Meyer. 2013. « The Proliferation-Quiescence Decision Is Controlled by a Bifurcation in CDK2 Activity at Mitotic Exit ». *Cell* 155 (2): 369-83. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.062>.
- Spies, Julian, Claudia Lukas, Kumar Somyajit, Maj-Britt Rask, Jiri Lukas, et Kai John Neelsen. 2019. « 53BP1 Nuclear Bodies Enforce Replication Timing at Under-Replicated DNA to Limit Heritable DNA Damage ». *Nature Cell Biology* 21 (4): 487-97. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0293-6>.
- Srinivasan, Seetha V., David Dominguez-Sola, Lily C. Wang, Olivier Hyrien, et Jean Gautier. 2013. « Cdc45 Is a Critical Effector of Myc-Dependent DNA Replication Stress ». *Cell Reports* 3 (5): 1629-39. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.002>.

- Stagno d'Alcontres, Martina, Alejandro Palacios, Diego Mejias, et Maria A Blasco. 2014. « TopoII α Prevents Telomere Fragility and Formation of Ultra Thin DNA Bridges during Mitosis through TRF1-Dependent Binding to Telomeres ». *Cell Cycle* 13 (9): 1463-81. <https://doi.org/10.4161/cc.28419>.
- Stern, B, et Paul Nurse. 1996. « A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast ». *Trends in Genetics* 12 (9): 345-50. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(96\)80016-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(96)80016-3).
- Stinchcomb, DT, K Struhl, et R.W Davis. 1979. « Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator ». *Nature*.
- Šviković, Saša, Alastair Crisp, Sue Mei Tan-Wong, Thomas A Guillian, Aidan J Doherty, Nicholas J Proudfoot, Guillaume Guilbaud, et Julian E Sale. 2019. « R-loop Formation during S Phase Is Restricted by PrimPol-mediated Repriming ». *The EMBO Journal* 38 (3). <https://doi.org/10.15252/embj.201899793>.
- Syljuåsen, Randi G., Sanne Jensen, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 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 Research* 66 (21): 10253-57. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2144>.
- Syljuåsen, Randi G., Claus Storgaard Sørensen, Lasse Tengbjerg Hansen, Kasper Fugger, Cecilia Lundin, Fredrik Johansson, Thomas Helleday, Maxwell Sehested, Jiri Lukas, et Jiri Bartek. 2005. « Inhibition of Human Chk1 Causes Increased Initiation of DNA Replication, Phosphorylation of ATR Targets, and DNA Breakage ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (9): 3553-62. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.9.3553-3562.2005>.
- Szmyd, Radoslaw, Joanna Niska-Blakie, M. Kasim Diril, Patricia Renck Nunes, Konstantinos Tzelepis, Aurélie Lacroix, Noémi van Hul, et al. 2019. « Premature Activation of Cdk1 Leads to Mitotic Events in S Phase and Embryonic Lethality ». *Oncogene* 38 (7): 998-1018. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0464-0>.
- Tada, Shusuke, Anatoliy Li, Domenico Maiorano, Marcel Méchali, et J. Julian Blow. 2001. « Repression of Origin Assembly in Metaphase Depends on Inhibition of RLF-B/Cdt1 by Geminin ». *Nature Cell Biology* 3 (2): 107-13. <https://doi.org/10.1038/35055000>.
- Takai, Hiroyuki, Kaoru Tominaga, Noboru Motoyama, Yohji A Minamishima, Hiroyasu Nagahama, Tadasuke Tsukiyama, Kyoji Ikeda, Keiko Nakayama, Makoto Nakanishi, et Kei-ichi Nakayama. 2000. « Aberrant Cell Cycle Checkpoint Function and Early Embryonic Death in Chk1 $^{-/-}$ Mice », mai, 10.
- Tarasov, Kirill V., Yelena S. Tarasova, Wai Leong Tam, Daniel R. Riordon, Steven T. Elliott, Gabriela Kania, Jinliang Li, et al. 2008. « B-MYB Is Essential for Normal Cell Cycle Progression and Chromosomal Stability of Embryonic Stem Cells ». Édité par Thomas Zwaka. *PLoS ONE* 3 (6): e2478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002478>.
- Tavernier, Nicolas, Anna Noatynska, Costanza Panbianco, Lisa Martino, Lucie Van Hove, Françoise Schwager, Thibaut Léger, Monica Gotta, et Lionel Pintard. 2015. « Cdk1 Phosphorylates SPAT-1/Bora to Trigger PLK-1 Activation and Drive Mitotic Entry in *C. Elegans* Embryos ». *Journal of Cell Biology* 208 (6): 661-69. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408064>.
- Taylor, William R, Munna L Agarwal, Archana Agarwal, Dennis W Stacey, et George R Stark. 1999. « P53 Inhibits Entry into Mitosis When DNA Synthesis Is Blocked ». *Oncogene* 18 (2): 283-95. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202516>.
- Técher, Hervé, Stéphane Koundrioukoff, Sandra Carignon, Therese Wilhelm, Gaël A. Millot, Bernard S. Lopez, Olivier Brison, et Michelle Debatisse. 2016. « Signaling from Mus81-Eme2-Dependent DNA Damage Elicited by Chk1 Deficiency Modulates Replication Fork Speed and Origin Usage ». *Cell Reports* 14 (5): 1114-27. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.093>.
- Técher, Hervé, Stéphane Koundrioukoff, Alain Nicolas, et Michelle Debatisse. 2017. « The Impact of Replication Stress on Replication Dynamics and DNA Damage in Vertebrate Cells ». *Nature Reviews Genetics* 18 (9): 535-50. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.46>.
- Tenca, Pierluigi, Deborah Brotherton, Alessia Montagnoli, Sonia Rainoldi, Clara Albanese, et Corrado Santocanale. 2007. « Cdc7 Is an Active Kinase in Human Cancer Cells Undergoing Replication Stress ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (1): 208-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604457200>.
- Thangavel, Saravanabhavan, Matteo Berti, Maryna Levikova, Cosimo Pinto, Shivasankari Gomathinayagam, Marko Vujanovic, Ralph Zellweger, et al. 2015. « DNA2 Drives Processing and Restart of Reversed Replication Forks in Human Cells ». *Journal of Cell Biology* 208 (5): 545-62. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406100>.
- Thomas, Yann, Luca Cirillo, Costanza Panbianco, Lisa Martino, Nicolas Tavernier, Françoise Schwager, Lucie Van Hove, et al. 2016. « Cdk1 Phosphorylates SPAT-1/Bora to Promote Plk1 Activation in *C. Elegans* and Human Cells ». *Cell Reports* 15 (3): 510-18. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.049>.
- Thompson, Sarah L., et Duane A. Compton. 2010. « Proliferation of Aneuploid Human Cells Is Limited by a P53-Dependent Mechanism ». *The Journal of Cell Biology* 188 (3): 369-81. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905057>.
- Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, J. M. Williams, J. N. Sarkaria, W. A. Cliby, S.-Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives, et R. T. Abraham. 1999. « A Role for ATR in the DNA Damage-Induced Phosphorylation of P53 ». *Genes & Development* 13 (2): 152-57. <https://doi.org/10.1101/gad.13.2.152>.
- Tkacz-Stachowska, Kinga, Christin Lund-Andersen, Angeliki Velissarou, June H. Myklebust, Trond Stokke, et Randi G. Syljuåsen. 2011. « The Amount of DNA Damage Needed to Activate the Radiation-Induced G2 Checkpoint Varies between Single Cells ». *Radiotherapy and Oncology* 101 (1): 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.05.060>.
- Toczyski, David P, David J Galgoczy, et Leland H Hartwell. 1997. « CDC5 and CKII Control Adaptation to the Yeast DNA Damage Checkpoint ». *Cell*, septembre, 10.

- Toledo, Franck, et Geoffrey M. Wahl. 2006. « Regulating the P53 Pathway: In Vitro Hypotheses, in Vivo Veritas ». *Nature Reviews Cancer* 6 (12): 909-23. <https://doi.org/10.1038/nrc2012>.
- Toledo, Luis I, Matilde Murga, Rafal Zur, Rebeca Soria, Antonio Rodriguez, Sonia Martinez, Julien Oyarzabal, Joaquin Pastor, James R Bischoff, et Oscar Fernandez-Capetillo. 2011. « A Cell-Based Screen Identifies ATR Inhibitors with Synthetic Lethal Properties for Cancer-Associated Mutations ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (6): 721-27. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2076>.
- Toledo, Luis Ignacio, Matthias Altmeyer, Maj-Britt Rask, Claudia Lukas, Dorthe Helena Larsen, Lou Klitgaard Povlsen, Simon Bekker-Jensen, Niels Mailand, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2013. « ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA ». *Cell* 155 (5): 1088-1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.043>.
- Tomimatsu, Nozomi, Bipasha Mukherjee, Molly Catherine Hardebeck, Mariya Ilcheva, Cristel Vanessa Camacho, Janelle Louise Harris, Matthew Porteus, Bertrand Llorente, Kum Kum Khanna, et Sandeep Burma. 2014. « Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 Regulates DNA End Resection and Repair Pathway Choice ». *Nature Communications* 5 (1): 3561. <https://doi.org/10.1038/ncomms4561>.
- Torres-Rosell, J., G. De Piccoli, V. Cordon-Preciado, S. Farmer, A. Jarmuz, F. Machin, P. Pasero, M. Lisby, J. E. Haber, et L. Aragon. 2007. « Anaphase Onset Before Complete DNA Replication with Intact Checkpoint Responses ». *Science* 315 (5817): 1411-15. <https://doi.org/10.1126/science.1134025>.
- Toufektchan, Eléonore, et Franck Toledo. 2018. « The Guardian of the Genome Revisited: P53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure ». *Cancers* 10 (5): 135. <https://doi.org/10.3390/cancers10050135>.
- Tsuji, Toshiya, Scott B Ficarro, et Wei Jiang. 2006. « Essential Role of Phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the Initiation of DNA Replication in Mammalian Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 17: 14.
- Tsuji, Toshiya, Eric Lau, Gary G. Chiang, et Wei Jiang. 2008. « The Role of Dbf4/Drf1-Dependent Kinase Cdc7 in DNA-Damage Checkpoint Control ». *Molecular Cell* 32 (6): 862-69. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.005>.
- Tsvetkov, Lyuben, et David F. Stern. 2005. « Phosphorylation of Plk1 at S137 and T210 Is Inhibited in Response to DNA Damage ». *Cell Cycle* 4 (1): 166-71. <https://doi.org/10.4161/cc.4.1.1348>.
- Tuduri, Sandie, Laure Crabbé, Chiara Conti, Hélène Tourrière, Heidi Holtgreve-Grez, Anna Jauch, Véronique Pantescio, et al. 2009. « Topoisomerase I Suppresses Genomic Instability by Preventing Interference between Replication and Transcription ». *Nature Cell Biology* 11 (11): 1315-24. <https://doi.org/10.1038/ncb1984>.
- Uto, Katsuhiko, Daigo Inoue, Ken Shimuta, Nobushige Nakajo, et Noriyuki Sagata. 2004. « Chk1, but Not Chk2, Inhibits Cdc25 Phosphatases by a Novel Common Mechanism ». *The EMBO Journal* 23 (16): 3386-96. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600328>.
- Van, Christopher, Shan Yan, W. Matthew Michael, Shou Waga, et Karlene A. Cimprich. 2010. « Continued Primer Synthesis at Stalled Replication Forks Contributes to Checkpoint Activation ». *The Journal of Cell Biology* 189 (2): 233-46. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909105>.
- van den Berg, Jeroen, Anna G. Manjón, Karoline Kielbassa, Femke M Feringa, Raimundo Freire, et René H Medema. 2018. « A Limited Number of Double-Strand DNA Breaks Is Sufficient to Delay Cell Cycle Progression ». *Nucleic Acids Research* 46 (19): 10132-44. <https://doi.org/10.1093/nar/gky786>.
- Varmeh, Shohreh, et James J. Manfredi. 2009. « Inappropriate Activation of Cyclin-Dependent Kinases by the Phosphatase Cdc25b Results in Premature Mitotic Entry and Triggers a P53-Dependent Checkpoint ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (14): 9475-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900037200>.
- 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 ». Édité par Michael Lichten. *PLoS Biology* 8 (1): e1000286. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000286>.
- Vigneron, Suzanne, Lena Sundermann, Jean-Claude Labbé, Lionel Pintard, Ovidiu Radulescu, Anna Castro, et Thierry Lorca. 2018. « Cyclin A-Cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry ». *Developmental Cell* 45 (5): 637-650.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.005>.
- Vugt, Marcel A. T. M. van, Alexandra K. Gardino, Rune Linding, Gerard J. Ostheimer, H. Christian Reinhardt, Shao-En Ong, Chris S. Tan, et al. 2010. « A Mitotic Phosphorylation Feedback Network Connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to Inactivate the G2/M DNA Damage Checkpoint ». Édité par Michael Lichten. *PLoS Biology* 8 (1): e1000287. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000287>.
- Vugt, Marcel A. T. M. van, Veronique A. J. Smits, Rob Klompemaker, et René H. Medema. 2001. « Inhibition of Polo-like Kinase-1 by DNA Damage Occurs in an ATM- or ATR-Dependent Fashion ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 41656-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101831200>.
- Vugt, Marcel A.T.M. van, Alexandra Brás, et René H. Medema. 2004. « Polo-like Kinase-1 Controls Recovery from a G2 DNA Damage-Induced Arrest in Mammalian Cells ». *Molecular Cell* 15 (5): 799-811. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.015>.
- Wahl, Alan, James Crute, Ralph Sabatino, John Bodner, Robert Marracino, Lee Harwell, Edith Lord, et Robert Bambara. 1986. « wahl1986.pdf ». *Biochemistry*.
- Walker, M, E J Black, V Oehler, D A Gillespie, et M T Scott. 2009. « Chk1 C-Terminal Regulatory Phosphorylation Mediates Checkpoint Activation by de-Repression of Chk1 Catalytic Activity ». *Oncogene* 28 (24): 2314-23.

<https://doi.org/10.1038/onc.2009.102>.

Wan, Li, Jiangman Lou, Yisui Xia, Bei Su, Ting Liu, Jiamin Cui, Yingying Sun, Huiqiang Lou, et Jun Huang. 2013. « HPrimpol1/CCDC111 Is a Human DNA Primase-polymerase Required for the Maintenance of Genome Integrity ». *EMBO Reports* 14 (12): 1104-12. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.159>.

Wang, I-Ching, Yi-Ju Chen, Douglas Hughes, Vladimir Petrovic, Michael L. Major, Hyung Jung Park, Yongjun Tan, Timothy Ackerson, et Robert H. Costa. 2005. « Forkhead Box M1 Regulates the Transcriptional Network of Genes Essential for Mitotic Progression and Genes Encoding the SCF (Skp2-Cks1) Ubiquitin Ligase ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (24): 10875-94. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.10875-10894.2005>.

Watanabe, N., H. Arai, J.-i. Iwasaki, M. Shiina, K. Ogata, T. Hunter, et H. Osada. 2005. « Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Phosphorylation Destabilizes Somatic Wee1 via Multiple Pathways ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (33): 11663-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500410102>.

Wei, X. 1998. « Segregation of Transcription and Replication Sites Into Higher Order Domains ». *Science* 281 (5382): 1502-5. <https://doi.org/10.1126/science.281.5382.1502>.

Whitfield, Michael L, Gavin Sherlock, Alok J Saldanha, John I Murray, Catherine A Ball, Karen E Alexander, John C Matese, et al. 2002. « Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors ». *Molecular Biology of the Cell* 13: 24.

Wiebusch, L, et C Hagemeyer. 2010. « P53- and P21-Dependent Premature APC/Cdh1 Activation in G2 Is Part of the Long-Term Response to Genotoxic Stress ». *Oncogene* 29 (24): 3477-89. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.99>.

Wilhelm, Therese, Anna-Maria Olziersky, Daniela Harry, Filipe De Sousa, Helène Vassal, Anja Eskat, et Patrick Meraldi. 2019. « Mild Replication Stress Causes Chromosome Mis-Segregation via Premature Centriole Disengagement ». *Nature Communications* 10 (1): 3585. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11584-0>.

Wilhelm, Therese, Sandrine Ragu, Indiana Magdalou, Christelle Machon, Elodie Dardillac, Hervé Têcher, Jérôme Guitton, Michelle Debatisse, et Bernard S. Lopez. 2016. « Slow Replication Fork Velocity of Homologous Recombination-Defective Cells Results from Endogenous Oxidative Stress ». Édité par Nancy Maizels. *PLoS Genetics* 12 (5): e1006007. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006007>.

Wohlschlegel, James A, Brian T Dwyer, Suman K Dhar, Christin Cvetic, et Johannes C Walter. 2000. « Inhibition of Eukaryotic DNA Replication by Geminin Binding to Cdt1 ». *Science*, 4.

Wong, Philip G., Sherry L. Winter, Elena Zaika, Thinh V. Cao, Umüt Oguz, John M. Koomen, Joyce L. Hamlin, et Mark G. Alexandrow. 2011. « Cdc45 Limits Replicon Usage from a Low Density of PreRCs in Mammalian Cells ». Édité par Anja-Katrin Bielinsky. *PLoS ONE* 6 (3): e17533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017533>.

Wonsey, Diane R., et Maximillian T. Follettie. 2005. « Loss of the Forkhead Transcription Factor FoxM1 Causes Centrosome Amplification and Mitotic Catastrophe ». *Cancer Research* 65 (12): 5181-89. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4059>.

Wyatt, Haley D.M., Shriparna Sarbajna, Joao Matos, et Stephen C. West. 2013. « Coordinated Actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday Junction Resolution in Human Cells ». *Molecular Cell* 52 (2): 234-47. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.035>.

Xiao, Zhan, Zehan Chen, Angelo H. Gunasekera, Thomas J. Sowin, Saul H. Rosenberg, Steve Fesik, et Haiying Zhang. 2003. « Chk1 Mediates S and G2 Arrests through Cdc25A Degradation in Response to DNA-Damaging Agents ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (24): 21767-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300229200>.

Xu, Naihan, Nadia Hegarat, Elizabeth J. Black, Mary T. Scott, Helfrid Hochegger, et David A. Gillespie. 2010. « Akt/PKB Suppresses DNA Damage Processing and Checkpoint Activation in Late G2 ». *The Journal of Cell Biology* 190 (3): 297-305. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003004>.

Yamada, M., K. Watanabe, M. Mistrik, E. Vesela, I. Protivankova, N. Mailand, M. Lee, H. Masai, J. Lukas, et J. Bartek. 2013. « ATR-Chk1-APC/CCdh1-Dependent Stabilization of Cdc7-ASK (Dbf4) Kinase Is Required for DNA Lesion Bypass under Replication Stress ». *Genes & Development* 27 (22): 2459-72. <https://doi.org/10.1101/gad.224568.113>.

Yamazaki, Satoshi, Aii Ishii, Yutaka Kanoh, Masako Oda, Yasumasa Nishito, et Hisao Masai. 2012. « Rif1 Regulates the Replication Timing Domains on the Human Genome: Rif1 Regulates the Replication Timing Domains ». *The EMBO Journal* 31 (18): 3667-77. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.180>.

Yang, Chi-Chun, Hiroyuki Kato, Mayumi Shindo, et Hisao Masai. 2019. « Cdc7 Activates Replication Checkpoint by Phosphorylating the Chk1-Binding Domain of Claspin in Human Cells ». *ELife* 8 (décembre): e50796. <https://doi.org/10.7554/eLife.50796>.

Yang, Chi-Chun, Masahiro Suzuki, Shiori Yamakawa, Syuzi Uno, Ai Ishii, Satoshi Yamazaki, Rino Fukatsu, et al. 2016. « Claspin Recruits Cdc7 Kinase for Initiation of DNA Replication in Human Cells ». *Nature Communications* 7 (1): 12135. <https://doi.org/10.1038/ncomms12135>.

Yang, Hee Won, Steven D Cappell, Ariel Jaimovich, Chad Liu, Mingyu Chung, Leighton H Daigh, Lindsey R Pack, et al. 2020. « Stress-Mediated Exit to Quiescence Restricted by Increasing Persistence in CDK4/6 Activation ». *ELife* 9 (avril): e44571. <https://doi.org/10.7554/eLife.44571>.

Yang, Hee Won, Mingyu Chung, Takamasa Kudo, et Tobias Meyer. 2017. « Competing Memories of Mitogen and P53 Signalling Control Cell-Cycle Entry ». *Nature* 549 (7672): 404-8. <https://doi.org/10.1038/nature23880>.

Yanow, Stephanie K., Daniel A. Gold, Hae Yong Yoo, et William G. Dunphy. 2003. « *Xenopus* Drf1, a Regulator of Cdc7, Displays Checkpoint-Dependent Accumulation on Chromatin during an

- S-Phase Arrest ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (42): 41083-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307144200>.
- Yeeles, Joseph T. P., Tom D. Deegan, Agnieszka Janska, Anne Early, et John F. X. Diffley. 2015. « Regulated Eukaryotic DNA Replication Origin Firing with Purified Proteins ». *Nature* 519 (7544): 431-35. <https://doi.org/10.1038/nature14285>.
- Ying, Songmin, Sheroy Minocherhomji, Kok Lung Chan, Timea Palmal-Pallag, Wai Kit Chu, Theresa Wass, Hocine W. Mankouri, Ying Liu, et Ian D. Hickson. 2013. « MUS81 Promotes Common Fragile Site Expression ». *Nature Cell Biology* 15 (8): 1001-7. <https://doi.org/10.1038/ncb2773>.
- Yoo, H. Y. 2006. « Site-Specific Phosphorylation of a Checkpoint Mediator Protein Controls Its Responses to Different DNA Structures ». *Genes & Development* 20 (7): 772-83. <https://doi.org/10.1101/gad.1398806>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00417-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00417-9).
- Yoshida, Kenichi, et Ituro Inoue. 2004. « Regulation of Geminin and Cdt1 Expression by E2F Transcription Factors ». *Oncogene* 23 (21): 3802-12. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207488>.
- Yoshizawa-Sugata, Naoko, Ai Ishii, Chika Taniyama, Etsuko Matsui, Ken-ichi Arai, et Hisao Masai. 2005. « A Second Human Dbf4/ASK-Related Protein, Drf1/ASKL1, Is Required for Efficient Progression of S and M Phases ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (13): 13062-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411653200>.
- Zaaijer, Sophie, Nadeem Shaikh, Rishi Kumar Nageshan, et Julia Promisel Cooper. 2016. « Rif1 Regulates the Fate of DNA Entanglements during Mitosis ». *Cell Reports* 16 (1): 148-60. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.077>.
- Zellweger, Ralph, Damian Dalcher, Karun Mutreja, Matteo Berti, Jonas A. Schmid, Raquel Herrador, Alessandro Vindigni, et Massimo Lopes. 2015. « Rad51-Mediated Replication Fork Reversal Is a Global Response to Genotoxic Treatments in Human Cells ». *Journal of Cell Biology* 208 (5): 563-79. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406099>.
- Zerjatke, Thomas, Igor A. Gak, Dilyana Kirova, Markus Fuhrmann, Katrin Daniel, Magdalena Gonciarz, Doris Müller, Ingmar Glauche, et Jörg Mansfeld. 2017. « Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification ». *Cell Reports* 19 (9): 1953-66. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.022>.
- Zhao, Hui, et Helen Piwnicka-Worms. 2001. « ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1 ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (13): 4129-39. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001>.
- Zou, L. 2003. « Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-SsDNA Complexes ». *Science* 300 (5625): 1542-48. <https://doi.org/10.1126/science.1083430>.
- Zou, L., D. Liu, et S. J. Elledge. 2003. « Replication Protein A-Mediated Recruitment and Activation of Rad17 Complexes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (24): 13827-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336100100>.

Titre : Couplage temporel entre la réplication et l'entrée en mitose en conditions normales ou perturbées : rôles de la signalisation Chk1

Mots clés : Prolifération cellulaire, cancer, imagerie sur cellules vivantes, intégrité génétique, voies de signalisation

Résumé : Le stress réplicatif est une source majeure d'instabilité génétique et pourrait jouer un rôle clé dans le développement tumoral précoce. Des mécanismes de surveillance (checkpoint) qui empêchent la progression du cycle cellulaire sont fortement actifs dans les lésions préneoplasiques, où ils pourraient agir comme une barrière à la tumorigenèse. Pourtant, de nombreux travaux suggèrent que les checkpoints ne sont pas infaillibles et que suite à divers stress génotoxiques, des altérations de l'ADN peuvent persister jusqu'à la mitose malgré un checkpoint fonctionnel. De l'ADN non répliqué peut notamment persister au niveau des sites fragiles communs (CFS) jusqu'à la fin de la phase G2 ou au début de la mitose, entraînant des gaps et cassures chromosomiques pouvant affecter la stabilité génétique de la lignée cellulaire. Le but de mon doctorat était de déterminer comment le checkpoint se comporte dans les cellules qui entrent en mitose malgré un stress réplicatif et de caractériser les mécanismes par lesquels les cellules entrent en mitose malgré la persistance de structures génotoxiques.

Pour explorer ces questions, j'ai développé un senseur FRET spécifique de l'activité Chk1 et ai exprimé cet outil de manière stable dans des cellules humaines non transformées. Ce nouveau système m'a permis de décrire la cinétique précise de l'activité Chk1 avec une forte résolution temporelle en vidéomicroscopie sur cellule unique, que ce soit à la suite d'un stress génotoxique ou dans des conditions non perturbées. Ainsi, dans des cellules où PCNA endogène a été marqué avec une protéine fluorescente, j'ai déterminé que Chk1 s'active faiblement en phase S mais que son profil d'activité dépend de l'activation constante de nouvelles origines de réplication et est fortement corrélé à la dynamique des foyers de réplication.

Suite à l'induction d'un stress réplicatif en phase S, cette activité basale est augmentée, mais une fraction des cellules en phase S parvient à atteindre la phase G2. Au cours de cette transition S/G2, Chk1 s'inactive de façon conjointe à la disparition des foyers de réplication, ce qui est suivi par l'expression des inducteurs mitotiques. De manière reproductible, cette phase G2 dure plusieurs heures avant de bifurquer vers la mitose ou vers un arrêt en G2 dépendant de p53.

De façon surprenante, la cinétique d'activité Chk1 à la phase G2 montre une forte hétérogénéité et peut soit rester à un niveau minimal, soit se réactiver en phase G2 pour empêcher une entrée en mitose prématurée. J'ai cependant pu déterminer qu'une fraction des cellules entre en mitose malgré la persistance d'un niveau élevé d'activité Chk1, démontrant de façon directe que les cellules de mammifères peuvent entrer en mitose malgré un checkpoint actif. Enfin, au cycle suivant, les cellules dont la mère a réactivé Chk1 à la phase G2 précédente sont moins susceptibles de ré-entrer en phase S au cours du cycle cellulaire suivant, ce qui suggère que les structures qui ont activé Chk1 en phase G2 sont génotoxiques et/ou provoquent un arrêt en G1.

Mes résultats élargissent nos connaissances sur la régulation de la progression du cycle cellulaire en conditions normales ou perturbées, ouvrent des questions sur les aspects temporels de l'activation d'ATR/Chk1, et suggèrent que les structures génotoxiques de l'ADN résultant d'un stress réplicatif en phase S sont effectivement détectées par le checkpoint en phase G2, mais que cette activation du checkpoint peut être contournée par les mécanismes d'entrée en mitose.

Title: Coordination between DNA replication and cell division to preserve genetic integrity in normal growth conditions and upon replication stress: key roles of Chk1 signaling.

Keywords: Cell proliferation, cancer, live imaging, genetic integrity, signaling pathways

Abstract : Replication stress is a major source of genomic instability and oncogene-induced replication stress has been proposed to play a key role in cancer development. Accordingly, the checkpoint mechanisms that prevent cell cycle progression under conditions of replication stress are reported to be highly active in pre-neoplastic lesions, where they might act as a potent barrier to tumorigenesis. Yet, multiple works suggest that DNA damage checkpoints are not infallible and that following various genotoxic stresses, DNA alterations may persist up to mitosis despite functional checkpoints mechanisms. Most notably, it was shown that unreplicated DNA may persist at Common Fragile Sites up to late G2 or early mitosis, resulting in chromosomes breaks that affect the genetic stability of the cell lineage. **The main question of my PhD was to determine how the DNA checkpoint behave in cells that enter mitosis despite replication stress, and thus help characterize the mechanisms through which checkpoint-proficient cells enter mitosis with persistent DNA alterations.**

To explore those questions, I developed a highly sensitive and specific FRET biosensor of Chk1 activity and stably expressed this tool in a non-transformed human cells background. This novel system allowed me to describe the precise kinetics of Chk1 activity with exceptional time resolution and exquisite sensitivity in single cell live imaging assays, both following genotoxic stress or under non-perturbed conditions. In a cell background where endogenous PCNA was tagged with a fluorescent protein, I characterized a mild but highly reproducible Chk1 activation pattern in non-perturbed S phase, which correlates tightly with bulk PCNA foci appearance at the G1/S transition and disappearance at the S/G2 transition. This basal activity depends on the constant firing of new replication origins.

Following induction of replication stress in S phase, this basal activity is increased but a fraction of S phase cells manages to reach G2 phase, and some further reach mitosis. Even under conditions of replication stress, the decreasing count of PCNA foci in late S phase correlates tightly with progressive Chk1 inactivation. Additionally, the specific expression profile of G2-specific mitotic inducers following PCNA disappearance indicates this is an actual G2 phase. This G2 phase reproducibly lasts several hours before either bifurcating to mitosis or to a p53-dependent G2 arrest.

Surprisingly, the kinetics of Chk1 activity in G2 display high heterogeneity and Chk1 can either remain at a minimal level or re-activate in G2 phase to prevent premature mitotic entry. Yet, following Chk1 re-activation in G2 phase, a fraction of cells enter mitosis with a persistent high level of Chk1 activity, providing the first ever observation of mammalian cells entering mitosis despite an active checkpoint. Finally, cells that re-activated Chk1 in G2 phase are less likely to re-enter S phase during the next cell cycle, compared to daughters of cells that did not re-activate Chk1 in G2 phase, suggesting that the structures that activated Chk1 in G2 phase are genotoxic and/or prompt a G1 arrest.

All in all, my results provide new insights on the regulation of cell cycle progression under both perturbed and non-perturbed conditions, open previously unforeseen questions about the temporal aspects of ATR/Chk1 activation, and suggest that genotoxic DNA structures arising from replication stress are indeed detected by the DNA damage checkpoint in G2 phase, but can be bypassed by the mitotic entrance machinery.