

Université de Montréal

**Rôle des centrosomes dans la régulation du point de contrôle en G2/M
en réponse aux dommages à l'ADN**

par

Marine Barbelanne

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du diplôme de maîtrise
en biologie moléculaire

Mai 2011

© Marine Barbelanne, 2011

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée:

Rôle des centrosomes dans la régulation du point de contrôle en G2/M en réponse aux dommages à l'ADN

Présentée par:
Marine Barbelanne

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Isabelle Royal, président-rapporteur
Dr Estelle Schmitt, directeur de recherche
Dr Sébastien Carreno, membre du jury

Résumé

Les centrosomes sont les centres organisateurs des microtubules et jouent un rôle crucial dans l'organisation du fuseau bipolaire pendant la mitose. Plus récemment, le rôle des centrosomes dans la régulation de l'entrée en mitose a été mis en évidence. Les centrosomes semblent également contribuer à l'activation du point de contrôle en G2/M en réponse aux lésions de l'ADN en servant de point de rencontre pour les régulateurs du cycle cellulaire et les gènes de réponse aux dommages à l'ADN. L'amplification du nombre de centrosomes est une caractéristique des cellules tumorales mais de façon intéressante, elle constitue aussi une réponse des cellules aux dommages à l'ADN. Les mécanismes qui régulent l'homéostasie et la dynamique des centrosomes sont encore mal compris.

Pour mieux comprendre le rôle des centrosomes dans la régulation du point de contrôle en G2/M en réponse aux dommages à l'ADN, le recrutement et/ou l'activation au niveau des centrosomes des kinases impliquées dans les voies de signalisation de ce point de contrôle ont été étudiés par immunofluorescence indirecte sur cellules HeLaS3 ou par Western blot sur des fractions enrichies en centrosomes. Nos résultats montrent que les kinases ATM, ATR, CHK1 et CHK2 sont actives dans les centrosomes de cellules en phase G2. En réponse à l'activation du point de contrôle en G2/M, les formes actives de ces kinases diminuent au niveau des centrosomes. Pour identifier de nouveaux acteurs centrosomaux potentiellement impliqués dans la régulation de ce point de contrôle, une analyse comparative des protéomes de centrosomes purifiés a également été réalisée par spectrométrie de masse.

Pour étudier plus particulièrement la fonction de CHK2 au niveau des centrosomes, nous avons développé des outils moléculaires qui serviront à déterminer le rôle de la sous population de CHK2 localisée aux centrosomes 1) dans la régulation de l'entrée en mitose au cours d'un cycle normal 2) dans l'activation et la stabilité du point de contrôle en G2/M en réponse aux lésions l'ADN et 3) dans l'homéostasie et la dynamiques des centrosomes en réponse aux dommages à l'ADN.

Cette étude permettra de mieux comprendre la fonction des centrosomes dans la réponse cellulaire au stress génotoxiques anti-cancéreux et de révéler de nouvelles fonctions potentielles pour la kinase CHK2.

Mots clés : dommages à l'ADN, centrosomes, cycle cellulaire, points de contrôle, G2, mitose.

Abstract

Centrosomes function primarily as microtubule-organizing centres that play a crucial rôle in the equal segregation of chromosomes by organizing the bipolar spindle during mitosis. Recent studies have revealed the involvement of centrosomes in regulating G2/M transition during normal cell cycle progression. Moreover, increasing evidence suggests that centrosomes also play roles in the DNA damage response and cell cycle checkpoint signalling by serving as “meeting points” where DNA-damage-responsive genes and cell cycle regulators communicate. Numerical centrosome aberrations, or centrosome amplification, is a common feature of most human cancers that promotes aneuploidy and is involved in tumorigenesis as well as tumor progression. Interestingly, centrosome amplification and fragmentation have also been shown to constitute a cellular response to impaired DNA integrity that triggers cell death by mitotic failure. Although their roles are critical in tumorigenesis and the DNA damage response, the mechanisms that regulate centrosome homeostasis and dynamics remain poorly understood.

To gain a better understanding of the role of the centrosomes in checkpoint regulation at G2/M transition in response to DNA damage; the recruitment and/or centrosomal activation of the kinases implicated in this checkpoint pathways were studied by indirect immunofluorescence on HeLaS3 cells or western blot on purified centrosomal fractions. Our results showed that the kinases CHK1, CHK2, ATM and ATR are activated at the centrosomes in cell synchronised in G2. However, after activation of the G2/M checkpoint, these activated kinases moved from centrosomes. Finally, to identify new centrosomal actors potentially involved in the regulation of this checkpoint, a comparative analysis of the proteome of purified centrosomes was also realized by mass spectrometry.

To study more specifically the function of CHK2 at the centrosomes, we developed molecular tools which will serve to determine the role of the sub-population of CHK2 localized at the centrosomes in 1) in regulating entry into mitosis during unperturbed cell cycle progression, 2) in checkpoint regulation at G2/M transition in response to DNA damage induced by ionizing radiations and genotoxic drugs and 3) in centrosomal homeostasis and dynamics by regulating centrosomal amplification, fragmentation and clustering during normal cell cycle progression and in response to genotoxic drugs.

This study will further elucidate the importance of centrosomes in regulating the cell response to genotoxic stress induced by anti-cancer treatments and reveal potential new functions for the kinase CHK2 in unperturbed cell cycle progression and in response to DNA damage.

Key words : DNA damages, cell cycle, G2, mitosis, checkpoint, centrosomes

Table des matières

Résumé	iv
Abstract.....	v
Table des matières	vi
Liste des tables.....	vii
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements	ix
Introduction.....	1
Hypothèse et objectifs de l'étude	6
Matériels et méthodes	7
Anticorps et réactifs	7
Culture cellulaire, transfections et traitements.....	7
Analyse du cycle cellulaire	8
Préparation de centrosomes	8
Spectrométrie de masse.....	8
Immunobuvardage de type Western	9
Immunofluorescence indirecte.....	9
Production des lentivirus et infections virales	10
Résultats.....	10
Les kinases ATM-P, ATR-P et CHK1 sont localisées au niveau des centrosomes en phase G2 avant et après traitement génotoxique	10
La kinase CHK2 est localisée au niveau des centrosomes en interphase et en mitose	12
Construction de vecteur d'expression exprimant des protéines CHK2 chimériques et localisation centrosomale	13
Analyse comparative des protéomes de centrosomes purifiés par spectrométrie de masse	13
Étude préliminaire de 6 protéines-candidates	14
Discussion.....	14
Références.....	17
Tables.....	23
Légende des figures	28
Figures	31

Liste des tables

Table 1	Spécificité des anticorps CHK2 utilisés dans cette étude.
Table 2	Analyse du protéome de centrosomes isolés à partir de cellules HeLa S3 synchronisées en phase G2 versus synchronisées en phase G2 et traitées au VP-16.

Liste des figures

Figure 1	Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans l'entrée de la mitose.
Figure 2	Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans le point de contrôle du cycle cellulaire à la transition G2/M.
Figure 3	Le niveau d'expression d'ATM-P (Ser1981) diminue au niveau des centrosomes après un traitement au VP-16.
Figure 4	Le niveau d'expression d'ATR-P (Ser428) diminue au niveau des centrosomes après un traitement au VP-16.
Figures 5	Le niveau d'expression de CHK1 diminue au niveau des centrosomes après un traitement au VP-16.
Figure 6	Colocalisation d'ATM-P (Ser1981) avec γ -H2AX-P et spécificité de l'anticorps reconnaissant ATM-P (Ser1981).
Figure 7	Les substrats phosphorylés par ATM/ATR sont localisés au niveau des centrosomes.
Figure 8	Les substrats phosphorylés par MAPK/CDK ne sont pas localisés au niveau des centrosomes.
Figure 9	CHK2-P (Thr68) est localisé au niveau des centrosomes.
Figure 10	Colocalisation de CHK2-P (Thr68) avec γ -H2AX-P et spécificité de l'anticorps reconnaissant CHK2-P (Thr68).
Figure 11	Résultats préliminaires de six protéines-candidates identifiées par spectrométrie de masse.
Figure 12	Construction de vecteur d'expression exprimant des protéines CHK2 chimériques et localisation centrosomale.
Figure 13	Résultats préliminaires de six protéines-candidates identifiées par spectrométrie de masse.

Liste des abréviations

ADN, acide désoxyribonucléique;
ARN, acide ribonucléique;
ATM, ataxia telangiectasia mutated;
ATR ataxia telangiectasia and Rad3 related;
BSA, albumine de sérum bovin;
CDC, cell division cycle;
CDK, cyclin-dependent kinase;
CHK, checkpoint kinase;
CLS, séquence de localisation centrosomale;
DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole;
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium;
ECL, enhanced chemiluminescence;
FBS, sérum bovin foetal;
GFP, green fluorescent protein;
Gy, grey;
MAPK, mitogen-activated protein kinase;
HA, influenza virus hemaglutinine tag sequence;
H3, histone 3;
P/S, pénicilline/streptomycine;
PBS, phosphate buffered saline;
PI, iodure de propidium;
PLK1, polo like kinase 1;
PVDF, polyvinylidene fluoride;
SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

Remerciements

Mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ces 2 années.

Mes remerciements au Dr Éric Campeau pour les vecteurs pLenti DEST(670-1) et au service de protéomique de l'IRIC, plus particulièrement à Éric Bonneil, pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Mes remerciements vont également aux organismes qui ont permis la réalisation de ce travail : le programme de biologie moléculaire de l'université de Montréal, l'Institut du Cancer de Montréal et les IRSC.

Je remercie plus particulièrement Kathleen, Myriam, Sandra, Katia et Guillaume pour leur disponibilité, leurs conseils, leur aide et leur bonne humeur.

Un merci spécial à Hélène dont l'amitié et le soutien, même à l'autre bout du monde, n'ont jamais failli.

Enfin, un immense merci à ma famille pour leur soutien, leur patience et leurs sacrifices consentis tout au long de la réalisation de ce travail.

Introduction

Les centrosomes sont des organelles importants pour le maintien de la stabilité génomique des cellules. Ils sont les centres organisateurs des microtubules et jouent un rôle essentiel dans l'organisation du fuseau bipolaire et la séparation des chromosomes pendant la mitose. De plus, de nouvelles évidences ont révélé une fonction des centrosomes dans la régulation d'un cycle cellulaire normal en interphase, suggérant ainsi que les centrosomes jouent également un rôle dans les points de contrôle du cycle cellulaire et dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (1,2).

En réponse aux lésions de l'ADN ou à un mauvais attachement des chromosomes au fuseau mitotique, la cellule active des points de contrôle. Ceux-ci arrêtent, de façon transitoire, la progression du cycle cellulaire aux transitions G1/S, G2/M, en phase S ou en mitose, pour permettre la réparation des dommages et préserver l'intégrité génomique de la cellule. Plusieurs voies de signalisation qui jouent un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux lésions de l'ADN ont été identifiées au cours des dernières années et les kinases CHK1 et CHK2 apparaissent comme des médiateurs clés de ces voies de signalisation, notamment celles qui ciblent les points de contrôle aux transitions G1/S et G2/M et en phase S (3-5).

Plus récemment, les événements initiateurs de l'entrée en mitose ont été mis en évidence au niveau des centrosomes (6-8). En effet, l'activation des complexes CDK1-CyclinB au niveau des centrosomes par la phosphatase CDC25B précède leur translocation au noyau qui va conduire à l'entrée des cellules en mitose de façon irréversible (9-11). De nouvelles découvertes soulignent également un rôle des centrosomes dans la réponse des cellules aux dommages à l'ADN. Les événements initiateurs de l'entrée en mitose au niveau des centrosomes sont ciblés en réponse à l'activation du point de contrôle en G2/M et le recrutement de CHK1 au niveau des centrosomes a été montré comme contribuant à ce point de contrôle dans les cellules endommagées (7,12). De plus, de nombreuses protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN et la régulation du cycle cellulaire ont été localisées au niveau des centrosomes, suggérant que ceux-ci servent de sites d'intégration des voies de signalisation qui émergent des dommages à l'ADN pour réguler les points de contrôle du cycle cellulaire. De récentes études révèlent également que les centrosomes semblent contribuer à l'activation du point de contrôle en G2/M en réponse aux lésions de l'ADN en servant de point de rencontre pour les régulateurs du cycle cellulaire et les gènes de réponse aux dommages à l'ADN (13-16).

L'implication des centrosomes dans la mort des cellules en réponse aux lésions de l'ADN a également été mise en évidence au cours des dernières années et plusieurs études ont montré qu'une amplification du nombre de centrosomes, une fragmentation ou une inactivation de ces derniers constituent une réponse active des cellules aux dommages à l'ADN qui entraîne la mort cellulaire par catastrophe mitotique. Cette réponse cellulaire est évoquée comme étant un nouveau point de contrôle du cycle appelé «point de contrôle centrosomal» (2, 17). Enfin, la majorité des cellules tumorales possède un nombre amplifié de centrosomes qui contribue à la tumorigénèse et la progression tumorale en favorisant l'aneuploïdie (18,19). Pour éviter les mitoses multipolaires et l'aneuploïdie massive qui conduit à la mort des cellules en mitose, la plupart des cellules tumorales regroupent leurs centrosomes surnuméraires en deux pôles permettant ainsi une mitose bipolaire. Les mécanismes moléculaires qui régulent ce processus, appelé "centrosomes clustering", sont encore peu compris (20-24). Il est intéressant de noter que l'amplification et/ou la fragmentation des centrosomes constitue aussi une réponse des cellules aux lésions génotoxiques qui conduit à la mort des cellules en mitose (25,26).

Centrosomes et cycle cellulaire

Les centrosomes sont de petits organites constitués de deux centrioles perpendiculaires l'un à l'autre et entourés d'une matrice protéique appelée matériel péricentriolaire. Cette matrice contient de nombreuses protéines nécessaires à la nucléation et à l'ancrage des microtubules pour la formation des fuseaux mitotiques ainsi qu'à la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (27). Les centrosomes observent un cycle de duplication qui suit le cycle cellulaire. Une cellule en phase G1 ne possède qu'un centrosome qui contient une paire de centrioles perpendiculaires. A la transition G1/S, les centrioles s'éloignent l'un de l'autre pour permettre leur duplication semi-conservatrice et à la transition G2/M, les centrosomes vont se séparer et migrer à des pôles opposés du noyau. En début de mitose, les centrosomes vont arriver à maturation en recrutant des protéines associées à la matrice péricentriolaire, ce qui permet une augmentation de la nucléation des microtubules pour former les fuseaux mitotiques et assurer la ségrégation équitable des chromosomes (28-33).

Un nombre important de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire est localisé au niveau des centrosomes, indiquant que ceux-ci pourraient servir de site d'intégration des voies de signalisation de la régulation du cycle cellulaire et qu'ils seraient impliqués dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire (1, 8, 34). Un rôle des centrosomes dans la régulation de la transition G2/M au cours d'un

cycle normal a déjà été démontré. Par ailleurs, une sous population de divers régulateurs de la mitose, comme Aurora A, CDK1-CyclinB, WEE1 ou les CDC25 B et C, est localisée au niveau des centrosomes pour contrôler les événements initiateurs de l'entrée en mitose.

Ainsi, en plus de leur rôle de centres organisateurs des microtubules, les centrosomes semblent servir de sites de régulation du cycle cellulaire où des signaux activateurs ou inhibiteurs sont intégrés pour contrôler la progression du cycle cellulaire.

Régulation de l'entrée en mitose

L'entrée en mitose des cellules est caractérisée par divers événements moléculaires et morphologiques comme l'activation du complexe CDK1-CyclinB, la désintégration de la membrane nucléaire et des corps nucléolaires, la condensation des chromosomes ou encore la formation des fuseaux mitotiques à partir des centrosomes (35). Pendant les phases S et G2, les complexes CDK1-CyclinB sont maintenus inactifs par les kinases WEE1 et MYT1 qui phosphorylent CDK1 sur la thréonine 14 et la tyrosine 15 (36,37). À la transition G2/M, les phosphatases CDC25 A, B et C vont activer les complexes CDK1-CyclinB en déphosphorylant ces deux résidus et entrainer l'entrée des cellules en mitose (38). Une fois les complexes CDK1-CyclinB actifs, plusieurs boucles d'auto-amplification vont s'établir. En effet, les kinases WEE1 et MYT1 vont être phosphorylées par CDK1-CyclinB et PLK1 ce qui va entrainer la dégradation au protéasome de WEE1 et l'inhibition de MYT1 (39). De plus, les complexes CDK1-CyclinB vont activer les phosphatases CDC25 entraînant l'entrée irréversible des cellules en mitose (11,40). Une illustration de ces voies de signalisation est schématisée à la Figure 1.

Les protéines majeures de l'entrée en mitose des cellules dont CDK1-CyclinB, PLK1 ou les CDC25 sont recrutées au niveau des centrosomes en fin de phase G2, indiquant que les centrosomes seraient les sites d'initiation de l'entrée en mitose des cellules (10, 41-43). Une fois les complexes CDK1-CyclinB activés aux niveaux des centrosomes, il vont transloquer au noyau où leur activité va être amplifiée et où la phosphorylation de nombreux substrats va entrainer les changements morphologiques et biochimiques nécessaire pour induire l'entrée en mitose des cellules de façon irréversible (9, 10). Les phosphatases CDC25 activent les complexes CDK1-CyclinB au niveau des centrosomes et régulent la nucléation des microtubules centrosomiaux à la transition G2/M (44). Les kinases PLK1 et AURORA A jouent un rôle majeur dans l'entrée des cellules en mitose via la régulation de la maturation et de la séparation des centrosomes en fin de

phase G2, processus essentiel pour la bonne nucléation des microtubules et la formation des fuseaux mitotiques (45). L'activation de AURORA A au niveau des centrosomes en fin de G2 est requise pour le recrutement et l'activation des complexes CDK1-CyclinB au niveau des centrosomes et l'entrée en mitose des cellules. PLK1 est à son tour activé par AURORA A et contribue à la boucle d'auto amplification du signal via la phosphorylation des phosphatases CDC25 (46-48). Finalement, PLK1 va également activer l'expression de différents gènes impliqués dans la transition G2/M via l'activation du facteur de transcription Forkhead Box M1 (49). Enfin, il a été montré qu'au cours d'un cycle cellulaire normal, la kinase CHK1 empêche l'entrée précoce des cellules en mitose par l'inhibition au niveau des centrosomes des phosphatases CDC25 limitant à leur tour l'activation des complexes CDK1-CyclinB (Fig. 1). Plusieurs travaux soulignent également une localisation centrosomale de la kinase CHK2 mais sa fonction y reste inconnue pour l'instant. De manière générale, ces connaissances corroborent le fait que les centrosomes pourraient servir de site d'intégration des voies de signalisation qui régulent l'entrée des cellules en mitose au cours d'un cycle cellulaire normal.

Points de contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN

Les points de contrôles du cycle cellulaire sont des mécanismes de surveillance qui permettent le maintien de l'intégrité génomique d'une cellule en division. En réponse aux dommages à l'ADN ou à un mauvais attachement des chromosomes aux fuseaux mitotiques, la cellule active ses points de contrôle pour arrêter, de façon transitoire, la progression du cycle cellulaire et permettre la réparation des dommages. Ces mécanismes de surveillance sont contrôlés par diverses voies de signalisation impliquant les phosphorylations transitoires de plusieurs régulateurs essentiels du cycle cellulaire (50,51). De nombreuses évidences indiquent que ces mécanismes sont défectueux dans les cellules cancéreuses et que cela contribue à la tumorigenèse. De plus, ces mécanismes ont un rôle majeur dans la réponse des cellules aux drogues utilisées lors des thérapies anticancéreuses (52-55). Les kinases CHK1 et CHK2 sont deux régulateurs centraux de ces mécanismes d'une cellule en interphase. En réponse aux lésions de l'ADN, les kinases Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) et Ataxia-Telangiectasia Rad3 Related (ATR) vont activer les régulateurs CHK1 et CHK2 qui vont à leur tour activer de nombreuses protéines cibles pour arrêter la progression du cycle cellulaire aux transitions G1/S, G2/M ou en phase S. Généralement, ATM va activer CHK2 en réponse aux cassures double brins de l'ADN et ATR va activer CHK1 en réponse au stress réplicatif (Fig. 2) (56).

Le point de contrôle à la transition G2/M empêche les cellules endommagées d'initier leur mitose et les régulateurs clés en aval de ce point de contrôle sont les complexes CDK1-CyclinB qui sont activés par les phosphatases CDC25 A, B et C (57). L'activation des kinases ATM/ATR puis CHK1/CHK2 amène à la phosphorylation des CDC25 créant ainsi des sites de liaison pour la protéine 14-3-3 et la séquestration au cytoplasme des CDC25 B et C, ou encore la dégradation au protéasome des CDC25 A (Fig. 2) (58,59).

Au cours des dernières années, les événements initiateurs de la mitose ont été mis en évidence au niveau des centrosomes et plusieurs recherches indiquent que les centrosomes sont également ciblés en réponse à l'activation du point de contrôle à la transition G2/M. Il a été montré que l'activation des CDC25 B par AURORA A au niveau des centrosomes est inhibée par l'activation de ce point de contrôle en réponse aux dommages à l'ADN (6, 7). D'autres ont montré que CHK1 relocalise au niveau des centrosomes après lésions de l'ADN et que son accumulation contribue à sa fonction dans la régulation du point de contrôle à la transition G2/M (15). Ces résultats, en plus du nombre croissant de protéines de la réponse aux dommages à l'ADN qui sont localisées au niveau des centrosomes, indiquent que les centrosomes pourraient servir de sites d'intégration et de coordination des voies de signalisation qui émergent des dommages à l'ADN pour réguler les points de contrôle du cycle cellulaire, notamment celui à la transition G2/M.

Amplification, fragmentation et regroupement des centrosomes

Des centrosomes surnuméraires ou amplifiés sont des caractéristiques en corrélation avec une augmentation de l'aneuploïdie et de l'agressivité tumorale (60-64). La perception générale est que l'amplification des centrosomes menant aux mitoses multipolaires est impliquée dans la formation et l'évolution de la tumeur. Toutefois, le fait que ces aberrations des centrosomes soient une cause ou une conséquence de l'instabilité génomique est jusqu'à aujourd'hui toujours une controverse (65-67). Récemment, il a été montré que les mitoses multipolaires menant à de l'aneuploïdie majeure sont généralement délétères et de nombreuses cellules les suppriment en regroupant leur centrosomes aux deux pôles de la cellule pour subir des mitoses bipolaires (30-34). De façon intéressante, un autre groupe de recherche a montré que l'instabilité génomique, associée à l'amplification des centrosomes, est une conséquence des attachements mérotéliques kinétochores-microtubules qui s'accumulent avant que les centrosomes ne soient regroupés et que les cellules ne fassent une mitose bipolaire (33). L'origine des centrosomes surnuméraires dans les cellules cancéreuses est peu comprise mais il a été montré que ces centrosomes supplémentaires apparaissent en raison d'une dérégulation du cycle de duplication des centrosomes ou d'une erreur de cytokinèse (68).

De récentes études suggèrent que les centrosomes sont aussi impliqués dans la réponse cellulaire au stress réplicatif et aux dommages à l'ADN (2, 27). En effet, les centrosomes sont souvent amplifiés ou fragmentés en réponse au stress réplicatif et aux lésions de l'ADN, et ces modifications provoquent une progression du cycle cellulaire non programmée qui entraîne une catastrophe mitotique et l'apoptose des cellules endommagées. De même, un nombre accru de centrosomes est observé après traitement aux rayons gamma et dans les cellules dont les gènes de la réponse aux dommages à l'ADN sont mutés. Enfin, la mort cellulaire par catastrophe mitotique associée à l'amplification des centrosomes est une des causes majeures de la mort des cellules induites lors des thérapies anticancéreuses (69). En résumé, ces résultats suggèrent qu'une amplification du nombre de centrosomes, une fragmentation ou une inactivation de ceux-ci constituent une réponse active des cellules aux dommages à l'ADN aboutissant au maintien de l'intégrité génomique.

Hypothèse et objectifs de l'étude

Ce projet de recherche vise à définir le rôle des centrosomes dans la régulation du point de surveillance en G2/M en réponse aux dommages à l'ADN. Notre hypothèse est que les centrosomes agissent comme sites d'intégration de voies de signalisation du point de contrôle en G2/M. Dans un premier objectif, nous désirons évaluer 1) la localisation intracellulaire et centrosomale des protéine kinases situées en amont des CDC25, soit ATM, ATR, CHK1 et CHK2, dans des cellules HeLa S3 contrôles et induites à un arrêt du cycle cellulaire en transition G2/M; 2) de réaliser une analyse comparative par spectrométrie de masse du protéome de centrosomes purifiés à partir de cellules HeLa S3 contrôles et induites à un arrêt du cycle cellulaire en transition G2/M. Par ces deux approches, notre but est d'identifier de nouveaux acteurs centrosomaux potentiellement impliqués dans la régulation du point de contrôle en G2/M induit par des lésions de l'ADN.

Dans un deuxième objectif, ce projet vise à développer des outils moléculaires pour étudier plus spécifiquement le rôle de la sous population centrosomale de CHK2 dans l'activation et la stabilité du point de contrôle en G2/M en réponse aux lésions de l'ADN. Ces outils pourraient ultérieurement être également utilisés pour évaluer le rôle de cette sous population centrosomale de CHK2 dans la régulation de l'entrée en mitose au cours d'un cycle normal, ou encore dans l'homéostasie et la dynamique des centrosomes en réponse aux dommages à l'ADN.

Dans ce mémoire, les résultats obtenus à ce jour sont décrits. Ultiment, cette étude permettra de mieux comprendre la fonction des centrosomes dans la réponse cellulaire au stress génotoxiques anti-cancéreux et de révéler de nouvelles fonctions potentielles pour la kinase CHK2.

Matériels et méthodes

Anticorps et réactifs

Les anticorps contre ch-TOG (1/50), FANCI, CHK2-P (T68) (1/150) et ©-tubuline (TU-30) (1/1000) ont été obtenus de Abcam (Cambridge, MA). Les anticorps anti-CHK2-P (Thr68, lot 7 et lot 9) (1/100), anti-CHK2-P (Thr68, C13C1) (1/100), anti-CHK2-P (S19) (1/100), anti-CHK2-P (S33/35) (1/100), anti-CHK2-P (T387) (1/100), anti-CHK2-P (T432) (1/100), anti-RCC1 (1/50), anti-RCC2 (1/100), anti-H3-P (Ser10), anti-ATR-P (Ser428) (1/100), anti-CHK2 (1/100) et anti-CHK1 (1/100), ainsi que les anticorps reconnaissant le motif consensus de phosphorylation des substrats phosphorylés par ATM/ATR (1/100), ou ceux phosphorylés par MAPK/CDK (1/100) proviennent de Cell Signaling Technology (Danver, MA). Les anticorps contre CHK1 (DCS-310) (1/100), CHK1 (G4) (1/50), Reptin 52 (H-162) (1/50), Nucleophosmin (H-106) (1/50), CHK2 (H-300) (1/50), CHK2 (DCS-273) (1/50) et CHK2-P (Thr68-R) (1/50) proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les anticorps anti-©-H2AX (Ser139) (1/1000) proviennent de Millipore Corp (Billerica, MA) et anti-CHK2 (1/100) de Novus Biologicals (Littleton, CO). La thymidine, le nocodazole, l'étoposide, l'iodure de propidium (PI), la RNase A et l'albumine de sérum bovin (BSA) proviennent de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO).

Culture cellulaire, transfections et traitements

Les cellules HeLa, HeLa S3, U2OS, 293FT, HCA2 et HCT116, obtenues de l' American Type Culture Collection (Manassas, VA) ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complété avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS) et 5% pénicilline/streptomycine (P/S) à 37°C et 5% CO₂. Les cellules ont été transfectées en utilisant la lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) selon les recommandations du fabricant. Une synchronisation à la transition G1/S a été obtenue par double bloc thymidine. Brièvement, les cellules sont mises en culture 16h en présence de 2 mM thymidine, lavées le

lendemain, remises en culture pour 12h dans du milieu frais et finalement mises en culture 16h en présence de 2 mM thymidine. Les cellules ont par la suite été lavées et remises en culture dans du milieu frais en présence ou en absence de 50 μ M d'étoposide (VP-16) pendant 2 h pour activer le point de contrôle en G2/M et utilisées pour des expériences d'immunofluorescence indirecte.

Analyse du cycle cellulaire

Les cellules HeLa et HeLa S3 ont été synchronisées en utilisant un double bloc thymidine. Pour l'analyse du contenu en ADN, les cellules ont été récoltées par ajout de trypsine, lavées deux fois avec du PBS puis fixées dans 70% d'éthanol glacé pendant un minimum de 3h. Elles ont ensuite été traitées avec la RNase A (0,5 mg/mL) dans une solution de PI (50 μ g/mL) pendant 30 min. L'index mitotique a été évalué par marquage de l'histone H3 phosphorylée (H3-P, Ser10). Les analyses ont été effectuées par cytofluorométrie à l'aide d'un Coulter EpicsXL.

Préparation de centrosomes

Les centrosomes ont été purifiés à partir de 1×10^9 cellules HeLa S3, contrôles ou traitées, selon le protocole de Moudjou et Bornens (70). Brièvement, les cellules ont été lysées après dépolymérisation des microtubules et des filaments d'actine à l'aide de 0.2 μ M de nocodazole et 1 μ g/mL de cytochalasine D pendant 1h à 37°C puis soumises à deux ultracentrifugations séquentielles sur gradient discontinu de sucrose (70%-50%-40%). Le dernier gradient a été récolté en 14 fractions de 1 mL utilisées pour l'immunobuvardage de type Western.

Spectrométrie de masse

Les échantillons ont été séparés sur gel 10% polyacrylamide et colorés au bleu de coomassie. Les bandes protéiques provenant de chaque condition ont été décolorées avec 50% méthanol, réduites par un traitement à 10 mM DTT (1h, 56°C) et alkylées pour 1h à la température de la pièce dans une solution 55 mM chloroacetamide. La digestion s'est effectuée avec une solution contenant de la trypsine dans 50 mM de bicarbonate d'ammonium pendant 8h à 37°C et 600 rpm. Les peptides ont été extraits des morceaux de gel

avec une solution 90% d'acétonitrile et 0.5 M urée. Les échantillons ont ensuite été séchés par SpeedVac puis solubilisés avec une solution 5% d'acétonitrile et 0.2% d'acide formique avant d'être déposés sur des colonnes C18 (150 μ m X 10 cm) à phases inversées sur un système de chromatographie Eksigent nanoLC-2D. Les peptides furent élués par un gradient 10-60% acétonitrile contenant 0.2% acide formique pendant 56 min, directement connecté à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (ThermoFisher) et les données ont été analysées à l'aide des logiciels Mascot (Matrix Science) et ProteoProfile.

Immunobuvardage de type Western

Les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur des membranes de nitrocellulose Hybond ECL (GE HealthCare Life Science, Piscataway, NJ) ou de polyvinylidene fluoride (PVDF) (Millipore Corp.). Les membranes ont été bloquées dans une solution de 5% (p/v) de lait dans du PBS pendant 1h ou selon les spécificités recommandées par les manufacturiers pour chaque anticorps. Les protéines ont été détectées par immunobuvardage de type Western avec les anticorps primaires appropriés et les anticorps secondaires correspondants conjugués à la HRP en utilisant la solution de détection ECL ou ECL Plus selon les recommandations du manufacturier (GE HealthCare Life Science).

Immunofluorescence indirecte

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles et utilisées pour les expériences d'immunofluorescence indirecte 24h ou 72h après ensemencement. Les lamelles ont été lavées avec du PBS et fixées dans 3,7% de formaldéhyde, 20 min à température pièce, puis dans du méthanol 100% glacé, 20 min à -20°C, après perméabilisation dans une solution PBS-0,2% saponine. Alternativement, les cellules ont été fixées dans un mélange 50% méthanol/50% acétone glacé pendant 20 min à -20°C. Toutes les étapes suivantes ont été faites à température pièce. Les lamelles ont été réhydratées dans du PBS pendant 10 min puis mises dans une solution de blocage pendant 30 min. Les lamelles ont ensuite été rincées 3 fois dans du PBS puis incubées pendant 1h avec l'anticorps primaire approprié (1/25 à 1/1000 selon les anticorps). Après 3 lavages dans du PBS, les lamelles ont été incubées avec les anticorps secondaires adéquats (1/800) AlexaFluor 488 ou Texas Red (Molecular Probes/Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). L'ADN a été marqué avec une solution contenant 1 μ g/mL de DAPI. Pour finir, les lamelles ont été retournées sur 5 μ L de mowiol (Sigma-Aldrich) puis laissées dans le noir à 4°C toute la nuit. Les cellules ont été photographiées avec une caméra digitale IEEE1394

14bits refroidie Pelletier Photometrics CoolSnap HQ2 reliée au logiciel NIS-Elements AR3.0 via un microscope Nikon Eclipse 600 (E-600).

Production des lentivirus et infections virales

Les lentivirus ont été produits en transfectant les cellules 293FT avec le vecteur pLenti CMV/TO Puro DEST (670-1) (gracieuseté du Dr Éric Campeau, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA) soit vide, soit contenant les séquences codant pour les protéines de fusion GFP-CLS, GFP-CHK2WT-CLS, GFP-CHK2(K249R)-CLS ou GFP-CHK2(D347A)-CLS. Les cellules 293FT ont étéensemencées dans des flacons de 150 cm² dans du milieu sans P/S. Lorsqu'elles ont atteint 80% de confluence, les cellules ont été transfectées avec les vecteurs d'expressions et le plasmide de l'enveloppe virale (pVPack-VSV-G) (gracieuseté du Dr Éric Campeau, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA) en utilisant la lipofectamine 2000. Après 16h d'incubation à 37°C, les cellules ont été lavées puis mises en culture dans du milieu complet. Les surnageants ont été récoltés toutes les 24h pendant 48h puis filtrés. Enfin, les virus ont été concentrés par ultracentrifugation et resuspendus dans 1/10^è du volume initial avant d'être congelés à -80C. Les cellules HeLa et U2OS ont été infectées par l'ajout de surnageant rétroviral en présence de polybrene (6 µg/ml, Sigma-Aldrich Corp.).

Résultats

Les kinases ATM-P, ATR-P et CHK1 sont localisées au niveau des centrosomes en phase G2 avant et après traitement génotoxique

Pour étudier la localisation intracellulaire des kinases d'intérêt, des cellules HeLa S3 ont été synchronisées par double bloc thymidine à la transition G1/S du cycle cellulaire puis relarguées dans du milieu frais. Lorsque les cellules ont atteint la phase G2, elles ont été traitées ou non avec un agent génotoxique, le VP-16, pour induire des dommages à l'ADN et activer le point de contrôle en G2/M. La synchronisation des cellules a été vérifiée par cytométrie de flux.

Dans les cellules synchronisées en phase G2 et non traitées, ATM-P (Ser1981) (Fig. 3A), ATR-P (Ser428) (Fig. 4A) et CHK1 (Fig. 5A) colocalisent avec la ©-tubuline au niveau des centrosomes. Après

traitement de 2h au VP-16 les mêmes kinases ont été observées au niveau des centrosomes (Fig. 3A, 4A et 5A). Toutefois, la quantification de l'intensité du signal des 3 kinases au niveau des centrosomes a révélé une légère diminution du marquage 2h après traitement au VP-16 (Fig. 3B, 4B et 5B).

La présence de ATM-P (Ser1981) au niveau des sites de dommage à l'ADN avec γ -H2AX fût également observée chez les cellules HeLa S3 asynchrones soumises aux irradiations ionisantes (6 Gy) (Fig 6A). La spécificité de l'anticorps anti-ATM-P (Ser1981) fût également contrôlée en utilisant des fibroblastes humains HCA2 asynchrones non-traités et transfectés avec un shRNA dirigé contre l'ARNm d'ATM (Fig. 6B). Dans les cellules transfectées avec un shRNA contrôle, ATM-P (Ser1981) colocalise avec la γ -tubuline au niveau des centrosomes. Par contre, dans les cellules transfectées avec un shRNA dirigé contre l'ARNm d'ATM, le signal au niveau des centrosomes disparaît. La spécificité des anticorps anti-ATR-P (Ser 428) et anti-CHK1 a été démontrée précédemment par d'autres groupes (75, 76)

Un anticorps générique qui reconnaît le motif consensus de phosphorylation des substrats phosphorylés par ATM et ATR a révélé un marquage au niveau des centrosomes dans les cellules synchronisées en phase G2 et non traitées (Fig. 7A). Après traitement au VP-16 (2h), une forte augmentation du signal a été observée au niveau du noyau et la localisation centrosomale persistait. La quantification de l'intensité du signal au niveau des centrosomes indique qu'il n'y a pas de différences entre avant et après l'induction de dommages à l'ADN par le VP-16 (Fig. 7B). Des expériences similaires en utilisant un anticorps générique qui reconnaît le motif consensus de phosphorylation des substrats phosphorylés par MAPK/CDK n'ont révélé aucun signal au niveau des centrosomes, que ce soit dans les cellules synchronisées en phase G2 contrôles ou traitées au VP-16 (Fig. 8).

Ces résultats suggèrent que ATM-P (Ser1981), ATR-P (Ser428) et CHK1 sont présentes au niveau des centrosomes dans les cellules synchronisées en phase G2 non traitées, et qu'une partie de ces kinases quitte les centrosomes 2h après l'induction d'un dommage à l'ADN par le VP-16. Les résultats suggèrent également que les voies de signalisation MAPK/CDK ne sont pas impliquées au niveau des centrosomes 2h après un traitement au VP-16.

La kinase CHK2 est localisée au niveau des centrosomes en interphase et en mitose

De la même manière, pour étudier la localisation intracellulaire de CHK2, des cellules HeLa S3 ont été synchronisées puis traitées ou non avec le VP-16 pour induire des lésions à l'ADN lorsqu'elles ont atteint la phase G2. Dans ces expériences, la synchronisation des cellules a également été vérifiée par cytométrie de flux. Dans les cellules synchronisées en phase G2 et non traitées, CHK2-P (Thr68) colocalise avec la α -tubuline au niveau des centrosomes (Fig. 9). Après un traitement de 2h au VP-16 une augmentation du signal CHK2-P (Thr68) fut observée au niveau du noyau et le signal au niveau des centrosomes a disparu (Fig. 9). Pour contrôler l'efficacité et la spécificité de l'anticorps anti-CHK2-P (Thr68) utilisé, une série d'expériences a été effectuée. Les cellules HeLa S3 asynchrones ont été soumises ou non aux irradiations ionisantes (6 Gy) et une forte colocalisation de CHK2-P (Thr68) avec α -H2AX fut observée après irradiation (Fig. 10A). Toutefois, ce même anticorps révélait un marquage non spécifique dans les cellules HCT-116 déficiente en CHK2 asynchrones non traitées remettant en question les résultats précédents (Fig. 10B). Une douzaine d'autres anticorps anti-CHK2 ou anti-CHK2-P (Thr68 ou autres) ont alors été testés dans les cellules HCT-116 WT et CHK2^{-/-} asynchrones contrôles ou traitées au VP-16 pendant 2h. Les marquages étaient non spécifiques ou absents au niveau des centrosomes (Table 1).

Pour solutionner ce problème, des cellules U2OS ont alors été transfectées avec un plasmide exprimant HA-CHK2 ou HA-GAB1, une protéine non centrosomale (71). 24h après transfection, les cellules en interphase (Fig. 11A) ou en mitose (Fig. 11B) exprimaient HA-CHK2 au niveau des centrosomes, contrairement aux cellules contrôles transfectées avec le vecteur vide ou avec le plasmide exprimant HA-GAB1. Pour valider la présence de CHK2 au niveau des centrosomes, des immunobuvardages de type Western ont été fait à partir d'extraits protéiques de fractions enrichies en centrosomes obtenus à partir de cellules HeLa S3. Un contrôle négatif provenant de cellules HCT-116 CHK2^{-/-} a également été analysé. CHK2 est présente dans les fractions 5 et 6 des préparations de centrosomes obtenus à partir des cellules HeLa S3 et absente dans les échantillons provenant des cellules HCT-116 CHK2^{-/-} (Fig. 11C). La présence de la α -tubuline et de la centrine, des marqueurs protéiques centrosomaux (72-74), a également été révélé (Fig. 11C). Ces dernières expériences supportent la présence de CHK2 au niveau des centrosomes.

Construction de vecteur d'expression exprimant des protéines CHK2 chimériques et localisation centrosomale

Pour étudier plus particulièrement la fonction de CHK2 au niveau des centrosomes, des lignées de cellules HeLa et U2OS qui exprimeront, sous le contrôle d'un promoteur inductible, la protéine CHK2 sauvage ou des formes inactives (D347A et K249R), fusionnées à une étiquette fluorescente GFP et une séquence de localisation centrosomale (CLS) sont en cours de développement au laboratoire (Fig. 12A). Cette approche ainsi que l'efficacité de la séquence CLS a été vérifiée par infection des cellules U2OS avec une construction contrôle GFP-CLS. L'expression du transgène a été induite par l'ajout de doxycycline et 48h après induction, la protéine chimérique GFP-CLS fut localisée au niveau des centrosomes avec la α -tubuline, contrairement aux cellules non induites où une absence de marquage est observée (Fig. 12B). Cette approche pour cibler une protéine au niveau des centrosomes semblant fonctionner, les différentes lignées cellulaires pourront donc être utilisées pour déterminer le rôle de la sous population de CHK2 localisée au niveau des centrosomes, 1) dans la régulation de l'entrée en mitose au cours d'un cycle normal, 2) dans l'activation et la stabilité du point de contrôle en G2/M en réponse aux lésions l'ADN et 3) dans l'homéostasie et la dynamique des centrosomes en réponse aux dommages à l'ADN.

Analyse comparative des protéomes de centrosomes purifiés par spectrométrie de masse

Pour identifier de nouveaux acteurs centrosomaux potentiellement impliqués dans la régulation du point de contrôle en G2/M induit par des lésions de l'ADN, une analyse comparative des protéomes de centrosomes purifiés a été réalisée par spectrométrie de masse. Brièvement, les cellules ont été synchronisées en phase G2 et le point de contrôle en G2/M a été activé ou non par ajout de VP-16 (3h). À partir de ces cellules, les centrosomes ont été purifiés par gradient discontinu de sucrose et les échantillons ont été envoyés à la plateforme de protéomique de l'IRIC pour une analyse comparative par spectrométrie de masse.

L'analyse a révélé un total de 823 protéines qui ont été classifiées selon leurs fonctions cellulaires et selon leurs localisations telles que décrites à ce jour (Table 2A-B). La majorité de ces protéines démontrent un faible taux de variation entre l'échantillon contrôle et l'échantillon traité au VP-16 (Table 2A). Les protéines potentiellement les plus intéressantes dans le cadre de cette étude sont celles classifiées dans les fonctions "cycle cellulaire" (Table 2C) et "dommages à l'ADN" (Table 2D). Parmi les protéines impliquées dans le cycle cellulaire, 25% sont décrites comme localisées au niveau des noyaux, 35% au niveau du

cytoplasme et 20% au niveau des centrosomes (Table 2C). Pour les protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (Table 2D), la plupart sont connues pour être localisées au niveau des noyaux, et étonnement aucune n'a été localisée précédemment aux centrosomes (Table 2B).

Étude préliminaire de 6 protéines-candidates

Parmi les protéines impliquées dans le cycle cellulaire ou la réponse aux dommages à l'ADN, 6 protéines candidates ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie : Nucleophosmine, ch-TOG (CKAP5), RCC1, RCC2, FANCI et Reptin 52. Ces 6 protéines candidates ont été sélectionnées car elles ont une fonction liée aux centrosomes ou à la mitose et que le ratio VP/CTRL est élevé. Cependant, d'autres protéines pourraient être tout aussi intéressantes et analysées ultérieurement.

Afin de valider la localisation intracellulaire des 6 protéines candidates sélectionnées, des cellules U2OS contrôles ou collectées après 2h de traitement au VP-16 ont été utilisées pour une analyse par microscopie à fluorescence. ch-TOG (CKAP5) se localise au niveau des centrosomes avec la ©-tubuline dans les cellules contrôles et traitées. Reptin 52 se localise au niveau des centrosomes avec la ©-tubuline dans les cellules contrôles et le signal semble diminuer dans les cellules après 2h de traitement au VP-16. Au contraire, les protéines Nucléophosmine, RCC1, RCC2 et FANCI ne semblent pas être localisées au niveau des centrosomes dans cette étude préliminaire (Fig. 13 A-F).

Discussion

Dans ce mémoire sont décrits les résultats de mon projet de recherche qui portait sur le rôle des centrosomes dans la régulation du point de surveillance en G2/M en réponse aux dommages à l'ADN. Notre hypothèse était que les centrosomes agissent comme sites d'intégration de voies de signalisation du point de contrôle en G2/M. Nous montrons ici que les kinases impliquées dans les voies de signalisation de ce point de contrôle (ATM, ATR, CHK1 et CHK2) sont actives dans les centrosomes de cellules en phase G2 et qu'en réponse à l'activation du point de contrôle en G2/M, les formes actives de ces kinases diminuent au niveau des centrosomes. Nous avons également réalisé une analyse comparative des protéomes de centrosomes purifiés par spectrométrie de masse pour identifier de nouveaux acteurs centrosomaux potentiellement impliqués dans la régulation de ce point de contrôle. Ce projet a également permis de développer des outils

moléculaires pour étudier plus spécifiquement le rôle de la sous population centrosomale de CHK2 dans l'activation et la stabilité du point de contrôle en G2/M en réponse aux lésions de l'ADN. À long terme, cette étude permettra de mieux comprendre la fonction des centrosomes dans la réponse cellulaire au stress génotoxiques anti-cancereux et de révéler de nouvelles fonctions potentielles pour la kinase CHK2.

Nos observations révèlent que les kinases ATM, ATR, CHK1 et CHK2 sont présentes au niveau des centrosomes dans les cellules synchronisées en phase G2 qu'elles aient un point de contrôle en G2/M actif ou non. Ces résultats sont en corrélation avec les travaux d'autres groupes (77-79) et permettent de confirmer l'activation des voies ATM/CHK2 et ATR/CHK1 en réponse aux dommages à l'ADN au niveau des centrosomes. Cependant, nos observations ont également montrées qu'une partie de ces kinases quitte les centrosomes 2h après l'induction d'un dommage à l'ADN par le VP-16. Nous ne comprenons pas la signification de cette diminution et il serait intéressant de savoir si ce phénomène est progressif au cours du temps ou non. Une étude cinétique par immunofluorescence indirecte sur les cellules synchronisées en phase G2 puis traitées ou non au VP-16 permettrait de répondre à cette question. L'addition d'un épitope fluorescent à ces protéines nous permettrait également de suivre en temps réel par imagerie (time-life vidéo), les mouvements de ces protéines des centrosomes aux noyaux ou vice-versa. Ces études pourraient également être répétées avec des mutants de phosphorylation pour nous permettre de comprendre davantage la signification du phénomène.

De précédents travaux sur CHK1 ont mis en évidence le rôle de cette kinase dans la transition G2/M au niveau des centrosomes (8, 78) et nous ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle CHK2 pourrait également être importante dans la régulation de ce point de contrôle du cycle cellulaire. Nous avons donc mis au point les outils moléculaires nécessaires pour étudier plus spécifiquement le rôle de la sous population centrosomale de CHK2 dans ce phénomène. À ce jour, nous avons montré que notre approche pour cibler une protéine au niveau des centrosomes est fonctionnelle et les différentes lignées U2OS et HeLa exprimant la protéine CHK2 sauvage ou des formes inactives (D347A et K249R) au niveau des centrosomes sont en cours de caractérisation au laboratoire. Ces outils moléculaires permettront d'étudier le rôle de CHK2 dans la régulation de l'entrée en mitose au cours d'un cycle normal et en réponse aux dommages à l'ADN mais également dans l'homéostasie et la dynamique des centrosomes en réponse aux lésions de l'ADN.

Enfin, notre expérience de spectrométrie de masse nous a permis de faire une étude préliminaire sur 6 protéines candidates (ch-TOG, RCC1, RCC2, Reptin 52, Nucleophosmine et FANCI) ayant un rôle potentiel

dans la régulation du point de contrôle en G2/M. Parmi ces 6 protéines candidates, ch-TOG et Reptin 52 semblent les plus indiquées pour une étude plus approfondie. En effet, ch-TOG est une protéine connue pour être localisée aux centrosomes et avoir un rôle dans la polymérisation et la stabilisation des microtubules au niveau des pôles mitotiques (80,81). Reptin 52 est quant à elle une protéine localisée au niveau des fuseaux mitotiques et des midbodies. C'est une ATPase impliquée dans le remodelage de la chromatine (82). Nos résultats préliminaires montrent une localisation centrosomale pour ces deux protéines dans des cellules asynchrones ou traitées au VP-16 pendant 2h. Il paraît donc intéressant de poursuivre les expériences avec ces 2 protéines candidates qui pourraient potentiellement avoir un rôle important au niveau des centrosomes à la transition G2/M et en réponse aux dommages à l'ADN. Par contre, les 4 autres protéines candidates, RCC1, RCC2, Nucleophosmine et FANCI ne semblent pas indiquées pour une étude plus approfondie bien qu'elles aient un rôle dans la mitose ou la réparation des dommages à l'ADN (83-85). En effet, RCC1, RCC2 et FANCI sont des protéines nucléaires et nécessaires seulement au moment de la mitose (83,85). La nucléophosmine est quant à elle une protéine nucléolaire qui est associée aux centrosomes seulement au moment de la mitose (84). Ces données, en accord avec nos résultats préliminaires en immunofluorescence indirecte, appuient le fait que ces 4 protéines ne semblent pas être de bons candidats centrosomaux. Il est cependant important de noter que ces résultats proviennent d'une seule analyse de spectrométrie de masse effectuée à partir de fractions centrosomales ayant des contaminants nucléaires. De plus, les kinases ATM, ATR, CHK1 et CHK2 n'ont pas été détectées lors de cette analyse. Cela suggère qu'au minimum une autre analyse sur de nouveaux échantillons est nécessaire et qu'il faudrait peut-être changer les paramètres de cette analyse et ajouter des contrôles positifs. A court terme, nous pourrions également, à l'aide du logiciel Mascot, rechercher spécifiquement des peptides de ATM, ATR, CHK1 ou CHK2 dans l'analyse précédente. En effet, en analyse de spectrométrie de masse, il n'est pas rare que certains peptides échappent à l'analyse s'ils sont très peu abondants. En demandant au logiciel de reprendre l'analyse en cherchant spécifiquement certains peptides, il n'est pas impossible en théorie, de retrouver ces peptides peu abondants.

Ultimement, cette étude pourra permettre de mieux comprendre la fonction des centrosomes dans la réponse cellulaire au stress génotoxiques anti-cancéreux et de révéler de nouvelles fonctions potentielles pour la kinase CHK2.

Références

1. Doxsey S, Zimmerman W, Mikule K. Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 303-11.
2. Loffler H, Lukas J, Bartek J, Kramer A. Structure meets function-centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response. *Exp Cell Res* 2006; 312: 2633-40.
3. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408: 433-9.
4. Bartek J, Falck J, Lukas J. CHK2 kinase-a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 877-86.
5. Stracker TH, Usui T, Petrini JH. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 2009; 8: 1047-54.
6. Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, et al. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* 2004; 117: 2523-31.
7. Cazales M, Schmitt E, Montembault E, Dozier C, Prigent C, Ducommun B. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* 2005; 4: 1233-8.
8. Schmitt E, Boutros R, Froment C, Monsarrat B, Ducommun B, Dozier C. CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. *J Cell Sci* 2006; 119:4269-75.
9. De Souza CP, Ellem KA, Gabrielli BG. Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Exp Cell Res* 2000; 257: 11-21.
10. Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 143-8.
11. Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansorge W, Hoffman I. The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* 1998; 111: 2445-53.
12. Loffler H, Bochtler T, Fritz B, et al. DNA Damage-induced accumulation of centrosomal Chk1 contributes to its checkpoint function. *Cell Cycle* 2007.
13. Ciciarello M, Mangiacasale R, Casenghi M, et al. p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J Biol Chem* 2001; 276:19205-13.
14. Tsvetkov L, Xu X, Li J, Stern DF. Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem* 2003; 278: 8468-75.
15. Hong Y, Stambrook PJ. Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14443-8.

16. Doxsey S, McCollum D, Theurkauf W. Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 411-34.
17. Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 815-25.
18. Duensing A, Duensing S. Centrosomes, polyploidy and cancer. *Adv Exp Med Biol* 2010; 676: 93-103.
19. Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, Gollin SM, Saunders WS. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* 2005; 307: 127-9.
20. Kwon M, Godinho SA, Chandhok NS, et al. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev* 2008; 22: 2189-203.
21. Basto R, Brunk K, Vinadogrova T, et al. Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell* 2008; 133: 1032-42.
22. Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 2009; 460: 278-82.
23. Godinho SA, Kwon M, Pellman D. Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 85-98.
24. Takada S, Kelkar A, Theurkauf WE. Drosophila checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell* 2003; 113: 87-99.
25. Sibon OC. Centrosomes as DNA damage regulators. *Nat Genet* 2003; 34: 6-7.
26. Kochanski RS, Borisy GG. Mode of centriole duplication and distribution. *J Cell Biol* 1990; 110: 1599-605.
27. Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, Maller JL, Sluder G. Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 1999; 283: 851-4.
28. Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2817-22.
29. Hinchcliffe EH, Sluder G. "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev* 2001; 15: 1167-81.
30. Heald R, Tournebize R, Habermann A, Karsenti E, Hyman A. Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol* 1997; 138:615-28.
- 31a. Palazzo RE, Vogel JM, Schnackenberg BJ, Hull DR, Wu X. Centrosome maturation. *Curr Top Dev Biol* 2000; 49: 449-70.

- 31b. Matsumoto Y, Maller JL. A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* 2004; 306: 885-8.
32. Pines J, Rieder CL. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E3-6.
33. Russell P, Nurse P. Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 1987; 49: 559-67.
34. Lundgren K, Walworth R, Booher R, Dembski M, Kirschner M, Beach D. *mik1* and *wee1* cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2*. *Cell* 1991; 45: 145-53.
35. Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG. *Myt1*: A membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates *cdc2* on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 1995; 270: 86-90.
36. O'Farrell PH. Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 512-9.
37. Kiyokawa H, Ray D. In vivo roles of CDC25 phosphatases: biological insight into the anticancer therapeutic targets. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 832-6.
38. Watanabe N, Arai H, Iwasaki J, et al. Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic *Wee1* via multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 11663-8.
39. Hoffmann I, Clarke P, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G. Phosphorylation and activation of human *cdc25-C* by *cdc2*-cyclin B and its involvement in the self amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* 1993; 12: 53-63.
40. Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 842-54.
41. van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 2006; 5: 853-64.
42. Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N, Iwamatsu A, Nishida E. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 2001; 410: 215-20.
43. Gabrielli BG, De Souza CPC, Tonks ID, Clarck JM, Hatward NK, Ellem KAO. Cytoplasmic accumulation of CDC25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Sci* 1996; 109: 1081-93.
44. Petronczki M, Lenart P, Peters JM. Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* 2008; 14: 646-59.
45. Lobjois V, Jullien D, Bouche JP, Ducommun B. The polo-like kinase 1 regulates CDC25B-dependent mitosis entry. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 462-8.

46. Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 2008; 320: 1655-8.
47. Macurek L, Lindqvist A, Lim D, et al. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 2008; 455: 119-23.
48. Fu Z, Malureanu L, Huang J, et al. Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1076-82.
49. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411:366-74.
50. Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 2002; 297: 547-51.
51. Eckstein JW. Cdc25 as a potential target of anticancer agents. *Invest New Drugs* 2000; 18: 149-56.
52. Lyon MA, Ducruet AP, Wipf P, Lazo JS. Dual-specificity phosphatases as targets for antineoplastic agents. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 961-76.
53. Graves PR, Yu L, Schwarz JK, et al. The chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem* 2000; 275:5600-5.
54. Damia G, Brogginini M. Cell cycle checkpoint proteins and cellular response to treatment by anticancer agents. *Cell Cycle* 2004; 3: 46-50.
55. Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 71-7.
56. Donzelli M, Draetta GF. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 2003; 4: 671-7.
57. Mailand N, Podtelejnikov AV, Groth A, Mann M, Bartek J, Lukas J. Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J* 2002; 21:5911-20.
58. Zhao H, Watkins JL, Piwnicka-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14795-800.
59. Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, et al. Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 963-70.
60. Kuo KK, Sato N, Mizumoto K, et al. Centrosome abnormalities in human carcinomas of the gallbladder and intrahepatic and extrahepatic bile ducts. *Hepatology* 2000; 31: 59-64.
61. Gustafson LM, Gleich LL, Fukasawa K, et al. Centrosome hyperamplification in head and neck squamous cell carcinoma: a potential phenotypic marker of tumor aggressiveness. *Laryngoscope* 2000;110: 1798-801.

62. Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Malhotra R, Liotta L, Doxsey SJ. Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res* 2001; 61: 2212-9.
63. D'Assoro AB, Barrett SL, Folk C, et al. Amplified centrosomes in breast cancer: a potential indicator of tumor aggressiveness. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75: 25-34.
64. Schneeweiss A, Sinn HP, Ehemann V, et al. Centrosomal aberrations in primary invasive breast cancer are associated with nodal status and hormone receptor expression. *Int J Cancer* 2003; 107: 346-52.
65. Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci* 2008; 121 Suppl 1: 1-84.
66. Wunderlich V. JMM---past and present. Chromosomes and cancer: Theodor Boveri's predictions 100 years later. *J Mol Med* 2002; 80: 545-8.
67. Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 157-62.
68. Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, et al. A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death. *Oncogene* 2000; 19: 5281-90.
69. Dodson H, Wheatley SP, Morrison CG. Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe. *Cell Cycle* 2007; 6: 364-70.
70. Moudjou et Bornens, *Cell Biology a laboratory handbook*, 2nd édition, 1998.
71. Maroun, C. R., M. A. Holgado-Madruga, I. Royal, M. A. Naujokas, T. M. Fournier, A. J. Wong, and M. Park. The Gab1 PH domain is required for localization of Gab1 at sites of cell-cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the Met receptor kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19:1784–1799.
72. Salisbury JL. Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 ; 7:39-45.
73. Raynaud-Messina B, Merdes A. Gamma-tubulin complexes and microtubule organization. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:24-30.
74. Bornens M, Azimzadeh J. Origin and evolution of the centrosome. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 607:119.
75. Katsura, M. et al. The ATR-Chk1 pathway plays a role in the generation of centrosome aberrations induced by Rad51C dysfunction. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 3959-3968.
76. Hall-Jackson, C.A., et al. ATR is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK. *Oncogene* 1999; 18: 6707-6713.
77. Tibelius A, Marhold J, Zentgraf H, Heilig CE, Neitzel H, Ducommun B, Rauch A, Ho AD, Bartek J, Krämer A. Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1. *J Biol Chem* 2009; 185:1149-57.

78. Zhang S, Hemmerich P, Grosse F. Centrosomal localization of DNA damage checkpoint proteins. *J Cell Biochem.* 2007; 101:451-65.
79. Oricchio E, Saladino C, Iacovelli S, Soddu S, Cundari E. ATM is activated by default in mitosis, localizes at centrosomes and monitors mitotic spindle integrity. *Cell Cycle* 2006; 5:88-92.
80. Cassimeris L, Becker B, Carney B. TOGp regulates microtubule assembly and density during mitosis and contributes to chromosome directional instability. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2009; 66:535-45.
81. Fielding AB, Lim S, Montgomery K, Dobрева I, Dedhar S. A critical role of integrin-linked kinase, ch-TOG and TACC3 in centrosome clustering in cancer cells. *Oncogene* 2011; 30:521-34.
82. Rousseau B, Ménard L, Haurie V, Taras D, Blanc JF, Moreau-Gaudry F, Metzler P, Hugues M, Boyault S, Lemièrre S, Canron X, Costet P, Cole M, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J, Rosenbaum J. Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 46:1108-18.
83. Hadjebi O, Casas-Terradellas E, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL. The RCC1 superfamily: from genes, to function, to disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1783:1467-79.
84. Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prev.* 2006; 30:481-90.
85. Yuan F, Song L, Qian L, Hu JJ, Zhang Y. Assembling an orchestra: Fanconi anemia pathway of DNA repair. *Front Bios* 2010; 15:1131-49.

Tables

Table 1. Spécificité des anticorps CHK2 utilisés dans cette étude.

AC	HCT-116 parentales	HCT-116 Chk2 KO	HCT-116 parentales VP 2h
Chk2 H-300 (1-300 N-ter) Santa Cruz	Colocalisation aux centrosomes	Colocalisation aux centrosomes	
Chk2 DCS-273 (full length) Santa Cruz	Marquage surtout nucléaire avec bp de bruit de fond	Bp de bruit de fond presque plus de de marquage nucléaire	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes
P-Chk2 C13C1 Cell Signaling	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes, sauf mitose	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes, sauf mitose	Relocalisation aux noyaux
P-Chk2 T68 Lot 7 Cell Signaling	Colocalisation aux centrosomes	Colocalisation aux centrosomes	Relocalisation aux noyaux
P-Chk2 T68 Lot 9 Cell Signaling	Colocalisation aux centrosomes	Colocalisation aux centrosomes	Relocalisation aux noyaux
P-Chk2 T68-R Santa Cruz	Diffus, quelques colocalisation aux centrosomes	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes
P-Chk2 T68 Abcam	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes, sauf mitose	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes	Relocalisation aux noyaux
P-Chk2 S19 Cell Signaling	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes
P-Chk2 S33/35 Cell Signaling	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes
P-Chk2 T387 Cell Signaling		Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes
P-Chk2 T432 Cell Signaling	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes	Diffus, pas de colocalisation aux centrosomes

* Données compilées à partir de 2 expériences pour chaque anticorps.

Table 2. Analyse du protéome de centrosomes isolés à partir de cellules HeLa S3 synchronisées en phase G2 versus synchronisées en phase G2 et traitées au VP-16.

A) Classification des protéines selon leur fonction et ratio d'expression cellules traitées au VP-16 / cellules non traitées.

Function	number of protein	Ratio VP/CTRL						
		<-10	-10 to -5	-5 to -2	-2 to 2	2 to 5	5 to10	>10
Cell Cycle	42 (5,1%)	0	1	9	15	8	4	4
DNA damage and repair	36 (4,4%)	0	3	10	17	4	2	0
Chaperone/protein folding	35 (4,3%)	0	1	2	13	7	7	5
Apoptosis	13 (1,6%)	0	0	2	8	0	3	0
Transcription regulation	40 (4,9%)	0	0	5	25	7	2	1
Protein synthesis/translation	84 (10,2%)	0	3	17	53	5	1	5
RNA processing/splicing	63 (7,7%)	0	4	10	30	14	4	1
protein transport/transport	70 (8,5%)	0	1	11	47	9	1	1
Channel	22 (2,7%)	0	1	10	10	1	0	0
Cytoskeleton organisation	47 (5,7%)	0	1	3	18	15	6	4
Metabolism	144 (17,5%)	0	12	26	68	19	5	14
Ribosome	12 (1,5%)	0	1	3	4	2	2	0
Mix	132 (16,0%)	1	7	17	84	16	5	3
not determinated	83 (10,1%)	1	1	8	67	4	2	0
Total of protein	823 (100%)	2	36	133	459	111	44	38

B) Classification des protéines selon leur fonction et leur localisation décrite ou connue.

	% nucleus	% cytoplasm	% mitochondria	% ribosome	% endoplasmic reticulum	% Golgi	% membrane	%spindle/ centrosome	% cytoskeleton
Function									
Cell Cycle	25,8	34,4	0,0	0,0	1,1	0,0	4,3	20,4	14,0
DNA damage/repair	75,6	14,6	4,9	2,4	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0
Chaperones/protein folding	7,8	35,3	15,7	0,0	11,8	0,0	7,8	11,8	9,8
Apoptosis	27,3	22,7	27,3	0,0	9,1	0,0	9,1	0,0	4,6
Transcription/ transcription regulation	56,7	28,3	6,7	1,7	0,0	1,7	1,7	1,7	1,7
Protein synthesis/translation	6,7	38,3	19,2	30,0	2,5	0,8	2,5	0,0	0,0
RNA processing/splicing	52,6	31,6	6,3	6,3	2,1	0,0	1,1	0,0	0,0
Protein transport/transport	17,3	24,6	5,5	0,9	10,9	11,8	26,4	0,0	2,7
Channel	43,2	5,4	13,5	0,0	8,1	0,0	18,9	5,4	5,4
Cytoskeleton organisation	11,5	34,6	0,0	0,0	1,3	0,0	14,1	3,9	34,6
Metabolism	2,6	26,8	40,5	0,7	10,5	1,3	17,0	0,0	0,7
Ribosome	28,5	7,1	35,7	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mix	23,3	28,0	7,3	2,7	6,7	3,3	21,3	0,0	7,3
Not determinated	24,1	6,9	10,3	0,0	6,9	3,5	44,8	0,0	3,5

C) Liste des protéines identifiées par MS/MS ayant une fonction décrite au niveau du cycle cellulaire.

Cell cycle		
Protein Description	VP/CTL	function
NPM1 Isoform 1 of Nucleophosmin	-7,11	centrosome duplication; ribosome biogenesis; protein chaperoning; histone assembly, cell proliferation
CKAP5 Isoform 1 of Cytoskeleton-associated protein 5	-4,16	spindle pole organization
RAN 26 kDa protein	-3,89	nucleocytoplasmic transport, mitotic spindle assembly
MYH10 Isoform 2 of Myosin-10	-3,63	cytokinesis, cell shape phosphorylated after DNA damage by ATM,ATR
NUMA1 Isoform 2 of Nuclear mitotic apparatus protein 1	-3,61	anaphase ; nucleus organization
NCAPD2 Condensin complex subunit 1	-2,89	chromosome condensation during mitosis
CSNK1A1 Isoform 2 of Casein kinase 1 isoform alpha	-2,64	cell division
BUB3 budding uninhibited by benzimidazoles 3 isoform b	-2,18	spindle assembly checkpoint
TPR Nucleoprotein TPR	-2,16	component of nuclear pore complex, play role in mitotic spindle checkpoint
GADD45GIP1 Growth arrest and DNA-damage-inducible proteins-interacting protein 1	-2,15	Negative regulator of G1 and S phase progression inhibits cdk-cyclin dependent kinases, interacts with Gadd45 a, b, g
KIF2C Isoform 1 of Kinesin-like protein KIF2C	-1,98	microtubule turnover regulation, cell cycle, mitosis
SMC4 Isoform 1 of Structural maintenance of chromosomes protein 4	-1,56	chromosomes condensation, mitosis
KIF4A Isoform 1 of Chromosome-associated kinesin KIF4A	-1,48	motor protein, mitosis
CDK4 Cell division protein kinase 4	-1,31	G1/S transition of mitotic cell cycle
NAT10 N-acetyltransferase 10	-1,28	transcription regulation, mitotic chromosome decondensation
NCAPG Condensin complex subunit 3	-1,22	chromosome condensation, mitosis
MAPRE1 Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	-1,1	microtubule polymerisation, spindle formation, cell cycle, mitosis
SMC2 Isoform 1 of Structural maintenance of chromosomes protein 2	1,07	mitotic chromosome condensation, cell division
SEPT9 septin 9 isoform b	1,21	cytoskeletal GTPase, may play a role in cytokinesis, cell cycle, cell division
DNM2 Isoform 2 of Dynamin-2	1,34	endocytosis, G2/M transition, regulation of apoptosis, transcription regulation and others
CDC2 cell division cycle 2 protein isoform 1	1,38	cell cycle, cell division, mitosis
TUBGCP2 Gamma-tubulin complex component 2	1,51	microtubule nucleation at the centrosome, protein complex assembly
KIF14 Kinesin-like protein KIF14	1,53	cytokinesis, microtubule-based movement
CIT Citron	1,83	Ser/Thr protein kinase, cell cycle, cell division, mitosis, differentiation, neurogenesis
ANP32B Isoform 1 of Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	1,86	multifunctional, cell cycle progression, apoptosis regulation
PCM1 Isoform 3 of Pericentriolar material 1 protein	2,46	centrosome assembly and function, microtubule anchoring to the centrosome, cell cycle
KIF23 Isoform 1 of Kinesin-like protein KIF23	2,69	MT motor enzyme, microtubule-based movement, mitotic spindle elongation, mitosis
KIF23 Isoform 2 of Kinesin-like protein KIF23	2,78	MT motor enzyme, microtubule-based movement, mitotic spindle elongation, mitosis
PRC1 Isoform 3 of Protein regulator of cytokinesis 1	2,93	central spindle midzone, midbody formation, cytokinesis, MT-binding protein, cell division
KPNA2;LOC728860 Importin subunit alpha-2	2,95	protein transport, transport, G2 phase, M phase specific microtubule process, cell division
PSMD7 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	2,96	Regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle
CALM1;CALM3;CALM2 Calmodulin	4,07	regulation of centrosomal cycle and cytokinesis
RACGAP1 Rac GTPase-activating protein 1	4,37	GTPase activation, cell cycle, cell division, cytokinesis, transport.
PRC1 protein regulator of cytokinesis 1 isoform 2	5,55	spindle midzone and midbody organisation, cytokinesis, cyclin-CDK substrate
PPP2R1A Ser/thr-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	6,38	chromosome segregation, induction of apoptosis and other...
RCC2 Protein RCC2	7,16	cell division, mitosis
RCC1 regulator of chromosome condensation 1 isoform a	8,23	cell cycle, mitosis, chromosome condensation
PSMC3 26S protease regulatory subunit 6A	12,04	regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle
RUVBL1 Isoform 1 of RuvB-like 1	13,69	cell cycle, mitosis, DNA recombination, transcription, transcription regulation
PSMD3 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	17,92	regulatory subunit of the 26 proteasome, mitotic cell cycle
SEPT2 Septin-2	32,76	GTPase, actin cytoskeleton, cell cycle, mitosis

D) Liste des protéines identifiées par MS/MS ayant une fonction décrite au niveau de la réponse aux dommages à l'ADN

DNA damage		
Protein Description	VP/CTL	function
FANCI Isoform 3 of Fanconi anemia group 1 protein	-8,12	DDR, cell cycle, S phase and G2 phase checkpoint activation upon DNA damage
APEX1 DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	-6,97	DNA damage repair
HMGB2 High mobility group protein B2	-5,39	DNA binding protein, recombination
MSH6 Isoform GTBP-alt of DNA mismatch repair protein Msh6	-4,23	DNA repair
LOC731751 similar to DNA dependent protein kinase catalytic subunit	-3,75	DNA damage
TOP2A Isoform 4 of DNA topoisomerase 2-alpha	-3,56	DNA double strand breaks and end joining
SUPT16H FACT complex subunit SPT16	-2,94	DNA damage, repair, replication transcription, involved in nucleosomes reorganisation
PRKDC Isoform 1 of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	-2,67	DNA damage, DNA repair
RPA1 Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	-2,6	DNA replication, recombination and repair
XRCC5 Putative uncharacterized protein XRCC5	-2,58	DNA repair
XRCC5 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	-2,54	DNA damage, DNA recombination, repair
highly similar to Histone H2B type 2-F	-2,49	core component of nucleosome, DNA binding
TOP2A Isoform 3 of DNA topoisomerase 2-alpha	-2,04	DNA double strand breaks and end joining
SMC3 Structural maintenance of chromosomes protein 3	-1,94	chromosome cohesion, mitosis, DNA damage and repair
RAD50 Isoform 2 of DNA repair protein RAD50	-1,88	DNA damage, DNA repair
SMC1A Structural maintenance of chromosomes protein 1A	-1,72	chromosome cohesion, mitosis, DNA damage and repair
PARP1 Poly [ADP-ribose] polymerase 1	-1,63	DNA damage, DNA repair
MSH6 Isoform GTBP-N of DNA mismatch repair protein Msh6	-1,32	DNA damage, DNA repair
MSH2 MutS homolog 2 variant	-1,3	DNA damage, DNA repair
TOP1 99 kDa protein	-1,23	isomérase , topoisomerase
MSH2 DNA mismatch repair protein Msh2	-1,15	DNA damage, DNA repair
RECQL ATP-dependent DNA helicase Q1	-1,11	DNA recombination, replication, DNA repair
SFPQ Isoform Short of Splicing factor; proline- and glutamine-rich	-1,11	DNA repair, recombination, transcription regulation, transcription
XRCC6 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	-1,04	DNA damage, DNA repair, recombination
MCM7 Isoform 1 of DNA replication licensing factor MCM7	1,02	DNA replication, response to DNA damage, transcription, transcription regulation
TYMS Thymidylate synthase	1,05	nucleotide biosynthesis, DNA repair, DNA replication
UPF1 Isoform 1 of Regulator of nonsense transcripts 1	1,09	histone mRNA catabolic process, DNA repair, replication, cell cycle, translational termination
SFPQ Isoform Long of Splicing factor; proline- and glutamine-rich	1,12	DNA damage, DNA repair, recombination, transcription, RNA splicing, RNA processing
RPA3 Replication protein A 14 kDa subunit	1,13	DNA replication, DNA repair
MRPS9 28S ribosomal protein S9; mitochondrial	1,29	Ribonucleoprotein, protein synthesis, DNA damage response, detection of DNA damage
Histone H4	2,57	Component of nucleosome, transcription regulation, DNA repair, DNA replication
HIST1H2AH Histone H2A type 1-H	3,16	core component of nucleosome, DNA replication, DNA repair
NONO Non-POU domain-containing octamer-binding protein	3,69	DNA damage, DNA repair, DNA recombination, transcription, mRNA processing, mRNA splicing
PRPF19 Pre-mRNA-processing factor 19	4,74	DNA damage, DNA repair, mRNA processing, mRNA splicing, protein polyubiquitination
FEN1 Flap endonuclease 1	8,06	DNA replication, double-strand break repair, phosphoinositide-mediated signaling
RUVBL2 RuvB-like 2	8,94	DNA recombination, DNA repair, transcription, transcription regulation, histone acetylation, protein folding

Légende des figures

Fig. 1. Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans l'entrée de la mitose.

Fig. 2. Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans le point de contrôle du cycle cellulaire à la transition G2/M.

Fig. 3. Le niveau d'expression d'ATM-P (Ser1981) diminue au niveau des centrosomes après un traitement au VP-16. A) Les cellules HeLa S3 ont été synchronisées par double bloc thymidine à la transition G1/S puis relarguées dans le cycle cellulaire pendant 6 heures pour atteindre la phase G2 (G2 control). Les cellules sont alors traitées avec 50 μ M de VP-16 pendant 2h (G2 + étoposide 2h). Les profils du contenu en ADN mesuré par cytométrie de flux sont illustrés à droite. La microscopie à fluorescence indirecte a été réalisée avec un anticorps reconnaissant ATM-P (Ser1981) (Texas Red - rouge), la γ -tubuline (AlexaFluor 488 - vert) et le DAPI (bleu). Les flèches indiquent les centrosomes. B) L'intensité de fluorescence du signal rouge au niveau des centrosomes a été quantifiée dans 250 cellules contrôles ou traitées obtenues dans 3 expériences distinctes (n=3). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur la moyenne, et les symboles correspondent aux cellules G2 contrôles (CTL), ou les cellules G2 traitées au VP-16 (VP).

Fig. 4. Le niveau d'expression d'ATR-P (Ser428) diminue au niveau des centrosomes après un traitement au VP-16. A) Les cellules HeLa S3 ont été synchronisées par double bloc thymidine à la transition G1/S puis relarguées dans le cycle cellulaire pendant 6 heures pour atteindre la phase G2 (G2 contrôle). Les cellules sont alors traitées avec 50 μ M de VP-16 pendant 2h (G2 + étoposide 2h). La microscopie à fluorescence indirecte a été réalisée avec un anticorps reconnaissant ATR-P (Ser428) (Texas Red - rouge), la γ -tubuline (AlexaFluor 488 - vert) et le DAPI (bleu). Les flèches indiquent les centrosomes. B) L'intensité de fluorescence du signal rouge au niveau des centrosomes a été quantifiée dans 250 cellules contrôles ou traitées obtenues dans 3 expériences distinctes (n=3). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur la moyenne, et les symboles correspondent aux cellules G2 contrôle (CTL), ou les cellules G2 traitées au VP-16 (VP).

Fig. 5. Le niveau d'expression de CHK1 diminue au niveau des centrosomes après un traitement au VP-16. A) Les cellules HeLa S3 ont été synchronisées par double bloc thymidine à la transition G1/S puis relarguées dans le cycle cellulaire pendant 6 heures pour atteindre la phase G2 (G2 contrôle). Les cellules sont alors traitées avec 50 μ M de VP-16 pendant 2h (G2 + étoposide 2h). La microscopie à fluorescence indirecte a été réalisée avec un anticorps reconnaissant CHK1 (Texas Red - rouge), la γ -tubuline (AlexaFluor 488 - vert) et le DAPI (bleu). Les flèches indiquent les centrosomes. B) L'intensité de fluorescence du signal rouge au niveau des centrosomes a été quantifiée dans 250 cellules contrôles ou traitées obtenues dans 3 expériences distinctes (n=3). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur la moyenne, et les symboles correspondent aux cellules G2 contrôle (CTL), ou les cellules G2 traitées au VP-16 (VP).

Fig. 6. Colocalisation d'ATM-P (Ser1981) avec γ -H2AX-P et spécificité de l'anticorps reconnaissant ATM-P (Ser1981). A) Les cellules HeLa S3 asynchrone (Ctrl) ont été exposées aux irradiations ionisantes (xxGy) et collecter 2 h après traitement (IR). La microscopie à fluorescence indirecte a été réalisée avec un anticorps reconnaissant ATM-P (Ser1981) (Texas Red - rouge), γ -H2AX-P (AlexaFluor 488 - vert) et le DAPI (bleu). Micrographies représentatives de 2 expériences. B) Les fibroblastes HCA2 asynchrones stablement transfectés avec un shARN contrôle (shRNA GFP) ou ciblant l'ARNm d'ATM (SHRNA ATM) ont été fixés et marqués avec un anticorps contre ATM-P (Ser1981) (Texas Red - rouge), la γ -tubuline

(AlexaFluor 488 - vert) et le DAPI (bleu). Micrographies représentatives de 2 expériences. Les flèches indiquent les centrosomes.

Fig. 7. Les substrats phosphorylés par ATM/ATR sont localisés au niveau des centrosomes. A) Microscopie à fluorescence indirecte des cellules HeLa S3 synchronisées en phase G2 (G2 contrôle), puis traitées au VP-16 pendant 2 h (G2 + étoposide 2h). Le triple marquage a été réalisé avec un anticorps reconnaissant le site consensus des substrats phosphorylés par ATM/ATR (Texas Red - rouge), la γ -tubuline (AlexaFluor 488 - vert) et le DAPI (bleu). Les flèches indiquent les centrosomes. B) L'intensité de fluorescence du signal rouge au niveau des centrosomes a été quantifiée dans 250 cellules contrôles ou traitées obtenues dans 3 expériences distinctes (n=3). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur la moyenne, et les symboles correspondent aux cellules G2 contrôle (CTL), ou les cellules G2 traitées au VP-16 (VP).

Fig. 8. Les substrats phosphorylés par MAPK/CDK ne sont pas localisés au niveau des centrosomes. A) Microscopie à fluorescence indirecte des cellules HeLa S3 synchronisées en phase G2 (G2 contrôle), puis traitées au VP-16 pendant 2 h (G2 + étoposide 2h). Le triple marquage a été réalisé avec un anticorps reconnaissant le site consensus des substrats phosphorylés par MAPK/CDK (Texas Red - rouge), la γ -tubuline (AlexaFluor 488 - vert) et le DAPI (bleu). Micrographies représentatives de 3 expériences.

Fig. 9. CHK2-P (Thr68) est localisé au niveau des centrosomes. Microscopie à fluorescence indirecte des cellules HeLa S3 synchronisées en phase G2 (G2 contrôle), puis traitées au VP-16 pendant 2 h (G2 + étoposide 2h). Le triple marquage a été réalisé avec un anticorps reconnaissant CHK2-P (Thr68) (Texas Red - rouge), la γ -tubuline (AlexaFluor 488 - vert) et le DAPI (bleu). Les flèches indiquent les centrosomes.

Fig. 10. Colocalisation de CHK2-P (Thr68) avec γ -H2AX-P et spécificité de l'anticorps reconnaissant CHK2-P (Thr68). A) Les cellules HeLa S3 asynchrones (Ctrl) ont été exposées aux irradiations ionisantes (6Gy) et collectées 2 h après traitement (IR). La microscopie à fluorescence indirecte a été réalisée avec un anticorps reconnaissant CHK2-P (Thr68) (Texas Red - rouge), la γ -tubuline (AlexaFluor 488 - vert) et le DAPI (bleu). Micrographies représentatives de 2 expériences. B) Les fibroblastes HCT-116 parentales et HCT-116 CHK2^{-/-} asynchrones ont été fixées et marquées avec un anticorps reconnaissant CHK2-P (Thr68) asynchrones et le DAPI (bleu). Micrographies représentatives de 3 expériences. Les flèches indiquent les centrosomes.

Fig. 11. CHK2 est localisé au niveau des centrosomes. Les cellules U2OS ont été transfectées provisoirement avec les vecteurs d'expression exprimant HA-CHK2, HA-GAB1 ou avec le vecteur vide (contrôle). A) Représentation de cellules en interphase ou, B) de cellules en mitose exprimant HA-CHK2 ou HA-GAB1 (Texas Red - rouge), la γ -tubuline (AlexaFluor 488 - vert). Les noyaux sont visualisés par une coloration au DAPI (bleu). Les flèches indiquent les centrosomes. Micrographies représentatives de 2 expériences. C) Immunobuvardage de type Western des fractions enrichies en centrosomes purifiées à partir de cellules HeLa S3 synchronisées en phase G2. Des extraits protéiques totaux obtenus des cellules asynchrones HCT-116 parentales, HCT-116 CHK2^{-/-} et HeLa S3 sont utilisés comme contrôles. L'expression de CHK2, centrin et γ -tubuline est illustré. Représentatif de 3 expériences.

Fig. 12. A) Représentation schématique des protéines CHK2 sauvage ou mutées (dominant négatif), fusionnés à une étiquette fluorescente GFP, une étiquette HA et une séquence de localisation centrosomale (CLS) ainsi que la construction contrôle GFP-CLS. B) Les cellules U2OS exprimant un système inductible à la doxycycline ont été infectées avec une construction contrôle GFP-CLS. Avant et après induction à la

doxycycline puis fixés et marqués avec un anticorps contre la γ -tubuline (rouge) ou le DAPI (bleu). Les flèches indiquent les centrosomes.

Fig. 13. Résultats préliminaires de six protéines candidates identifiées par spectrométrie de masse. Microscopie à fluorescence indirecte de cellules U2OS asynchrones contrôles (Ctrl) ou traitées au VP-16 pendant 2 h (VP 2h). Les cellules fixées ont été marquées avec un anticorps contre Nucleophosmin (A), chTOG (B), RCC1 (C), RCC2 (D), FANCI (E), Reptin 52 (F) (Texas Red - rouge), la γ -tubuline (AlexaFluor 488 - vert) ou le DAPI (bleu). Micrographies représentatives de 1 expérience.

Figures

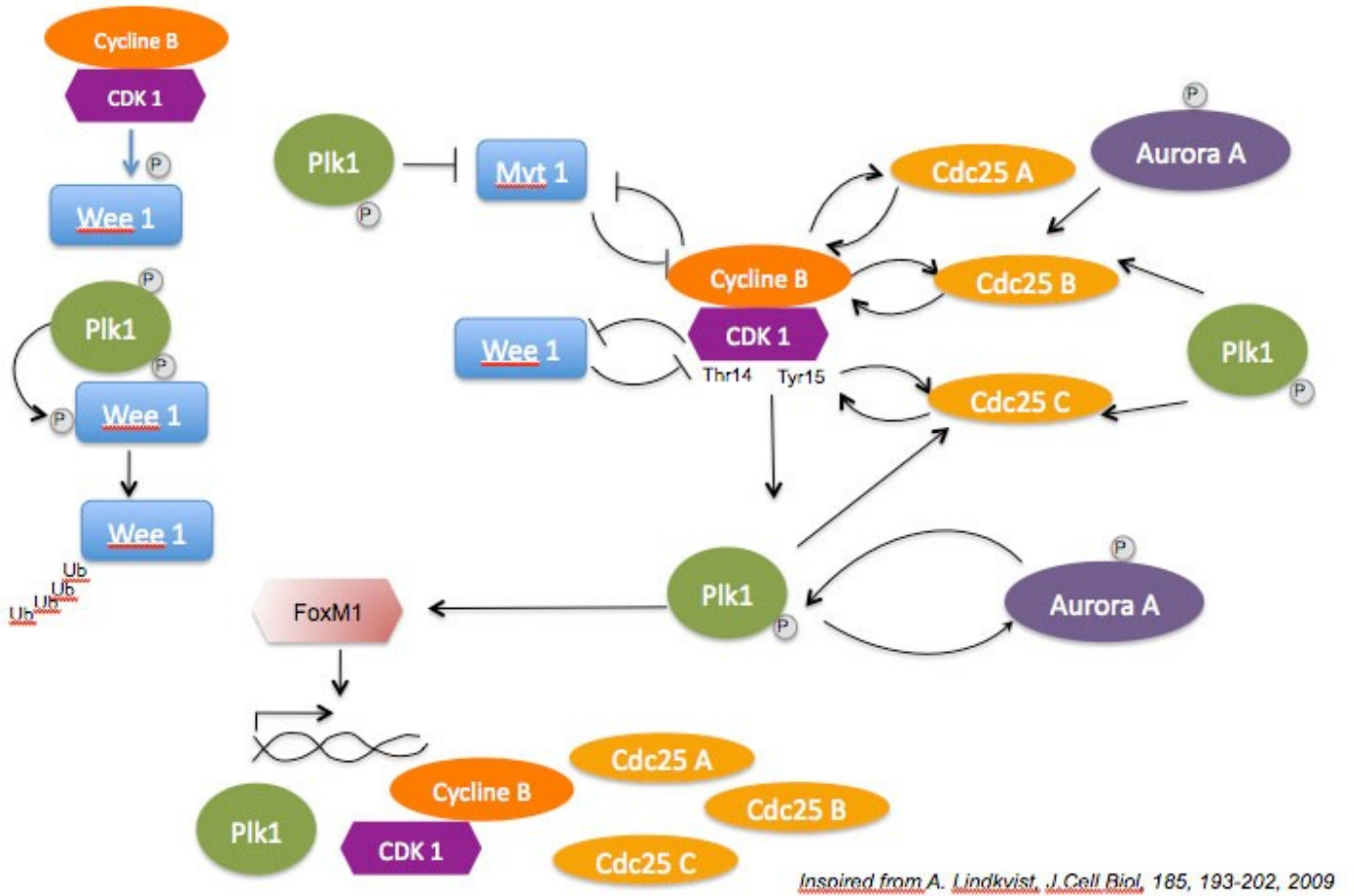


Figure 1

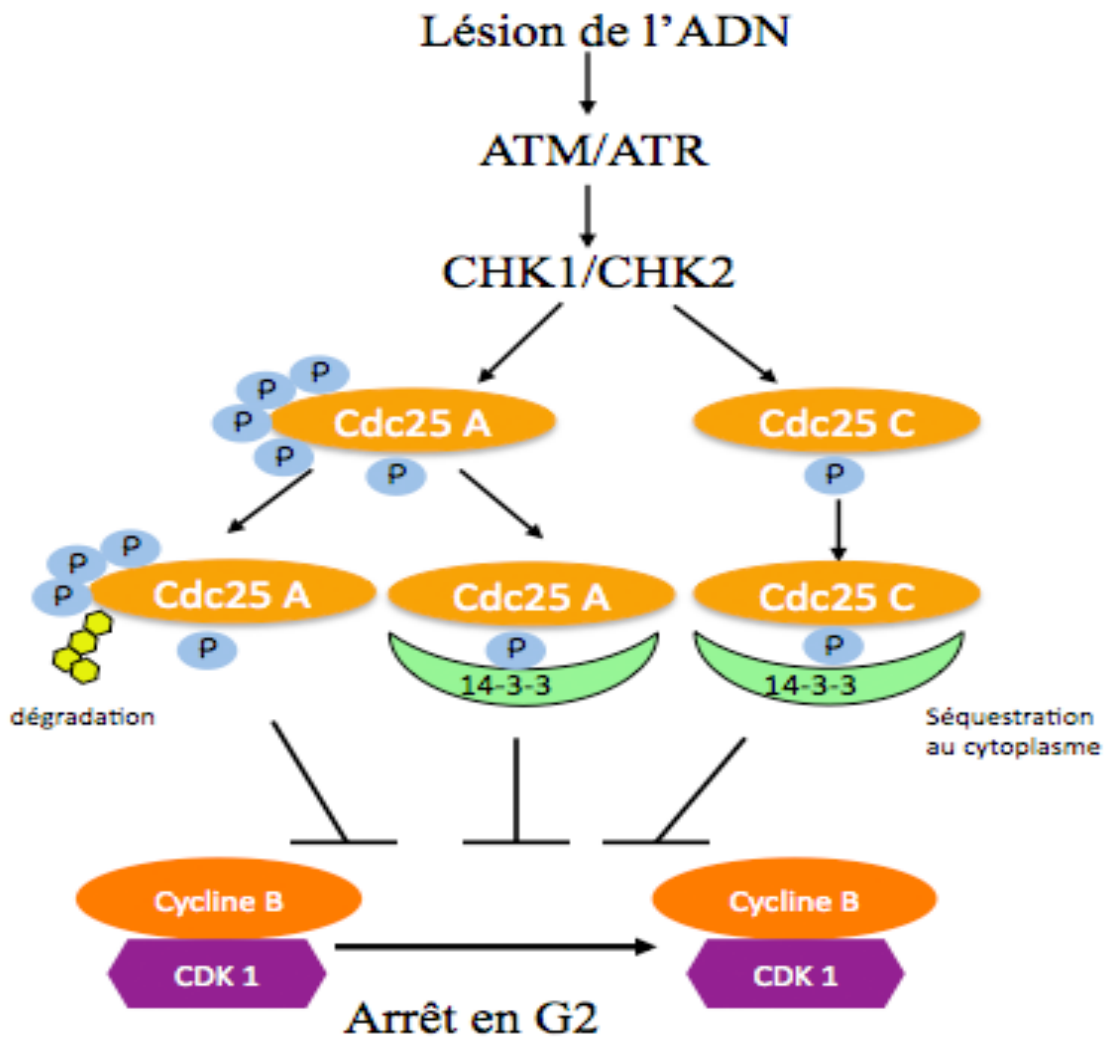
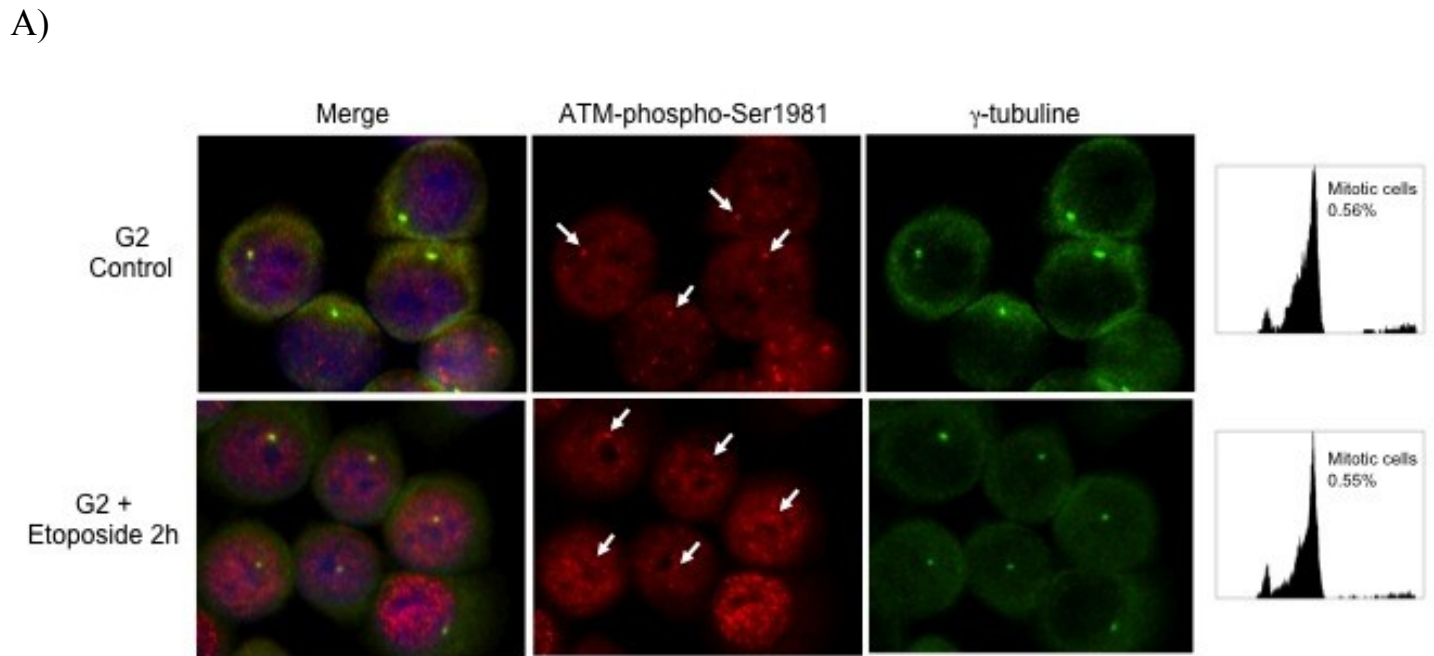


Figure 2



B)

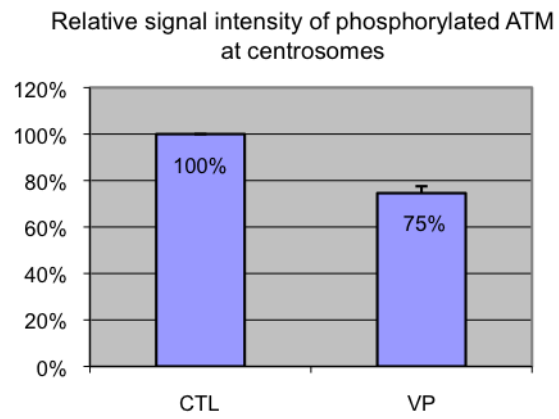
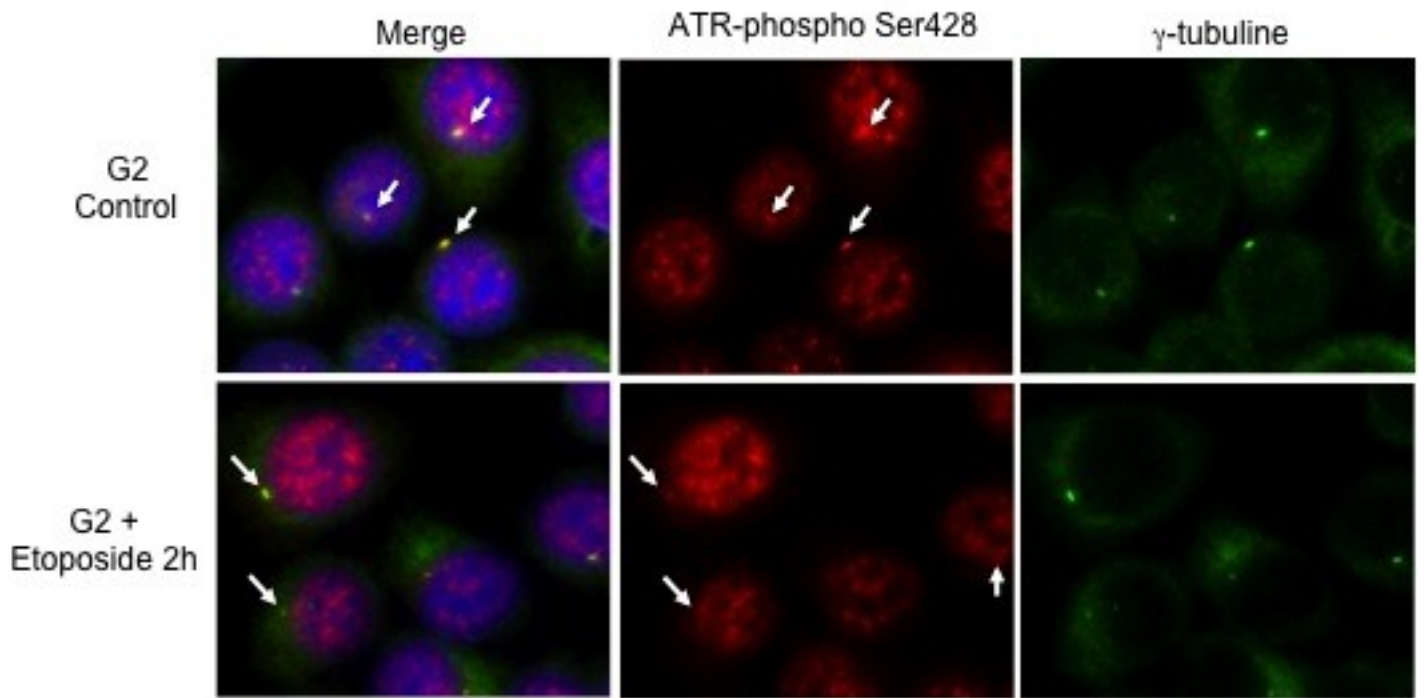


Figure 3

A)



B)

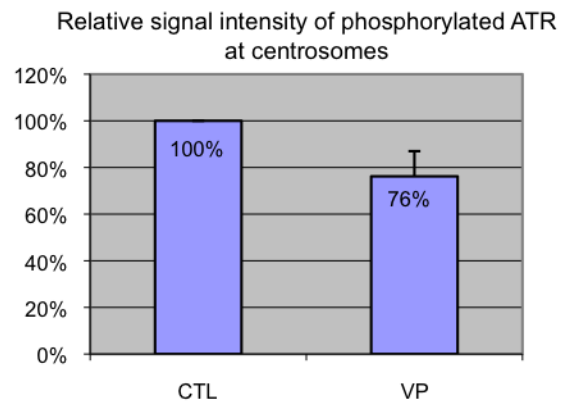
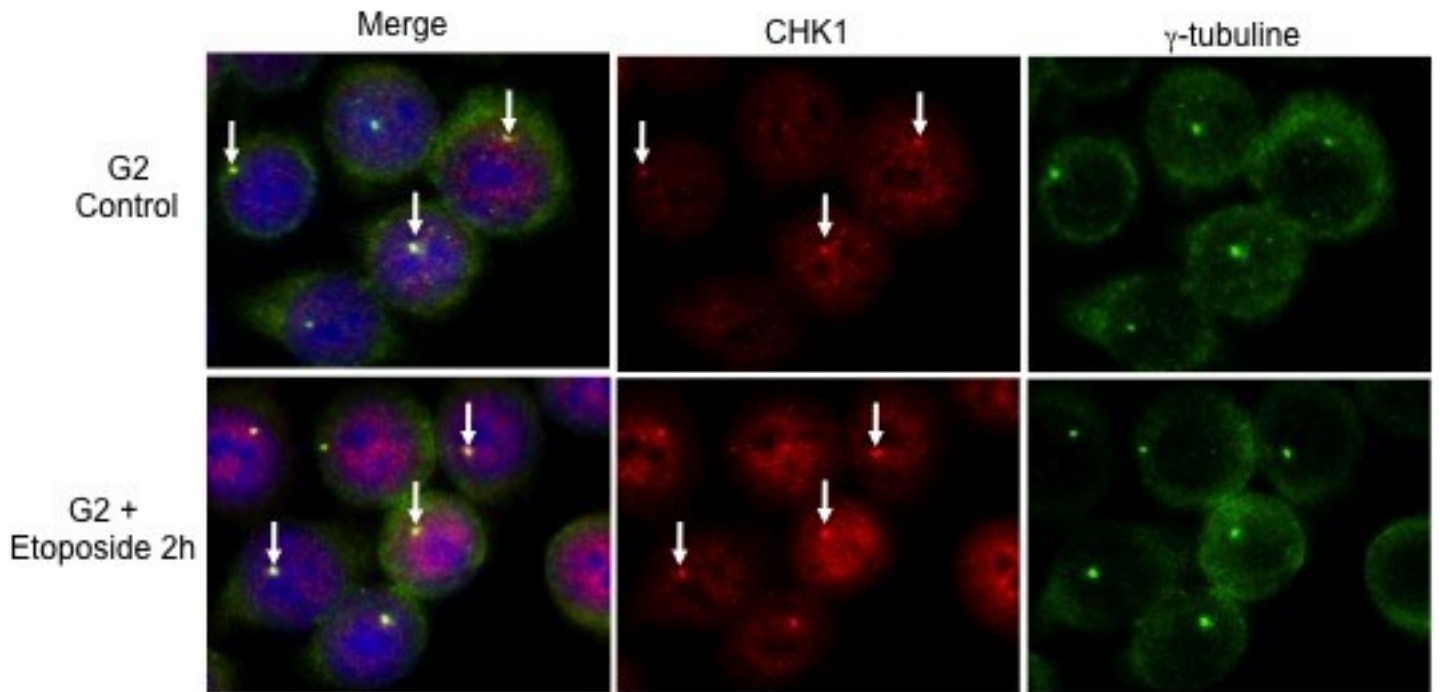


Figure 4

A)



B)

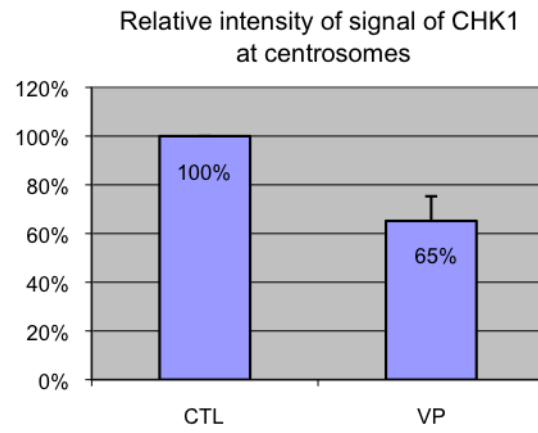


Figure 5

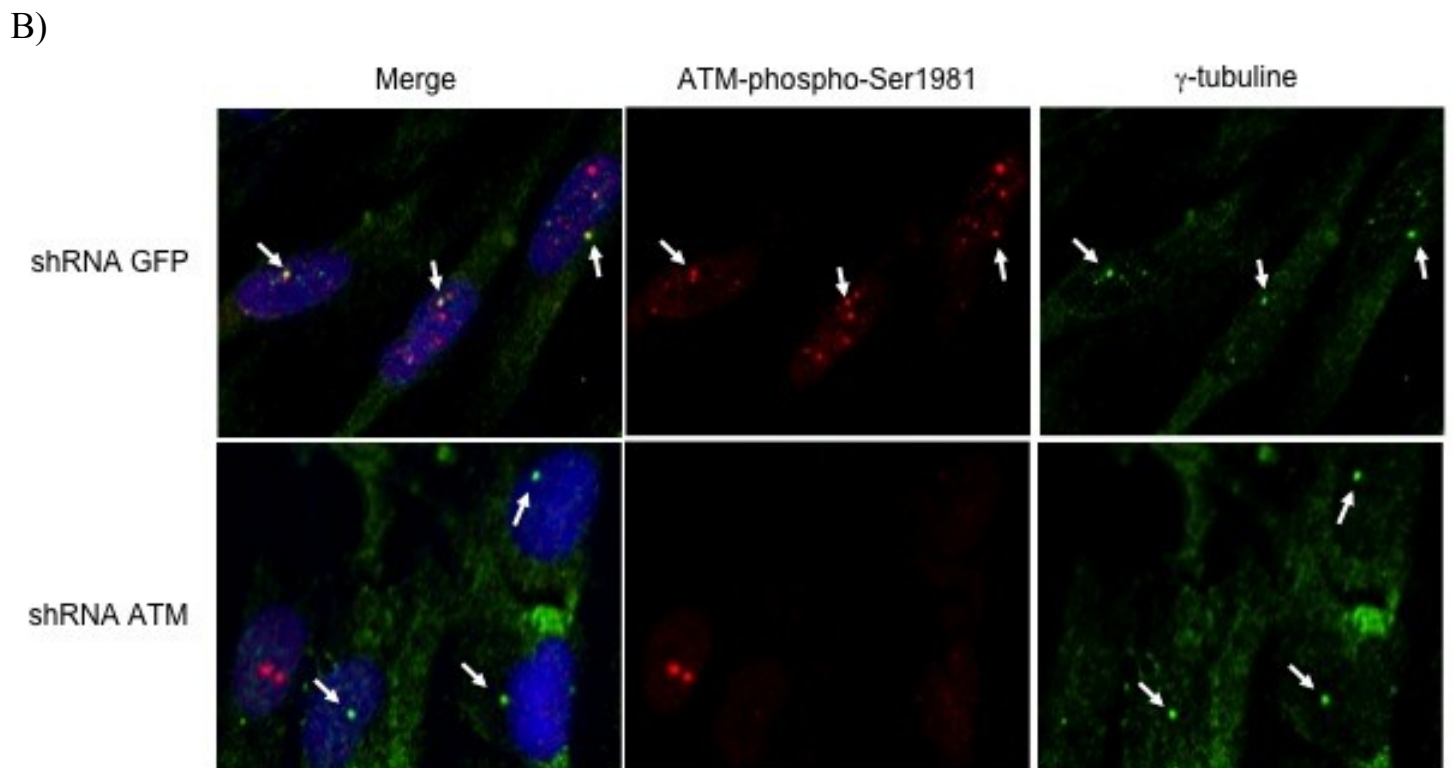
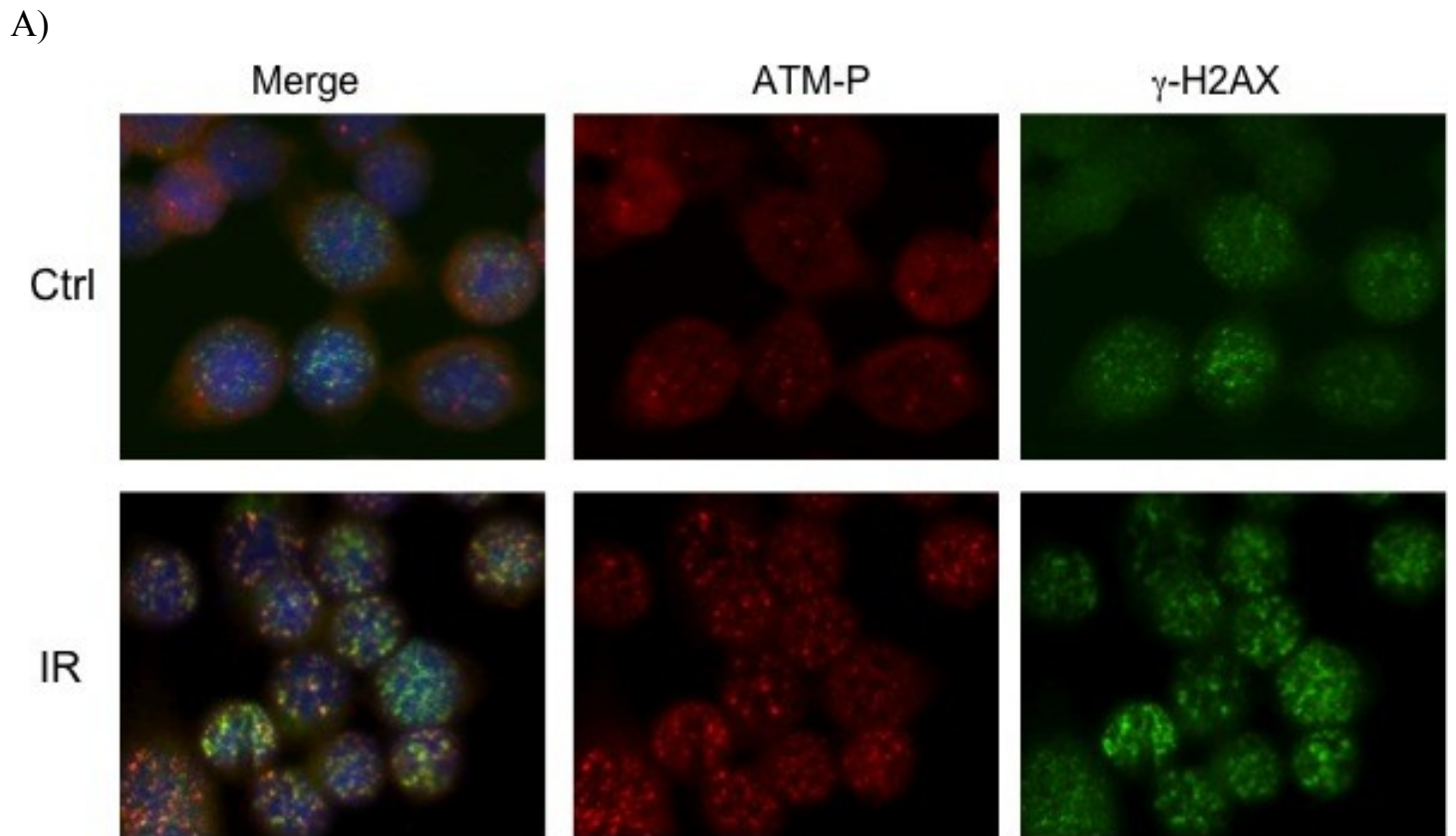
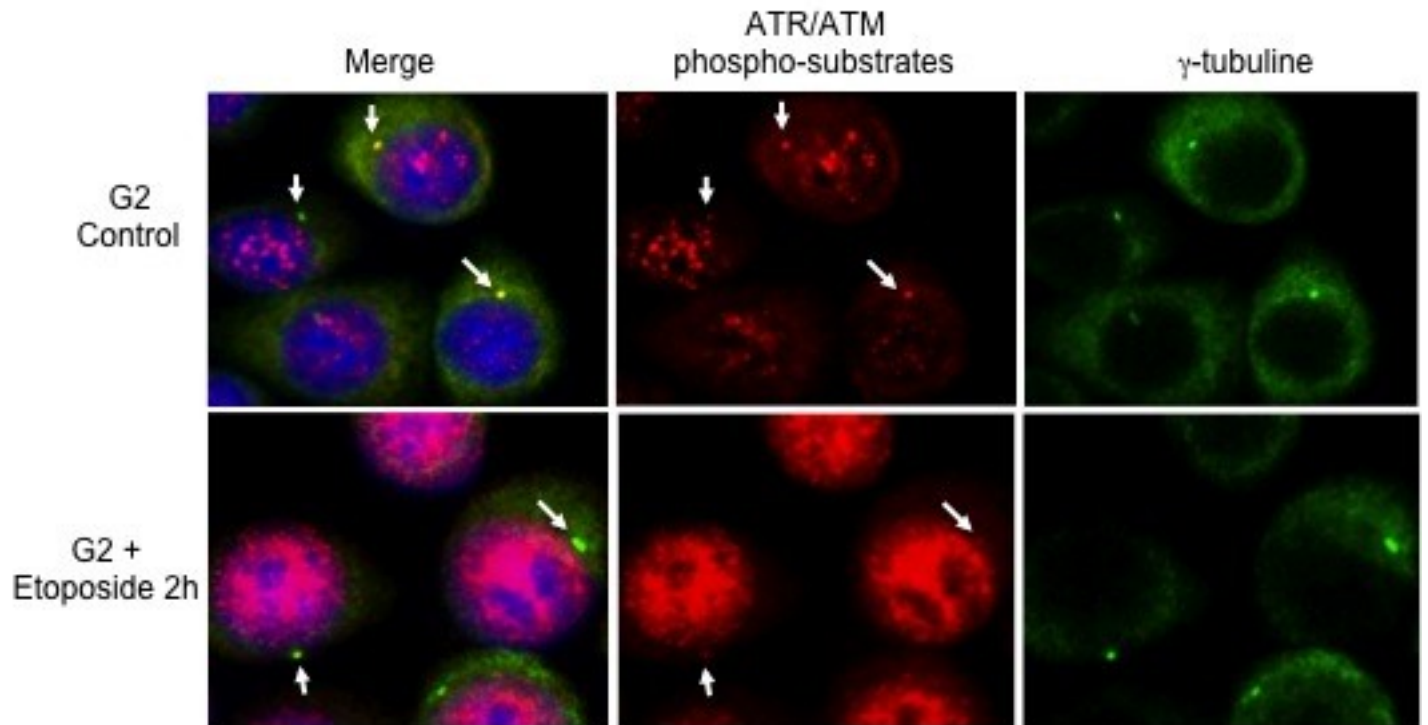


Figure 6

A)



B)

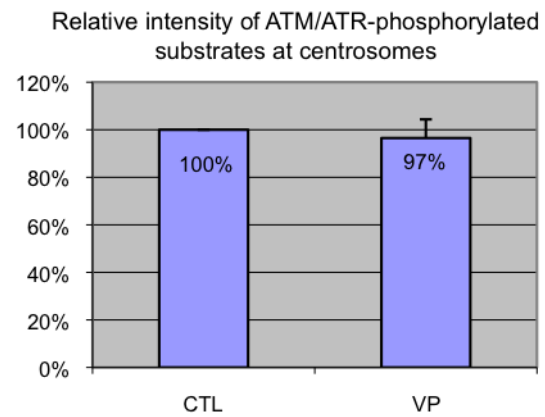


Figure 7

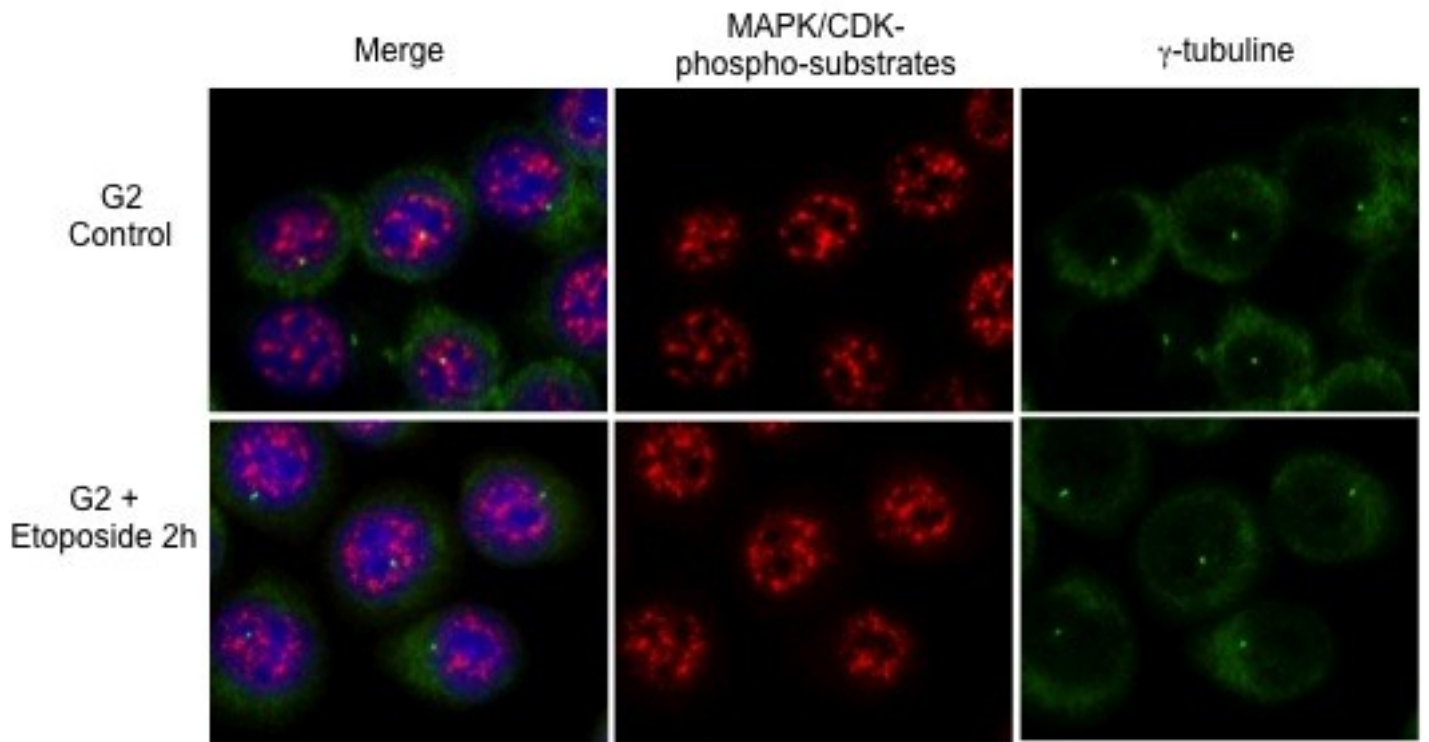


Figure 8

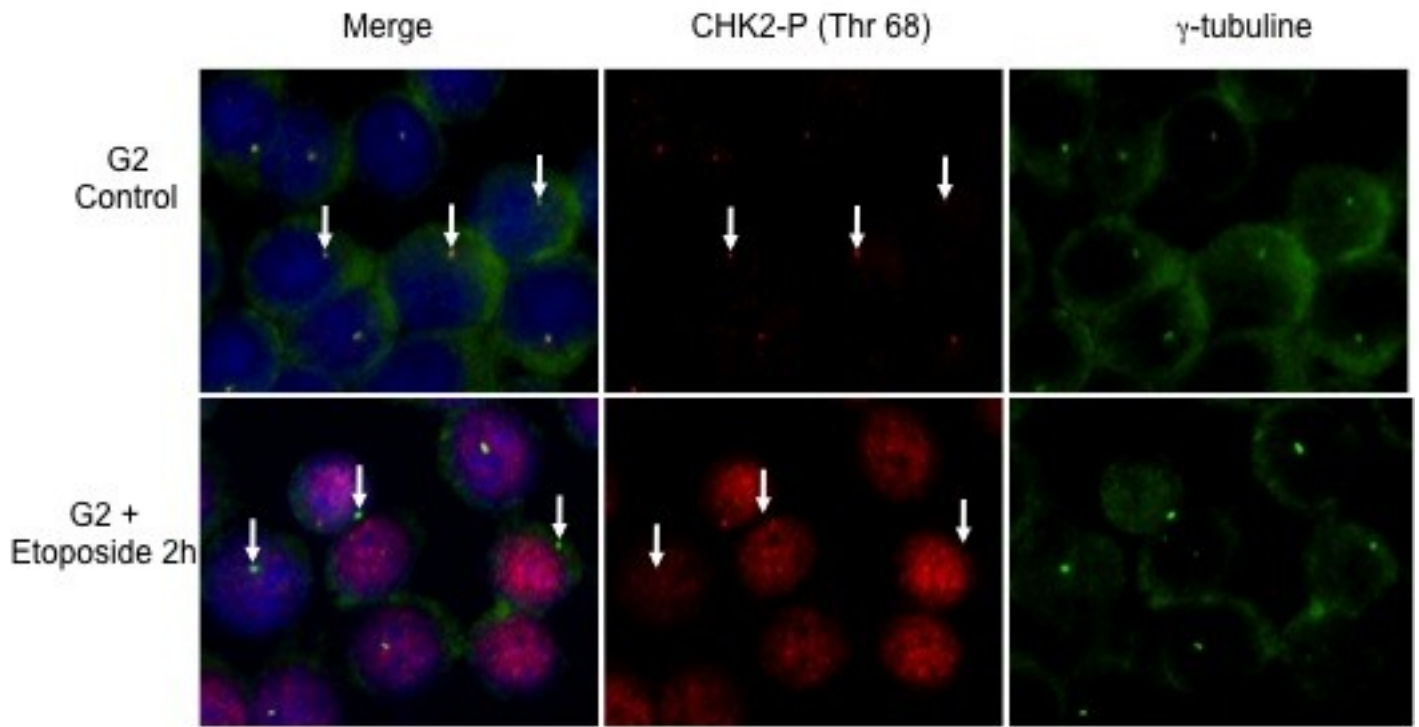


Figure 9

A)

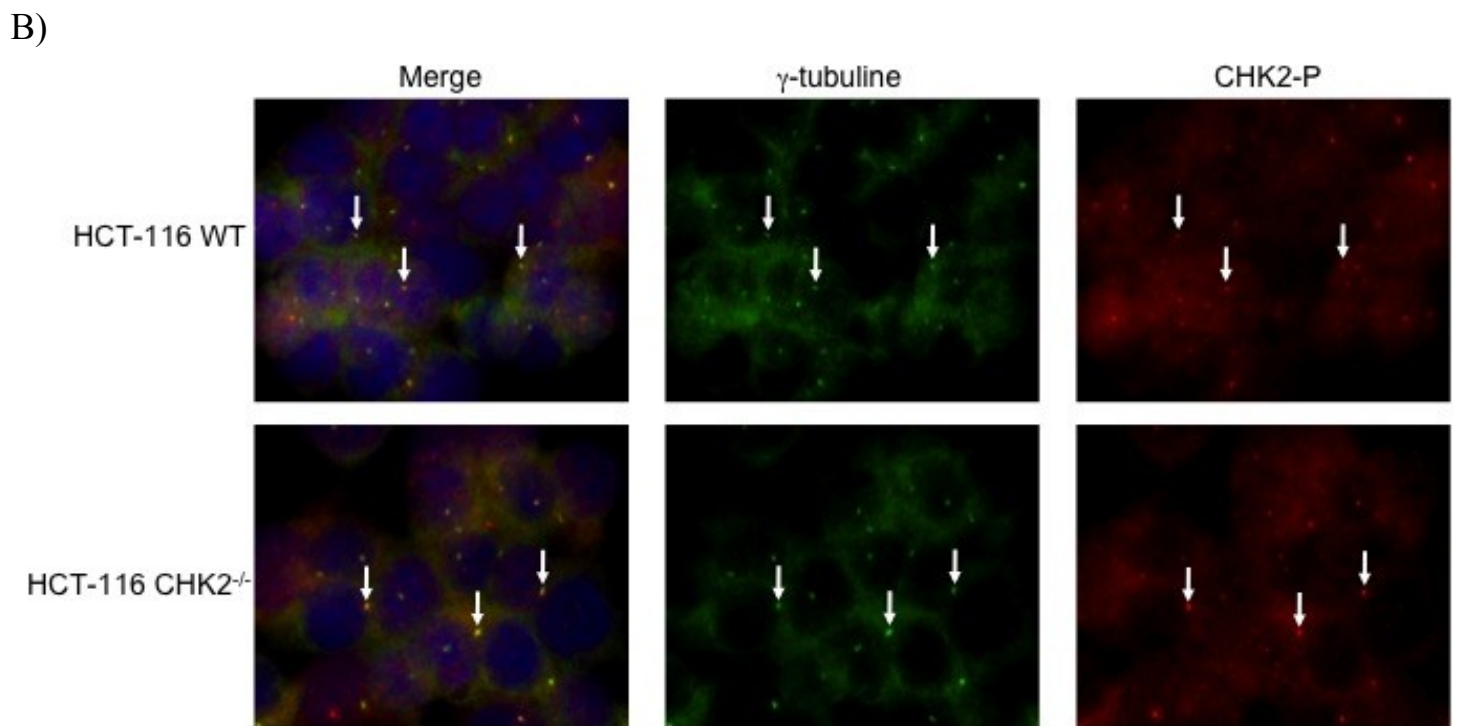
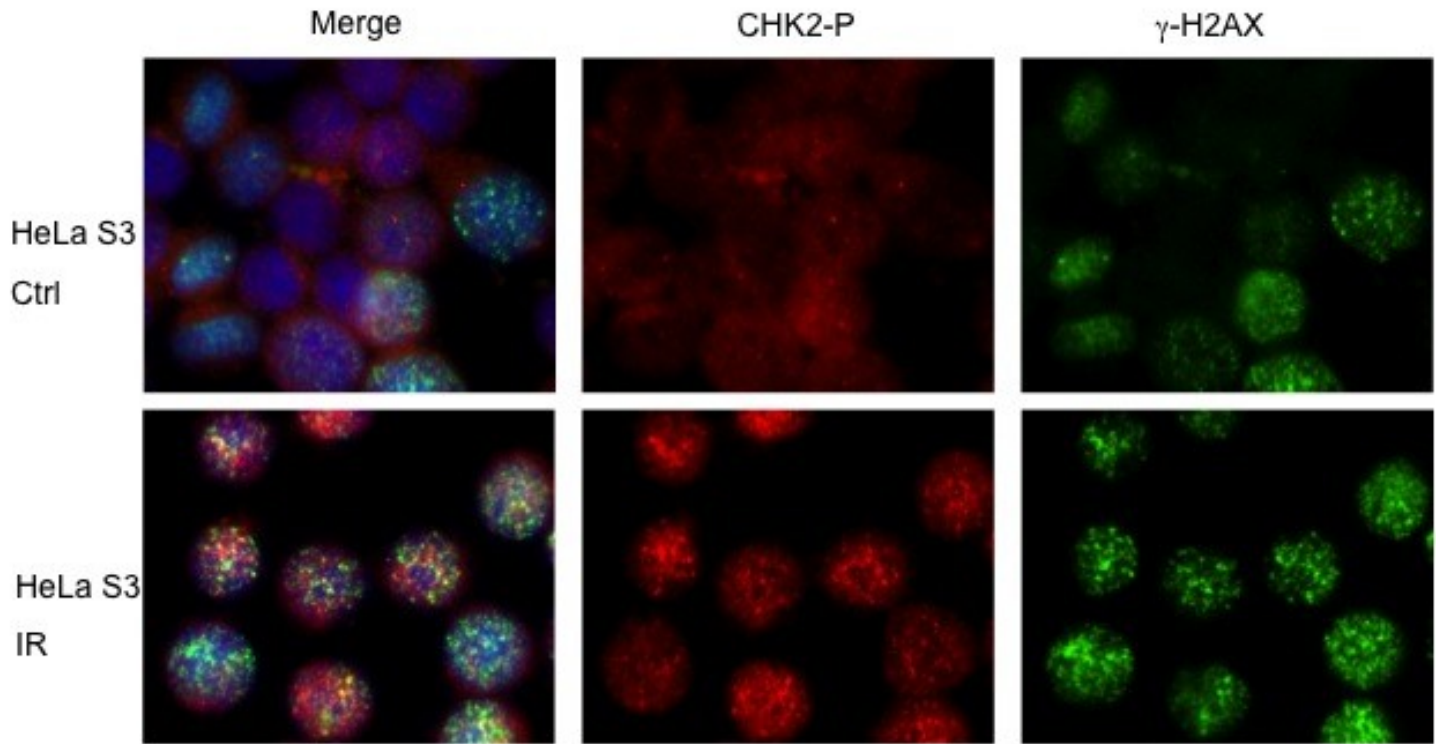
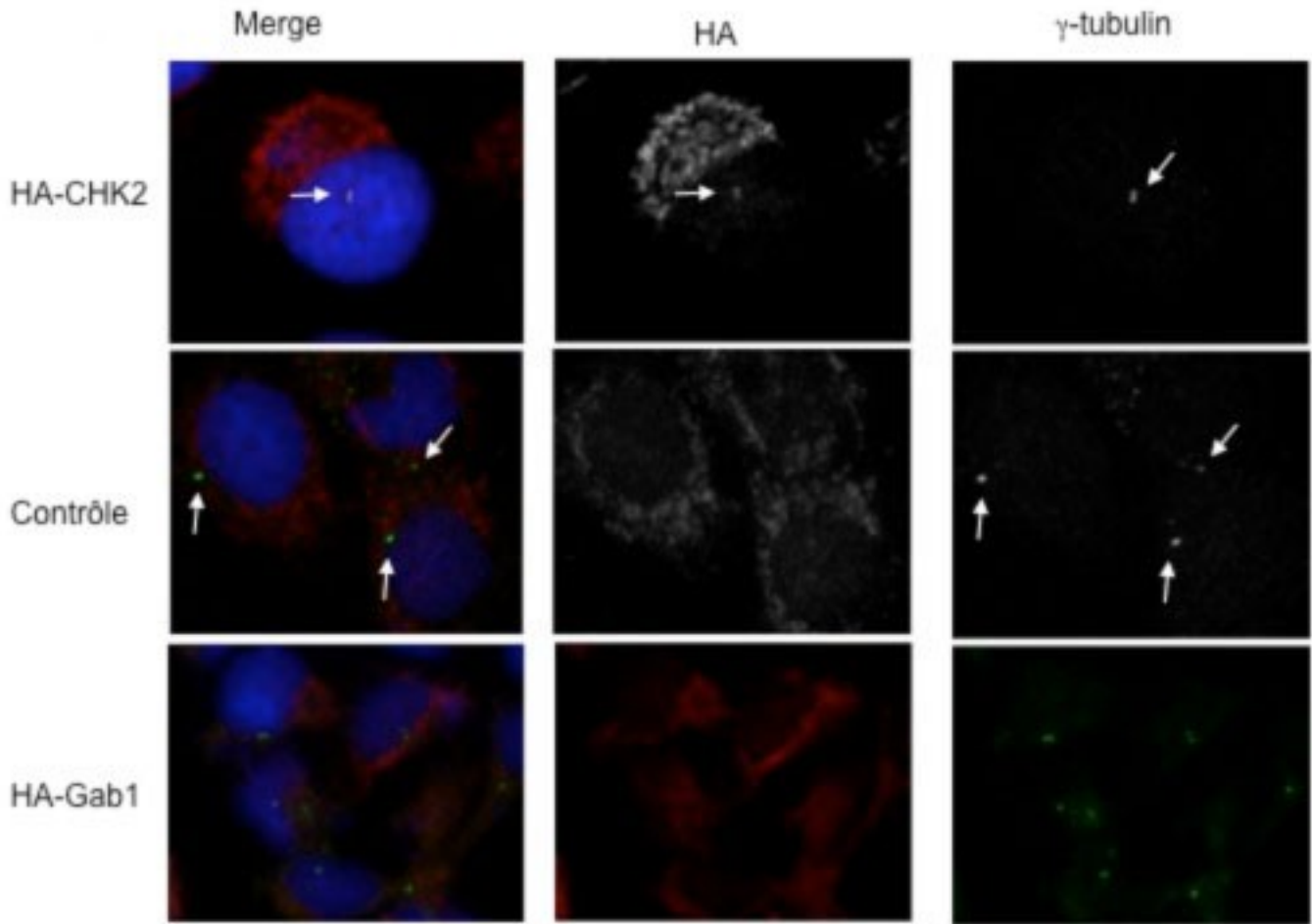
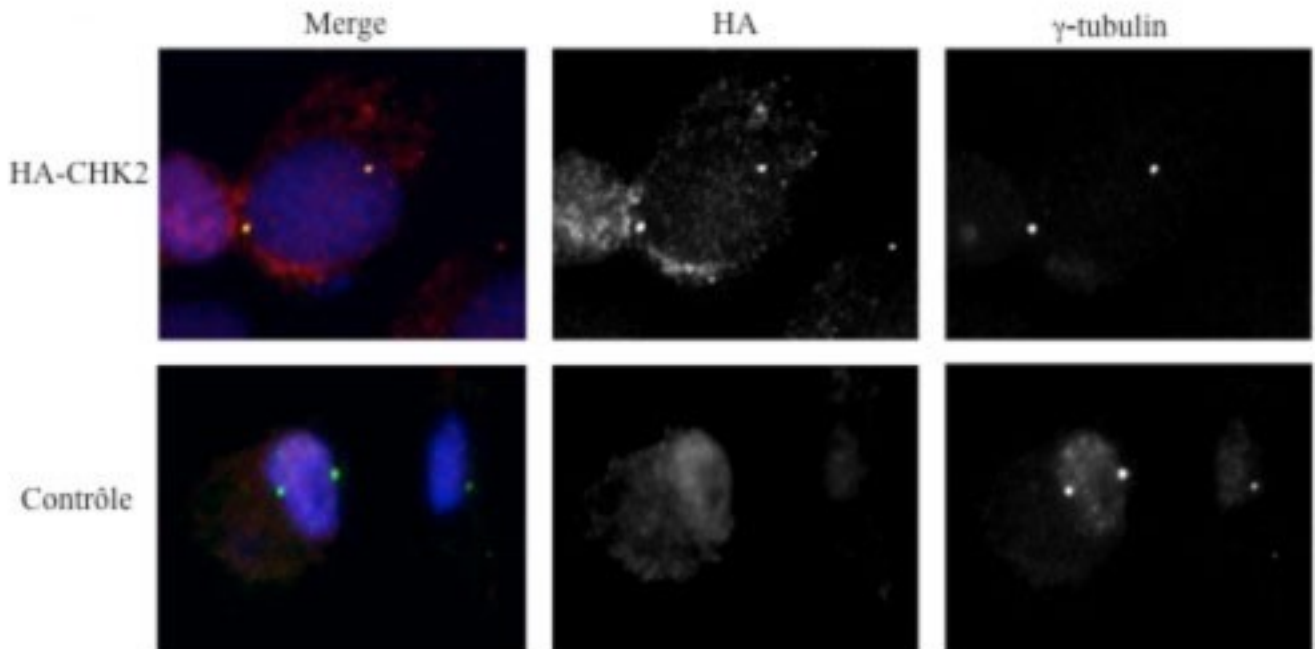


Figure 10

A)



B)



C)

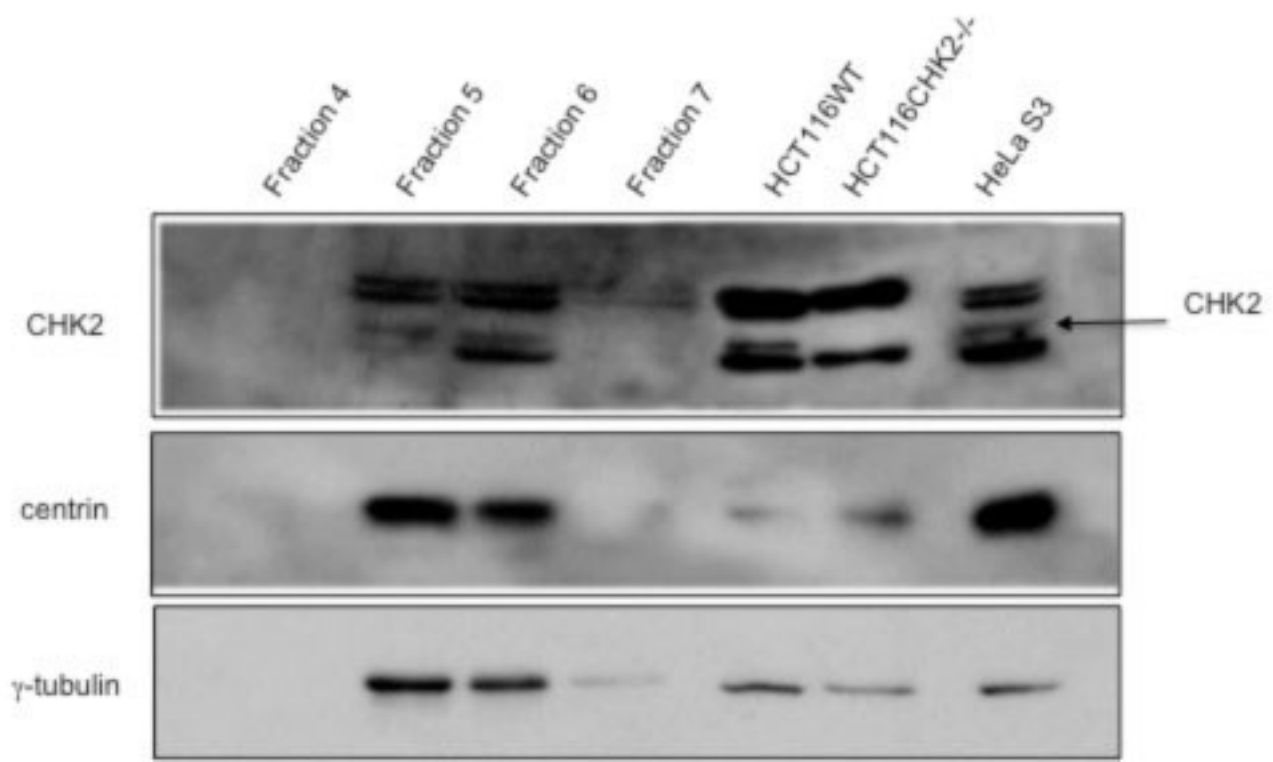
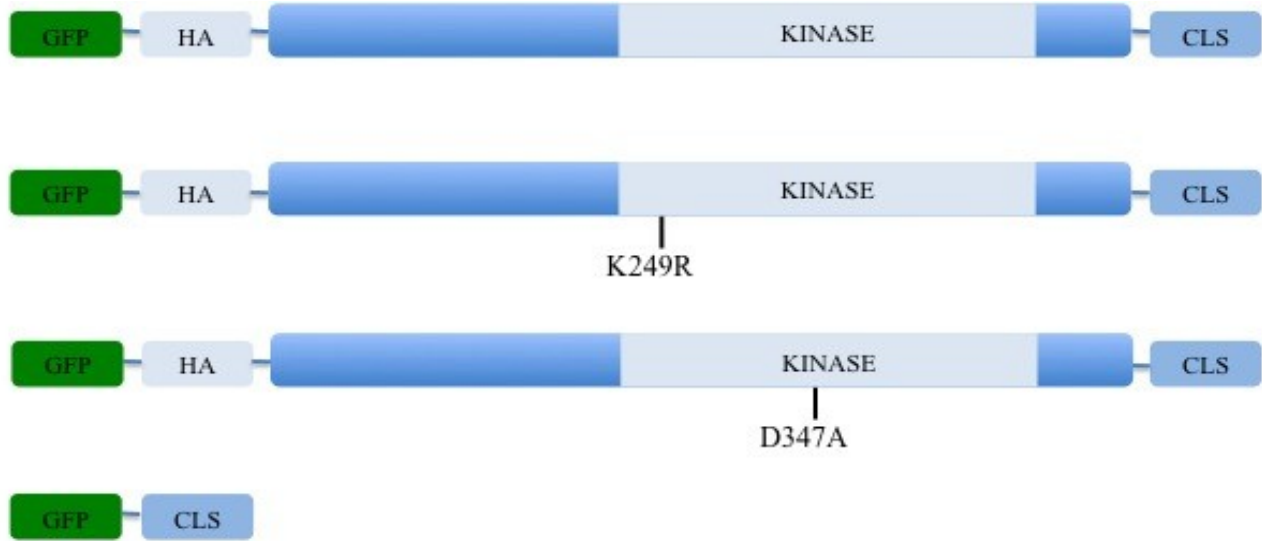


Figure 11

A)



CLS = séquence de localisation centrosomale

B)

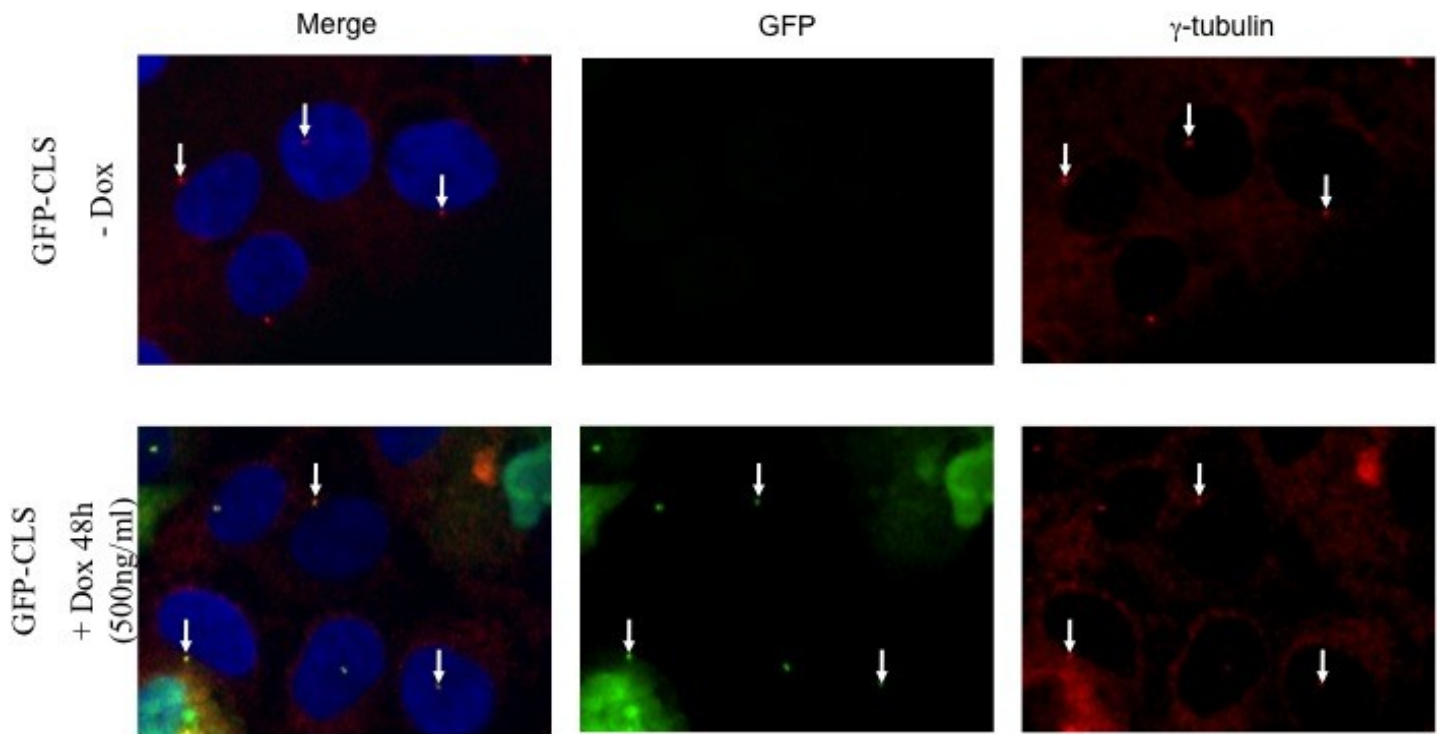
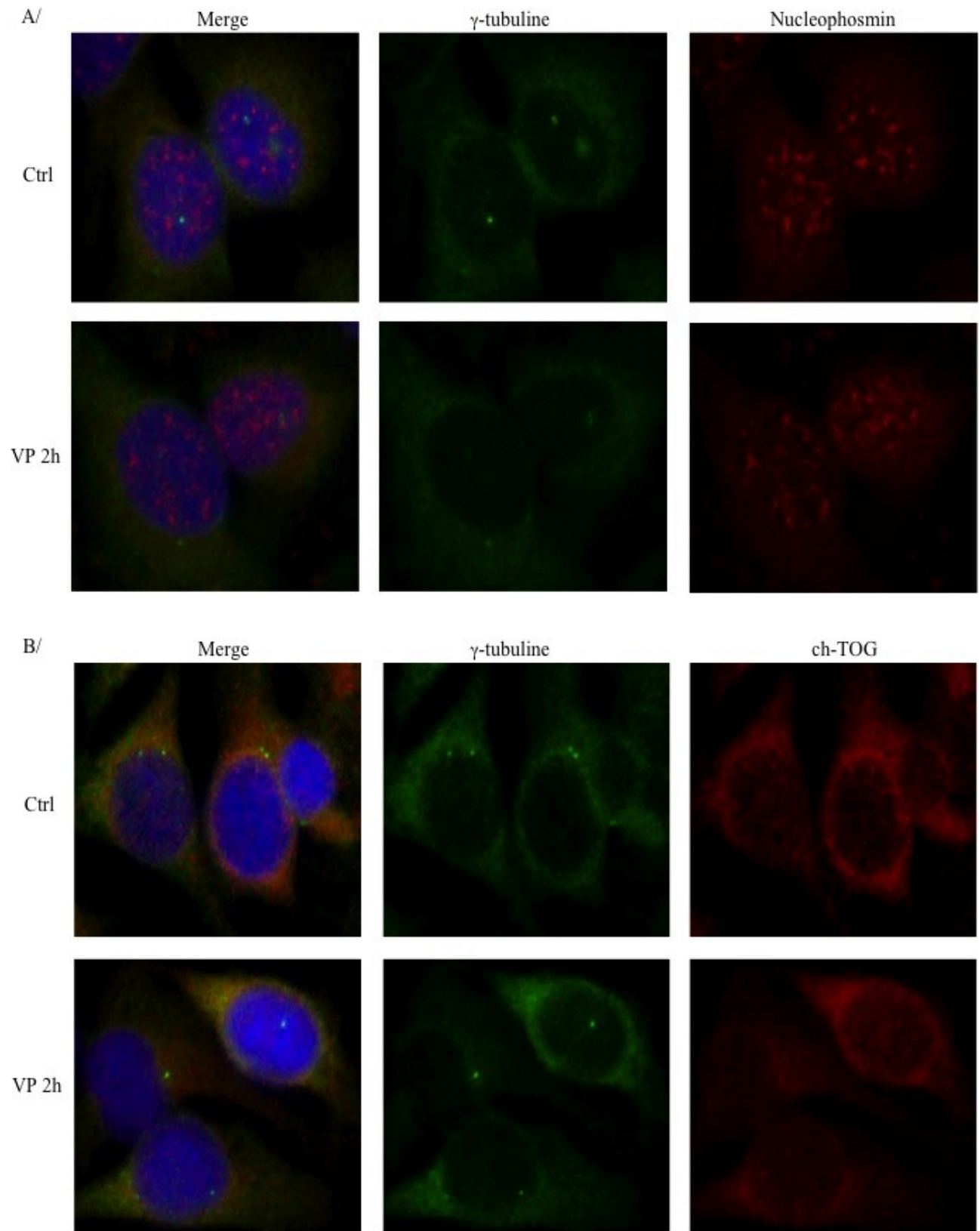
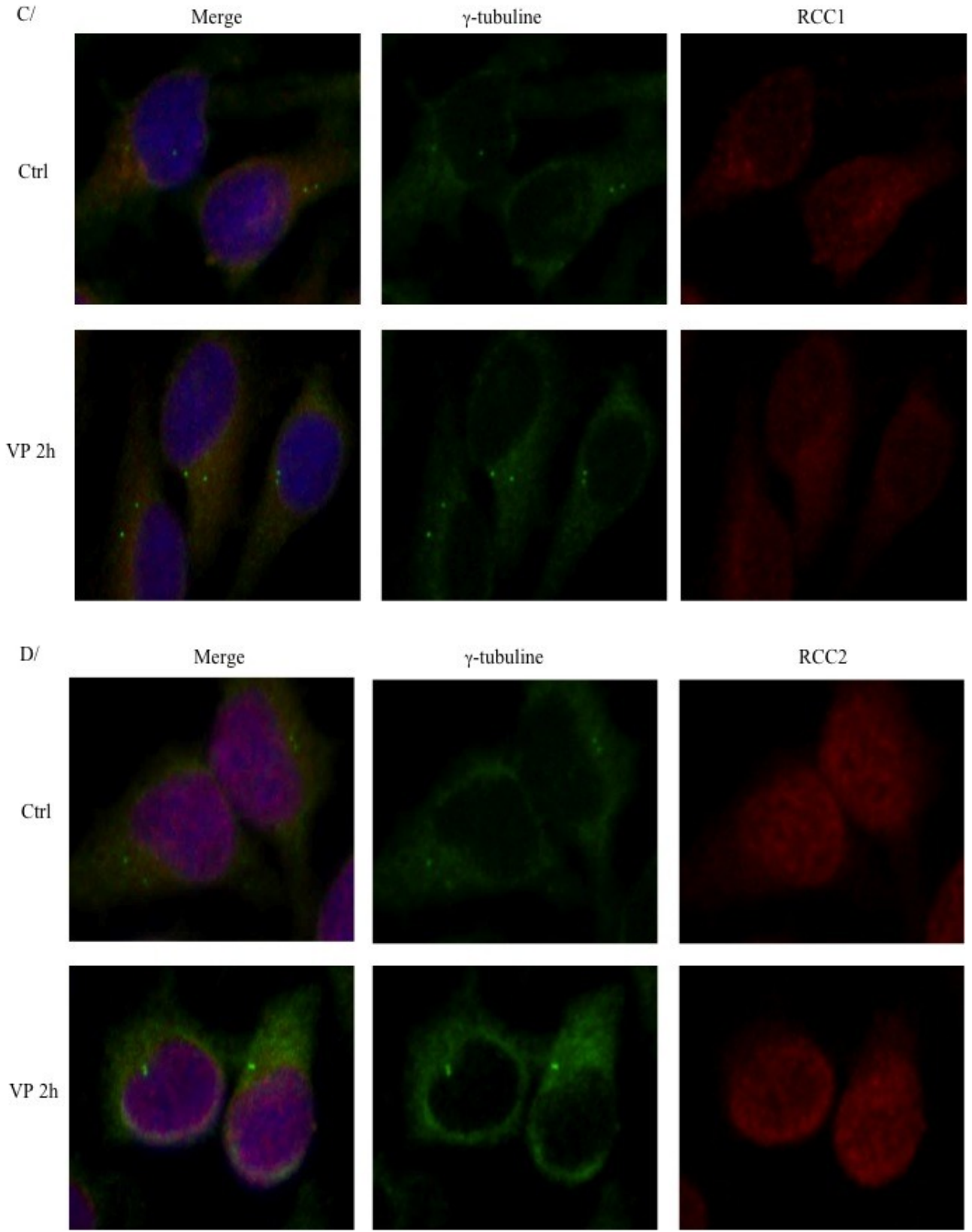


Figure 12





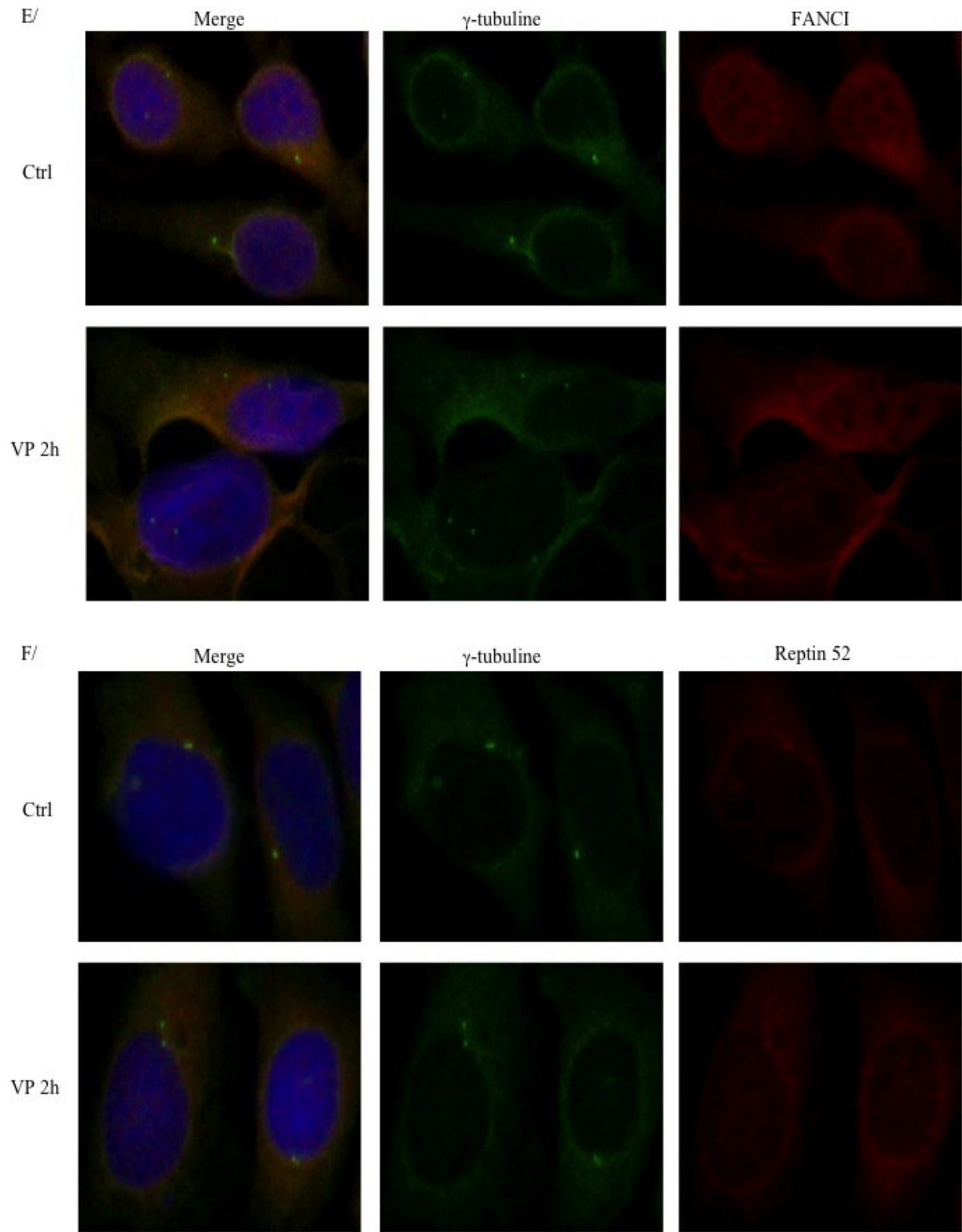


Figure 13

Annexes

Marine Barbelanne
Étudiante Ph.D.
Programme Biologie moléculaire
Examen écrit

**DNA Polymerases as Potential Therapeutic Targets for
Cancers Deficient in the DNA Mismatch Repair
Proteins MSH2 or MLH1**

**Sarah A. Martin, Nuala McCabe, Michelle Mullarkey, Robert Cummins, Darren J.
Burgess, Yusaku Nakabeppu, Sugako Oka, Elaine Kay, Christopher J. Lord,
Alan Ashworth**

Cancer Cell. 2010 March 16; 17(3-3): 235–248

Introduction. Un des thèmes récurrents de la recherche actuelle sur les drogues anti cancer est la conception d'approches thérapeutiques qui exploitent la spécificité génétique des cellules tumorales. Depuis quelques années, la notion de « Synthetic Sickness/Lethality » (SSL) est étudiée dans ce but (Hartwell et al., 1997). Deux gènes A et B sont dit SSL si la mutation de l'un ou l'autre gène seul est compatible avec la viabilité cellulaire mais la mutation simultanée des deux gènes cause la mort des cellules (Kaelin, 2005). Le concept de SSL a été suggéré pour choisir des nouvelles cibles thérapeutiques en 1997 par Hartwell *et al.*. Par exemple, si un gène suppresseur de tumeur et un deuxième gène sont SSL, l'inhibition du deuxième gène pourrait sélectivement tuer les cellules tumorales. Plus précisément, Hartwell et al. a souligné le potentiel des interactions SSL entre les protéines du « mismatch repair » (MMR) et les polymérase de l'ADN, une hypothèse basée principalement sur des études dans la levure (Morrison et al., 1993).

La voie du MMR est une voie de réparation de l'ADN fortement conservée qui reconnaît et répare les erreurs d'appariement de base qui surgissent pendant la réplication ou la recombinaison de l'ADN (Martin et al., 2010). Le rôle de cette voie a été en grande partie étudié en réponse aux dommages à l'ADN induits par les agents chimiothérapeutiques (Brown et al., 2003) et il a été reporté que les protéines du MMR jouent un rôle clé dans la mort cellulaire en réponse à différentes drogues endommageant l'ADN (O'Brien et al., 2006). La reconnaissance des disparités est médiée par deux hétérodimères MutS ; MutS α (composé de MSH2 et MSH6) ou MutS β (composé de MSH2 et MSH3). MutL (un hétérodimère de MLH1 et PMS2 ou PMS1) est par la suite recruté par MSH2 pour former un complexe ternaire avec un des complexes MutS et promouvoir la signalisation intracellulaire pour amorcer l'excision et la réparation de la disparité (Iyer et al., 2006 ; Martin et al., 2010). Les protéines du MMR sont également impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN causés par des stress oxydatifs (Macpherson et al., 2005), notamment chez *S. cerevisiae* (Ni et al., 1999). Guanine 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) est une des lésions oxydatives majeures de l'ADN (Kasai et al., 1984) et est fortement mutagénique car elle peut s'appareiller avec l'adénine aussi bien que la cytosine (Maki et al., 2002). Les cellules de mammifères possèdent plusieurs mécanismes pour gérer ces lésions oxydatives dont ceux impliquant la glycosylase OGG1 (Klungland et Bjelland, 2007) ou la glycosylase MUTYH (Oka et al., 2008). MUTYH reconnaît la paire de base 8-oxoG:A et enlève l'adénine tandis que OGG1 enlève l'8-oxoguanine pour reconstituer la séquence d'ADN originale (Paz-Elizur et al., 2008).

« **Synthetic Sickness/Lethality** » et « **mismatch repair** » (Fig 1). Afin d'étudier les interactions SSL dans les cellules humaines, Martin et *al.* se sont servis de modèles isogéniques de déficience pour MLH1 ou MSH2. Tout au long de cet article, ils ont utilisé la lignée cellulaire d'adénocarcinome colique humain HCTT116 caractérisée par une mutation homozygote du gène *MLH1* et une lignée dérivée, HCT116+Chr3, ayant un chromosome 3 humain supplémentaire qui exprime un allèle fonctionnel de *MLH1*. Pour MSH2, ils ont utilisé la lignée cellulaire endométriale HEC59 caractérisée par des mutations non-sens hétérozygotes et une lignée dérivée, HEC59+Chr2, ayant un chromosome 2 humain supplémentaire qui exprime un allèle fonctionnel de *MSH2*. En utilisant deux approches différentes, ARN interférence et essai clonogénique, ils ont établi une relation SSL entre MLH1 et POLG et entre MSH2 et POLB. Ces deux techniques permettent entre autre d'étudier la survie cellulaire, comme dans cet article, et le fait d'obtenir les mêmes résultats en utilisant deux méthodes différentes renforce la conclusion des auteurs. Enfin, en utilisant différentes autres lignées cellulaires tumorales et non tumorales et des inhibiteurs chimiques des polymérase, ils ont pu généraliser cette notion de SSL entre MLH1 et POLG et entre MSH2 et POLB.

Importance du niveau d'expression des polymérase (Fig 2). Afin de mieux comprendre la relation SSL entre MLH1 et POLG et entre MSH2 et POLB, Martin et *al.* ont étudié le niveau d'expression des ARN messagers (ARNm) de *POLB* et *POLG* dans leurs différentes lignées cellulaires. Ils ont mis en évidence une augmentation significative du niveau d'expression de l'ARNm de *POLB* pour les cellules déficientes en MSH2 et de l'ARNm de *POLG* pour les cellules déficientes en MLH1. Une augmentation du niveau d'expression des protéines correspondantes a également été observée par western blot.

De façon intéressante, le niveau d'expression des ARNm de *POLB* et *POLG* n'était pas augmenté dans les cellules respectivement déficientes en MLH1 et MSH2 mais le niveau d'expression de Msh2 augmentait dans les cellules *Polb*^{-/-}. Par contre, il est à noter qu'aucune étude sur le niveau d'expression de Mlh1 n'a été faite ce qui aurait pourtant été intéressant. Finalement, une expérience d'immunohistochimie a permis de corréler ces variations d'expression de POLB et POLG avec une déficience respectivement de MSH2 et MLH1 dans différentes tumeurs humaines.

« **Synthetic Sickness/Lethality** » et lésions 8-oxoG (Fig 3). Les résultats précédents ont permis aux auteurs de se demander si leurs observations pouvaient être expliquées par un échec de réparation de lésions de

l'ADN. Ils se sont intéressés aux lésions oxydatives 8-oxoG et leur lien avec les effets SSL MSH2/POLB et MLH1/POLG. La lésion 8-oxoG est une des lésions de l'ADN la plus commune résultant des espèces réactives de l'oxygène et joue un rôle significatif dans la mutagenèse à cause de sa capacité à s'associer avec l'adénine aussi bien que la cytosine. En utilisant un test ELISA, ils ont démontré qu'il y avait une augmentation significative des lésions 8-oxoG dans les cellules déficientes pour MLH1 ou MSH2 quand les polymérases α et β sont respectivement inhibées par ARN interférence. Par ailleurs, comme contrôle négatif, ils ont inhibé plusieurs autres polymérases dans leurs lignées cellulaires déficientes pour MLH1 ou MSH2 et ont montré qu'il n'y avait pas d'augmentation des lésions 8-oxoG. Ces résultats suggèrent que les effets observés sont bien spécifiques à POLB ou POLG.

Les auteurs ont par la suite voulu approfondir leurs observations en étudiant la formation au cours du temps des lésions 8-oxoG. Ils ont alors découvert qu'après inhibition des polymérases, les lésions 8-oxoG apparaissaient à la fois dans les cellules compétentes et déficientes pour MLH1 ou MSH2 mais que seules les cellules compétentes pouvaient réparer ces lésions. Dans les cellules déficientes, il y a persistance des lésions oxydatives et les auteurs ont suggéré que cette accumulation pourrait aboutir à la mort des cellules. Pour valider cette hypothèse, il aurait été intéressant d'effectuer un test de viabilité cellulaire (test au MTT) avec leur différentes lignées cellulaires, avant et après inhibition des polymérases. De plus, si les cellules ne réparent pas les dommages et que ceux-ci s'accumulent, ça augmente le risque de cancer.

En se basant sur le fait que POLG est mitochondriale et que POLB est principalement nucléaire (Loeb et Monnat, 2008), les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle la différence entre les SSL MLH1/POLG et MSH2/POLB est due à une accumulation des lésions 8-oxoG soit dans la mitochondrie soit dans le noyau. Après inhibition des polymérases et fractionnement cellulaire, ils ont mesuré par ELISA le taux des lésions 8-oxoG dans le compartiment nucléaire ou mitochondrial de leurs différentes lignées cellulaires. Tout d'abord, ils ont observé une accumulation des lésions 8-oxoG dans les cellules déficientes pour MSH2 seulement après l'inhibition de POLB et seulement dans la fraction nucléaire. Ils ont par la suite constaté une accumulation des lésions 8-oxoG dans les cellules déficientes pour MLH1 seulement après l'inhibition de POLG et seulement dans la fraction mitochondriale. De façon intéressante, ces résultats ont été validés dans des modèles cellulaires additionnels ce qui constitue un bon contrôle pour leur expérience. Toutefois, afin de confirmer leurs résultats il aurait été souhaitable de faire une expérience d'immunofluorescence indirecte avec un anticorps anti-8-oxoG.

La réparation des lésions 8-oxoG peut s'effectuer via la voie du « base excision repair » (BER) avec l'excision de la base oxydée par la glycosylase OGG1. Les auteurs ont précédemment montré que l'inhibition de OGG1 entraîne une augmentation des lésions 8-oxoG dans les cellules déficientes pour MLH1 et MSH2. Ils se sont donc intéressés à la dichotomie noyau-mitochondrie dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) exprimant soit une forme nucléaire, soit une forme mitochondriale, soit pas de OGG1 du tout. Par des expériences de « rescue », ils ont montré que l'interaction SSL entre MSH2 et OGG1 était médiée par la perte de l'activité nucléaire de OGG1 et que l'interaction SSL entre MLH1 et OGG1 était médiée par la perte de l'activité mitochondriale de OGG1.

Rôle de la glycosylase MUTYH (Fig 4 et 5). Oka *et al.* ont montré que la mort cellulaire induite par l'accumulation des lésions 8-oxoG nécessite l'activité de la glycosylase MUTYH. Les auteurs ont donc voulu vérifier si les SSL MLH1/POLG et MSH2/POLB étaient dépendants de l'activité de MUTYH. En effet, l'inhibition par ARN interférence de *MUTYH* permet le « rescue » des SSL MLH1/POLG et MSH2/POLB. Ils ont alors suggéré que la mort cellulaire due à ces SSL était causée par la formation de cassures double brin (DSB). Pour contrôler la formation de DSB, ils ont regardé par immunofluorescence indirecte la formation de foyers γ -H2AX nucléaires (Bonner *et al.*, 2008). L'inhibition de POLB a provoqué une augmentation du nombre de foyers γ -H2AX dans les cellules déficientes en MSH2 mais malheureusement l'expérience n'a pas été réalisée dans les cellules déficientes en MLH1 après inhibition de POLG. Pour ces cellules, ils ont regardés l'intégrité de l'ADN mitochondrial via la variation d'expression du gène *CoxI*, gène connu pour être localisé dans l'ADN mitochondrial (Oka *et al.*, 2008). Ils ont montré qu'une inhibition de POLG entraînait une diminution significative de *CoxI*, suggérant une perturbation de l'ADN mitochondrial qui pourrait contribuer à la relation SSL entre MLH1 et POLG. Il aurait aussi été intéressant de voir si l'inhibition de POLB dans les cellules déficientes en MSH2 perturbait ou non l'intégrité génomique des mitochondries. Toutefois, il est important de noter que même si les cellules sont sauvées par la mutation de MUTYH, les lésions oxydatives restent non réparées entraînant des hauts taux de mutations ce qui n'est pas aidant d'un point de vue thérapeutique.

Rôle de la glycosylase OGG1 (Fig 6). Dans la dernière partie de l'article, les auteurs ont émis l'hypothèse selon la quelle une diminution de l'expression de POLB pouvait moduler l'expression de OGG1 et ainsi causer une augmentation des lésions 8-oxoG dans les noyaux des cellules déficientes en MSH2. Ils ont

montré par western blot et autoradiographie qu'il y avait une diminution du niveau d'expression de OGG1 après l'inhibition de POLB, changement qui est spécifique à OGG1 car le niveau d'expression d'autres protéines du BER ne varie pas. Ils ont par la suite mis en évidence que cette diminution du niveau d'expression de OGG1 était causée par ubiquitination et dégradation au protéasome en cas d'inhibition de POLB. Il est cependant regrettable que les auteurs n'aient pas fait une analyse similaire pour MLH1 et POLG étant donné que tout au long du papier ils ont étudié la relation SSL entre ces deux protéines.

Conclusion (Fig 7). Martin *et al.* ont montrés dans cet article que les relations SSL impliquant les protéines du « mismatch repair » MSH2 et MLH1 et les polymérases de l'ADN existaient dans les tumeurs humaines et que cette notion de SSL pourrait donc être exploitée pour mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques ciblées pour les cancers ayant des déficiences dans les protéines du MMR. Ils ont proposé un modèle dans lequel une déficience en MSH2 ou MLH1 couplée avec l'inhibition respective de POLB ou POLG entraînait une accumulation de lésions oxydatives. Cette accumulation causerait la formation de dommages létaux ou gênerait le fonctionnement normal de la cellule, aboutissant à une mort cellulaire inévitable.

Projet de recherche

Le concept de “synthetic sickness/lethality” (SSL) est important pour la recherche actuelle sur les drogues anti cancer car il exploite la spécificité génétique des cellules tumorales. Dans leur article, Martin *et al.* ont mis en évidence une relation SSL entre deux polymérases de l'ADN (POLB et POLG) et deux protéines impliquées dans la réparation des « mismatch » de l'ADN (MSH2 et MLH1). Cependant, bien que ces polymérases soient des cibles intéressantes pour de nouvelles approches thérapeutiques, le développement d'inhibiteurs efficaces et sélectifs contre ces polymérases n'en est qu'à un stade précoce (Martin *et al.*, 2010). Il est donc légitime de se demander si d'autres protéines de la même voie de signalisation ne pourraient pas avoir de relation SSL avec MSH2 ou MLH1 et si elles ne seraient pas plus susceptibles à l'inhibition pharmacologique, pourvu qu'il existe déjà des inhibiteurs efficaces et sélectifs. APE1 est une enzyme essentielle du mécanisme de réparation « excision base repair » (BER). Elle est responsable de la réparation

des dommages oxydatifs de l'ADN et protège ainsi les cellules contre les effets toxiques des agents chimiothérapeutiques (Fleck and Nielsen, 2004). Un échec de la réparation peut amener à l'apparition de cassures doubles brins, de cytotoxicité accrue et d'apoptose (Zhang et al., 2009). De plus, la surexpression de APE1 a été liée à la chimiorésistance dans différentes tumeurs humaines (Robson et al., 1992 ; Chen et al., 1991). Parmi tous les inhibiteurs existants de APE1, deux ont été montrés comme efficaces et sélectifs : le lucanthone (Luo et Kelley, 2004) et AR03 (Bapat et al., 2010). Le lucanthone est un inhibiteur spécifique de APE1 connu pour générer des sites AP (Luo et Kelley, 2004) et est largement utilisé en traitement additionnel lors des radiothérapies anti cancer (Del Rowe et al., 1999). AR03 inhibe l'activité endonucléase de APE1 *in vitro* et empêche le clivage des sites AP *in vivo* (Bapat et al., 2010). On peut donc se demander si APE1 serait une cible thérapeutique potentielle utilisable dans les traitements contre les cancers qui sont déficients dans le « mismatch repair ».

« Synthetic Sickness/Lethality » entre MSH2/MLH1 et APE1.

La première étape essentielle de ce projet sera de montrer l'effet SSL de l'inhibition de APE1 dans les cellules déficientes pour MSH2 ou MLH1. Pour cela, comme utilisé dans l'article de Martin et *al.*, nous utiliserons les cellules HCTT116 déficiente pour MLH1 et une lignée dérivée, HCT116+Chr3, ayant un allèle fonctionnel de *MLH1*. Pour MSH2, nous utiliserons les cellules HEC59 caractérisées par des mutations non-sens hétérozygotes et une lignée dérivée, HEC59+Chr2, ayant un allèle fonctionnel de *MSH2*. Par une approche d'ARN interférents et d'essais clonogéniques pour étudier la survie cellulaire, nous montrerons qu'une inhibition de APE1 dans les cellules déficientes pour MSH2 ou MLH1 aboutit à une mortalité plus élevée que pour les cellules compétentes. Pour contrôles, nous utiliserons également d'autres lignées isogéniques (HeLa ou MCF7) et des lignées non tumorales (MCF10A ou MEF). Étant donné que d'autres protéines de la même voie de signalisation que APE1 ont une relation SSL avec MSH2 et MLH1 (Martin et al., 2010), il est normal de penser que se soit le cas pour APE1 également. Une fois cette relation SSL entre APE1 et MSH2 ou MLH1 établie, nous pourrions nous concentrer sur l'étude des inhibiteurs de APE1 : lucanthone et AR03.

Inhibiteurs de APE1 et survie cellulaire *in vitro*.

Pour examiner les effets de l'inhibition de APE1 sur la viabilité des cellules déficientes en MSH2, nous exposerons nos lignées cellulaires HEC59 (MSH2^{-/-}) et HEC59+Chr2 (MSH2^{+/+}) à différentes

concentrations de lucanthone ou AR03. La croissance cellulaire sera mesurée par incorporation de thymidine-H3 et par compte cellulaire après coloration au bleu trypan (Neshat et al., 2001). Nous comparerons les résultats obtenus pour les cellules déficientes en MSH2 à celles compétentes après traitement avec les deux inhibiteurs de APE1. En cas de différence dans la croissance cellulaire, cette comparaison nous permettra de voir s'il y a une sensibilité exacerbée des cellules déficientes en MSH2 aux inhibiteurs de APE1, lucanthone et AR03. De manière alternative, un test colorimétrique utilisant le MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Samarghandian et al., 2010) pourra être utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire. De la même façon, nous exposerons nos lignées cellulaires MLH1+/+ et MLH1-/- à différentes concentrations de lucanthone ou AR03 pour mesurer la survie cellulaire et déterminer s'il y a une sensibilité exacerbée des cellules déficientes en MLH1 aux inhibiteurs de APE1. Théoriquement, nous devrions observer une inhibition de la croissance cellulaire pour les cellules déficientes en MSH2 ou MLH1 après ajout des inhibiteurs de APE1. Cela montrerait que ces cellules sont plus affectées par le traitement que les cellules compétentes. Dans le cas contraire, l'existence de protéines redondantes pour APE1 pourrait expliquer l'absence de différence entre les lignées cellulaires déficientes et compétentes.

Inhibiteurs de APE1 et survie cellulaire *in vivo*.

Pour évaluer le rôle de l'inhibition de APE1 dans la croissance de tumeurs déficientes pour MSH2, nous examinerons les effets du lucanthone et de AR03 sur la croissance de tumeurs isogéniques MSH2+/+ ou MSH2-/- obtenues par injection sous cutanée de cellules HEC59 (MSH2-/-) et HEC59+Chr2 (MSH2+/+) dans des souris immunodéficientes. Quand les tumeurs auront atteint une taille de 200 mm³ (Neshat et al., 2001), les souris seront traitées aléatoirement avec le lucanthone, AR03 ou un contrôle pendant cinq jours consécutifs par injection intra péritonéale. La taille des tumeurs sera mesurée tous les jours durant le traitement puis pendant quinze jours après l'arrêt du traitement et nous comparerons les courbes de croissance de chaque fond génétique avant et après les différents traitements. Cette comparaison devrait nous permettre d'établir un lien entre l'inhibition de la croissance des tumeurs MSH2-/- et l'inhibition de APE1.

De la même manière, les souris immunodéficientes seront injectées avec des cellules HCT116+Chr3 (MLH1+/+) et HCT116 (MLH1-/-) et seront traitées avec les inhibiteurs ou le contrôle lorsque les tumeurs auront atteint la taille voulue. La croissance tumorale sera suivie pendant et après le traitement et la comparaison des courbes de croissance nous permettra d'établir si les tumeurs MLH1-/- sont dépendantes de APE1 pour croître. De manière théorique, nous devrions observer un blocage de la croissance des tumeurs

déficientes en MSH2 ou MLH1 après ajout des inhibiteurs de APE1 contrairement aux tumeurs non déficientes. Enfin, une étude à plus long terme serait nécessaire pour voir s'il y a apparition d'effets secondaires à causes de l'utilisation des inhibiteurs de APE1 avant de penser à une utilisation chez les humains.

Inhibition de APE1 et apoptose.

Pour déterminer les effets des traitements avec le lucanthone et AR03 sur la croissance et l'apoptose, nous étudierons la prolifération et l'apoptose dans les tumeurs MSH2+/+, MSH2-/-, MLH1+/+ et MLH1-/- . Pour cela, nous examinerons des coupes histologiques de tumeurs obtenues après les cinq jours de traitement avec les inhibiteurs de APE1 ou le contrôle. Les coupes histologiques seront fixées puis marquées avec un anticorps anti Ki67 (marqueur de prolifération) ou avec la méthode TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling, marqueur d'apoptose) (Craft et al., 1999). Au total, dix coupes seront comptées pour chaque fond génétique et chaque traitement pour comparaison. De plus, une analyse statistique (test de Student) nous permettra de déterminer si les différences observées seront significatives ou non. De manière alternative, un marquage avec un anticorps contre la forme active de la caspase 3 pourra être utilisé comme marqueur de l'apoptose (Bressenot et al., 2008). Un troisième paramètre important à considérer pour la variation de la taille des tumeurs est la taille des cellules qui composent ces tumeurs (Neshat et al., 2001). Pour déterminer si l'inhibition de APE1 affecte la taille des cellules tumorales, nous ferons une analyse morphométrique de 10 coupes histologiques marquées par hématoxyline et éosine. Comme pour les deux autres paramètres, nous ferons une analyse statistique (test de Student) pour de déterminer si les différences observées seront significatives ou non. Ces résultats permettront de caractériser le rôle de APE1 sur la croissance cellulaire, la taille des cellules et l'apoptose, trois paramètres importants pour évaluer l'activité anti tumorale d'inhibiteurs. Sachant qu'un échec de la réparation des dommages à l'ADN induit l'apoptose (Zhang et al., 2009), nous devrions théoriquement observer une inhibition de la croissance cellulaire et une augmentation du nombre de corps apoptotiques sur les coupes des tumeurs déficientes en MSH2 ou MLH1 après traitement avec les inhibiteurs de APE1.

Nos études *in vitro* et *in vivo* sur des cellules tumorales humaines pourront permettre de démontrer que les cellules déficientes en MSH2 ou MLH1 sont plus sensibles à l'inhibition de la croissance cellulaire médiée par le blocage pharmacologique de AP1 que les cellules compétentes pour ces deux même protéines. C'est à dire que cette déficience prédispose les cellules tumorales à une plus forte réponse à l'inhibition biochimique

de APE1 et permet un taux plus élevé de mort cellulaire. C'est pourquoi APE1 serait une cible thérapeutique potentiellement utilisable dans les traitements anti cancer en cas de déficience pour MSH2 ou MLH1 préalablement établie.

Références

Bapat A, Glass LS, Luo M, Fishel ML, Long EC, Georgiadis MM, Kelley MR. Novel smallmolecule inhibitor of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 blocks proliferation and reduces viability of glioblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Sep 1;334(3):988-98. 2010 May 26.

Bapat Aditi, LaTeca S. Glass, Meihua Luo, Melissa L. Fishel, Eric C. Long, Millie M. Georgiadis and Mark R. Kelley. Novel small molecule inhibitor of Ape1 endonuclease blocks proliferation and reduces viability of glioblastoma cells May 26, 2010 10.1124/jpet.110.169128

Boiteux S, Gellon L, Guibourt N. Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2002 Jun 15;32(12):1244-53.

Bonner W.M., Redon C.E., Dickey J.S., Nakamura A.J., Sedelnikova O.A., Solier S., Pommier Y. γ H2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2008;8:957–96.

Bressenot A., S. Marchal, L. Bezdetsnaya, J. Garrier, F. Guillemin and F. Plénat. Assessment of Apoptosis by Immunohistochemistry to Active Caspase-3, Active Caspase-7, or Cleaved PARP in Monolayer Cells, Spheroid, and Subcutaneous Xenografts of Human Carcinoma. November 24, 2008. doi:10.1369/jhc.2008.952044 *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.

Brown K.D., A. Rathi and R. Kamath et al., The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation, *Nat Genet* 33 (2003), pp. 80–84.

Chen DS, Herman T, Demple B (1991) Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'- blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA. *Nucleic Acids Research* 19: 5907–5914.

Craft Noah, Chloe Chhor, Chris Tran, Arie Beldegrun, Jean DeKernion, Owen N. Witte, Jonathan Said, Robert E. Reiter, and Charles L. Sawyers. Evidence for Clonal Outgrowth of Androgen-independent Prostate Cancer Cells from Androgen-dependent Tumors through a Two-Step Process. *CANCER RESEARCH* 59, 5030–5036, October 1, 1999.

Del Rowe JD, Bello J, Mitnick R, Sood B, Filippi C, Moran J, Freeman K, Mendez F, Bases R. Accelerated regression of brain metastases in patients receiving whole brain radiation and the topoisomerase II inhibitor, lucanthone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Jan 1;43(1):89-93.

Fishel ML, Kelley MR. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Mol Aspects Med.* 2007 Jun-Aug;28(3-4):375-95. Epub 2007 May 3.

Fleck O, Nielsen O. DNA repair. *J Cell Sci.* 2004 Feb 1;117(Pt 4):515-7.

Georgiadis and Mark R. Kelley. Novel small molecule inhibitor of Ape1 endonuclease blocks proliferation and reduces viability of glioblastoma cells May 26, 2010 10.1124/jpet.110.169128.

Hartwell L.H., Szankasi P., Roberts C.J., Murray A.W., Friend S.H. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science.* 1997;278:1064–1068.

Iyer R.R., A. Pluciennik, V. Burdett and P.L. Modrich, DNA mismatch repair: functions and mechanisms, *Chem Rev* 106 (2006), pp. 302–323.

Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006;7:335–346.

Kaelin W.G. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2005;5:689–698.

Kasai H, Tanooka H, Nishimura S. Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by Xirradiation. *Gann.* 1984 Dec;75(12):1037-9.

Klungland A, Bjelland S. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Apr 1;6(4):481-8. Epub 2006 Nov 28.

Loeb L.A., Monnat R.J. DNA polymerases and human disease. *Nat. Rev. Genet.* 2008;9:594–604.

Luo Meihua, Kelley Mark R. Inhibition of the Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (Ape1) Repair Activity and Sensitization of Breast Cancer Cells to DNA Alkylating Agents with Lucanthone. *ANTICANCER RESEARCH* 24: 2127-2134 (2004)

Macpherson P., Barone F., Maga G., Mazzei F., Karran P., Bignami M. 8-oxoguanine incorporation into DNA repeats in vitro and mismatch recognition by MutS α . *Nucleic Acids Res.* 2005;33:5094–5105.

Maki H. Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu Rev Genet.* 2002;36:279-303. Epub 2002 Jun 11.

Martin SA, McCabe N, Mullarkey M, Cummins R, Burgess DJ, Nakabeppu Y, Oka S, Kay E, Lord CJ, Ashworth A. DNA polymerases as potential therapeutic targets for cancers deficient in the DNA mismatch repair proteins MSH2 or MLH1. *Cancer Cell.* 2010 Mar 16;17(3):235-48.

Martin LM, Marples B, Coffey M, Lawler M, Lynch TH, Hollywood D, Marignol L. DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treat Rev.* 2010 Nov;36(7):518-27. Epub 2010 Apr 21.

Morrison A., Johnson A.L., Johnston L.H., Sugino A. Pathway correcting DNA replication errors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1993;12:1467–1473.

Ni T.T., Marsischky G.T., Kolodner R.D. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S.cerevisiae*. *Mol. Cell.* 1999;4:439–444.

O'Brien V. and R. Brown, Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System, *Carcinogenesis* 27 (2006), pp. 682–692.

Oka S., Ohno M., Tsuchimoto D., Sakumi K., Furuichi M., Nakabeppu Y. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J.* 2008;27:421–432.

Paz-Elizur T, Sevilya Z, Leitner-Dagan Y, Elinger D, Roisman LC, Livneh Z. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett.* 2008 Jul 18;266(1):60-72. Epub 2008 Apr 18.

Robson CN, Hochhauser D, Craig R, Rack K, Buckle VJ, Hickson ID. Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localisation to chromosome 14q 11.2-12. *Nucleic Acids Res.* 1992 Sep 11;20(17):4417

Samarghandian S, Boskabady MH, Davoodi S. Use of in vitro assays to assess the potential antiproliferative and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) in human lung cancer cell line. *Pharmacogn Mag.* 2010 Oct;6(24):309-14.

Zhang T, Brazhnik P, Tyson JJ. Computational analysis of dynamical responses to the intrinsic pathway of programmed cell death. *Biophys J.* 2009 Jul 22;97(2):415-34.