

Etude de la dynamique de réplication en présence de dommage à l'ADN chez la levure *S. cerevisiae*

Julien Bacal

► **To cite this version:**

Julien Bacal. Etude de la dynamique de réplication en présence de dommage à l'ADN chez la levure *S. cerevisiae*. Génétique. 2011. <hal-01477900>

HAL Id: hal-01477900

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01477900>

Submitted on 27 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté

Par

Julien Bacal

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Etude de la dynamique de réplication en présence de dommage à l'ADN chez la
levure *S. cerevisiae*

Soutenu le 15/12/2011 devant le jury suivant :

Rossel Mireille – Président

Pasero Philippe – Tuteur scientifique

Marcilhac Anne – Tuteur pédagogique

Lambert Sarah – Rapporteur

Etienne Schwob – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Philippe Pasero - philippe.pasero@igh.cnrs.f

UPR CNRS 1142 - Institut de génétique Humaine

141, rue de la Cardonille

34396 Montpellier Cedex 5

et de

Anne Marcilhac - marcilhac@univ-montp2.fr

UMR Inserm U710-UM2-EPHE

Université Montpellier 2

Place Eugène Bataillon

CC105 - Bât 24

34095 Montpellier cedex 05

RÉSUMÉ

Il est crucial pour la cellule de transmettre à sa descendance une copie complète et fidèle de son patrimoine génétique. Pour cela, il existe plusieurs mécanismes de contrôle, appelés « checkpoints », dont la fonction est de coordonner une réponse globale afin de maintenir l'intégrité du génome. Deux checkpoints sont actifs durant la phase S. Il s'agit du checkpoint de réplication et du checkpoint de dommage à l'ADN, regroupés sous le nom de checkpoint intra-S. Chez *S. cerevisiae*, les adaptateurs Mrc1 et Rad9 permettent d'activer respectivement le checkpoint de réplication et le checkpoint de dommage à l'ADN. De nombreuses études ont analysé le rôle du checkpoint intra-S sur le contrôle du timing de réplication en présence de stress réplcatif induit pas l'HU. Cependant, la contribution de ces deux voies dans la réponse aux dommages à l'ADN reste peu connue. Nos données suggèrent que, contrairement au stress réplcatif induit par l'HU, la réponse au MMS (lésions simple-brin) ou à la Zéocine (cassure double-brin), fait intervenir les deux voies du checkpoint intra-S. En effet, nous avons montré que Mrc1 et dans une moindre mesure Rad9 contribuent tous deux au ralentissement du programme de réplication en présence de MMS, tandis que Rad9 est le principal régulateur de la réplication en réponse à la Zéocine. De plus, nos données indiquent que la voie Rad9 contrôle la vitesse des fourches en présence de cassures double-brin, ce qui représente la première démonstration formelle de l'existence d'un checkpoint d'élongation chez la levure. Enfin, nos données suggèrent également que la kinase Cdc7, impliquée dans l'initiation de la réplication, pourrait également avoir un rôle dans le contrôle de la progression des fourches. L'ensemble de nos données suggère l'existence d'un mécanisme actif de régulation de la vitesse des fourches de réplication chez *S. cerevisiae*.

Mots-clés : Levure *S. cerevisiae*, réplication de l'ADN, dommage, checkpoint

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction

I.	<u>La réplication de l'ADN</u>	6
A.	<u>Introduction au cycle cellulaire</u>	6
B.	<u>La réplication de l'ADN</u>	9
C.	<u>Le programme de réplication</u>	13
II.	<u>Mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome : les checkpoints</u>	15
A.	<u>Le checkpoint de réplication</u>	15
B.	<u>Le checkpoint de dommage à l'ADN</u>	16
C.	<u>Fonctions du checkpoint intra-S</u>	17
III.	<u>Checkpoint et cancer</u>	20
IV.	<u>But de l'étude</u>	23

Chapitre 5 : bibliographie

Liste des sigles et des abréviations

ACS : ARS consensus sequence
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARS : Autonomously Replicated Sequence
BER : Base Excision Repair
BrdU : Bromodeoxyuridine
CDB : Cassure double brin
CDA : Checkpoint de dommage à l'ADN
CDK : Cyclin dependant kinase
ChIP: Chromatin Immunoprecipitation
CldU : Chlorodeoxyuridine
CR : Checkpoint de réplication
DDK : Dbf4-Dependent Kinase
dNTP : deoxyribonucleotide
HU : Hydroxyurée
IdU : Iododeoxyuridine
MCM : Mini Chromosome Maintenance
MMR : DNA Mismatch Repair
NER : Nucleotide Excision Repair
NHEJ : Non Homologous End Joining
ORC : Origin Recognition Complex
Pb : Paire de Base
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
Pre IC : Pre-initiation Complex
Pre RC : Pre-replication Complex
RH : Recombinaison homologue
RNR : Ribonucleotide Reductase
RPA : Replication Protein A
S-CDK: S phase specific CDK
ssDNA: single stranded DNA
UV: Rayonnement Ultra violet

Chapitre 1 : Introduction

I. La réplication de l'ADN

A. Introduction au cycle cellulaire

a) Les différentes étapes du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des mécanismes qui permettent à une cellule mère de se diviser en deux cellules filles identiques. Au cours de ce processus, une cellule doit répliquer l'ensemble de son génome au cours de l'interphase puis effectuer un partage équitable de ses chromosomes au cours de la phase de division appelée mitose. L'interphase est la période qui s'écoule entre deux mitoses successives, elle est divisée en trois phases : une phase de croissance et de préparation à la réplication de l'ADN (G1), une phase de réplication de l'ADN (S), et une phase de croissance et de préparation à la mitose (G2).

b) Régulation du cycle cellulaire par les CDKs

Pour les organismes eucaryotes vivants, il est indispensable que les différentes phases du cycle cellulaire soient coordonnées de façon précise. Les phases doivent suivre un ordre correct et une phase doit être terminée avant que la phase suivante ne démarre. Les erreurs de coordination peuvent conduire à des altérations chromosomiques. Des chromosomes ou des parties de chromosome peuvent être perdus, réarrangés ou distribués de manière inéquitable entre les deux cellules filles. Ces types d'altérations chromosomiques sont souvent observés dans les cellules cancéreuses (Malumbres and Barbacid, 2001).

L'enchaînement coordonné du cycle cellulaire est assuré par les CDKs (Cyclin-dependent kinases) et les cyclines (Morgan, 1995). CDKs et cyclines s'associent en complexes hétéro-dimériques, les CDK constituant la sous-unité catalytique et les cyclines la sous-unité régulatrice. Une CDK peut former des complexes avec plusieurs cyclines différentes, et inversement. À chaque phase du cycle cellulaire correspond un ou plusieurs complexes CDK/cycline. Les cyclines ne sont pas présentes pendant tout le cycle, elles apparaissent puis disparaissent à des moments précis du cycle, de façon périodique. Les CDKs peuvent être sous forme active ou inactive, selon leur association ou non à leur cycline. Le cycle cellulaire est contrôlé par au moins six complexes CDK/cyclines différents qui interviennent pour contrôler des étapes précises du cycle cellulaire. La mise en place séquentielle des activités kinases CDK-cyclines est à la base de l'enchaînement des phases du cycle cellulaire.

Chez les vertébrés, la progression en G1 est coordonnée par les activités de CDK4/cycD et CDK6/cycD. Ces complexes vont d'une part stimuler l'expression de gènes nécessaires à la progression en G1 en phosphorylant la protéine Rb, et d'autre part séquestrer des protéines inhibitrices de CDK2. Grâce à cela et à la synthèse de cycline E, l'activité CDK2 augmente en fin de G1, ce qui entraîne la phosphorylation de substrats nécessaires aux premières étapes de

la réplication (Mailand and Diffley, 2005). L'expression de cycline E chute ensuite rapidement en fin de G1 et CDK2 va former un complexe avec cycline A, ce qui permet l'entrée en phase S. Ensuite CDK1, majoritairement associée à cycline B, va entraîner les cellules en mitose.

La dégradation des cyclines en dehors de leur fenêtre d'expression constitue le moteur du cycle cellulaire. Celles-ci sont dégradées par la voie du protéasome, grâce à leur ubiquitination par les protéines APC/C et SCF.

B. La réplication de l'ADN

La réplication est la phase du cycle cellulaire au cours de laquelle la double hélice d'ADN est dupliquée par les ADN polymérases. Ce processus est dit « semi-conservatif » car les deux brins de l'ADN parental sont séparés pour permettre la synthèse des brins complémentaires.

a) Les origines de réplication

Chez tous les eucaryotes, la réplication démarre au niveau de sites spécifiques appelés « origines de réplication ». Chez les eucaryotes supérieurs, les caractéristiques des origines de réplication ne sont pas clairement établies, bien qu'une étude récente mette en évidence la présence de motifs nucléotidiques spécifiques autour des origines de réplication (Cayrou et al., 2011).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les origines de réplication sont mieux caractérisées. Elles sont spécifiées par des séquences d'environ 150 pb appelées « autonomous replication sequences » ou ARS. Les ARS contiennent une séquence consensus de 11 pb appelée ACS (pour ARS Consensus Sequence) qui est reconnue par ORC pour recruter les protéines du complexe pré-répliatif (Pre-RC). Cependant, seulement une fraction des ARS agissent comme des origines de réplication dans leur contexte naturel (Newlon and Theis, 1993). Le génome de la levure contient environ 12000 ACS (soit environ une par kb) mais seulement 5% d'entre elles sont capables de permettre la réplication d'un plasmide (1/20 kb). Des analyses sur des origines précises (par gel 2D) ou à l'échelle du génome (par puce à ADN) ont montré que seulement une fraction de ces origines étaient actives sur chaque chromosome au sein d'une population (1/35kb) (Newlon and Theis, 1993; Raghuraman et al., 2001). Enfin des analyses sur molécule unique, par peignage moléculaire d'ADN, ont montré que seulement une fraction de celles-ci était active dans une cellule donnée (1/45kb) (Tuduri et al., 2009).

b) L'initiation de la réplication

Le processus de réplication débute en G1 avec la fixation séquentielle aux origines de plusieurs protéines qui forment le complexe pré-répliatif (pré-RC). A la transition G1/S, l'action des S-CDK (CDKs spécifiques de phase S) et de DDK (DBF4-dependent kinases)

permet le recrutement de facteurs d'initiation au niveau des origines, l'ouverture de l'ADN et l'engagement des ADN polymérase répliquatives (Labib 2010).

c) **Structure du pré-RC et du pré-IC**

La fixation du complexe ORC (Origin Recognition Complex) sur l'origine de réplication est la première étape de la formation du pré-RC. ORC est un complexe de six sous-unités qui a un rôle de plateforme pour l'assemblage des autres protéines du complexe. En G1, ORC recrute Cdc6 et Cdt1 qui permettent le recrutement du complexe hélicase MCM2-7. Le complexe pré-RC ainsi formé est activé pour créer le pré-IC via le recrutement de plusieurs facteurs incluant Mcm10, Cdc45, Sld2-3, Dpb11 et le complexe GINS (Aladjem, 2007).

Le premier facteur d'initiation recruté est Mcm10, qui est nécessaire pour charger Cdc45 (Sawyer et al., 2004). Mcm10 interagit avec l'ADN polymérase α et assure sa stabilité (Ricke and Bielinsky, 2004), La fixation de Cdc45 est également nécessaire au chargement des polymérase répliquatives (Mimura and Takisawa, 1998). Cdc45 se lie au pré-RC et aux polymérase, formant un lien physique entre les facteurs d'initiation et d'élongation. Pendant toute la phase S, Cdc45 se lie aux origines au moment de leur activation. Cette protéine est indispensable pour l'initiation mais aussi l'élongation de la réplication car elle interagit aussi avec les MCMs (Pacek and Walter, 2004). Dpb11 est nécessaire au chargement des polymérase, mais ne semble pas se déplacer avec la fourche de réplication. Cette protéine possède aussi une fonction dans l'activation du checkpoint (voir chapitre Checkpoint). Sld2 forme un complexe avec Dpb11, Pol α et GINS après activation par les CDKs (Muramatsu et al.). Sld3 forme avec Cdc45 un complexe qui se fixe aux MCM2-7 avant l'initiation mais contrairement à Cdc45, Sld3 ne reste pas liée à la fourche de réplication lors de sa progression (Kanemaki and Labib, 2006). Quatre protéines, Sld5, PSsf1, 2 et 3 forment le complexe GINS, qui interagit avec Mcm2-7. GINS est nécessaire à la fois à l'initiation et à l'élongation de la réplication (Gambus et al., 2006).

Le chargement de ces facteurs aux origines de réplication nécessite la présence de deux kinases de phase S, les S-CDKs et les DDKs afin d'activer l'hélicase répliquative. Chez *S. cerevisiae* Sld2 et Sld3 sont phosphorylées par les CDKs pour permettre l'initiation de la réplication. Des cellules ayant des mutations phosphomimétiques de leurs sites de phosphorylation par les CDKs au niveau de Sld2 et Sld3 peuvent s'affranchir totalement des CDKs pour entrer en phase S (Zegerman and Diffley, 2006).

La kinase DDK est un complexe composé de la sérine/thréonine kinase Cdc7 et de la sous-unité régulatrice Dbf4. Cdc7/Dbf4 est requis pour l'initiation des origines de réplication. Dbf4 se lie à la chromatine à la transition G1/S et reste liée durant toute la phase S, tandis que Cdc7 est associée à la chromatine durant tout le cycle cellulaire (Pasero et al., 1999; Weinreich and Stillman, 1999). Plusieurs études suggèrent que les MCM2-7 seraient une cible de Cdc7/Dbf4 (Labib, 2010). Différentes mutations des MCMs permettent de se passer de Cdc7 : une mutation ponctuelle de la proline 83 de *MCM5*, appelé *mcm5-bob1* (Hardy et al., 1997), ainsi qu'une délétion des résidus 74 à 174 de *MCM4* (Sheu and Stillman, 2010). De plus, plusieurs

études ont montré que MCM2-7 interagit physiquement avec Cdc7 (Jares and Blow, 2000; Jiang et al., 1999; Lei et al., 1997; Roberts et al., 1999; Sato et al., 1997).

d) L'élongation de la réplication

L'ADN polymérase α associée à la primase initie une courte amorce d'ARN, qui va permettre la synthèse initiale d'ADN. Le complexe RFC se lie à la jonction entre l'amorce et la matrice et catalyse le recrutement de PCNA (Pol30 chez *S. cerevisiae*) qui encercle l'ADN. PCNA sert de plateforme au niveau de la fourche de réplication dans le but de coordonner la réplication avec plusieurs autres mécanismes tels que l'assemblage des nucléosomes ou l'établissement de la cohésion (Moldovan et al., 2007). Les polymérases Pol δ ou Pol ϵ , plus processives que Pol α , sont alors recrutées pour synthétiser la majorité de l'ADN. Ces polymérases possèdent une activité 3'-5' exonucléase de « proof-reading » qui réduit fortement les erreurs d'incorporation de nucléotides. Les deux brins d'ADN sont synthétisés par des mécanismes différents. Le brin précoce est synthétisé de façon continue dans le sens 5'-3' par Pol δ (Pursell et al., 2007). Le brin retardé orienté 3'-5' est synthétisé de manière discontinue, par Pol α sous forme de fragments d'Okazaki, dans le sens inverse de progression de la fourche (Nick McElhinny et al., 2008). Les fragments d'Okazaki sont ensuite maturés et fusionnés par l'ADN ligase I (Cdc9 chez *S. cerevisiae*). Bien que la synthèse des deux brins ait lieu en sens opposé, la fourche forme un seul complexe homogène : le réplisome.

C. Le programme de réplication

a) Programme temporel d'activation des origines

Il est connu depuis longtemps chez les eucaryotes que la duplication des chromosomes suit un programme temporel bien défini. En effet, chaque région du génome est répliquée à un moment précis de la phase S. Chez la levure *S. cerevisiae*, il a été montré que le programme temporel est contrôlé au niveau de l'activation des origines. Certaines origines sont activées très précocement au cours de la phase S tandis que d'autres sont activées plus tardivement (Raghuraman et al., 1997). Chez *S. cerevisiae*, des études pan-génomiques ont permis de montrer que les origines sont activées tout au long de la phase S, avec un pic en milieu de phase S (Raghuraman et al., 2001). Les expériences utilisant des puces à ADN ne permettent pas de différencier le temps et l'efficacité d'activation d'une origine (Raghuraman et al., 2001). Malgré cela, il a été montré par peignage moléculaire que l'activation des origines dans une région donnée varie entre deux cellules chez la levure (Tuduri et al., 2009), comme chez les cellules humaines (Lebofsky et al., 2006). Le timing d'activation des origines est déterminé dès la phase G1 (Raghuraman et al., 1997), en grande partie par le contexte chromatinien des origines (Vogelauer et al., 2002). Le checkpoint de réplication contrôle aussi le programme temporel de réplication au cours d'une phase S normale (Shirahige et al., 1998).

Il a été proposé un modèle dans lequel l'activation des origines est stochastique, mais chaque origine a une probabilité d'activation propre et cette probabilité augmente au cours de la phase S (Rhind et al., 2009). Une origine avec une forte probabilité d'activation aura tendance

à être activée précocement alors qu'une origine avec une faible probabilité d'activation aura tendance à s'activer plus tardivement ou à être répliquée passivement. En effet, une grande partie des origines ayant formé un pré-RC en G1 ne s'active pas au cours d'une phase S normale et est répliquée passivement par des fourches issues d'origines adjacentes. Ces origines sont appelées « origines dormantes ». Les mécanismes définissant ces origines comme « dormantes » sont actuellement très mal connus. En revanche, chez les eucaryotes supérieurs, ces origines peuvent s'activer en réponse au ralentissement des fourches de réplication (Courbet et al., 2008) ou lors de l'activation du checkpoint de phase S (Ge et al., 2007; Ibarra et al., 2008; Tuduri et al., 2009). Elles sont nécessaires à la survie des cellules en condition de stress en constituant des origines de secours (Ge et al., 2007).

b) Corrélation du timing de réplication avec le niveau de compaction de la chromatine

Il est maintenant bien établi que les régions répliquées précocement correspondent à des zones de chromatine décondensée (Gilbert et al., 2004). Ainsi, l'accessibilité de la chromatine, mesurée par des expériences de cartographie de la sensibilité à la DNase I, a montré une forte corrélation entre euchromatine et réplication précoce (Hansen et al., 2010). En revanche, on ignore toujours si l'hétérochromatine est une cause ou une conséquence de la réplication tardive. La réplication en fin de phase S pourrait en effet servir de repère pour l'établissement de l'hétérochromatine en fin de phase S (Farkash-Amar and Simon, 2010)

II. Mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome : les checkpoints

Il est crucial pour la cellule de transmettre à sa descendance une copie complète et fidèle du patrimoine génétique. Pour cela, il existe plusieurs mécanismes de contrôle, appelés « checkpoints », dont la fonction est de coordonner une réponse globale afin de maintenir l'intégrité du génome. Celle-ci est profondément affectée lorsque le checkpoint est inactif. Ainsi une augmentation importante des réarrangements chromosomiques a lieu dans des cellules mutées pour plusieurs protéines impliquées dans les checkpoints (Kolodner et al., 2002); (Myung et al., 2001). Les mécanismes de surveillance de la phase S sont séparés en deux voies qui partagent en partie la même cascade de signalisation mais qui sont activées ou non en fonction du type de lésion reconnu. Ainsi les fourches de réplication arrêtées activent le checkpoint de réplication (CR). Les cassures ou lésions de l'ADN sont quant à elles responsables de l'activation de la voie de surveillance des dommages de l'ADN (checkpoint de dommage à l'ADN ou CDA). De plus, elles ne sont pas actives au même moment, le checkpoint de réplication est surtout efficace en phase S, tandis que le checkpoint de dommage à l'ADN peut être activé tout au long du cycle cellulaire.

A. Le checkpoint de réplication

Chez tous les eucaryotes, le checkpoint de réplication (CR) empêche le désassemblage (ou

collapse) des fourches de réplication arrêtées et ralentit la progression en phase S (Nyberg et al., 2002). En l'absence du checkpoint de réplication l'arrêt des fourches induit par des agents génotoxiques comme l'Hydroxyurée (HU) ou le Methyl MethaneSulfonate (MMS) est irréversible (Lopes et al., 2001; Tercero and Diffley, 2001). Ceci est dû à la formation d'intermédiaires de réplication anormaux (Sogo et al., 2002). Le checkpoint stabilise les ADN polymérase des fourches arrêtées et empêche le désassemblage du réplisome (Lopes et al., 2001; Tercero et al., 2003).

La cascade de transduction du signal du checkpoint de réplication implique trois types de partenaires. Tout d'abord, des senseurs détectent la lésion sur l'ADN, puis des médiateurs transmettent et amplifient le signal, activant les protéines effectrices qui agissent enfin sur les différentes cibles (Nyberg et al., 2002). En présence d'HU, l'arrêt de la fourche de réplication provoque un découplage entre le complexe hélicase MCM et les polymérase, ce qui expose de larges portions d'ADN simple brin ou ssDNA (300bp par fourche chez la levure). En présence de MMS, le découplage se produit entre la synthèse des brins avancé et retardé de la fourche (Branzei and Foiani, 2005; Byun et al., 2005). Le ssDNA exposé est rapidement couvert par RPA, un complexe hétérotrimérique ayant une forte affinité pour l'ADN simple brin. RPA lié au simple brin est un signal d'activation du checkpoint. Des études ont mis en évidence qu'une quantité minimale de RPA, fixée à l'ADN simple brin est nécessaire pour activer le checkpoint. Ceci permettrait donc de bloquer la progression de la phase S uniquement lorsqu'une quantité critique de fourches est bloquée (Shimada et al., 2002; Tercero et al., 2003). Le complexe RPA recrute le complexe Ddc2p-Mec1p (ATRIP-ATR chez l'Homme) à la fourche de réplication (Namiki and Zou, 2006; Zou and Elledge, 2003). Ceci permet la phosphorylation de la protéine Mrc1 (Claspin chez l'Homme), qui est le médiateur du checkpoint de réplication et la monophosphorylation de la kinase effectrice Rad53. Mrc1 permet ensuite l'autophosphorylation de Rad53 en agissant comme un adaptateur (Alcasabas et al., 2001; Tanaka and Russell, 2001). La forme hyperphosphorylée de Rad53 va alors agir au niveau d'un très grand nombre de cibles afin de réguler la progression dans le cycle cellulaire et la réparation des fourches bloquées. Il est important de noter que Mrc1 est associée de façon permanente à la fourche, même en l'absence de lésions sur l'ADN (Katou et al., 2003).

B. Le checkpoint de dommage à l'ADN

Le checkpoint de dommage à l'ADN (CDA) diffère du checkpoint de réplication par les senseurs et/ou les médiateurs utilisés (Jazayeri et al., 2006). En effet, les cassures double brin de l'ADN sont détectées par Tel1p (ATM chez l'Homme), associée au complexe Mre11-Rad50-Xrs2 (Mre11-Rad50-Nbs1 chez l'Homme) (D'Amours and Jackson, 2001). Après résection de la cassure, RPA est recrutée au niveau de l'ADN simple brin. Mec1 est alors recrutée par RPA (Nakada et al., 2003) où elle interagit avec d'autres complexes tels que :

Rad17/Mec3/Ddc1 et un complexe RFC-like où Rad24 remplace RFC1. (Majka and Burgers, 2003). L'ensemble de ces interactions permet le recrutement de Rad9, le médiateur spécifique du checkpoint de dommage à l'ADN. Mec1 phosphoryle Rad9, entraînant le recrutement de Rad53 et sa phosphorylation par Mec1. Rad9 en tant qu'adaptateur permet à Rad53 de s'autophosphoryler afin d'être totalement activée (Pellicoli and Foiani, 2005; Zhou and Elledge, 2000).

L'activation du checkpoint de dommage à l'ADN et du checkpoint de réplication conduisent tous deux à la phosphorylation de la même protéine Rad53. En phase S, ces deux checkpoints étant actifs, on les regroupe sous le nom de « checkpoint intra-S ».

C. Fonctions du checkpoint intra-S

Les fonctions du checkpoint de phase S sont multiples mais convergent toutes vers un but commun qui est le maintien de la stabilité du génome. Les mécanismes d'action du checkpoint, essentiellement par l'action des kinases Mec1 et Rad53, consistent à coordonner la réplication avec les processus de réparation, de recombinaison, de cohésion et de ségrégation des chromosomes (Branzei and Foiani, 2006).

Maintien de la stabilité du réplisome

La fonction principale du checkpoint intra-S est le maintien de la stabilité du réplisome (Cobb et al., 2003; Lopes et al., 2001; Lucca et al., 2004; Sogo et al., 2002; Tercero and Diffley, 2001) afin de permettre le redémarrage de la fourche en coordonnant la réplication et les processus de réparation de l'ADN (Foiani et al., 2000).

Transcription des gènes de la réparation

Mec1 et Rad53 phosphorylent de nombreuses cibles impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN. Par exemple la phosphorylation de la kinase Dun1 par Rad53 permet l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Ces voies de réparation incluent le BER (Base excision Repair), qui permet la suppression d'une base incorrecte (Barnes and Lindahl, 2004), le NER (Nucléotide Excision Repair), qui réalise l'excision d'un nucléotide, comme dans le cas d'un dommage induit par la lumière UV (Hoeijmakers, 2001) et le MMR (MisMatch Repair), qui a pour rôle de corriger les erreurs d'incorporation de nucléotides effectuées par la polymérase lors de la réplication (Kunkel, 2003).

Régulation de la quantité de dNTPs

Rad53 et Mec1 contrôlent également la quantité de nucléotides (dNTPs) mis à disposition des polymérases. Sous l'action de la kinase Dun1, la protéine Sml1, un régulateur négatif de la synthèse de dNTPs, est dégradée (Zhao and Rothstein, 2002).

Inhibition de l'entrée en mitose

Le checkpoint de phase S inhibe l'entrée des cellules en mitose (Zhou and Elledge, 2000). Cette fonction fait appel à différents mécanismes dans le but de prévenir la séparation prématurée des chromatides sœurs avant la réplication complète des chromosomes (Clarke, 2003). Par exemple, la dégradation des cohésines, protéines qui maintiennent les chromatides sœurs associées, est réprimée en cas de dommage à l'ADN (Agarwal et al., 2003).

Répression des origines tardives

Rad53 inhibe l'activation des origines tardives en présence d'HU (Santocanale and Diffley, 1998; Shirahige et al., 1998). Une étude récente (Zegerman and Diffley, 2010) a montré que le mécanisme de cette inhibition reposait sur la phosphorylation de Dbf4 et Sld3 par Rad53. La phosphorylation de Sld3 empêche l'interaction entre Cdc45 et Dpb11. La phosphorylation de Dbf4 inhibe DDK, mais le mécanisme de cette inhibition reste incertain. La phosphorylation de Dbf4 via Rad53 constatée dans cette étude vient renforcer plusieurs autres études qui font de Cdc7/Dbf4 une cible important du checkpoint de réplication (Dohrmann et al., 1999; Pasero et al., 1999; Weinreich and Stillman, 1999).

I. III. Checkpoint et cancer

En 2000, Hanahan et Weinberg ont suggéré que la transformation d'un tissu sain en tissu cancéreux passerait par l'acquisition d'au moins 6 propriétés : l'augmentation de l'angiogenèse, l'invasion tissulaire et la formation de métastases, l'échappement à l'apoptose, la prolifération indépendante des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance et un potentiel prolifératif illimité (Hanahan and Weinberg 2000). Récemment, d'autres caractéristiques ont été proposées par S. Elledge : l'échappement à la surveillance immunitaire et la présence de stress métaboliques, protéotoxiques, mitotiques, oxydatifs et de dommages à l'ADN (Luo et al. 2009).

Des mutations dans trois types de gènes sont sélectionnées par les cellules tumorales : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes gardiens de la stabilité du génome (caretakers).

Les oncogènes sont des accélérateurs de la prolifération cellulaire tandis que les gènes suppresseurs de tumeurs, sont au contraire des régulateurs négatifs de la prolifération. Le suppresseur de tumeur le plus caractérisé est la protéine p53. Une mutation dans un de ces deux types de gènes a des conséquences physiologiquement similaires, à savoir favoriser la division des cellules, inhiber la mort cellulaire ou bien induire l'arrêt du cycle cellulaire, entraînant une prolifération aberrante.

Les caretakers regroupent les gènes responsables de la réparation de mutations ponctuelles, ainsi que des gènes responsables de la stabilité des chromosomes à plus grande échelle. On trouve aussi dans ce groupe des gènes impliqués dans les différents checkpoints.

L'équipe de R. Kolodner a montré chez la levure *S. cerevisiae* que les protéines du checkpoint de phase S sont essentielles pour limiter l'instabilité génétique. En effet par un test génétique mesurant le taux de réarrangements chromosomiques, son équipe a pu mettre en évidence que les protéines du checkpoint de phase S sont celles qui génèrent le plus de réarrangements lorsqu'elles sont mutées (Myung et al., 2001). De plus, le fait que le checkpoint de phase S soit extrêmement conservé au cours de l'évolution et que plusieurs de ses composants se comportent comme des suppresseurs de tumeurs corroborent ces données (Aguilera and Gomez-Gonzalez, 2008).

L'instabilité génomique et la mutation quasi systématique de la protéine p53 sont les deux événements majeurs observés dans les tumeurs. Le modèle proposé par J. Bartek et T. Halazonetis (Halazonetis et al., 2008) a permis d'établir un lien entre ces deux événements au cours de la progression tumorale. Ce modèle stipule que la réponse aux dommages à l'ADN constitue une barrière contre la progression tumorale en entraînant l'apoptose ou la sénescence des cellules. Cependant, l'activation chronique de ce checkpoint crée une pression

de sélection permettant à tout clone présentant un défaut de ce checkpoint d'être sélectionné positivement. Des altérations dans les protéines du checkpoint pourraient ainsi réduire la mort cellulaire et augmenter l'instabilité génétique, favorisant ainsi la progression tumorale. L'échappement à cette barrière corrèle bien avec les mutations de p53 dans les cancers.

IV. But de l'étude

Chez *S. cerevisiae*, les adaptateurs Mrc1 et Rad9 sont respectivement impliqués dans le checkpoint de réplication et le checkpoint de dommage à l'ADN. Ces deux médiateurs permettent l'activation de la kinase Rad53 par Mec1 en présence d'ADN simple brin recouvert de RPA, que l'on retrouve aussi bien aux fourches bloquées qu'aux cassures double-brin. Ces deux voies sont donc partiellement interchangeable. Ainsi, dans un mutant *mrc1*, la phosphorylation de Rad53 peut être médiée par Rad9 en présence d'HU, même si elle est retardée par rapport aux cellules sauvages (Crabbe et al., 2010). En revanche, dans un mutant *rad9* en présence de cassures double brin, Rad53 n'est pas activée via Mrc1 (Sweeney et al., 2005). Lors d'un stress réplicatif, Rad9 peut donc indirectement activer Rad53, tandis que Mrc1 ne peut pas activer Rad53 à la place de Rad9 en dehors de la phase S. De plus, même si Rad9 est capable d'activer Rad53 dans un mutant *mrc1*, cette activation ne permet pas de réprimer les origines de réplication tardives, une des principales fonctions de Rad53 en présence d'HU (Crabbé et al., 2010).

Il est généralement admis que l'HU ne génère pas de cassures de l'ADN mais induit simplement une pause de la réplication. L'activation de Rad53 dans un mutant *mrc1* exposé à l'HU est donc probablement liée à la déstabilisation des fourches en absence de Mrc1, ce qui induirait des cassures secondaires et une activation indirecte du checkpoint de dommage à l'ADN. En HU, l'activation de Rad53 par Rad9 interviendrait donc trop tard pour bloquer les origines tardives. Si c'est le cas, l'activation plus rapide de Rad53 via Rad9 par des agents génotoxiques qui induisent des lésions de l'ADN, devrait réprimer plus efficacement les origines tardives.

Dans cette étude, nous proposons de tester cette hypothèse et de vérifier s'il existe une collaboration entre le checkpoint de réplication et le checkpoint de dommages à l'ADN. Nous avons cherché à répondre à ces différentes questions chez la levure, en utilisant des techniques de pointe permettant une analyse fine de la réplication, comme le peignage moléculaire ou le BrdU-IP-chip.

Chapitre 5 : bibliographie

Agarwal, R., Tang, Z., Yu, H., and Cohen-Fix, O. (2003). Two Distinct Pathways for

- Inhibiting Pds1 Ubiquitination in Response to DNA Damage. *J Biol Chem* 278, 45027-45033.
- Aguilera, A., and Gomez-Gonzalez, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. In *Nat Rev Genet* (Nature Publishing Group), pp. 204-217.
- Aladjem, M.I. (2007). Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat Rev Genet* 8, 588-600.
- Alcasabas, A.A., Osborn, A.J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P.J., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J.F., Carr, A.M., and Elledge, S.J. (2001). Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol* 3, 958-965.
- Barnes, D.E., and Lindahl, T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 38, 445-476.
- Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., and Taylor, J. (2009). Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 19*, Unit 19 10 11-21.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2005). The DNA damage response during DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* 17, 568-575.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2006). The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Experimental Cell Research* 312, 2654-2659.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.-c., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* 19, 1040-1052.
- Cayrou, C., Coulombe, P., Vigneron, A., Stanojic, S., Ganier, O., Peiffer, I., Rivals, E., Puy, A., Laurent-Chabalier, S., Desprat, R., *et al.* (2011). Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res*.
- Clarke, D.J. (2003). Establishment of dependence relationships between genome replication and mitosis. *J Cell Biochem* 88, 95-103.
- Cobb, J.A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C., and Gasser, S.M. (2003). DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J* 22, 4325-4336.
- Courbet, S., Gay, S., Arnoult, N., Wronka, G., Anglana, M., Brison, O., and Debatisse, M. (2008). Replication fork movement drives remodeling of chromatin loops and origin choice in mammalian cells. *Nature* 455, 557-560.
- Crabbé, L., Thomas, A., Pantesco, V., De Vos, J., Pasero, P., and Lengronne, A. (2010). Analysis of replication profiles reveals key role of RFC-Ctf18 in yeast replication stress response. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 1391-1397.
- D'Amours, D., and Jackson, S.P. (2001). The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* 15, 2238-2249.
- de la Torre-Ruiz, M.A., Green, C.M., and Lowndes, N.F. (1998). RAD9 and RAD24 define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation. *Embo J* 17, 2687-2698.
- Dohrmann, P.R., Oshiro, G., Tecklenburg, M., and Sclafani, R.A. (1999). RAD53 regulates DBF4 independently of checkpoint function in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151, 965-977.
- Farkash-Amar, S., and Simon, I. (2010). Genome-wide analysis of the replication program in mammals. *Chromosome Res* 18, 115-125.
- Foiani, M., Pelliccioli, A., Lopes, M., Lucca, C., Ferrari, M., Liberi, G., Muzi Falconi, M., and Plevani, P. (2000). DNA damage checkpoints and DNA replication controls in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 451, 187-196.
- Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D., and Labib, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in

- replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* 8, 358-366.
- Ge, X.Q., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2007). Dormant origins licensed by excess Mcm2 7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev* 21, 3331-3341.
- Giannattasio, M., Follonier, C., Tourrière, H., Puddu, F., Lazzaro, F., Pasero, P., Lopes, M., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2010). Exo1 Competes with Repair Synthesis, Converts NER Intermediates to Long ssDNA Gaps, and Promotes Checkpoint Activation. *Molecular Cell* 40, 50-62.
- Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N.P., and Bickmore, W.A. (2004). Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118, 555-566.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. (2008). An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* 319, 1352-1355.
- Hansen, L., Marino-Ramirez, L., and Landsman, D. (2010). Many sequence-specific chromatin modifying protein-binding motifs show strong positional preferences for potential regulatory regions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nucl Acids Res*, gkp1195.
- Hardy, C.F., Dryga, O., Seematter, S., Pahl, P.M., and Sclafani, R.A. (1997). *mcm5/cdc46-bob1* bypasses the requirement for the S phase activator Cdc7p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3151-3155.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., and Jackson, S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature in press*.
- Ibarra, A., Schwob, E., and Mendez, J. (2008). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *PNAS* 105, 8956-8961.
- Jares, P., and Blow, J.J. (2000). *Xenopus cdc7* function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading. *Genes Dev* 14, 1528-1540.
- 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.
- Jiang, W., McDonald, D., Hope, T.J., and Hunter, T. (1999). Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *Embo J* 18, 5703-5713.
- Kanemaki, M., and Labib, K. (2006). Distinct roles for Sld3 and GINS during establishment and progression of eukaryotic DNA replication forks. *Embo J* 25, 1753-1763.
- Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K., and Shirahige, K. (2003). S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* 424, 1078-1083.
- Koc, A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K., and Merrill, G.F. (2004). Hydroxyurea Arrests DNA Replication by a Mechanism That Preserves Basal dNTP Pools. *J Biol Chem* 279, 223-230.
- Kolodner, R.D., Putnam, C.D., and Myung, K. (2002). Maintenance of Genome Stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 297, 552-557.
- Kunkel, T.A. (2003). Considering the cancer consequences of altered DNA polymerase function. *Cancer Cell* 3, 105-110.
- Labib, K. (2010). How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev* 24, 1208-1219.

- Lebofsky, R., Heilig, R., Sonnleitner, M., Weissenbach, J., and Bensimon, A. (2006). DNA Replication Origin Interference Increases the Spacing between Initiation Events in Human Cells. *Mol Biol Cell* *17*, 5337-5345.
- Lei, M., Kawasaki, Y., Young, M.R., Kihara, M., Sugino, A., and Tye, B.K. (1997). Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev* *11*, 3365-3374.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., and Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* *412*, 557-561.
- Lucca, C., Vanoli, F., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Haber, J., and Foiani, M. (2004). Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. *Oncogene* *23*, 1206-1213.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jensen, D., Goldman, A.S., and Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* *33*, 3799-3811.
- Mailand, N., and Diffley, J.F.X. (2005). CDKs Promote DNA Replication Origin Licensing in Human Cells by Protecting Cdc6 from APC/C-Dependent Proteolysis. *Cell* *122*, 915-926.
- Majka, J., and Burgers, P.M. (2003). Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2249-2254.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* *1*, 222-231.
- Michalet, X., Ekong, R., Fougerousse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., van Slegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J.S., *et al.* (1997). Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* *277*, 1518-1523.
- Mimura, S., and Takisawa, H. (1998). Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *Embo J* *17*, 5699-5707.
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* *129*, 665-679.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* *374*, 131-134.
- Murakami-Sekimata, A., Huang, D., Piening, B.D., Bangur, C., and Paulovich, A.G. (2010). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17 and RAD24 genes are required for suppression of mutagenic post-replicative repair during chronic DNA damage. *DNA Repair (Amst)* *9*, 824-834.
- Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y.S., Kamimura, Y., and Araki, H. CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol (epsilon), and GINS in budding yeast. *Genes Dev* *24*, 602-612.
- Myung, K., Datta, A., and Kolodner, R.D. (2001). Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* *104*, 397-408.
- Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2003). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev* *17*, 1957-1962.
- Namiki, Y., and Zou, L. (2006). ATRIP associates with replication protein A-coated ssDNA through multiple interactions. *PNAS* *103*, 580-585.
- Newlon, C.S., and Theis, J.F. (1993). The structure and function of yeast ARS elements. *Curr Opin Genet Dev* *3*, 752-758.
- Nick McElhinny, S.A., Gordenin, D.A., Stith, C.M., Burgers, P.M., and Kunkel, T.A. (2008). Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol Cell* *30*, 137-144.

- Nicol, J.W., Helt, G.A., Blanchard, S.G., Jr., Raja, A., and Loraine, A.E. (2009). The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* 25, 2730-2731.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36, 617-656.
- Pacek, M., and Walter, J.C. (2004). A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *Embo J* 23, 3667-3676.
- Pasero, P., Duncker, B.P., Schwob, E., and Gasser, S.M. (1999). A role for the cdc7 kinase regulatory subunit dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication. *Genes Dev* 13, 2159-2176.
- Pelliccioli, A., and Foiani, M. (2005). Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Curr Biol* 15, R769-771.
- Pursell, Z.F., Isoz, I., Lundstrom, E.-B., Johansson, E., and Kunkel, T.A. (2007). Yeast DNA Polymerase {epsilon} Participates in Leading-Strand DNA Replication. *Science* 317, 127-130.
- Raghuraman, M.K., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1997). Cell cycle-dependent establishment of a late replication program. *Science* 276, 806-809.
- Raghuraman, M.K., Winzeler, E.A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D.J., Davis, R.W., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (2001). Replication Dynamics of the Yeast Genome. *Science* 294, 115-121.
- Rhind, N., Yang, S.C.-H., and Bechhoefer, J. (2009). Reconciling stochastic origin firing with defined replication timing. *Chromosome Research* 18, 35-43.
- Ricke, R.M., and Bielsky, A.K. (2004). Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase-alpha. *Mol Cell* 16, 173-185.
- Roberts, B.T., Ying, C.Y., Gautier, J., and Maller, J.L. (1999). DNA replication in vertebrates requires a homolog of the Cdc7 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2800-2804.
- Santocanale, C., and Diffley, J.F. (1998). A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* 395, 615-618.
- Sato, N., Arai, K., and Masai, H. (1997). Human and Xenopus cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7. *Embo J* 16, 4340-4351.
- Sawyer, S.L., Cheng, I.H., Chai, W., and Tye, B.K. (2004). Mcm10 and Cdc45 cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 340, 195-202.
- Sheu, Y.-J., and Stillman, B. (2010). The Dbf4-Cdc7 kinase promotes S phase by alleviating an inhibitory activity in Mcm4. *Nature* 463, 113-117.
- Shimada, K., Pasero, P., and Gasser, S.M. (2002). ORC and the intra-S-phase checkpoint: a threshold regulates Rad53p activation in S phase. *Genes Dev* 16, 3236-3252.
- Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., and Yoshikawa, H. (1998). Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* 395, 618-621.
- Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. (2002). Fork Reversal and ssDNA Accumulation at Stalled Replication Forks Owing to Checkpoint Defects. *Science* 297, 599-602.
- Sweeney, F.D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Durocher, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Acts as a Mec1 Adaptor to Allow Rad53 Activation. *Curr Biol* 15, 1364-1375.
- Tanaka, K., and Russell, P. (2001). Mrc1 channels the DNA replication arrest signal to checkpoint kinase Cds1. *Nat Cell Biol* 3, 966-972.
- Tercero, J.A., and Diffley, J.F. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* 412, 553-557.

- Tercero, J.A., Longhese, M.P., and Diffley, J.F. (2003). A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* *11*, 1323-1336.
- Tourrière, H., Versini, G., Cordon-Preciado, V., Alabert, C., and Pasero, P. (2005). Mrc1 and Tof1 Promote Replication Fork Progression and Recovery Independently of Rad53. *Molecular Cell* *19*, 699-706.
- Tuduri, S., Tourrière, H., and Pasero, P. (2009). Defining replication origin efficiency using DNA fiber assays. *Chromosome Research* *18*, 91-102.
- Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J., and Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* *10*, 1223-1233.
- Weinreich, M., and Stillman, B. (1999). Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway. *Embo J* *18*, 5334-5346.
- Wysocki, R., Javaheri, A., Allard, S., Sha, F., Cote, J., and Kron, S.J. (2005). Role of Dot1-Dependent Histone H3 Methylation in G1 and S Phase DNA Damage Checkpoint Functions of Rad9. *Mol Cell Biol* *25*, 8430-8443.
- Zegerman, P., and Diffley, J.F.X. (2006). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* *445*, 281-285.
- Zegerman, P., and Diffley, J.F.X. (2010). Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature* *467*, 474-478.
- Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., and Rothstein, R. (2001). The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J* *20*, 3544-3553.
- Zhao, X., and Rothstein, R. (2002). The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *PNAS* *99*, 3746-3751.
- Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* *408*, 433-439.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* *300*, 1542-1548.