

Université de Montréal

**Rôle de la chromatine dans la modulation de la réponse
aux dommages à l'ADN en présence de stress répliatif**

par Étienne Ricard

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en biologie moléculaire,
option maladies complexes chez l'humain

Septembre, 2016

© Étienne Ricard, 2016

Résumé

Les sirtuines sont une famille conservée de déacétylases NAD⁺-dépendantes qui sont impliquées dans divers processus. Les humains possèdent 7 sirtuines (SIRT1-7) qui jouent un rôle dans plusieurs voies cellulaires, tandis que la levure *Saccharomyces cerevisiae* possède 5 membres (Sir2, Hst1-4) qui influencent plusieurs voies comme le cycle cellulaire ou le vieillissement. Une absence d'activité des sirtuines mène toutefois à des défauts de croissance, une thermosensibilité et l'apparition de dommages spontanés à l'ADN par des mécanismes mal élucidés. Pour mieux caractériser ce phénomène, ce mémoire met en lumière certains résultats venant d'un crible chimiogénétique réalisé par traitement au nicotinamide (NAM), un pan-inhibiteur des sirtuines. Nos résultats indiquent que le NAM entraîne chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* une forte activation des voies de réponses aux dommages à l'ADN, et que les défauts de croissance sont principalement dus à l'hyperacétylation de la lysine 56 de l'histone H3 (H3K56), une modification post-traductionnelle qui est renversée par les sirtuines Hst3 et Hst4. Lors d'hyperacétylation de H3K56, la protéine Slx4 et le complexe PP4 sont requis pour la croissance de la levure en modulant les niveaux d'activation de la kinase Rad53 lors de la RDA. Également, certains résultats préliminaires inclus dans ce mémoire mettent en évidence un rôle de l'activité des sirtuines dans la régulation de la recombinaison homologue, l'une des voies de réparation de l'ADN. Ensemble, nos résultats suggèrent que la déacétylation des histones par les sirtuines permet de moduler la réponse aux dommages à l'ADN en présence de stress répliatif.

Mots-clés : Nicotinamide, sirtuines, acétylation de la lysine 56 de l'histone H3, réplication de l'ADN, crible chimiogénétique, cycle cellulaire, voie de réponse aux dommages à l'ADN, voie d'activation de Rad53, recombinaison homologue

Abstract

Sirtuins are a conserved family of NAD⁺-dependent deacetylases that are involved in various processes. Humans have seven sirtuins (SIRT1-7) and play a role in several cellular pathways, while the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has 5 members (Sir2, Hst1-4) and influence several pathways, such as the cell cycle or aging. Lack of sirtuin activity however leads to growth defects, thermosensitivity and spontaneous DNA damage by poorly understood mechanisms. To further characterize this phenomenon, this thesis highlights results obtained from a chemogenetic screen realized by treatment with nicotinamide (NAM), a pan-inhibitor of all sirtuins. Our results indicate that NAM causes strong activation of DNA damage-induced signaling in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and that growth defects are mainly due to histone H3 lysine 56 (H3K56) hyperacetylation, a post-translational modification reversed by sirtuins Hst3 and Hst4. During H3K56 hyperacetylation, the Slx4 protein and PP4 complex are both required for yeast growth by modulating the activation levels of Rad53 kinase during the DDR. Also, preliminary results included in this thesis highlight that proper regulation of homologous recombination, one of DNA repair pathways, is essential for growth in the presence of NAM-induced sirtuin inhibition. Together, our results suggest that chromosome-wide histone deacetylation by sirtuins can modulate DNA damage response in presence of replicative stress.

Keywords : Nicotinamide, sirtuins, Histone H3 lysine 56 acetylation, DNA replication, chemogenetic screen, cell cycle, DNA damage-induced response, Rad53 activation pathway, homologous recombination

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
Introduction.....	1
Rôle de la chromatine dans la régulation des processus eucaryotiques.....	1
La réplication de l'ADN (phase S) chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Implication des modifications post-traductionnelles dans l'état de la chromatine.....	5
L'acétylation de la lysine 56 sur l'histone H3 (H3K56ac) en phase S.....	8
Les déacétylases d'histones de la classe III, ou sirtuines.....	11
Que se passe-t-il en absence d'activité des sirtuines?.....	15
Voies de réponse aux dommages à l'ADN lors de stress répliatif.....	17
Cascade de signalisation menant à l'activation de la kinase Rad53.....	18
Terminaison de la cascade de signalisation de la kinase Rad53.....	21
Réparation des bris double-brins par la recombinaison homologue (RH).....	23
Régulation de la recombinaison homologue.....	25
Voies de tolérance aux dommages à l'ADN : la réparation post-répliative.....	27
Voie de tolérance avec erreurs : la polymérisation de translésion (TLS).....	27
Voie de tolérance sans erreurs : le changement de matrice (TS).....	28
Implication de H3K56ac dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	30

Le nicotinamide, un inhibiteur non compétitif des sirtuins	31
Potentiel antifongique du nicotinamide	31
Hypothèse et objectifs	32
Matériel et méthodes	33
Utilisation de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comme modèle expérimental	33
Manipulations génétiques de la levure	33
Tests de croissance par dilutions en série	34
Tests de croissance au nicotinamide	34
Étude de croissance en plaques 96 puits	34
Étude du temps de dédoublement	35
Étude asynchrone des générations de levure	35
Synchronisation cellulaire et traitement aux agents génotoxiques	35
Cytométrie en flux	36
Immunobuvardage de type Western	36
Essais d'autophosphorylation de Rad53 <i>in situ</i>	36
Microscopie à fluorescence	37
Crible chimiogénétique et «fitness assay»	37
Résultats	43
Résultats publiés (Simoneau A. <i>et al</i> , Nucleic Acid Research Journal 2016) (318)	43
L'hyperacétylation de H3K56 entraîne une forte activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN	43
Identification de liens génétiques entre H3K56ac et la réponse cellulaire à l'inhibition de l'activité des sirtuines	45
Catégories de gènes dont la mutation influence la prolifération cellulaire en absence d'activité des sirtuines	47

La protéine d'échafaudage Slx4 est importante pour la croissance cellulaire en présence d'hyperacétylation de H3K56	48
La protéine phosphatase Pph3 permet l'atténuation de la réponse aux dommages à l'ADN en réponse à l'hyperacétylation de H3K56.....	51
Réduire le niveau d'activation de la kinase Rad53 restaure la croissance des mutants <i>slx4Δ</i> et <i>pph3Δ</i> lors d'hyperacétylation de H3K56	53
L'hyperactivation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN affecte la complétion de la réplication de l'ADN des mutants <i>slx4Δ</i> et <i>pph3Δ</i>	56
La polymérisation de translésion (TLS) permet de compléter la réplication de l'ADN des mutants <i>slx4Δ</i> et <i>pph3Δ</i> en présence de stress réplcatif	57
Résultats non-publiés	60
L'hélicase Srs2 est essentielle à la croissance cellulaire lors d'inhibition des sirtuines, de manière dépendante et indépendante de l'état de la chromatine.....	60
Les défauts de croissance du mutant <i>srs2Δ</i> en présence de NAM pourraient être reliées à l'inhibition de sirtuines autres que Hst3 et Hst4	63
L'activation de la réponse aux dommages à l'ADN est une conséquence et non la cause de la sensibilité du mutant <i>srs2Δ</i> au NAM.....	65
L'inhibition des sirtuines entraîne la formation d'intermédiaires toxiques de Rad51 qui nécessitent leur retrait par la protéine Srs2	69
Conclusion et perspectives.....	72
Plusieurs mutations de gènes non essentiels de la levure <i>S. cerevisiae</i> confèrent une sensibilité au nicotinamide causée par l'hyperacétylation de H3K56	72
L'hyperacétylation de H3K56 par le NAM induit une forte activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN par l'activation de la kinase Rad53	74
L'hyperactivation de la kinase Rad53 affecte la complétion de la réplication de l'ADN en présence d'hyperacétylation de H3K56 par le NAM.....	76

L'inhibition des sirtuines par le NAM influence la formation de filaments Rad51 toxiques pour la cellule.....	78
Applications cliniques à long terme pour l'utilisation d'inhibiteurs de déacétylases d'histones dans le traitement du cancer	79
Bibliographie.....	81
Annexe	109
Résultats publiés (Simoneau A. <i>et al</i> , Nucleic Acid Research Journal 2016) (318)	109
L'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 contribue aux phénotypes d'une inhibition des sirtuines par le NAM	109
La polymérisation de translésion (TLS) est une voie requise pour la croissance cellulaire lors d'inhibition des sirtuines par le NAM	110
Résultats non-publiés.....	111
Optimisation des conditions nécessaires à la réalisation des souches <i>srs2Δ ± rtt101Δ</i> , <i>rtt107Δ</i> , <i>mms1Δ</i> et <i>mms22Δ</i>	111
Implication du niveau de SUMOylation de Rad52 et de la phosphorylation de Mms4 lors d'hyperacétylation de H3K56 induite par le NAM.....	112

Liste des tableaux

Tableau 1 Liste et fonctionnalité des sirtuines de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (69,76,80,146).....	15
Tableau 2 Table des souches de levures étudiées dans ce mémoire	38

Liste des figures

Figure 1 Initiation de la réplication et formation du réplisome (23).....	4
Figure 2 L'acétylation de la lysine 56 sur l'histone H3 et l'assemblage <i>de novo</i> des nucléosomes chez la levure <i>S. cerevisiae</i> (78,82,98,113).....	10
Figure 3 Schématisation de la biosynthèse du NAD ⁺ et mécanisme d'action global des sirtuines (118,122,126–128)	12
Figure 4 Cascade de signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN menant à l'activation de la kinase Rad53 par la voie dépendante de Mec1 (165,183,192–195).....	20
Figure 5 Régulation de la voie d'activation de la kinase Rad53 par les complexes Slx4-Rtt107 et PP4 (195,206,218).....	22
Figure 6 Schéma de la voie de réparation par recombinaison homologue en présence de brins double-brins et facteurs de recombinaison impliqués (175,201,219,233).....	24
Figure 7 Modifications post-traductionnelles de PCNA dans la réparation post-réplivative (233).....	29
Figure 8 L'inhibition des sirtuines par le NAM cause des dommages à l'ADN qui dépend de l'hyperacétylation de H3K56.....	44
Figure 9 Résumé du crible chimiogénétique réalisé en NAM.....	46
Figure 10 Le mutant <i>slx4Δ</i> est sensible à l'hyperacétylation de H3K56 induite par le NAM..	49
Figure 11 La sensibilité du mutant <i>slx4Δ</i> en NAM requiert une contribution de H3K56ac, Rtt101 et Rtt107, et non celle de la voie de résolution des jonctions d'Holliday.....	50
Figure 12 Le mutant <i>pph3Δ</i> est sensible à l'hyperacétylation de H3K56 induite par le NAM	52
Figure 13 Les mutants <i>slx4Δ</i> et <i>pph3Δ</i> présentent une hyperactivation de la kinase Rad53 en présence de NAM	53
Figure 14 La délétion de <i>RAD9</i> diminue l'activation de la kinase Rad53 et renverse les phénotypes de <i>slx4Δ</i> et <i>pph3Δ</i> en absence d'activité des sirtuines.....	54
Figure 15 Empêcher la phosphorylation de H2A ou la triméthylation de H3K79 restaure la croissance de <i>slx4Δ</i> et <i>pph3Δ</i> en présence de NAM.....	55
Figure 16 L'inhibition des origines tardives dépendante de Rad53 contribue aux défauts de croissance des mutants <i>slx4Δ</i> et <i>pph3Δ</i> en NAM.....	57

Figure 17 La polymérisation de translésion permet la complétion du cycle cellulaire, mais non la progression de la réplication de l'ADN	59
Figure 18 Retour sur le crible chimiogénétique.....	61
Figure 19 Le mutant <i>srs2Δ</i> est sensible à l'inhibition des sirtuines par le NAM, de manière dépendante et indépendante de H3K56ac	62
Figure 20 Les phénotypes du mutant <i>srs2Δ</i> en NAM ne sont pas associés à la voie d'ubiquitination de l'histone H3	63
Figure 21 Les phénotypes du mutant <i>srs2Δ</i> en NAM ne sont pas associés à la voie d'acétylation de l'histone H4	65
Figure 22 L'hyperactivation de la cascade de signalisation de Rad53 influence la complétion de la réplication de l'ADN du mutant <i>srs2Δ</i> en NAM.....	67
Figure 23 L'atténuation de la voie de signalisation de Rad53 ou des voies de tolérance aux dommages à l'ADN n'influence pas les phénotypes du mutant <i>srs2Δ</i> en NAM.....	68
Figure 24 L'absence de Srs2 entraîne la formation de structures de recombinaison aberrantes qui s'avèrent létales pour la cellule en réponse au NAM	70
Figure 25 L'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 contribue aux défauts de croissance cellulaire observés au NAM.....	109
Figure 26 La polymérisation de translésion permet de restaurer la croissance des mutants <i>slx4Δ</i> et <i>pph3Δ</i> en NAM, de manière indépendante à Polζ	111
Figure 27 Les mutants <i>srs2Δ rtt101Δ</i> , <i>srs2Δ rtt107Δ</i> , <i>srs2Δ mms1Δ</i> et <i>srs2Δ mms22Δ</i> présentent une hypersensibilité en NAM et en MMS.....	112
Figure 28 Le niveau de SUMOylation de Rad52 ainsi que celui de phosphorylation de Mms4 influencent peu les phénotypes de <i>srs2Δ</i> en NAM	114

Liste des sigles et abréviations

A: Alanine

Ac: Acétylation

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomal

ATP : Adénosine triphosphate

C. albicans: *Candida albicans*

DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole

D.O. : Densité optique

DSB : Bris double-brin à l'ADN

DTT: Dithiothréitol

HAT: Histone acétyltransférase

HDAC: Déacétylase d'histone

His: Histidine

HPH: Hygromycine

JH: Jonction d'Holliday

K: Lysine

Kan: Kanamycine

Me: Méthylation

MCM : Minichromosome maintenance protein complex

MMS : Méthanesulfonate de méthyle

MPT : Modification post-traductionnelle

NAM : Nicotinamide

NAD⁺: Nicotinamide adénine dinucléotide

NBP : Poche de liaison au nicotinamide

dNTP : Désoxyribonucléotide 5'-triphosphate

P: Phosphorylation

PCR: Réaction par polymérase en chaîne

PVDF: Polyfluorure de vinylène

R: Arginine

RDA: Voie de réponse aux dommages à l'ADN

RH: Recombinaison homologue

RPR : Voie de réparation post-réplivative

S: Sérine

SC: Milieu minimal «synthetic complete»

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

SDS-PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et dodécylsulfate de sodium

T : Thréonine

TCA: Acide trichloroacétique

TDA : Voie de tolérance aux dommages à l'ADN

TLS: Polymérisation par translésion (Translesion synthesis)

Trp : Tryptophane

TS: Changement de matrice (Template switching)

Ub : Ubiquitination

URA : Uracile

Y : Tyrosine

YPD : Milieu synthétique «yeast extract-peptone-dextrose»

5FoA : Acide 5-fluoroorotique

Remerciements

Je tiens à saluer tous les gens qui m'ont épaulé durant le déroulement de ma maîtrise. Tout d'abord, j'aimerais remercier les membres du laboratoire qui ont partagé mon quotidien lors des deux dernières années; la technicienne du laboratoire Edlie St-Hilaire qui a su me venir en aide dans la réalisation de mes expériences, Ian Hammond-Martel, Kristelle Desfossés-Baron et Jean-Philippe Angers pour leurs judicieux conseils ainsi qu'Antoine Simoneau, qui m'a non seulement initié à ce projet mais avec qui j'ai collaboré tout au long de mon projet de maîtrise, ce qui a mené à une publication dans le *Nucleic Acid Research* en janvier 2016. Je tiens à remercier également mon directeur de recherche Hugo Wurtele de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir guidé dans la réalisation de mon projet de maîtrise ainsi que dans la rédaction de ce mémoire. Pour terminer, je tiens à souligner l'encouragement et le soutien de ma famille et de mes amis qui m'ont permis d'achever avec succès mon parcours aux cycles supérieurs.

Introduction

Rôle de la chromatine dans la régulation des processus eucaryotiques

Chez les eucaryotes, l'ADN se compacte en une structure que l'on nomme la chromatine. Celle-ci est hautement régulée et permet de moduler divers processus cellulaires, que ce soit la réparation de l'ADN, la transcription de gènes ou encore la division cellulaire. L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome, soit des unités répétitives qui enroulent 147 paires de bases d'ADN autour d'octamères d'histones (1). Les histones sont des protéines basiques composées d'environ 20 à 30 acides aminés, possédant un domaine globulaire et une queue N-terminale plus ou moins ordonnée (2). Les octamères sont composés de deux dimères d'histones H3 et H4, formant un tétramère stable avec deux dimères d'histones H2A et H2B. L'octamère formé est lié à la double-hélice d'ADN par des interactions spécifiques telles que des liens hydrophobes ou des liens hydrogènes (2,3).

La structure de la chromatine est hautement dynamique. Plusieurs facteurs influencent l'état de la chromatine dans le but de réguler les divers processus cellulaires. L'un des rôles les mieux caractérisés de la chromatine est celui de la régulation de la transcription des gènes. Certaines régions spécifiques du génome possèdent des structures de la chromatine peu condensées permettant une meilleure accessibilité aux facteurs protéiques liant l'ADN pour démarrer la transcription, ce que l'on nomme la chromatine active. À l'opposé, d'autres régions du génome présentent des structures de la chromatine très condensées, soit la chromatine silencieuse, ce qui empêche la liaison de ces facteurs et par le fait même, l'enclenchement de la transcription (4,5). Les histones, comme toute autre protéine de la cellule, sont sujettes à des modifications post-traductionnelles (MPTs) covalentes qui modulent leur activité. Ces modifications peuvent influencer la charge globale de la chromatine, ce qui affecte le niveau de compaction des histones avec l'ADN, ou peuvent servir de plateformes pour le recrutement de facteurs protéiques (5).

L'état de la chromatine subit des modifications durant le cycle cellulaire et plusieurs d'entre elles sont conservées au cours de l'évolution. Certains mécanismes, par exemple, ont été élucidés chez la levure à bourgeonnement *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) avant d'être transposés chez l'humain, et nous nous attarderons à cet organisme modèle dans ce mémoire. La prochaine sous-section fera un survol du cycle cellulaire, plus précisément lors de la réplication de l'ADN, et mettra ensuite l'accent sur les différentes modifications post-traductionnelles qui influencent la structure de la chromatine.

La réplication de l'ADN (phase S) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Le cycle cellulaire de la levure se déroule en quatre phases, comme pour la plupart des autres organismes : la phase-gap 1 (phase G1), la phase de synthèse d'ADN (phase S), la phase-gap 2 (phase G2) ainsi que la mitose (phase M). La phase G1 sert initialement à préparer la cellule pour la duplication de son génome. Selon l'environnement de croissance, la cellule procédera à la transcription de facteurs permettant soit son entrée dans le cycle cellulaire, ou alors à sa sporulation (6). La phase S, au cours de laquelle la cellule réplique son ADN, sera détaillée plus loin dans cette sous-section. La phase G2 et la phase M entraînent la division cellulaire, soit le partage du génome dupliqué entre la cellule mère et la cellule fille, pour ensuite se séparer lors de la cytokinèse (7). La progression dans le cycle cellulaire repose sur l'activité de kinases dépendantes des cyclines (CDKs), qui phosphorylent plusieurs facteurs clés lorsqu'elles sont liées à leurs sous-unités régulatrices, les cyclines (8). Ces dernières sont spécifiques à leur phase du cycle cellulaire, ce qui est contrôlé par un mécanisme de coordination. D'une part, l'oscillation des CDKs régule l'activation temporelle des cyclines, ce qui permet une transition adéquate entre les différentes phases du cycle cellulaire. De l'autre, un réseau de facteurs de transcription qui agit indépendamment des cyclines-CDKs régule l'expression périodique d'éléments impliqués dans la progression du cycle cellulaire (9).

L'initiation de la réplication de l'ADN est un processus conservé au cours de l'évolution. L'une des étapes initiales est le chargement de l'hélicase MCM aux origines de réplication sous forme inactive (10,11). Le complexe d'origine de réplication (ORC), associé avec les facteurs Cdt1 et Cdc6 chez *S. cerevisiae*, est lié à des séquences de réplication

autonomes (12) et permet le recrutement de l'hélicase MCM pour l'initiation de la phase S (13,14). Comme les fourches de réplication sont bi-directionnelles, il est possible que l'ORC recrute au moins deux MCM à orientations opposées (11). L'hélicase MCM est un hexamère des sous-unités Mcm2 à Mcm7 et forme le complexe de pré-réplication chez les eucaryotes. Son association stable avec l'ADN forme un complexe CMG aux fourches actives par interaction avec Cdc45, qui régule son activité, ainsi que le complexe GINS, qui maintient Cdc45 à l'ADN (15,16). Le chargement de l'hélicase MCM est fortement régulé avec le cycle cellulaire (17) dans le but de prévenir la re-réplication (18,19). Les cyclines-CDK permettent notamment d'inhiber Cdt1 et Cdc6, et donc le chargement du complexe MCM lors de l'initiation de la phase S (20).

L'initiation de la réplication est régulée par deux classes de protéines kinases : les CDKs et les kinases dépendantes de Dbf4 (DDK) (10). Les CDKs phosphorylent deux facteurs clés, Sld2 et Sld3, ce qui permet le recrutement du facteur de réplication Dbp11, du complexe CMG et de la polymérase ϵ (21), tandis que les DDKs activent l'hélicase MCM par le dimère Dbf4-Cdc7 (22,23). Le complexe GINS permet l'interaction de l'hélicase MCM avec plusieurs protéines impliquées dans la formation du réplisome (16), entre autres la protéine de contrôle Mrc1, le complexe Csm3-Tof1 qui maintient l'intégrité des fourches (24) ainsi que la protéine Ctf4. Cette dernière, quoique non essentielle à la réplication, est impliquée dans la cohésion des chromatides sœurs (25) et dans la liaison de la primase/polymérase- α au complexe CMG (26). La duplication du génome chez les eucaryotes est conduite par trois polymérases répliquatives essentielles de la famille B, soit la polymérase- α , la polymérase- ϵ et la polymérase- δ (27,28). Comme les polymérases d'ADN ne peuvent allonger qu'à partir d'une amorce d'ARN préexistante, la polymérase- α forme un complexe avec la primase qui ajoute des fragments d'ARN d'environ 7 à 12 nucléotides de long pour son ancrage (29). Après l'ajout d'environ 20 nucléotides, l'élongation est poursuivie soit par la polymérase- ϵ (Pol2 chez la levure) sur le brin précoce (30) ou par la polymérase- δ (Pol32 chez la levure) sur le brin retardé, qui nécessite la formation de fragments d'Okazaki (31). La figure 1 suivante illustre quelques-uns de ces facteurs aux fourches de réplication bi-directionnelles.

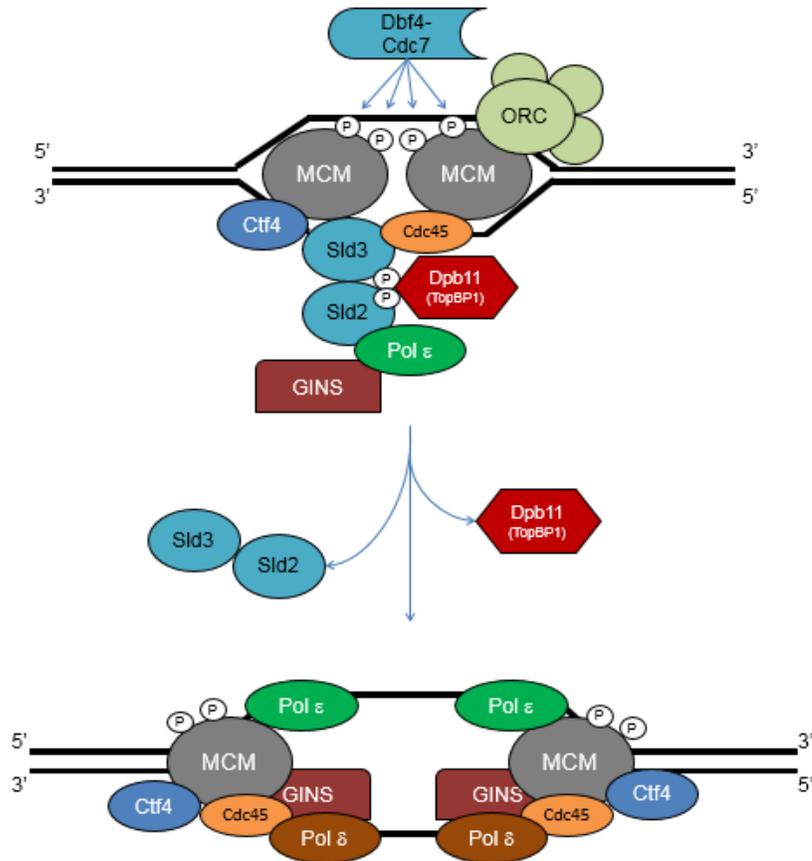


Figure 1 Initiation de la réplication et formation du réplisome (23)

D'autres complexes sont recrutés lors de la réplication de l'ADN. Le facteur de réplication A (RPA), formé des sous-unités Rfa1 à 3, est un complexe conservé qui protège l'ADN simple-brin pour l'activation des voies de signalisation aux dommages à l'ADN (voir la section de la RDA) (32). Le PCNA est un homotrimer conservé de la protéine Pol30 chez *S. cerevisiae* qui forme un anneau autour de l'ADN. Il régule la processivité des polymérase d'ADN et interagit avec plusieurs facteurs protéiques pour compléter l'élongation (33,34). PCNA est chargé à l'ADN lors de la phase S par le facteur de réplication C (RFC), formé des sous-unités Rfc1 à 5 (35,36). RFC interagit également avec la composante Rad24 dans le chargement d'un PCNA alternatif, ce qui reviendra plus loin dans l'introduction (37). La terminaison de la réplication chez la levure est régulée par le complexe Skp1/Cul1/F-Box Dia2 (SCF-Dia2), qui ubiquitine la sous-unité Mcm7 de l'hélicase MCM par interaction avec la protéine Mrc1 (38). SCF-Dia2 agit en coordination avec la ségrégase Cdc48 et permet la poly-ubiquitination de Mcm7, ce qui entraîne la dissolution du complexe CMG suivi du retrait de

l'hélicase MCM après les dissociations de Cdc45 et GINS (38,39). Les molécules d'ADN filles en liaison avec l'ADN parental sont résolues par la topoisomérase II Top2 en fin de phase S (40). En somme, la réplication de l'ADN est un processus hautement régulé dans le but de maintenir l'intégrité génomique jusqu'à la prochaine phase du cycle cellulaire. Les cellules ont évolué en divers mécanismes pour faciliter le déroulement de la phase S, entre autres par des MPTs qui influencent la stabilité des protéines régulatrices et leur recrutement à la chromatine. Les sous-sections suivantes s'intéresseront aux différentes modifications qui modulent les protéines ainsi que les histones.

Implication des modifications post-traductionnelles dans l'état de la chromatine

Les protéines sont susceptibles à un vaste registre de modifications post-traductionnelles, régulées par des classes d'enzymes qui ajoutent ou retirent des groupements chimiques sur des résidus cibles. Parmi celles-ci, on y retrouve la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la SUMOylation ainsi que l'acétylation; cette dernière sera détaillée dans la prochaine sous-section.

La méthylation consiste à l'ajout d'un groupement méthyle sur les lysines (K) et arginines (R) des protéines cibles, ce qui influence la régulation épigénétique (41,42). Les histones sont méthylées par des histones méthyltransférases (HMT), et ces MPTs sont reconnues par certains domaines de protéines tels que les chromodomaines, les domaines Tudor ou les domaines PHD (43,44). Chez la levure, la lysine 79 de l'histone H3 est triméthylée (H3K79me3) par la méthyltransférase Dot1. Cette modification est impliquée dans la réparation de l'ADN et dans la limitation de la répression génique en libérant le complexe SIR de la chromatine (voir la section sur les sirtuines) (45,46). La phosphorylation consiste à l'ajout d'un groupement phosphate sur les sérines (S), thréonines (T) et tyrosines (Y) des protéines cibles par utilisation de l'ATP (47). Les protéines kinases et phosphatases ont des rôles opposés dans cette MPT, ce qui régule l'activation de substrats ainsi que le recrutement de facteurs par leurs domaines BRCT (47,48). Chez les eucaryotes, l'histone H2A est phosphorylée sur la sérine 128 (H2A S128P pour la levure, ou γ H2AX pour les eucaryotes avancés), et participe à l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN (voir la

section sur l'activation de Rad53) (49). L'ubiquitination consiste à l'attachement d'une chaîne polymérique de protéines ubiquitines d'environ 76 acides aminés sur des lysines cibles (50). Elle est régulée par des enzymes ubiquitine-ligases (Ub-ligases) qui ajoutent soit une seule ubiquitine (mono-ubiquitination), ou alors une chaîne d'ubiquitines reliées à la même lysine (poly-ubiquitination) (50,51). L'un des rôles les mieux caractérisés de cette MPT est celui servant de signal de dégradation d'une protéine cible par sa poly-ubiquitination à la lysine 48, suivi de sa fragmentation en polypeptides par le protéasome (51). Toutefois, elle peut donner lieu à des signaux non protéolytiques, par exemple lors de l'ubiquitination de PCNA (voir la section sur les voies de tolérance aux dommages). La SUMOylation est une modification reliée à l'ubiquitination (de nom Small Ubiquitin-related Modifier, ou SUMO), soit par l'attachement d'une protéine SUMO (Smt3 chez la levure) d'environ 100 acides aminés sur des lysines cibles (52). Elle est régulée par des enzymes SUMO-ligases, dont trois qui sont identifiées chez la levure : Siz1, Siz2 et Mms21 (52,53). Contrairement à l'ubiquitination, la SUMOylation n'influence pas la stabilité des protéines, mais module leurs interactions et leurs fonctions, même si les modalités d'action de cette MPT demeurent mal comprises.

L'acétylation des lysines influence la conformation des histones sur l'ADN

L'acétylation consiste à l'ajout de groupements acétyles sur les lysines des protéines cibles. Elle correspond au transfert d'acétyle d'une molécule d'acétyl-coenzyme A (acétyl CoA) vers le résidu cible qui est médié par des enzymes nommés les acétyltransférases (figure 3) (54). Comme il s'agit d'un processus réversible, le groupement acétyle est retiré par des enzymes déacétylases (55). L'acétylation des histones est l'une des premières modifications reconnues à la chromatine et l'une des plus dynamiques. Plusieurs lysines dans le domaine globulaire ou sur la queue N-terminale des histones sont acétylées (55), et ces cycles d'acétylation et de déacétylation jouent un rôle dans plusieurs fonctions cellulaires comme le remodelage de la chromatine (56), la transcription des gènes (55), la réplication de l'ADN (57,58), le transport nucléaire (59) ainsi que la réparation de l'ADN (60). Cette MPT recrute des facteurs à la chromatine par leurs bromodomains, étant associés à des remodeleurs de la chromatine ou aux acétyltransférases (61), ou par leurs domaines PH (62).

Les groupes enzymatiques régulant l'acétylation sont les lysines acétyltransférases (KAT) et les lysines déacétylases (KDAC) : toutefois, comme elles ont été caractérisées initialement sur les histones (63), elles sont répertoriées en histones acétyltransférases (HAT) et histones déacétylases (HDAC). Les HAT se retrouvent en deux groupes majeurs chez *S. cerevisiae* selon leur homologie de séquence : la classe de l'acétyltransférase Gcn5 (GNAT) et la classe MOZ-Ybf3-Sas2-Tip60 (MYST). La classe GNAT est composée des membres Gcn5, Hat1, Hpa2 et Elp3 (64), dont la plupart présentent des similarités de séquence avec Gcn5. Cette HAT est une sous-unité catalytique de plusieurs complexes (*e.g.* SAGA, Ada) qui acétyle plusieurs histones libres dans la régulation de la transcription et dans l'assemblage des nucléosomes (54,57,65). La classe MYST, composée des membres Esa1, Sas2 et Sas3 chez la levure, a été caractérisée selon leurs homologues chez l'humain (66). Esa1, composante du complexe NuA4, agit dans la transcription (67) alors que Sas2, sous-unité catalytique du complexe SAS-I avec les membres Sas4 et Sas5 (68), est impliquée dans l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16ac), modification abondante de la chromatine active dans le but de réduire le niveau d'étalement de la chromatine silencieuse (55,69).

Les HDAC sont regroupées en trois grandes classes chez *S. cerevisiae* : les classes I et II, qui possèdent un atome de zinc dans leur site catalytique et la classe III, qui diffère par son utilisation du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) comme co-enzyme (70). La classe I est composée des membres Rpd3, Hos1 et Hos2 (70), et regroupe des enzymes possédant une homologie de séquence avec Rpd3. Les enzymes de cette classe déacétylent plusieurs résidus d'histones cibles dans la réponse aux stress environnementaux (71), dans la répression de gènes de sporulation (72) et dans l'initiation de la réplication (73). La classe II comporte Hda1 et Hos3, qui intervient dans la répression de la transcription (74) et dans la division cellulaire (75). La classe III, qui sera détaillée dans la prochaine section, est composée chez la levure du membre fondateur Sir2 et de ses homologues de séquence Hst1 à Hst4. Utilisant le NAD⁺ dans sa réaction catalytique, elle est impliquée dans plusieurs réponses cellulaires (76,77).

L'acétylation de la lysine 56 sur l'histone H3 (H3K56ac) en phase S

Alors que la plupart des modifications post-traductionnelles sur les histones sont régulées selon le niveau d'expression génique, l'une d'entre elles est influencée davantage par les niveaux d'altérations à la chromatine, soit l'acétylation de la lysine 56 de l'histone H3 (H3K56ac). Elle se déroule spécifiquement lors de la phase S au niveau du domaine globulaire des histones H3 nouvellement synthétisées derrière les fourches de réplication (78,79), contrairement aux histones parentales qui demeurent non acétylées (80). Chez la levure *S. cerevisiae*, cette acétylation est effectuée par l'histone acétyltransférase Rtt109, qui acétyle spécifiquement H3K56 (81,82). Rtt109 ne possède aucune homologie de séquence avec les autres HAT de la levure (83), mais elle est analogue au niveau structural avec l'acétyltransférase humaine CBP/p300 (84,85). Cette dernière est recrutée pour l'acétylation de H3K56 chez l'humain à la chromatine plutôt qu'aux histones H3 libres et contrairement à Rtt109, elle possède un bromodomaine (85). Rtt109 est lié à deux chaperonnes d'histones pour l'acétylation de H3K56, soit Asf1 et Vps75 (86). Le complexe Asf1-Rtt109 est recruté aux dimères H3-H4 pour l'acétylation des histones H3 libres (82,87), et le complexe Vps75-Rtt109 permet l'acétylation des queues N-terminale des histones H3 (88). Alors que ces chaperonnes contrôlent l'activité de cette HAT, le complexe Asf1-Rtt109, mais non celui de Vps75-Rtt109, est important pour le maintien de l'intégrité génomique (86,89).

H3K56ac est une modification conservée chez différentes espèces fongiques (90) et se retrouve à faible stœchiométrie dans les cellules humaines (85,91). Bien que les rôles de H3K56ac demeurent à être élucidés, cette modification est impliquée chez la levure dans la stabilité génomique (92), le positionnement des chromosomes (93), la régulation de la transcription (94) et le maintien du réplisome en présence de stress répliatif (95). Néanmoins, l'un des rôles les mieux caractérisés de H3K56ac demeure son implication dans l'assemblage *de novo* des nucléosomes lors de la réplication de l'ADN.

Assemblage des nucléosomes de manière dépendante de H3K56ac

L'assemblage *de novo* des nucléosomes derrière les fourches de réplication se produit à la grandeur du génome par des processus couplés à la réplication de l'ADN qui nécessitent le recrutement de chaperonnes d'histones (96). Asf1 est la première chaperonne d'histone recrutée pour l'assemblage. Elle forme un hétérotrimère avec les histones libres H3-H4 et

permet notamment de présenter l'histone H3 nouvellement synthétisée à l'acétyltransférase Rtt109 (82,86). *RTT109* est lié génétiquement à un complexe Ub-ligase composé des gènes *RTT101*, *MMS1* et *MMS22* (97). Ces gènes codent pour le complexe Cul4 E3 Ub-ligase Rtt101-Mms1-Mms22, orthologue à Cul4A-DDB1 chez l'humain (98). Rtt101 entraîne l'ubiquitination des lysines 121, 122 et 125 à l'interface de H3K56ac près du site de liaison de la chaperonne Asf1, ce qui la déloge du dimère H3-H4 (98). Il est suggéré que Mms1 et Mms22 soient des adaptateurs de Rtt101 permettant la liaison du complexe aux histones H3-H4 et l'ubiquitination des histones H3 acétylées en K56 (98). La protéine d'échafaudage Rtt107 est également recrutée à la chromatine par Rtt109 et Rtt101 lors de la réponse aux dommages à l'ADN, mais de manière indépendante de H3K56ac (voir la section sur la régulation de Rad53) (99–101). Les histones H3-H4 sont transférées d'Asf1 vers deux autres chaperonnes d'histones, Rtt106 et CAF-1, qui vont déposer les dimères H3-H4 sur l'ADN nouvellement répliqué (82,102). H3K56ac augmente l'affinité de ces chaperonnes pour l'histone H3. Le complexe conservé CAF-1, formé des sous-unités Cac1 à 3, est recruté aux sites d'assemblage par sa liaison à PCNA (103) et aux chaperonnes Rtt106 et Asf1 pour l'assemblage *de novo* des nucléosomes (104). Rtt106 possède un domaine PH qui interagit avec H3K56ac dans la déposition de l'histone H3 (62). Il a été suggéré récemment que le complexe chaperonne FACT, composé des membres Spt16 et Pob3, pouvait interagir avec CAF-1 et Rtt106 dans la déposition de l'histone H3 acétylée lors du remodelage de la chromatine (105). La figure 2 illustre les principaux éléments impliqués dans l'assemblage des nucléosomes de manière dépendante de H3K56ac.

H3K56ac est une modification réversible dans le cycle cellulaire

Comme H3K56ac est une modification réversible (80), le retrait du groupement acétyle est régulé par des enzymes déacétylases suite à l'assemblage des nucléosomes. Les histones déacétylases Hst3 et Hst4 sont conservées dans de nombreux pathogènes (90,106) et possèdent des rôles redondants dans la déacétylation de H3K56 à travers le génome (80). Leur fonction est régulée de manière dépendante à la phase du cycle cellulaire (107). Hst3 est la première enzyme à déacétyler H3K56 en fin de phase S/début G2, tandis que Hst4 complète la déacétylation en début de phase G1 (80,108). Il a d'ailleurs été suggéré que Hst3 possédait un rôle dominant dans la déacétylation de H3K56, et que l'activité de Hst4 pouvait servir de

compensation en absence de Hst3 (107). L'expression de Hst3 est située en phase G2, suivie de sa dégradation subséquente durant la mitose ou en début de phase G1. L'expression de Hst4 se déroule peu après celle de Hst3, suivie de sa dégradation avant la réplication de l'ADN des cellules filles (107). L'activité de Hst3 et Hst4 régule plusieurs réponses cellulaires telles que la répression des gènes (108), la réponse aux dommages à l'ADN (109) et la durée de vie répllicative (110,111) par la déacétylation de H3K56. Comme mentionné dans la sous-section précédente, ces enzymes font partie de la classe III des HDAC, paralogue à l'enzyme Sir2 (112) et utilisant le NAD⁺ dans leur réaction catalytique (80,110). Compte tenu de leur similarité à Sir2 de la levure *S. cerevisiae*, cette classe est communément nommée SirTwo (sirtuines) et sera décrite en détail dans la prochaine sous-section.

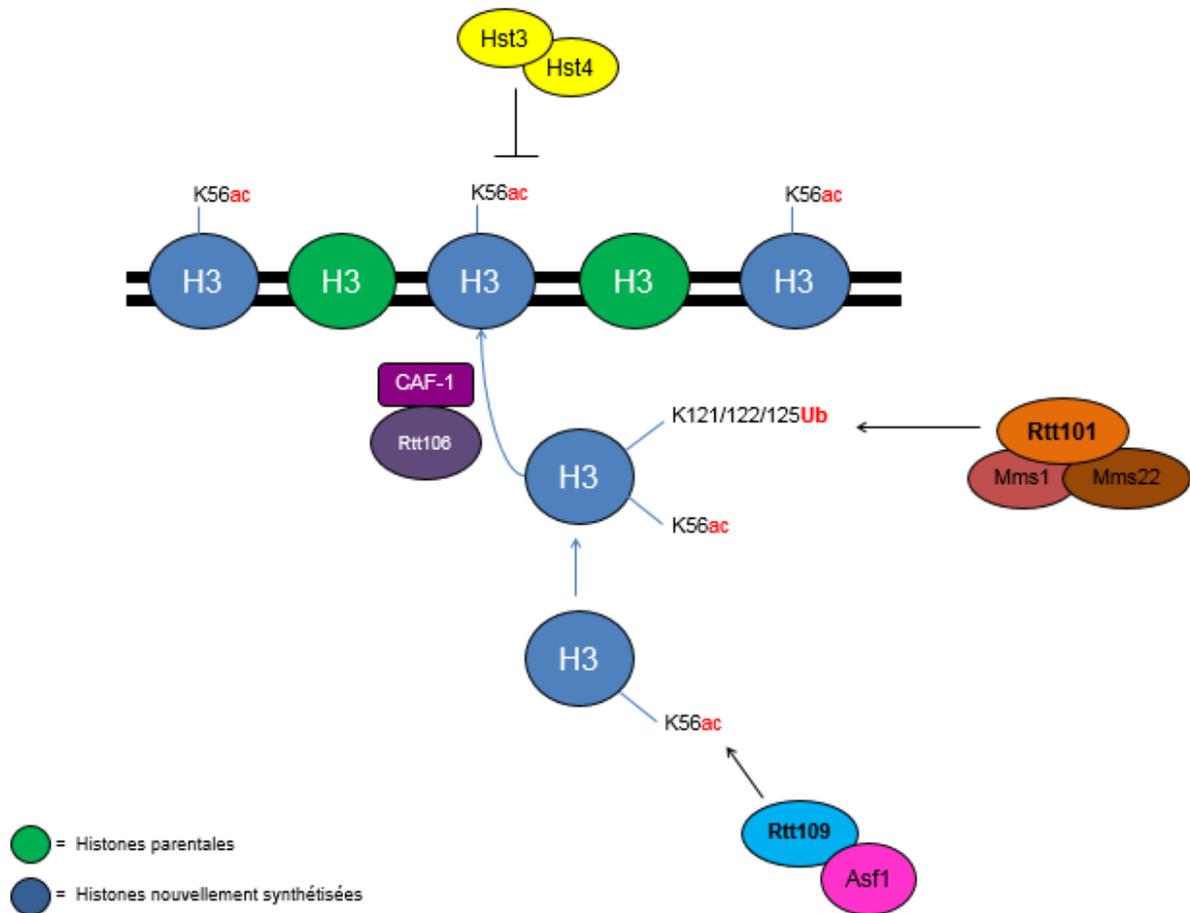


Figure 2 L'acétylation de la lysine 56 sur l'histone H3 et l'assemblage *de novo* des nucléosomes chez la levure *S. cerevisiae* (78,82,98,113)

Les déacétylases d'histones de la classe III, ou sirtuines

Les sirtuines sont une classe d'enzymes déacétylases conservées dans l'évolution, présentant une homologie à la protéine Sir2 chez *S. cerevisiae*, soit la première sirtuine qui fut identifiée (112). Le génome de la levure comporte cinq sirtuines : le membre fondateur *SIR2*, ainsi que les homologues à Sir2 *HST1* à *HST4* (112,114). Chez l'humain, le génome code pour sept sirtuines différentes partageant une fonctionnalité plus ou moins conservée de *S. cerevisiae*, soit les membres SIRT1 à SIRT7 (115). Ces enzymes, retrouvées également dans les eubactéries, pathogènes et eucaryotes (116), sont à la base de plusieurs voies cellulaires comme des processus métaboliques, la réplication et la réparation de l'ADN, l'expression des gènes ainsi que le vieillissement cellulaire (76,117,118).

Une réaction catalytique utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺)

Les sirtuines possèdent un mécanisme différent des autres classes de HDAC de la levure par l'utilisation du co-enzyme NAD⁺ dans leur activité catalytique. La déacétylation est produite par une réaction d'échange de bases (116) qui nécessite l'utilisation d'une molécule d'H₂O ainsi que du NAD⁺ (119). Le NAD⁺ se lie à une poche enzymatique conservée des sirtuines nommée la poche de liaison au nicotinamide (Nicotinamide-binding pocket, ou NBP), situé près de la partie ADP-ribose de l'enzyme (118,120,121). Le mécanisme principal de l'échange entre le NAD⁺ et la lysine acétylée de la protéine cible demeure à être élucidé, bien que plusieurs modèles soient proposés dans la littérature¹ (116,119,122). Toutefois, il est connu que cette réaction hydrolyse la lysine acétylée de la protéine cible et entraîne la formation de deux sous-produits : le nicotinamide (NAM) relâché par attaque nucléophile du NAD⁺ ainsi que l'O-acétyl ADP-ribose (OAADPr), un métabolite relâché en conformations² 2' et 3' (112,118,123). Le nicotinamide relâché agit comme inhibiteur physiologique de l'activité des sirtuines (124,125); cette molécule d'intérêt reviendra d'ailleurs dans ce mémoire.

¹ Pour simplifier la figure 3, la réaction n'est seulement représentée que par une flèche (NAD⁺ vers NAM).

² La forme 2' O-acétyl ADP-ribose est représentée en figure 3.

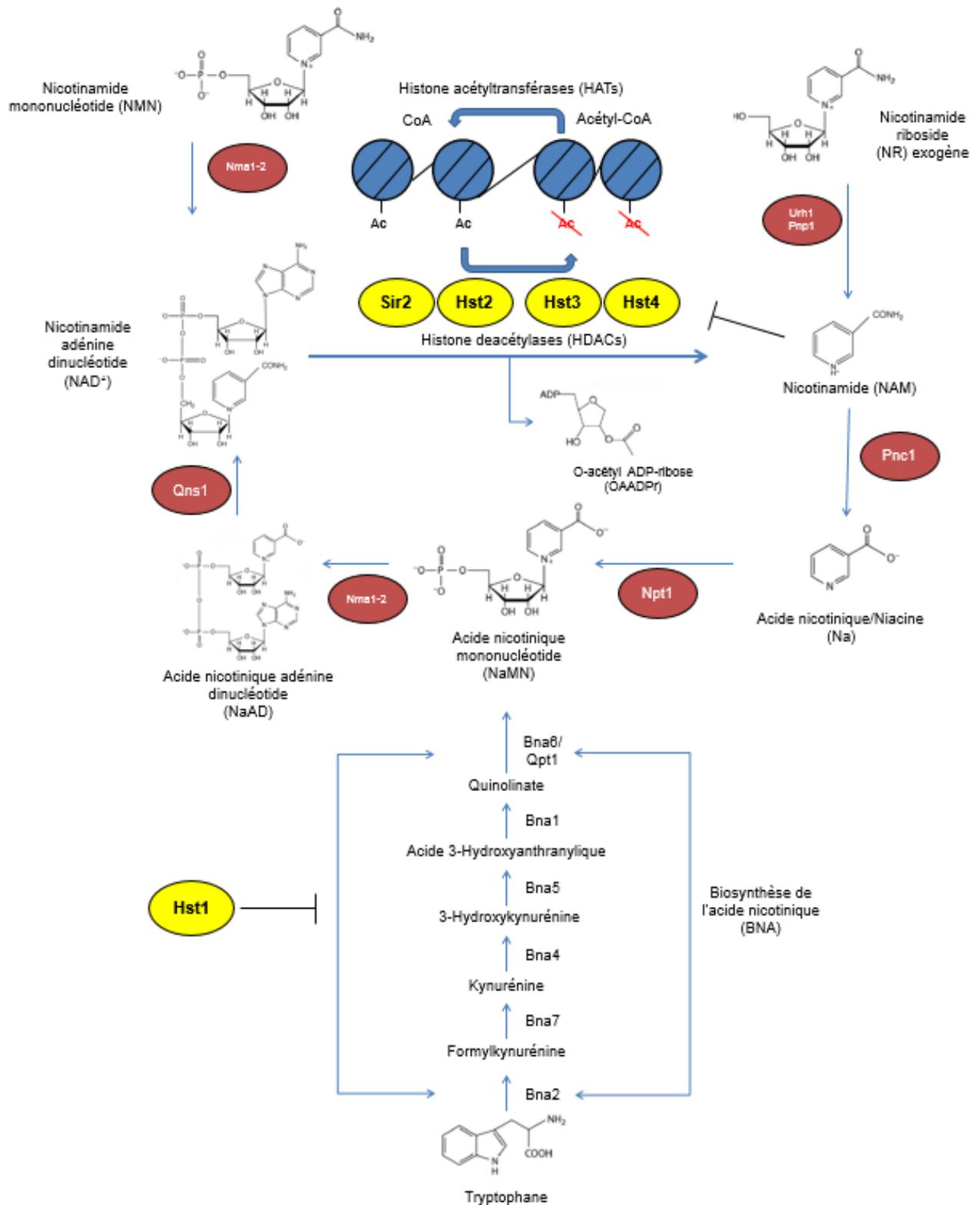


Figure 3 Schématisation de la biosynthèse du NAD⁺ et mécanisme d'action global des sirtuines (118,122,126–128)

Le NAM, ainsi que le NAD⁺, est synthétisé et recyclé par la cellule. Plusieurs voies de biosynthèse du NAD⁺ sont présentes chez *S. cerevisiae* : la voie exogène passant soit par la synthèse du nicotinamide mononucléotide (NMN) ou de l'acide nicotinique (Na), ce dernier comprenant le NAM comme intermédiaire, ainsi que la synthèse *de novo* passant par la conversion du tryptophane en NaMN (116,122). Bien que ces voies ne soient pas détaillées dans ce mémoire, les différentes molécules intermédiaires ainsi que les enzymes de conversion chez la levure *S. cerevisiae* ont été incluses dans la figure 3 à la page précédente. Les prochaines sous-sections exploreront le rôle des sirtuines autres que Hst3 et Hst4, soit les sirtuines Sir2, Hst1 et Hst2.

Rôle de l'histone déacétylase Sir2

La protéine Sir2 de la levure *S. cerevisiae* est le membre fondateur de la famille des sirtuines, où elle fut identifiée pour son rôle dans la répression génique (Silent Information Regulator, ou *SIR*) (112). Elle régule la propagation de la chromatine silencieuse au niveau du locus d'accouplement *HMRA* et *HMLα* (mating loci) et la recombinaison de l'ADN ribosomal (ADNr) par répression des gènes (silencing) à ces régions (114,129). Sir2 forme un complexe aux nucléosomes avec les membres Sir3 et Sir4, soit l'holocomplexe SIR (130,131), et son rôle repose sur la déacétylation des queues N-terminale des histones le long de la chromatine (76). Sir2 déacétyle la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16), et agit ainsi de manière opposée à l'HAT Sas2 (69). H4K16ac permet l'accessibilité aux membres Sir2 et Sir4 à la chromatine, et sa déacétylation par Sir2 engendre la formation du complexe SIR qui s'étale sur les histones H4 (76,132). Ce complexe est recruté au locus d'accouplement par interaction avec l'ORC de la réplication et les protéines Rap1-Abf1 (133). Comme mentionné à la sous-section précédente, Sir2 est une histone déacétylase qui utilise le NAD⁺ dans sa réaction catalytique (134). Le 2' O-acétyl ADP-ribose, l'un des sous-produits de la réaction, peut aussi affecter la formation et la fonctionnalité de l'holocomplexe SIR à la chromatine hypoacétylée (131).

L'activité de Sir2 influence la durée de vie répllicative en modulant l'effet de la restriction calorique (117) et en limitant le niveau de recombinaison entre répétitions de l'ADN ribosomal (ADNr) (135). Sir2 est recruté au locus de l'ADNr sous la forme d'un autre complexe répresseur composé des membres Net1 et Cdc14, soit le complexe RENT (130).

Celui-ci déacétyle les histones entourant les séquences répétitives de l'ADNr et empêche l'engagement des polymérase d'ARN sur leurs promoteurs (136). La propagation de la chromatine silencieuse à l'ADNr empêche notamment la formation d'ADNr circulaire extrachromosomale (ERC) qui est reliée au vieillissement cellulaire (137,138). Il fut suggéré que Hst3 et Hst4 possédaient des rôles opposés à Sir2 dans le silencing en limitant son accès à la chromatine active par la déacétylation de H3K56 (108). La plupart de ces informations sont notées dans le tableau 1 à la page suivante.

Rôle de l'histone déacétylase Hst1

Hst1 est une déacétylase qui partage la plus grande similarité de séquence avec Sir2, mais possède toutefois des fonctions différentes (139,140). Hst1 forme un complexe avec les facteurs Sum1 et Rfm1 dans la répression transcriptionnelle de gènes par déacétylation de leurs promoteurs (141,142). Certains gènes réprimés par ce complexe influencent la sporulation mitotique (142), la biosynthèse du NAD⁺ (voir figure 3) (143) et la biosynthèse de la thiamine (144). Il fut récemment identifié que Hst1, Sum1 et Sir2 pouvaient réprimer des gènes impliqués dans la glycolyse et dans la fermentation du glucose (145). Comme Hst1 ne possède aucun site de déacétylation précis (tableau 1) et une affinité moindre pour le NAD⁺ (143), elle peut déacétyler plusieurs résidus cibles, dont ceux près des gènes *THI* impliqués dans la biosynthèse de la thiamine (144). La plupart de ces informations sont notées dans le tableau 1 à la page suivante.

Rôle de l'histone déacétylase Hst2

Contrairement aux autres sirtuines de la levure, Hst2 possède un signal d'exportation nucléaire qui médie sa localisation dans le cytosol (146). Cette séquence, riche en leucines, interagit avec l'exportine Crm1 qui permet son exclusion nucléaire (147). Malgré le fait que son rôle cytosolique soit nébuleux, il fut suggéré que Hst2 interagisse avec une autre déacétylase, Hos2, dans la régulation spatiale de protéines pour la croissance cellulaire (148). De plus, elle peut déacétyler H4K16, et influencer le vieillissement cellulaire et la stabilisation de l'ADNr en absence d'activité de Sir2 (146,149). Une surexpression du gène de *HST2* influence le niveau de répression à l'ADNr et aux télomères en absence ou en présence de Sir2 (146), ce qui suggère que les rôles nucléaires de Hst2 chevauchent partiellement ceux de Sir2. La plupart de ces informations sont notées dans le tableau 1 à la page suivante.

Tableau 1 Liste et fonctionnalité des sirtuines de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (69,76,80,146)

Nom	Poids moléculaire (kDa)	Fonctions	Site de déacétylation cible	Partenaires d'interaction
Sir2	63,2	Silencing de l'ADNr et du mating loci, rôle dans la restriction calorique	Lysine 16 de l'histone H4	Sir3 Sir4 Net1 Cdc14
Hst1	57,7	Régulation de la sporulation, de la biosynthèse de la thiamine et du NAD ⁺	Inconnue	Sum1 Rfm1
Hst2	39,9	Rôle cytosolique, déacétylation de H4K16 en absence de Sir2	Lysine 16 de l'histone H4	Crml Hos2
Hst3	50,5	Déacétylation de H3K56 en phase G2/M	Lysine 56 de l'histone H3	-
Hst4	41,7	Déacétylation de H3K56 en phase G1	Lysine 56 de l'histone H3	-

Que se passe-t-il en absence d'activité des sirtuines?

Comme les sirtuines régulent plusieurs voies cellulaires chez la levure *S. cerevisiae*, l'absence de leur activité entraîne de sévères phénotypes qui affectent la croissance cellulaire (112). La délétion de *SIR2*, représentée par le mutant *sir2Δ*, entraîne une courte durée de vie répllicative (137) et de l'hyper-recombinaison au niveau de l'ADNr (135). Un mutant *hst1Δ* présente une augmentation de transcription des gènes de sporulation (141) et de la concentration intracellulaire en NAD⁺ (143). Bien qu'aucun phénotype n'ait été rapporté pour la mutation *hst2Δ*, la délétion de *HST2* en combinaison avec le mutant *sir2Δ* affecte les niveaux de recombinaison de l'ADNr et l'effet de la restriction calorique (149). Dans la prochaine section, nous parlerons en détail des effets produits par la double mutation des gènes *HST3* et *HST4* de la levure, représentée par *hst3Δ hst4Δ*.

Importance génétique de *HST3* et *HST4* dans la déacétylation de H3K56

Bien que les simples mutations *hst3Δ* ou *hst4Δ* n'aient pas d'effet sur la viabilité cellulaire (80,107), l'absence combinée de ces gènes non essentiels de la levure cause d'importants phénotypes. Le double mutant *hst3Δ hst4Δ* induit une hyperacétylation de H3K56 qui persiste sur les histones parentales et nouvellement synthétisées au cours des divisions cellulaires (80,109). L'inactivation seule de Hst3 élève les niveaux de H3K56ac de 50% en phase G2, tandis que l'inactivation de Hst4 présente peu de H3K56ac due à la présence de Hst3 (80). L'hyperacétylation de H3K56 entraîne plusieurs défauts de croissance cellulaire, notamment une thermosensibilité (80), une courte durée de vie répliative (112,150), une perte d'hétérozygotie lors du vieillissement cellulaire (110), des réarrangements chromosomiques (151,152), l'apparition de dommages spontanés à l'ADN (109), une élévation de la recombinaison à l'ADNr (153) ainsi qu'une sensibilité accrue aux agents génotoxiques comme l'hydroxyurée (HU) ou le méthanesulfonate de méthyle (MMS) (60,154). Le MMS est un agent qui modifie la guanine (7-méthyleguanine) et l'adénine (3-méthyleadénine) de l'ADN par alkylation, ce qui cause des défauts de réplication et l'apparition de bris cytotoxiques par la présence de sites abasiques (155,156). À l'inverse, l'absence d'acétylation de H3K56 peut entraîner une hypersensibilité de la cellule à des agents génotoxiques comme le MMS ou la camptothécine (CPT) (78,157), une incapacité à compléter la réplication de l'ADN et la formation de foyers de recombinaison intranucléaires (154). Cela suggère que les cycles d'acétylation et de déacétylation de H3K56 doivent être régulés pour le maintien de l'intégrité génomique.

Comme *HST3* et *HST4* sont des gènes non essentiels, le double mutant *hst3Δ hst4Δ* accumule éventuellement des mutations qui permettent aux cellules de s'adapter à l'hyperacétylation de H3K56 et de faciliter la croissance cellulaire (109). Le double mutant *hst3Δ hst4Δ* présente une létalité synthétique en combinaison avec des mutations de gènes inclus dans la réplication de l'ADN (*POL32*, *DIA2*) (158), dans les voies de signalisation (*SLX4*, *MRC1*) (109) ainsi que *sir2Δ*, celui-ci par des mécanismes mal compris (60,112). La plupart des phénotypes de ce double mutant peuvent être résolus par des mutations qui préviennent l'acétylation de H3K56, comme la délétion du gène de l'acétyltransférase *RTT109* ou la mutation de la lysine 56 pour une arginine non acétylable *H3K56R* (80,157), suggérant

qu'ils sont causés en partie par l'hyperacétylation de H3K56. De plus, certaines mutations aux gènes encodant les histones ou divers éléments de la voie de réponse aux dommages à l'ADN peuvent influencer les phénotypes d'hypersensibilité de *hst3Δ hst4Δ*. Par exemple, la mutation de gènes comme *RAD24* ou *RAD9* améliore la croissance du double mutant (109) et des mutations d'histones *H4K16R* ou *H3K79R*, qui abolissent leurs MPTs respectives, réduisent le niveau de thermosensibilité du double mutant *hst3Δ hst4Δ* (60). Ces résultats suggèrent que l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN pourrait contribuer aux phénotypes des cellules présentant une hyperacétylation de H3K56. Les prochaines sections s'attarderont aux diverses voies de réponses et de réparation de l'ADN chez la levure *S. cerevisiae*, et établiront un lien avec l'altération de la chromatine lors d'instabilité génomique.

Voies de réponse aux dommages à l'ADN lors de stress réplcatif

Les dommages à l'ADN peuvent être causés de manière endogène ou par des agents génotoxiques (environnementaux, cliniques, etc.) qui influencent la progression du cycle cellulaire. Afin de répondre au stress génotoxique, les cellules eucaryotes utilisent des réseaux de signalisation, que l'on nomme les points de contrôle (checkpoint) dans le but de préserver l'intégrité génomique. Trois points de contrôle peuvent être déclenchés dans le cycle cellulaire : celui en G1/S, celui en phase intra-S qui vise les défauts de réplication de l'ADN, et celui en G2/M qui prévient la ségrégation de chromosomes défectifs (159,160). Dans le cadre de ce mémoire, nous discuterons des points de contrôle intra-S.

La phase S détient un point de contrôle important, car les fourches de réplication sont sensibles aux dommages à l'ADN. Cette vulnérabilité peut conduire à des cassures double-brins à l'ADN (DSBs) ainsi que des mutations transmises d'une génération à l'autre, ce qui est cause d'instabilité génomique (161). Les défauts de réplication mènent à des réarrangements chromosomiques ou encore à une augmentation de la synthèse de dNTPs (162,163). Le checkpoint intra-S chez les eucaryotes enclenche une cascade de signalisation qui inhibe la progression de la cellule en phase S jusqu'à la réparation des lésions à l'ADN. Compte tenu de leur nature, ces lésions peuvent solliciter différentes voies de réponse aux dommages à l'ADN. Les paragraphes suivants effectuent un survol de ces mécanismes conservés chez la levure *S. cerevisiae*.

Cascade de signalisation menant à l'activation de la kinase Rad53

Le rôle global de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (RDA) est l'activation d'une cascade de signalisation par phosphorylation de substrats, dans le but de ralentir la progression du cycle cellulaire de manière à réparer les dommages induits au génome (164). Le détecteur principal du stress répliatif est l'ADN simple-brin, qui est généré par le découplage de l'hélicase MCM et des polymérases répliatives, ainsi que par la résection 5'-3' de l'extrémité d'un DSB (165,166). Ceux-ci permettent la liaison de senseurs sur l'ADN, soit le complexe RPA impliqué à la répliation de l'ADN (32). La présence de dommages augmente le niveau d'ADN simple-brin ainsi que celui de RPA, ce qui donne lieu au recrutement de kinases pour activer la cascade de signalisation (167). Chez la levure, les DSBs entraînent l'activation de deux kinases qui appartiennent à la famille des phosphoinositide (PI) 3-kinases conservées dans l'évolution, soit Mec1 et Tel1 (168). Elles mènent à l'activation de deux kinases effectrices dans la RDA dont Rad53, l'homologue de CHK2 humain, ainsi que Chk1 (168).

Mec1 est l'homologue direct de la protéine ATR, qui s'active à l'ADN simple-brin par interaction avec la protéine Ddc2 qui elle-même interagit avec le complexe RPA (167), ainsi qu'avec le facteur de répliation Dpb11 près des sites de lésions (169). Tout comme ATR chez l'humain, la kinase Mec1 phosphoryle divers transducteurs de la RDA dont entre autres l'histone H2A, le PCNA alternatif, la protéine du réplisome Mrc1 et la protéine adaptatrice Rad9. La phosphorylation de l'histone H2A est l'une des premières modifications à la chromatine en réponse aux dommages à l'ADN. Mec1 et Tel1 phosphorylent le domaine C-terminal de H2A à la sérine 128 (H2A S128P), ce qui induit la forme modifiée γ H2A (170). Elle facilite le recrutement d'éléments de la RDA, dont des remodeleurs de la chromatine et des protéines adaptatrices (170,171). Le PCNA alternatif (ou 9-1-1 clamp) est un anneau hétérotrimérique formé des membres Ddc1, Rad17 et Mec3, qui est homologue de structure à PCNA (172). Il est chargé aux jonctions d'ADN simple-brin par le complexe d'ancrage RFC-Rad24 (37,172). Mec1 phosphoryle la sous-unité Ddc1, ce qui permet le recrutement de Dpb11 aux sites de lésions pour l'activation de kinases subséquentes, dont celle de Mec1 (169,173,174). En plus de son rôle au réplisome, Mrc1 est impliqué dans l'activation de la kinase Rad53 et régule la réparation de l'ADN de manière spatio-temporelle (175,176). Elle

permet la cohésion des chromatides sœurs pour faciliter la réparation de l'ADN (177) et la stabilisation des fourches de réplication par interaction avec la sous-unité Mcm6 (178) et le complexe Csm3-Tof1 en réponse au HU (179). Rad9 est l'homologue de séquence à 53BP1 humain qui permet l'activation de la kinase Rad53 via phosphorylation par Mec1 (180). Cette protéine adaptatrice possède deux sites de recrutement à la chromatine endommagée, soit γ H2A par son domaine de liaison à la phosphorylation BRCT2, ainsi que H3K79me3 par son domaine de liaison à la méthylation Tudor-2 (171,181). Rad9 est épistatique à la méthyltransférase Dot1 dans la RDA, et cette dernière enzyme est donc indirectement impliquée dans l'activation de la kinase Rad53 en présence de stress réplcatif (182,183). Malgré la présence de ces deux sites de liaison, H3K79me3 et H2A S128P n'agissent pas de façon redondante dans le mécanisme d'action de Rad9, chacun contribuant à son recrutement à la chromatine (181).

Tel1 est l'homologue direct de la protéine ATM qui, contrairement à Mec1, est recruté aux DSBs non résectés par le complexe MRX. Ce complexe hétérotrimérique, composé de Mre11, Rad50 et Xrs2, est lié aux DSBs et entraîne l'activation de la kinase Tel1 et l'enclenchement de la RDA (184). Mre11 forme un complexe avec Tel1, qui agit en parallèle avec Ddc2-Mec1 pour l'activation de la kinase Rad53 par l'adaptateur Rad9 à différents stades du cycle cellulaire (phase M et phase S, respectivement) (185). En phase S, Tel1 est toutefois moins efficace dans l'activation de Rad53 en l'absence de Mec1 (185,186), ce qui suggère que la voie de réponse intra-S dépend davantage de la kinase Mec1 que Tel1.

Activité de la kinase Rad53/CHK2 lorsque phosphorylée

La kinase Rad53, lors de son activation, entraîne la phosphorylation d'une multitude de substrats de la RDA, dont sa propre auto-phosphorylation et agit à différentes étapes du cycle cellulaire (159,187). L'activité de Rad53 peut retarder la progression du cycle cellulaire par l'inhibition des fourches tardives, ce qui donne le temps pour la réparation de l'ADN. En point de contrôle intra-S, Rad53 inhibe les voies dépendantes des CDKs et DDKs durant la réplication, soit par la phosphorylation des protéines Dbf4 (voie DDK) et Sld3 (voie CDK) (188). La phosphorylation du domaine C-terminal de Sld3 par Rad53 bloque son interaction avec Dbp11 et Cdc45 aux origines tardives, tandis que celle de Dbf4 empêche l'activation de l'hélicase MCM par le complexe Dbf4-Cdc7 (188,189). Rad53 active également la kinase

Terminaison de la cascade de signalisation de la kinase Rad53

Dans le but de restaurer la progression dans le cycle cellulaire suite à l'activation de la RDA, la kinase Rad53 doit passer par un cycle de désactivation qui résulte à sa déphosphorylation (196). Il fut suggéré que la kinase Cdc5 soit impliquée dans la diminution du niveau d'hyperphosphorylation de Rad53 pour l'adaptation au point de contrôle intra-S (197). Chez la levure, l'activité de Rad53 est régulée par des protéines qui atténuent son signal ou des phosphatases qui entraînent sa déphosphorylation (198,199). Ces voies, représentées par les protéines Slx4 et Pph3 respectivement, feront l'objet de la prochaine sous-section.

Les protéines Slx4 et Pph3 sont impliquées dans l'atténuation de la voie d'activation de Rad53

Chez la levure, la protéine d'échafaudage Slx4 régule l'activation de la kinase Rad53 ainsi que les événements de recombinaison homologue. Au cours de la recombinaison homologue, Slx4 est phosphorylée par la voie Mec1-Cdk1 et interagit avec Dpb11 pour recruter le complexe Mus81-Mms4 aux jonctions d'Holliday, mécanisme qui sera détaillé dans la prochaine section (200,201). Un autre rôle de Slx4 est d'atténuer l'activation de la kinase Rad53 en formant un complexe avec la protéine d'échafaudage Rtt107, qui inhibe de manière compétitive la liaison de Rad9 à γ H2A et prévient l'arrêt prolongé du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN (199,202). Rtt107 est recrutée à plusieurs facteurs durant la phase S, dont Slx4 et le complexe Ub-ligase Rtt101 à la chromatine (100,203). Son interaction avec Slx4 médie sa phosphorylation par Mec1 (204), et le complexe Slx4-Rtt107 se localise aux fourches de réplication grâce à la phosphorylation de Slx4 qui est reconnue par le domaine BRCT de Dpb11 (202,205). Les domaines BRCT en C-terminal de Rtt107 se lient donc à la phosphorylation de l'histone H2A, ce qui empêche la liaison de Rad9 et l'activation de Rad53 (205,206). Slx4 est une protéine conservée chez l'humain. Son homologue direct, l'endonucléase SLX4, possède des caractéristiques similaires comme la résolution des jonctions d'Holliday en interagissant avec le complexe MUS81-EME1 et TopBP1, l'homologue de Dpb11 (207,208).

Pph3 est une sous-unité catalytique du complexe phosphatase PP4 de la levure avec les sous-unités Psy2 et Psy4 (209,210). Pph3, en complexe avec Psy2, permet la

déphosphorylation de la kinase Rad53 (198) et γ H2A en réponse au MMS (211). Psy4 n'est toutefois pas impliquée dans la déphosphorylation de Rad53, mais uniquement γ H2A, ce qui la sépare mécaniquement des autres sous-unités (198). Le complexe PP4 est conservé chez l'humain et présente des rôles dans la déphosphorylation de γ H2AX comme pour la levure (212), mais aussi de protéines impliquées à la recombinaison homologue (213,214). D'autres complexes phosphatases participent à la déphosphorylation de Rad53 chez *S. cerevisiae*. La phosphatase Glc7, membre du complexe PP1, atténue l'activité de Rad53 et la phosphorylation de H2A en réponse à une déplétion de dNTP par le HU (215). Les protéines phosphatases PP2C, soit Ptc2 et Ptc3, peuvent déphosphoryler Rad53 en réponse à une durée prolongée d'un DSB (216). Cela suggère que Rad53 peut être modulée par différentes phosphatases spécifiques selon le type de perturbation génomique (217). En somme, Slx4 et Pph3 possèdent des rôles importants dans la régulation de la kinase Rad53. Les mutants *slx4* Δ et *pph3* Δ présentent une létalité synthétique en absence d'éléments régulateurs de la RDA et parviennent difficilement à compléter la phase S lors de stress réplcatif induit par le MMS (196,200). Comme la kinase Mec1 régule le recrutement du complexe Slx4-Rtt107 et de la phosphatase PP4 dans la cascade de signalisation, cela suggère que ces composantes soient importantes dans l'atténuation de la RDA (206,218). La figure 5 schématise les voies de régulation de la kinase Rad53 présentées dans cette sous-section.

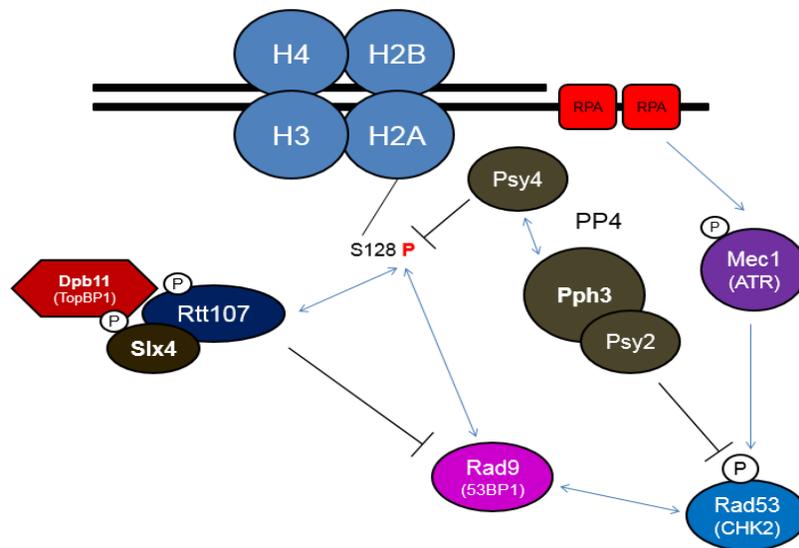


Figure 5 Régulation de la voie d'activation de la kinase Rad53 par les complexes Slx4-Rtt107 et PP4 (195,206,218)

Réparation des bris double-brins par la recombinaison homologue (RH)

La recombinaison homologue (RH) est un mécanisme permettant la réparation de lésions à l'ADN durant la réplication sans engendrer de mutations dans le génome. Principalement élucidé chez la levure *S. cerevisiae*, ce mécanisme est conservé au cours de l'évolution. La RH requiert une région d'homologie dans une chromatide sœur, servant de matrice de synthèse pour la réparation (219). Ce mécanisme est précisément régulé, car la RH inapproprié peut entraîner de l'instabilité génomique chez les eucaryotes (220). Pour débiter, le complexe MRX se lie aux extrémités d'une cassure double-brin et mène à la résection nucléolytique 5'-3' pour générer de l'ADN simple-brin, ce qui recrute le complexe RPA (221,222). L'extrémité 3' simple-brin initie alors la recherche de régions d'homologie sur la chromatide sœur à l'aide de protéines recombinases. Chez la levure, ces protéines font partie de la famille épistatique *RAD*, dont il sera question dans la prochaine sous-section.

Implication des protéines *RAD* dans la recombinaison homologue

L'invasion de l'ADN simple-brin en 3' constitue la première étape de la recombinaison homologue. La protéine recombinase Rad51 recouvre l'ADN simple-brin, ce qui forme le filament pré-synaptique, et s'apparie à la matrice homologue (223). Pour initier ce mécanisme, la recombinase médiatrice Rad52 déloge le complexe RPA présent sur l'ADN simple-brin et médie la formation des filaments nucléoprotéiques Rad51 par leur oligomérisation sur l'ADN simple-brin (224,225). L'hétérodimère Rad55-Rad57, qui est recruté simultanément avec Rad52, stimule cet échange et stabilise les filaments pré-synaptiques (226). Ceux-ci enclenchent la synapse et l'invasion simple-brin en formant une boucle en D sur la matrice homologue, ce qui produit une première jonction d'Holliday (JH) (227). Lors du croisement, la recombinase Rad54 et son ATPase Rdh54 sont recrutés pour l'extension de l'hétéroduplex d'ADN et la translocation des filaments nucléoprotéiques Rad51, ce qui contrôle l'invasion simple-brin (228–230). Dans le modèle classique de RH, la polymérisation de l'interstice entre la résection et le DSB entraîne la formation d'une deuxième jonction d'Holliday. Pour d'autres voies alternatives à la RH, l'invasion peut se faire d'un seul côté, comme c'est le cas pour la voie de synthèse par réassociation des brins (SDSA) (219,231). L'appariement des ADN simple-brins (SSA) est une autre variante de RH qui se produit indépendamment de la

formation de filaments pré-synaptiques (232). La figure 6 présente un résumé de la RH et ses principaux éléments régulateurs qui seront détaillés dans la prochaine sous-section.

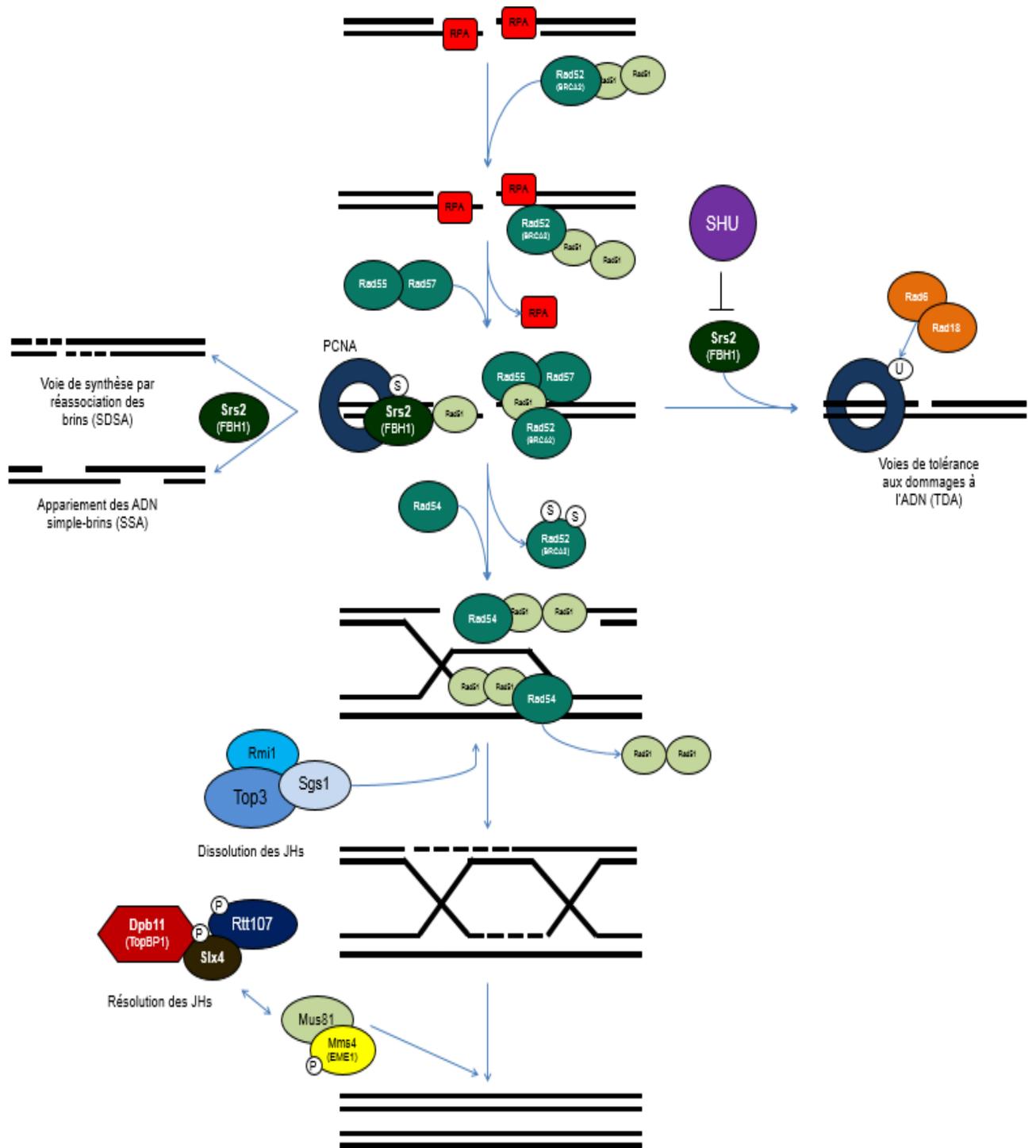


Figure 6 Schéma de la voie de réparation par recombinaison homologe en présence de brins double-brins et facteurs de recombinaison impliqués (175,201,219,233)

Régulation de la recombinaison homologue

Dans le but de compléter la réplication de l'ADN, les événements de RH doivent être régulés de manière efficace. La recombinaise Rad52 est SUMOylée en réponse au stress réplicatif par la SUMO-ligase Siz2 (234), au même titre que la sous-unité de RPA Rfa1 (235). Cette SUMOylation module les niveaux de recombinaison : dans le cas de Rad52, elle pourrait réguler l'accumulation des filaments Rad51 sur l'ADN invasif (236,237). Autre que cette MPT, les jonctions d'Holliday reliant les chromatides sœurs peuvent être séparées dans la régulation des événements de RH. Chez la levure *S. cerevisiae*, deux hélicases 3'-5' sont identifiées dans la régulation de ces structures, soit Sgs1 et Srs2, ainsi que le complexe endonucléase Mus81-Mms4 qui est associé à la protéine Slx4 (238,239). Leurs rôles respectifs dans le traitement des intermédiaires de RH seront détaillés dans les prochaines sous-sections.

Complexes de résolution impliqués dans le traitement des intermédiaires de recombinaison

L'hélicase Sgs1 forme un complexe impliqué dans la dissolution des JHs avec la topoisomérase III Top3 et le membre Rmi1 (240-242). Dans ce complexe, Sgs1 permet le déroulement de l'ADN double-brin pour former des structures simple-brins qui sont maintenues par le complexe RPA (243). Suite à la formation de ces structures, Top3 maintient l'ouverture et permet le passage du brin d'ADN pour la dissolution des intermédiaires. Rmi1 stimule la décaténation de l'ADN et stabilise l'état d'ouverture de Top3 avec l'ADN (243). L'interaction Sgs1-Top3 possède aussi un autre rôle dans la rupture des filaments nucléoprotéiques de Rad51 lors de l'invasion simple-brin (244,245). Autre que son rôle dans l'atténuation du signal de la kinase Rad53, Slx4 forme des complexes endonucléases pour la résolution de structures de recombinaison, semblable à son homologue chez l'humain (207). Slx4 interagit avec le complexe Rad1-Rad10 dans la résolution du SSA (200), avec Slx1 dans la stabilisation de l'ADNr (246) et avec le complexe Mus81-Mms4 dans la résolution des JHs (201). Durant la mitose, Mms4 est phosphorylée par la polo-kinase Cdc5, ce qui permet son association avec l'endonucléase Mus81 (201,247). La phosphorylation de Slx4 et son recrutement à Dpb11 médie l'interaction avec ce complexe endonucléase, où ce dernier reconnaît spécifiquement les JHs formées lors de la recombinaison homologue (201,248). Comme l'activation de la RDA empêche la formation de ce complexe, cela suggère que les

rôles de Slx4 lors de la RH se distinguent de ceux mis en cause dans l'inhibition de Rad9 (201). La dernière partie de la figure 6 illustre l'implication de ces complexes de résolution aux intermédiaires de RH.

Activité de l'hélicase Srs2 lors de la recombinaison homologue

Srs2 est une anti-recombinase impliquée dans la réparation de l'ADN, où elle possède trois fonctions différentes pour inhiber les événements de RH (249,250). Son activité hélicase permet de dérouler l'ADN lors de l'invasion simple-brin par une polarité 3'-5' en proximité des nucléofilaments de Rad51, ce qui requiert son activité ATPase (251,252). Son activité translocase désassemble les filaments pré-synaptiques Rad51 par un déplacement 3'-5' sur l'ADN simple-brin, et donc empêche l'initiation de la RH (253,254). Srs2 est recrutée aux fourches de réplication durant la phase S par interaction avec la SUMOylation de PCNA à la lysine 164 (255,256). Celle-ci permet de réguler Srs2 au point de contrôle intra-S, soit par l'adaptation à la RDA en retardant les événements de RH lors de l'activation de la kinase Mec1 (257,258). Sa liaison à la SUMOylation de PCNA permet notamment de diriger la réparation post-répllicative vers la RH (voir dans la prochaine section) (259,260) ainsi que médier la réparation de l'ADN par des voies alternatives à la RH, comme le SDSA et le SSA (261,262). Toutefois, Srs2 est recrutée à des sites de recombinaison indépendamment de PCNA SUMOylé lorsqu'elle désassemble des filaments Rad51 placés de façon aberrante sur l'ADN (263). En plus de son homologie aux hélicases bactériennes UvrD et PcrA, deux homologues de fonction chez l'humain sont connus pour Srs2 (249). La protéine FBH1 fut caractérisée pour sa capacité à se lier à RAD51 et d'inhiber la formation de structures de recombinaison (264), tandis que la protéine PARI fut récemment découverte pour sa fonction anti-recombinase médiée par sa liaison à la SUMOylation de PCNA (265).

En somme, l'anti-recombinase Srs2 agit comme mécanisme de contrôle de la RH et possède des rôles antagonistes avec Rad52 pour la formation de filaments pré-synaptiques Rad51 (266). Certains éléments régulateurs peuvent moduler l'activité de Srs2. La protéine de contrôle Esc2, en interaction avec la nucléase Exo1, empêche son recrutement aux fourches de réplication précoces (267). Le complexe SHU, composé des gènes non essentiels *CSM2*, *PSY3*, *SHU1* et *SHU2*, est un régulateur de la RH et favorise la formation d'intermédiaires par

l'inhibition de Srs2 (268,269). Un mutant *srs2Δ* présente de l'hyper-recombinaison spontanée (270), une plus grande fréquence en foyers de recombinaison Rad51 et Rad54 (266) et une courte durée de vie répllicative (271). Comme ce mutant s'avère létal en absence de gènes régulateurs tels que *SGS1*, *MRC1* ou *RAD54*, cela suggère que Srs2 soit importante dans le maintien de l'intégrité génomique (256,272,273). La figure 6 illustre quelques rôles de Srs2 aux filaments nucléoprotéiques de Rad51.

Voies de tolérance aux dommages à l'ADN : la réparation post-répllicative

L'ADN non répliqué qui demeure derrière les fourches de réplication peut mener à la réparation post-répllicative (RPR), située en fin de phase S/début G2, qui utilise des voies de tolérance aux dommages à l'ADN (TDA). La TDA, qui reconnaît majoritairement des bases modifiées à l'ADN, ne permet pas de réparer mais plutôt de tolérer ces mutations, dans le but de recharger rapidement les polymérase répllicative sur l'ADN et finaliser la réplication (274,275). Par son interactome, le PCNA fonctionne comme un tableau de bord dans la coordination de ces événements. Les MPTs de PCNA en fin de phase S/début G2 constituent l'élément déclencheur de la TDA chez les eucaryotes (276,277). La mono-ubiquitination de la lysine 164 de PCNA enclenche la polymérisation de translésion (TLS), qui fait usage de polymérase à potentiel mutagène, et sa poly-ubiquitination subséquente enclenche le changement de matrice (TS), analogue à la réparation par RH (278). Comme mentionné à la section précédente, PCNA peut être SUMOylé à cette même lysine par la SUMO-ligase Siz1, qui recrute l'hélicase Srs2 pour médier les événements de RH vers la RPR (259,279), suggérant un lien direct entre ces MPTs. Les prochaines sous-sections détailleront ces mécanismes conservés chez la levure *S. cerevisiae*.

Voie de tolérance avec erreurs : la polymérisation de translésion (TLS)

La polymérisation de translésion (translesion synthesis, ou TLS) est un mécanisme de TDA qui utilise des polymérase alternatives pouvant accommoder des bases modifiées dans leur site catalytique. Chez les eucaryotes, la famille de polymérase Y peut générer leurs propres bases pour l'élongation. Contrairement à la famille B répllicative, la famille Y est

défaillante en activité exonucléase et ne peut relire de mauvaises insertions de bases, ce qui diminue leur niveau de fidélité (280). Chez la levure, le TLS est initié soit par la polymérase- η , codée par le gène *RAD30* ou la polymérase- ζ (Pol ζ). Cette dernière, étant un hétérodimère composé des sous-unités Rev3 et Rev7, est la plus sollicitée en réponse au stress répliatif par le MMS (281).

Le TLS est surnommé «la voie dépendante de Rad6» dans la littérature, car il est enclenché par les enzymes Ub-ligases Rad6 et Rad18 (276,277). Lors d'activation de la RPR, l'E3 Ub-ligase Rad18 est recrutée à l'ADN simple-brin par le complexe RPA et forme un complexe avec l'E2 Ub-conjugase Rad6 pour la mono-ubiquitination de PCNA à la lysine 164 (278,282). Cette modification est un signal pour dissocier la polymérase répliatrice de l'ADN et lier la polymérase de transléision à fidélité moindre. Rev1 est une composante du TLS qui médie l'interaction de Pol ζ à la mono-ubiquitination de PCNA. La liaison de la sous-unité structurale Rev7 entraîne la transition des polymérases, puis la sous-unité catalytique Rev3 permet l'élongation de la matrice par substitution de la base modifiée (281). Le TLS est hautement mutagénique, car sa basse fidélité d'incorporation de bases peut engendrer des mutations ponctuelles dans le génome (274). Chez l'humain, le TLS est une voie de TDA fortement sollicitée lors d'irradiation par les rayons ultraviolets, et la polymérase- η est plus fidèle dans la substitution de bases que la polymérase- ζ (27). Toutefois, le TLS n'est pas une voie essentielle chez *S. cerevisiae*. Elle est directement régulée par la RDA où la méthyltransférase Dot1, par l'activation de la kinase Rad53, inhibe le TLS régulé par Pol ζ pour limiter la réponse mutagène lors de stress répliatif (figure 4) (183,283).

Voie de tolérance sans erreurs : le changement de matrice (TS)

Le changement de matrice (template switching, ou TS) est un mécanisme de TDA qui fonctionne de façon similaire à la recombinaison homologue. Il permet l'échange temporaire du brin endommagé vers la chromatide sœur, ce qui n'induit pas de mutations, mais peut mener à des réarrangements chromosomiques (284). Comme le TLS, le TS est médié les enzymes Ub-ligases Rad6 et Rad18 (285,286). La mono-ubiquitination de PCNA permet le recrutement de l'E3 Ub-ligase Rad5, analogue de fonction à Rad18, qui forme un complexe avec l'E2 Ub-conjugase hétérodimérique Ubc13-Mms2 pour la poly-ubiquitination de PCNA

à la lysine 164 (278). L'extension des chaînes d'ubiquitines reliées à la lysine 63 entraîne l'activation du TS en recrutant des recombinaisons de la RH comme Rad51 et Rad52, mais les mécanismes impliqués demeurent mal compris (278,286).

Certains éléments de la RDA ou de la réplication de l'ADN ont été démontrés comme des régulateurs de la TDA. Le PCNA alternatif possède deux rôles dans la promotion de la TDA qui sont indépendants de celui dans la RDA. D'une part, l'interaction entre les sous-unités Ddc1-Rad17 et Pol ζ suggèrent son implication dans le TLS (287) et de l'autre, il permet l'initiation du TS de manière non canonique à l'aide de la nucléase Exo1 (288). La protéine du replisome Ctf4 et la polymérase- α ont été identifiés récemment comme des éléments importants pour le TS, suggérant que l'hybridation des polymérases est fortement régulée (289). Chez la levure, le TS est favorisé comme premier plan en fin de phase S par rapport au TLS, et s'initie derrière les fourches de réplication (290). La figure 7 suivante résume les étapes d'ubiquitination de PCNA lors de la TDA.

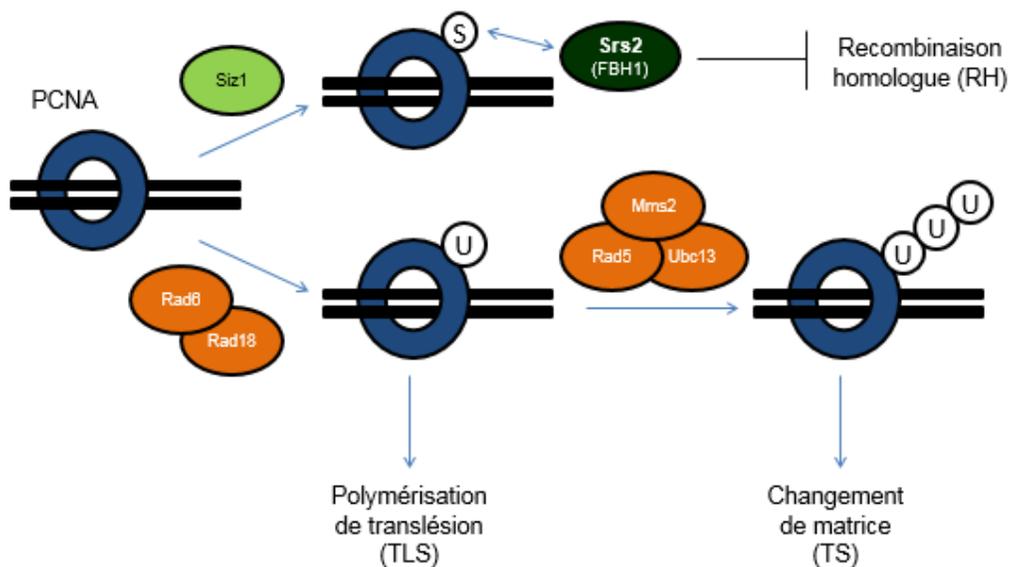


Figure 7 Modifications post-traductionnelles de PCNA dans la réparation post-répliquative (233)

Implication de H3K56ac dans la réponse aux dommages à l'ADN

L'acétylation de H3K56 a été démontrée comme un environnement favorable à la réparation de l'ADN et certains mécanismes agissent de sorte à préserver cette acétylation lors de la RDA (291). Lors de l'anaphase, Hst3 est phosphorylée par la kinase Cdk1, et ce signal est reconnu par le complexe SCF-Cdc4 qui poly-ubiquitine Hst3 pour sa dégradation (292,293). En réponse au stress génotoxique, la sirtuine Hst3 est ciblée pour dégradation au protéasome par l'activation de la kinase Mec1, ce qui conserve H3K56ac à la chromatine en phase G2/M (78,294). Cela suggère que la persistance de H3K56ac durant cette phase pourrait moduler certains aspects des voies de réparation à l'ADN. Toutefois, la machinerie d'ubiquitination impliquée dans la dégradation de Hst3 lors de la RDA, ainsi que les mécanismes qui préviennent la déacétylation de H3K56 en fin de phase S demeurent à être élucidés (293).

Les cycles d'acétylation et de déacétylation de H3K56 influencent entre autres la recombinaison homologe entre chromatides sœurs (295), la réparation post-répllicative (296) et la réparation aux extrémités chromosomales par le BIR (151). H3K56ac active la réparation des DSBs par des événements de recombinaison (295), et l'hyperacétylation de H3K56 induite par le double mutant *hst3Δ hst4Δ* présente une augmentation en foyers spontanés Rad52 (60,297), une létalité synthétique avec le mutant *rad52Δ* (109) ainsi qu'une inhibition des étapes initiales du BIR et de la conversion des gènes (151). La recombinaison spontanée est également observée dans un simple mutant *hst3Δ* (107). Ainsi, la dynamique de H3K56ac peut réguler la réparation des dommages à l'ADN lors de stress réplcatif par deux voies de recombinaison : l'une qui dépend de Rad51, soit le modèle de RH classique, et l'autre qui dépend de la sous-unité Pol32 (295). Celle-ci permet la synthèse d'ADN sur la chromatide sœur par des événements qui sont reliés au BIR (298,299). Toutefois, nous revisiterons uniquement les mécanismes de RH régulés par H3K56ac dans ce mémoire.

Le nicotinamide, un inhibiteur non compétitif des sirtuines

Comme présenté à la figure 3, la déacétylation des histones par les sirtuines entraîne la formation de deux sous-produits : l'O-acétyl ADP-ribose (OAADPr) et le nicotinamide (NAM). Étant un substitut de la vitamine B3, le NAM agit comme un pan-inhibiteur de l'activité de plusieurs enzymes utilisant le NAD⁺, dont les sirtuines (116,300). Il a été suggéré que Hst3 et Hst4 soient plus résistantes au NAM que les autres sirtuines de la levure (Sir2, Hst1, Hst2), comme une grande concentration de cet inhibiteur est requise pour obtenir une phénocopie d'un double mutant *hst3Δ hst4Δ* (150). L'inhibition des sirtuines par le NAM s'effectue de manière non compétitive. Comme cette molécule fait partie du NAD⁺, le NAM se lie à la poche de liaison au nicotinamide (NBP) des enzymes, ce qui n'affecte pas leur liaison aux résidus acétylés mais plutôt leur réaction d'échange avec le NAD⁺ (118,120). En plus de la déacétylation, le NAM peut être synthétisé à partir du nicotinamide riboside (NR) ou être converti en acide nicotinique (Na) lors de la biosynthèse du NAD⁺ (127,128). Chez la levure, les sirtuines constituent la quasi-totalité des enzymes utilisant le NAD⁺ contrairement aux mammifères (301).

Potentiel antifongique du nicotinamide

L'inhibition des sirtuines par le NAM peut prévenir la croissance chez certains pathogènes infectieux, principalement ceux de la famille *Candida albicans*, mais également d'autres familles comme *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus nidulans* (90). Chez *C. albicans*, il a été démontré que ces effets étaient reliés à l'acétylation de H3K56. Cette MPT est régulée par les enzymes Rtt109p et Hst3p, et même si l'inhibition de Rtt109p confère une forte sensibilité aux agents antifongiques, celle de Hst3p entraîne une perte de viabilité ainsi qu'une croissance anormale des filaments de *C. albicans* (90). De plus, il a été suggéré que l'altération pharmacologique de H3K56ac par le NAM peut réduire la virulence d'une infection à *C. albicans* dans un modèle de souris A/J (90). En somme, le NAM détient un potentiel cytotoxique qui dépend des niveaux de H3K56ac, toutefois ses mécanismes d'action dans la cellule demeurent mal compris.

Hypothèse et objectifs

Des résultats précédents suggéraient que l'hyperacétylation de H3K56, induite par l'inhibition des sirtuines Hst3 et Hst4, entraîne des défauts de croissance, des dommages spontanés à l'ADN ainsi qu'une létalité chez certains pathogènes infectieux (80,90,109). Toutefois, la nature du lien direct entre l'état de la structure de la chromatine et les phénotypes observés demeurent encore nébuleux.

Pour mieux comprendre ces phénomènes, nous avons étudié la réponse cellulaire face à l'inhibition des sirtuines par le nicotinamide chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce projet a débuté par l'obtention de résultats provenant d'un criblage chimiogénétique chez *S. cerevisiae*, qui visait à identifier des gènes pouvant influencer la croissance de la levure en absence d'activité des sirtuines induite par traitement au NAM. Par l'identification de plusieurs mutations conférant une forte sensibilité à cet inhibiteur pharmacologique, nous avons noté qu'un grand nombre de ceux-ci était impliqué dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN, ainsi que pour d'autres voies de réparation de l'ADN comme la recombinaison homologue. Nous avons cherché à vérifier si certains mutants cibles agissant dans l'atténuation des voies de signalisation présentaient une forte réponse aux dommages à l'ADN, et si ces phénotypes étaient dépendants de l'hyperacétylation de H3K56 causée par l'inhibition des sirtuines Hst3 et Hst4. À la lumière de nos résultats, nous postulons que la déacétylation des histones nouvellement synthétisées empêche l'hyperactivation des kinases lors de dommages à l'ADN en réponse au stress répliatif induit par des agents cytotoxiques.

Matériel et méthodes

Utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle expérimental

Toutes les expériences détaillées dans ce mémoire ont été réalisées à partir de notre modèle au laboratoire, la levure de bourgeonnement *Saccharomyces cerevisiae*. Toutes les souches de levures qui ont été générées au fil des projets sont inscrites dans le tableau 2 à la fin de cette section. La plupart d'entre elles ont été conçues par des méthodes de transformation génétique, qui seront décrites dans le paragraphe suivant, et certaines souches ont été généreusement offertes par d'autres laboratoires. Nous avons obtenu entre autres la collection de mutations d'histones du Dr Ali Shilatifard (Northwestern University) et celle de mutations d'origines de réplication du Dr John Diffley (Francis Crick Institute) (188,302).

Manipulations génétiques de la levure

Le projet a été réalisé avec trois souches génétiques différentes de *S. cerevisiae* : BY, W303 et FY. Question de reproductibilité, certaines souches offertes avec un génotype particulier nous ont incités à utiliser le même type de souche génétique dans la réalisation de nos travaux. Concernant nos méthodes de transformation génétique, certaines souches ont été conçues par choc thermique ou par croisement génétique. La transformation par choc thermique consiste à augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire de sorte à incorporer un fragment d'ADN à l'intérieur des pores. Le protocole expérimental implique l'utilisation de polyéthylène glycol et de lithium acétate pour perméabiliser la membrane (303). L'autre type de transformation est le croisement du matériel génétique, soit entre deux levures haploïdes de sexes différents MAT α et MAT α . Ce croisement génétique forme un diploïde qui est ensuite mis à sporulation : les produits venant de la méiose forment une tétrade où certaines spores présentent le génotype d'intérêt selon le modèle classique (304). L'utilisation d'un microscope à dissection permet ensuite la séparation de chaque tétrade.

Tests de croissance par dilutions en série

Les cellules ont été mises en croissance en chambre humide à 25 ou 30°C pendant la nuit. Les tests de croissance ont été effectués le lendemain selon deux méthodes. Dans le premier cas, les cultures saturées ont été diluées en série puis répliquées sur un milieu avec ou sans méthanesulfonate de méthyle (MMS), suivi d'une incubation pendant 48h à 30°C. Dans le deuxième cas, les cultures saturées possédant un plasmide avec séquence *URA3* ont été répliquées sur un milieu contenant ou non de l'acide 5-fluoroorotique (5-FoA), suivi d'une incubation pendant 48h à 25°C. Les cellules ayant spontanément perdu le plasmide demeurent viables sur 5-FoA (109) tandis que celles qui le conservent convertissent l'acide en une forme toxique lors d'expression du gène *URA3*, ce qui est létal pour les cellules (305).

Tests de croissance au nicotinamide

Dans le cadre de nos expériences, les levures ont été mises en culture dans un milieu synthétique «yeast extract-peptone-dextrose» (YPD) ou dans un milieu minimal «synthetic complete» (SC) en absence d'uracile (URA). La poudre de nicotinamide a été soit dissoute dans le milieu puis filtrée avant l'ajout des cellules, par exemple lors des études sur plaques 96 puits, ou alors dissoute directement en culture pour le traitement de cellules asynchrones.

Étude de croissance en plaques 96 puits

Les cellules ont été mises en croissance en chambre humide à 30°C pendant la nuit. Elles ont été dosées le lendemain matin puis diluées à une densité optique à 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,0005 dans 100 µL de milieu YPD avec des concentrations croissantes de nicotinamide allant de 0 à 200 mM. Ces dilutions ont été faites à l'intérieur de plaques 96 puits qui ont été incubées pendant 48 heures en chambre humide à 30°C. La densité optique à 630 nm (D.O.₆₃₀) a été lue à l'aide d'un lecteur de plaque Biotek EL800 équipé d'un logiciel de lecture Gen5, version 1.05. Durant l'analyse des données, la D.O.₆₃₀ résultante fut soustraite de celle contenant uniquement le milieu YPD (échantillon «blanc») et la croissance fut normalisée sur les contrôles non traités. Chaque graphique représente une expérience réalisée en triplicata et les barres d'incertitudes représentent l'erreur moyenne lors de la normalisation des données.

Étude du temps de dédoublement

Pour le calcul du temps de dédoublement, les cellules ont été mises en croissance en chambre humide à 30°C pendant la nuit, puis diluées le lendemain à une D.O.₆₀₀ de 0,01 dans 100 µL de milieu YPD contenant 0 ou 20 mM de NAM dans des plaques 96 puits. Ces plaques ont été mises en agitation à 30°C dans un lecteur de plaques Biotek ELX808 pour une durée de 48 heures. Les D.O.₆₀₀ ont été lues automatiquement chaque demi-heure. Chaque densité optique a d'abord été mise en format graphique pour l'analyse des données, puis une méthode de régression exponentielle sur les valeurs a été utilisée pour le calcul du temps de dédoublement de chaque population.

Étude asynchrone des générations de levure

Pour cette étude, les cellules saturées en mini-culture ont été diluées en milieu YPD ou SC dans un incubateur de 25°C avec agitation pendant la nuit. Elles ont été centrifugées le lendemain à une certaine densité optique, pour être ensuite resuspendues dans le milieu correspondant en présence d'une concentration en NAM. Le temps d'incubation de ces cellules à 30°C a été en moyenne de 8 à 12 heures, où la densité optique fut vérifiée chaque 2 heures pour éviter la saturation à 1,0 D.O./mL. Le nicotinamide a été acheté de la compagnie Sigma-Aldrich.

Synchronisation cellulaire et traitement aux agents génotoxiques

Les cellules saturées en mini-culture ont été diluées en milieu YPD dans un incubateur de 25°C avec agitation pendant la nuit. La densité des cultures fut évaluée le lendemain matin puis les cellules ont été synchronisées en phase G1 dans un milieu YPD contenant 5 µg/mL de phéromone facteur- α pendant 90 minutes, suivi d'une deuxième dose de 5 µg/mL de facteur- α pendant 75 minutes. Le facteur- α est une phéromone permettant de bloquer les cellules MATa en phase G1. Les cellules ont ensuite été relâchées en phase S par resuspension dans un milieu YPD contenant 50 µg/mL de pronase (protéase dégradant le facteur- α) ainsi qu'une concentration en méthanesulfonate de méthyle (MMS). Le MMS ainsi que la pronase ont été obtenus de la compagnie Sigma Aldrich.

Cytométrie en flux

Les cellules recueillies lors des expériences sur des cellules non synchronisées (asynchrones) ou avec synchronisation en phase G1 ont été fixées avec de l'éthanol 70% pour procéder à l'analyse du contenu en ADN par cytométrie en flux. La méthodologie appliquée fut celle utilisant le Sytox Green obtenu de chez Invitrogen. Ce dernier fluoresce lorsqu'il est intercalé dans l'ADN double-brin et permet la détection du contenu en ADN lors de l'analyse (306). La cytométrie en flux a été réalisée sur un appareil FACS-Calibur possédant un logiciel CellQuest. Les figures ont été assemblées à l'aide du logiciel FlowJo, version 7.6.5.

Immunobuvardage de type Western

La précipitation de protéines venant d'extraits de cellules recueillies lors des expériences sur cellules asynchrones a été réalisée soit par la méthode de lyse cellulaire en milieu alcalin ou alors par une méthode de précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA) avec billes de verre (307). Les protéines dosées ont été séparées par une migration par électrophorèse sur gel composé de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE), puis transférées sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) avec un appareil Bio-Rad Semi-Dry à 0,8 mA/cm² pendant deux heures. L'anticorps utilisé contre l'histone H2A a été acheté d'Active Motif (No. Catalogue 39236) et les anti-H3, anti-H3K56ac, anti-H4K16ac et anti-H2A phosphorylé (78) ont été généreusement offerts par le laboratoire du Dr Alain Verreault (Université de Montréal).

Essais d'autophosphorylation de Rad53 *in situ*

Les protéines venant d'extraits de cellules recueillies lors des expériences asynchrones ont été précipitées selon le protocole employant le TCA. Elles ont été séparées par SDS-PAGE puis transférées sur membrane PVDF par utilisation d'un tampon de transfert (25 mM de Tris et 192 mM de glycine, sans méthanol et SDS) sur l'appareil Bio-Rad. Pour l'essai d'autophosphorylation de Rad53, les membranes ont été dénaturées dans une solution contenant de la guanidine-HCl et du dithiothréitol (DTT), puis les protéines furent renaturées par incubation à 4°C dans une solution à base d'albumine bovine et de DTT (187). La réaction d'autophosphorylation a été effectuée dans 10 µCi/mL d'ATP radioactif [γ -³²P] pendant 1 heure.

Les autoradiogrammes ont été révélés par un appareil à numérisation Phosphor Imager Storm 840, équipé du logiciel ImageQuant servant à l'analyse.

Microscopie à fluorescence

Les extraits de cellules recueillies lors des expériences asynchrones ont été fixés à une concentration de 3,7% en formaldéhyde pour procéder à l'analyse par microscopie à fluorescence. Les protéines d'intérêt ont été préalablement fusionnées en C-terminal à une séquence exprimant une protéine fluorescente, soit ici la protéine à fluorescence jaune (YFP) et la protéine à fluorescence cyan (CFP), par modification du gène endogène (308). Les échantillons ont été conservés à 4°C sur des lamelles contenant du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), puis les protéines fluorescentes furent examinées avec un microscope à fluorescence DeltaVision utilisant un objectif de 60X ou 100X, équipé du logiciel SoftWorx (GE Healthcare) pour la superposition des images («maximal intensity projection») (154). Les images ont ensuite été analysées par le logiciel ImageJ, version 1.46E.

Crible chimiogénétique et «fitness assay»

Le crible chimiogénétique de la collection de mutants de la levure *S. cerevisiae* a été réalisé en collaboration avec les Drs Corey Nislow et Guri Giaever, chercheurs principaux à l'University of British Columbia et collaborateurs externes du projet publié au journal scientifique Nucleic Acid Research (voir la section résultats). Nous avons traité une banque de souches arborant des mutations de gènes comparativement à des souches normales, qui servaient ici de contrôle (309). La banque contenait une collection de mutants homozygotes de gènes non essentiels diploïdes de la levure BY4743 possédant chacun une séquence génétique «code-barre» qui flanque le gène *KanMX*, permettant ainsi leur identification et la quantification de leur croissance dans un «pool» (310,311). Cette collection, ainsi que celle contrôle, a été mise en croissance dans un milieu YPD avec 20 mM NAM à 30°C. Les cellules ont été recueillies à partir de la génération 0 (qui représente les souches initiales non traitées), ainsi qu'à 5 et 20 générations de croissance. Une génération représente un passage complet dans le cycle cellulaire, où la levure initie son bourgeonnement durant la réplication (phase G1/S) jusqu'à la division cellulaire lors de la mitose (phase G2/M).

L'ADN génomique des cellules traitées a été extrait à l'aide de la trousse de Zymo Research YeaStar (312). Pour chaque échantillon, deux réactions par polymérase en chaîne (PCR) ont été effectuées pour amplifier les séquences «code-barres» des souches mutées («downtags» et «uptags»). Les produits d'ADN amplifiés furent par la suite combinés, purifiés et hybridés par une micropuce à l'ADN à haute densité Affymetrix TAG4, ce qui a permis la quantification de l'abondance de chaque souche dans le «pool» avant et après traitement (313). Ces essais contiennent au moins cinq répliquats pour chaque amplification des downtags et des uptags, de sorte à éliminer les caractéristiques aberrantes avant de calculer la valeur d'intensité de chaque mutant. Ces valeurs moyennes ont ensuite été normalisées par rapport aux contrôles ainsi que corrigées pour la saturation (309,312). Chaque Z-Score des mutants (obtenu par l'équation (tag contrôle – tag mutant)/déviations standard du contrôle) a été calculé après 5 et 20 générations. Lorsqu'on obtient une valeur nulle, aucune différence de croissance n'a pu être observée avant et après traitement au NAM. Si la valeur est positive, la population présente une plus grande sensibilité après traitement que celle contrôle; sinon, la valeur tendra vers le négatif ou 0. L'ontologie des gènes (GO Terms) a été identifiée grâce à l'outil GO Term Finder, disponible sur le site de Saccharomyces Genome Database (314,315).

Tableau 2 Table des souches de levures étudiées dans ce mémoire

Figure	Souche	Génotype	Référence
#8	BY4741	BY4741 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1</i>	(316)
	BY4743	BY4743 <i>MATa/a his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	(316)
	W5094-1C	W303 <i>ADE2 RAD52-YFP RAD5</i>	(154)
	HWY2493	W303 <i>ADE2 bar1Δ::LEU2 RFA1-8ala-YFP RAD5</i>	(60)
	HWY297	BY4741 <i>rtt109Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY3111	YBL574 <i>hht1-hhf1Δ::LEU2 hht2-hhf2Δ::HIS3 [pCEN TRP1 HHT1-HHF1]</i>	(302)
	HWY2949	YBL574 <i>hht1-hhf1Δ::LEU2 hht2-hhf2Δ::HIS3 [pCEN TRP1 HHT1-HHF1] rtt109Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
#10	HWY1608	BY4741 <i>slx4Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY1875	BY4741 <i>slx4Δ::HPHMX rtt109Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ICY703	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 [pCEN URA3 HST3]</i>	(80)
	ASY3657	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 rtt107Δ::HPHMX [pCEN URA3 HST3]</i>	Cette étude-ci
	ASY2156	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 slx4Δ::KanMX [pCEN URA3 HST3]</i>	Cette étude-ci
	ASY3675	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 slx4Δ::KanMX rtt107Δ::HPHMX [pCEN URA3 HST3]</i>	Cette étude-ci
#11	ASY2164	BY4741 <i>rtt101Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ASY2168	BY4741 <i>rtt101Δ::URA3MX slx4Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci

	ASY2166	BY4741 <i>rtt107Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY2163	BY4741 <i>rtt107Δ::KanMX slx4Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	HWY970	W303 <i>ADE2 RAD52-YFP RAD5 rtt101Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	HWY972	W303 <i>ADE2 RAD52-YFP RAD5 rtt107Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	HWY978	W303 <i>ADE2 RAD52-YFP RAD5 rtt109Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	HWY1610	BY4741 <i>rad1Δ::KanMX 25C10</i>	Cette étude-ci
	HWY1609	BY4741 <i>slx1Δ::KanMX 10E7</i>	Cette étude-ci
	ASY3147	BY4741 <i>mus81Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	HWY3228	BY4741 <i>mms4Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
#12	ASY1763	BY4741 <i>psy2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY1764	BY4741 <i>psy4Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY1765	BY4741 <i>pph3Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY1840	BY4741 <i>pph3Δ::HPHMX rtt109Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ASY3537	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 pph3Δ::HPHMX [pCEN URA3 HST3]</i>	Cette étude-ci
#13	ASY2766	W303 <i>ADE2 RAD52-YFP RAD5 slx4Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	ASY2764	W303 <i>ADE2 RAD52-YFP RAD5 pph3Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
#14	EHY047	BY4741 <i>rad9Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY2796	BY4741 <i>rad9Δ::KanMX pph3Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	ASY3516	BY4741 <i>slx4Δ::KanMX rad9Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
#15	-	FY406 <i>MATa hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::TRP1 [pCEN HIS3 HTB1-HTA1]</i>	(302)
	ERY3394	FY406 <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::TRP1 [pCEN HIS3 HTB1-HTA1] pph3Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3396	FY406 <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::TRP1 [pCEN HIS3 HTB1-hta1S128A] pph3Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	HWY2878	FY406 <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::TRP1 [pCEN HIS3 HTB1-HTA1] slx4Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY2879	FY406 <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::TRP1 [pCEN HIS3 HTB1-hta1S128A] slx4Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY1936	FY406 <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::TRP1 [pCEN HIS3 HTB1-hta1S128A]</i>	(302)
	EHY071	BY4741 <i>dot1Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3386	BY4741 <i>slx4Δ::KanMX dot1Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY3389	BY4741 <i>pph3Δ::HPHMX dot1Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
#16	W303	W303 <i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 [psi+] rad5-535</i>	(317)
	Y2573	W303 <i>dbf4Δ::TRP1 his3::PDBF4-dbf4-4A::HIS3 sld3-38A-10his-13MYC::KanMX4</i>	(188)
	ERY3414	W303 <i>dbf4Δ::TRP1 his3::PDBF4-dbf4-4A::HIS3 sld3-38A-10his-13MYC::KanMX4 slx4Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3415	W303 <i>dbf4Δ::TRP1 his3::PDBF4-dbf4-4A::HIS3 sld3-38A-10his-13MYC::KanMX4 pph3Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	ASY2798	W303 <i>pph3Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	HWY2882	W303 <i>slx4Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
#17	ASY3519	BY4741 <i>pph3Δ::HPHMX rev3Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY2940	BY4741 <i>slx4Δ::KANMX rev3Δ::HIS3MX</i>	Cette étude-ci
	HWY2942	BY4741 <i>slx4Δ::KanMX dot1Δ::URA3MX rev3Δ::HIS3MX</i>	Cette étude-ci
	ASY3534	BY4741 <i>pph3Δ::HPHMX dot1Δ::URA3MX rev3Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY4003	BY4741 <i>rev3Δ::KanMX dot1Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
#19	ERY3466	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 [pCEN URA3 HST3] srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	ERY4153	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 [pCEN URA3 HST3]</i>	Cette étude-ci

		<i>rtt109Δ::KanMX</i>	
	ERY4138	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1</i> [pCEN URA3 HST3] <i>srs2Δ::HPHMX rtt109Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY4438	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 asf1Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY4441	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 srs2Δ::HPHMX</i> <i>asf1Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY3449	BY4741 <i>hst3Δ::URA3MX srs2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY4380	BY4741 <i>hst4Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	HWY634	BY4741 <i>srs2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY635	BY4741 <i>srs2Δ::KanMX rtt109Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	-	YBL574 <i>hht1-hhf1Δ::LEU2 hht2-hhf2Δ::HIS3</i> [pCEN TRP1 <i>hht1K56A-HHF1</i>]	(302)
	ERY3441	YBL574 <i>hht1-hhf1Δ::LEU2 hht2-hhf2Δ::HIS3</i> [pCEN TRP1 <i>hht1K56A-HHF1</i>] <i>srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3875	BY4741 <i>rtt101Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY3877	BY4741 <i>rtt107Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY4430	BY4741 <i>asf1Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
#20	ERY4162	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 rtt101Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY4163	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 srs2Δ::HPHMX</i> <i>rtt101Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY3868	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 srs2Δ::HPHMX</i> <i>rtt107Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY4156	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 mms1Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY4158	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 srs2Δ::HPHMX</i> <i>mms1Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY4164	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 mms22Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY4166	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 srs2Δ::HPHMX</i> <i>mms22Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	HWY2503	BY4741 <i>mms1Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY2505	BY4741 <i>mms22Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3879	BY4741 <i>mms1Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY3881	BY4741 <i>mms22Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
#21	ICY918	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 sas2Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	(80)
	ERY3874	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 srs2Δ::HPHMX</i> <i>sas2Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY4196	BY4741 <i>hst1Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY4194	BY4741 <i>hst2Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY4408	BY4743 <i>sir2Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ASY3111	YBL574 <i>hht1-hhf1Δ::LEU2 hht2-hhf2Δ::HIS3</i> [pCEN TRP1 <i>HHT1-HHF1</i>]	(302)
	ASY3113	YBL574 <i>hht1-hhf1Δ::LEU2 hht2-hhf2Δ::HIS3</i> [pCEN TRP1 <i>HHT-hhf1K16A</i>]	(302)
	ERY3436	YBL574 <i>hht1-hhf1Δ::LEU2 hht2-hhf2Δ::HIS3</i> [pCEN TRP1 <i>HHT1-HHF1</i>] <i>srs2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3443	YBL574 <i>hht1-hhf1Δ::LEU2 hht2-hhf2Δ::HIS3</i> [pCEN TRP1 <i>HHT1-hhf1K16A</i>] <i>srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	HWY47	BY4741 <i>sas2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY4134	BY4741 <i>sas2Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci

#22	ASY3493	BY4741 <i>rad9Δ::URA3MX srs2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY3496	BY4741 <i>dot1Δ::URA3MX srs2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY4400	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 rad9Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	HWY4402	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 srs2Δ::HPHMX</i> <i>rad9Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	HWY4403	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 dot1Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	HWY4405	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 srs2Δ::HPHMX</i> <i>dot1Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
#23	ERY3822	FY406 <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::TRP1</i> [pCEN HIS3 <i>HTB1-HTA1</i>] <i>srs2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3824	FY406 <i>hta1-htb1Δ::LEU2 hta2-htb2Δ::TRP1</i> [pCEN HIS3 <i>HTB1-hta1S128A</i>] <i>srs2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY642	BY4741 <i>siz1Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY630	BY4741 <i>rad18Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY636	BY4741 <i>mms2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3862	BY4741 <i>rad18Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY3885	BY4741 <i>mms2Δ::KanMX srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	HWY4406	BY4741 <i>siz1Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ASY3489	BY4741 <i>shu1Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY3692	BY4741 <i>shu2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY3694	BY4741 <i>psy3Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY3693	BY4741 <i>csm2Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ASY3490	BY4741 <i>shu1Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ASY3723	BY4741 <i>shu2Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY4175	BY4741 <i>psy3Δ::KanMX srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	ERY4174	BY4741 <i>csm2Δ::KanMX srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	HWY2416	BY4741 <i>ddc1Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY2418	BY4741 <i>rad17Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY2415	BY4741 <i>mec3Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3853	BY4741 <i>ddc1Δ::KanMX srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
ERY3854	BY4741 <i>rad17Δ::KanMX srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci	
ERY3856	BY4741 <i>mec3Δ::KanMX srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci	
#24	HWY640	BY4741 <i>rad51Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	HWY2892	BY4741 <i>srs2Δ::KanMX rad51Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
	ERY4170	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 rad51Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY4173	FY833 <i>hst3Δ::HIS3 hst4Δ::TRP1 srs2Δ::HPHMX</i> <i>rad51Δ::KanMX</i> [pCEN URA3 HST3]	Cette étude-ci
	ERY3863	BY4741 <i>rad51Δ::KanMX srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	EHY035	BY4741 <i>rad55Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY4444	BY4743 <i>rad55Δ::KanMx srs2Δ::URA3Mx</i>	Cette étude-ci
	EHY043	BY4741 <i>rad57Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY4435	BY4741 <i>rad57Δ::KanMx srs2Δ::URA3Mx</i>	Cette étude-ci
	EHY027	BY4741 <i>rad59Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY3424	BY4741 <i>rad59Δ::KanMx srs2Δ::URA3Mx</i>	Cette étude-ci
	HWY628	BY4741 <i>rad52Δ::KanMX</i>	Cette étude-ci
	ERY4432	BY4741 <i>rad52Δ::KanMx srs2Δ::URA3Mx</i>	Cette étude-ci
	ML288-8B	W303 <i>ADE2 trp1-1 LYS2 RAD5 YFP-RAD51 RAD52-CFP</i>	(317)
	ERY3810	W303 <i>ADE2 LYS2 RAD5 YFP-RAD51 RAD52-CFP</i> <i>srs2Δ::HPHMX</i>	Cette étude-ci
W8367-1C	W303-1a <i>ade2-1 can1-100 CFP-RAD51 RAD54-YFP</i>	(266)	

	W8367-2C	W303-1a <i>ade2-1 can1-100 CFP-RAD51 RAD54-YFP srs2Δ::HIS3MX</i>	(266)
#26 (Annexe)	ASY3667	BY4741 <i>pol30Δ::KANMX trp1Δ::KANMX slx4Δ::HPHMX rad9Δ::HIS3MX [pCEN-POL30-TRP1]</i>	Cette étude-ci
	ASY3668	BY4741 <i>pol30Δ::KANMX trp1Δ::KANMX slx4Δ::HPHMX rad9Δ::HIS3MX [pCEN-pol30-K164R-TRP1]</i>	Cette étude-ci
	ASY3669	BY4741 <i>pol30Δ::KANMX trp1Δ::KANMX pph3Δ::HPHMX rad9Δ::HIS3MX [pCEN-POL30-TRP1]</i>	Cette étude-ci
	ASY3670	BY4741 <i>pol30Δ::KANMX trp1Δ::KANMX pph3Δ::HPHMX rad9Δ::HIS3MX [pCEN-pol30-K164R-TRP1]</i>	Cette étude-ci
	ASY3522	BY4741 <i>slx4Δ::KanMX dot1Δ::URA3 rad18Δ::HIS3MX</i>	Cette étude-ci
	HWY2939	BY4741 <i>slx4Δ::kanMX dot1Δ::URA3MX mms2Δ::HIS3MX</i>	Cette étude-ci
	ASY3651	BY4741 <i>pph3Δ::KanMX rad18Δ::HIS3MX rad9Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ASY3654	BY4741 <i>pph3Δ::KanMX mms2Δ::HPHMX rad9Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
#28 (Annexe)	ECS1921	FF18733 <i>RAD52-L264P</i>	(237)
	ECS1982	FF18733 <i>RAD52-L264P srs2Δ::LEU2MX</i>	(237)
	ECS2343	FF18733 <i>RAD52-SMT3::NATMX</i>	(237)
	ECS2333	FF18733 <i>RAD52-SMT3::NATMX srs2Δ::LEU2MX</i>	(237)
	ERY4391	W303 <i>srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	HY1728	W303 <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 can1-100 RAD5 mms4Δ::HPHMX4</i>	(247)
	HY3048	W303 <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 can1-100 GAL PSII+ RAD5+ leu2::pADH1-Tc3-3HA-mms4-S56E, T184D::kanMX4</i>	(247)
	HY3092	W303 <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 can1-100 GAL PSII+ RAD5+ leu2::pADH1-Tc3-3HA-mms4-S56E::kanMX4</i>	(247)
	ERY4421	W303 <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 can1-100 RAD5 mms4Δ::HPHMX4 srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
	ERY4423	W303 <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 can1-100 GAL PSII+ RAD5+ leu2::pADH1-Tc3-3HA-mms4-S56E, T184D::kanMX4 srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci
ERY4426	W303 <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 can1-100 GAL PSII+ RAD5+ leu2::pADH1-Tc3-3HA-mms4-S56E::kanMX4 srs2Δ::URA3MX</i>	Cette étude-ci	

Résultats

Résultats publiés (Simoneau A. *et al*, Nucleic Acid Research Journal 2016) (318)

La première partie de cette section englobe des résultats obtenus dans le cadre du projet auquel j'ai collaboré lors de ma première année de maîtrise, et qui a mené en janvier 2016 à une publication dans le Nucleic Acid Research en tant que second auteur. La plupart des figures tirées du papier qui suivent résultent majoritairement de ma contribution. Toutefois, dans le but d'améliorer le fil conducteur de cette section dans la présentation des résultats, certaines d'entre elles ont été réalisées par des collaborateurs au projet et membres du laboratoire : Antoine Simoneau (premier auteur), Dr Ian Hammond-Martel (collaborateur) et Dr Hugo Wurtele (superviseur et auteur de correspondance). Leur contribution sera créditée à chaque figure concernée. Certains résultats inclus dans l'annexe (partie résultats publiés) compléteront l'information au besoin.

L'hyperacétylation de H3K56 entraîne une forte activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN

Le nicotinamide (NAM) permet d'inhiber la croissance de certains pathogènes fongiques, dont la famille *C. albicans*, et ces phénotypes seraient reliés à l'hyperacétylation de H3K56 (90). Nous avons investigué les conséquences d'une inhibition des sirtuines par le NAM à l'aide de la levure modèle *S. cerevisiae*. L'utilisation d'une concentration de 20, 50 ou 100 mM de NAM dans des cellules de type sauvage augmente les niveaux de H3K56ac après 8h de traitement (figure 8A). Ce résultat était attendu, car le NAM inhibe les sirtuines Hst3 et Hst4 et empêche la déacétylation de ce résidu (80). Les essais kinases *in situ* qui ont été réalisés en parallèle indiquent une augmentation du niveau d'autophosphorylation de la kinase Rad53 (187), ce qui suggère une forte activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (RDA) (figure 8A). Bien qu'elle augmente en présence de 20 et 50 mM de NAM, l'activation de Rad53 est plus faible à 100 mM NAM, ce qui suggère que l'induction de hautes concentrations en NAM influence la croissance en modulant non seulement la réponse aux

dommages à l'ADN, mais probablement aussi d'autres fonctions cellulaires. La présence de dommages à l'ADN peut entraîner une augmentation de foyers de réparation intranucléaires (228). En effet, il a été observé par microscopie que l'ajout de 20 mM NAM cause l'augmentation du nombre de foyers Rad52-YFP et Rfa1-YFP (figure 8B), qui sont tous deux des marqueurs de la RDA et de la réparation de l'ADN (228). Ces résultats suggèrent que le NAM pourrait causer des lésions à l'ADN ou empêcher la réparation efficace de dommages spontanés, pouvant mener à une forte activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN.

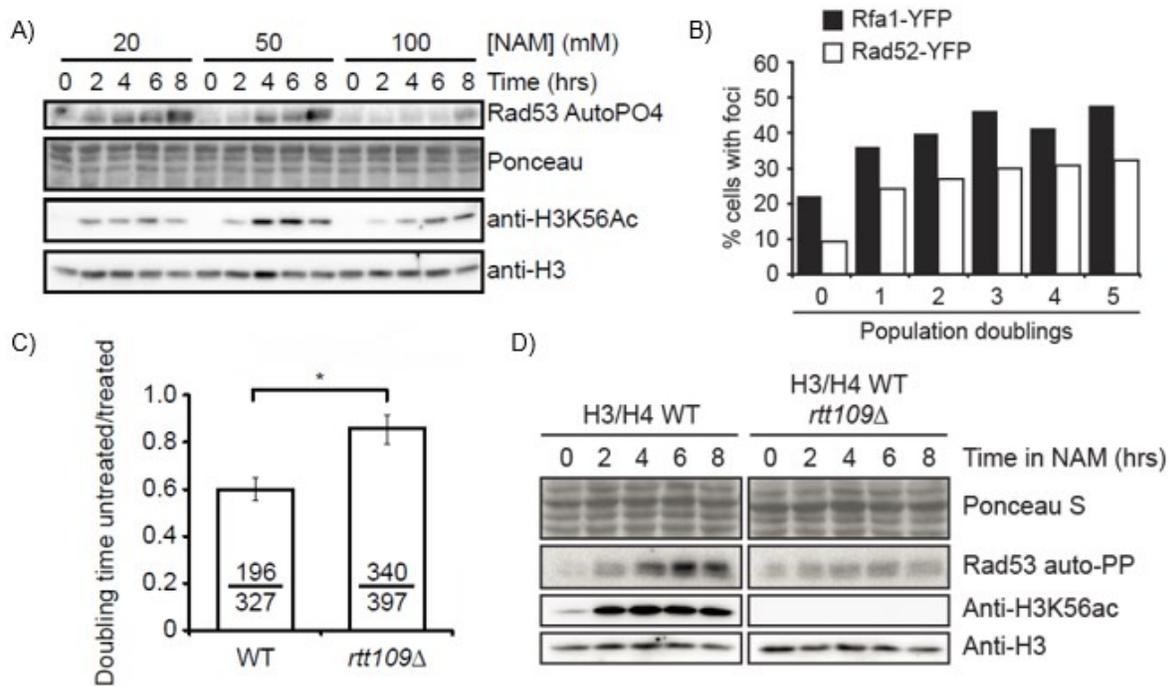


Figure 8 L'inhibition des sirtuines par le NAM cause des dommages à l'ADN qui dépend de l'hyperacétylation de H3K56. A) Le NAM augmente le niveau d'activation de la kinase Rad53. Les cellules ont été traitées avec soit 20, 50 ou 100 mM NAM pendant 8 heures et collectées aux temps respectifs pour le Western Blot ainsi que l'essai kinase *in situ*. B) Le NAM augmente la fréquence de cellules présentant des foyers de réparation Rad52 et Rfa1. Les cellules ont été traitées avec 20 mM NAM pendant 5 générations de dédoublement, puis observées par microscopie à fluorescence. C) Les défauts de croissance cellulaire en NAM dépendent de l'hyperacétylation de H3K56. Les temps de dédoublement ont été mesurés en milieu YPD \pm 20 mM NAM. Les valeurs représentent les ratios, en minutes, du dédoublement en milieu YPD \pm 20 mM NAM. Les valeurs représentent les ratios, en minutes, du dédoublement en milieu YPD \pm 20 mM NAM. D) L'absence de Rtt109 diminue le niveau d'activation de Rad53. Les cellules ont été traitées avec 20 mM NAM puis collectées comme en A). Collaboration : Hugo Wurtele (figures A et D)

Plusieurs résultats démontrent que la plupart des phénotypes observés lors d'inhibition des sirtuines Hst3 et Hst4 sont dépendants de l'hyperacétylation de H3K56, car l'absence de l'acétyltransférase Rtt109 renverse ces phénotypes (80,90,109). L'étude du temps de dédoublement et les essais kinases *in situ* (figure 8C-D) indiquent que la délétion du gène *RTT109* permet de restaurer le niveau de croissance cellulaire et diminuer l'activation de la kinase Rad53 en présence de 20 mM NAM, respectivement. Cela suggère que la majorité des effets cytotoxiques observés au NAM serait reliée à l'hyperacétylation de H3K56 due à l'inhibition de Hst3 et Hst4.

Identification de liens génétiques entre H3K56ac et la réponse cellulaire à l'inhibition de l'activité des sirtuines

Pour vérifier la base moléculaire de l'effet anti-prolifératif du nicotinamide, nous nous sommes intéressés aux interactions génétiques reliées à H3K56ac pouvant être influencées par cet inhibiteur pharmacologique. Nous avons utilisé les résultats d'un crible chimiogénétique qui ont permis l'identification de gènes dont la mutation pourrait influencer le niveau de croissance cellulaire en présence de NAM. Ce crible fut réalisé en collaboration avec les Drs Corey Nislow et Guri Giaever, chercheurs à l'University of British Columbia et collaborateurs externes au projet (318). Sommairement, nous avons utilisé une collection de mutants homozygotes de gènes non essentiels de levures diploïdes possédant une séquence code-barre, pour procéder à l'amplification par PCR et à l'identification des mutants par hybridation d'une micropuce à l'ADN (voir la section matériel et méthodes) (309,312). Ces souches homozygotes ont été traitées en présence et en absence de 20 mM NAM pour 5 et 20 générations de dédoublement. L'ADN génomique fut extrait des souches traitées et non traitées, puis leurs séquences code-barres ont été amplifiées par PCR et hybridées par une micropuce à l'ADN dans le but d'évaluer l'abondance de chaque code-barre suite aux traitements. Les Z-Scores ont été obtenus par comparaison des échantillons traités aux non traités, et ceux se situant au-dessus ou en dessous de 2,58 (pourcentage cumulatif de 99%) ont été considérés pour l'analyse. Les graphiques suivants indiquent que la plupart des mutations modulant la croissance en NAM confèrent des défauts de croissance après 5 (84 sensibles contre 12 résistants) et 20 (467 sensibles contre 342 résistants) générations en présence de 20 mM NAM (figure 9A) (318). L'analyse des GO terms démontre que la majorité de ces

mutations de gènes présentant une sensibilité au NAM à 5 générations agissent dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN et au stress réplcatif (figure 9B). C'est également le cas pour 20 générations, mais des mutations de gènes inclus dans d'autres processus cellulaires, dont le catabolisme, ont été définies après traitement à long terme (318). Nous avons donc opté pour l'analyse des résultats obtenus à 5 générations plutôt que ceux à 20 générations, comme le nombre de gènes identifiés était plus modeste.

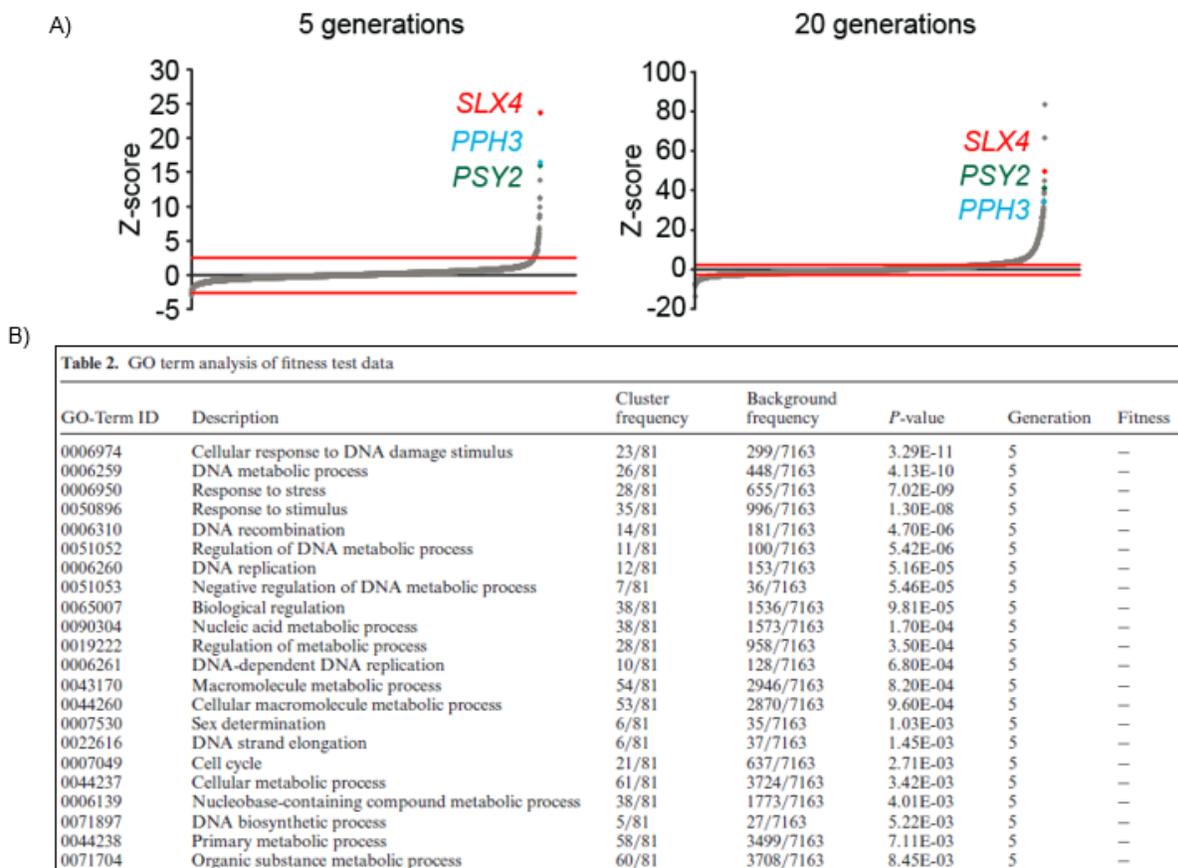


Figure 9 Résumé du crible chimiogénétique réalisé en NAM. A) La collection de mutants diploïdes a été mise en croissance avec 20 mM NAM pendant 5 et 20 générations. Les graphiques représentent le Z-Score de chaque valeur, soit un ratio traité vs non traité. Les valeurs positives représentent un défaut de croissance; les négatives ou nulles représentent une amélioration de la croissance ou aucun effet. Le ratio du Z-score est de $\pm 2,58$, ce qui est considéré significatif dans l'analyse des données (150 gènes identifiés à 5 générations). Les mutants hautement sensibles qui ont été identifiés par amplification de leur séquence code-barre sont indiqués. B) Ce tableau présente les résultats prédominants d'ontologie des gènes (GO terms) à 5 générations, considéré selon leur P-value. Collaboration : Corey Nislow et Guri Giaever (University of British Columbia)

Les résultats du crible suggèrent une corrélation significative entre la voie de réponse aux dommages à l'ADN et la structure de la chromatine, qui doit être régulée de manière efficace de sorte à préserver le niveau de croissance chez la levure *S. cerevisiae*. Il demeure à savoir la base moléculaire de ce niveau d'activation ainsi que le type de réparation à l'ADN requis pour la croissance lors d'inhibition des sirtuines par le NAM.

Catégories de gènes dont la mutation influence la prolifération cellulaire en absence d'activité des sirtuines

Le crible chimiogénétique a identifié plusieurs gènes dont la mutation influençait la croissance cellulaire en présence de NAM. Pour vérifier la contribution de chaque sirtuine dans ces phénomènes causés par ce pan-inhibiteur, nous avons démontré qu'un nombre significatif des interactions génétiques identifiées sont semblables à des interactions génétiques négatives publiées impliquant *HST3* et *HST4*, mais non les gènes des autres sirtuines *HST1*, *HST2* et *SIR2* (315,318). Plusieurs mutations observées confèrent une forte sensibilité au NAM après 5 et 20 générations (84 et 467, respectivement), dont certains sont inclus dans la RDA. Celles-ci se retrouvent dans plusieurs catégories, soit pour la résolution de structures d'ADN (*SLX4*, *SGS1*, *SRS2*), dans la recombinaison homologue (*RAD52*, *MRE11*), ou dans la modulation du point de contrôle en phase S (*PPH3*, *PSY2*, *MRC1*). D'autres mutations, dont celles qui font partie de la voie cellulaire de H3K56ac (*RTT101*, *RTT107*, *MMS1*, *MMS22*), possèdent une meilleure croissance après 5 ou 20 générations en NAM (12 et 342, respectivement) (318).

Dans le but de comprendre la base moléculaire d'une activation potentielle de la RDA en absence d'activité des sirtuines, nous nous sommes penchés dans le cadre de ce projet sur deux mutations de gènes conservés dans l'évolution et causant une forte sensibilité après traitement à 20 mM NAM dans le crible chimiogénétique (figure 9A). Il s'agit des mutants de *SLX4* (Z-scores de 25 et 48, respectivement) et *PPH3* (Z-scores de 16 et 33, respectivement), codant tous deux pour des protéines impliquées dans l'atténuation de la réponse aux dommages à l'ADN. Nous avons d'abord vérifié si ces mutants présentaient une forte induction des voies des réponses aux dommages à l'ADN en présence de NAM, et si ces phénotypes dépendaient de l'hyperacétylation de H3K56.

La protéine d'échafaudage Slx4 est importante pour la croissance cellulaire en présence d'hyperacétylation de H3K56

Slx4 est une protéine d'échafaudage qui forme des complexes avec plusieurs facteurs impliqués dans la résolution des voies de réponses aux dommages à l'ADN (206). Le crible chimiogénétique illustre que la délétion diploïde du gène *SLX4* cause une sensibilité au NAM (figure 9A). La délétion de ce gène dans une levure haploïde entraîne aussi un défaut de croissance cellulaire à de faibles concentrations en NAM, comparativement à une cellule de type sauvage qui parvient à croître à de hautes concentrations en NAM (figure 10A). Par cytométrie, nous avons observé que le mutant *slx4Δ* ne peut compléter le cycle cellulaire et demeure bloqué en phase S, d'où la présence d'un seul pic qui représente la duplication de la quantité d'ADN (figure 10C). Pour évaluer si le défaut de croissance du mutant *slx4Δ* dépendait de l'hyperacétylation de H3K56, un test de croissance a été effectué dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ*, qui présente une hyperacétylation de H3K56. Brièvement, ce double mutant arbore un plasmide qui exprime *HST3* (*pHST3-URA3*). Le milieu 5FoA permet la sélection des mutants ayant spontanément perdu le plasmide, car la conversion de l'acide lors d'expression du gène *URA3* est toxique pour la cellule (109). La mutation du gène de *SLX4* dans ce cadre génétique induit une létalité synthétique sur milieu 5FoA (figure 10B) puisque le triple mutant ne peut perdre le plasmide *HST3* et demeurer viable, ce qui avait été rapporté auparavant (109). La délétion du gène de l'acétyltransférase *RTT109* restaure la croissance du mutant *slx4Δ* à concentrations élevées en NAM (figure 10A) et sa progression dans le cycle cellulaire (figure 10C). Ces résultats suggèrent que la protéine Slx4 est importante pour la prolifération cellulaire en présence d'hyperacétylation de H3K56 induite par l'absence d'activité des sirtuines Hst3 et Hst4.

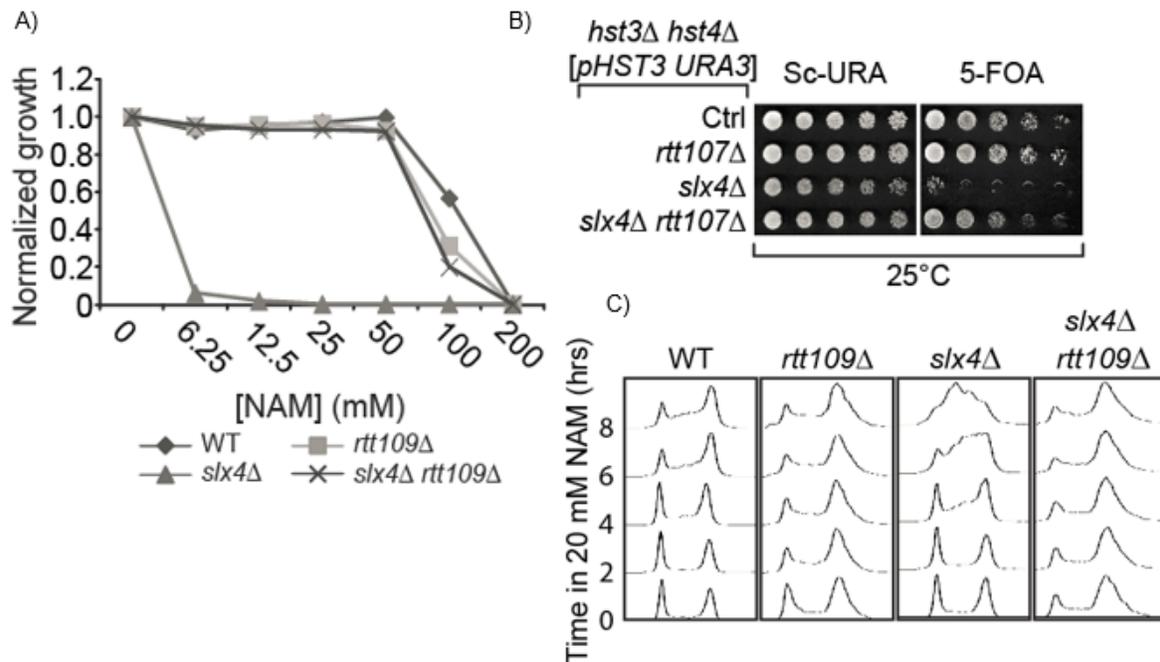


Figure 10 Le mutant *slx4Δ* est sensible à l'hyperacétylation de H3K56 induite par le NAM. A) *slx4Δ* présente des défauts de croissance en présence d'hyperacétylation de H3K56. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. B) *slx4Δ* cause une létalité synthétique avec l'absence de Hst3 et Hst4, et *rtt107Δ* renverse ce phénotype. Les cellules ont été diluées en série, puis répliquées sur la plaque correspondante et incubées à 25°C. C) *slx4Δ* bloque durant la phase S du cycle cellulaire de manière dépendante de H3K56ac. Des cellules en croissance exponentielle ont été traitées à 20 mM NAM pendant 8 heures, puis collectées pour l'analyse par cytométrie en flux. Collaboration : Antoine Simoneau (figure B)

Pour connaître la voie de régulation pouvant affecter le mutant *slx4Δ* en présence de NAM, nous avons évalué les liens entre la protéine Slx4 et la voie de H3K56ac. Slx4 interagit avec plusieurs protéines, incluant Rtt107 (199,204,206), Dbp11 (206), le complexe Mus81-Mms4 (201), Slx1 (246) ou Rad1-Rad10 (200). Son interaction avec Rtt107 est impliquée dans la réparation de l'ADN par formation d'un complexe avec Slx4 à la chromatine (206). La délétion du gène de *RTT107* restaure la croissance du mutant *slx4Δ* dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ* (figure 10B) et en présence de NAM par un test de croissance (figure 11A), alors que le mutant *rtt107Δ* parvient à croître de manière analogue au type sauvage (figures 10B et 11A). Comme l'absence de cette protéine d'échafaudage renverse les phénotypes de *slx4Δ* en NAM, un modèle à envisager était que Rtt107 pouvait induire des dommages à l'ADN de

manière dépendante de H3K56ac, et la présence de Slx4 serait requise pour leur résolution. Nous avons donc émis l'hypothèse que le mutant *rtt107Δ* devait présenter moins de dommages à l'ADN en réponse au NAM en l'absence d'un complexe Slx4-Rtt107 à la chromatine. En effet, nous avons observé par microscopie que ce mutant présente une diminution significative de la fréquence de foyers Rad52-YFP comparativement au type sauvage, et que cette diminution était semblable à celle d'un mutant *rtt109Δ* (figure 11B). Rtt107 interagit à la chromatine avec le complexe E3 Ub-ligase Rtt101-Mms1-Mms22 (97,99), et cette interaction n'est pas impliquée dans l'acétylation de H3K56 (100). Une diminution de la fréquence de foyers Rad52-YFP fut observée dans un mutant *rtt101Δ* comparativement au type sauvage (figure 11B), ce qui suggère que Rtt107 et Rtt101 seraient impliqués dans la formation de lésions à l'ADN reliées à la chromatine en réponse à l'acétylation constitutive de H3K56, ce qui requerrait les activités de Slx4 pour leur résolution.

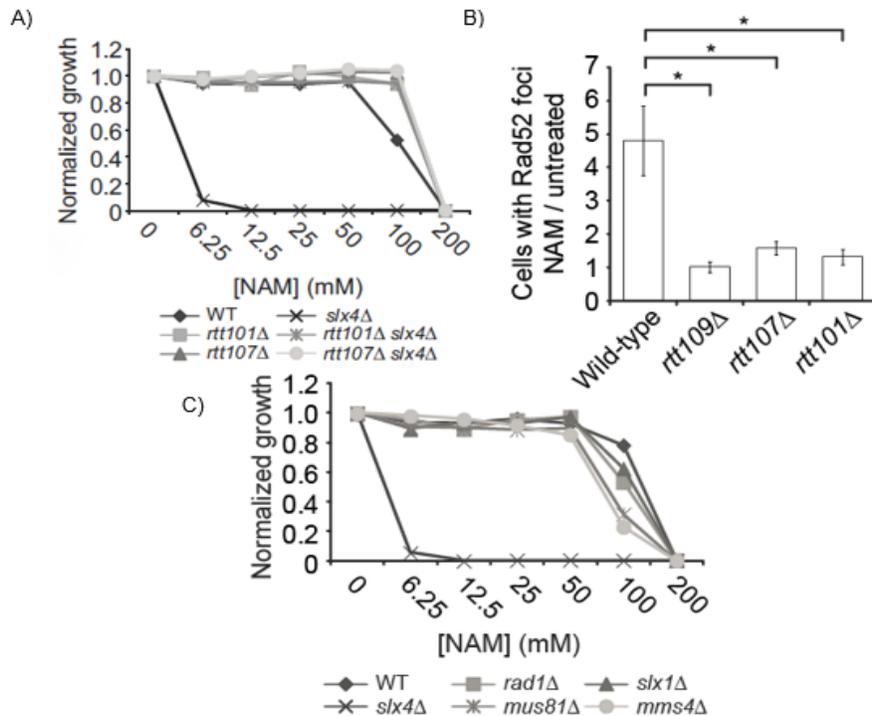


Figure 11 La sensibilité du mutant *slx4Δ* en NAM requiert une contribution de H3K56ac, Rtt101 et Rtt107, et non celle de la voie de résolution des jonctions d'Holliday. A) La mutation des gènes *RTT101* et *RTT107* ne présentent pas de défauts de croissance en NAM. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. B) La délétion de ces gènes, ainsi que celle de *RTT109*, diminuent le niveau

d'induction de dommages spontanés à l'ADN. Les cellules ont été traitées pendant 8 heures à 20 mM NAM et des échantillons pour la microscopie à fluorescence ont été recueillis au temps 0 et après traitement. Le graphique représente le ratio de Rad52-YFP sur le non traité. C) Les mutations de gènes d'endonucléases interagissant avec Slx4 ne sont pas influencées par le NAM. Les cellules ont été traitées comme en A). Collaboration : Antoine Simoneau (figure C)

Nous avons vérifié quelles fonctions de Slx4 pouvaient influencer la prolifération cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN induits par l'hyperacétylation de H3K56. Slx4 forme des complexes endonucléases avec Mus81-Mms4, Rad1-Rad10 et Slx1 en réponse aux dommages à l'ADN, ce qui permet la résolution des jonctions d'Holliday pour la réparation de l'ADN (246,248,319). Il fut observé par un test de croissance que la délétion des gènes impliqués dans ces voies de réparation cause peu de sensibilité en NAM, contrairement au défaut de croissance du mutant *slx4Δ* (figure 11C). Ceci suggère que la perte de ces fonctions n'a aucune influence sur la sensibilité de la cellule en l'absence de Slx4, et que d'autres fonctions de cette protéine seraient influencées lors d'inhibition des sirtuines. Nous ne pouvons toutefois pas exclure la possibilité qu'une inhibition simultanée de ces voies de résolution puisse affecter les phénotypes du mutant *slx4Δ* en présence de NAM. Il est connu que le complexe Slx4-Rtt107 permet l'atténuation de la RDA par concurrence avec la protéine adaptatrice Rad9 pour la liaison à γ H2A, ce qui limite l'activation de la kinase Rad53 (48,199). Comme le crible a identifié des éléments du complexe phosphatase PP4 en tant que régulateurs de la sensibilité en NAM (figure 9A), nous nous sommes intéressés à la réponse cellulaire de ces mutants.

La protéine phosphatase Pph3 permet l'atténuation de la réponse aux dommages à l'ADN en réponse à l'hyperacétylation de H3K56

Le complexe phosphatase PP4 de la levure comporte trois sous-unités, soit Pph3, Psy2 et Psy4 (210,320). Ce complexe déphosphoryle la kinase Rad53 ainsi que l'histone H2A, étant toutes deux cibles de la kinase Mec1, ce qui atténue cette voie de signalisation (198,211,321). Le crible chimiogénétique indique que les délétions des gènes *PPH3* et *PSY2* confèrent une sensibilité au NAM à 5 et 20 générations chez les levures diploïdes (figure 9A). Les mutants haploïdes *pph3Δ* et *psy2Δ*, mais non *psy4Δ*, présentent un défaut de croissance à faibles concentrations en NAM (figure 12A). Par cytométrie, il a été observé que le mutant *pph3Δ* ne

parvient pas à compléter le cycle cellulaire et demeure bloqué en phase S en présence de NAM (figure 12C). Pour évaluer si ce défaut de croissance dépendait de l'hyperacétylation de H3K56, un test de croissance dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ* a été réalisé, et la mutation du gène *PPH3* dans ce cadre génétique induit une létalité synthétique (figure 12B). La délétion du gène de l'acétyltransférase *RTT109* restaure le niveau de croissance du mutant *pph3Δ* à concentrations élevées en NAM (figure 12A) et sa progression dans le cycle cellulaire (figure 12C). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'un des phénotypes observés dans les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en réponse à l'hyperacétylation de H3K56 est une forte activation de la voie de signalisation de la kinase Rad53, ce qui concorde avec des résultats publiés pour un double mutant *hst3Δ hst4Δ* (60). Notons que la sous-unité Psy4 est impliquée dans la déphosphorylation de γ H2A et non celle de Rad53 (198), ce qui explique la croissance du mutant *psy4Δ* observée en présence de NAM (figure 12A).

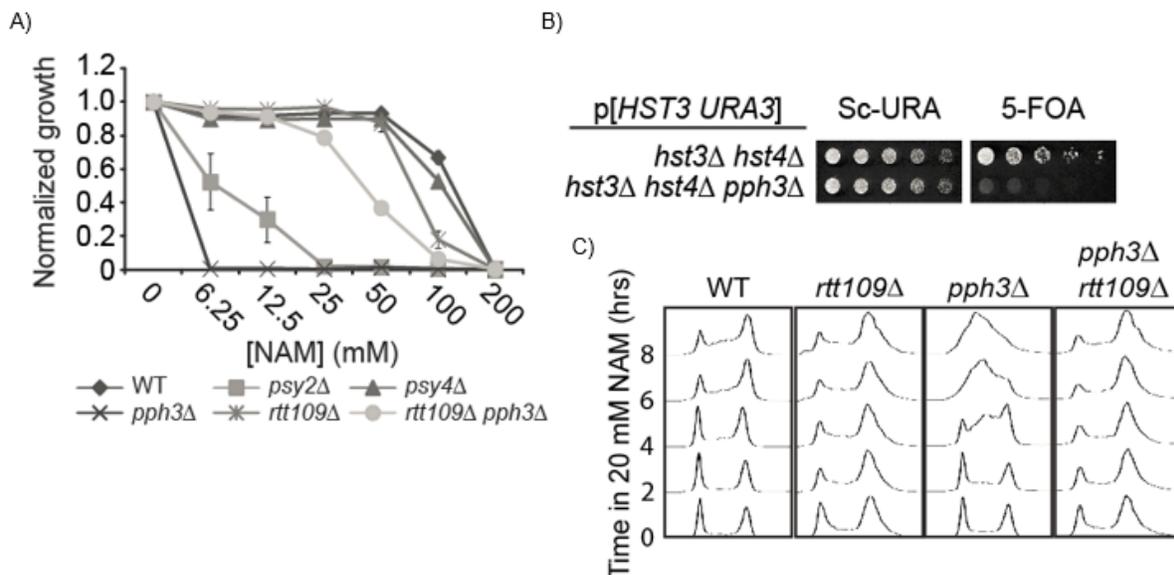


Figure 12 Le mutant *pph3Δ* est sensible à l'hyperacétylation de H3K56 induite par le NAM. A) *pph3Δ* et *psy2Δ* présentent des défauts de croissance en présence d'hyperacétylation de H3K56. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. B) *pph3Δ* cause une létalité synthétique avec l'absence de Hst3 et Hst4. Les cellules ont été diluées en série, puis répliquées sur la plaque correspondante et incubées à 25°C. C) *pph3Δ* bloque durant la phase S du cycle cellulaire de manière dépendante de H3K56ac. Des cellules en croissance exponentielle ont été traitées à 20 mM NAM pendant 8 heures, puis collectées pour l'analyse par cytométrie en flux. Collaboration : Antoine Simoneau (figure A)

Réduire le niveau d'activation de la kinase Rad53 restaure la croissance des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* lors d'hyperacétylation de H3K56

Les gènes *SLX4* et *PPH3* codent pour des protéines servant à atténuer la voie de signalisation de Rad53 (198,199). Il est possible que l'absence de ces atténuateurs entraîne une hyperphosphorylation de la kinase Rad53, qui a la capacité de s'autophosphoryler lorsqu'elle est pleinement activée (187). Par essais kinase *in situ*, il fut observé que le niveau d'activation de Rad53 est augmenté de manière significative dans les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* après 3-4 générations du type sauvage en réponse au NAM (figure 13A). Par contre, le NAM n'augmente pas la fréquence de foyers Rad52-YFP dans les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* comparativement au type sauvage (figure 13B), ce qui suggère que ces mutants ne présentent pas plus de lésions d'ADN en réponse au NAM, mais activent anormalement Rad53.

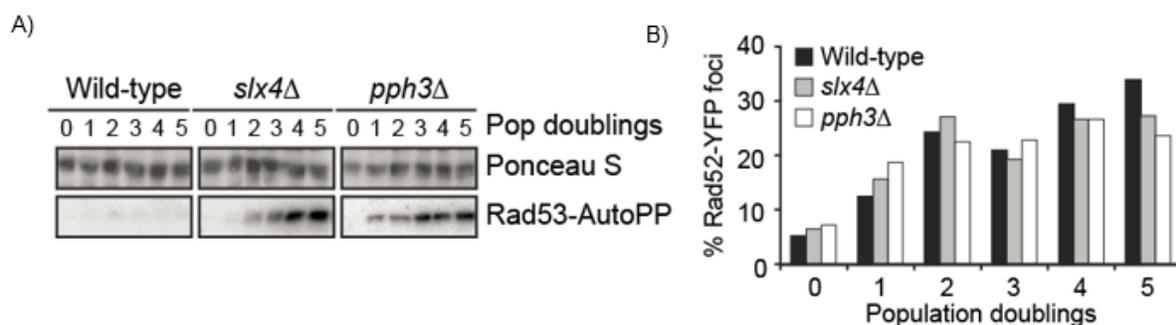


Figure 13 Les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* présentent une hyperactivation de la kinase Rad53 en présence de NAM. A) Rad53 est fortement activé en absence d'atténuateurs de la voie de signalisation. Les cellules ont été traitées pendant 5 générations de dédoublement (correspondant à celle du type sauvage) à 20 mM NAM. Les échantillons ont été collectés aux temps respectifs pour un essai kinase *in situ*. B) *slx4Δ* et *pph3Δ* ne présentent pas de lésions supplémentaires à l'ADN par leur quantité de foyers Rad52. Comme en A), les cellules ont été traitées pendant 5 générations de dédoublement à 20 mM NAM, puis collectées aux temps correspondants pour procéder à la microscopie à fluorescence.

Ces résultats suggèrent qu'il y a une forte activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN par la kinase Rad53 dans ces conditions (figures 8 et 13). Il demeure à savoir si cette activation est la cause de la létalité de ces mutants en réponse au NAM. Nous avons émis l'hypothèse que la suppression de l'un des éléments impliqués dans la voie d'activation de Rad53 pourrait renverser le phénotype observé des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en absence d'activité des sirtuines. Il a été démontré que l'activation de Rad53 dans un double

mutant *hst3Δ hst4Δ* dépendait de la protéine adaptatrice Rad9, qui médie sa phosphorylation de façon dépendante à Mec1 (60,109,180). La mutation du gène de *RAD9* restaure les niveaux de croissance des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en présence de NAM de manière semblable au type sauvage (figure 14A), et atténue le niveau d'autophosphorylation de Rad53 (figure 14B). De plus, la mutation *rad9Δ* restaure la progression dans le cycle cellulaire des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* exposés au NAM (figure 14C).

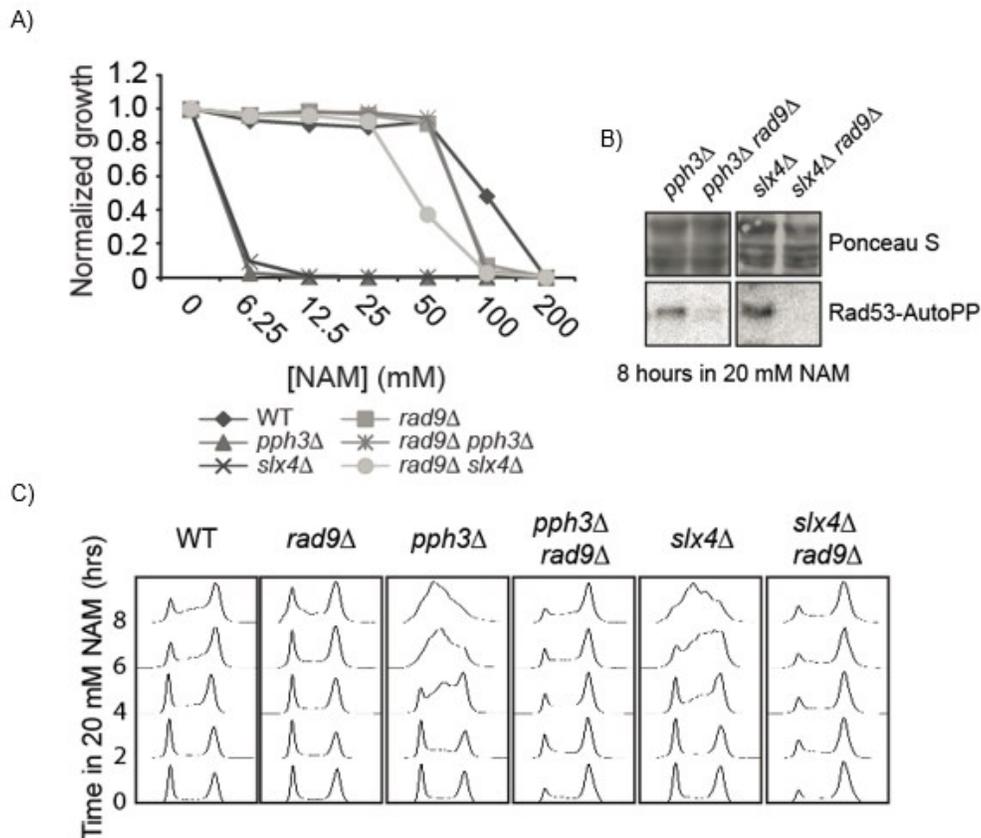


Figure 14 La délétion de *RAD9* diminue l'activation de la kinase Rad53 et renverse les phénotypes de *slx4Δ* et *pph3Δ* en absence d'activité des sirtuines. A) *rad9Δ* permet de restaurer la croissance de ces mutants en NAM. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. B) *rad9Δ* permet d'atténuer le signal de la kinase Rad53 dans ces mutants. Les cellules ont été traitées à 20 mM NAM pendant 8 heures. Les échantillons ont été collectés pour un essai kinase *in situ*. C) Le mutant *rad9Δ* redémarre la progression du cycle cellulaire de ces mutants. Des cellules en croissance exponentielle ont été traitées à 20 mM NAM pendant 8 heures, puis collectées pour l'analyse par cytométrie en flux.

La protéine Rad9 se lie à la chromatine endommagée sur deux sites : la phosphorylation de la sérine 128 de l'histone H2A (γ H2A) (171) et la triméthylation de la lysine 79 de l'histone H3 (H3K79me3) (181). Comme Rad9 peut se lier à γ H2A par son domaine BRCT, nous avons vérifié si l'inhibition de cette modification diminuait l'activation de Rad53 en utilisant une souche où la sérine 128 est mutée par une alanine (*H2A-S128A*), donc non phosphorylable. La mutation de ce résidu restaure la croissance des mutants *slx4* Δ et *pph3* Δ à hautes concentrations de NAM, de manière semblable au type sauvage (figure 15A). La méthyltransférase Dot1 est responsable pour H3K79me3, et Rad9 s'y lie par son domaine Tudor (45). Nous voulions vérifier si cette modification pouvait contribuer à l'hyperactivation de la RDA en mutant le gène de *DOT1*, ce qui abolit H3K79me3. Comme pour *H2A-S128A*, le mutant *dot1* Δ restaure la croissance des mutants *slx4* Δ et *pph3* Δ , quoique partiellement dans le dernier cas (figure 15B). Puisque la sous-unité Pph3 est recrutée à γ H2A pour sa déphosphorylation (211), cela pourrait expliquer la restauration partielle du double mutant *pph3* Δ *dot1* Δ comparativement à *pph3* Δ *H2A-S128A*. En somme, ces résultats suggèrent qu'en réponse à l'hyperacétylation de H3K56, les mutants *slx4* Δ et *pph3* Δ présentent une activation persistante de la kinase Rad53 de manière dépendante à Rad9, ce qui cause des défauts de croissance cellulaire.

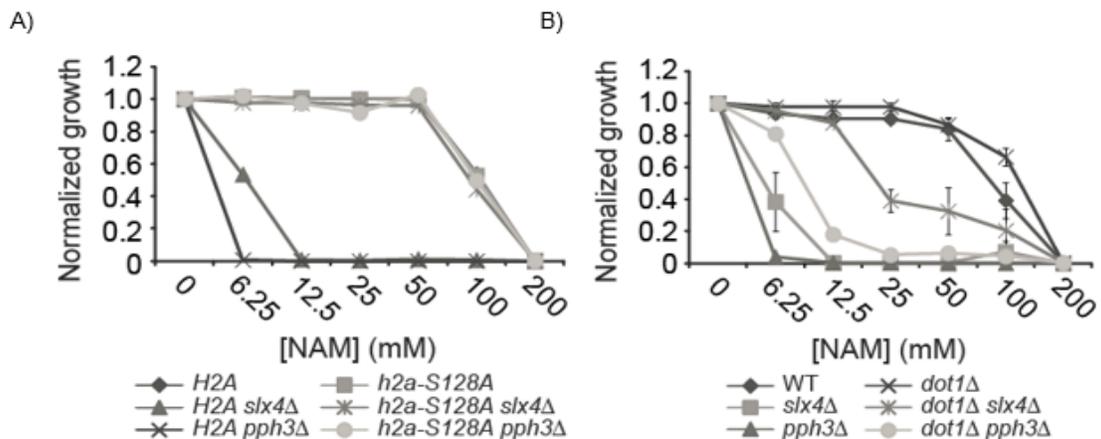


Figure 15 Empêcher la phosphorylation de H2A ou la triméthylation de H3K79 restaure la croissance de *slx4* Δ et *pph3* Δ en présence de NAM. A) La mutation du site de phosphorylation de H2A en alanine renverse les phénotypes de ces mutants en NAM. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. B) La mutation du gène de la méthyltransférase *DOT1* renverse également les

phénotypes observés, mais à moins grande efficacité. Les cellules ont été traitées comme en A).

L'hyperactivation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN affecte la complétion de la réplication de l'ADN des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ*

Nous voulions savoir si l'hyperactivation de la kinase Rad53 pouvait se traduire par une incapacité des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* à compléter la réplication de l'ADN. L'un des rôles de Rad53 est d'arrêter le cycle cellulaire en retardant la réplication de l'ADN par l'inhibition des origines tardives (189). Rad53 phosphoryle les protéines Dbf4 et Sld3, ce qui empêche l'initiation de la réplication aux origines tardives (188). Nous voulions observer si cette inhibition pouvait contribuer à la sensibilité de *slx4Δ* et *pph3Δ* en réponse au NAM. Nous avons utilisé une souche de levure W303 où les sites de phosphorylation de Dbf4 et Sld3 sont mutés en alanines (*dbf4-4A sld3-A*), ce qui les rend non phosphorylables. Ceci n'empêche pas l'activation de Rad53, mais évite l'inhibition des fourches tardives en présence de dommages à l'ADN (188). La mutation *dbf4-4A sld3-A* restaure partiellement le niveau de croissance des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en concentrations croissantes en NAM (figure 16A), et l'activation des origines tardives prévient l'accumulation en phase S des mutants en permettant de redémarrer partiellement leur progression dans le cycle cellulaire (voir la description de la figure pour le choix des concentrations utilisées en NAM) (figure 16B). Ces mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* s'accumulent moins en phase S que ceux observés précédemment (figures 10C, 12C et 14C), car ces résultats-ci sont présentés dans des souches W303³. Pour une raison inconnue, il semble que les souches de type BY s'accumulent en début de phase S, alors que celles W303 bloquent en fin S/début G2. Néanmoins, ces données suggèrent que l'hyperactivation de la kinase Rad53 dans les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* entraîne l'inhibition des protéines Dbf4 et Sld3 en réponse à l'hyperacétylation de H3K56, ce qui contribue aux défauts de progression dans le cycle cellulaire.

³ Comme le mutant *dbf4-4A sld3-A* provenant de la collection du Dr John Diffley est de type W303, l'expérience fut également réalisée à l'aide de souches W303 pour pouvoir conserver le même génotype.

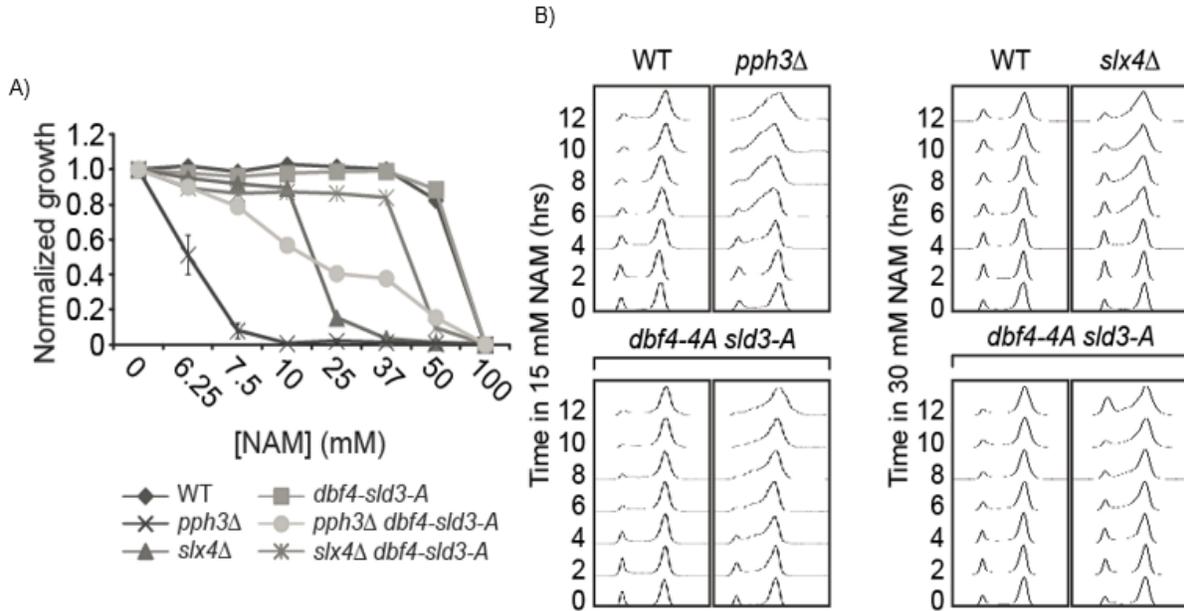


Figure 16 L'inhibition des origines tardives dépendante de Rad53 contribue aux défauts de croissance des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en NAM. A) La mutation des sites de phosphorylation de Dbf4 et Sld3 restaure partiellement la croissance de ces mutants. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. B) L'inhibition des origines tardives contribue au défaut de réplication des mutants. Des cellules en croissance exponentielle ont été traitées avec 15 mM NAM (dans le cas de *pph3Δ*) ou 30 mM NAM (dans le cas de *slx4Δ*) pendant 12 heures. Le choix de la concentration de NAM à utiliser correspond aux valeurs inhibitrices minimales observées en A). Les cellules ont été collectées pour l'analyse par cytométrie en flux.

La polymérisation de translésion (TLS) permet de compléter la réplication de l'ADN des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en présence de stress réplcatif

Nous voulions investiguer si d'autres mécanismes influencés par l'activation de Rad53 pouvaient contribuer aux défauts de complétion de la réplication dans les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ*. Lors de dommages à l'ADN, Rad53 inhibe la voie de tolérance mutagénique par polymérisation de translésion (TLS) en réponse au méthanesulfonate de méthyle (MMS), par des mécanismes mal compris. En effet, des mutations venant abolir l'activation de la kinase Rad53, comme *dot1Δ*, restaurent l'activation du TLS en présence de MMS (183,283). Comme il a été démontré que la sensibilité du double mutant *hst3Δ hst4Δ* serait d'une part causée par l'inhibition de la polymérase- ζ , nous voulions vérifier si l'inhibition du TLS pouvait

contribuer aux défauts de réplication dans nos mutants en réponse au NAM (60,280,322). Puisque cette partie a été entièrement réalisée par les autres membres du projet, les résultats de cette sous-section ont été inclus en annexe (figure 26). Sommairement, il fut observé que la mutation de la lysine 164 de PCNA par une arginine et la mutation du gène de *RAD18* sensibilise les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* à de faibles concentrations en NAM, même lors d'atténuation de la kinase Rad53. Ceci suggère que le TLS peut être une voie de tolérance requise pour la réponse cellulaire en NAM lors d'hyperactivation de la kinase Rad53. Toutefois, la délétion du gène de *REV3* n'influence pas le phénotype des mutants en présence de NAM, même en absence de Dot1. Donc, si le TLS était sollicité en cas d'hyperacétylation de H3K56, il pourrait y avoir l'implication d'une autre polymérase de translésion pour promouvoir cette voie de tolérance aux dommages à l'ADN (TDA). Pour approfondir le rôle du TLS dans les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ*, nous avons utilisé le MMS dans les expériences suivantes, car il est connu que les 3-méthyleadénines produites par cet agent génotoxique sont traitées en majeure partie par Polζ (283).

Rev3 est la sous-unité catalytique de la polymérase-ζ permettant d'initier le TLS. Elle est connue pour médier la réponse mutagénique d'un mutant *slx4Δ* en présence de MMS (200). Pour vérifier si cette voie de tolérance dirigée par Polζ peut contribuer à la réplication de l'ADN des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ*, nous avons procédé à des tests de croissance sur milieu YPD en présence ou non de MMS. La délétion de *DOT1* restaure le niveau de croissance de ces mutants, et la délétion de *REV3* les sensibilise de nouveau, ce qui suggère que l'effet d'atténuation de la RDA permet le TLS (figure 17A-B). Les mutations *slx4Δ* ou *pph3Δ* combinées avec la mutation de *REV3* confèrent une forte sensibilité au MMS, et *dot1Δ* reverse partiellement ces phénotypes (figure 17A-B). Cela indique que la viabilité de *slx4Δ* ou *pph3Δ* par la délétion de *DOT1* nécessite les activités de Polζ en présence de MMS. Ces mutants, de manière analogue au phénotype observé en NAM, bloquent en phase S du cycle cellulaire en réponse au MMS (196,200). Pour vérifier si l'inhibition du TLS par la kinase Rad53 contribue à ces phénotypes, nous avons synchronisé des cellules en G1 par utilisation de la phéromone facteur-α, puis nous les avons relâchées en phase S dans un milieu contenant 0,03% de MMS. Les résultats de cytométrie, après 8h de relâchement, démontrent une accumulation en phase S des mutants *slx4Δ* ou *pph3Δ*, ce qui était attendu (figure 17C). La

délétion de *DOT1* permet de restaurer leur progression dans le cycle cellulaire de manière semblable au type sauvage, soit par un retour en phase G1 et S entre 4 et 6h de relâchement en MMS (figure 17C). Cependant, la délétion de *REV3* n'affecte pas les défauts de progression des mutants *slx4Δ* ou *pph3Δ*, mais empêche le retour en G1 des mutants *dot1Δ*, *pph3Δ dot1Δ* et *slx4Δ dot1Δ* par un blocage en phase G2/M (figure 17C).

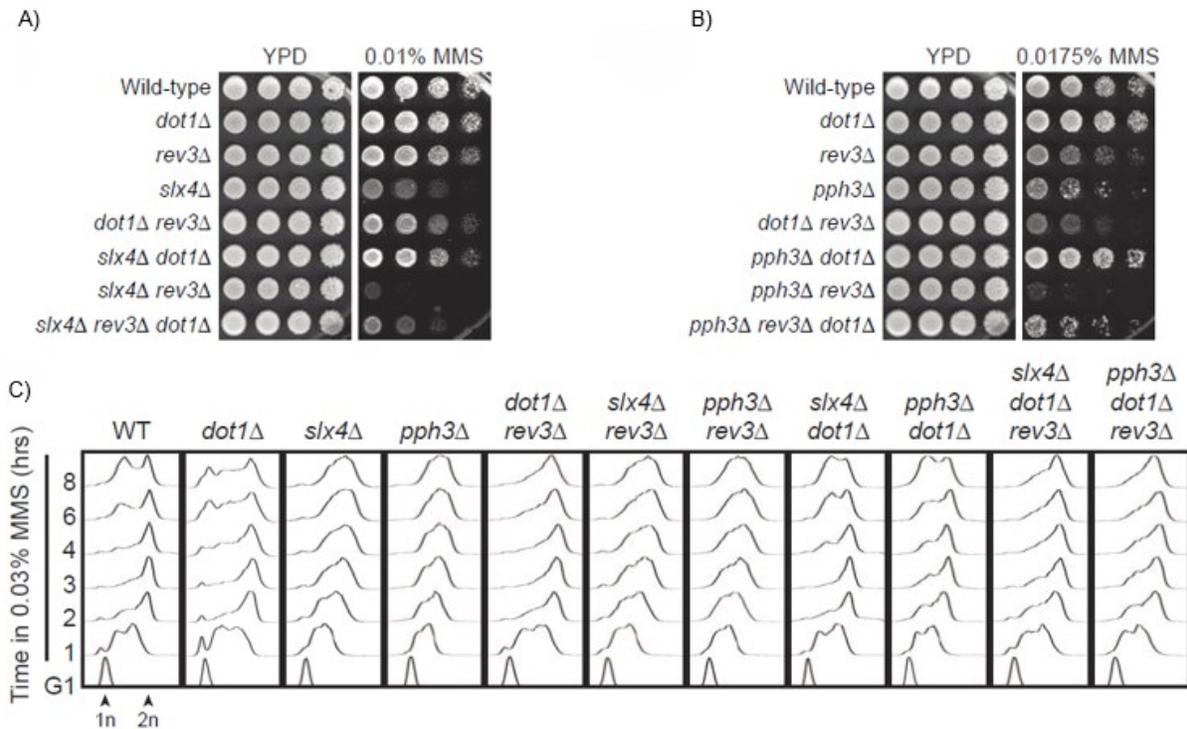


Figure 17 La polymérisation de translésion permet la complétion du cycle cellulaire, mais non la progression de la réplication de l'ADN. A) et B) La mutation du gène *REV3* affecte la croissance des mutations *slx4Δ* et *pph3Δ* dans un génotype *dot1Δ* en réponse au MMS. Les cellules ont été diluées en série, puis répliquées sur les plaques en concentration de MMS correspondantes et incubées à 30°C. C) L'absence de la sous-unité catalytique de Pol-ζ, Rev3, influence la progression du cycle cellulaire même en absence de *DOT1*. Les cellules ont été synchronisées en G1 avec le facteur-α, puis relâchées en phase S dans un milieu YPD contenant 0,03% MMS pendant 8 heures. Les cellules ont été collectées aux temps respectifs puis analysées par cytométrie en flux. Contenu en ADN : 1n (phase G1), 2n (phase G2). Collaboration : Antoine Simoneau (figure A et B)

Ces résultats suggèrent que l'absence de la méthyltransférase Dot1 permet d'atténuer Rad53 en présence de MMS, ce qui entraîne la complétion de la réplication de l'ADN par le TLS de manière dépendante à Polζ (283). Rev3 pourrait enclencher cette voie de tolérance principalement en fin S/début G2/M et non directement en phase S, donc ces événements ne

seraient pas couplés à la réplication de l'ADN (277). En somme, l'inhibition du TLS par Rad53 contribue en partie aux défauts de croissance des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* lors de stress réplcatif, sans toutefois influencer leur progression en phase S.

Résultats non-publiés

La deuxième partie de cette section comprend des résultats préliminaires provenant d'un projet entamé au cours de ma deuxième année de maîtrise. Globalement, ce projet est en continuité avec le crible chimiogénétique présenté en première partie. Certains résultats inclus dans l'annexe appuient l'information au besoin.

L'hélicase Srs2 est essentielle à la croissance cellulaire lors d'inhibition des sirtuines, de manière dépendante et indépendante de l'état de la chromatine

Nous sommes retournés au crible chimiogénétique dans le but d'investiguer d'autres voies cellulaires influencées par le NAM (figure 9). Autres que l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN, différents processus sont altérés en réponse à l'inhibition des sirtuines dont la réponse au stress réplcatif et la recombinaison de l'ADN (figure 9B). Dans la même optique, nous voulions examiner la base moléculaire des défauts de recombinaison à l'ADN observés dans les mutants de H3K56ac en nous penchant sur des gènes impliqués dans ces voies de réparation. Nous nous sommes intéressés à un mutant de gène fonctionnellement conservé dans l'évolution et validé dans le «fitness assay» comme sensible à 20 mM NAM, soit le mutant *srs2Δ* (Z-scores de 7 et 4, respectivement) (figure 18). Ce gène code pour une anti-recombinase qui régule les événements de recombinaison homologue (RH) en désassemblant les filaments Rad51 sur l'ADN simple-brin (249,323,324). Nous voulions vérifier si ce mutant générait à fréquence anormalement élevée des structures de recombinaison d'ADN en présence de NAM, et si ces phénotypes dépendaient de l'hyperacétylation de H3K56.

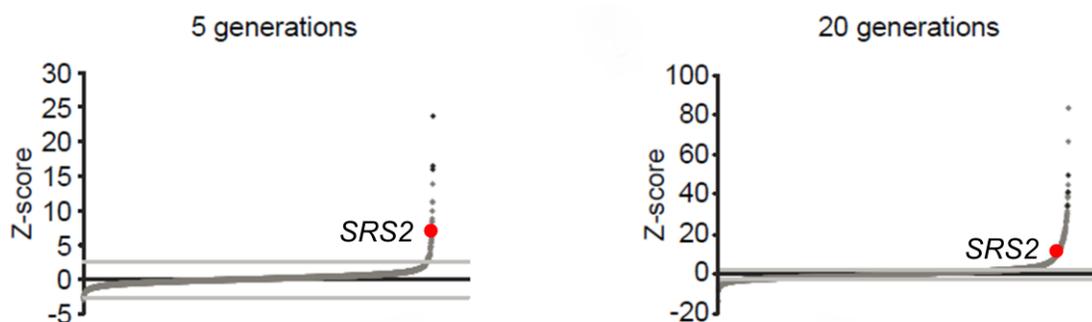


Figure 18 Retour sur le crible chimiogénétique. Le NAM influence d'autres réponses cellulaires autres que l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN, comme par exemple les niveaux de recombinaison à l'ADN (figure 9B). Le gène identifié ici (*SRS2*) est ressorti comme mutant sensible au NAM à 5 et 20 générations et est indiqué dans les graphiques selon son Z-Score (point rouge).

La mutation *srs2Δ* cause une létalité synthétique lorsque combinée à des mutations dans les gènes encodant les sirtuines Hst3 et Hst4 (109). Ce résultat fut confirmé avec un test de croissance dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ*, où l'absence de *SRS2* induit une létalité synthétique (figure 19A). Pour savoir si cette létalité était causée par un effet combinatoire des mutants *hst3Δ* et *hst4Δ*, nous avons effectué un croisement génétique d'un mutant *srs2Δ* avec *hst3Δ* ou *hst4Δ* seulement, et aucun des doubles mutants générés ne présente des défauts de croissance (figure 19B). Ceci suggère que l'hyperacétylation de H3K56, par l'absence combinée de Hst3 et Hst4, cause la létalité synthétique du mutant *srs2Δ*. Il fut suggéré dans la littérature que la létalité de ce triple mutant était indépendante de H3K56ac, car la mutation non acétylable *H3K56R* ne pouvait renverser ce phénotype (109). À l'inverse, nos résultats indiquent que la délétion du gène de l'acétyltransférase *RTT109* parvient à restaurer la croissance de *srs2Δ* dans un mutant *hst3Δ hst4Δ*, de même qu'un mutant du gène de la chaperonne *ASF1*, impliqué dans l'acétylation de H3K56 (figure 19A) (82). Il est possible que d'autres cibles d'Asf1 et Rtt109 puissent contribuer à la létalité synthétique entre *hst3Δ hst4Δ* et *srs2Δ*, même si la cible majeure du complexe Asf1-Rtt109 est H3K56ac (82,87). Par un test de croissance en NAM, la délétion haploïde de *SRS2* présente un défaut de croissance à de faibles concentrations (figure 19C-D). De manière contradictoire, les mutations *rtt109Δ*, *asf1Δ* et la mutation *H3K56A* (qui empêche l'acétylation à cette position) ne peuvent renverser ce phénotype (figure 19C-D). Ces résultats suggèrent que le NAM induit une réponse cellulaire dans le mutant *srs2Δ* qui n'est pas uniquement reliée à l'hyperacétylation de H3K56.

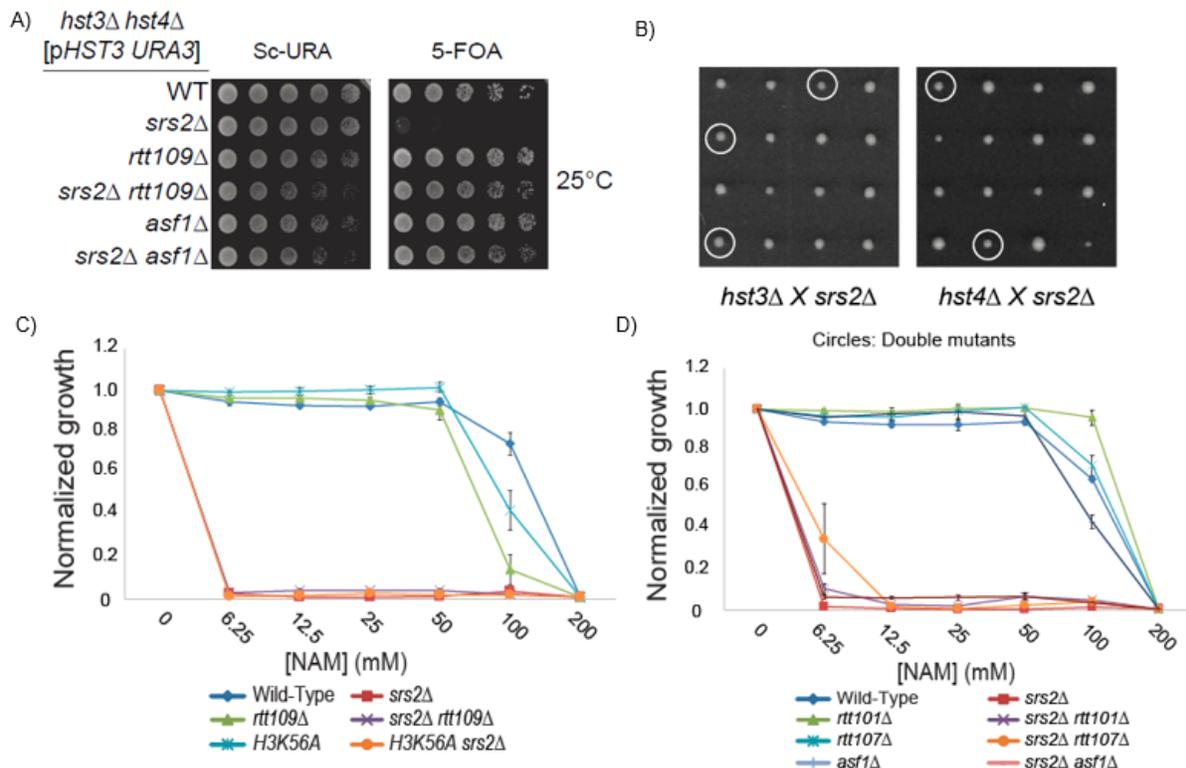


Figure 19 Le mutant *srs2Δ* est sensible à l'inhibition des siruines par le NAM, de manière dépendante et indépendante de H3K56ac. A) *rtt109Δ* et *asf1Δ* restaurent la croissance de *srs2Δ* dans le double mutant *hst3Δ hst4Δ*. Les cellules ont été diluées en série, puis répliquées sur la plaque correspondante et incubées à 25°C. B) La létalité du mutant *srs2Δ* provient de la délétion combinée de *HST3* et *HST4*. Les mutants correspondants ont été croisés pour générer un diploïde, puis mis à sporulation pour la formation de tétrades. Les cercles blancs représentent les doubles mutants haploïdes. C) Prévenir l'acétylation de H3K56 n'influence pas les défauts de croissance de *srs2Δ* en NAM. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. D) Influencer la voie d'assemblage des nucléosomes n'affecte pas les défauts de croissance de *srs2Δ* en NAM. Les cellules ont été traitées comme en C).

Comme la délétion de *RTT109* restaure la croissance de *srs2Δ* en absence de Hst3 et Hst4 (figure 19A), nous nous sommes demandés si Srs2 jouait un rôle dans les voies cellulaires reliées à H3K56ac, dont l'assemblage des nucléosomes couplé à la réplication de l'ADN (58,113). La protéine d'échafaudage Rtt107 est recrutée à la chromatine par le complexe Ub-ligase Rtt101-Mms1-Mms22 de manière indépendante de H3K56ac (97,100). La délétion du gène de *RTT107* ou *RTT101* influence peu les phénotypes de *srs2Δ* par test de

croissance en NAM (figures 19D, 20B). Le complexe Rtt101-Mms1-Mms22 permet l'ubiquitination de H3K56ac et l'assemblage des nucléosomes par le transfert des histones à CAF-1 et Rtt106 pour leur déposition (98). Les mutants *mms1Δ* et *mms22Δ* influencent peu les défauts de croissance de *srs2Δ* en présence de NAM (figure 20B), mais la délétion de *MMS22* restaure marginalement les défauts de *srs2Δ* dans le double mutant *hst3Δ hst4Δ* (figure 20A). Cette réponse à la fois dépendante et indépendante de H3K56ac du mutant *srs2Δ* suggère l'implication de sirtuines autres que Hst3 et Hst4 dans les phénotypes observés lors d'un traitement au NAM.

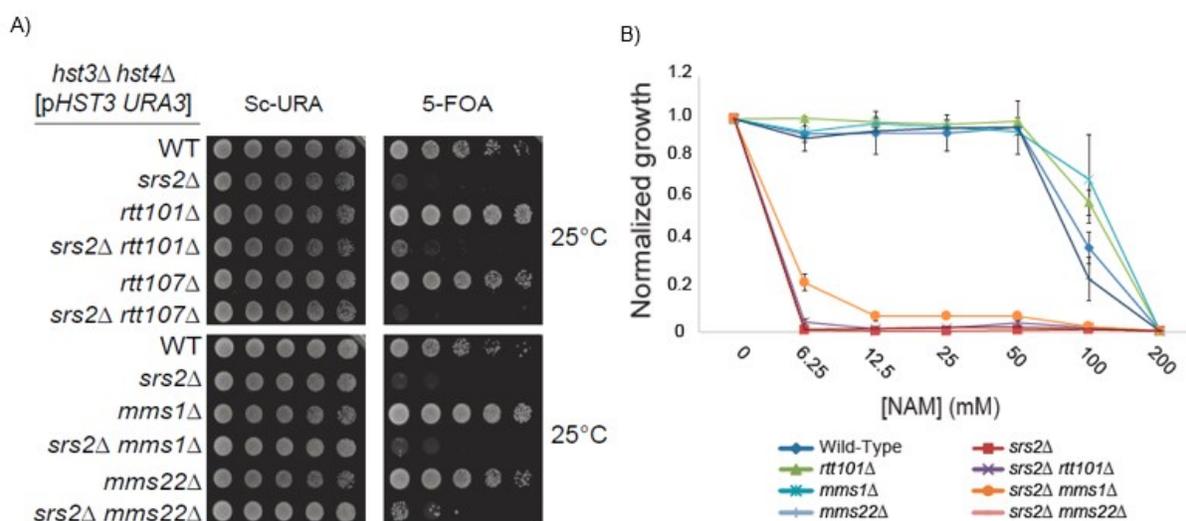


Figure 20 Les phénotypes du mutant *srs2Δ* en NAM ne sont pas associés à la voie d'ubiquitination de l'histone H3. A) La mutation de gènes impliqués dans l'assemblage des nucléosomes influence peu les défauts de croissance de *srs2Δ* dans le double mutant *hst3Δ hst4Δ*. Les cellules ont été diluées en série, puis répliquées sur la plaque correspondante et incubées à 25°C. B) La mutation de ces gènes n'influence pas les phénotypes de *srs2Δ* en NAM. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité.

Les défauts de croissance du mutant *srs2Δ* en présence de NAM pourraient être reliés à l'inhibition de sirtuines autres que Hst3 et Hst4

Les résultats précédents nous suggèrent que l'inhibition de sirtuines autres que Hst3 et Hst4 pourraient causer les phénotypes du mutant *srs2Δ* en NAM, indépendamment de l'hyperacétylation de H3K56. L'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16ac) est une

modification abondante de la chromatine qui est médiée par la sous-unité Sas2 du complexe SAS-I et retirée par les sirtuines Sir2 et Hst2 (68,69,149). Elle est indirectement impliquée dans la voie de H3K56ac, car le mutant non acétylable *H4K16R* supprime la thermosensibilité d'un double mutant *hst3Δ hst4Δ* (60) et améliore la croissance cellulaire en réponse au NAM (figure 25, annexe). Contrairement à celle de *RTT109*, la délétion du gène de l'acétyltransférase *SAS2* n'influence pas la létalité synthétique du triple mutant *hst3Δ hst4Δ srs2Δ* (figure 21A). Cette mutation ainsi que *H4K16A* (qui empêche l'acétylation à cette position) n'ont aucun effet sur les défauts de croissance de *srs2Δ* en NAM (figure 21C). L'inhibition simultanée de H3K56ac et H4K16ac, représentée par le double mutant *H4K16A rtt109Δ*, ne peut également pas restaurer la croissance du mutant *srs2Δ* en NAM (figure 21C). Toutefois, il ne faut pas exclure le fait que le mutant *H4K16A* pourrait ne pas simuler efficacement une lysine non acétylée. Ces résultats suggèrent que les phénotypes du mutant *srs2Δ* puissent être reliés à une combinaison de réponses cellulaires des sirtuines influencées par le NAM, qui solliciterait les activités de l'hélicase Srs2. La mutation des gènes des sirtuines *hst1Δ*, *hst2Δ* ou *sir2Δ* croisées avec celle de *srs2Δ* demeurant viables (figure 21B), cela nous pousse à investiguer cette possibilité.

Sir2 possède différents rôles cellulaires passant par la répression génique (114,129,325). Comme le mutant *rtt109Δ* reverse les phénotypes de *srs2Δ* dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ* mais non ceux en présence de NAM (figure 19A-C), nous avons postulé que la délétion du gène de *SIR2* (ou son absence d'activité) dans un double mutant *srs2Δ rtt109Δ* induirait une létalité synthétique. Par croisement génétique, le triple mutant *sir2Δ srs2Δ rtt109Δ* ne peut être généré (figure 21D, cercles). Cela suggère que les phénotypes de *srs2Δ* seraient influencés par l'hyperacétylation de H3K56 en absence de Hst3 et Hst4, mais l'inhibition des autres sirtuines (Hst1-2, Sir2) exacerberait ces défauts de manière indépendante au niveau d'acétylation de H4K16.

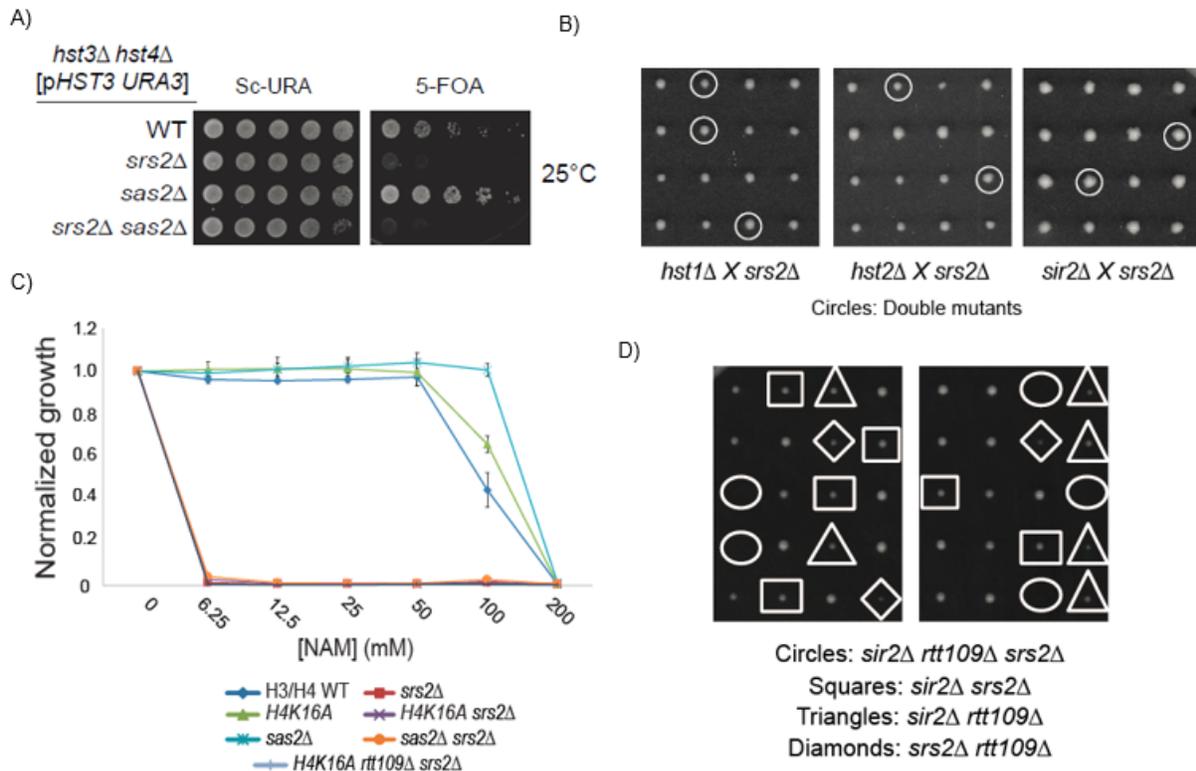


Figure 21 Les phénotypes du mutant *srs2Δ* en NAM ne sont pas associés à la voie d'acétylation de l'histone H4. A) *sas2Δ* n'influence pas la létalité synthétique de *srs2Δ* par l'absence de Hst3 et Hst4. Les cellules ont été diluées en série, puis répliquées sur la plaque correspondante et incubées à 25°C. B) La sensibilité du mutant *srs2Δ* en NAM serait due à l'inhibition combinée des sirtuines. Les mutations correspondantes ont été croisées pour générer un diploïde, puis mises à sporulation pour la formation de tétrades. Les cercles blancs représentent les doubles mutants haploïdes. C) Prévenir l'acétylation de H4K16 ou simultanément H3K56ac n'influence pas les défauts de croissance de *srs2Δ* en NAM. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. D) La combinaison des mutants *srs2Δ*, *sir2Δ* et *rtt109Δ* présente une létalité synthétique. Voir la description en B). Les carrés, triangles et losanges représentent chacun des doubles mutants.

L'activation de la réponse aux dommages à l'ADN est une conséquence et non la cause de la sensibilité du mutant *srs2Δ* au NAM

Comme l'hyperactivation de la kinase Rad53 était l'un des phénotypes majeurs observés dans les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en réponse au NAM (voir dans la première section), nous avons postulé que l'absence de *SRS2* pourrait entraîner une activité anormale de Rad53 lors d'inhibition des sirtuines. Par essai kinase *in situ*, le niveau d'autophosphorylation de

Rad53 augmente dans le mutant *srs2Δ* en NAM comparativement au type sauvage (figure 22A). La délétion des gènes de *RAD9* ou *DOT1*, impliqués dans l'activation de la kinase Rad53 (181), diminue son niveau d'activation dans le mutant *srs2Δ* (figure 22B). Notons que Rad53 demeure légèrement activée dans le simple mutant *dot1Δ* (figure 22B). Le double mutant *srs2Δ rtt109Δ* présente un niveau d'autophosphorylation de Rad53 comparable au simple mutant (figure 22B). Le mutant *srs2Δ* bloque également en fin de phase S/début G2 en réponse au NAM (figure 22C). Sa progression dans le cycle cellulaire est restaurée en l'absence de *RAD9*, *DOT1* et de manière moins efficace, *RTT109* (figure 22C). Nous avons observé la formation de ponts en anaphase, représentée par une liaison du DAPI entre deux cellules bourgeonnantes («DAPI bridges») visualisées par microscopie à fluorescence. Alors que le mutant *srs2Δ* bloque en pré-anaphase et présente plusieurs ponts en phase mitotique (257), l'absence de *RAD9* réduit la fréquence de ces structures (figure 22E). En somme, ces résultats suggèrent que l'activation de la kinase Rad53 serait l'une des causes de certains phénotypes du mutant *srs2Δ*, ce qui rejoint nos résultats présentés en première partie.

Nous voulions vérifier si la suppression d'éléments de la RDA pouvait contrer les défauts de croissance de *srs2Δ* en réponse au NAM. Par un test de croissance dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ*, la mutation des gènes *RAD9* et *DOT1* n'ont aucun effet sur la létalité synthétique générée par l'absence de *SRS2* (figure 22D). Ces délétions, ainsi que le mutant de l'histone H2A non phosphorylable (*H2A-S128A*), n'ont également aucun impact sur la croissance de *srs2Δ* à hautes concentrations de NAM (figure 23A). Ces résultats suggèrent que la kinase Rad53, même fortement activée, n'est pas responsable des défauts de croissance engendrés par l'absence de *SRS2* lors d'inhibition des sirtuines.

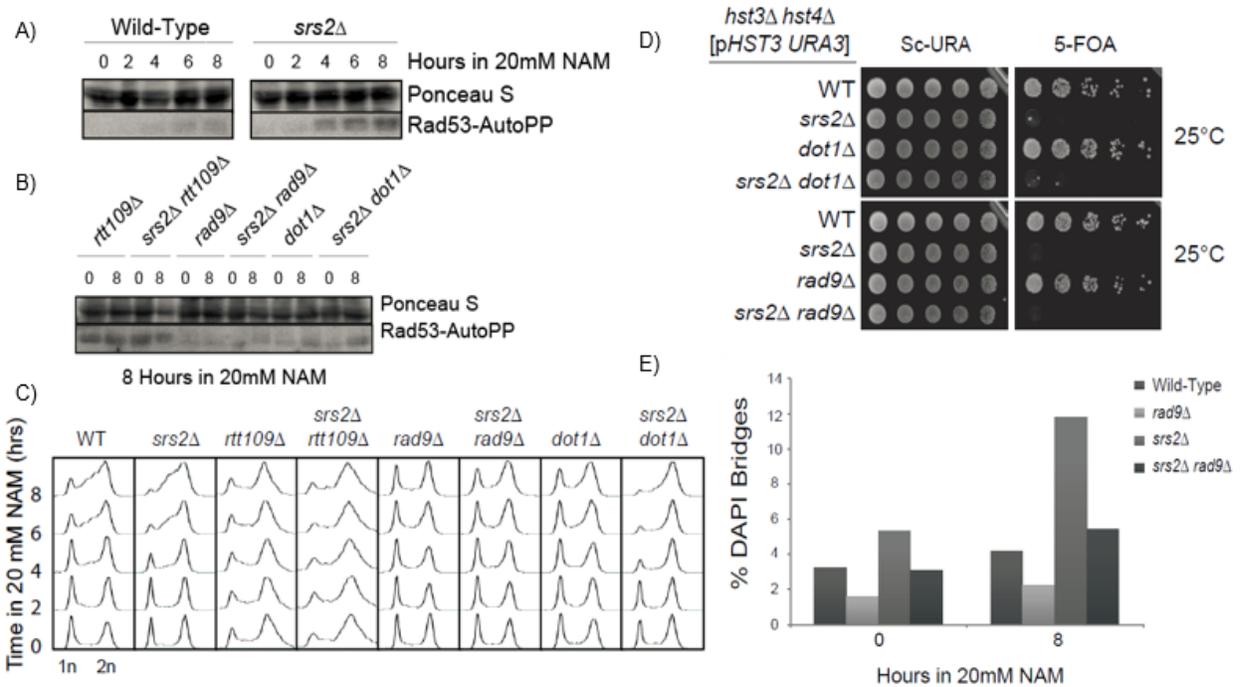


Figure 22 L’hyperactivation de la cascade de signalisation de Rad53 influence la complétion de la réplication de l’ADN du mutant *srs2Δ* en NAM. A) Rad53 est fortement activée en absence de Srs2. Les cellules ont été traitées à 20 mM NAM pendant 8 heures. Les échantillons ont été collectés aux temps correspondants pour un essai kinase *in situ*. B) *rad9Δ* et *dot1Δ* influencent peu le niveau du signal de la kinase Rad53 dans le mutant *srs2Δ*. Les cellules ont été traitées comme en A). C) Ces mutants restaurent la progression du cycle cellulaire de *srs2Δ*. Des cellules en croissance exponentielle ont été traitées à 20 mM NAM pendant 8 heures, puis collectées pour l’analyse par cytométrie en flux. D) Ces mutations ne peuvent renverser le phénotype du mutant *srs2Δ* en absence de Hst3 et Hst4. Les cellules ont été diluées en série, puis répliquées sur la plaque correspondante et incubées à 25°C. E) Le mutant *srs2Δ* présente plusieurs ponts en anaphase et sont diminués en absence de *RAD9*. Les cellules ont été traitées comme en A), et les échantillons ont été collectés pour la microscopie à fluorescence. Un pont en anaphase correspond à la liaison du DAPI entre deux cellules durant la mitose (DAPI bridges).

Srs2 permet de diriger la recombinaison homologue (RH) vers la réparation post-répllicative (RPR), ce qui inclut le changement de matrice (TS) et la polymérisation de translésion (TLS) (274,278,279). En plus de son rôle dans la réponse aux dommages à l’ADN (37,172), le PCNA alternatif (9-1-1 clamp) est impliqué dans l’initiation du TS (288). Le complexe SHU permet de médier les activités du TS par la formation des filaments intermédiaires Rad51 et l’inhibition de l’anti-recombinase Srs2 (268,269). Nous voulions observer par un test de croissance si l’absence de l’un de ces éléments renverserait les

phénotypes du mutant *srs2Δ* exposé au NAM. La délétion des gènes du 9-1-1 clamp *DDC1* et *RAD17*, mais non *MEC3*, restaurent partiellement le niveau de croissance de *srs2Δ* à hautes concentrations en NAM (figure 23B). Comme Mec3 est la sous-unité qui se lie à l'ADN (172), sa mutation pourrait expliquer l'absence d'effet dans un mutant *srs2Δ*. À l'opposé, la délétion de gènes du complexe SHU (*SHU1*, *SHU2*, *CSM2*, *PSY3*) n'a aucune influence sur les phénotypes de *srs2Δ* en présence de NAM (figure 23C).

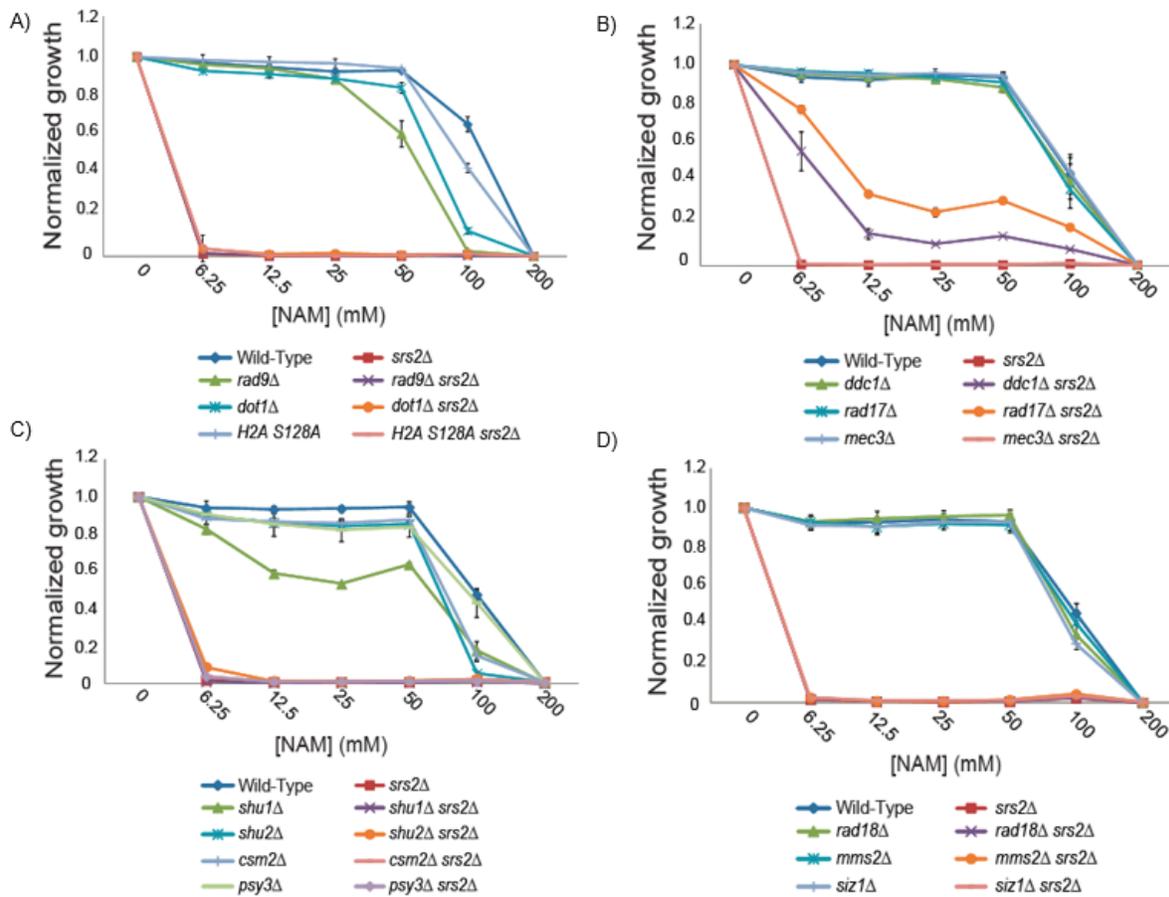


Figure 23 L'atténuation de la voie de signalisation de Rad53 ou des voies de tolérance aux dommages à l'ADN n'influence pas les phénotypes du mutant *srs2Δ* en NAM. A) Atténuer le niveau d'activation de la kinase Rad53 ne peut pallier les défauts de croissance de *srs2Δ* en NAM. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. B) L'absence d'activité de PCNA alternatif influence peu les défauts de croissance du mutant *srs2Δ*. Les cellules ont été traitées comme en A). C) L'absence d'activité du complexe SHU ne restaure pas la croissance du mutant *srs2Δ* lors d'inhibition des sirtuines. Les cellules ont été traitées comme en A). D) Prévenir la SUMOylation et l'ubiquitination de PCNA ne peut renverser les phénotypes de *srs2Δ* en NAM. Les cellules ont été traitées comme en A).

La SUMO-ligase Siz1 médie la SUMOylation de la lysine 164 de PCNA et permet le recrutement de Srs2 aux sites de lésions à l'ADN (255). Cette lysine peut être mono-ubiquitinée par le complexe Ub-ligase Rad6-Rad18 pour l'initiation du TLS, et poly-ubiquitinée subséquentement par le complexe Ub-ligase Mms2-Rad5-Ubc13 pour l'initiation du TS (233,278). Nous voulions observer si l'absence de modifications de PCNA influençait les phénotypes de *srs2Δ* au NAM en déplétant les gènes *RAD18*, *MMS2* et *SIZ1*. Ces simples mutants parviennent à croître à hautes concentrations en NAM, mais n'influencent pas les défauts de croissance de *srs2Δ* même à faibles concentrations (figure 23D). Cela suggère que Srs2 pourrait être recrutée à des sites de recombinaison en réponse au NAM de manière indépendante à la modification de PCNA.

L'inhibition des sirtuines entraîne la formation d'intermédiaires toxiques de Rad51 qui nécessitent leur retrait par la protéine Srs2

L'activité anti-recombinase de Srs2 permet le désassemblage des filaments pré-synaptiques de Rad51 sur l'ADN simple-brin invasif, ce qui empêche l'initiation de la recombinaison homologue (RH) (253,254). Pour évaluer si les phénotypes de *srs2Δ* pouvaient se traduire par des défauts de recombinaison, nous avons émis l'hypothèse que la suppression de gènes impliqués à la RH restaurerait la croissance du mutant en réponse au NAM. Il a été rapporté dans la littérature que la mutation *rad51Δ* permet la viabilité du double mutant (autrement létal) *srs2Δ sgs1Δ* en présence de stress répliatif (271,326). La délétion de *RAD51* restaure partiellement la croissance de *srs2Δ* dans le double mutant *hst3Δ hst4Δ*, tandis que le mutant *rad51Δ* confère un défaut de croissance à ce double mutant en présence de *SRS2* (figure 24A). Ces conditions causent une forte induction d'autophosphorylation de la kinase Rad53, semblable au simple mutant *srs2Δ* (figure 24B). Cela suggère que l'absence de Hst3 et Hst4 pourrait induire des défauts de recombinaison homologue (109). L'effet de la mutation de *RAD51* ainsi que d'autres gènes impliqués dans la RH, soit *RAD52*, *RAD55*, *RAD57* et *RAD59* sur la sensibilité du mutant *srs2Δ* ont été comparés (327). Excepté pour un double mutant *srs2Δ rad54Δ* qui présente une létalité synthétique (résultat non présenté) (256), la délétion des éléments de la RH renverse les phénotypes du mutant *srs2Δ* à hautes concentrations en NAM (figure 24C). Ces résultats suggèrent que le rôle de Srs2 en réponse à

l'inhibition des sirtuines est la modulation des événements de recombinaison homologue, qui sont mal résolus ou alors présents en trop grande proportion dans le génome. Comme le mutant *rad52Δ* présente un défaut de croissance en absence de Hst3 et Hst4 (109) et que le gène *RAD59* n'est pas directement impliqué à la RH, mais plutôt aux événements du SSA (328), cela explique l'absence de croissance de *rad52Δ* et *rad59Δ* en combinaison avec *srs2Δ* (figure 24C).

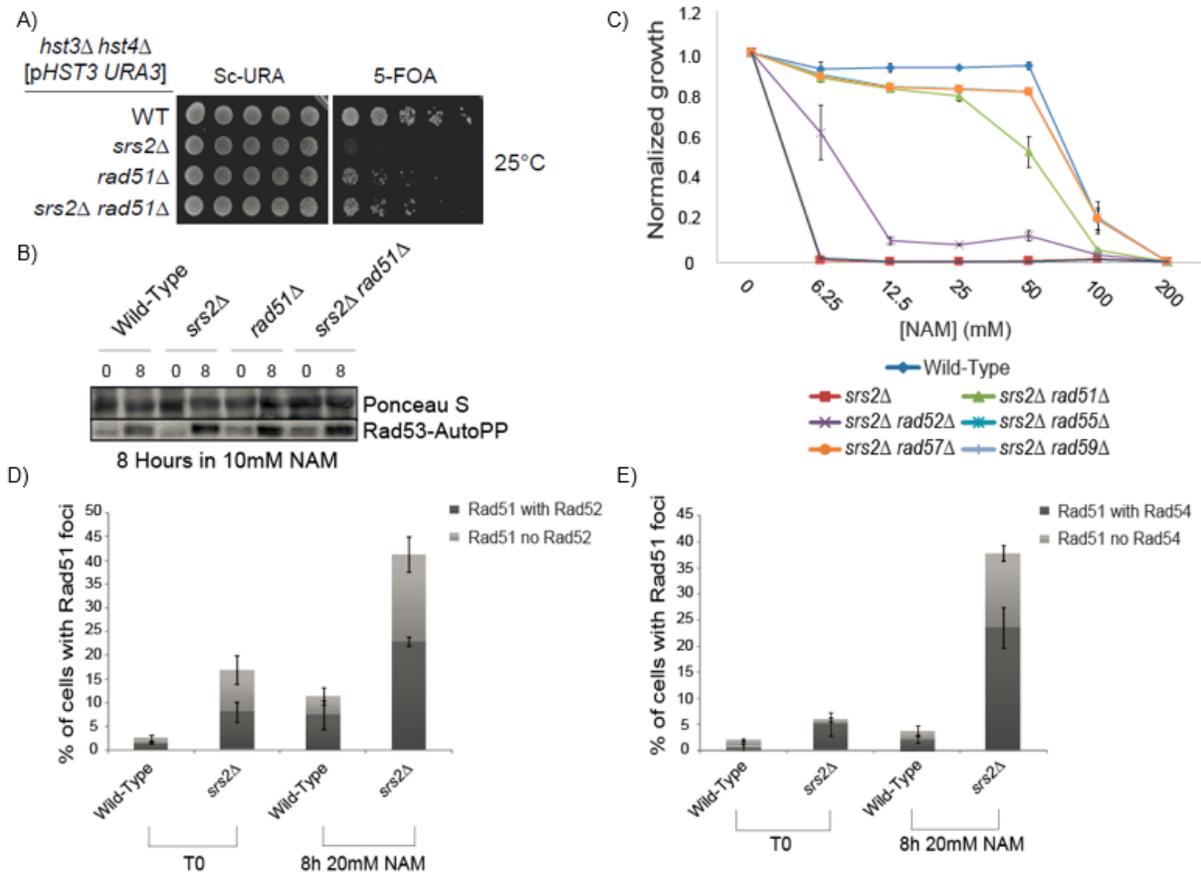


Figure 24 L'absence de Srs2 entraîne la formation de structures de recombinaison aberrantes qui s'avèrent létales pour la cellule en réponse au NAM. A) La délétion de *RAD51* supprime la létalité synthétique de *srs2Δ* dans le double mutant *hst3Δ hst4Δ*. Les cellules ont été diluées en série, puis répliquées sur la plaque correspondante et incubées à 25°C. B) La kinase Rad53 demeure hyperactivée dans le double mutant *srs2Δ rad51Δ*. Les cellules ont été traitées à 10 mM NAM pendant 8 heures. Les échantillons ont été collectés aux temps correspondants pour un essai kinase *in situ*. C) La délétion de gènes de recombinaison restaure la croissance du mutant *srs2Δ* en NAM. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. D) Le mutant *srs2Δ* présente une augmentation de la fréquence de foyers Rad51 et une absence de co-

localisation Rad51-Rad52 en présence de NAM. Les cellules ont été traitées pendant 8 heures à 20 mM NAM et des échantillons pour la microscopie à fluorescence ont été recueillis au temps 0 et après traitement. Le graphique représente le ratio de Rad51-YFP total et le niveau de co-localisation avec Rad52-CFP. E) Le NAM diminue les niveaux de co-localisation de Rad51 avec des foyers Rad54 en absence de Srs2. Les cellules ont été traitées comme en D), sauf que le niveau de co-localisation correspond aux foyers Rad54-YFP présents parmi ceux Rad51-CFP.

L'activité anti-recombinase de Srs2 est suggérée comme un mécanisme de contrôle : en présence de filaments Rad51 à des sites inappropriés sur le génome, Srs2 antagonise le rôle de Rad52 dans la modulation de ces filaments et ce dernier médie la reformation de ces structures aux endroits propices pour la réparation de l'ADN (266). Comme nos résultats suggèrent un défaut de la RH dans un mutant *srs2Δ* (figure 24C), nous postulons qu'il y pourrait y avoir une formation de structures de recombinaison aberrantes en présence de NAM, aggravée dans le cas de *srs2Δ*. Par microscopie à fluorescence, nous avons observé la fréquence de foyers Rad51-YFP (ou CFP) en présence ou en absence de *SRS2*, ainsi que leur co-localisation avec des foyers de recombinaison Rad52-CFP ou Rad54-YFP, qui sont requis pour la régulation des filaments pré-synaptiques (266,329). Le type sauvage présente une fréquence moindre de foyers Rad51, et un mutant *srs2Δ* entraîne une augmentation significative de cette fréquence (figure 24D-E) (266). La plupart des foyers Rad51 sont co-localisés avec des foyers Rad52 (figure 24D) et Rad54 (figure 24E). En absence de *SRS2*, une proportion de ces foyers est non localisée avec les recombinaisons, ce qui suggère la formation d'intermédiaires de recombinaison de manière indépendante aux rôles de Rad52 et Rad54, normalement requises pour l'assemblage des filaments Rad51 à l'ADN simple-brin (figure 24D-E). Cela suggère que le NAM entraîne la formation de filaments pré-synaptiques à des sites aberrants sur l'ADN, ce qui requiert l'activité de Srs2 pour retirer ces filaments de manière adéquate et préserver l'intégrité génomique. L'implication de ces résultats sera approfondie dans la discussion.

Conclusion et perspectives

Le travail présenté dans le cadre de ce mémoire met en lumière le rôle des déacétylases d'histones de la famille des sirtuines dans divers processus cellulaires chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nos résultats suggèrent que l'inhibition de leur activité catalytique par le pan-inhibiteur nicotinamide (NAM) entraîne des défauts de croissance de la levure par l'hyperactivation de la réponse aux dommages à l'ADN et par la formation de structures de recombinaison aberrantes qui influencent la complétion du cycle cellulaire. Les prochaines sous-sections reviennent sur certains aspects qui ont été observés suite à nos travaux.

Plusieurs mutations de gènes non essentiels de la levure *S. cerevisiae* confèrent une sensibilité au nicotinamide causée par l'hyperacétylation de H3K56

Nos résultats préliminaires ont démontré que l'inhibition des sirtuines par le NAM induit des dommages spontanés à l'ADN et que ces réponses sont causées majoritairement par l'hyperacétylation de H3K56, une conséquence de l'inhibition de Hst3 et Hst4 (80). Ces résultats sont compatibles avec les phénotypes connus d'un double mutant *hst3Δ hst4Δ*, qui présente une thermosensibilité, l'apparition de dommages spontanés, et des défauts dans la réplication de l'ADN (80,109,112). Un crible chimiogénétique réalisé chez *S. cerevisiae* nous a permis d'identifier des interactions génétiques pouvant être reliées à H3K56ac. Des mutations homozygotes de gènes non essentiels diploïdes ont été traitées à 20 mM NAM et certaines d'entre eux conféraient une sensibilité à ce pan-inhibiteur, dont la plupart représente des gènes inclus dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN (RDA) et dans la recombinaison de l'ADN (figures 9 et 18). Il est connu que le double mutant *hst3Δ hst4Δ* induit l'activation de kinases de la RDA et présente une létalité synthétique en absence de gènes régulateurs (*SLX4*, *SRS2*, *DUNI*), ce qui supporte les données présentées dans le crible (60,109). Notre étude s'est toutefois limitée sur les mutations de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, alors que le crible a permis d'identifier d'autres réponses cellulaires qui sont influencées par le NAM, dont plusieurs voies métaboliques (*e.g.* sporulation, synthèse des macromolécules) (318). Examiner si ces voies de régulation peuvent être modulées par Hst3 et

Hst4 serait intéressant pour mieux prédire des similarités de fonction entre les sirtuines de la levure et leurs homologues chez l'humain (126). En somme, ces résultats obtenus sont une ressource importante pour comprendre les bases moléculaires de H3K56ac, ainsi que les réseaux génétiques impliqués dans la régulation de cette modification post-traductionnelle (MPT).

La sensibilité des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* au nicotinamide dépend de l'hyperacétylation de H3K56

Les gènes *SLX4* et *PPH3* sont impliqués dans l'atténuation de la RDA (198,199) et leur mutation cause des défauts de croissance lors d'inhibition des sirtuines Hst3 et Hst4 (figures 10 et 12). Comme la délétion du gène de l'acétyltransférase *RTT109* renverse les phénotypes de ces mutants, cela signifie que l'hyperacétylation de H3K56 possède probablement un rôle dominant dans les défauts de croissance induits par le NAM. Autrement, il faudrait vérifier que la mutation *H3K56R* (qui empêche l'acétylation) puisse également restaurer la croissance de ces mutants, comme il a été démontré par spectrométrie de masse que seuls les niveaux de H3K56ac sont modulés dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ* (330). Il fut observé qu'empêcher l'acétylation de H4K16 par une mutation non acétylable *H4K16A* améliore la croissance cellulaire en présence de NAM (figure 25A, annexe), ce qui concorde avec des résultats antérieurs suggérant que l'absence de H4K16ac supprime la thermosensibilité du double mutant *hst3Δ hst4Δ* (60). Il serait intéressant de vérifier si la modulation des niveaux de H4K16ac pouvait influencer les phénotypes des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en réponse au NAM, car nous postulons que l'altération de cette MPT à la chromatine silencieuse induirait une réponse aux dommages à l'ADN. Des études futures serviront à mieux élucider le lien entre ces deux modifications d'histones.

La sensibilité du mutant *srs2Δ* au nicotinamide est causée de manière dépendante et indépendante de H3K56ac

L'hélicase Srs2 permet de moduler les niveaux de recombinaison homologue (RH) (253,254) et son absence cause un défaut de croissance lors d'inhibition des sirtuines Hst3 et Hst4, mais qui semble être influencée de manière dépendante et indépendante à l'hyperacétylation de H3K56. En réponse au NAM, la sensibilité du mutant *srs2Δ* n'est pas

affectée par la délétion de *RTT109* tandis que dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ*, le mutant *rtt109Δ* parvient à supprimer la létalité synthétique de *srs2Δ* (figure 19A-C). Ce dernier résultat demeure à être confirmé, car il contredit des résultats antérieurs suggérant que la mutation non acétylable *H3K56R* n'a aucun effet sur la létalité synthétique du triple mutant *hst3Δ hst4Δ srs2Δ* (109). Reproduire ces deux types de mutations serait nécessaire pour mieux comprendre les phénomènes observés. Néanmoins, il est possible que l'inhibition de toutes les sirtuines par le NAM puisse influencer d'autres voies cellulaires qui pourraient s'avérer problématiques dans un mutant *srs2Δ*, en plus de la présence d'une hyperacétylation de H3K56 par l'inhibition de Hst3 et Hst4. Moduler les niveaux de H4K16ac n'influence pas les phénotypes de *srs2Δ* en réponse au NAM, alors que la combinaison des mutations *sir2Δ* et *rtt109Δ* au simple mutant *srs2Δ* cause une létalité synthétique (figure 21C-D). Ceci suggère que l'activité de Srs2 pourrait être indirectement reliée à l'état de la chromatine par la sirtuine Sir2. Par exemple, l'un des rôles de Sir2 est de réguler les niveaux de recombinaison à l'ADNr (129,331). Comme il est suggéré que Srs2 puisse aussi être recrutée à l'ADNr (332,333), ces résultats pourraient caractériser une voie de régulation influencée par le NAM dans un mutant *srs2Δ*. Vérifier par séquençage CHIP-Seq si les niveaux de H4K16ac à l'ADNr sont modulés dans un mutant *srs2Δ* lors d'inhibition des sirtuines pourrait répondre à cette hypothèse. Un autre aspect intéressant à observer serait le croisement de mutants *hst1Δ* ou *hst2Δ* au double mutant *srs2Δ rtt109Δ*, car Hst1 et Hst2 influencent d'autres processus cellulaires que Sir2 et pourraient intervenir avec Srs2 (142,143,147). Ces expériences additionnelles seront nécessaires afin d'appuyer ce modèle, de façon à associer les phénotypes de *srs2Δ* à cette modification d'histone.

L'hyperacétylation de H3K56 par le NAM induit une forte activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN par l'activation de la kinase Rad53

Nos résultats suggèrent un modèle où la cellule nécessite l'activité de Slx4 et du complexe PP4 pour l'atténuation de la kinase Rad53 en réponse à l'hyperacétylation de H3K56, soit en empêchant l'activité de Rad9. Il est connu que des mutations inhibant la

liaison de l'adaptateur Rad9 à la chromatine endommagée, comme *H3K79R* ou la mutation de *RAD9* supprime les phénotypes du double mutant *hst3Δ hst4Δ* (60,109), ce qui a été observé dans nos résultats en présence de NAM (figures 14 et 15). En somme, cela suggère que l'un des phénotypes majeurs observés lors d'inhibition des sirtuines par le NAM est l'hyperactivation des voies de signalisation de Rad53. Il serait possible que la présence de H3K56 ou de H4K16 constitutivement acétylées puisse influencer la liaison de Rad9 de manière positive, comme il a été suggéré que H3K56ac soit un environnement favorable à l'enclenchement de la RDA (294). Ceci pourrait expliquer entre autres la sensibilité des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* lors d'une exposition au NAM. Le niveau de contribution de la voie d'activation de Rad53 parmi les phénotypes observés lors d'inhibition des sirtuines sera à déterminer au cours d'expériences futures.

Recrutement du complexe Slx4-Rtt107 aux fourches de réplication en réponse aux dommages à l'ADN

Alors que le complexe Slx4-Rtt107 est recruté aux fourches de réplication pour limiter l'activité de la kinase Rad53 (199,202), la délétion de leurs gènes entraîne des effets opposés en réponse au NAM. La délétion de *SLX4* cause une létalité synthétique avec *hst3Δ hst4Δ*, tandis que celle de *RTT107* permet une meilleure croissance de ce double mutant (figure 10B). Cela suppose que le complexe Slx4-Rtt107 pourrait aider à tolérer les lésions à l'ADN lors de l'atténuation de la RDA, alors que les complexes générés à la chromatine comme Rtt101-Rtt107 causeraient des dommages à l'ADN de manière dépendante de H3K56ac. Rtt101 forme un complexe Ub-ligase qui ubiquitine H3K56ac pour l'assemblage *de novo* des nucléosomes à l'aide des chaperonnes Asf1, CAF-1 et Rtt106 (98). Comme Rtt107 n'est pas impliquée à ces événements, ceci suggère que des problèmes d'assemblage de la chromatine ne seraient pas à l'origine des dommages causés par Rtt107 en réponse au NAM. Il a été suggéré que Rtt109 et Rtt101 recrutent Rtt107 pour stabiliser les fourches de réplication en réponse au MMS (100), et que le complexe Slx4-Rtt107 est formé en réponse au stress génotoxique (205). Ceci appuie un modèle où H3K56ac modulerait la formation de ces complexes aux fourches de réplication, et que l'acétylation constitutive de H3K56 causerait une localisation inappropriée de ces éléments durant la réplication de l'ADN, ce qui pourrait mener à l'induction de dommages. D'autres expériences seront requises pour valider ce modèle, ainsi que pour caractériser le

niveau de recrutement du complexe Slx4-Rtt107 lors de l'effondrement des fourches de réplication en réponse au NAM.

La forte activation de Rad53 n'est pas la cause de la sensibilité d'un mutant *srs2Δ* en réponse au NAM

Même si le mutant *srs2Δ* présente une activation de la kinase Rad53 due à son phénotype d'hyper-recombinaison (257,258), la suppression d'éléments de la RDA n'a aucun effet sur les défauts de croissance du mutant lors d'inhibition des sirtuines (figures 22D et 23A). Curieusement, le double mutant *srs2Δ rad9Δ* est non viable en absence de Hst3 et Hst4, mais parvient à progresser dans le cycle cellulaire (figure 22C-E). Une possibilité serait que le double mutant parviendrait à faire quelques divisions cellulaires avant de mourir en présence de NAM. Connaître le moment requis pour induire une létalité synthétique du double mutant *srs2Δ rad9Δ* en NAM serait un aspect intéressant à observer lors d'expériences futures. Comme il a été suggéré que le mutant *srs2Δ* ne peut activer pleinement une réponse Rad53 (258), cela indique que l'activation de cette kinase n'est pas la cause des phénotypes de *srs2Δ* en réponse au NAM, mais plutôt une conséquence de cette mutation. De cette façon, les principaux problèmes de *srs2Δ* seraient reliés à la RH, ce qui sera discuté plus bas.

L'hyperactivation de la kinase Rad53 affecte la complétion de la réplication de l'ADN en présence d'hyperacétylation de H3K56 par le NAM

Nos résultats démontrent que l'activation persistante de la kinase Rad53 en réponse au NAM influence la progression de la réplication de l'ADN dans les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ*. Ces phénotypes seraient attribués en partie au rôle de Rad53 dans l'inhibition des origines tardives Dbf4 et Sld3 (figure 16) (188), ainsi que dans l'inhibition de la polymérisation de translésion (TLS) en réponse au MMS (figure 17) (183,283). Cela suggère néanmoins que d'autres voies de réparation de l'ADN pourraient intervenir dans la complétion de la réplication. Il fut démontré que les protéines Slx4 et Pph3, par leur rôle dans l'atténuation de Rad53, régulent l'activité du complexe endonucléase Mus81-Mms4 pour la résolution

d'intermédiaires de RH en réponse au MMS (334). Ceci nous amène à penser que la sensibilité des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en NAM pourrait dépendre d'une part à une incapacité de la cellule de résoudre efficacement les jonctions d'Holliday (JHs) dû à l'hyperactivation de la RDA. Il serait intéressant d'investiguer si cette notion contribue aux défauts de réplication des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* lors d'expériences futures.

Implication de la polymérisation de translésion (TLS) dans la réponse au NAM des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ*

Comme le TLS est une voie de réparation post-répllicative (RPR) se produisant en phase G2, notre hypothèse est que ce mécanisme pourrait répliquer les fragments d'ADN simple-brin en fin de phase S lors de stress réplcatif (277). Alors que la mutation de *REV3* cause une sensibilité synergique dans les mutants *slx4Δ dot1Δ* et *pph3Δ dot1Δ* en présence de MMS, elle n'influence toutefois pas la croissance restaurée des mutants *slx4Δ dot1Δ* et *pph3Δ rad9Δ* en réponse au NAM (figures 17A-B et 26C, annexe). Ceci suggère que l'inhibition du TLS par l'activation de Rad53 pourrait contribuer aux défauts de croissance en présence d'hyperacétylation de H3K56, mais à travers l'utilisation d'une autre polymérase de translésion que Polζ. Chez la levure, la polymérase-η est codée par le gène *RAD30* et est impliquée dans la résistance aux rayons ultraviolets (335). Il serait intéressant de tester cette possibilité dans les mutants *slx4Δ* et *pph3Δ*, ce qui pourrait élucider le rôle du TLS dans la complétion de la réplication lors d'inhibition des sirtuines.

Recrutement de Srs2 aux sites de lésions à l'ADN indépendamment de la SUMOylation de PCNA

La protéine Srs2 est liée à la SUMOylation de PCNA pour enclencher la RPR vers le changement de matrice (TS) (255,259). Nos résultats suggèrent que les défauts de croissance du mutant *srs2Δ* ne soient pas influencés par ces voies de tolérance aux dommages à l'ADN (TDA), car les délétions de *RAD18* et *MMS2* ne peuvent renverser les phénotypes de cette mutation en réponse au NAM (figure 23D). Comme le PCNA alternatif est impliqué dans le TS et que son absence influence partiellement la sensibilité du mutant *srs2Δ* (figure 23B) (288), une possibilité est que le rôle de Srs2 dans la régulation de la RPR soit réalisé en partie par interaction avec des sous-unités de PCNA alternatif lors d'inhibition des sirtuines. Comme

des résultats suggèrent que Srs2 soit impliquée dans l'atténuation de la voie de signalisation aux dommages à l'ADN (336), un lien entre Srs2 et le PCNA alternatif pourrait corrélérer avec l'hyperactivation de la kinase Rad53 observée dans le mutant *srs2Δ* lors de nos expériences. Il serait aussi intéressant de vérifier si les niveaux de SUMOylation de PCNA sont modulés en réponse au NAM, et si cette modulation influence le recrutement de Srs2 aux sites de lésions de manière négative et donc empêche l'enclenchement de la RPR. Ceci suggérerait l'implication des mécanismes de TDA dans la réponse cellulaire de Srs2 face à l'inhibition des sirtuines, quoique certaines expériences additionnelles soient nécessaires à la validité de ce modèle.

L'inhibition des sirtuines par le NAM influence la formation de filaments Rad51 toxiques pour la cellule

Nos résultats suggèrent que l'anti-recombinase Srs2 est recrutée aux sites de RH pour la modulation des filaments pré-synaptiques Rad51 de manière indépendante à la modification de PCNA en présence de NAM. Ceci est compatible avec des rôles identifiés pour Srs2 à la recombinaison de l'ADNr (333) ainsi qu'aux événements inappropriés de RH non spécifiques à des DSBs (266). Notre hypothèse était donc que Srs2 puisse interagir avec des filaments Rad51 qui ne sont pas localisés près de PCNA.

Modulation des filaments pré-synaptiques aberrants par l'anti-recombinase Srs2 en réponse au NAM

L'absence de *SRS2* entraîne une augmentation significative de la fréquence de foyers Rad51, dont une grande proportion est localisée de manière indépendante aux recombinases Rad52 et Rad54, et ce en présence ou en absence de NAM (figure 24D-E) (266). Ces résultats suggèrent un modèle de régulation des structures de RH qui seraient influencées en absence d'activité des sirtuines. Dans le premier cas, le NAM entraînerait la formation de filaments pré-synaptiques Rad51, qui seraient non localisés spécifiquement à des sites de lésions à l'ADN. La présence de Srs2 permettrait le retrait de ces filaments, ce qui expliquerait la faible fréquence de foyers Rad51 dans les cellules de type sauvage (figure 24D-E). Dans le deuxième cas, l'absence de Srs2 influencerait la formation de ces structures de recombinaison aberrantes qui ne peuvent plus être retirées. Elles seraient donc présentes à plus grande

fréquence à des endroits inappropriés dans le génome, ce qui mènerait à la cytotoxicité d'un mutant *srs2Δ* en réponse au NAM (figure 24D-E). Plusieurs expériences seront à réaliser pour justifier cette hypothèse. L'une d'elles est d'observer le niveau de recrutement de Srs2 aux structures de RH après exposition au NAM comparativement à une cellule non traitée, ce qui démontrerait le besoin de la cellule de retirer les intermédiaires de RH formés en absence d'activité des sirtuines. Il serait intéressant aussi d'observer la fréquence et la co-localisation de foyers intranucléaires Rad51 avec ceux formés par Rad52 dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ* en absence de NAM, comme est connu que ce double mutant présente une grande fréquence de foyers Rad52 (60,154). Ceci viendrait clarifier si le mécanisme observé fonctionne indépendamment ou non de l'hyperacétylation de H3K56.

Il est possible que l'inhibition des sirtuines par le NAM puisse influencer d'autres activités de Srs2 dans la réparation de l'ADN. Srs2 est recruté à la protéine Nej1 pour le désassemblage des filaments Rad51 durant la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), qui est un mécanisme de réparation peu d'usage chez *S. cerevisiae* (337). Srs2 interagit également avec le complexe endonucléase Mus81-Mms4, où ce dernier inhibe son activité lors de la résolution des JHs (338,339). Il serait donc intéressant d'évaluer si l'absence de ces fonctions peut influencer la sensibilité d'un mutant *srs2Δ* ainsi que son phénotype d'hyper-recombinaison en réponse au NAM.

Applications cliniques à long terme pour l'utilisation d'inhibiteurs de déacétylases d'histones dans le traitement du cancer

Les sirtuines deviennent d'intérêt en milieu clinique, non seulement dû à leur spectre d'action, mais également par leurs rôles conservés dans la modulation du vieillissement cellulaire démontré dans plusieurs modèles (76,340). Les sept sirtuines chez l'humain (SIRT1-7) possèdent des fonctionnalités plus ou moins conservées à celles de la levure, dont la sénescence, la réparation de l'ADN ou des rôles métaboliques (341,342). Leur dérégulation est observée dans certains cancers ou maladies neurodégénératives, ce qui est prometteur pour le développement d'un traitement visant à l'inhibition de ces enzymes au niveau pharmacologique (343–345). Les inhibiteurs de HDACs sont de plus en plus utilisés comme agents thérapeutiques potentiels contre la propagation tumorale (346,347). L'une des stratégies

à long terme serait de cibler des cellules tumorales par ces inhibiteurs de manière spécifique, de sorte à pouvoir les combiner avec des agents chimiothérapeutiques (348). Des études précédentes ont démontré que l'inhibition des sirtuines par le NAM a un effet antifongique chez plusieurs pathogènes infectieux, dont la famille *C. albicans* (90). Toutefois, les sirtuines sont des déacétylases qui consomment le NAD⁺, au même titre que plusieurs enzymes chez les eucaryotes comme les ADP-riboses transférases, les cADP-ribose synthases ou les PARP (128,301). Cela suggère que le NAM posséderait un spectre d'action plus ou moins spécifique chez les eucaryotes avancés, ce qui causerait des effets secondaires difficiles à prédire.

D'autres inhibiteurs de HDACs sont en vogue dans les essais cliniques, comme l'aristoforine ou le cambinol, où ils modulent l'expression d'oncogènes dans la croissance tumorale (346). Toutefois, leurs mécanismes d'action au point de vue thérapeutique demeurent mal caractérisés. Améliorer les connaissances sur la biologie des sirtuines pourrait permettre de mieux prédire l'efficacité des inhibiteurs de HDACs dans le traitement de cellules tumorales au niveau clinique. Dans le but d'améliorer cette connaissance, les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent un nouveau modèle de réseaux génétiques influencés par l'inhibition des sirtuines chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, dont la plupart modulent les voies de réponse aux dommages à l'ADN lors de stress répliatif.

Bibliographie

1. Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. 1974 May 24;184(4139):868–71.
2. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997 Sep 18;389(6648):251–60.
3. Schultz MC, Hockman DJ, Harkness TAA, Garinther WI, Altheim BA. Chromatin assembly in a yeast whole-cell extract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9034–9.
4. Grunstein M, Hecht A, Fisher-Adams G, Wan J, Mann RK, Strahl-Bolsinger S, et al. The regulation of euchromatin and heterochromatin by histones in yeast. *J Cell Sci Suppl*. 1995;19:29–36.
5. Campos EI, Reinberg D. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet*. 2009;43:559–99.
6. Alberghina L, Mavelli G, Drovandi G, Palumbo P, Pessina S, Tripodi F, et al. Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: basic regulatory design and protein-protein interaction network. *Biotechnol Adv*. 2012 Feb;30(1):52–72.
7. Fu J, Hagan IM, Glover DM. The centrosome and its duplication cycle. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Feb;7(2):a015800.
8. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):149–60.
9. Orlando DA, Lin CY, Bernard A, Wang JY, Socolar JES, Iversen ES, et al. Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. *Nature*. 2008 Jun 12;453(7197):944–7.
10. Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:333–74.
11. Zegerman P, Diffley JFX. DNA replication as a target of the DNA damage checkpoint. *DNA Repair*. 2009 Sep 2;8(9):1077–88.
12. Yang C, Theis JF, Newlon CS. Conservation of ARS elements and chromosomal DNA replication origins on chromosomes III of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*. *Genetics*. 1999 Jul;152(3):933–41.
13. Rowley A, Cocker JH, Harwood J, Diffley JF. Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. *EMBO J*. 1995 Jun 1;14(11):2631–41.

14. Speck C, Chen Z, Li H, Stillman B. ATPase-dependent, cooperative binding of ORC and Cdc6p to origin DNA. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 Nov;12(11):965–71.
15. Ilves I, Petojevic T, Pesavento JJ, Botchan MR. Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell.* 2010 Jan 29;37(2):247–58.
16. Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, et al. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol.* 2006 Apr;8(4):358–66.
17. Samson RY, Bell SD. MCM loading--an open-and-shut case? *Mol Cell.* 2013 May 23;50(4):457–8.
18. Remus D, Diffley JFX. Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Dec;21(6):771–7.
19. Nguyen VQ, Co C, Li JJ. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature.* 2001 Jun 28;411(6841):1068–73.
20. Kim Y, Kipreos ET. Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways. *Cell Div.* 2007;2:18.
21. Araki H. Regulatory mechanism of the initiation step of DNA replication by CDK in budding yeast. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar;1804(3):520–3.
22. Lei M, Kawasaki Y, Young MR, Kihara M, Sugino A, Tye BK. Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev.* 1997 Dec 15;11(24):3365–74.
23. Labib K. How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev.* 2010 Jun 15;24(12):1208–19.
24. Hodgson B, Calzada A, Labib K. Mrc1 and Tof1 Regulate DNA Replication Forks in Different Ways during Normal S Phase. *Mol Biol Cell.* 2007 Oct 1;18(10):3894–902.
25. Hanna JS, Kroll ES, Lundblad V, Spencer FA. *Saccharomyces cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol.* 2001 May;21(9):3144–58.
26. Simon AC, Zhou JC, Perera RL, van Deursen F, Evrin C, Ivanova ME, et al. A Ctf4 trimer couples the CMG helicase to DNA polymerase α in the eukaryotic replisome. *Nature.* 2014 Jun 12;510(7504):293–7.
27. McCulloch SD, Kunkel TA. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res.* 2008 Jan;18(1):148–61.
28. Morrison A, Araki H, Clark AB, Hamatake RK, Sugino A. A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*. *Cell.* 1990 Sep 21;62(6):1143–51.

29. Aze A, Zhou JC, Costa A, Costanzo V. DNA replication and homologous recombination factors: acting together to maintain genome stability. *Chromosoma*. 2013 Oct;122(5):401–13.
30. Pursell ZF, Isoz I, Lundström E-B, Johansson E, Kunkel TA. Yeast DNA Polymerase ϵ Participates in Leading-Strand DNA Replication. *Science*. 2007 Jul 6;317(5834):127–30.
31. Garg P, Stith CM, Sabouri N, Johansson E, Burgers PM. Idling by DNA polymerase delta maintains a ligatable nick during lagging-strand DNA replication. *Genes Dev*. 2004 Nov 15;18(22):2764–73.
32. Wold MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:61–92.
33. Moldovan G-L, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*. 2007 May 18;129(4):665–79.
34. Kubota T, Katou Y, Nakato R, Shirahige K, Donaldson AD. Replication-Coupled PCNA Unloading by the Elg1 Complex Occurs Genome-wide and Requires Okazaki Fragment Ligation. *Cell Rep*. 2015 Aug 4;12(5):774–87.
35. Cullmann G, Fien K, Kobayashi R, Stillman B. Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1995 Sep;15(9):4661–71.
36. Majka J, Burgers PMJ. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2004;78:227–60.
37. Kondo T, Matsumoto K, Sugimoto K. Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1136–43.
38. Maric M, Maculins T, De Piccoli G, Labib K. Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science*. 2014 Oct 24;346(6208):1253596.
39. Moreno SP, Bailey R, Campion N, Herron S, Gambus A. Polyubiquitylation drives replisome disassembly at the termination of DNA replication. *Science*. 2014 Oct 24;346(6208):477–81.
40. Fachinetti D, Bermejo R, Cocito A, Minardi S, Katou Y, Kanoh Y, et al. Replication termination at eukaryotic chromosomes is mediated by Top2 and occurs at genomic loci containing pausing elements. *Mol Cell*. 2010 Aug 27;39(4):595–605.
41. Smith BC, Denu JM. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jan;1789(1):45–57.

42. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Apr;12(2):142–8.
43. Lachner M, O’Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):116–20.
44. Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature.* 2006 Jul 6;442(7098):96–9.
45. van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell.* 2002 Jun 14;109(6):745–56.
46. Farooq Z, Banday S, Pandita TK, Altaf M. The many faces of histone H3K79 methylation. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2016 Jun;768:46–52.
47. Ubersax JA, Ferrell Jr JE. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):530–41.
48. Cussiol JR, Jablonowski CM, Yimit A, Brown GW, Smolka MB. Dampening DNA damage checkpoint signalling via coordinated BRCT domain interactions. *EMBO J.* 2015 Jun 12;34(12):1704–17.
49. Mejia-Ramirez E, Limbo O, Langerak P, Russell P. Critical Function of γ H2A in S-Phase. *PLoS Genet.* 2015 Sep;11(9):e1005517.
50. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 2016 Apr;26(4):399–422.
51. Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol.* 2004 Dec;8(6):610–6.
52. Johnson ES. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:355–82.
53. Jentsch S, Psakhye I. Control of nuclear activities by substrate-selective and protein-group SUMOylation. *Annu Rev Genet.* 2013;47:167–86.
54. Tanner KG, Langer MR, Kim Y, Denu JM. Kinetic Mechanism of the Histone Acetyltransferase GCN5 from Yeast. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):22048–55.
55. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:75–100.
56. Simon M, North JA, Shimko JC, Forties RA, Ferdinand MB, Manohar M, et al. Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 2;108(31):12711–6.
57. Burgess RJ, Zhou H, Han J, Zhang Z. A role for Gcn5 in replication-coupled nucleosome assembly. *Mol Cell.* 2010 Feb 26;37(4):469–80.

58. Li Q, Zhou H, Wurtele H, Davies B, Horazdovsky B, Verreault A, et al. Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly. *Cell*. 2008 Jul 25;134(2):244–55.
59. Keck KM, Pemberton LF. Histone chaperones link histone nuclear import and chromatin assembly. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1819(3–4):277–89.
60. Simoneau A, Delgosaie N, Celic I, Dai J, Abshiru N, Costantino S, et al. Interplay between histone H3 lysine 56 deacetylation and chromatin modifiers in response to DNA damage. *Genetics*. 2015 May;200(1):185–205.
61. Mujtaba S, Zeng L, Zhou M-M. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene*. 2007 Aug 13;26(37):5521–7.
62. Zunder RM, Antczak AJ, Berger JM, Rine J. Two surfaces on the histone chaperone Rtt106 mediate histone binding, replication, and silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 17;109(3):E144–153.
63. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 2005 Dec 19;363:15–23.
64. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, et al. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):843–51.
65. Grant PA, Duggan L, Côté J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, et al. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*. 1997 Jul 1;11(13):1640–50.
66. Kimura A, Matsubara K, Horikoshi M. A Decade of Histone Acetylation: Marking Eukaryotic Chromosomes with Specific Codes. *J Biochem (Tokyo)*. 2005 Dec 1;138(6):647–62.
67. Allard S, Utley RT, Savard J, Clarke A, Grant P, Brandl CJ, et al. NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J*. 1999 Sep 15;18(18):5108–19.
68. Meijnsing SH, Ehrenhofer-Murray AE. The silencing complex SAS-I links histone acetylation to the assembly of repressed chromatin by CAF-I and Asf1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 2001 Dec 1;15(23):3169–82.
69. Suka N, Luo K, Grunstein M. Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet*. 2002 Nov;32(3):378–83.

70. Gregoretto IV, Lee Y-M, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol.* 2004 Apr 16;338(1):17–31.
71. Alejandro-Osorio AL, Huebert DJ, Porcaro DT, Sonntag ME, Nillasithanukroh S, Will JL, et al. The histone deacetylase Rpd3p is required for transient changes in genomic expression in response to stress. *Genome Biol.* 2009;10(5):R57.
72. Pijnappel WW, Schaft D, Roguev A, Shevchenko A, Tekotte H, Wilm M, et al. The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev.* 2001 Nov 15;15(22):2991–3004.
73. Knott SRV, Viggiani CJ, Tavaré S, Aparicio OM. Genome-wide replication profiles indicate an expansive role for Rpd3L in regulating replication initiation timing or efficiency, and reveal genomic loci of Rpd3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 2009 May 1;23(9):1077–90.
74. Millar CB, Xu F, Zhang K, Grunstein M. Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev.* 2006 Mar 15;20(6):711–22.
75. Wang M, Collins RN. A lysine deacetylase Hos3 is targeted to the bud neck and involved in the spindle position checkpoint. *Mol Biol Cell.* 2014 Sep 15;25(18):2720–34.
76. Wierman MB, Smith JS. Yeast sirtuins and the regulation of aging. *FEMS Yeast Res.* 2014 Feb;14(1):73–88.
77. Downey M, Johnson JR, Davey NE, Newton BW, Johnson TL, Galaang S, et al. Acetylome profiling reveals overlap in the regulation of diverse processes by sirtuins, *gcn5*, and *esa1*. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2015 Jan;14(1):162–76.
78. Masumoto H, Hawke D, Kobayashi R, Verreault A. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature.* 2005 Jul 14;436(7048):294–8.
79. Xu F, Zhang K, Grunstein M. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell.* 2005 May 6;121(3):375–85.
80. Celic I, Masumoto H, Griffith WP, Meluh P, Cotter RJ, Boeke JD, et al. The sirtuins *hst3* and *Hst4p* preserve genome integrity by controlling histone h3 lysine 56 deacetylation. *Curr Biol CB.* 2006 Jul 11;16(13):1280–9.
81. Han J, Zhou H, Horazdovsky B, Zhang K, Xu R-M, Zhang Z. Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science.* 2007 Feb 2;315(5812):653–5.

82. Han J, Zhou H, Li Z, Xu R-M, Zhang Z. Acetylation of lysine 56 of histone H3 catalyzed by Rtt109 and regulated by ASF1 is required for replisome integrity. *J Biol Chem*. 2007 Sep 28;282(39):28587–96.
83. Tang Y, Holbert MA, Wurtele H, Meeth K, Rocha W, Gharib M, et al. Fungal Rtt109 histone acetyltransferase is an unexpected structural homolog of metazoan p300/CBP. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Jul;15(7):738–45.
84. Bazan JF. An old HAT in human p300/CBP and yeast Rtt109. *Cell Cycle Georget Tex*. 2008 Jun 15;7(12):1884–6.
85. Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature*. 2009 May 7;459(7243):113–7.
86. Tsubota T, Berndsen CE, Erkmann JA, Smith CL, Yang L, Freitas MA, et al. Histone H3-K56 acetylation is catalyzed by histone chaperone-dependent complexes. *Mol Cell*. 2007 Mar 9;25(5):703–12.
87. English CM, Adkins MW, Carson JJ, Churchill MEA, Tyler JK. Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell*. 2006 Nov 3;127(3):495–508.
88. Tang Y, Holbert MA, Delgosaie N, Wurtele H, Guillemette B, Meeth K, et al. Structure of the Rtt109-AcCoA/Vps75 complex and implications for chaperone-mediated histone acetylation. *Struct Lond Engl* 1993. 2011 Feb 9;19(2):221–31.
89. Radovani E, Cadorin M, Shams T, El-Rass S, Karsou AR, Kim H-S, et al. The carboxyl terminus of Rtt109 functions in chaperone control of histone acetylation. *Eukaryot Cell*. 2013 May;12(5):654–64.
90. Wurtele H, Tsao S, Lépine G, Mullick A, Tremblay J, Drogaris P, et al. Modulation of histone H3 lysine 56 acetylation as an antifungal therapeutic strategy. *Nat Med*. 2010 Jul;16(7):774–80.
91. Tjeertes JV, Miller KM, Jackson SP. Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *EMBO J*. 2009 Jul 8;28(13):1878–89.
92. Driscoll R, Hudson A, Jackson SP. Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science*. 2007 Feb 2;315(5812):649–52.
93. Hiraga S-I, Botsios S, Donaldson AD. Histone H3 lysine 56 acetylation by Rtt109 is crucial for chromosome positioning. *J Cell Biol*. 2008 Nov 17;183(4):641–51.
94. Voichek Y, Bar-Ziv R, Barkai N. Expression homeostasis during DNA replication. *Science*. 2016 Mar 4;351(6277):1087–90.

95. Luciano P, Dehé P-M, Audebert S, Géli V, Corda Y. Replisome function during replicative stress is modulated by histone h3 lysine 56 acetylation through Ctf4. *Genetics*. 2015 Apr;199(4):1047–63.
96. Burgess RJ, Zhang Z. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat Struct Mol Biol*. 2013 Jan;20(1):14–22.
97. Collins SR, Miller KM, Maas NL, Roguev A, Fillingham J, Chu CS, et al. Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137):806–10.
98. Han J, Zhang H, Zhang H, Wang Z, Zhou H, Zhang Z. A Cul4 E3 ubiquitin ligase regulates histone hand-off during nucleosome assembly. *Cell*. 2013 Nov 7;155(4):817–29.
99. Mimura S, Yamaguchi T, Ishii S, Noro E, Katsura T, Obuse C, et al. Cul8/Rtt101 forms a variety of protein complexes that regulate DNA damage response and transcriptional silencing. *J Biol Chem*. 2010 Mar 26;285(13):9858–67.
100. Roberts TM, Zaidi IW, Vaisica JA, Peter M, Brown GW. Regulation of rtt107 recruitment to stalled DNA replication forks by the cullin rtt101 and the rtt109 acetyltransferase. *Mol Biol Cell*. 2008 Jan;19(1):171–80.
101. Buser R, Kellner V, Melnik A, Wilson-Zbinden C, Schellhaas R, Kastner L, et al. The Replisome-Coupled E3 Ubiquitin Ligase Rtt101Mms22 Counteracts Mrc1 Function to Tolerate Genotoxic Stress. *PLoS Genet*. 2016 Feb;12(2):e1005843.
102. Clemente-Ruiz M, González-Prieto R, Prado F. Histone H3K56 acetylation, CAF1, and Rtt106 coordinate nucleosome assembly and stability of advancing replication forks. *PLoS Genet*. 2011 Nov;7(11):e1002376.
103. Shibahara K, Stillman B. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell*. 1999 Feb 19;96(4):575–85.
104. Huang S, Zhou H, Katzmann D, Hochstrasser M, Atanasova E, Zhang Z. Rtt106p is a histone chaperone involved in heterochromatin-mediated silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 20;102(38):13410–5.
105. Yang J, Zhang X, Feng J, Leng H, Li S, Xiao J, et al. The Histone Chaperone FACT Contributes to DNA Replication-Coupled Nucleosome Assembly. *Cell Rep*. 2016 Jan 19;
106. Haldar D, Kamakaka RT. *Schizosaccharomyces pombe* Hst4 functions in DNA damage response by regulating histone H3 K56 acetylation. *Eukaryot Cell*. 2008 May;7(5):800–13.
107. Maas NL, Miller KM, DeFazio LG, Toczyski DP. Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol Cell*. 2006 Jul 7;23(1):109–19.

108. Yang B, Miller A, Kirchmaier AL. HST3/HST4-dependent deacetylation of lysine 56 of histone H3 in silent chromatin. *Mol Biol Cell*. 2008 Nov;19(11):4993–5005.
109. Celic I, Verreault A, Boeke JD. Histone H3 K56 hyperacetylation perturbs replisomes and causes DNA damage. *Genetics*. 2008 Aug;179(4):1769–84.
110. Hachinohe M, Hanaoka F, Masumoto H. Hst3 and Hst4 histone deacetylases regulate replicative lifespan by preventing genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 2011 Apr;16(4):467–77.
111. Irene C, Theis JF, Gresham D, Soteropoulos P, Newlon CS. Hst3p, a histone deacetylase, promotes maintenance of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III lacking efficient replication origins. *Mol Genet Genomics MGG*. 2016 Feb;291(1):271–83.
112. Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev*. 1995 Dec 1;9(23):2888–902.
113. Wurtele H, Li Q, Zhou H, Zhang Z, Verreault A. [Histone acetylation and chromatin assembly]. *Médecine Sci MS*. 2009 Feb;25(2):121–2.
114. Rine J, Herskowitz I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1987 May;116(1):9–22.
115. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 5;273(2):793–8.
116. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:435–65.
117. Guarente L. Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mech Ageing Dev*. 2005 Sep;126(9):923–8.
118. Denu JM. The Sir 2 family of protein deacetylases. *Curr Opin Chem Biol*. 2005 Oct;9(5):431–40.
119. Sauve AA. Sirtuin chemical mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1804(8):1591–603.
120. Avalos JL, Boeke JD, Wolberger C. Structural Basis for the Mechanism and Regulation of Sir2 Enzymes. *Mol Cell*. 2004 Mar 5;13(5):639–48.
121. Min J, Landry J, Sternglanz R, Xu RM. Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell*. 2001 Apr 20;105(2):269–79.

122. Gazzaniga F, Stebbins R, Chang SZ, McPeck MA, Brenner C. Microbial NAD Metabolism: Lessons from Comparative Genomics. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2009 Sep;73(3):529–41.
123. Borra MT, Langer MR, Slama JT, Denu JM. Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *Biochemistry (Mosc)*. 2004 Aug 3;43(30):9877–87.
124. Sauve AA, Schramm VL. Sir2 regulation by nicotinamide results from switching between base exchange and deacetylation chemistry. *Biochemistry (Mosc)*. 2003 Aug 12;42(31):9249–56.
125. Yuan H, Marmorstein R. Structural basis for sirtuin activity and inhibition. *J Biol Chem*. 2012 Dec 14;287(51):42428–35.
126. Madsen CT, Sylvestersen KB, Young C, Larsen SC, Poulsen JW, Andersen MA, et al. Biotin starvation causes mitochondrial protein hyperacetylation and partial rescue by the SIRT3-like deacetylase Hst4p. *Nat Commun*. 2015;6:7726.
127. Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Cohen H, Lin SS, et al. Manipulation of a nuclear NAD⁺ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ levels. *J Biol Chem*. 2002 May 24;277(21):18881–90.
128. Belenky P, Bogan KL, Brenner C. NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci*. 2007 Jan;32(1):12–9.
129. Fritze CE, Verschuere K, Strich R, Easton Esposito R. Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *EMBO J*. 1997 Nov 3;16(21):6495–509.
130. Ghidelli S, Donze D, Dhillon N, Kamakaka RT. Sir2p exists in two nucleosome-binding complexes with distinct deacetylase activities. *EMBO J*. 2001 Aug 15;20(16):4522–35.
131. Liou G-G, Tanny JC, Kruger RG, Walz T, Moazed D. Assembly of the SIR Complex and Its Regulation by O-Acetyl-ADP-Ribose, a Product of NAD-Dependent Histone Deacetylation. *Cell*. 2005 May 20;121(4):515–27.
132. Oppikofer M, Kueng S, Martino F, Soeroes S, Hancock SM, Chin JW, et al. A dual role of H4K16 acetylation in the establishment of yeast silent chromatin. *EMBO J*. 2011 Jul 6;30(13):2610–21.
133. Rusché LN, Kirchmaier AL, Rine J. Ordered nucleation and spreading of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2002 Jul;13(7):2207–22.

134. Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. 2000 Feb 17;403(6771):795–800.
135. Kobayashi T, Horiuchi T, Tongaonkar P, Vu L, Nomura M. SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast. *Cell*. 2004 May 14;117(4):441–53.
136. Donze D, Kamakaka RT. RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 2001 Feb 1;20(3):520–31.
137. Kaerberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev*. 1999 Oct 1;13(19):2570–80.
138. Sinclair DA, Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell*. 1997 Dec 26;91(7):1033–42.
139. Froyd CA, Rusche LN. The duplicated deacetylases Sir2 and Hst1 subfunctionalized by acquiring complementary inactivating mutations. *Mol Cell Biol*. 2011 Aug;31(16):3351–65.
140. Mead J, McCord R, Youngster L, Sharma M, Gartenberg MR, Vershon AK. Swapping the gene-specific and regional silencing specificities of the Hst1 and Sir2 histone deacetylases. *Mol Cell Biol*. 2007 Apr;27(7):2466–75.
141. Xie J, Pierce M, Gailus-Durner V, Wagner M, Winter E, Vershon AK. Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1999 Nov 15;18(22):6448–54.
142. McCord R, Pierce M, Xie J, Wonkatal S, Mickel C, Vershon AK. Rfm1, a novel tethering factor required to recruit the Hst1 histone deacetylase for repression of middle sporulation genes. *Mol Cell Biol*. 2003 Mar;23(6):2009–16.
143. Bedalov A, Hirao M, Posakony J, Nelson M, Simon JA. NAD⁺-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2003 Oct;23(19):7044–54.
144. Li M, Petteys BJ, McClure JM, Valsakumar V, Bekiranov S, Frank EL, et al. Thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the NAD⁺-dependent histone deacetylase Hst1. *Mol Cell Biol*. 2010 Jul;30(13):3329–41.
145. Li M, Valsakumar V, Poorey K, Bekiranov S, Smith JS. Genome-wide analysis of functional sirtuin chromatin targets in yeast. *Genome Biol*. 2013;14(5):R48.

146. Perrod S, Cockell MM, Laroche T, Renauld H, Ducrest AL, Bonnard C, et al. A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *EMBO J*. 2001 Jan 15;20(1–2):197–209.
147. Wilson JM, Le VQ, Zimmerman C, Marmorstein R, Pillus L. Nuclear export modulates the cytoplasmic Sir2 homologue Hst2. *EMBO Rep*. 2006 Dec;7(12):1247–51.
148. Liu I-C, Chiu S-W, Lee H-Y, Leu J-Y. The histone deacetylase Hos2 forms an Hsp42-dependent cytoplasmic granule in quiescent yeast cells. *Mol Biol Cell*. 2012 Apr;23(7):1231–42.
149. Lamming DW, Latorre-Esteves M, Medvedik O, Wong SN, Tsang FA, Wang C, et al. HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction. *Science*. 2005 Sep 16;309(5742):1861–4.
150. Tsuchiya M, Dang N, Kerr EO, Hu D, Steffen KK, Oakes JA, et al. Sirtuin-independent effects of nicotinamide on lifespan extension from calorie restriction in yeast. *Aging Cell*. 2006 Dec;5(6):505–14.
151. Che J, Smith S, Kim YJ, Shim EY, Myung K, Lee SE. Hyper-Acetylation of Histone H3K56 Limits Break-Induced Replication by Inhibiting Extensive Repair Synthesis. *PLoS Genet*. 2015 Feb;11(2):e1004990.
152. Kadyrova LY, Mertz TM, Zhang Y, Northam MR, Sheng Z, Lobachev KS, et al. A reversible histone H3 acetylation cooperates with mismatch repair and replicative polymerases in maintaining genome stability. *PLoS Genet*. 2013 Oct;9(10):e1003899.
153. Ide S, Saka K, Kobayashi T. Rtt109 Prevents Hyper-Amplification of Ribosomal RNA Genes through Histone Modification in Budding Yeast. *PLoS Genet* [Internet]. 2013 Apr 4 [cited 2016 Aug 13];9(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3616922/>
154. Wurtele H, Kaiser GS, Bacal J, St-Hilaire E, Lee E-H, Tsao S, et al. Histone H3 lysine 56 acetylation and the response to DNA replication fork damage. *Mol Cell Biol*. 2012 Jan;32(1):154–72.
155. Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman ASH, et al. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(12):3799–811.
156. Sedgwick B. Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Feb;5(2):148–57.
157. Recht J, Tsubota T, Tanny JC, Diaz RL, Berger JM, Zhang X, et al. Histone chaperone Asf1 is required for histone H3 lysine 56 acetylation, a modification associated with S phase in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 2;103(18):6988–93.

158. Pan X, Ye P, Yuan DS, Wang X, Bader JS, Boeke JD. A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*. 2006 Mar 10;124(5):1069–81.
159. Allen JB, Zhou Z, Siede W, Friedberg EC, Elledge SJ. The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev*. 1994 Oct 15;8(20):2401–15.
160. Budzowska M, Kanaar R. Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell Biochem Biophys*. 2009;53(1):17–31.
161. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol Cell*. 2010 Oct 22;40(2):179–204.
162. Myung K, Datta A, Kolodner RD. Suppression of Spontaneous Chromosomal Rearrangements by S Phase Checkpoint Functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*. 2001 Feb 9;104(3):397–408.
163. Davidson MB, Katou Y, Keszthelyi A, Sing TL, Xia T, Ou J, et al. Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J*. 2012 Feb 15;31(4):895–907.
164. Jossen R, Bermejo R. The DNA damage checkpoint response to replication stress: A Game of Forks. *Front Genet*. 2013;4:26.
165. Branzei D, Foiani M. The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair*. 2009 Sep 2;8(9):1038–46.
166. Byun TS, Pacek M, Yee M, Walter JC, Cimprich KA. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev*. 2005 May 1;19(9):1040–52.
167. Nakada D, Hirano Y, Tanaka Y, Sugimoto K. Role of the C terminus of Mec1 checkpoint kinase in its localization to sites of DNA damage. *Mol Biol Cell*. 2005 Nov;16(11):5227–35.
168. Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science*. 1996 Jan 19;271(5247):357–60.
169. Navadgi-Patil VM, Burgers PM. Yeast DNA replication protein Dpb11 activates the Mec1/ATR checkpoint kinase. *J Biol Chem*. 2008 Dec 19;283(51):35853–9.
170. Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*. 2000 Dec 21;408(6815):1001–4.

171. Hammet A, Magill C, Heierhorst J, Jackson SP. Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO Rep.* 2007 Sep;8(9):851–7.
172. Majka J, Burgers PMJ. Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: A sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Mar 4;100(5):2249–54.
173. Wang H, Elledge SJ. Genetic and physical interactions between DPB11 and DDC1 in the yeast DNA damage response pathway. *Genetics.* 2002 Apr;160(4):1295–304.
174. Pfander B, Diffley JFX. Dpb11 coordinates Mec1 kinase activation with cell cycle-regulated Rad9 recruitment. *EMBO J.* 2011 Dec 14;30(24):4897–907.
175. Prado F. Genetic instability is prevented by Mrc1-dependent spatio-temporal separation of replicative and repair activities of homologous recombination: homologous recombination tolerates replicative stress by Mrc1-regulated replication and repair activities operating at S and G2 in distinct subnuclear compartments. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2014 May;36(5):451–62.
176. Berens TJ, Toczyski DP. Colocalization of Mec1 and Mrc1 is sufficient for Rad53 phosphorylation in vivo. *Mol Biol Cell.* 2012 Mar;23(6):1058–67.
177. Xu H, Boone C, Klein HL. Mrc1 is required for sister chromatid cohesion to aid in recombination repair of spontaneous damage. *Mol Cell Biol.* 2004 Aug;24(16):7082–90.
178. Komata M, Bando M, Araki H, Shirahige K. The direct binding of Mrc1, a checkpoint mediator, to Mcm6, a replication helicase, is essential for the replication checkpoint against methyl methanesulfonate-induced stress. *Mol Cell Biol.* 2009 Sep;29(18):5008–19.
179. Katou Y, Kanoh Y, Bando M, Noguchi H, Tanaka H, Ashikari T, et al. S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature.* 2003 Aug 28;424(6952):1078–83.
180. Sweeney FD, Yang F, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Durocher D. *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Acts as a Mec1 Adaptor to Allow Rad53 Activation. *Curr Biol.* 2005 Aug 9;15(15):1364–75.
181. Grenon M, Costelloe T, Jimeno S, O’Shaughnessy A, Fitzgerald J, Zgheib O, et al. Docking onto chromatin via the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Tudor domain. *Yeast Chichester Engl.* 2007 Feb;24(2):105–19.
182. Wysocki R, Javaheri A, Allard S, Sha F, Côté J, Kron SJ. Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Mol Cell Biol.* 2005 Oct;25(19):8430–43.

183. Conde F, Ontoso D, Acosta I, Gallego-Sánchez A, Bueno A, San-Segundo PA. Regulation of tolerance to DNA alkylating damage by Dot1 and Rad53 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*. 2010 Oct 5;9(10):1038–49.
184. Nakada D, Matsumoto K, Sugimoto K. ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev*. 2003 Aug 15;17(16):1957–62.
185. Usui T, Ogawa H, Petrini JH. A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell*. 2001 Jun;7(6):1255–66.
186. Morrow DM, Tagle DA, Shiloh Y, Collins FS, Hieter P. TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell*. 1995 Sep 8;82(5):831–40.
187. Pelliccioli A, Lucca C, Liberi G, Marini F, Lopes M, Plevani P, et al. Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J*. 1999 Nov 15;18(22):6561–72.
188. Zegerman P, Diffley JFX. Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature*. 2010 Sep 23;467(7314):474–8.
189. Santocanale C, Diffley JF. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature*. 1998 Oct 8;395(6702):615–8.
190. Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet*. 2002;36:617–56.
191. Zhou Z, Elledge SJ. DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell*. 1993 Dec 17;75(6):1119–27.
192. Cohen-Fix O, Koshland D. The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 23;94(26):14361–6.
193. Nguyen AT, Zhang Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes Dev*. 2011 Jul 1;25(13):1345–58.
194. Yekezare M, Gómez-González B, Diffley JFX. Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. *J Cell Sci*. 2013 Mar 15;126(Pt 6):1297–306.
195. Hustedt N, Gasser SM, Shimada K. Replication Checkpoint: Tuning and Coordination of Replication Forks in S Phase. *Genes*. 2013 Aug 19;4(3):388–434.

196. Szyjka SJ, Aparicio JG, Viggiani CJ, Knott S, Xu W, Tavaré S, et al. Rad53 regulates replication fork restart after DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 2008 Jul 15;22(14):1906–20.
197. Vidanes GM, Sweeney FD, Galicia S, Cheung S, Doyle JP, Durocher D, et al. CDC5 inhibits the hyperphosphorylation of the checkpoint kinase Rad53, leading to checkpoint adaptation. *PLoS Biol.* 2010 Jan;8(1):e1000286.
198. O'Neill BM, Szyjka SJ, Lis ET, Bailey AO, Yates JR, Aparicio OM, et al. Pph3-Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 29;104(22):9290–5.
199. Ohouo PY, Bastos de Oliveira FM, Liu Y, Ma CJ, Smolka MB. DNA-repair scaffolds dampen checkpoint signalling by counteracting the adaptor Rad9. *Nature.* 2013 Jan 3;493(7430):120–4.
200. Flott S, Alabert C, Toh GW, Toth R, Sugawara N, Campbell DG, et al. Phosphorylation of Slx4 by Mec1 and Tel1 regulates the single-strand annealing mode of DNA repair in budding yeast. *Mol Cell Biol.* 2007 Sep;27(18):6433–45.
201. Gritenaite D, Princz LN, Szakal B, Bantele SCS, Wendeler L, Schilbach S, et al. A cell cycle-regulated Slx4-Dpb11 complex promotes the resolution of DNA repair intermediates linked to stalled replication. *Genes Dev.* 2014 Jul 15;28(14):1604–19.
202. Dibitetto D, Ferrari M, Rawal CC, Balint A, Kim T, Zhang Z, et al. Slx4 and Rtt107 control checkpoint signalling and DNA resection at double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 2015 Oct 20;
203. Hang LE, Peng J, Tan W, Szakal B, Menolfi D, Sheng Z, et al. Rtt107 Is a Multifunctional Scaffold Supporting Replication Progression with Partner SUMO and Ubiquitin Ligases. *Mol Cell.* 2015 Oct 15;60(2):268–79.
204. Roberts TM, Kobor MS, Bastin-Shanower SA, Ii M, Horte SA, Gin JW, et al. Slx4 regulates DNA damage checkpoint-dependent phosphorylation of the BRCT domain protein Rtt107/Esc4. *Mol Biol Cell.* 2006 Jan;17(1):539–48.
205. Balint A, Kim T, Gallo D, Cussiol JR, Bastos de Oliveira FM, Yimit A, et al. Assembly of Slx4 signaling complexes behind DNA replication forks. *EMBO J.* 2015 Aug 13;34(16):2182–97.
206. Ohouo PY, Bastos de Oliveira FM, Almeida BS, Smolka MB. DNA damage signaling recruits the Rtt107-Slx4 scaffolds via Dpb11 to mediate replication stress response. *Mol Cell.* 2010 Jul 30;39(2):300–6.

207. Wyatt HDM, Sarbajna S, Matos J, West SC. Coordinated actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday junction resolution in human cells. *Mol Cell*. 2013 Oct 24;52(2):234–47.
208. Castor D, Nair N, Déclais A-C, Lachaud C, Toth R, Macartney TJ, et al. Cooperative Control of Holliday Junction Resolution and DNA Repair by the SLX1 and MUS81-EME1 Nucleases. *Mol Cell*. 2013 Oct 24;52(2):221–33.
209. Gingras A-C, Caballero M, Zarske M, Sanchez A, Hazbun TR, Fields S, et al. A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2005 Nov;4(11):1725–40.
210. Hastie CJ, Vázquez-Martin C, Philp A, Stark MJR, Cohen PTW. The *Saccharomyces cerevisiae* orthologue of the human protein phosphatase 4 core regulatory subunit R2 confers resistance to the anticancer drug cisplatin. *FEBS J*. 2006 Jul;273(14):3322–34.
211. Keogh M-C, Kim J-A, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, Harrison JC, et al. A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature*. 2006 Jan 26;439(7075):497–501.
212. Nakada S, Chen GI, Gingras A-C, Durocher D. PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep*. 2008 Oct;9(10):1019–26.
213. Lee J, Adelmant G, Marto JA, Lee D-H. Dephosphorylation of DBC1 by Protein Phosphatase 4 Is Important for p53-Mediated Cellular Functions. *Mol Cells*. 2015 Aug;38(8):697–704.
214. Lee D-H, Pan Y, Kanner S, Sung P, Borowiec JA, Chowdhury D. A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Mar;17(3):365–72.
215. Bazzi M, Mantiero D, Trovesi C, Lucchini G, Longhese MP. Dephosphorylation of gamma H2A by Glc7/protein phosphatase 1 promotes recovery from inhibition of DNA replication. *Mol Cell Biol*. 2010 Jan;30(1):131–45.
216. Guillemain G, Ma E, Mauger S, Miron S, Thai R, Guérois R, et al. Mechanisms of Checkpoint Kinase Rad53 Inactivation after a Double-Strand Break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2007 May 1;27(9):3378–89.
217. Heideker J, Lis ET, Romesberg FE. Phosphatases, DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation. *Cell Cycle Georget Tex*. 2007 Dec 15;6(24):3058–64.
218. Hustedt N, Seeber A, Sack R, Tsai-Pflugfelder M, Bhullar B, Vlaming H, et al. Yeast PP4 interacts with ATR homolog Ddc2-Mec1 and regulates checkpoint signaling. *Mol Cell*. 2015 Jan 22;57(2):273–89.

219. Symington LS, Rothstein R, Lisby M. Mechanisms and regulation of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2014 Nov;198(3):795–835.
220. Carr AM, Lambert S. Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J Mol Biol*. 2013 Nov 29;425(23):4733–44.
221. Chen H, Lisby M, Symington LS. RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Mol Cell*. 2013 May 23;50(4):589–600.
222. Nicolette ML, Lee K, Guo Z, Rani M, Chow JM, Lee SE, et al. Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Dec;17(12):1478–85.
223. Ogawa T, Yu X, Shinohara A, Egelman EH. Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science*. 1993 Mar 26;259(5103):1896–9.
224. Sugiyama T, Kowalczykowski SC. Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):31663–72.
225. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:229–57.
226. Gasior SL, Wong AK, Kora Y, Shinohara A, Bishop DK. Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev*. 1998 Jul 15;12(14):2208–21.
227. Heyer W-D, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 2010;44:113–39.
228. Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):699–713.
229. Petukhova G, Stratton S, Sung P. Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*. 1998 May 7;393(6680):91–4.
230. Solinger JA, Kiiianitsa K, Heyer W-D. Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol Cell*. 2002 Nov;10(5):1175–88.
231. Nassif N, Penney J, Pal S, Engels WR, Gloor GB. Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol Cell Biol*. 1994 Mar 1;14(3):1613–25.

232. Ivanov EL, Sugawara N, Fishman-Lobell J, Haber JE. Genetic Requirements for the Single-Strand Annealing Pathway of Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics*. 1996 Mar;142(3):693–704.
233. Xu X, Blackwell S, Lin A, Li F, Qin Z, Xiao W. Error-free DNA-damage tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015 Jun;764:43–50.
234. Sacher M, Pfander B, Hoege C, Jentsch S. Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nat Cell Biol*. 2006 Nov;8(11):1284–90.
235. Chung I, Zhao X. DNA break-induced sumoylation is enabled by collaboration between a SUMO ligase and the ssDNA-binding complex RPA. *Genes Dev*. 2015 Aug 1;29(15):1593–8.
236. Ohuchi T, Seki M, Branzei D, Maeda D, Ui A, Ogiwara H, et al. Rad52 sumoylation and its involvement in the efficient induction of homologous recombination. *DNA Repair*. 2008 Jun 1;7(6):879–89.
237. Esta A, Ma E, Dupaigne P, Maloisel L, Guerois R, Le Cam E, et al. Rad52 sumoylation prevents the toxicity of unproductive Rad51 filaments independently of the anti-recombinase Srs2. *PLoS Genet*. 2013;9(10):e1003833.
238. Mitchel K, Lehner K, Jinks-Robertson S. Heteroduplex DNA Position Defines the Roles of the Sgs1, Srs2, and Mph1 Helicases in Promoting Distinct Recombination Outcomes. *PLOS Genet*. 2013 Mar 14;9(3):e1003340.
239. Fabre F, Chan A, Heyer W-D, Gangloff S. Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/ Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24;99(26):16887–92.
240. Gangloff S, McDonald JP, Bendixen C, Arthur L, Rothstein R. The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol*. 1994 Dec;14(12):8391–8.
241. Mankouri HW, Hickson ID. The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific “dissolvasome”? *Trends Biochem Sci*. 2007 Dec;32(12):538–46.
242. Myung K, Datta A, Chen C, Kolodner RD. SGS1, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):113–6.
243. Cejka P, Plank JL, Dombrowski CC, Kowalczykowski SC. Decatenation of DNA by the *S. cerevisiae* Sgs1-Top3-Rmi1 and RPA complex: a mechanism for disentangling chromosomes. *Mol Cell*. 2012 Sep 28;47(6):886–96.

244. Vanoli F, Fumasoni M, Szakal B, Maloisel L, Branzei D. Replication and Recombination Factors Contributing to Recombination-Dependent Bypass of DNA Lesions by Template Switch. *PLOS Genet.* 2010 Nov 11;6(11):e1001205.
245. Liberi G, Maffioletti G, Lucca C, Chiolo I, Baryshnikova A, Cotta-Ramusino C, et al. Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in *sgs1* mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes Dev.* 2005 Feb 1;19(3):339–50.
246. Mullen JR, Kaliraman V, Ibrahim SS, Brill SJ. Requirement for three novel protein complexes in the absence of the *Sgs1* DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2001 Jan;157(1):103–18.
247. Szakal B, Branzei D. Premature Cdk1/Cdc5/Mus81 pathway activation induces aberrant replication and deleterious crossover. *EMBO J.* 2013 Apr 17;32(8):1155–67.
248. Bastin-Shanower SA, Fricke WM, Mullen JR, Brill SJ. The mechanism of Mus81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1-Rad10. *Mol Cell Biol.* 2003 May;23(10):3487–96.
249. Aboussekhra A, Chanet R, Zgaga Z, Cassier-Chauvat C, Heude M, Fabre F. RADH, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of radH mutants and sequence of the gene. *Nucleic Acids Res.* 1989 Sep 25;17(18):7211–9.
250. Rong L, Klein HL. Purification and characterization of the SRS2 DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1993 Jan 15;268(2):1252–9.
251. Krejci L, Macris M, Li Y, Van Komen S, Villemain J, Ellenberger T, et al. Role of ATP hydrolysis in the antirecombinase function of *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 protein. *J Biol Chem.* 2004 May 28;279(22):23193–9.
252. Van Komen S, Reddy MS, Krejci L, Klein H, Sung P. ATPase and DNA helicase activities of the *Saccharomyces cerevisiae* anti-recombinase Srs2. *J Biol Chem.* 2003 Nov 7;278(45):44331–7.
253. Krejci L, Van Komen S, Li Y, Villemain J, Reddy MS, Klein H, et al. DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):305–9.
254. Veaute X, Jeusset J, Soustelle C, Kowalczykowski SC, Le Cam E, Fabre F. The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):309–12.
255. Pfander B, Moldovan G-L, Sacher M, Hoege C, Jentsch S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature.* 2005 Jul 21;436(7049):428–33.

256. Heude M, Chanet R, Fabre F. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase during the mitotic cell cycle, meiosis and after irradiation. *Mol Gen Genet MGG*. 1995 Jul 22;248(1):59–68.
257. Vaze MB, Pelliccioli A, Lee SE, Ira G, Liberi G, Arbel-Eden A, et al. Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell*. 2002 Aug;10(2):373–85.
258. Liberi G, Chiolo I, Pelliccioli A, Lopes M, Plevani P, Muzi-Falconi M, et al. Srs2 DNA helicase is involved in checkpoint response and its regulation requires a functional Mec1-dependent pathway and Cdk1 activity. *EMBO J*. 2000 Sep 15;19(18):5027–38.
259. Papouli E, Chen S, Davies AA, Huttner D, Krejci L, Sung P, et al. Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell*. 2005 Jul 1;19(1):123–33.
260. Schiestl RH, Prakash S, Prakash L. The SRS2 suppressor of rad6 mutations of *Saccharomyces cerevisiae* acts by channeling DNA lesions into the RAD52 DNA repair pathway. *Genetics*. 1990 Apr;124(4):817–31.
261. Dupaigne P, Le Breton C, Fabre F, Gangloff S, Le Cam E, Veaute X. The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA: implications for crossover incidence during mitotic recombination. *Mol Cell*. 2008 Feb 1;29(2):243–54.
262. Sugawara N, Ira G, Haber JE. DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(14):5300–9.
263. Le Breton C, Dupaigne P, Robert T, Le Cam E, Gangloff S, Fabre F, et al. Srs2 removes deadly recombination intermediates independently of its interaction with SUMO-modified PCNA. *Nucleic Acids Res*. 2008 Sep;36(15):4964–74.
264. Kohzaki M, Hatanaka A, Sonoda E, Yamazoe M, Kikuchi K, Vu Trung N, et al. Cooperative roles of vertebrate Fbh1 and Blm DNA helicases in avoidance of crossovers during recombination initiated by replication fork collapse. *Mol Cell Biol*. 2007 Apr;27(8):2812–20.
265. Moldovan G-L, Dejsuphong D, Petalcorin MIR, Hofmann K, Takeda S, Boulton SJ, et al. Inhibition of homologous recombination by the PCNA-interacting protein PARI. *Mol Cell*. 2012 Jan 13;45(1):75–86.
266. Burgess RC, Lisby M, Altmannova V, Krejci L, Sung P, Rothstein R. Localization of recombination proteins and Srs2 reveals anti-recombinase function in vivo. *J Cell Biol*. 2009 Jun 15;185(6):969–81.

267. Urulangodi M, Sebesta M, Menolfi D, Szakal B, Sollier J, Sisakova A, et al. Local regulation of the Srs2 helicase by the SUMO-like domain protein Esc2 promotes recombination at sites of stalled replication. *Genes Dev.* 2015 Oct 1;29(19):2067–80.
268. Bernstein KA, Reid RJD, Sunjevaric I, Demuth K, Burgess RC, Rothstein R. The Shu complex, which contains Rad51 paralogues, promotes DNA repair through inhibition of the Srs2 anti-recombinase. *Mol Biol Cell.* 2011 May;22(9):1599–607.
269. Mankouri HW, Ngo H-P, Hickson ID. Shu proteins promote the formation of homologous recombination intermediates that are processed by Sgs1-Rmi1-Top3. *Mol Biol Cell.* 2007 Oct;18(10):4062–73.
270. Rong L, Palladino F, Aguilera A, Klein HL. The hyper-gene conversion hpr5-1 mutation of *Saccharomyces cerevisiae* is an allele of the SRS2/RADH gene. *Genetics.* 1991 Jan;127(1):75–85.
271. McVey M, Kaeberlein M, Tissenbaum HA, Guarente L. The short life span of *Saccharomyces cerevisiae* sgs1 and srs2 mutants is a composite of normal aging processes and mitotic arrest due to defective recombination. *Genetics.* 2001 Apr;157(4):1531–42.
272. Mankouri HW, Craig TJ, Morgan A. SGS1 is a multicopy suppressor of srs2: functional overlap between DNA helicases. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 1;30(5):1103–13.
273. Robert T, Dervins D, Fabre F, Gangloff S. Mrc1 and Srs2 are major actors in the regulation of spontaneous crossover. *EMBO J.* 2006 Jun 21;25(12):2837–46.
274. Branzei D, Psakhye I. DNA damage tolerance. *Curr Opin Cell Biol.* 2016 Apr 6;40:137–44.
275. Branzei D, Szakal B. Priming for tolerance and cohesion at replication forks. *Nucl Austin Tex.* 2016 Feb 18;1–5.
276. Hoeye C, Pfander B, Moldovan G-L, Pyrowolakis G, Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.* 2002 Sep 12;419(6903):135–41.
277. Karras GI, Jentsch S. The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell.* 2010 Apr 16;141(2):255–67.
278. Zhang W, Qin Z, Zhang X, Xiao W. Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. *FEBS Lett.* 2011 Sep 16;585(18):2786–94.
279. Broomfield S, Xiao W. Suppression of genetic defects within the RAD6 pathway by srs2 is specific for error-free post-replication repair but not for damage-induced mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 2002 Feb 1;30(3):732–9.

280. Zhong X, Garg P, Stith CM, Nick McElhinny SA, Kissling GE, Burgers PMJ, et al. The fidelity of DNA synthesis by yeast DNA polymerase zeta alone and with accessory proteins. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(17):4731–42.
281. Kunz BA, Straffon AF, Vonarx EJ. DNA damage-induced mutation: tolerance via translesion synthesis. *Mutat Res.* 2000 Jun 30;451(1–2):169–85.
282. Davies AA, Huttner D, Daigaku Y, Chen S, Ulrich HD. Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a. *Mol Cell.* 2008 Mar 14;29(5):625–36.
283. Conde F, San-Segundo PA. Role of Dot1 in the response to alkylating DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of DNA damage tolerance by the error-prone polymerases Polzeta/Rev1. *Genetics.* 2008 Jul;179(3):1197–210.
284. Branzei D. Ubiquitin family modifications and template switching. *FEBS Lett.* 2011 Sep 16;585(18):2810–7.
285. Branzei D, Vanoli F, Foiani M. SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. *Nature.* 2008 Dec 18;456(7224):915–20.
286. Zhang H, Lawrence CW. The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 1;102(44):15954–9.
287. Sabbioneda S, Minesinger BK, Giannattasio M, Plevani P, Muzi-Falconi M, Jinks-Robertson S. The 9-1-1 Checkpoint Clamp Physically Interacts with Pol ζ and Is Partially Required for Spontaneous Pol ζ -dependent Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2005 Nov 18;280(46):38657–65.
288. Karras GI, Fumasoni M, Sienski G, Vanoli F, Branzei D, Jentsch S. Noncanonical role of the 9-1-1 clamp in the error-free DNA damage tolerance pathway. *Mol Cell.* 2013 Feb 7;49(3):536–46.
289. Fumasoni M, Zwicky K, Vanoli F, Lopes M, Branzei D. Error-Free DNA Damage Tolerance and Sister Chromatid Proximity during DNA Replication Rely on the Pol α /Primase/Ctf4 Complex. *Mol Cell.* 2015 Mar 5;57(5):812–23.
290. Giannattasio M, Zwicky K, Follonier C, Foiani M, Lopes M, Branzei D. Visualization of recombination-mediated damage bypass by template switching. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Oct;21(10):884–92.
291. Wurtele H, Verreault A. Histone post-translational modifications and the response to DNA double-strand breaks. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Apr;18(2):137–44.

292. Edenberg ER, Vashisht AA, Topacio BR, Wohlschlegel JA, Toczyski DP. Hst3 is turned over by a replication stress-responsive SCF(Cdc4) phospho-degron. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 22;111(16):5962–7.
293. Delgosaie N, Tang X, Kanshin ED, Williams EC, Rudner AD, Thibault P, et al. Regulation of the histone deacetylase Hst3 by cyclin-dependent kinases and the ubiquitin ligase SCFCdc4. *J Biol Chem*. 2014 May 9;289(19):13186–96.
294. Thaminy S, Newcomb B, Kim J, Gatbonton T, Foss E, Simon J, et al. Hst3 is regulated by Mec1-dependent proteolysis and controls the S phase checkpoint and sister chromatid cohesion by deacetylating histone H3 at lysine 56. *J Biol Chem*. 2007 Dec 28;282(52):37805–14.
295. Muñoz-Galván S, Jimeno S, Rothstein R, Aguilera A. Histone H3K56 Acetylation, Rad52, and Non-DNA Repair Factors Control Double-Strand Break Repair Choice with the Sister Chromatid. *PLoS Genet*. 2013 Jan;9(1):e1003237.
296. Endo H, Kawashima S, Sato L, Lai MS, Enomoto T, Seki M, et al. Chromatin dynamics mediated by histone modifiers and histone chaperones in postreplicative recombination. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 2010 Sep 1;15(9):945–58.
297. Alvaro D, Lisby M, Rothstein R. Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS Genet*. 2007 Dec;3(12):e228.
298. Moriel-Carretero M, Aguilera A. A Postincision-Deficient TFIIF Causes Replication Fork Breakage and Uncovers Alternative Rad51- or Pol32-Mediated Restart Mechanisms. *Mol Cell*. 2010 Mar 12;37(5):690–701.
299. Lydeard JR, Jain S, Yamaguchi M, Haber JE. Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature*. 2007 Aug 16;448(7155):820–3.
300. Sauve AA, Youn DY. Sirtuins: NAD(+)-dependent deacetylase mechanism and regulation. *Curr Opin Chem Biol*. 2012 Dec;16(5–6):535–43.
301. Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. *Mol Basel Switz*. 2009;14(9):3446–85.
302. Nakanishi S, Sanderson BW, Delventhal KM, Bradford WD, Staehling-Hampton K, Shilatifard A. A comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Aug;15(8):881–8.
303. Kawai S, Hashimoto W, Murata K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioeng Bugs*. 2010 Dec;1(6):395–403.

304. Treco DA, Winston F. Growth and manipulation of yeast. *Curr Protoc Mol Biol Ed Frederick M Ausubel Al.* 2008 Apr;Chapter 13:Unit 13.2.
305. Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 1987;154:164–75.
306. Haase SB, Reed SI. Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle Georget Tex.* 2002 Apr;1(2):132–6.
307. Kushnirov VV. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast Chichester Engl.* 2000 Jun 30;16(9):857–60.
308. Sheff MA, Thorn KS. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* 2004 Jun;21(8):661–70.
309. Ericson E, Hoon S, St Onge RP, Giaever G, Nislow C. Exploring gene function and drug action using chemogenomic dosage assays. *Methods Enzymol.* 2010;470:233–55.
310. Hillenmeyer ME, Fung E, Wildenhain J, Pierce SE, Hoon S, Lee W, et al. The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science.* 2008 Apr 18;320(5874):362–5.
311. Lee AY, St. Onge RP, Proctor MJ, Wallace IM, Nile AH, Spagnuolo PA, et al. Mapping the Cellular Response to Small Molecules Using Chemogenomic Fitness Signatures. *Science.* 2014 Apr 11;344(6180):208–11.
312. Smith AM, Durbic T, Oh J, Urbanus M, Proctor M, Heisler LE, et al. Competitive genomic screens of barcoded yeast libraries. *J Vis Exp JoVE.* 2011;(54).
313. Pierce SE, Davis RW, Nislow C, Giaever G. Genome-wide analysis of barcoded *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion mutants in pooled cultures. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2958–74.
314. Boyle EI, Weng S, Gollub J, Jin H, Botstein D, Cherry JM, et al. GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinforma Oxf Engl.* 2004 Dec 12;20(18):3710–5.
315. Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, Balakrishnan R, Binkley G, Chan ET, et al. *Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast.* *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan;40(Database issue):D700-705.
316. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast Chichester Engl.* 1998 Jan 30;14(2):115–32.

317. Thomas BJ, Rothstein R. The genetic control of direct-repeat recombination in *Saccharomyces*: the effect of *rad52* and *rad1* on mitotic recombination at *GAL10*, a transcriptionally regulated gene. *Genetics*. 1989 Dec;123(4):725–38.
318. Simoneau A, Ricard É, Weber S, Hammond-Martel I, Wong LH, Sellam A, et al. Chromosome-wide histone deacetylation by sirtuins prevents hyperactivation of DNA damage-induced signaling upon replicative stress. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 8;
319. de los Santos T, Loidl J, Larkin B, Hollingsworth NM. A role for *MMS4* in the processing of recombination intermediates during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2001 Dec;159(4):1511–25.
320. Hoffmann R, Jung S, Ehrmann M, Hofer HW. The *Saccharomyces cerevisiae* gene *PPH3* encodes a protein phosphatase with properties different from *PPX*, *PP1* and *PP2A*. *Yeast Chichester Engl*. 1994 May;10(5):567–78.
321. Vázquez-Martin C, Rouse J, Cohen PTW. Characterization of the role of a trimeric protein phosphatase complex in recovery from cisplatin-induced versus noncrosslinking DNA damage. *FEBS J*. 2008 Aug;275(16):4211–21.
322. Pavlov YI, Shcherbakova PV, Kunkel TA. In vivo consequences of putative active site mutations in yeast DNA polymerases alpha, epsilon, delta, and zeta. *Genetics*. 2001 Sep;159(1):47–64.
323. Marini V, Krejci L. Srs2: the “Odd-Job Man” in DNA repair. *DNA Repair*. 2010 Mar 2;9(3):268–75.
324. Antony E, Tomko EJ, Xiao Q, Krejci L, Lohman TM, Ellenberger T. Srs2 disassembles Rad51 filaments by a protein-protein interaction triggering ATP turnover and dissociation of Rad51 from DNA. *Mol Cell*. 2009 Jul 10;35(1):105–15.
325. Aparicio OM, Billington BL, Gottschling DE. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell*. 1991 Sep 20;66(6):1279–87.
326. Gangloff S, Soustelle C, Fabre F. Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the *Sgs1* and *Srs2* helicases. *Nat Genet*. 2000 Jun;25(2):192–4.
327. Liu J, Renault L, Veaute X, Fabre F, Stahlberg H, Heyer W-D. Rad51 paralogs Rad55-Rad57 balance the anti-recombinase Srs2 in Rad51 filament formation. *Nature*. 2011 Oct 23;479(7372):245–8.
328. Pannunzio NR, Manthey GM, Bailis AM. *RAD59* and *RAD1* cooperate in translocation formation by single-strand annealing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2010 Feb;56(1):87–100.

329. Seong C, Colavito S, Kwon Y, Sung P, Krejci L. Regulation of Rad51 recombinase presynaptic filament assembly via interactions with the Rad52 mediator and the Srs2 anti-recombinase. *J Biol Chem*. 2009 Sep 4;284(36):24363–71.
330. Drogaris P, Wurtele H, Masumoto H, Verreault A, Thibault P. Comprehensive profiling of histone modifications using a label-free approach and its applications in determining structure-function relationships. *Anal Chem*. 2008 Sep 1;80(17):6698–707.
331. Yoshida K, Bacal J, Desmarais D, Padioleau I, Tsaponina O, Chabes A, et al. The histone deacetylases sir2 and rpd3 act on ribosomal DNA to control the replication program in budding yeast. *Mol Cell*. 2014 May 22;54(4):691–7.
332. Weitao T, Budd M, Campbell JL. Evidence that yeast SGS1, DNA2, SRS2, and FOB1 interact to maintain rDNA stability. *Mutat Res*. 2003 Nov 27;532(1–2):157–72.
333. Kolesar P, Altmannova V, Silva S, Lisby M, Krejci L. Pro-recombination Role of Srs2 Protein Requires SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) but Is Independent of PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) Interaction. *J Biol Chem*. 2016 Apr 1;291(14):7594–607.
334. Jablonowski CM, Cussiol JR, Oberly S, Yimit A, Balint A, Kim T, et al. Termination of Replication Stress Signaling via Concerted Action of the Slx4 Scaffold and the PP4 Phosphatase. *Genetics*. 2015 Nov;201(3):937–49.
335. McDonald JP, Levine AS, Woodgate R. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. *Genetics*. 1997 Dec;147(4):1557–68.
336. Yeung M, Durocher D. Srs2 enables checkpoint recovery by promoting disassembly of DNA damage foci from chromatin. *DNA Repair*. 2011 Dec 10;10(12):1213–22.
337. Carter SD, Vidasová D, Chen J, Chovanec M, Aström SU. Nej1 recruits the Srs2 helicase to DNA double-strand breaks and supports repair by a single-strand annealing-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 21;106(29):12037–42.
338. Chavdarova M, Marini V, Sisakova A, Sedlackova H, Vidasova D, Brill SJ, et al. Srs2 promotes Mus81-Mms4-mediated resolution of recombination intermediates. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):3626–42.
339. Keyamura K, Arai K, Hishida T. Srs2 and Mus81-Mms4 Prevent Accumulation of Toxic Inter-Homolog Recombination Intermediates. *PLoS Genet*. 2016 Jul;12(7):e1006136.
340. Porcu M, Chiarugi A. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci*. 2005 Feb;26(2):94–103.

341. Carafa V, Rotili D, Forgione M, Cuomo F, Serretiello E, Hailu GS, et al. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. *Clin Epigenetics*. 2016;8:61.
342. Donadini A, Rosano C, Felli L, Ponassi M. Human sirtuins: an overview of an emerging drug target in age-related diseases and cancer. *Curr Drug Targets*. 2013 Jun 1;14(6):653–61.
343. Yuan H, Su L, Chen WY. The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. *OncoTargets Ther*. 2013;6:1399–416.
344. Bosch-Presegú L, Vaquero A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer*. 2011 Jun;2(6):648–62.
345. Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*. 2007 Aug 13;26(37):5489–504.
346. Schemies J, Uciechowska U, Sippl W, Jung M. NAD(+) -dependent histone deacetylases (sirtuins) as novel therapeutic targets. *Med Res Rev*. 2010 Nov;30(6):861–89.
347. Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett*. 2009 May 8;277(1):8–21.
348. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Sep;5(9):769–84.

Annexe

Résultats publiés (Simoneau A. *et al*, Nucleic Acid Research Journal 2016) (318)

L'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 contribue aux phénotypes d'une inhibition des sirtuines par le NAM

H4K16ac est une modification post-traductionnelle à la chromatine silencieuse qui est déacétylée par les sirtuines Sir2 et Hst2 (55,69,149). L'abolition de H4K16ac par mutation de la lysine pour une arginine non acétylable (*H4K16R*) supprime la thermosensibilité du double mutant *hst3Δ hst4Δ*, suggérant que ces deux modifications d'histones sont indirectement reliées (60). Nous avons vérifié si cette modification pouvait contribuer à l'apparition de dommages spontanés à l'ADN observés en NAM (figure 8), qui inhibe également les activités de Sir2 et Hst2. La mutation de la lysine 16 par une alanine (*H4K16A*) ou une arginine (*H4K16R*) améliore le niveau de croissance cellulaire en NAM (figure 25A) et diminue le niveau d'activation de la kinase Rad53 (figure 25B). Ces résultats suggèrent que même si l'hyperacétylation de H3K56 joue un rôle dominant dans la génotoxicité en NAM, d'autres MPTs telles que H4K16ac peuvent contribuer aux phénotypes.

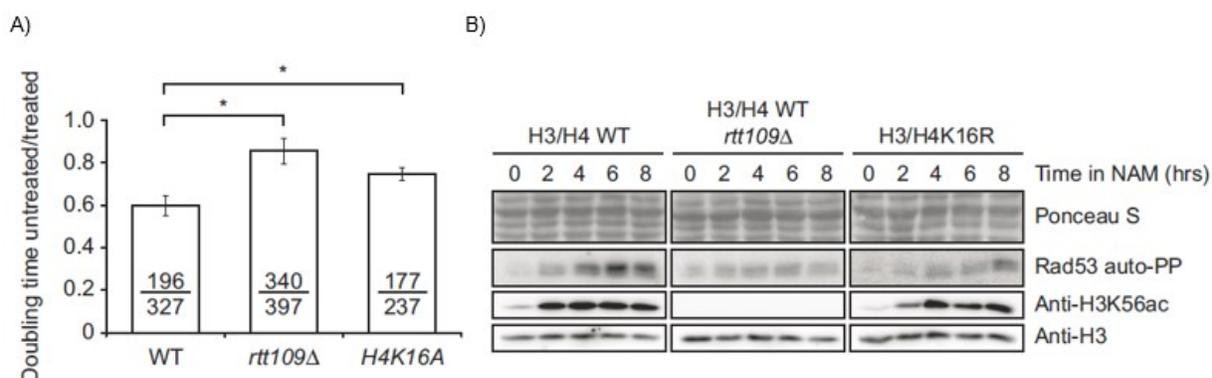


Figure 25 L'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 contribue aux défauts de croissance cellulaire observés au NAM. A) Les défauts de croissance en NAM dépendent de l'hyperacétylation de H3K56, mais également de H4K16ac. Les temps de dédoublements ont été mesurés en milieu YPD \pm 20 mM NAM. Les valeurs représentent les ratios, en minutes, du dédoublement en NAM sur les cellules non traitées. B) Le mutant *H4K16R* diminue le niveau

d'activation de Rad53. Les cellules ont été traitées avec 20 mM NAM puis collectées aux temps respectifs pour le Western Blot ainsi que l'essai kinase *in situ*. Réalisation : Hugo Wurtele (figure B)

La polymérisation de translésion (TLS) est une voie requise pour la croissance cellulaire lors d'inhibition des sirtuines par le NAM

Comme l'activation de la kinase Rad53 mène à l'inhibition de la polymérisation de translésion (TLS) et que nos résultats suggèrent que son hyperactivation influence la réplication de l'ADN, nous avons émis l'hypothèse que le TLS pouvait être impliqué dans la complétion de la réplication en réponse à l'inhibition des sirtuines (60,280,322). Nous voulions vérifier si PCNA contribuait à la suppression phénotypique des mutants *rad9Δ* ou *dot1Δ*. PCNA est ubiquitiné sur la lysine 164 lors de la réparation post-réplivative (RPR) : le complexe Ub-ligase Rad6-Rad18 enclenche le TLS par sa mono-ubiquitination, alors que le complexe Ub-ligase Mms2-Rad5-Ubc13 enclenche le TS par sa poly-ubiquitination (274,278). Empêcher le TLS, soit par la mutation du gène de *RAD18* ou celle de la lysine 164 de PCNA (*POL30*) par une arginine, sensibilise les mutants *slx4Δ dot1Δ* et *pph3Δ rad9Δ* à de faibles concentrations en NAM (figure 26A-B). Cela suggère que le TLS est une voie de réparation sollicitée en réponse au NAM plutôt que le TS, car une délétion du gène de *MMS2* n'affecte pas la croissance cellulaire des doubles mutants (figure 26A). La délétion du gène de *REV3*, codant pour la sous-unité catalytique de Polζ, ne contribue pas à la suppression phénotypique des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en absence de Dot1 (figure 26C). Ces résultats indiquent que même si l'inhibition du TLS pouvait contribuer aux défauts des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en présence de NAM, cette voie de TDA inciterait l'utilisation d'une autre polymérase de translésion que Polζ. Cela n'exclut toutefois pas l'hypothèse du TLS comme un mécanisme compensatoire.

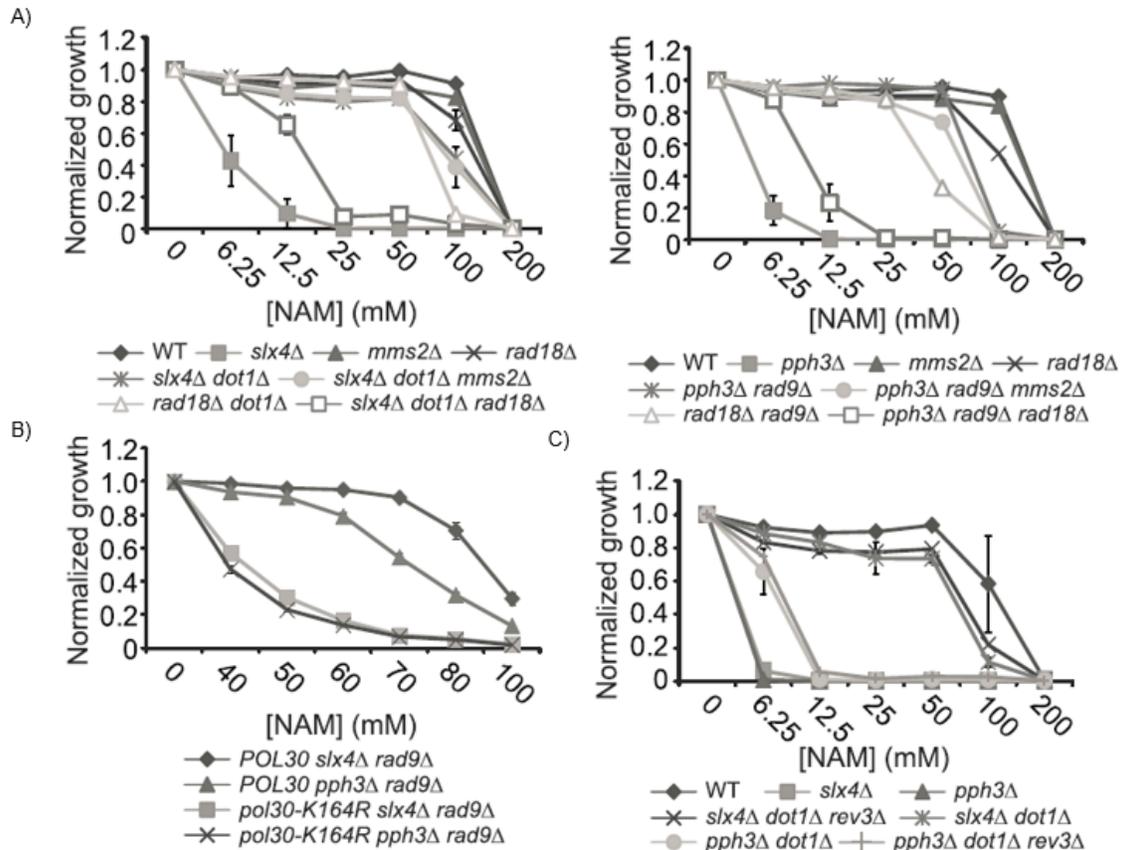


Figure 26 La polymérisation de translésion permet de restaurer la croissance des mutants *slx4Δ* et *pph3Δ* en NAM, de manière indépendante à Polζ. A) Restaurer la croissance des mutants par *dot1Δ* et *rad9Δ* dépend de la fonction de *RAD18*, et non celle de *MMS2*. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. B) Restaurer la croissance par *rad9Δ* dépend également de la mono-ubiquitination de PCNA (*POL30*). Les cellules ont été traitées comme en A). C) Restaurer la croissance par un mutant *dot1Δ* ne requiert pas l'activité de la polymérase zêta (*REV3*). Les cellules ont été traitées comme en A). Réalisation : Ian Hammond-Martel (figures A et B), Antoine Simoneau (figure C)

Résultats non-publiés

Optimisation des conditions nécessaires à la réalisation des souches *srs2Δ* ± *rtt101Δ*, *rtt107Δ*, *mms1Δ* et *mms22Δ*

Pour confirmer les résultats obtenus à la figure 20, des tests de validité pour les souches *srs2Δ rtt101Δ*, *srs2Δ rtt107Δ*, *srs2Δ mms1Δ* et *srs2Δ mms22Δ* ont été effectués. La délétion de gènes impliqués dans la voie de H3K56ac comme *RTT101*, *MMS1*, *MMS22* ou

RTT107 confère une meilleure croissance de la levure en présence de NAM, mais non en présence d'agents génotoxiques comme le MMS (154,318). Nous avons procédé à des tests de croissance sur milieu YPD en présence de MMS ou de NAM, dans le but d'observer la modulation de ces phénotypes en absence de *SRS2*. Le mutant *srs2Δ* sensibilise les cellules dépourvues de *Rtt101*, *Mms1*, *Mms22* et *Rtt107* en réponse au NAM et au MMS (figure 27A). Ce même effet fut observé en absence des sirtuines *Hst3* et *Hst4* à des conditions semblables (figure 27B), car l'hyperacétylation de H3K56 dans un double mutant *hst3Δ hst4Δ* confère une forte sensibilité de la cellule en MMS (80). Cela suggère que *Srs2* permettrait la viabilité de la cellule en présence d'agents cytotoxiques, de manière dépendante de H3K56ac.

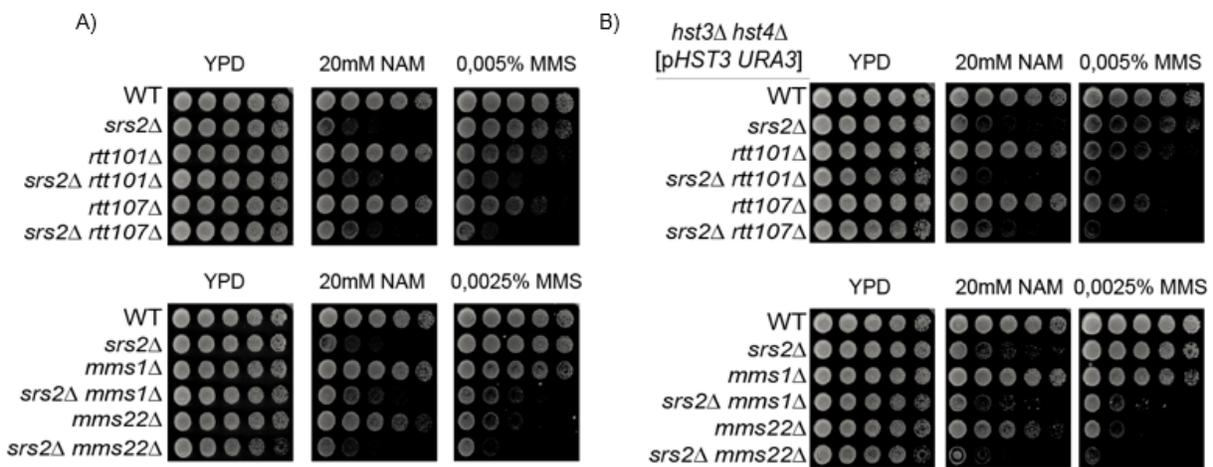


Figure 27 Les mutants *srs2Δ rtt101Δ*, *srs2Δ rtt107Δ*, *srs2Δ mms1Δ* et *srs2Δ mms22Δ* présentent une hypersensibilité en NAM et en MMS. A) Les doubles mutants présentent un défaut de croissance en présence de ces agents cytotoxiques. Les cellules ont été diluées en série, puis répliquées sur les plaques en concentration de NAM ou MMS correspondantes et incubées à 30°C. B) Les doubles mutants dans un génotype *hst3Δ hst4Δ* présentent un défaut de croissance en présence de ces agents cytotoxiques. Les cellules ont été traitées comme en A).

Implication du niveau de SUMOylation de Rad52 et de la phosphorylation de Mms4 lors d'hyperacétylation de H3K56 induite par le NAM

La protéine recombinaise Rad52 est SUMOylée en présence de dommages à l'ADN et celle-ci module la formation de filaments Rad51 de manière indépendante à l'hélicase *Srs2* (234,236,237). Comme nos résultats suggèrent une formation de structures de recombinaison aberrantes en absence de *SRS2* (figure 24), nous voulions observer si la conservation de Rad52

SUMOylée pouvait restaurer les défauts de croissance du mutant *srs2Δ* en présence de NAM. Deux types de souches de levure ont été utilisés. Le premier est un allèle dominant de *RAD52* où la leucine 264 est mutée pour une proline et mime la SUMOylation (*RAD52-L264P*), et le deuxième est une fusion du marqueur de SUMOylation *SMT3* au gène de *RAD52*, ce qui rend la protéine constitutivement SUMOylée (*RAD52-SMT3*) (237). Alors que ces souches peuvent contrer les phénotypes du mutant *srs2Δ* en MMS (237), ce résultat n'est pas reproductible en réponse au NAM, même si l'allèle muté *RAD52-L264P* possède un effet partiel sur la croissance du mutant à de hautes concentrations (figure 28A). Ces résultats suggèrent que les niveaux de SUMOylation de Rad52 ne sont pas influencés lors d'inhibition des sirtuines.

L'hyperactivation de la kinase Rad53 réprime l'activité du complexe endonucléase Mus81-Mms4, et des protéines régulatrices comme Slx4 ou le complexe PP4 peuvent l'activer pour la résolution des intermédiaires de recombinaison (334). Mms4 est phosphorylée par la polo-kinase Cdc5, ce qui régule la formation de ce complexe (201,247). Nous voulions observer si moduler la fonction de Mus81-Mms4 pourrait renverser les phénotypes d'hyper-recombinaison du mutant *srs2Δ* en présence de NAM. Des conditions où le gène *MMS4* est absent (*mms4Δ*), où il y a phosphorylation constitutive par mutation d'un site CDK de Mms4 (*MMS4-S56E*) et où il y a mutation de deux sites CDK de Mms4 (*MMS4-T184D, S56E*) ont été utilisées (247). Ces mutations n'affectent pas les défauts de croissance de *srs2Δ* à hautes concentrations en NAM (figure 28B), suggérant que l'activation constitutive de l'endonucléase Mms4 entraîne plus d'effets dérégulateurs que d'influence sur les phénotypes du mutant (247). Dans l'ensemble, les problèmes de recombinaison induits par l'absence de *SRS2* sont indépendants de ces MPTs, mais cela n'enlève pas la possibilité que ces mécanismes puissent être modulés en réponse au NAM.

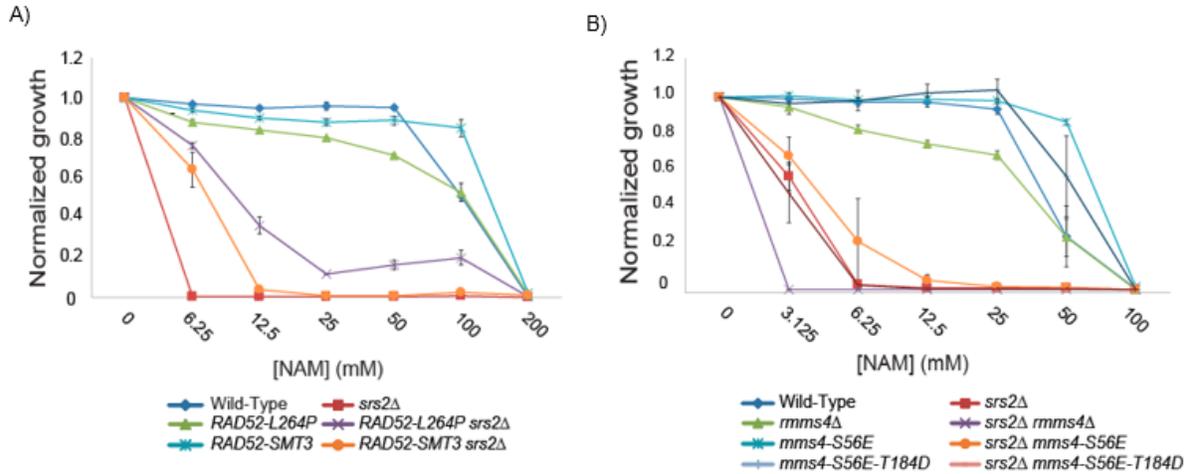


Figure 28 Le niveau de SUMOylation de Rad52 ainsi que celui de phosphorylation de Mms4 influencent peu les phénotypes de *srs2Δ* en NAM. A) Un contrôle du niveau de SUMOylation de Rad52 pourrait contribuer aux phénotypes observés. Les cellules ont été mises en croissance sur plaque 96 puits à différentes concentrations en NAM et la densité optique a été lue après 48 heures. Les valeurs sont normalisées par rapport au non traité. B) L'activation constitutive de Mms4 ne peut résoudre les problèmes d'hyper-recombinaison de *srs2Δ*. Les cellules ont été traitées comme en A).