

Table des Matières

I. INFORMATIONS PERSONNELLES	1
A. CURRICULUM VITAE	1
B. CURSUS UNIVERSITAIRE ET PROFESSIONNEL	1
C. BOURSES ET ALLOCATIONS DE RECHERCHE	2
D. ENSEIGNEMENT	2
E. ORGANISATION DE TABLE RONDE	2
F. ACTIVITE DE REVUE	2
G. PUBLICATIONS	3
1. ARTICLES ORIGINAUX	3
2. MEMOIRES	6
H. COMMUNICATIONS A DES CONFERENCES	7
I. INVITATIONS	8
II. BILAN DES ACTIVITES	10
A. TRAVAUX DE RECHERCHE DOCTORAUX	10
B. TRAVAUX DE RECHERCHE DU 1ER STAGE POST-DOCTORAL	12
1. ANALYSE GENETIQUE DE LA RECOMBINAISON STIMULEE EN L'ABSENCE DE <i>TOP3</i>	13
2. ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES CONDUISANT A UNE AUGMENTATION DE LA RECOMBINAISON DANS LES MUTANTS <i>TOP3Δ</i>	14
3. ISOLEMENT DE SUPPRESSEURS EXTRAGENIQUES DE LA MUTATION NULLE <i>TOP3Δ</i>	17
4. ISOLEMENT DE PEPTIDES INTERAGISSANT AVEC <i>TOP3</i>	18
C. TRAVAUX DE RECHERCHE DU SECOND STAGE POST-DOCTORAL	20
1. L'INSTABILITE CHROMOSOMIQUE NE PEUT A ELLE SEULE EXPLIQUER LE DEFAUT DE SPORULATION	20
2. UN DEFAUT D'ACTIVATION TRANSCRIPTIONNELLE DES GENES INDUCTEURS DE LA MEIOSE NE SONT PAS RESPONSABLES DE L'ABSENCE DE SPORULATION	21
3. L'ABSENCE DE <i>TOP3</i> EMPECHE LES CELLULES DE FRANCHIR LA PREMIERE DIVISION MEIOTIQUE	21
4. LES MUTANTS <i>TOP3</i> ENTRENT EN MEIOSE	22
5. LA RECOMBINAISON EST RESPONSABLE DU DEFAUT MEIOTIQUE	24
6. LA SUREXPRESSION DE <i>TOP4</i> PERMET LA SPORULATION DES MUTANTS <i>TOP3</i>	25
7. L'ABSENCE DE <i>SGS1</i> NE SUPPRIME PAS EFFICACEMENT L'ABSENCE DE <i>TOP3</i>	26
D. TRAVAUX RECENTS	27
1. INTRODUCTION GENERALE	27
2. ROLE DE <i>SGS1</i> DANS LA REPARATION DE L'ADN PAR RECOMBINAISON	32
3. ETUDE DE L'INTERACTION DES HELICASES <i>SGS1</i> ET <i>SRS2</i>	33
4. INTERPRETATIONS	36
III. TRAVAUX ACTUELS ET PERSPECTIVES	38
A. IDENTIFICATION DE GENES IMPLIQUES DANS LA PHASE TARDIVE DE LA RECOMBINAISON	39
B. TOUS LES GENES DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE SUPPRIMENT LES COMBINAISONS LETALES	41
C. LES CDBS NE SONT PAS DES LESIONS SPONTANEEES FREQUENTES	43
D. CONCLUSIONS DE CE TRAVAIL	46
E. PERSPECTIVES	47
1. ETUDE DU CONTROLE DES CO AVEC UN SUBSTRAT CHROMOSOMIQUE	48
2. ETUDE DU CONTROLE DES CO AVEC UN SUBSTRAT PLASMIDIQUE	49

3. CONCLUSIONS

50

IV. CITATIONS

52

I. INFORMATIONS PERSONNELLES

A. *Curriculum Vitae*

Nom: Serge GANGLOFF
Date de Naissance: 12 Août 1960
Lieu de Naissance: Strasbourg, France
Nationalité: Française
Situation de Famille: Marié
Adresse professionnelle: CEA de Fontenay-aux-Roses
UMR217 CNRS - CEA/DSV/DRR/SRMC/LERA
Bâtiment 05 - Pièce A103
60-68 avenue du Général Leclerc
92265 Fontenay-aux-Roses
Téléphone: 01 46 54 93 43
Fax: 01 46 54 95 98
email: serge.gangloff@cea.fr
Adresse personnelle: 2 rue de Mirbel
75005 Paris
Fonction Actuelle: Chargé de Recherche de 1ère classe au CNRS
Thème de recherche: Etude du contrôle génétique de la réparation de l'ADN
Titre Universitaire: Doctorat de l'Université Aix - Marseille II
Spécialité: Biologie Cellulaire et Microbiologie
Soutenu le: 20 Janvier 1990
Faculté des Sciences de Marseille - Luminy
Titre: "Isolement et caractérisation du gène nucléaire codant pour l'aconitase mitochondriale de *Saccharomyces cerevisiae*: Etudes préliminaires sur la régulation de son expression"

B. *Cursus universitaire et professionnel*

10/1998 – Présent: Chargé de Recherche de 1ère classe au CNRS
05/1998 – 09/1998: Stage post-doctoral dans le laboratoire de Francis Fabre.
CEA de Fontenay-aux-Roses
09/1996 – 04/1998: Stage post-doctoral dans le laboratoire de Francis Fabre.
Institut Curie - Paris
02/1990 – 07/1996: Stage post-doctoral dans le laboratoire de Rodney
Rothstein
Columbia University, New York
07/1986 – 01/1990: Doctorat de l'Université Aix - Marseille II
Directeur de thèse: Pr. Guy Lauquin
Laboratoire de Physiologie Cellulaire
Case 901, 13288 Marseille Cedex 9
07/1986: DEA de Biologie Cellulaire et Microbiologie
Université Aix - Marseille II
06/1985: Maîtrise de Biochimie
- C3 de Biochimie

	- C4 de Génétique C. E. S. U. d'Immunologie Université Aix - Marseille II
06/1984:	Licence de Biochimie Université Aix - Marseille II
06/1983:	DEUG B Université Aix - Marseille II
1980 - 1981:	Service Militaire

C. Bourses et allocations de recherche

10/1986 – 11/1989:	Ministère de la Recherche et de la Technologie
07/1994 – 06/1995:	Fondation Philippe
08/1996 – 01/1997:	Fondation pour la Recherche Médicale
02/1997 – 01/1998:	Association pour la Recherche sur le Cancer
07/1998 – 09/1998:	Ligue Nationale contre le Cancer

D. Enseignement

- Enseignement dirigé et travaux pratiques de l'Unité de Biomembranes pour les étudiants de Maîtrise de l'Université d'Aix - Marseille II (1987, 1988 et 1989)
- Enseignement du Génie Génétique, dans le cadre des programmes de formation du Centre de Transfert des Biotechnologies, à des chercheurs du secteur public et privé. Cours Magistraux et Travaux Pratiques, 1987, 1988 et 1989)
- Enseignement de la partie "Réparation des cassures double brin" du module III "Mécanismes de contrôle de la stabilité génétique" de la Maîtrise de Différentiation et Oncogenèse de l'Université Paris VI (Décembre 1999)
- Enseignement de la partie "Réparation des cassures double brin" du module III "Mécanismes de contrôle de la stabilité génétique" de la Maîtrise de Différentiation et Oncogenèse de l'Université Paris VI (Décembre 2000)
- Enseignement du module "Mécanismes de réparation des lésions de l'ADN" du DEA de Cancérologie : Biologie cellulaire et thérapeutiques des cancers (Décembre 2001)
- Enseignement de la partie "Réparation des cassures double brin" du module III "Mécanismes de contrôle de la stabilité génétique" de la Maîtrise de Différentiation et Oncogenèse de l'Université Paris VI (Février 2002)

E. Organisation de table ronde

- Organisation d'un groupe de travail sur la technique du "double-hybride" Department of Genetics & Development, Columbia University (1994)

F. Activité de revue

- Examineur pour les journaux: EMBO Journal, EMBO Reports, Cell, Molecular Cell, Molecular & Cellular Biology, Nucleic Acids Research, Journal of Cell Science

G. Publications

1. Articles originaux

- **Gangloff, S. P., Marguet, D., and Lauquin, G. J. (1990). Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (*ACO1*) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Molecular and Cellular Biology* 10, 3551-3561**

*We have isolated genomic clones complementing the aconitase-deficient strain (*glu1-1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the aconitase gene was established by enzymatic assays and molecular analyses. The corresponding mRNA has been characterized, and its direction of transcription has been determined. The complete nucleotide sequence revealed strong amino acid homologies with the sequences of some peptides isolated from the mammalian protein. Disruption of the gene by deletion-insertion led to glutamate auxotrophy. Expression of the aconitase gene was sensitive to glucose repression and was synergistically down regulated by glucose and glutamate.*

*Bendixen, C., Gangloff, S., and Rothstein, R. (1994). A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Research* 22, 1778-1779.*

- **Gangloff, S., Lieber, M. R., and Rothstein, R. (1994). Transcription, topoisomerases and recombination. *Experientia* 50, 261-269**

Transcription, DNA topoisomerases and genetic recombination are interrelated for several structural reasons. Transcription can affect DNA topology, resulting in effects on recombination. It can also affect the chromatin structure in which the DNA resides. Topoisomerases can affect DNA and/or chromatin structure influencing the recombination potential at a given site. Here we briefly review the extent to which homologous direct repeat recombination and site-specific recombination in eukaryotes are affected by transcription and topoisomerases. In some cases, transcription or the absence of topoisomerases have little or no effect on recombination. In others, they are important components in the recombinational process. The common denominator of any effects of transcription and topoisomerases on recombination are their shared role in altering DNA topology.

- **Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L., and Rothstein, R. (1994). The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Molecular and Cellular Biology* 14, 8391-8398.**

*We have previously shown that cells mutant for *TOP3*, a gene encoding a prokaryotic-like type I topoisomerase in *Saccharomyces cerevisiae*, display a pleiotropic phenotype including slow growth and genome instability. We identified a mutation, *sgs1* (slow growth suppressor), that suppresses both the growth defect and the increased genomic instability of *top3* mutants. Here we report the independent isolation of the *SGS1* gene in a screen for proteins that interact with Top3. DNA sequence analysis reveals that the putative Sgs1 protein is highly homologous to the helicase encoded by the *Escherichia coli**

recQ gene. These results imply that *Sgs1* creates a deleterious topological substrate that *Top3* preferentially resolves. The interaction of the *Sgs1* helicase homolog and the *Top3* topoisomerase is reminiscent of the recently described structure of reverse gyrase from *Sulfolobus acidocaldarius*, in which a type I DNA topoisomerase and a helicase-like domain are fused in a single polypeptide.

- Rothstein, R., and Gangloff, S. (1995). Hyper-recombination and Bloom's syndrome: microbes again provide clues about cancer. *Genome Research* 5, 421-426.
- Gangloff, S., Zou, H., and Rothstein, R. (1996). Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large tandem repeats in yeast. *EMBO Journal* 15, 1715-1725.

The genomic stability of the rDNA tandem array in yeast is tightly controlled to allow sequence homogenization and at the same time prevent deleterious rearrangements. In our study, we show that gene conversion, and not unequal sister chromatid exchange, is the predominant recombination mechanism regulating the expansion and contraction of the rDNA array. Furthermore, we found that RAD52, which is essential for gene conversion, is required for marker duplication stimulated in the absence of the two yeast type I topoisomerases. Our results have implications for the mechanisms regulating genomic stability of repetitive sequence families found in all eukaryotes.

- Gangloff, S., de Massy, B., Arthur, L., Rothstein, R., and Fabre, F. (1999). The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. *EMBO Journal* 18, 1701-1711.

Yeast cells mutant for TOP3, the gene encoding the evolutionary conserved type I-5' topoisomerase, display a wide range of phenotypes including altered cell cycle, hyper-recombination, abnormal gene expression, poor mating, chromosome instability and absence of sporulation. In this report, an analysis of the role of TOP3 in the meiotic process indicates that top3Delta mutants enter meiosis and complete the initial steps of recombination. However, reductional division does not occur. Deletion of the SPO11 gene, which prevents recombination between homologous chromosomes in meiosis I division, allows top3Delta mutants to form viable spores, indicating that Top3 is required to complete recombination successfully. A topoisomerase activity is involved in this process, since expression of bacterial TopA in yeast top3Delta mutants permits sporulation. The meiotic block is also partially suppressed by a deletion of SGS1, a gene encoding a helicase that interacts with Top3. We propose an essential role for Top3 in the processing of molecules generated during meiotic recombination.

- Rothstein, R., and Gangloff, S. (1999). The shuffling of a mortal coil. *Nature Genetics* 22, 4-6.
- Rothstein, R., Michel, B., and Gangloff, S. (2000). Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes & Development* 14, 1-10.
- Gangloff, S., Soustelle, C., and Fabre, F. (2000). Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the *Sgs1* & *Srs2* helicases. *Nature Genetics* 25, 192-194.

*DNA helicases are involved in many aspects of DNA metabolism, including transcription, replication, recombination and repair. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the absence of the *Sgs1* helicase results in genomic instability and accelerated ageing(1-4). In human cells, mutations in orthologues of *SGS1* lead to Bloom (BS), Werner (WS) or Rothmund-Thomson (RTS) syndromes, which are rare, autosomal recessive diseases characterized by genetic instability associated with cancer predisposition(5-7). Although data concerning these human diseases are accumulating, there is still no clear idea of the function of the proteins involved. Here we show that *sgs1* Delta mutants are deficient in DNA repair and are defective for induced recombination events that involve homologous chromosomes. The role of homologous recombination is further evidenced in haploid cells in which both *Sgs1p* and *Srs2p* are absent. Yeast *SRS2* encodes another DNA helicase involved in the maintenance of genome integrity(8-10). Our data suggest that some defects observed in BS, WS or RTS are the consequence of unrestrained recombination.*

- **Gangloff, S., Soustelle, C et Fabre, F. (2000). *Sgs1* and *Srs2*: helicases with a central role for replication and recombination? *Médecine/Sciences* 16, 1102-1105.**

- **Shor, E., Gangloff, S., Wagner, M., Weinstein, J., Price, G., and Rothstein, R. (2002) Mutations in homologous recombination genes rescue *top3* slow growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* (in Press)**

*In budding yeast, loss of topoisomerase III, encoded by the *TOP3* gene, leads to a genomic instability phenotype that includes slow growth, hyper-sensitivity to genotoxic agents, mitotic hyper-recombination, increased chromosome missegregation, and meiotic failure. Slow growth and other defects of *top3* mutants are suppressed by mutation of *SGS1*, which encodes the only RecQ helicase in *S. cerevisiae*. *SGS1* is epistatic to *TOP3*, suggesting that the two proteins act in the same pathway. To identify other factors that function in the *Sgs1-Top3* pathway, we undertook a genetic screen for non-*sgs1* suppressors of *top3* defects. We find that slow growth and DNA damage sensitivity of *top3* mutants are suppressed by mutations in *RAD51*, *RAD54*, *RAD55*, and *RAD57*. In contrast, *top3* mutants show extreme synergistic growth defects with mutations in *RAD50*, *MRE11*, *XRS2*, *RDH54*, and *RAD1*. We also analyzed recombination at the *SUP4-o* region, showing that in a *rad51*, *rad54*, *rad55* or *rad57* background, *top3* Δ G does not increase recombination to the same degree as in a wild type strain. These results suggest that the presence of the *Rad51* homologous recombination complex in a *top3* background facilitate creation of detrimental intermediates by *Sgs1*. We present a model wherein *Rad51* helps recruit *Sgs1-Top3* to sites of replicative damage.*

- **Fabre, F., Chen, A., Heyer, W-D. and Gangloff, S. (2002) Alternate pathways involving *Sgs1/Top3*, *Mus81/Mms4* and *Srs2* prevent formation of toxic recombination intermediates from single-strand gaps created by DNA replication (submitted)**

*Toxic recombination events can be detected in vegetative *Saccharomyces cerevisiae* cells through negative growth interactions between certain*

combinations of mutations. For example, mutations affecting both the Srs2 and Sgs1 helicases result in poor growth, a phenotype suppressed by mutations in genes that govern early stages of recombination. Here we identify a new such interaction involving double mutations affecting Sgs1 or Top3 and Mus81 or Mms4. We also find that the primary DNA structures that initiate these toxic recombination events cannot be double-strand breaks (DSBs) and thus are likely to be single-strand DNA (ssDNA). We postulate that replication stalling causes ssDNA, which can be processed by two competing mechanisms: recombination and non-recombination gap-filling. Binding of the recombination proteins to ssDNA would initiate recombination with the sister chromatid. Functions involved in preventing toxic recombination would then act to either process the intermediate structure or to channel it back into the gap-filling route. We propose a model in which Sgs1/Top3 and Mus81/Mms4 perform alternative functions to process recombination intermediates, while Srs2 acts to reverse recombination structures.

2. Mémoires

- D.E.A.: “Clonage moléculaire du gène codant pour l’aconitase mitochondriale de *Saccharomyces cerevisiae*” Juillet 1985, Université Aix-Marseille II
- Doctorat: “Isolement et caractérisation du gène nucléaire codant pour l’aconitase mitochondriale de *Saccharomyces cerevisiae*: Etudes préliminaires sur la régulation de son expression” Janvier 1990, Université Aix-Marseille II.

H. Communications à des conférences

□ Forum des Jeunes Chercheurs

Juillet 1988. Sophia-Antipolis

Présentation orale "Isolement du gène nucléaire codant pour l'aconitase mitochondriale de *Saccharomyces cerevisiae*" Serge Gangloff et Guy J-M. Lauquin

□ Cold Spring Harbor Yeast Cell Biology

Août 1990. Cold Spring Harbor, New York

Présentation d'un poster "Molecular cloning of the yeast nuclear aconitase gene, and evidence of a synergistic regulation by glucose and glutamate at the transcriptional level"

Serge Gangloff, Didier Marguet et Guy J-M. Lauquin

□ DNA Topoisomerases in Therapy

15 - 18 Octobre 1990. NYU Medical Center, New York

Présentation orale "*TOP3* from *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to the two type I topoisomerases from *E. coli*" Serge Gangloff et Rodney Rothstein

□ Yeast Genetics and Molecular Biology

23 - 27 Mai 1991. San Francisco, California

Présentation orale "Heterologous and Extragenic Suppressors of mutations in the yeast *TOP3* gene affect pleiotropic phenotypes" Serge Gangloff et Rodney Rothstein

□ FASEB Summer Research Conference

Chromosome Structure, Replication and Segregation

5 - 10 Juillet 1992. Snowmass, Colorado

Présentation d'un poster "Elevated recombination in *top3* mutants requires different genes at rDNA and *SUP4*" Serge Gangloff et Rodney Rothstein

□ FASEB Summer Research Conference

Genetic Recombination and Genome Rearrangements

25 - 30 Juillet 1993. Copper Mountain, Colorado

Présentation d'un poster "The two yeast type I topoisomerases maintain mitotic stability in the rDNA tandem array via different mechanisms" Serge Gangloff, Hui Zou et Rodney Rothstein

□ Yeast Genetics and Molecular Biology

16 - 21 Août 1994. Seattle, Washington

Présentation orale "Yeast type I topoisomerase, Top3, interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase?" Serge Gangloff, John P. McDonald, Christian Bendixen, Lane Arthur et Rodney Rothstein

□ Congrès des 3R

3 - 6 Juin 1997, Villejuif

Présentation d'un poster "Le défaut de sporulation des cellules dépourvues du gène *TOP3* résulte d'une synthèse préméiotique anormale et d'un blocage de la division réductionnelle" Serge Gangloff, Bernard de Massy et Francis Fabre

□ 7th International Conference on Environmental mutagens

7 - 12 Septembre 1997, Toulouse

Présentation d'un poster "Sporulation defect in *top3* mutants results from abnormal premeiotic DNA synthesis and absence of reductional segregation"

Serge Gangloff, Bernard de Massy and Francis Fabre

□ Molecular Mechanisms in DNA Replication and Recombination

16 – 22 Février 1999, Taos NM – USA

Présentation orale (R. diGate) "The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination" Serge Gangloff, Bernard de Massy et Francis Fabre

□ **Congrès des 3R**

15 – 18 Juin 1999, Villejuif

Présentation d'un poster "La topoisomérase III de *Saccharomyces cerevisiae* est essentielle pour maturer des intermédiaires de recombinaison au cours de la méiose" Serge Gangloff, Bernard de Massy et Francis Fabre.

□ **EMBO workshop on Genetic Recombination**

22 – 26 Mai 2000 (Seillac)

Présentation orale "Homologous recombination is responsible for the poor viability of *sgs1 srs2* double mutants" Serge Gangloff et Francis Fabre

□ **Congrès des 3R**

2 - 5 Juillet 2001, Gif-sur-Yvette

Présentation d'un poster "Les hélicases Sgs1 et Srs2 définissent deux voies de rétablissement des fourches de réplication" Serge Gangloff et Francis Fabre

□ **FASEB Summer Research Conference**

Genetic Recombination and Chromosome Rearrangements

21 - 26 Juillet 2001. Snowmass, Colorado

Présentation orale et d'un poster "The Sgs1 and Srs2 helicases define two pathways for replication restart"

Serge Gangloff et Francis Fabre.

□ **Molecular Mechanisms in DNA Replication and Recombination**

7 – 13 Janvier 2002, Snowbird UT – USA

Présentation orale et d'un poster (S. Shuman) "Roles of the Mus81, Sgs1 and Srs2 proteins in recombinational repair" Serge Gangloff et Francis Fabre

I. Invitations

□ **The Molecular Biology Conference**

17 - 20 Septembre 1995. San Diego, California (R. Dana)

"Screening for interacting peptides by mating in yeast"

□ **Department of Molecular Genetics - Beckman Research Institute of the City of Hope**

22 Septembre 1995. City of Hope, California (A. Bailis)

"Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large tandem repeats in yeast"

□ **Department for Radiological Research - Columbia University**

21 Novembre 1995, New York (G. Freyer & H. Lieberman)

"Genetic and physical interactions between topoisomerases and a helicase in yeast: A clue to understanding Bloom's syndrome"

□ **Département de Biochimie - Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay**

21 Janvier 1997, Gif sur Yvette (P. Thuriaux)

"Topoisomérase et hélicase: Maintien de la stabilité des séquences d'ADNr chez la levure"

□ **Ecole Normale Supérieure**

8 Décembre 1997, Lyon (E. Gilson)

"Interaction entre topoisomérase et hélicase: Rôle dans le maintien de l'intégrité du génome"

□ **Institut de Biochimie et de Physico-Chimie**

20 Novembre 1998, Paris (M. Springer)

"La topoisomérase III de *Saccharomyces cerevisiae*: un rôle essentiel dans la recombinaison méiotique"

□ **Institut de Recherches sur le cancer**

4 février 1999, Villejuif (G. Baldacci)

"Rôle des hélicases et des topoisomérases dans le maintien de l'intégrité du génome"

□ **University of Wales at Swansea**

The Annual British Yeast Group Meeting

23 – 25 Mars 2002 (R. Waters)

"Roles of the Mus81, Sgs1 and Srs2 proteins in recombinational repair"

□ **EMBO workshop on Genetic Recombination**

27 – 31 Mai 2002 (Seillac (S. West)

"Roles of the Mus81, Sgs1 and Srs2 proteins in recombinational repair"

II. BILAN DES ACTIVITES

A. Travaux de recherche doctoraux

En 1985, dans le cadre de mon "Diplôme d'Etudes Approfondies", j'ai démarré une étude portant sur le métabolisme du glucose dans le laboratoire du Pr. G. J-M. Lauquin à la Faculté des Sciences de Marseille-Luminy. Au cours de cette année, j'ai cloné le gène nucléaire codant pour l'aconitase mitochondriale de *Saccharomyces cerevisiae*. Ces résultats encourageants me permirent d'obtenir une allocation du Ministère de la Recherche et de la Technologie et de poursuivre cette étude pour l'obtention d'un Doctorat. Au cours des trois années suivantes, j'ai combiné une triple approche biochimique, génétique et de biologie moléculaire pour d'une part aborder l'étude des mécanismes qui régulent l'expression de l'aconitase mitochondriale au cours du métabolisme et pour d'autre part élucider les problèmes d'acheminement de cette enzyme soit vers les mitochondries (cycle de Krebs), soit vers les peroxysomes (cycle du glyoxylate).

J'ai isolé le gène codant pour l'aconitase mitochondriale de *Saccharomyces cerevisiae* (*ACO1*) par complémentation fonctionnelle de la mutation *glu1-1*. Cette mutation est caractérisée par l'absence d'activité enzymatique aconitase et confère un phénotype d'auxotrophie envers le glutamate. La région d'ADN de levure responsable de la complémentation du phénotype mutant a été délimitée à une portion génomique de 3,0 kb, et a été identifiée à l'ADN *GLU1* par des expériences de liaison génétique. Un transcrit polyadénylé unique de 2,6 kb a été mis en évidence, et son sens de transcription déterminé par la technique d'hybridation sur Northern blot. Le gène *ACO1* a été assigné au chromosome XII grâce à des expériences d'hybridation sur des chromosomes séparés par électrophorèse en champ pulsé. L'examen de la séquence nucléotidique du gène a révélé la présence d'un cadre de lecture ouvert unique pouvant être traduit en une entité protéique de 85 685 Da. En outre, les comparaisons de séquence effectuées au niveau peptidique avec des oligopeptides d'aconitase de cœur de bœuf ont révélé de très fortes similitudes avec la protéine déduite du gène *ACO1*, indiquant que ce dernier correspond au gène de structure de l'enzyme de levure. La région amino-terminale de la protéine déduite est constituée par des acides aminés basiques et

hydrophobes qui s'organisent en une structure amphiphilique caractéristique des pré-séquences peptidiques responsables de l'acheminement vers la mitochondrie.

L'expression du gène *ACO1* est régulée par les substrats de croissance. Comme pour la majorité des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la respiration, le gène *ACO1* est soumis à la répression catabolique. Cet effet est essentiellement exercé au niveau transcriptionnel, et se trouve amplifié lors d'une croissance sur un milieu où le glucose et le glutamate (ou l'un de ses dérivés) sont présents simultanément. En revanche, la transcription d'*ACO1* est stimulée lors d'une croissance sur un milieu non fermentescible. Cette augmentation de la quantité de transcrits est due à la fixation des protéines activatrices Hap2 et Hap3 sur leur site spécifique, l'UAS2 UP1, présent en amont de la boîte TATA du gène *ACO1*.

L'aconitase est impliquée dans le fonctionnement du cycle de Krebs au sein de la mitochondrie, mais également dans celui du cycle du glyoxylate qui se déroule dans le cytoplasme cellulaire. Les résultats préliminaires suggèrent que le gène *ACO1* est responsable de la production des deux isoformes.

Une partie de ces résultats a été publiée dans un article:

- Gangloff, S. P., Marguet, D., and Lauquin, G. J. (1990). Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (*ACO1*) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Molecular and Cellular Biology* 10, 3551-3561

B. Travaux de recherche du 1er stage post-doctoral

J'ai rejoint le 1er février 1990 le laboratoire du Dr. Rodney Rothstein (Columbia University, New York) pour étudier les mécanismes qui contrôlent la recombinaison mitotique entre séquences répétées d'ADN.

La recombinaison génétique entre séquences répétées est l'un des mécanismes principaux gouvernant l'évolution des familles multigéniques (Edelman and Gally, 1970), et de nombreux remaniements chromosomiques résultent d'une altération dans ce système. Un nombre croissant de maladies humaines causées par des réarrangements délétères entre séquences répétées a été mis en évidence ces dernières années. Parmi les maladies les plus courantes se trouvent l'hémophilie sévère de type A (Lakich et al., 1993), l'hypercholestérolémie (Lehrman et al., 1987) ainsi qu'un nombre grandissant de désordres neurologiques caractérisés par une amplification de régions contenant des triplets répétés. C'est le cas pour le syndrome du chromosome X fragile (Fu et al., 1991), la dystrophie musculaire myotonique (Fu et al., 1992; Harley et al., 1992), l'atrophie musculaire spinale et bulbaire (Caskey et al., 1992; La Spada et al., 1991) ou la maladie de Huntington (Group, 1993).

A mon arrivée dans le laboratoire du Dr. Rothstein, un crible visant à isoler des gènes impliqués dans la suppression de la recombinaison mitotique entre séquences répétées venait de conduire à l'isolement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* du gène *TOP3*. Le produit de traduction du gène *TOP3* présente 40% de similarité avec les topoisomérases bactériennes de type I (TopA et TopB). En revanche, Top3 ne partage aucune homologie avec les topoisomérases de type I ou II mises en évidence jusque-là chez la levure ou chez un autre eucaryote (Wallis et al., 1989). Top3 relaxe uniquement l'ADN surenroulé négativement, par opposition aux topoisomérases de type I eucaryotes qui relaxent aussi l'ADN positivement surenroulé (Kim and Wang, 1992).

J'ai décidé d'étudier le rôle de *TOP3* dans le maintien de la stabilité des séquences réitérées dans le génome. Pour mener à bien ce projet, j'ai développé de multiples approches:

- Une étude du rôle des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN sur la stimulation de la recombinaison en l'absence de Top3

- Une étude des mécanismes moléculaires altérés en l'absence de Top3
- Une analyse génétique classique avec isolement de supresseurs
- Une recherche de protéines qui interagissent avec Top3

1. Analyse génétique de la recombinaison stimulée en l'absence de TOP3

a) Dans l'ADN ribosomique

Chez *S. cerevisiae*, l'ADN ribosomique (ADNr) constitue un système modèle pour étudier le contrôle génétique de la stabilité des séquences répétées. Il est composé d'une succession de 100 à 200 répétitions en tandem d'une unité de base de 9,2 kb (Cf. Figure 1) exclusivement localisée sur le chromosome XII (Petes, 1979). Il est ainsi facile d'y insérer un marqueur d'auxotrophie et de mesurer la fréquence à laquelle ce dernier est perdu au cours des divisions mitotiques (Gangloff et al., 1994a; Szostak and Wu, 1980).

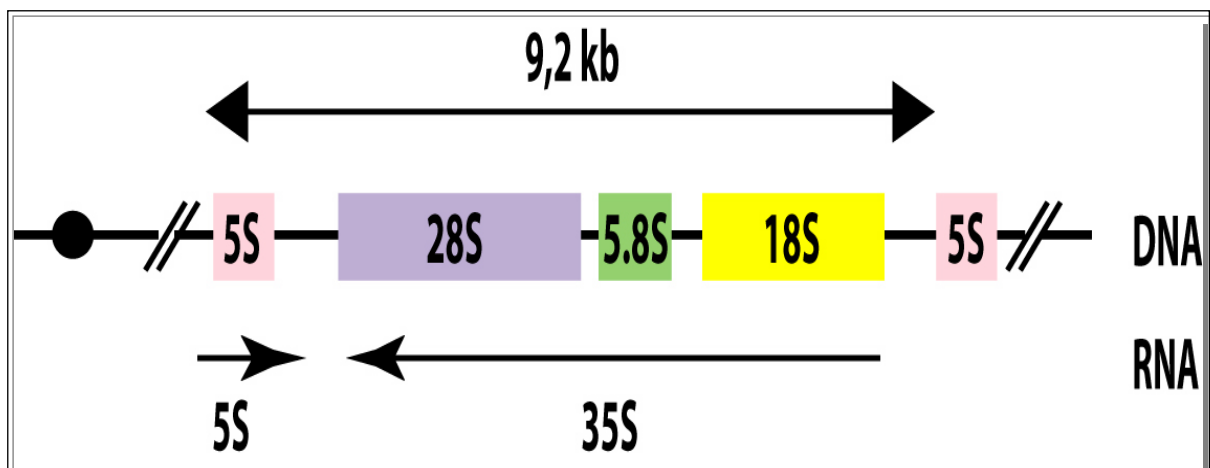


Figure 1 : Organisation de l'ADNr de *S. cerevisiae*

Cette approche a été suivie avec les mutants *top3*, et m'a permis de montrer que l'absence de *TOP3* stimule cet événement plus de 80 fois. Des études antérieures avaient établi que la stabilité de l'ADNr est sensible à la présence de Top1 et de Top2, les topoisomérases de type I et II préalablement isolées chez *S. cerevisiae* (Christman et al., 1988). La fréquence de perte de marqueur d'auxotrophie dans l'ADNr chez les mutants *top3* est cependant beaucoup plus élevée que pour les mutants *top1* ou *top2*. En outre, l'absence simultanée de *TOP1* et de *TOP3* résulte

en une élévation synergique de la fréquence de perte de marqueur, ce qui indique que ces deux enzymes sont capables d'exercer des fonctions communes.

J'ai ensuite testé les effets des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN sur la fréquence de recombinaison stimulée en l'absence de *TOP3*. L'absence de *RAD1*, impliqué dans la phase d'incision du mécanisme de réparation par excision - resynthèse (Yang and Friedberg, 1984) n'affecte que modérément la fréquence de recombinaison des mutants *top3* dans l'ADNr. En revanche, la présence de *RAD52* (Petes et al., 1991), le gène central de la recombinaison chez la levure, est indispensable pour observer l'hyper-recombinogénicité des mutants *top3*.

b) Entre ARNt dupliqués présents au locus *SUP4*

J'ai également analysé les effets de *top3* dans un système où les séquences dupliquées sont les longues répétitions terminales des éléments transposables Ty (appelées séquences delta) dispersées et non pas répétées en tandem autour d'un ARN de transfert capable de supprimer des mutations "ocre" (Rothstein et al., 1987). Dans ce système (Cf. Figure 2), la fréquence de délétion de *SUP4-o* par recombinaison entre les différentes séquences delta est 100-fois plus élevée dans les cellules mutées pour *TOP3* que dans les contrôles sauvages. Contrairement à ce qui était observé dans l'ADNr, cette stimulation est tributaire de la présence, non seulement de *RAD52*, mais également de *RAD1* devenu nécessaire pour enlever les séquences non identiques entre les différents éléments delta.

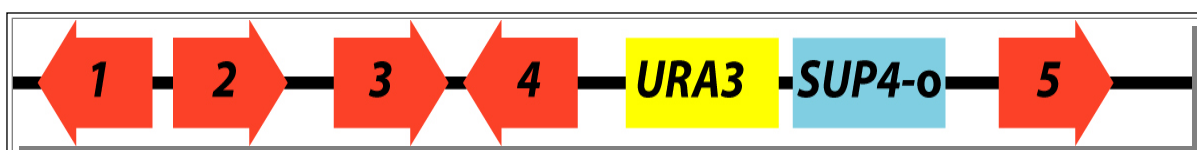


Figure 2 : Organisation du locus *SUP4* de *S. cerevisiae*

2. Etude des mécanismes moléculaires conduisant à une augmentation de la recombinaison dans les mutants *top3Δ*

a) Au niveau de l'ADNr

La perte du marqueur d'auxotrophie inséré dans l'ADNr peut s'expliquer de plusieurs façons: par recombinaison inégale entre chromatides sœurs, par recombinaison intra-chromatidienne, par conversion génique, par glissement lors de la réplication (Fletcher, 1994) ou par un mécanisme de "Single Strand Annealing" (SSA) au cours

duquel une dégradation exonucléolytique (5'→3') dégrade les simple brins de chaque côté de la cassure double brin, découvrant ainsi des régions complémentaires qui peuvent s'apparier et être ligaturées après élimination par Rad1/Rad10 (Bardwell et al., 1993; Tomkinson et al., 1993) des simple brins non appariés (Figure 3).

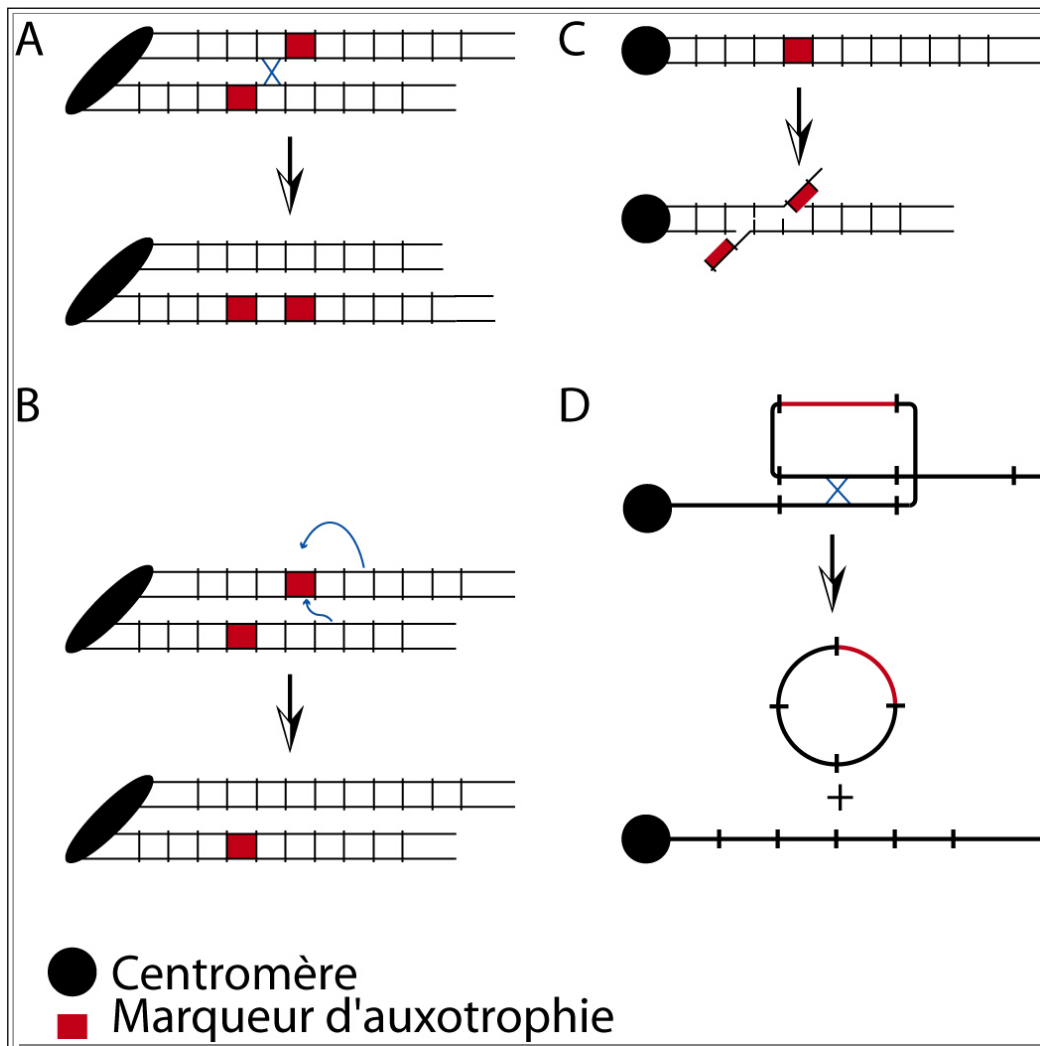


Figure 3 : Perte de marqueur inséré dans l'ADNr

Les résultats des analyses moléculaires ont indiqué que les mutants *top3* élèvent la fréquence de recombinaison dans l'ADNr en produisant un nombre accru de lésions qui sont réparées par conversion génique. Au cours de cette analyse, nous avons également établi que l'événement majeur contrôlant l'homogénéité des séquences en tandem est la conversion génique et non pas l'échange inégal entre chromatides sœurs comme il est encore communément admis.

Ces résultats ont donné lieu à un article:

- Gangloff, S., Zou, H., and Rothstein, R. (1996). Gene conversion plays the major role in controlling the stability of large tandem repeats in yeast. *EMBO Journal* 15, 1715-1725.

b) Au niveau du locus *SUP4-o*

Des travaux effectués antérieurement au laboratoire ont montré l'existence de sept classes de recombinants associées avec une délétion de *SUP4-o* (Rothstein et al., 1987). Les différentes classes de délétion peuvent être produites par conversion génique ou par un mécanisme de SSA. En l'absence du gène *RAD1*, une classe majoritaire de recombinants est obtenue. Cette classe est générée par un événement de conversion génique entre les séquences dupliquées les moins divergentes, et ne nécessite pas l'activité endonucléase du complexe formé par Rad1 et Rad10 (Bardwell et al., 1993; Tomkinson et al., 1993). En l'absence des gènes du groupe d'épistasie de *RAD52* (*RAD50*, *RAD51*, *RAD54*, *RAD55* et *RAD57*) une catégorie différente de recombinants peut être obtenue, celle qui utilise un mécanisme de SSA pour réparer la région comprise entre deux ARNt en répétition directe. Ce résultat indique que le groupe d'épistasie de *RAD52* est nécessaire pour effectuer de la conversion génique et confirme que *RAD1* et *RAD52* définissent des voies de recombinaison alternatives. En l'absence de *TOP3*, la distribution des différentes classes est identique à celle observée chez le sauvage, et seule la fréquence à laquelle ces événements surviennent est augmentée. Dans les double mutants *rad1 top3*, une seule classe de recombinants est obtenue, celle des mutants *rad1*. La relation d'épistasie de *rad1* et *top3* observée génétiquement est ainsi aussi reflétée au niveau moléculaire. Chez les doubles mutants *rad52 top3*, la fréquence de délétion des mutants *rad52* est stimulée 100 fois par l'absence simultanée de *TOP3*, mais la seule classe de délétion observée reste celle des mutants *rad52*.

Il ressort de cette étude moléculaire que l'absence de *TOP3* conduit essentiellement à une accumulation de structures recombinogènes qui sont normalement résolues par conversion génique, un mécanisme nécessitant la présence d'un gène *RAD52* fonctionnel. Dans le cas des répétitions au locus *SUP4*, la présence de *RAD1* est également requise pour éliminer les régions simple brin non complémentaires comprises entre les séquences dupliquées.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication :

- Shor, E., Gangloff, S., Wagner, M., Weinstein, J., Price, G., and Rothstein, R. (2002) Mutations in homologous recombination genes rescue *top3* slow growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics (in Press)

3. Isolement de suppresseurs extragéniques de la mutation nulle *top3Δ*

Les cellules de levure dépourvues du gène *TOP3* présentent un phénotype pléiotrope. Les cellules se développent lentement (40% du temps de doublement d'une souche sauvage) et l'analyse par coloration au DAPI des noyaux de cellules *top3* en phase exponentielle de croissance a révélé un défaut de morphologie des cellules et également un changement de distribution de ces cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (les cellules mutantes sont ralenties lors de leur transition de la phase S vers la phase G2). En outre, les cellules de signe sexuel alpha expriment constitutivement la protéase Bar1, transcrite uniquement dans les cellules de type a et qui dégrade la phéromone alpha, empêchant ainsi la réaction de copulation. Par ailleurs, les souches diploïdes portant la mutation *top3* à l'état homozygote sont incapables de sporuler. Finalement, les cellules mutées pour *TOP3* sont caractérisées par une fréquence élevée de remaniements chromosomiques entre séquences dupliquées et par une perte de chromosomes dans les cellules diploïdes. Bien qu'une délétion de *TOP3* ne soit pas létale, le phénotype pléiotrope du mutant indique que la réplication, la transcription et la recombinaison sont fortement altérées.

Une analyse de suppresseurs spontanés du phénotype de croissance ralentie a permis d'isoler 25 suppresseurs, qui appartiennent tous au même groupe de complémentation et ont été appelés *sgs1* (**s**low **g**rowth **s**uppressor). Ces suppresseurs de la croissance ralentie suppriment également la morphologie altérée des mutants *top3* et l'expression inappropriée de *BAR1*. En revanche, *sgs1* élève par lui-même la fréquence de recombinaison entre séquences répétées et est épistatique par rapport à *top3*. Enfin, une délétion de *sgs1* est capable de supprimer l'incapacité de sporuler des mutants *top3*, un désordre que seule la surproduction chez la levure de la topoisomérase bactérienne TopA était capable de compenser.

4. Isolement de peptides interagissant avec Top3

Pour isoler des peptides qui interagissent avec Top3, j'ai mis au point une méthode de "double-hybride" dans laquelle l'étape de co-transformation a été remplacée par une simple réaction de copulation qui permet de cribler la banque pour de multiples interactions simultanément. Grâce à ce système, j'ai isolé un peptide qui active spécifiquement la transcription de deux gènes rapporteurs en présence d'un produit de fusion entre Top3 et le domaine de Gal4 qui se lie à l'ADN (Bendixen et al., 1994). L'analyse génétique d'une souche portant une partie de la séquence ainsi isolée intégrée au locus chromosomique par recombinaison homologue a révélé que le gène ainsi identifié est fortement lié à la mutation *sgs1*, le suppresseur extragénique de la croissance ralentie des mutants *top3*. Ce gène a été cloné et identifié à *SGS1* par un test de complémentation de fonction (Gangloff et al., 1994a).

L'analyse de la séquence de Sgs1 indique que cette protéine de 164 KDa est constituée de deux domaines. L'un interagit avec Top3 et possède deux régions riches en acides aminés acides capables d'activer la transcription des gènes rapporteurs dans le système du double-hybride. L'autre domaine est très homologue à l'ADN hélicase RecQ d'*Escherichia coli*, impliquée dans la voie de recombinaison caractérisée par RecF (Umezumi et al., 1990), et à la protéine RECQL identifiée par génétique reverse chez l'homme (Puranam and Blackshear, 1994). Une séquence nucléique de *Caenorhabditis elegans* obtenue lors du projet de séquençage de cet organisme peut également être traduite en un produit présomptif homologue à Sgs1. Récemment, le gène humain déficient responsable du syndrome de Bloom a été isolé (Ellis et al., 1995), et l'analyse de sa séquence a révélé qu'il correspond vraisemblablement à Sgs1.

Ces résultats ont donné lieu à trois publications:

- Gangloff, S., Lieber, M. R., and Rothstein, R. (1994). Transcription, topoisomeres and recombination. *Experientia* 50, 261-269
- Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L., and Rothstein, R. (1994). The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Molecular and Cellular Biology* 14, 8391-8398.

- Rothstein, R., and Gangloff, S. (1995). Hyper-recombination and Bloom's syndrome: microbes again provide clues about cancer. *Genome Research* 5, 421-426.

C. Travaux de recherche du second stage post-doctoral

En Septembre 1996, j'ai rejoint le laboratoire du Dr. Francis Fabre à l'Institut Curie où j'ai poursuivi les travaux que j'ai démarré aux Etats Unis. L'étude que j'ai prolongée concerne l'incapacité de sporulation et l'instabilité chromosomique liée à l'absence de Top3 dans les cellules diploïdes. Mes travaux antérieurs ont montré que l'absence du gène *TOP3* conduit à une expression altérée de certains gènes, à une très forte instabilité du génome et à un cycle cellulaire fortement perturbé. Dans cette étude, les causes du seul phénotype "terminal" des mutants dépourvus de Top3 sont analysées en s'appuyant sur les résultats obtenus sur les cellules en croissance végétative.

1. L'instabilité chromosomique ne peut à elle seule expliquer le défaut de sporulation

Des observations antérieures ont montré que les cellules diploïdes homozygotes pour la délétion du gène *TOP3* se comportent comme si elles étaient le siège de pertes fréquentes d'un chromosome III. En effet, la perte de l'un de ces chromosomes se traduit à la fois par l'impossibilité de sporuler, et par la capacité de se croiser avec une souche haploïde en raison de la perte de l'information sexuelle MATa ou MAT α portée par l'un ou l'autre des chromosomes III. L'utilisation d'une souche portant le gène centromérique *LEU2* sauvage sur l'un des chromosomes III m'a permis de mesurer la fréquence à laquelle ce chromosome est perdu dans une population au moment de l'induction de la méiose. Dans de telles conditions, moins d'une cellule diploïde sur mille a perdu le chromosome portant le gène *LEU2*, ce qui suggère que la majorité des mutants diploïdes contient les loci MATa ou MAT α nécessaires à l'entrée en méiose.

L'étude de l'instabilité chromosomique par un test génétique basé sur la couleur des colonies (Hieter et al., 1985) m'a également permis de préciser que l'absence de la topoisomérase Top3 conduit à une augmentation d'un facteur 20 à la fois de la perte de chromosomes et de la non disjonction liée à une mauvaise ségrégation lors de l'anaphase (Cf. Tableau 1). Quoique très élevée, cette instabilité chromosomique ne peut pas seule expliquer la complète absence de sporulation chez ces mutants en termes de fréquence et de nombre de chromosomes.

Génotype	Fréquence de mauvaise ségrégation		Total
	Non disjonction	Perte de chromosome	
<i>TOP3 / TOP3</i>	1.45×10^{-4}	3.0×10^{-4}	4.45×10^{-4}
<i>top3 / top3</i>	35×10^{-4}	43×10^{-4}	78×10^{-4}

Tableau 1 : Ségrégation des chromosomes chez les mutants *top3*

2. Un défaut d'activation transcriptionnelle des gènes inducteurs de la méiose ne sont pas responsables de l'absence de sporulation

J'ai analysé l'implication de l'expression de certains gènes essentiels à l'entrée en méiose et ai montré que le défaut de sporulation n'est pas lié à un déficit de stimulation transcriptionnelle de ces gènes inducteurs (Mitchell et al., 1990; Sia and Mitchell, 1995; Smith et al., 1993; Smith et al., 1990), puisque la surexpression des gènes *IME1* et *IME2* sous le contrôle d'un promoteur inductible, qui normalement forcent les cellules à accomplir le programme méiotique, ne confère pas la capacité de sporuler aux cellules mutantes (Cf. Tableau 2).

Génotype	Sporulation après		Viabilité des spores
	2 jours	5 jours	
<i>TOP3 / TOP3</i>	+++	+++	90%
<i>top3 / top3</i>	0	0	-
<i>top3 / top3 + pGAL : :IME1</i>	0	0	-
<i>top3 / top3 + pGAL : :IME2</i>	0	0	-
<i>top3 spo11 / top3 spo11</i>	0	0	-
<i>top3 spo13 / top3 spo13</i>	0	0	-
<i>spo11 spo13 / spo11 spo13</i>	+++	+++	70%
<i>top3 spo11 spo13 / top3 spo11 spo13</i>	+++	+++	65%

Tableau 2 : Efficacité de sporulation et viabilité des spores

3. L'absence de *TOP3* empêche les cellules de franchir la première division méiotique

Afin de déterminer à quel stade du processus méiotique les mutants *top3* sont arrêtés, j'ai examiné par microscopie à fluorescence le devenir des noyaux après marquage au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Chez une cellule sauvage, les noyaux dédoublés apparaissent après une dizaine d'heures. Les résultats obtenus indiquent que les mutants *top3* ne voient jamais leur noyau se dédoubler, contrairement aux cellules témoins qui présentent des doublets après quelques heures dans le milieu d'induction, et des quadruplets après à peine 24 heures. En

outre, après 24 heures en milieu de sporulation, les cellules mutantes voient la presque totalité de leur ADN dégradé, comme en témoignent les images de fluorescence de la Figure 4.

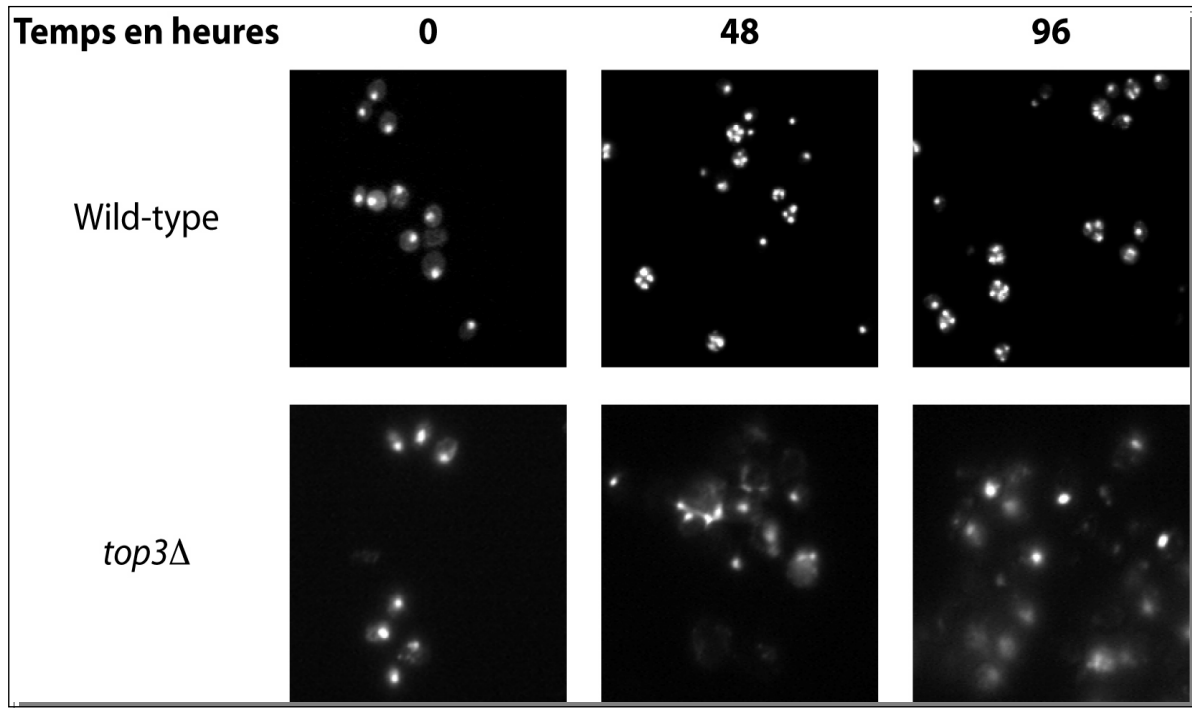


Figure 4 : Analyse de la progression méiotique par microscopie à fluorescence

4. Les mutants *top3* entrent en méiose

La question de l'entrée effective en méiose a été abordée en analysant la présence physique de cassures double brin programmées chez ces mutants. Dans le cas des mutants *top3*, on assiste à l'apparition de cassures double brin (CDBs) consécutives à l'induction physiologique de la méiose. L'analyse qualitative réalisée en collaboration avec Bernard de Massy indique que les cassures sont non seulement induites chez les mutants homozygotes, mais aussi qu'elles disparaissent au bout de 24 heures (Figure 5). L'analyse quantitative par PhosphorImager a permis de montrer que les proportions relatives de CDBs par rapport à l'ADN total ne sont pas différentes au locus *ARG4* entre les mutants et le contrôle sauvage. Etant donné que les CDBs sont produites chez les mutants, il devenait intéressant de savoir si des molécules recombinantes pouvaient être obtenues.

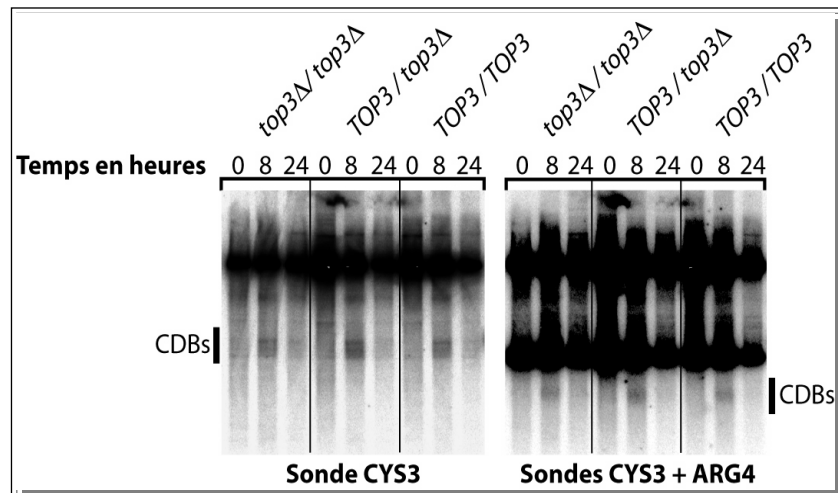


Figure 5 : Analyse de la présence de cassures double brin

Deux approches ont été suivies pour répondre à cette question. D'une part, des expériences de "Return to Growth", et d'autre part des expériences de détection physique de molécules jointes. Ces deux approches sont basées sur l'utilisation de loci hétéroalléliques (portant un polymorphisme de restriction) au niveau desquels la recombinaison est déterminée soit par l'apparition d'une prototrophie lors d'un retour vers un régime de croissance mitotique consécutif à une incubation plus ou moins longue en milieu inducteur de CDBs, soit par la détection de molécules recombinantes caractérisées par l'apparition de nouveaux fragments de restriction.

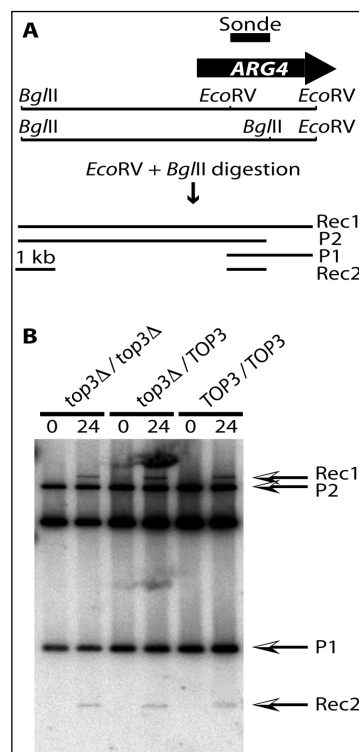


Figure 6 : Analyse de la présence de produits recombinés

Alors que chez les cellules sauvages le RTG conduit à une augmentation importante des fréquences de cellules ARG+ après une incubation de quelques heures dans le milieu de sporulation, chez le mutant *top3* aucune élévation n'est observée alors que les CDBs initiatrices sont présentes. Ce résultat suggère que lorsque la cassure est effectuée, la cellule ne peut plus revenir en arrière et reprendre une croissance végétative. En revanche, l'étude physique par polymorphisme de restriction du locus *ARG4* indique que des molécules recombinantes sont présentes à des fréquences similaires à celles trouvées chez les témoins sauvages (Figure 6).

Ces résultats indiquent que les cellules dépourvues de Top3 s'engagent dans le processus méiotique, mais sont arrêtées à un stade qui précède la première anaphase. D'autre part nos résultats montrent également que cette topoisomérase n'est pas essentielle à la formation de molécules recombinantes.

5. La recombinaison est responsable du défaut méiotique

Etant donné qu'une absence de résolution des structures de recombinaison entre chromosomes homologues lors de la méiose I conduit à un défaut de sporulation (Rose et al., 1990), nous avons également examiné le devenir des cellules *top3* dans un contexte où la recombinaison n'est pas initiée. Chez *S. cerevisiae*, il existe une mutation, *spo11*, qui abolit l'initiation de la recombinaison, et par conséquent la formation d'intermédiaires topologiques qui doivent être résolus avant d'effectuer la méiose II (Bruschi and Esposito, 1983; Esposito, 1984; Klapholz et al., 1985; Malone and Hoekstra, 1984; Wagstaff et al., 1985). Ces mutants *spo11* sont capables de former des produits de méiose diploïdes viables (dyades) lorsqu'une deuxième mutation qui élimine la ségrégation réductionnelle, *spo13*, est également présente dans la souche (Klapholz and Esposito, 1980a; Klapholz and Esposito, 1980b; Wang et al., 1987). L'utilisation de souches isogéniques homozygotes pour des mutations dans *TOP3*, *SPO11* et *SPO13* a permis de récupérer des produits méiose viables (Cf. Tableau 2). L'observation que les triple mutants *top3 spo11 spo13* produisent des spores viables suggère que la fonction de Top3 est nécessaire après le déclenchement de la recombinaison, à un stade plus avancé du processus

méiotique. Ce résultat indique également qu'en l'absence de recombinaison, la fonction de Top3 n'est plus essentielle en méiose (cf. Figure 7).

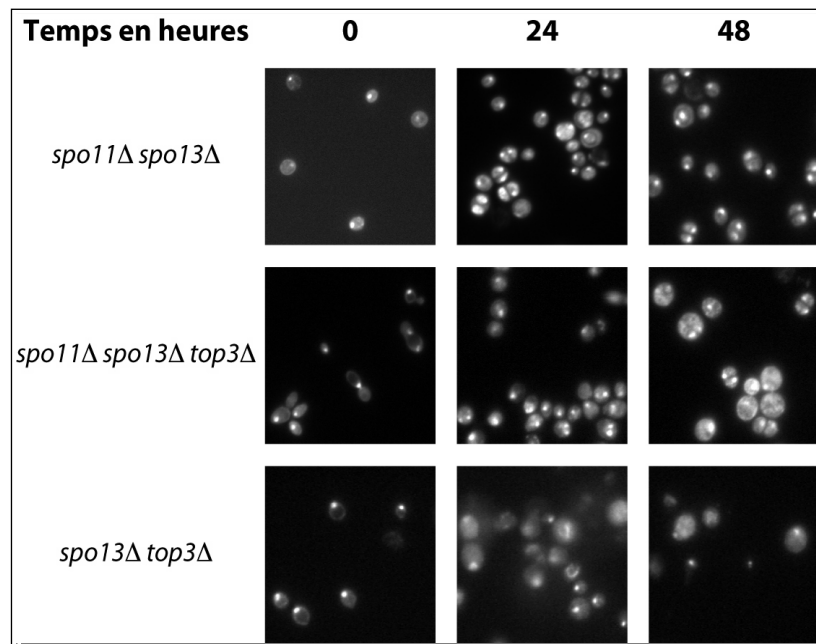


Figure 7: Analyse par fluorescence du rôle de l'initiation de la recombinaison sur l'arrêt de progression en méiose

6. La surexpression de *topA* permet la sporulation des mutants *top3*

Des travaux antérieurs avaient montré que la surexpression chez la levure d'une topoisomérase bactérienne de type I-5' fonctionnellement apparentée à Top3 est capable de compléter le phénotype de croissance ralentie des mutants *top3* (Wallis et al., 1989). Il était donc intéressant de déterminer si cette topoisomérase bactérienne est également capable de restaurer la sporulation chez les mutants *top3*. L'utilisation d'un gène bactérien inductible en présence de galactose a permis d'établir que la fonction essentielle de Top3 au cours du processus méiotique peut-être partiellement supprimé par son homologue bactérien. Ce résultat suggère qu'une activité commune à TopA et Top3 mais absente de Top1 et Top2 est responsable du bon déroulement de la méiose. Du point de vue biochimique, TopA et Top3 se lient à de l'ADN simple brin, contrairement aux produits des gènes *TOP1* ou *TOP2*. Ceci permet de spéculer quant à une activité de Top3 dans la décaténation d'ADN simple brin, un intermédiaire rare présent plus fréquemment pendant la méiose lorsque les niveaux de recombinaison sont élevés en moyenne d'un facteur 100 par rapport à ceux observés au cours de la croissance végétative.

La nécessité de résoudre au moins un de ces intermédiaires par méiose peut rendre compte du rôle essentiel de Top3 uniquement dans ce cycle de développement.

7. L'absence de Sgs1 ne supprime pas efficacement l'absence de Top3

Tous les phénotypes mitotiques liés à l'absence de Top3 identifiés jusque là sont supprimés lorsque Sgs1 n'est pas présente. Une hypothèse simple expliquant une totale absence de sporulation en l'absence de Top3 consiste à attribuer à l'hélicase Sgs1 un rôle dans l'établissement d'une structure qui ne peut être résolue que par l'action de Top3. La prédiction de ce modèle implique que lorsque cette structure n'est pas créée, la fonction de Top3 n'est plus essentielle. Au cours de l'étude de l'absence de Sgs1 lors de la méiose, seule une très faible production de spores (correspondant à 1/1000ème du sauvage) a été observée. De plus, nous avons remarqué que les souches diploïdes mutantes pour *SGS1* présentent un défaut méiotique qui se traduit par un retard de 48 heures dans l'apparition de tétrades associé à une diminution de la production d'asques d'un facteur 3 à 4 (cf. Figure 8). Comme dans le cas des mutants *top3*, le retard est aboli en absence d'initiation de la recombinaison, ce qui indique que Sgs1 est impliqué dans le traitement d'intermédiaires de recombinaison. Ces observations permettent pour la première fois de découpler les activités de Sgs1 et de Top3 et d'attribuer à ces protéines, une fonction dans le processus de recombinaison.

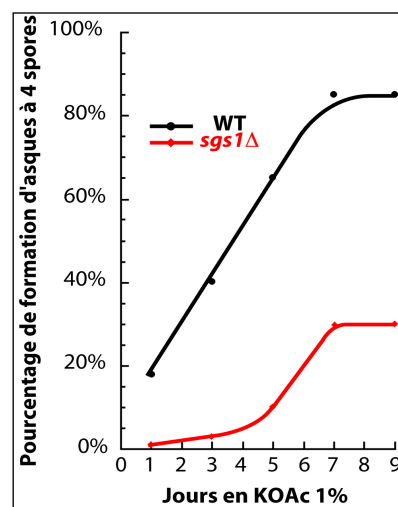


Figure 8 : Cinétique de formation de tétrades matures

Ces résultats ont été publiés dans un article:

- Gangloff, S., de Massy, B., Arthur, L., Rothstein, R., and Fabre, F. (1999). The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. EMBO Journal 18, 1701-1711.

D. Travaux récents

1. Introduction générale

Le projet que je développe depuis mon intégration au CNRS s'inscrit dans la continuité des travaux démarrés au cours de mes stages post-doctoraux et rejoint la thématique travaillée depuis des années dans le laboratoire de Francis Fabre. Il s'agit de l'étude des mécanismes de réparation de l'ADN et plus particulièrement du rôle des hélicases impliquées dans ce processus. Ce projet s'inscrit également dans le cadre plus étendu de l'étude des mécanismes qui régulent la stabilité de l'information génétique dans les cellules eucaryotes.

Caractéristiques	Blm	Wrn	Rts	Sgs1	Rqh1
	<i>H. sapiens</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Génétiques	Autosomique récessif	Autosomique récessif	Autosomique récessif	récessif	récessif
Cliniques ou phénotypiques	Retard de croissance Grande variété de cancers Diabète mature Hypogonadisme	Retard de croissance Cancers non épithéliaux Diabète mature Hypogonadisme	Prédisposition à la néoplasie Affections de la peau et du squelette	Méiose altérée Instabilité génétique Sensibilité aux radiations	Sensibilité aux radiations et aux dommages de l'ADN
Cytogénétiques	SCEs Cassures chromosomiques Figures quadriradiales	Mosaïcisme varié de translocation (Inversions, translocations)	Réarrangements chromosomiques	Non disjonction	Mitoses aberrantes Phénotype "cut"
Mutations	Elevé (délétions)	Elevé (délétions)	?	Elevé (délétions)	?
Recombinaison	Hyper recombinaison	Hyper recombinaison	Hyper recombinaison	Hyper recombinaison	Hyper recombinaison
Réplication	Progression ralentie des fourches Profil anormal des intermédiaires	Distances altérées entre les sites d'initiation Phase S allongée	?	Réplication altérée	Redémarrage en phase S altéré

Tableau 3 : Phénotype mutant des orthologues eucaryotes de Sgs1

Dans le cadre de l'isolement de suppresseurs extragéniques d'une délétion de la topoisomérase de type I-5' Top3, j'ai isolé et cloné *SGS1*, un gène codant pour une protéine dont la région consensus correspondant à son domaine hélicase est très similaire à la protéine RecQ d'*E. coli* (Gangloff et al., 1994b). La protéine RecQ est une ADN hélicase, elle-même impliquée dans une voie alternative de recombinaison définie par RecF (Umezumi et al., 1990). Récemment, des homologues de Sgs1 ont été isolés chez *Schizosaccharomyces pombe* (Murray et al., 1997; Stewart et al., 1997), *Caenorhabditis elegans* et *Homo sapiens*. Chez l'homme, cinq homologues ont été identifiés. Le premier, RecQ1, a été isolé par génétique inverse grâce à son activité hélicase (Puranam and Blackshear, 1994; Seki et al., 1994). Jusqu'à présent, aucune pathologie n'a pu être associée à un défaut de cette hélicase. Une déficience dans le deuxième de ces homologues (BLM) est responsable du syndrome de Bloom (BS) (Ellis et al., 1995), une maladie génétique récessive rare caractérisée par une déficience immunitaire, un faible poids à la naissance, une spermatogenèse anormale et une très forte prédisposition au développement précoce de toutes les formes de cancer (Bloom, 1954). Au niveau cytologique, les cellules des patients présentent des niveaux élevés de mutations somatiques, de cassures chromosomiques et d'échanges entre chromatides sœurs (German, 1993). Plus récemment, un troisième homologue humain de l'hélicase Sgs1 a été isolé par clonage positionnel (Yu et al., 1996). L'absence de cet homologue (WRN) entraîne le syndrome de Werner (WS), une maladie génétique récessive rare caractérisée par l'apparition précoce des signes du vieillissement. Les cellules somatiques de ces patients sont le siège d'une fréquence élevée de mutations, et développent des remaniements chromosomiques à des fréquences très élevées. Dernièrement, deux nouveaux membres humains de la famille des hélicases de type RecQ ont été isolés (Kitao et al., 1998). Certaines mutations dans l'un d'entre eux, RecQ4, conduisent au Syndrome de Rothmund-Thomson (RTS) (Kitao et al., 1999), une maladie rare caractérisée elle aussi par une instabilité génétique élevée et une prédisposition au cancer. Le gène *RECQ5* donne naissance par épissage à trois produits alternatifs dont l'un, RecQ5b, interagit avec les

orthologues humains de Top3. A ce jour, aucune pathologie n'a été associée à une mutation dans ce gène (Shimamoto et al., 2000), (cf: Tableaux 3, 4 et 5).

Mutants				
	<i>sgs1</i>	<i>blm</i>	<i>wrn</i>	<i>rts</i>
Instabilité	Séquences répétées Hétéroallèles Chromatides sœurs ADNr circulaire	SCEs Structures quadriradiales Délétions Insertions	Translocations Délétions	Réarrangements chromosomiques
Réplication	Sensibilité modérée à l'hydroxyurée	Retard des fourches Intermédiaires aberrants	Intermédiaires aberrants Sensibilité au cours de la phase S	?
Réponse aux UV Viellissement	Faible sensibilité Durée de vie réduite Pas de télomères courts en présence de télomérase α Nucléole fragmenté	Pas sensible ?	Pas sensible Durée de vie réduite Télomères courts	Pas sensible Viellissement accéléré
Perte de chromosome ou non disjonction	Mitotique et méiotique	Sub-fertilité	Sub-fertilité	?

Tableau 4 : Propriétés des mutants

Protéines				
	Sgs1	Blm	Wrn	Rts
Taille (AA)	1447	1417	1432	1208
Polarité hélicase	3'→5'	3'→5'	3'→5'	ND
Activité exonucléase	Non	Non	Oui	ND
Migration des jonctions de Hollyday	Oui	Oui	Oui	ND
Substrats	ADN duplex Fourches Hybrides ADN/ARN	ADN duplex Fourches ADN G4 Cruciformes	ADN duplex Hybrides ADN/ARN	ND
Interactions	Top2 Top3 Rad30	RPA Top3	Ku PCNA Top1 RP-A	

Tableau 5 : Caractéristiques des protéines

L'analyse des séquences peptidiques a indiqué que Sgs1 partage des identités structurales avec Blm, Wrn, et Rqh1 sur la totalité de leur longueur. Les quatre protéines ont une taille similaire (1400 acides aminés environ), et leur domaine hélicase est localisé à la même position (Rothstein and Gangloff, 1995). L'homologie de séquence peptidique entre Blm, Wrn, Rqh1 et Sgs1 s'étend au-delà des motifs hélicase, contrairement à ce qui est observé avec RecQ, RecQ1, RecQ4 ou RecQ5. Ces quatre protéines possèdent également des groupements d'acides aminés acides dans leur région N-terminale (Figure 9) qui, dans le cas de Sgs1 et de BLM, sont capables d'activer l'expression d'un gène rapporteur dans un système de double-hybride. La région carboxy-terminale contient un motif à doigt de zinc dégénéré qui suggère que ces protéines pourraient posséder une activité de fixation à l'ADN ou d'activation de la transcription (Foucault et al., 1997; Morozov et al., 1997). De plus, il a été récemment montré que l'extrémité C-terminale de Sgs1 et de Blm interagit avec Rad51 (Wu et al., 2001).

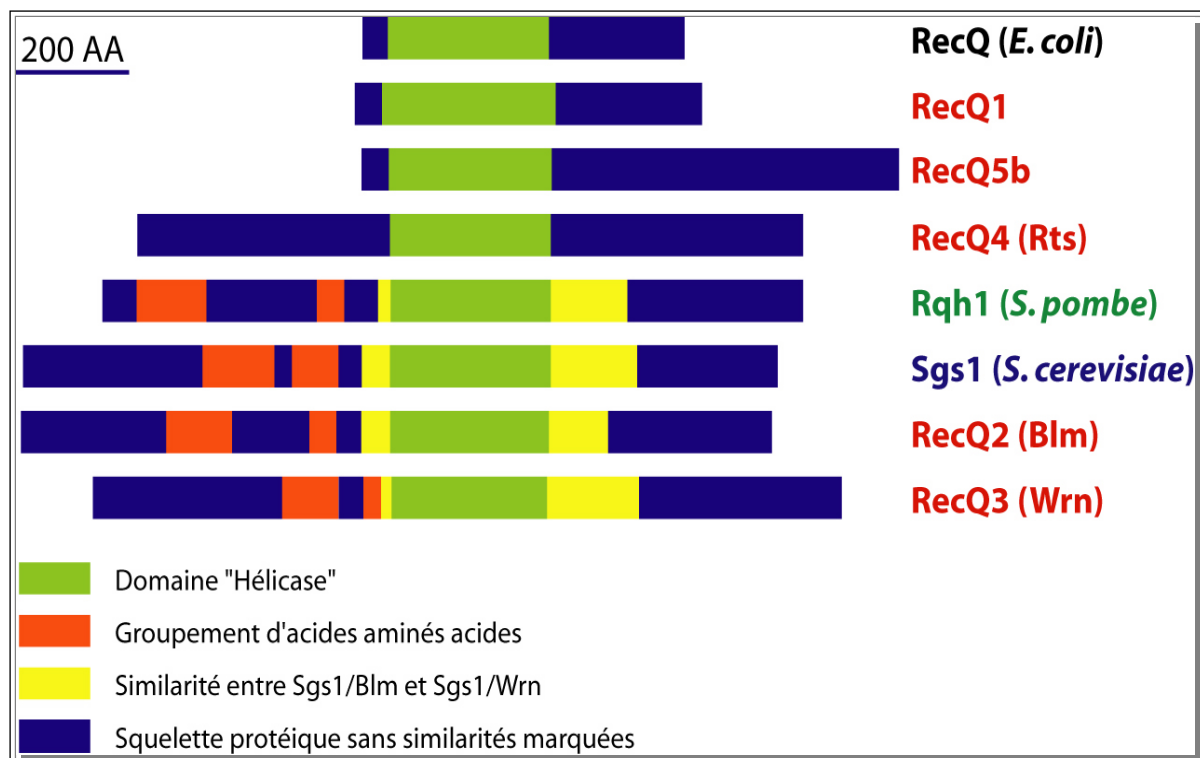


Figure 9 : Comparaison des hélicases

La similarité de Blm, Wrn, Rts, Rqh1 et Sgs1 n'est cependant pas limitée à leur structure primaire (Figure 10). En effet, Blm, Wrn, Rts et Rqh1 partagent également des identités phénotypiques avec Sgs1 (Cf. Tableau 3, 4 et 5). En effet,

j'ai montré que l'absence de *SGS1*, tout comme celle de *BLM*, *WRN*, *RTS* ou *rqh1+* conduit à une méiose aberrante, à une fréquence élevée de non disjonction chromatidienne, à une réplication altérée et surtout à des niveaux élevés de recombinaison mitotique. Récemment, le groupe de Guarente à Boston a montré que les levures mutées pour *SGS1* ont une durée de vie réduite de plus de 50% par rapport aux cellules témoin isogéniques, et présentent un phénotype global de vieillissement accéléré caractérisé par l'apparition précoce de stérilité et de fragmentation du nucléole (Sinclair and Guarente, 1997; Sinclair et al., 1997).

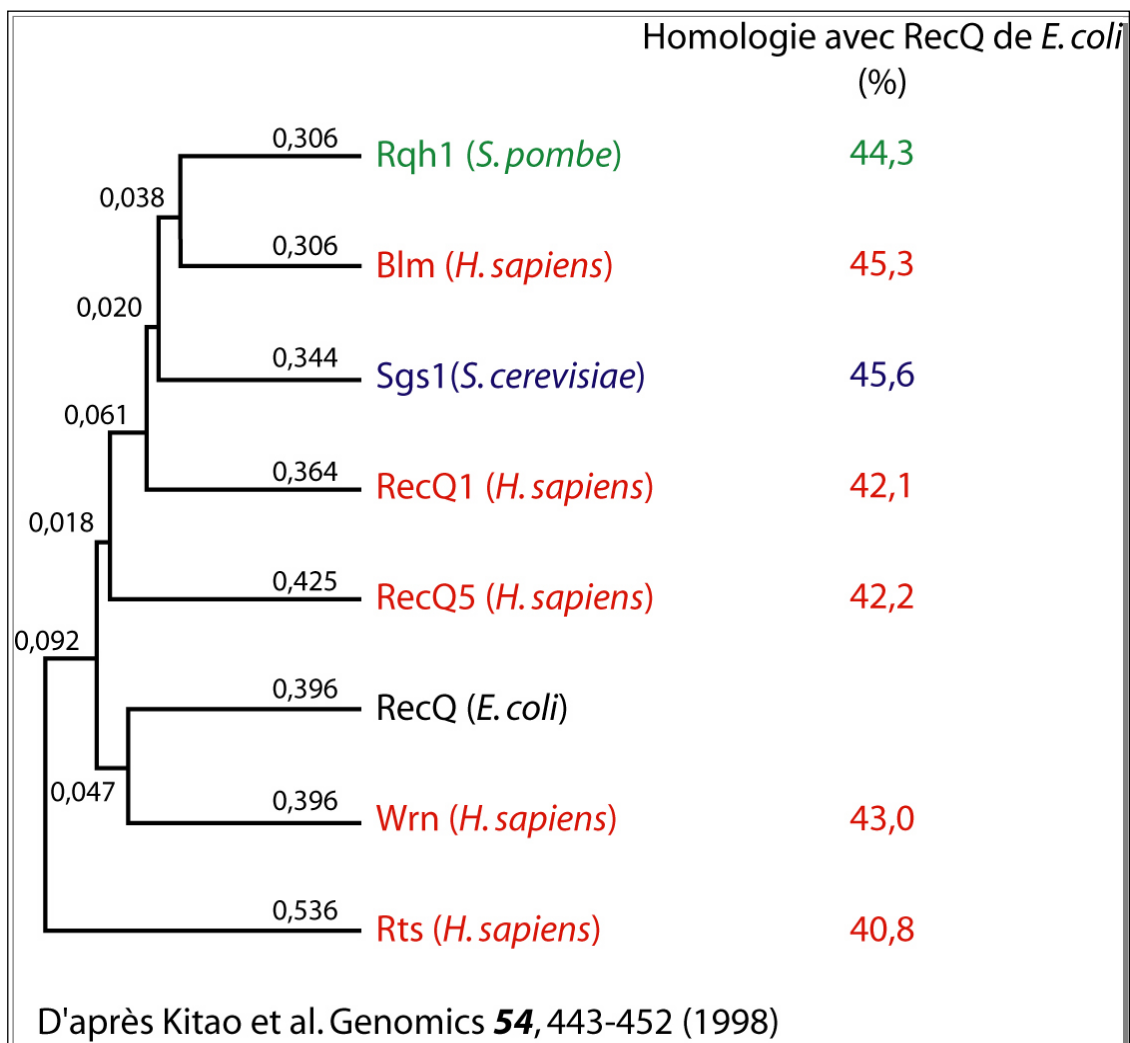


Figure 10 : Arbre phylogénétique

Les récents résultats obtenus chez Francis Fabre et dans plusieurs autres laboratoires indiquent que la fonction de *SGS1* est conservée dans les cellules d'eucaryotes supérieurs. Le phénotype des cellules mutantes *blm*, *wrn*, *rqh1*, *recQ4*

ou *sgs1* suggère que le produit de ces gènes est impliqué dans la recombinaison, la réplication et la transcription.

A ce jour, peu d'informations précises concernant la fonction de ces gènes sont disponibles, et une première partie de mon travail a consisté à utiliser la levure *S. cerevisiae* pour effectuer des approches génétiques pour comprendre l'implication de *SGS1* dans le métabolisme des acides nucléiques.

2. Rôle de Sgs1 dans la réparation de l'ADN par recombinaison

Les levures mutées pour le gène *SGS1* présentent une instabilité génétique caractérisée notamment par des fréquences élevées d'échanges entre chromatides sœurs (phénotype partagé avec les cellules "Bloom") et par une ségrégation anormale des chromosomes homologues (Gangloff et al., 1994b; Watt et al., 1995). Par ailleurs, les données montrant que l'expression de *SGS1* est maximale en phase S (Spellman et al., 1998) et que la protéine se complexe avec des topoisomérases impliquées notamment dans la décaténation de molécules d'ADN répliquées, plaident en faveur d'un rôle de la protéine Sgs1 au cours de la réplication de l'ADN.

Nous avons étudié le rôle de cette protéine dans la réparation de l'ADN en postulant que son activité n'est pas restreinte aux événements spontanés initiés en phase S. Si cette hypothèse est vraie, les mutants devraient présenter une sensibilité particulière aux radiations ionisantes. Les rayons γ induisent dans l'ADN des cassures double-brin qui ne sont efficacement réparées chez la levure que par recombinaison homologue. Cette dernière s'effectue entre chromatides sœurs dans les cellules haploïdes et entre chromatides sœurs et chromosomes homologues dans les cellules diploïdes. En ce qui concerne les cellules haploïdes, l'effet des rayons γ est létal aussi bien pour les simples mutants *sgs1* que pour les sauvages. Seule la sous population de cellules en phase S/G2, qui peuvent réparer les cassures de l'ADN par recombinaison entre chromatides sœurs, est résistante, et la mutation *sgs1* n'affecte pas cette réparation. En revanche, les diploïdes mutés sont très sensibles à ces radiations, ce qui pourrait bien refléter une diminution de l'efficacité de recombinaison entre chromosomes homologues (Figure 11a). Ce défaut est confirmé par la forte diminution de recombinaison intragénique provoquée par les rayons γ (Figure 11b). Ainsi, après une irradiation, Sgs1 participe d'une

manière directe ou indirecte à la formation de molécules recombinantes, mais seulement lorsque les chromosomes homologues sont impliqués. Ce résultat n'est pas en contradiction avec le fait que *sgs1* augmente les taux spontanés de recombinaison probablement initiés au cours de la phase S, alors qu'après irradiation les événements sont initiés dans toutes les phases du cycle cellulaire. Ceci illustre la complexité du rôle de Sgs1 dont l'absence peut, selon les cas, augmenter ou réduire les taux de recombinaison.

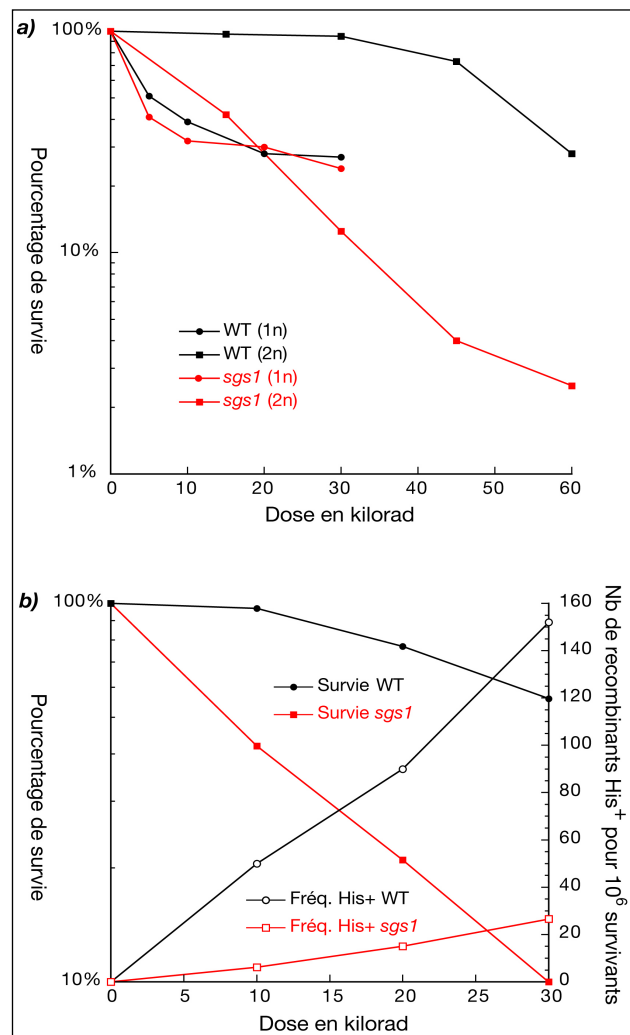


Figure 11 : Survie et recombinaison après irradiation aux γ

3. Etude de l'interaction des hélicases Sgs1 et Srs2

Une autre hélicase de levure, Srs2, qui ne possède pas d'orthologue connu dans les cellules de mammifères, est également impliquée dans le maintien de la stabilité du génome. Plusieurs observations suggèrent que le gène *SRS2* pourrait également être impliqué pendant la phase de réplication de l'ADN : les mutants *srs2* présentent

des taux élevés de recombinaison spontanée (Rong et al., 1991); tout comme *SGS1*, *SRS2* est fortement exprimé en phase S (Heude et al., 1995), et la protéine possède de fortes homologues de séquence avec les protéines Rep, UvrD et PcrA (Aboussekhra et al., 1989), des hélicases bactériennes elles-mêmes impliquées dans la réplication et la réparation. *In vitro*, il a été montré que les hélicases Sgs1 et Srs2 possèdent la même polarité 3' → 5' (Lu et al., 1996; Rong and Klein, 1993), il était donc tentant de spéculer que les activités de ces protéines puissent au moins partiellement se substituer l'une à l'autre.

Afin de tester une éventuelle redondance de fonction, des double-mutants *sgs1 srs2* ont été construits en croisant des simple-mutants de signe sexuel opposé. Les cellules diploïdes sont mises à sporuler, et les tétrades sont disséquées (Figure 12a). Parmi les spores haploïdes, certaines portent les délétions de *SGS1* et de *SRS2*. Ces cellules double mutantes présentent une faible vitesse de croissance liée à une mort stochastique des cellules (Gangloff et al., 2000), un résultat en accord avec un rôle compensatoire de ces deux hélicases lors de la réplication. Se pose alors la question concernant le rôle exact de ces hélicases. Plusieurs possibilités coexistent. Elles pourraient : (i) ouvrir l'hélice en amont de la fourche de réplication (ii) jouer un rôle dans la terminaison de la réplication en interaction éventuelle avec des topoisomérases (iii) empêcher la formation de structures secondaires de l'ADN qui bloqueraient la réplication (iv) avoir un rôle dans la réinitialisation de la synthèse après un arrêt de la réplication (v) être impliquées dans les événements de recombinaison formés au cours de la réplication.

Nous avons exploré génétiquement les relations pouvant exister entre la recombinaison homologue et les fonctions de Sgs1 et de Srs2. L'hypothèse d'une activité délétère des protéines de recombinaison chez le double mutant *sgs1 srs2* était en effet suggérée par certaines propriétés des mutants *srs2* indiquant qu'une fonction du gène *SRS2* consisterait à empêcher la formation de structures de recombinaison qui, pour des raisons encore inconnues, conduisent à une létalité (Chanet et al., 1996). Si le même type de phénomène intervient lors de la réplication chez les double mutants *sgs1 srs2*, l'élimination de la capacité des cellules à initier la recombinaison homologue devrait permettre aux levures mutées pour *SRS2* et *SGS1* de se développer normalement. Cette expérience est possible chez la levure étant

donné que la recombinaison homologue n'est pas essentielle à la croissance végétative. Nous avons observé que l'abolition du gène *RAD51* qui gouverne les étapes précoces de la recombinaison homologue et qui possède plusieurs orthologues humains, permet non seulement la survie de tous les triple-mutants (Figure 12b), mais restaure également des vitesses de croissance identiques à celles des cellules délétées uniquement pour *RAD51*, (Tableau 6).

Génotype	Génération en minutes	Efficacité d'étalement (%)
Sauvage	90	90
<i>srs2</i>	90	80
<i>sgs1</i>	100	70
<i>rad51</i>	115	70
<i>srs2 sgs1</i>	185	35
<i>srs2 sgs1 rad51</i>	115	70

Tableau 6 : Temps de doublement et efficacité d'étalement

Des résultats identiques sont observés avec les gènes *RAD55* ou *RAD57* homologues à *RAD51* (Figure 12b et 12c). Ceci montre que le rôle des hélicases Sgs1 et Srs2 est lié à la recombinaison et non pas directement à un rôle essentiel dans la transcription de l'ARN ribosomique ou dans la réplication de l'ADN, comme il avait été précédemment suggéré (Lee et al., 1999). En effet, dans cette hypothèse, l'élimination de la recombinaison dans les cellules *sgs1 srs2* ne restaurerait pas une croissance normale.

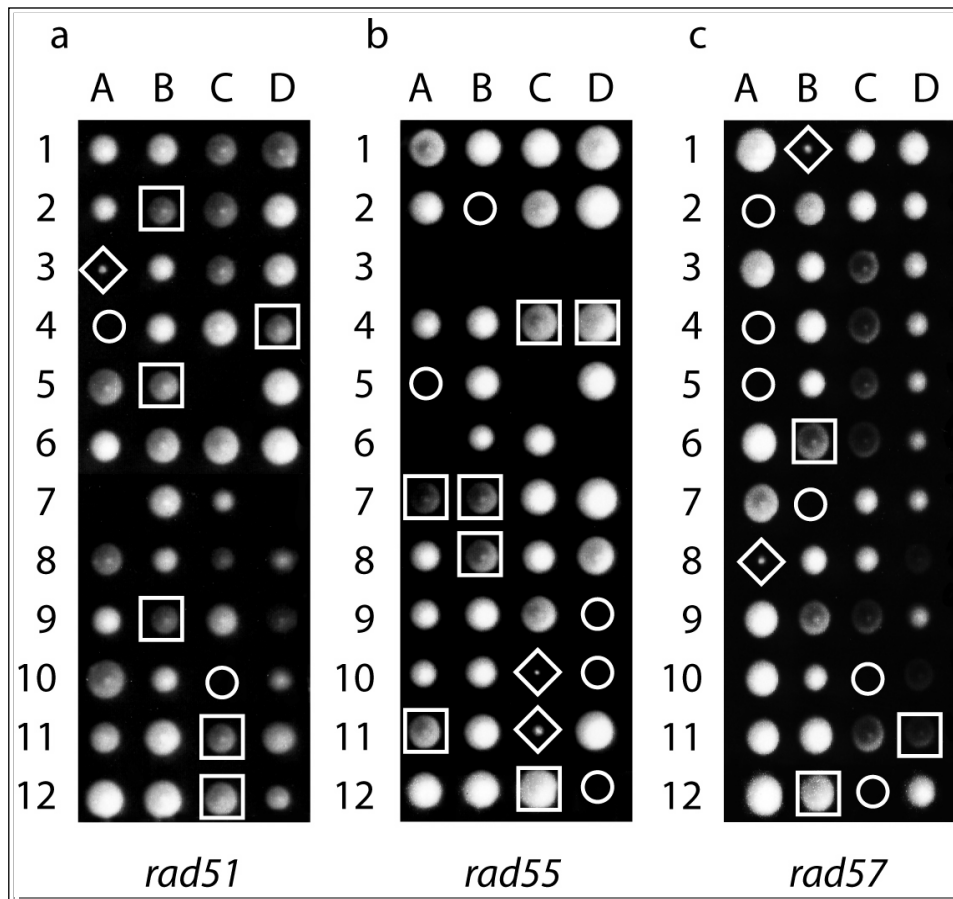


Figure 12 : Interactions génétiques entre *sgs1Δ*, *srs2Δ* et *rad51Δ*

4. Interprétations

Deux hypothèses non exclusives peuvent rendre compte de l'effet délétère de la recombinaison dans les double mutants: (i) les produits des gènes *SGS1* et *SRS2* contribuent à la progression normale d'une fourche de réplication en empêchant l'accès aux protéines de recombinaison (ii) les protéines Sgs1 et Srs2 sont directement impliquées dans la maturation des intermédiaires de recombinaison qui se forment spontanément au cours de la réplication. Dans ce cas, la suppression du phénotype mutant *sgs1 srs2* par la délétion de gènes gouvernant les étapes précoces de la recombinaison suggère un rôle tardif de ces hélicases, à un stade faisant suite à l'envahissement des brins.

L'ensemble de ces résultats permet de penser que les effets des mutations dans les gènes humains orthologues de *SGS1* sont liés à la recombinaison. Il est possible qu'au cours de l'évolution, *SGS1* ait été dupliqué et que les différents gènes de cette famille aient acquis des spécificités de fonction, par exemple :

recombinaison spontanée ou induite par des lésions, rôle spécifique sur des domaines chromosomiques comme les régions télomériques, recombinaison spécialisée et programmée au cours du développement, recombinaison dans différents organes. Ces spécificités pourraient refléter les différences de pathologies associées aux mutations dans Blm, Wrn ou Rts.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article et d'une publication à caractère de vulgarisation.

- Gangloff, S., Soustelle, C et Fabre, F. (2000). Sgs1 and Srs2: helicases with a central role for replication and recombination? *Médecine/Sciences* 16, 1102-1105.
- Gangloff, S., Soustelle, C., and Fabre, F. (2000). Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 & Srs2 helicases. *Nature Genetics* 25, 192-194.

III. TRAVAUX ACTUELS ET PERSPECTIVES

Etant donné que nos précédents résultats suggéraient un rôle possible de Sgs1 dans une phase tardive du processus de recombinaison, nous avons voulu explorer davantage cette hypothèse. En effet, les processus précoces de la recombinaison homologue sont bien décrits du point de vue de la génétique et de l'enzymologie. En revanche, les étapes qui sont postérieures à la formation du nucléofilament et de l'envahissement d'un duplex homologue sont encore largement inconnues.

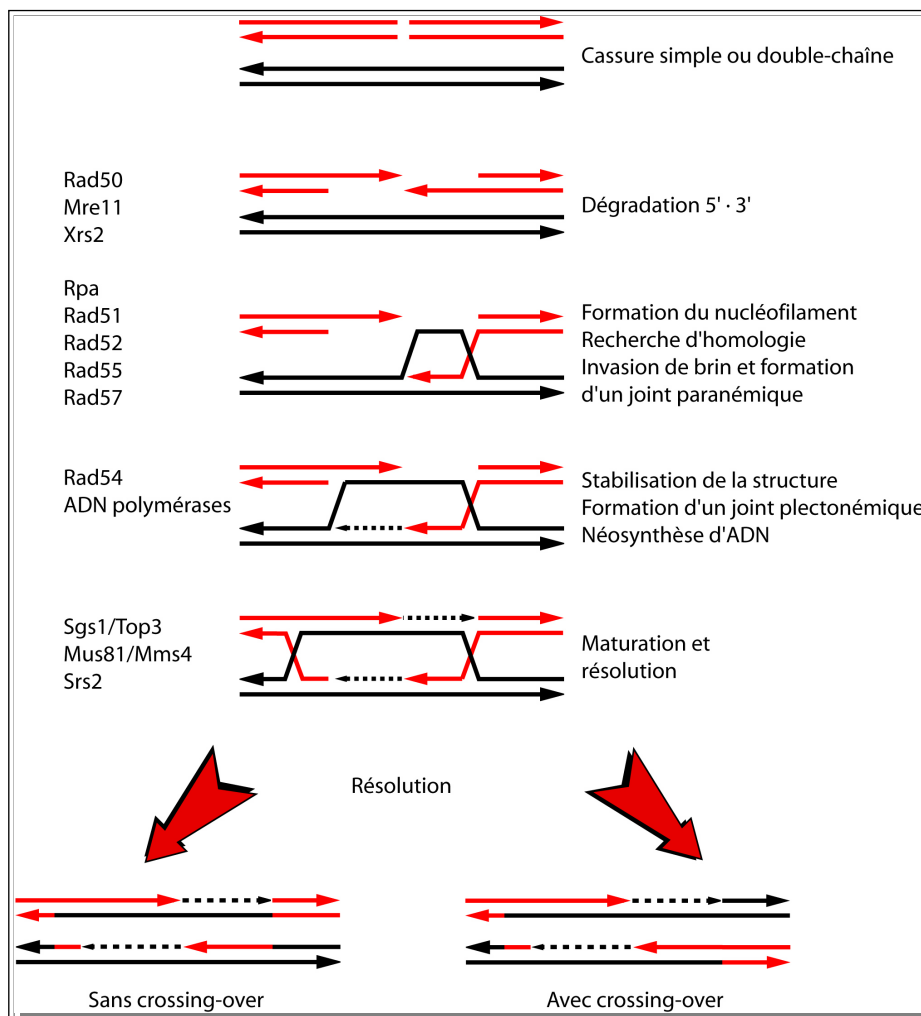


Figure 13 : Chronologie de la recombinaison

Au cours d'un événement de recombinaison, un ADN endommagé est métabolisé de telle sorte qu'une molécule simple-chaîne portant une extrémité 3' OH soit formée. Cette étape fait intervenir le complexe hétérotrimérique Mre11-Rad50-Xrs2 (Ivanov et al., 1994; Sugawara and Haber, 1992; Tsubouchi and Ogawa, 1998). L'ADN simple-chaîne ainsi formé est immédiatement protégé par la protéine RP-A,

affine de cette structure. Pour qu'un événement de recombinaison puisse avoir lieu, cet ADN simple-chaîne doit être nettoyé et recouvert d'un nucléofilament protéique Rad51 (Paques and Haber, 1999). L'étape qui assure l'enlèvement de RP-A est catalysée par les protéines Rad51 et Rad52, ce qui permet la polymérisation d'un nucléofilament de Rad51 sur cet ADN. Des protéines accessoires sont également utilisées pour stabiliser cette structure et faciliter les étapes ultérieures de ce processus. Ce sont les produits des gènes *RAD55* et *RAD57*. Des expériences de "double-hybride" ont montré que Rad55 interagit avec Rad51, et que Rad57 interagit avec Rad55 (Johnson and Symington, 1995). Le nucléofilament ainsi formé est compétent pour former des joints paranémiques avec l'ADN et pour ainsi chercher des séquences homologues. La protéine Rad54, un membre de la famille Snf/Swi, est une ATPase ADN double-brin dépendante qui est impliquée dans l'ouverture de la double-hélice d'ADN, la formation d'un joint plectonémique avec le nucléofilament et dans le démarrage de la synthèse réparatrice (Mazin et al., 2000; Solinger and Heyer, 2001; Sung et al., 2000; Van Komen et al., 2000) (Figure 13).

A. Identification de gènes impliqués dans la phase tardive de la recombinaison

Afin d'identifier des gènes impliqués dans le processus tardif de maturation d'intermédiaires de recombinaison autres que *SRS2*, nous avons recherché des mutations en présence desquelles une délétion de *SGS1* est létale et avons analysé si cette combinaison est viable en l'absence de recombinaison homologue. La première étape de ce crible nous a été facilitée par les travaux réalisés dans le laboratoire de Steve Brill qui ont débouché sur l'isolement de 6 mutants (*slx1*, 2, 3, 4, 5 et 8) de délétion qui sont létaux en l'absence de *Sgs1* et de *Top3* (Mullen et al., 2001). Nous avons construit des mutants de délétion pour chacun de ces gènes et avons confirmé leur caractère synthétique létal avec *sgs1* Δ et *top3* Δ . Nous avons ensuite construit des souches diploïdes hétérozygotes à la fois pour les *slx* Δ , *sgs1* Δ et *rad51* Δ et avons analysés les produits méiotiques par dissection de tétrades. Sur les six mutations analysées, seules deux d'entre elles étaient viables en l'absence de *RAD51*. Il s'agit des mutants *slx2* Δ et *slx3* Δ qui sont des allèles des gènes *MUS81* et *MMS4* (Figure 14).

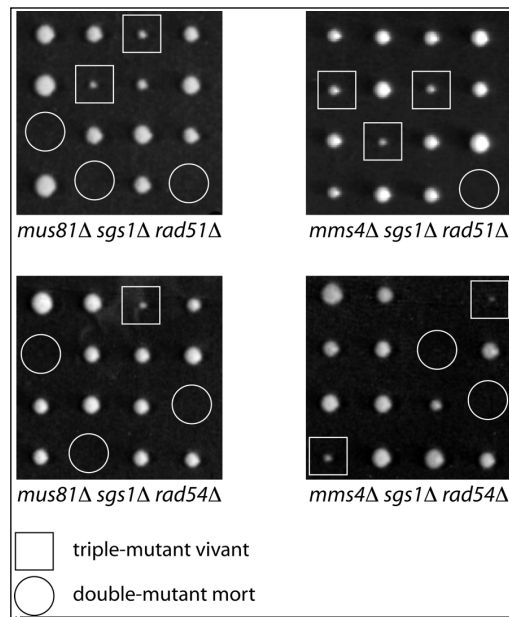


Figure 14 : Dissection de souches hétérozygotes

MUS81 est un gène non essentiel qui code pour une protéine de 632 acides aminés. Une interaction physique entre les protéines Mus81 et Mms4 via leurs régions C-terminale a été démontrée (Mullen et al., 2001). La protéine Mms4 est connue pour son implication dans la réparation des dommages de l'ADN liés au MMS (Xiao et al., 1998). Les protéines Mus81/Mms4 présentent une homologie avec les protéines de la famille des endonucléases XPF/ERCC1 (Mullen et al., 2001). Mus81 et Mms4 sont homologues respectivement aux protéines Rad1 et Rad10 de *S. cerevisiae* qui sont impliquées dans le mécanisme de NER (Mullen et al., 2001). Mus81 est une protéine ubiquitaire pour laquelle un orthologue a été isolé récemment chez l'homme (Chen et al., 2001). En plus du domaine endonucléase, la protéine Mus81 contient deux domaines "hélices – boucle – hélices" couramment retrouvés dans les protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Le gène *MUS81* a été identifié grâce à un crible double-hybride utilisant la protéine Rad54 comme "appât". Un mutant *mus81* se caractérise par les phénotypes suivants : une forte sensibilité aux ultraviolets (UV) et au MMS, ainsi qu'une méiose altérée (Interthal and Heyer, 2000). L'activité endonucléolytique du complexe Mus81/Mms4 a été mise en évidence *in vitro*. Les substrats préférentiels de ce complexe sont les fourches de réplication et les duplex d'ADN porteurs d'un simple brin branché se terminant par une extrémité 3'-OH sortante. L'interaction Mus81/Mms4 est

indispensable à la fixation à l'ADN et à la fonction endonucléolytique du complexe hétérodimérique Mus81/Mms4 (Kaliraman et al., 2001).

B. Tous les gènes de la recombinaison homologe suppriment les combinaisons létales

Nous avons ensuite voulu savoir si des délétions de *RAD52*, *RAD54*, *RAD55* et *RAD57* sont également capables de sauver les doubles mutants *sgs1Δ* ou *top3Δ* et *mus81Δ* ou *mms4Δ* (Figure 14 et Figure 15). Ces résultats sont différents de ceux que nous avons obtenus avec le double-mutant *sgs1Δ srs2Δ*. En effet, toutes les combinaisons sont viables en l'absence de n'importe lequel des gènes qui contrôlent les premières étapes de la recombinaison. De plus, bien que la suppression de la létalité soit totale, celle de la vitesse de croissance ne l'est pas indiquant un rôle pour ces différentes protéine dans un processus indépendant de la recombinaison.

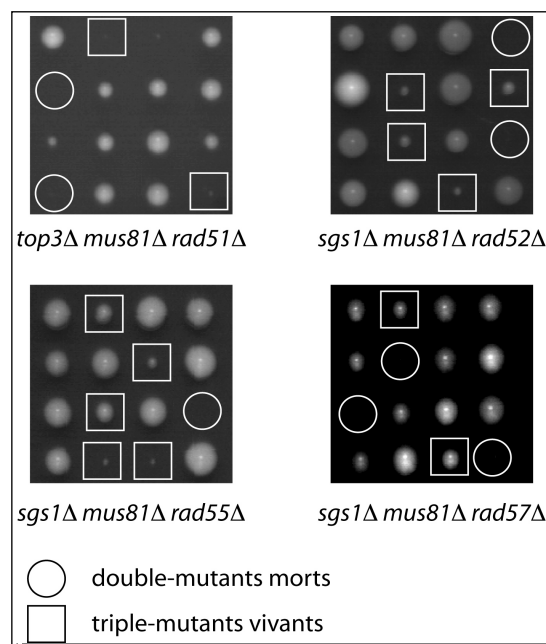


Figure 15 : Effet de *top3Δ* et des autres mutants “*rad*”

Dans le cas du double-mutant *sgs1Δ srs2Δ*, nous avons montré que cette association peut être sauvée par une élimination de Rad51, Rad52, Rad55 ou Rad57, mais pas de Rad54 (Gangloff et al., 2000). Par ailleurs, dans le cas où la suppression est réalisée, les triple-mutants se développent tous à la même vitesse que le simple-mutant de recombinaison correspondant. L'ensemble de ces résultats indique que Sgs1 et Top3 d'une part et Mus81 et Mms4 d'autre part définissent deux

voies alternatives de maturation d'intermédiaires de recombinaison tardifs dont l'activité est essentielle en aval de la réaction catalysée par Rad54. Ces résultats suggèrent également que Sgs1/Top3 et Mus81/Mms4 exercent une activité non essentielle dans un processus métabolique non recombino-gène. Finalement, la dissection de diploïdes hétérozygotes pour *srs2Δ*, *mus81Δ* ou *mms4Δ* et *rad54Δ* (Figure 16) nous a permis de montrer que les combinaisons double-mutantes *mus81Δ srs2Δ* et *mms4Δ srs2Δ* ou *mms4Δ rad54Δ* et *mus81Δ rad54Δ* sont parfaitement viables alors que les double-mutants *srs2Δ rad54Δ* (Palladino and Klein, 1992) et les combinaisons triple-mutantes *srs2Δ rad54Δ mus81Δ* ou *srs2Δ rad54Δ mms4Δ* sont létales, mais sauvées en l'absence de Rad51, Rad52, Rad55 ou Rad57 (Gangloff et al., 2000; Heude et al., 1995 ; Schild, 1995).

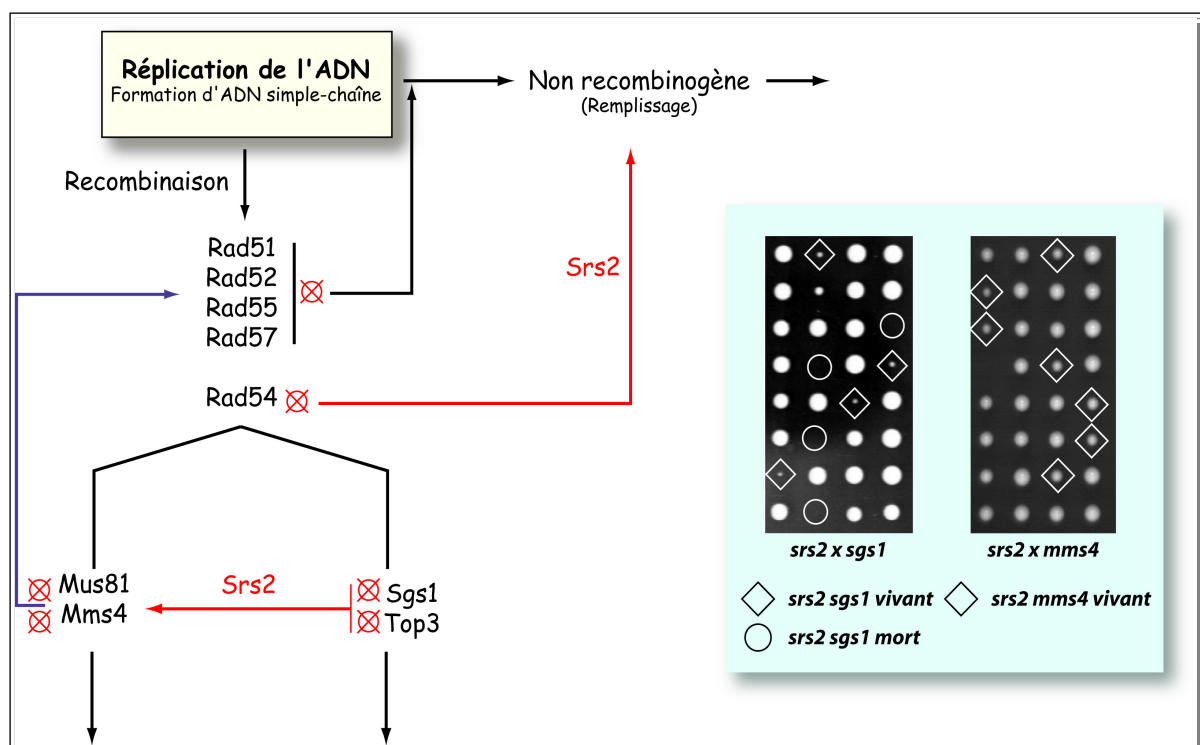


Figure 16 : Modèle de travail

Ceci suggère que Mus81 et Mms4 n'appartiennent pas à la voie Srs2, et a conduit au modèle de la Figure 16 qui rend compte de toutes ces interactions. Srs2 agirait donc au moins à deux niveaux distincts : l'un en amont de Rad54 pour éviter à la recombinaison d'intervenir, et l'autre en aval de Rad54 pour défaire des intermédiaires immatures. Dans le cas de la réversion d'intermédiaires bloqués, Srs2

fonctionne de façon asymétrique, puisqu'il est requis en l'absence de Sgs1 mais pas de Mus81 ou Mms4.

C. Les CDBs ne sont pas des lésions spontanées fréquentes

Etant donnée la nature spontanée des événements de recombinaison que nous analysons ainsi que les profils d'expression des gènes *SGS1* et *SRS2* (Spellman et al., 1998), il est raisonnable de postuler que les lésions qui conduisent à la formation d'intermédiaires qui peuvent être pris en charge par la recombinaison homologue sont générées au cours de la réplication.

La recombinaison n'est pas initiée sur de l'ADN intact, mais plutôt sur des molécules endommagées par des cassures simple ou double-chaîne ou sur des régions dont le surenroulement révèle des régions d'ADN simple-chaîne. Chez *S. cerevisiae*, les CDBs sont essentiellement réparées par recombinaison homologue et dépendent très fortement de la présence de Rad52. Ainsi, si des CDBs sont à l'origine des intermédiaires toxiques observés chez les double-mutants *sgs1Δ srs2Δ* ou *sgs1Δ mus81Δ*, alors la suppression de la létalité en l'absence de Rad52 devrait strictement dépendre du "nonhomologous end-joining" (NHEJ), le seul autre mécanisme connu capable de sceller des CDBs.

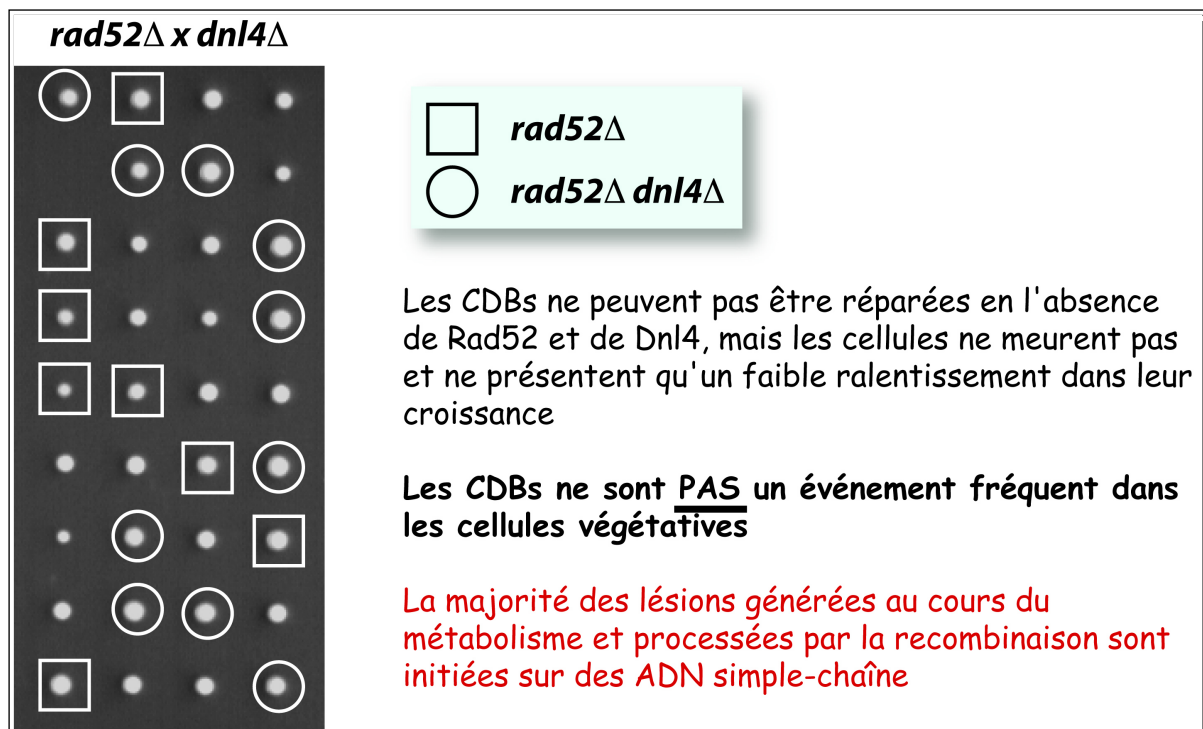


Figure 17 : Les CDBs ne sont pas fréquentes au cours du métabolisme

Nous avons testé cette hypothèse en construisant une souche mutée à la fois pour Rad52 et Dnl4, la ligase spécifique du NHEJ (Schar et al., 1997; Teo and Jackson, 1997). Les cellules double-mutantes se développent comme les cellules *rad52Δ*, ce qui indique que les CDBs ne sont pas fréquentes dans les cellules sauvages (Figure 17). De plus, l'oblitération du gène *DNL4* n'affecte pas non plus la croissance des triple-mutants *rad52 srs2 sgs1*, ce qui confirme que les événements supprimés en l'absence de recombinaison homologue ne sont pas initiés par des CDBs, et donc que ces dernières sont très peu fréquentes au cours du métabolisme normal des cellules.

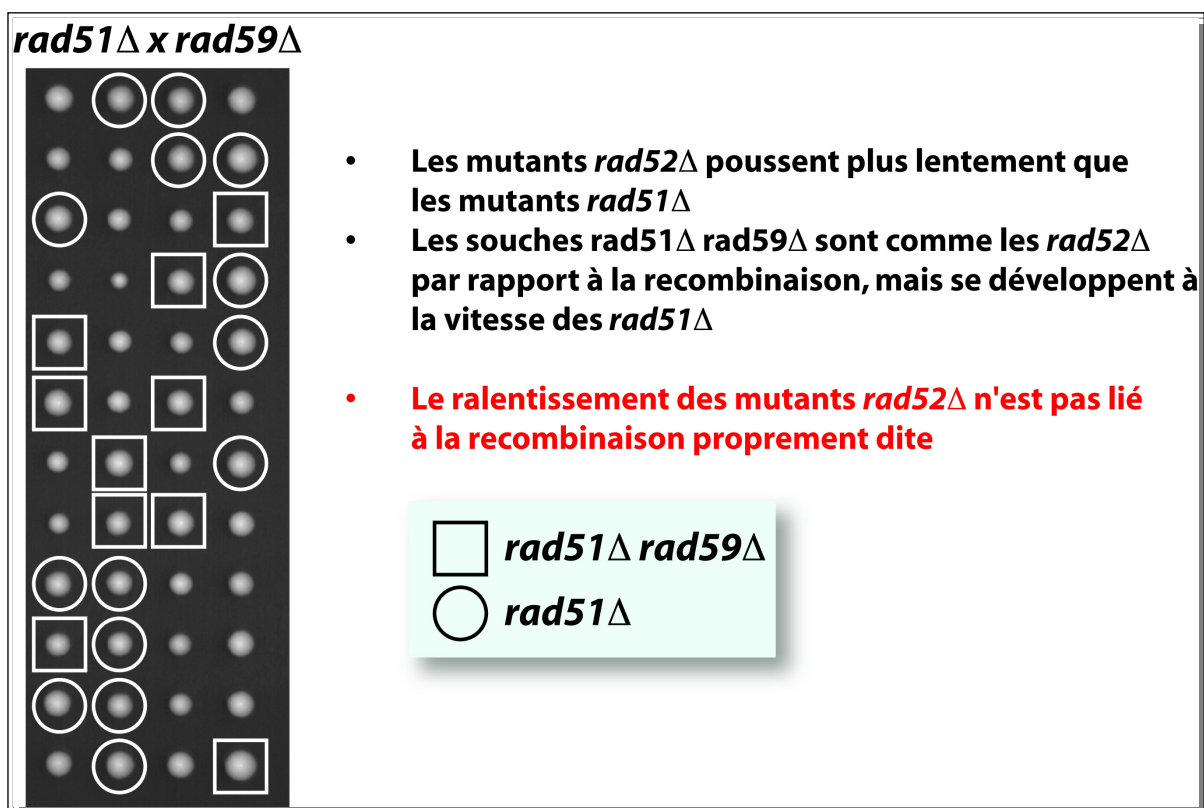


Figure 18 : Le ralentissement des mutants *rad52Δ* n'est pas lié à la recombinaison

Ces conclusions sont vraies pour des événements supprimés par *rad52Δ*. Cependant, puisque les mutants *rad52Δ* se développent à une vitesse plus faible que les mutants *rad51Δ* (Tableau 7), une partie des événements de recombinaison pourrait être initiée par des CDBs qui pourraient être réparées en l'absence de Rad51. De tels mécanismes pourraient être le "Break-Induced Replication" (BIR) ou le "Single-Strand Annealing" (SSA) qui sont strictement dépendants de Rad52 et

seulement partiellement dépendants de Rad51 (Paques and Haber, 1999). Cette idée a été analysée génétiquement par le biais d'une mutation dans le gène *RAD59* qui réduit très fortement le BIR et le SSA résiduel dans les mutants *rad51Δ* (Signon et al., 2001; Sugawara et al., 2000). Nous avons trouvé que l'absence de Rad59 ne modifie la vitesse de croissance ni des simple-mutants *rad51Δ*, ni des triple-mutants *rad51Δ sgs1Δ srs2Δ* (Tableau 7). Ces résultats suggèrent très fortement que le BIR ou le SSA ne sont pas nécessaires pour métaboliser des intermédiaires de recombinaison en l'absence de Rad51.

Génotype relevant	Nom de la souche	Doublement en min.
Wild-type	FF18733	105
<i>rad51</i>	FF181079	105
<i>sgs1</i>	FF181495	105
<i>srs2</i>	FF18744	105
<i>mus81</i>	FF181659	105
<i>rad59</i>	FF181769	105
<i>lig4</i>	FF181767	105
<i>rad52</i>	FF18742	144
<i>srs2 mus81</i>	FF181661	119
<i>srs2 sgs1</i>	FF181611	372
<i>rad51 sgs1 mus81</i>	FF181667	132
<i>rad51 srs2 sgs1</i>	FF181787	107
<i>rad51 srs2 sgs1 rad59</i>	FF1806	105
<i>rad52 lig4</i>	FF181773	147
<i>rad52 srs2 sgs1</i>	FF181787	145
<i>rad52 srs2 sgs1 lig4</i>	FF181808	145
<i>rad52 sgs1 mus81</i>	FF181787	195

Tableau 7 : Temps de génération des différents mutants

L'ensemble de nos résultats appuie l'hypothèse que les CDBs n'initient pas fréquemment des événements de recombinaison au cours du métabolisme normal de l'ADN, et ne sont pas à l'origine des lésions qui conduisent à des produits toxiques pour la recombinaison en l'absence des différentes combinaisons de mutants que nous avons étudiées. Il semble donc vraisemblable que les lésions initiatrices sont des ADN simple-chaîne.

D. Conclusions de ce travail

L'étude décrite ci-dessus nous a conduit à l'identification des premiers gènes dont les produits interviennent tardivement au cours de la recombinaison, c'est à dire après l'étape catalysée par la protéine Rad54. Après l'étape catalysée par Rad54, la synthèse réparatrice démarre. Si cette structure n'est pas stabilisée, le brin néo-synthétisé peut alors être déplacé et se rattachier avec la molécule réceptrice (**S**ynthesis **D**ependant **S**trand **A**nnealing ou SDSA). Il se forme alors un intermédiaire qui est le substrat préférentiel de l'endonucléase Mus81/Mms4. Au contraire, si cette structure est stabilisée, une double jonction de Holliday va se former. Cette dernière nécessite le produit des gènes Sgs1 et Top3 pour être résolue (Figure 19).

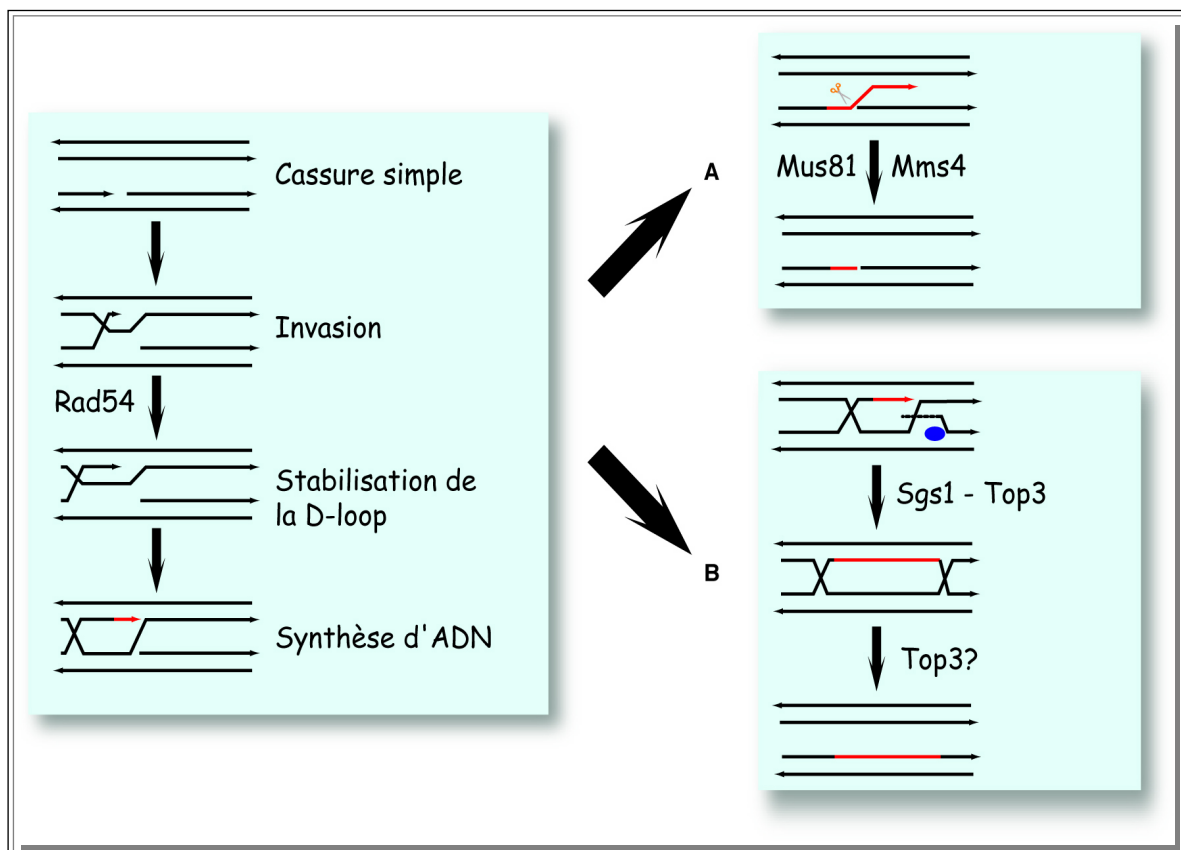


Figure 19 : Schéma de maturation d'intermédiaires tardifs

Nous avons ainsi mis en évidence l'existence de deux voies alternatives permettant de métaboliser des structures de recombinaison générées spontanément au cours de la réplication. Les données biochimiques établies pour ces différentes protéines, ainsi que les interactions génétiques que nous avons mises en évidence nous ont permis de proposer un modèle de résolution des intermédiaires tardifs qui

rend compte de toutes ces interdépendances. La Figure 20 schématise ce qui se passe chez les différents mutants.

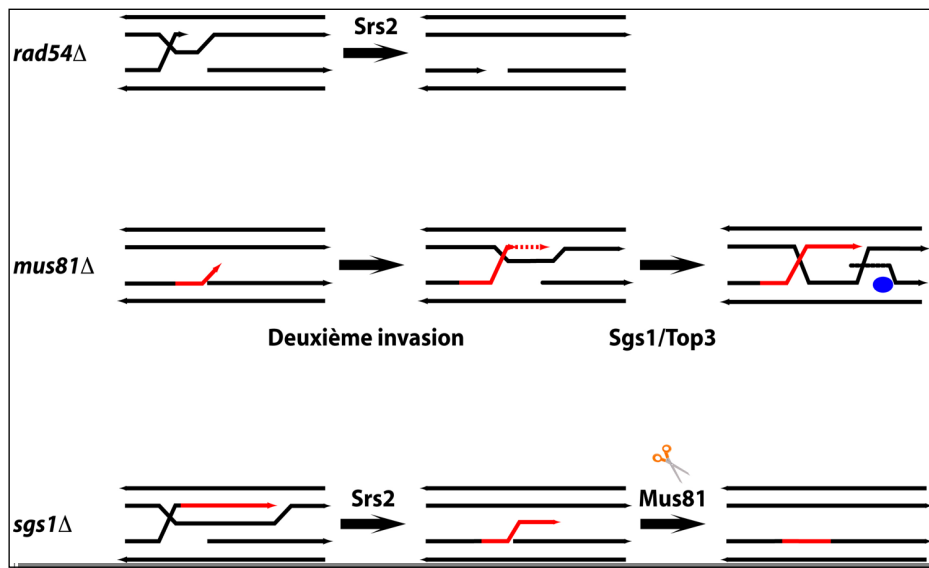


Figure 20 : Maturation des intermédiaires chez les mutants

Finalement, ce travail montre surtout que, contrairement aux idées reçues, le métabolisme normal des cellules n'engendre pas la formation de cassures double-brin. Ceci suggère très fortement que les lésions prises en charge par la recombinaison homologue sont des régions d'ADN simple-brin. Celles-ci peuvent résulter d'une brèche simple-chaîne, mais également d'une région d'ADN double-brin dont la superhélicité locale est sous enroulée.

E. Perspectives

Les derniers résultats que nous avons obtenus permettent de formuler une hypothèse quant au rôle de Mus81/Mms4 et Top3/Sgs1 dans la résolution d'intermédiaires de recombinaison. Selon notre modèle, deux voies de résolution des intermédiaires tardifs de recombinaison sont actives et font intervenir les gènes *SGS1/TOP3* et *MUS81/MMS4*. La formation d'une double jonction de Holliday est la configuration qui peut donner naissance à un crossing over (CO). Notre modèle prédit que la voie Sgs1/Top3 contrôle la formation de CO alors que la voie Mus81/Mms4 permet le SDSA, un mécanisme qui n'est pas associé à des CO (cf. Figure 20). L'analyse de la fréquence des CO chez des mutants oblitérés pour l'une ou l'autre des voies contrôlée par ces gènes devrait nous renseigner sur les rôles des protéines sauvages dans le processus de résolution.

1. Etude du contrôle des CO avec un substrat chromosomique

Afin d'analyser l'influence des voies *SGS1* et *MUS81* sur la fréquence spontanée des CO associés à un événement de recombinaison homologue, deux approches parallèles sont envisagées. La première approche consiste à déterminer la fréquence des CO spontanés et radio-induits en s'appuyant sur un substrat chromosomique dans une souche haploïde. Dans un tel système, il est possible de sélectionner un événement de recombinaison entre deux allèles d'un même gène (*ARG4*), situés sur deux chromosomes différents (V et VIII) et dans une orientation identique par rapport à leur centromère respectif (Figure 21). Ce type de construction devrait permettre de récupérer à la fois des événements de recombinaison non associés à un CO ainsi que des translocations réciproques qui sont la signature moléculaire d'un CO. Il faut cependant noter que les événements de recombinaison formés dans ce système s'effectuent entre chromosomes non homologues, ce qui risque d'influencer leur dépendance génétique par rapport à des événements n'impliquant strictement que des chromatides sœurs. Dans l'hypothèse la simple, nous nous attendons à observer une diminution de la fréquence des CO chez les mutants *sgs1* et une légère augmentation chez les mutants *mus81*.

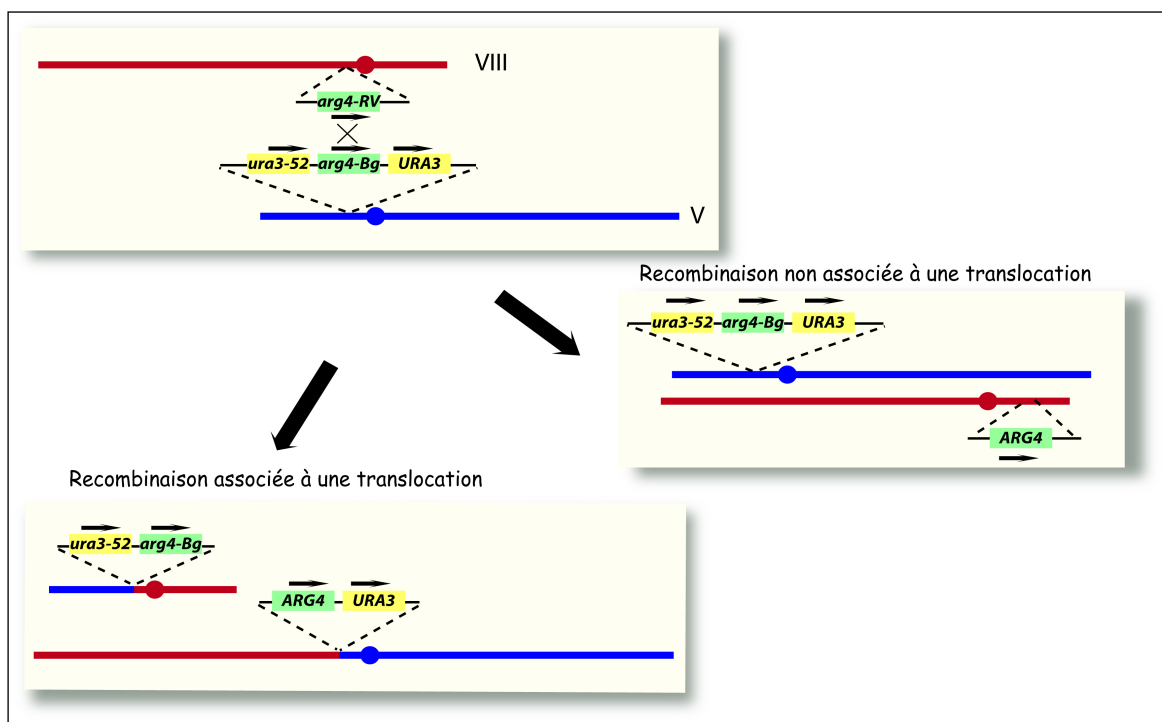


Figure 21 : Substrat chromosomique

Concrètement, des recombinants prototrophe envers l'arginine seront indépendamment sélectionnés avant d'être testés pour la présence de la duplication parentale des allèles *URA3*. Chez les recombinants transloqués, un faible taux de papillations sur un milieu qui contre sélectionne la présence du gène *URA3* devrait détecté, alors que les recombinants possédant la configuration parentale forment des papilles nombreuses. Il est à noter que les différentes configurations sont également détectables moléculairement grâce au changement de la taille des chromosomes recombinés.

2. Etude du contrôle des CO avec un substrat plasmidique

La deuxième approche consiste à mesurer la fréquence des CO en s'appuyant sur un substrat plasmidique linéaire qui peut se stabiliser, après transformation dans la cellule, de deux façons exclusives. Soit le plasmide s'intègre dans le génome (CO), soit il est refermé par l'action de la ligase et peut se maintenir sous la forme d'un épisode extrachromosomique (Figure 22).

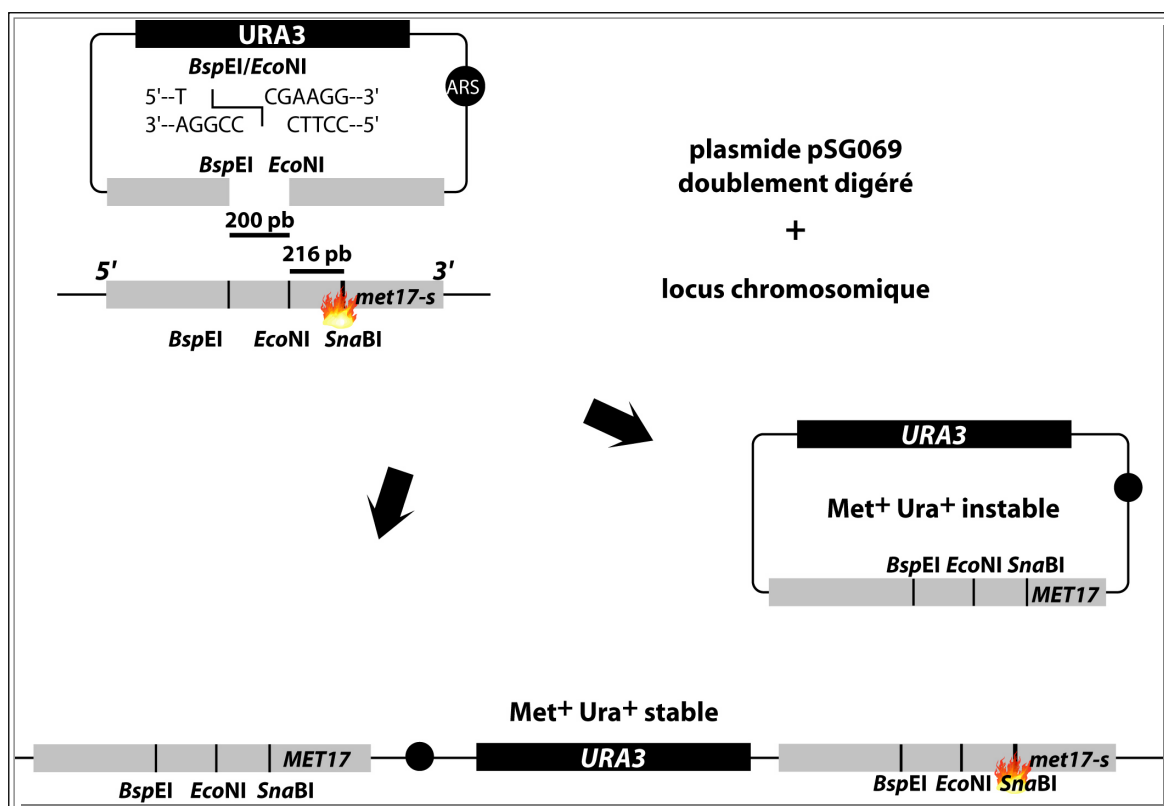


Figure 22 : Substrat plasmidique

Le plasmide utilisé pour cette étude porte les allèles sauvages des gènes *MET17* et *URA3*. La digestion du plasmide par les enzymes *BspEI* et *EcoNI* crée une délétion de 238 pb dans le gène *MET17*. Cette digestion permet donc de simuler une cassure double-chaîne avec des extrémités non compatibles, ce qui exclut toute possibilité de re-ligature du plasmide doublement digéré. Cette molécule ne pourra être réparée que par un événement de recombinaison avec la copie homologue présente sur le chromosome. La mise en évidence de la réparation de ce plasmide sera réalisée dans des souches portant un allèle muté de *MET17* (*met17-s*) qui se caractérise par la disparition du site de coupure *SnaBI* entraînant un décalage du cadre de lecture et conduisant à la formation d'une protéine inactive. Cette mutation est située 216 pb en aval de la délétion créée par la double digestion *BspEI/EcoNI* (Bartsch et al., 2000).

Ce crible permet de mettre en évidence des événements de recombinaison homologue en testant l'apparition de colonies prototrophe envers l'uracile, mais aussi de détecter les CO associés à ces événements de recombinaison en mesurant la stabilité de cette prototrophie.

3. Conclusions

Le modèle de résolution des intermédiaires tardifs de recombinaison que nous proposons implique les voies contrôlées par les gènes *SGS1/TOP3* ou *MUS81/MMS4*. La voie Sgs1/Top3 peut être impliquée dans la migration et la résolution de la double jonction de Holliday qui est formée au cours de la conversion génique. La voie Mus81/Mms4 peut, quant à elle, être impliquée dans le clivage nucléolytique des structures branchées qui peuvent apparaître au cours du mécanisme de SDSA. Dans ce modèle, seule la voie Sgs1/Top3 permet la formation d'une translocation réciproque, ce qui laisse supposer un contrôle des gènes Sgs1/Top3 sur les CO. Les deux approches proposées pour comprendre le rôle de Sgs1/Top3 et Mus81/Mms4 dans la résolutions d'intermédiaires de recombinaison sont complémentaires. La première, fondée sur le substrat chromosomique, est soit spontanée, puisque la nature de la cassure induisant la recombinaison homologue est aléatoire, soit induite par des agents introduisant des dommages dans l'ADN. La deuxième s'appuie sur un substrat plasmidique et est induite par une cassure double-chaîne simulée par la linéarisation du plasmide.

Le modèle de résolution des intermédiaires sur lequel est fondé cette étude concerne des événements mitotiques spontanés qui mettent essentiellement en jeu des chromatides soeurs. De tels événements ne sont malheureusement pas observables puisqu'ils conduisent à des molécules recombinantes identiques. Les approches expérimentales que nous projetons d'utiliser ont pour but de simuler de tels événements afin d'en comprendre le déroulement. Le substrat chromosomique simule bien un événement spontané, mais entre deux chromosomes différents. Le substrat plasmidique, quant à lui, nous permet de nous affranchir de l'initiation de la recombinaison puisque l'événement que nous analyserons est induit exclusivement par une cassure double-chaîne. Ces deux approches sont parfaitement indépendantes l'une de l'autre, ce qui renforcera la valeur physiologique des résultats que nous obtiendrons.

IV. CITATIONS

Aboussekhra, A., Chanet, R., Zgaga, Z., Cassier-Chauvat, C., Heude, M., and Fabre, F. (1989). *RADH*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of *radH* mutants and sequence of the gene. *Nucleic Acids Res* 17, 7211-7219.

Bardwell, A. J., Bardwell, L., Johnson, D. K., and Friedberg, E. C. (1993). Yeast DNA recombination and repair proteins Rad1 and Rad10 constitute a complex *in vivo* mediated by localized hydrophobic domains. *Mol Microbiol* 8, 1177-1188.

Bartsch, S., Kang, L. E., and Symington, L. S. (2000). *RAD51* is required for the repair of plasmid double-stranded DNA gaps from either plasmid or chromosomal templates. *Mol Cell Biol* 20, 1194-1205.

Bendixen, C., Gangloff, S., and Rothstein, R. (1994). A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 22, 1778-1779.

Bloom, D. (1954). Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs. *Am J Dis Child* 88, 754-758.

Bruschi, C. V., and Esposito, M. S. (1983). Enhancement of spontaneous mitotic recombination by the meiotic mutant *spo11-1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 7566-7570.

Caskey, C. T., Pizzuti, A., Fu, Y. H., Fenwick, R. G., Jr., and Nelson, D. L. (1992). Triplet repeat mutations in human disease. *Science* 256, 784-789.

Chanet, R., Heude, M., Adjiri, A., Maloisel, L., and Fabre, F. (1996). Semidominant mutations in the yeast Rad51 protein and their relationships with the Srs2 helicase. *Mol Cell Biol* 16, 4782-4789.

Chen, X. B., Melchionna, R., Denis, C. M., Gaillard, P. H., Blasina, A., Van de Weyer, I., Boddy, M. N., Russell, P., Vialard, J., and McGowan, C. H. (2001). Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions *in vitro*. *Mol Cell* 8, 1117-1127.

Christman, M. F., Dietrich, F. S., and Fink, G. R. (1988). Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell* 55, 413-425.

Edelman, G. M., and Gally, J. A. (1970). Arrangement and evolution of eukaryotic genes (New York, Rockefeller University Press).

Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T. Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocchi, S., Proytcheva, M., and German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83, 655-666.

Esposito, M. S. (1984). Molecular mechanisms of recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: testing mitotic and meiotic models by analysis of hypo-rec and hyper-rec mutations. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 38, 123-159.

Fletcher, H. L. (1994). Possible loss of length conservation and reciprocity during recombination or conversion in tandem arrays. *Genetics* 138, 511-518.

Foucault, F., Vaury, C., Barakat, A., Thibout, D., Planchon, P., Jaulin, C., Praz, F., and Amor-Gueret, M. (1997). Characterization of a new *BLM* mutation associated with a topoisomerase II alpha defect in a patient with Bloom's syndrome. *Hum Mol Genet* 6, 1427-1434.

Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S., Verkerk, A. J., Holden, J. J., Fenwick, R., Jr., Warren, S. T., et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67, 1047-1058.

Fu, Y. H., Pizzuti, A., Fenwick, R., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., de Jong, P., et al. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256-1258.

Gangloff, S., Lieber, M. R., and Rothstein, R. (1994a). Transcription, topoisomerases and recombination. *Experientia* 50, 261-269.

Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L., and Rothstein, R. (1994b). The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* 14, 8391-8398.

Gangloff, S., Soustelle, C., and Fabre, F. (2000). Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nature Genet* 25, 192-194.

German, J. (1993). Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine* 72, 393-406.

Group, H. s. D. C. R. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971-983.

- Harley, H. G., Brook, J. D., Rundle, S. A., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A. J., Harper, P. S., Housman, D. E., and Shaw, D. J. (1992). Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* *355*, 545-546.
- Heude, M., Chanet, R., and Fabre, F. (1995). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase during the mitotic cell cycle, meiosis and after irradiation. *Mol Gen Genet* *248*, 59-68.
- Hieter, P., Mann, C., Snyder, M., and Davis, R. W. (1985). Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* *40*, 381-392.
- Interthal, H., and Heyer, W. D. (2000). *MUS81* encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* *263*, 812-827.
- Ivanov, E. L., Sugawara, N., White, C. I., Fabre, F., and Haber, J. E. (1994). Mutations in *XRS2* and *RAD50* delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *14*, 3414-3425.
- Johnson, R. D., and Symington, L. S. (1995). Functional differences and interactions among the putative RecA homologs Rad51, Rad55, and Rad57. *Mol Cell Biol* *15*, 4843-4850.
- Kaliraman, V., Mullen, J. R., Fricke, W. M., Bastin-Shanower, S. A., and Brill, S. J. (2001). Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes Dev* *15*, 2730-2740.
- Kim, R. A., and Wang, J. C. (1992). Identification of the yeast *TOP3* gene product as a single strand-specific DNA topoisomerase. *J Biol Chem* *267*, 17178-17185.
- Kitao, S., Ohsugi, I., Ichikawa, K., Goto, M., Furuichi, Y., and Shimamoto, A. (1998). Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: Biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics* *54*, 443-452.
- Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R. W., Smithson, W. A., Lindor, N. M., and Furuichi, Y. (1999). Mutations in *RECQL4* cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nature Genet* *22*, 82-84.
- Klapholz, S., and Esposito, R. E. (1980a). Isolation of *SPO12-1* and *SPO13-1* from a natural variant of yeast that undergoes a single meiotic division. *Genetics* *96*, 567-588.

- Klapholz, S., and Esposito, R. E. (1980b). Recombination and chromosome segregation during the single division meiosis in *SPO12-1* and *SPO13-1* diploids. *Genetics* 96, 589-611.
- Klapholz, S., Waddell, C. S., and Esposito, R. E. (1985). The role of the *SPO11* gene in meiotic recombination in yeast. *Genetics* 110, 187-216.
- La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E., and Fischbeck, K. H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352, 77-79.
- Lakich, D., Kazazian, H., Jr., Antonarakis, S. E., and Gitschier, J. (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 5, 236-241.
- Lee, S. K., Johnson, R. E., Yu, S. L., Prakash, L., and Prakash, S. (1999). Requirement of yeast *SGS1* and *SRS2* genes for replication and transcription. *Science* 286, 2339-2342.
- Lehrman, M. A., Goldstein, J. L., Russell, D. W., and Brown, M. S. (1987). Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell* 48, 827-835.
- Lu, J., Mullen, J. R., Brill, S. J., Kleff, S., Romeo, A. M., and Sternglanz, R. (1996). Human homologues of yeast helicase. *Nature* 383, 678-679.
- Malone, R. E., and Hoekstra, M. F. (1984). Relationships between a hyper-rec mutation (*REM1*) and other recombination and repair genes in yeast. *Genetics* 107, 33-48.
- Mazin, A. V., Bornarth, C. J., Solinger, J. A., Heyer, W. D., and Kowalczykowski, S. C. (2000). Rad54 protein is targeted to pairing loci by the Rad51 nucleoprotein filament. *Mol Cell* 6, 583-592.
- Mitchell, A. P., Driscoll, S. E., and Smith, H. E. (1990). Positive control of sporulation-specific genes by the *IME1* and *IME2* products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 2104-2110.
- Morozov, V., Mushegian, A. R., Koonin, E. V., and Bork, P. (1997). A putative nucleic acid-binding domain in Bloom's and Werner's syndrome helicases. *Trends Biochem Sci* 22, 417-418.

- Mullen, J. R., Kaliraman, V., Ibrahim, S. S., and Brill, S. J. (2001). Requirement for Three Novel Protein Complexes in the Absence of the Sgs1 DNA Helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 157, 103-118.
- Murray, J. M., Lindsay, H. D., Munday, C. A., and Carr, A. M. (1997). Role of *Schizosaccharomyces pombe* RecQ homolog, recombination, and checkpoint genes in UV damage tolerance. *Mol Cell Biol* 17, 6868-6875.
- Palladino, F., and Klein, H. L. (1992). Analysis of mitotic and meiotic defects in *Saccharomyces cerevisiae* SRS2 DNA helicase mutants. *Genetics* 132, 23-37.
- Paques, F., and Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 349-404.
- Petes, T. D. (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 410-414.
- Petes, T. D., Malone, R. E., and Symington, L. S. (1991). Recombination in yeast. In *The Molecular & Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics.*, J. R. Broach, J. R. Pringle, and E. W. Jones, eds. (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 407-521.
- Puranam, K. L., and Blackshear, P. J. (1994). Cloning and characterization of *RECQL*, a potential human homologue of the *Escherichia coli* DNA helicase RecQ. *J Biol Chem* 269, 29838-29845.
- Rong, L., and Klein, H. L. (1993). Purification and characterization of the *SRS2* DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268, 1252-1259.
- Rong, L., Palladino, F., Aguilera, A., and Klein, H. L. (1991). The hyper-gene conversion *hpr5-1* mutation of *Saccharomyces cerevisiae* is an allele of the *SRS2/RADH* gene. *Genetics* 127, 75-85.
- Rose, D., Thomas, W., and Holm, C. (1990). Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II. *Cell* 60, 1009-1017.
- Rothstein, R., and Gangloff, S. (1995). Hyper-recombination and Bloom's syndrome: microbes again provide clues about cancer. *Genome Res* 5, 421-426.
- Rothstein, R., Helms, C., and Rosenberg, N. (1987). Concerted deletions and inversions are caused by mitotic recombination between delta sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7, 1198-1207.

- Schar, P., Herrmann, G., Daly, G., and Lindahl, T. (1997). A newly identified DNA ligase of *Saccharomyces cerevisiae* involved in *RAD52*-independent repair of DNA double-strand breaks. *Genes Dev* 11, 1912-1924.
- Schild, D. (1995). Suppression of a new allele of the yeast *RAD52* gene by overexpression of *RAD51*, mutations in *srs2* and *ccr4*, or mating-type heterozygosity. *Genetics* 140, 115-127.
- Seki, M., Miyazawa, H., Tada, S., Yanagisawa, J., Yamaoka, T., Hoshino, S., Ozawa, K., Eki, T., Nogami, M., Okumura, K., and et al. (1994). Molecular cloning of cDNA encoding human DNA helicase Q1 which has homology to *Escherichia coli* RecQ helicase and localization of the gene at chromosome 12p12. *Nucleic Acids Res* 22, 4566-4573.
- Shimamoto, A., Nishikawa, K., Kitao, S., and Furuichi, Y. (2000). Human RecQ5 beta, a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3 alpha and 3 beta. *Nucleic Acids Res* 28, 1647-1655.
- Sia, R. A., and Mitchell, A. P. (1995). Stimulation of later functions of the yeast meiotic protein kinase Ime2p by the *IDS2* gene product. *Mol Cell Biol* 15, 5279-5287.
- Signon, L., Malkova, A., Naylor, M. L., Klein, H., and Haber, J. E. (2001). Genetic Requirements for *RAD51*- and *RAD54*-Independent Break-Induced Replication Repair of a Chromosomal Double-Strand Break. *Mol Cell Biol* 21, 2048-2056.
- Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell* 91, 1033-1042.
- Sinclair, D. A., Mills, K., and Guarente, L. (1997). Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science* 277, 1313-1316.
- Smith, H. E., Driscoll, S. E., Sia, R. A., Yuan, H. E., and Mitchell, A. P. (1993). Genetic evidence for transcriptional activation by the yeast *IME1* gene product. *Genetics* 133, 775-784.
- Smith, H. E., Su, S. S., Neigeborn, L., Driscoll, S. E., and Mitchell, A. P. (1990). Role of *IME1* expression in regulation of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 6103-6113.
- Solinger, J. A., and Heyer, W. D. (2001). Rad54 protein stimulates the postsynaptic phase of Rad51 protein-mediated DNA strand exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 8447-8453.

- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* *9*, 3273-3297.
- Stewart, E., Chapman, C. R., Al-Khodairy, F., Carr, A. M., and Enoch, T. (1997). *rqh1+*, a fission yeast gene related to the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for reversible S phase arrest. *EMBO J* *16*, 2682-2692.
- Sugawara, N., and Haber, J. E. (1992). Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol Cell Biol* *12*, 563-575.
- Sugawara, N., Ira, G., and Haber, J. E. (2000). DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* *RAD59* in double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 5300-5309.
- Sung, P., Trujillo, K. M., and Van Komen, S. (2000). Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen* *451*, 257-275.
- Szostak, J. W., and Wu, R. (1980). Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *284*, 426-430.
- Teo, S. H., and Jackson, S. P. (1997). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair. *EMBO J* *16*, 4788-4795.
- Tomkinson, A. E., Bardwell, A. J., Bardwell, L., Tappe, N. J., and Friedberg, E. C. (1993). Yeast DNA repair and recombination proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded-DNA endonuclease. *Nature* *362*, 860-862.
- Tsubouchi, H., and Ogawa, H. (1998). A novel *mre11* mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol* *18*, 260-268.
- Umez, K., Nakayama, K., and Nakayama, H. (1990). *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* *87*, 5363-5367.
- Van Komen, S., Petukhova, G., Sigurdsson, S., Stratton, S., and Sung, P. (2000). Superhelicity-driven homologous DNA pairing by yeast recombination factors Rad51 and Rad54. *Mol Cell* *6*, 563-572.

- Wagstaff, J. E., Klapholz, S., Waddell, C. S., Jensen, L., and Esposito, R. E. (1985). Meiotic exchange within and between chromosomes requires a common Rec function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 5, 3532-3544.
- Wallis, J. W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., and Rothstein, R. (1989). A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58, 409-419.
- Wang, H. T., Frackman, S., Kowalisyn, J., Esposito, R. E., and Elder, R. (1987). Developmental regulation of *SPO13*, a gene required for separation of homologous chromosomes at meiosis I. *Mol Cell Biol* 7, 1425-1435.
- Watt, P. M., Louis, E. J., Borts, R. H., and Hickson, I. D. (1995). Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II in vivo and is required for faithful chromosome segregation. *Cell* 81, 253-260.
- Wu, L., Davies, S. L., Levitt, N. C., and Hickson, I. D. (2001). Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem* 276, 19375-19381.
- Xiao, W., Chow, B. L., and Milo, C. N. (1998). Mms4, a putative transcriptional (co)activator, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from endogenous and environmental DNA damage. *Mol Gen Genet* 257, 614-623.
- Yang, E., and Friedberg, E. C. (1984). Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *RAD1* gene. *Mol Cell Biol* 4, 2161-2169.
- Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., et al. (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272, 258-262.