

Université de Sherbrooke

Effet des perturbations de la synthèse des nucléotides sur la réplication des télomères

Par

Martin Toussaint

Département de Microbiologie et infectiologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie

décembre 2003



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitons et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 0-612-90620-5
Our file *Notre référence*
ISBN: 0-612-90620-5

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Université de Sherbrooke
Réplication et maintien des télomères en fonction de la concentration des nucléotides
Par
Martin Toussaint
Département de Microbiologie et infectiologie
Mémoire présenté à la faculté de médecine
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie
Juin 2003

Résumé

Les nucléotides sont nécessaires pour la réplication et la réparation du génome. Un déséquilibre dans le ratio entre les différents nucléotides a des effets variés sur les cellules, pouvant entre autres provoquer des mutations et la carcinogénèse chez les mammifères. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, une mutation dans les gènes codant pour la thymidilate synthase (*CDC21*) ou la thymidilate kinase (*CDC8*), impliqués dans la synthèse des dTTP, provoque un raccourcissement des télomères. De plus, l'inhibition complète de la synthèse des dTTP provoque la mort des cellules par "*thymineless death*" (TLD). Avec cette étude, nous démontrons que la diminution de la synthèse des dTTP, ainsi que la diminution de la synthèse de tous les nucléotides provoquent un raccourcissement des télomères. Ce défaut télomérique serait provoqué par une incapacité de la réplication semi-conservative à répliquer entièrement les télomères, et d'une incapacité de bien coordonner la fourche de réplication avec la télomérase. En plus d'ajouter aux connaissances sur les répercussions d'un déséquilibre de la synthèse des nucléotides, ces résultats démontreraient une fois de plus, l'importance d'une bonne coordination entre la fourche de réplication et la télomérase pour une réplication et un maintien adéquat des télomères.

Table des matières

Liste des figures.....	ii
Listes des sigles, abréviations et symboles.....	V
Résumé	
1. Introduction.....	1
2. Matériels et méthodes.....	24
3. Résultats.....	34
4. Discussion.....	56
5. Remerciements.....	70
6. Références.....	71

Listes des figures

Tableau 1 Souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilisées durant cette étude.....	25-27
Figure 1. Structure terminale des télomères.....	2
Figure 2. Schéma de la réplication de l'ADN.....	4
Figure 3. Schéma de la réplication complète d'un chromosome.....	6
Figure 4. Régulation de la télomérase.....	12
Figure 5. Synthèse des désoxyribonucléotides et des ribonucléotides chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Figure 6. Régulation de la synthèse des nucléotides chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figure 7. Analyse de la taille des télomères.....	31
Figure 8. Les mutants <i>cdc8-1</i> et <i>cdc21-1</i> ont des télomères courts à température permissive.....	34
Figure 9. La <i>TK</i> du virus de l'herpès supprime la thermosensibilité des souches portant une mutation <i>cdc8-1</i>	36

Figure 10. La <i>TK</i> du virus de l'herpès complémente le défaut télomérique des cellules avec une mutation <i>cdc8-1</i>	37
Figure 11. L'inhibition de la thymidylate synthase de cellules de type sauvage provoque un raccourcissement des télomères.....	39
Figure 12. L'hydroxyurée n'affecte pas la taille des télomères des cellules de type sauvage.....	41
Figure 13. La diminution de la synthèse de tous les nucléotides provoque un raccourcissement des télomères.....	42
Figure 14. La surexpression de <i>RNR1</i> rétablit partiellement la taille des télomères des souches portant une mutation <i>cdc21-1</i>	43
Figure 15. Le défaut télomérique des souches dont le gène <i>DUNI</i> a été délété est complémenté par une augmentation de la concentration de tous les nucléotides.....	44
Figure 16. Effet de l'augmentation de la concentration de tous les nucléotides sur la taille des télomères de différents mutants.....	46
Figure 17. En absence de la télomérase, la réplication semi-conservative des télomères semble être affectée lorsque la synthèse des dTTP est diminuée.....	48

Figure 18. Effet de la diminution de la synthèse des dTTP sur les télomères des cellules ne possédant pas le gène <i>TELI</i>	49
Figure 19. La capacité de la télomérase à ajouter des séquences télomériques ne semble pas affectée par la diminution de la synthèse des dTTP.....	51
Figure 20. Effet de la diminution de la synthèse des dTTP sur les télomères des cellules dont le gène <i>RIFI</i> a été délété.....	52
Figure 21. L'incorporation des résidus uraciles (U) dans les télomères ne provoque pas l'apparition du défaut télomérique des cellules dont la synthèse des dTTP est diminuée.....	54
Figure 22. Modèle de réplication des télomères.....	66

Liste des sigles, abréviations et symboles

5-FOA :	acide 5-fluoroorotique
A :	adénine
ADN :	acide déoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
ARS :	<i>"Autonomus Replicating Sequence"</i>
C :	cytosine
DTT :	dithiothréitol
EDTA :	tétraacétate d'éthylènediamine disodium
EST :	<i>"Ever Shorter Telomere"</i>
FUDR :	5-Fluoro 2'-deoxyuridine
g :	gramme
G :	guanosine
HCl :	acide Chlorhydrique
HIS :	histidine
kb :	kilopaire de base
kDa :	kiloDalton
l :	litre
LEU :	leucine
M :	molaire
ml :	millilitre
mM :	millimolaire

mol/l :	mole par litre
MRX :	Mre11p/Rad50p/Xrs2p
NaCl :	chlorure de sodium
NaOH :	hydroxyde de sodium
ng :	nanogramme
NHEJ :	<i>"Non Homologous End Joining"</i>
nM :	nanomolaire
nts :	nucléotides
pb :	paire de base
PCR :	<i>"Polymerase Chain Reaction"</i>
P/V :	poids sur volume
RNR :	ribonucléotide réductase
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS :	sodium dodecyl sulfate
T :	thymine
TK :	thymidine kinase
<i>T-loop</i> :	<i>"Telomere loop"</i>
TLD :	<i>"Thymineless Death"</i>
TPE :	<i>"Telomere Position Effect"</i>
TRF :	<i>"Terminal Restriction Fragments"</i>
TRP :	tryptophane
U :	résidu uracile
URA :	uracile
V :	volt

μg : microgramme
 μl : microlitre
 μM : micromolaire
YC : milieu "*Yeast Complete*"

1. Introduction

L'intérêt actuel sur les télomères et la télomérase prend racine dans les expériences de Barbara McClintock et Hermann J. Muller dans les années 1930. De façon indépendante, Muller et McClintock proposèrent à la même époque que les chromosomes devaient porter des structures particulières à leurs extrémités, ce qui leur conférerait de la stabilité. En effet, en 1938, Muller démontra qu'après irradiation des mouches à fruit aux rayons X, il était difficile de retrouver des cassures de l'ADN dans les extrémités des chromosomes. Il proposa donc le terme "télomère" provenant du grec "telos" (fin) et "meros" (partie) pour décrire ces structures terminales (Muller, 1938). De son côté, Barbara McClintock fit des observations semblables chez le maïs. Elle démontra que les extrémités créées lors de cassures des chromosomes fusionnent entre elles, alors que les extrémités naturelles des chromosomes ne fusionnent jamais entre-elles (McClintock, 1939; McClintock, 1941).

Les télomères

La structure des télomères est désormais beaucoup mieux connue. Un télomère serait formé par un complexe nucléoprotéique essentiel qu'on retrouve à chaque extrémité des chromosomes des organismes eucaryotes. Il sert essentiellement à protéger le génome contre les nucléases, à assurer une réplication complète du génome et à éviter que les extrémités des chromosomes soient reconnues comme des cassures double brin de l'ADN. Les télomères des organismes eucaryotes sont constitués de séquences d'ADN répétées comprenant un brin riche en guanine (G) qui forme une extrémité 3' simple brin, et un brin complémentaire riche en cytosine (C) formant

l'invasion de l'extrémité simple brin terminale dans la portion télomérique double brin, ce qui crée un repliement du télomère sur lui-même (figure 1B). Ces *T-loops* ont été aussi observés chez d'autres organismes eucaryotes; cette structure serait donc conservée dans l'évolution et, par conséquent, jouerait un rôle important dans la formation de la structure terminale des chromosomes (Munoz-Jordan et al., 2001; Murti et Prescott, 1999). Chez *S. cerevisiae*, la portion simple brin serait trop courte pour permettre une invasion de l'ADN télomérique double brin et former une telle structure (Wellinger et al., 1993). Cependant, certaines évidences expérimentales permettent de croire que les télomères de cet organisme se replient sur eux-mêmes pour former une structure terminale similaire aux *T-loops* retrouvés chez certains mammifères (Figure 1C) (de Bruin et al., 2000; de Bruin et al., 2001; Grunstein, 1997).

Réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN est un processus hautement conservé. Chez les eucaryotes, la réplication est dite semi-conservative; chaque brin d'une molécule d'ADN sert de matrice pour la synthèse de la nouvelle molécule fille (Brush et Kelly, 1996). Dans un génome, la réplication de l'ADN s'initie à des endroits bien précis, les origines de réplication (figure 2). Puisque les polymérases à ADN sont incapables de synthétiser de l'ADN *de novo*, il doit y avoir synthèse d'un court fragment d'ARN qui fournira une extrémité 3' OH libre et servira d'amorce pour la synthèse du nouveau brin d'ADN. Cette amorce d'ARN est synthétisée par le complexe primase (discuté plus loin dans la section polymérase à ADN, page 4). Par ailleurs, étant donné que les polymérases à ADN synthétisent l'ADN dans une seule direction, soit de 5' vers 3', et que les deux brins d'une molécule sont antiparallèles, un brin sera synthétisé en continu (brin avancé), alors que l'autre brin sera synthétisé en discontinu (brin retardé) (figure 2). Un fragment d'Okazaki est formé d'un

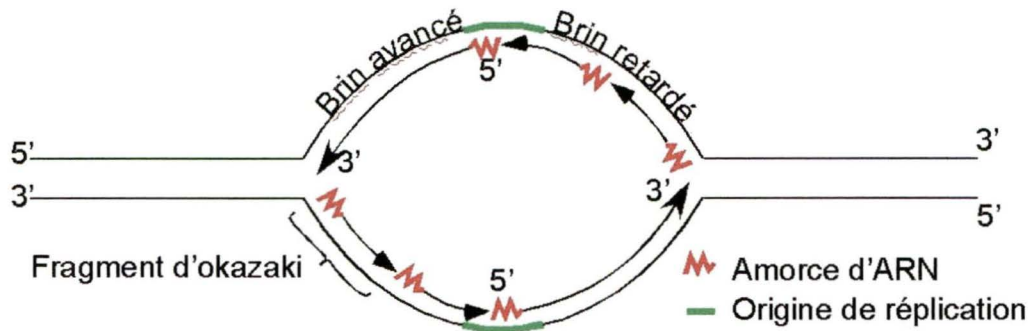


Figure 2 : Schéma de la réplication de l'ADN. La réplication de l'ADN est semi-conservative, s'initie à des endroits précis dans le génome (origines de réplication), démarre sur des amorces d'ARN et procède dans une seule direction, de 5' vers 3', de sorte qu'il y a la synthèse d'un brin en continu (brin avancé) et d'un brin en discontinu (brin retardé).

fragment d'ADN débutant par une courte amorce d'ARN. Les amorces d'ARN sont dégradées et remplacées par la molécule d'ADN synthétisée en amont (figure 2).

Polymérase à ADN

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il y a trois polymérase à ADN nucléaires essentielles pour la réplication du génome: la polymérase α , la polymérase δ et la polymérase ϵ (Campbell, 1993).

La polymérase α est un complexe protéique composé de quatre sous-unités de 180, 86, 48 et 58 kDa encodées respectivement par les gènes *POL1/CDC17*, *POL12*, *PRI1* et *PRI2*. Cette polymérase est nécessaire pour initier la réplication et pour la synthèse des amorces d'ARN des fragments d'Okazaki. La plus grosse sous-unité (*POL1/CDC17*) est responsable de l'activité catalytique de synthèse de l'ADN (Budd et Campbell, 1987). Pri1p et Pri2p sont impliqués dans la synthèse des amorces d'ARN des fragments d'Okazaki (Plevani et al., 1985). Pri2p ne serait cependant pas nécessaire pour l'activité primase, mais plutôt pour stabiliser la liaison de Pri1p à

Pol1p. Pour sa part, Pol12p serait impliqué dans l'initiation de la réplication de l'ADN (Foiani et al., 1994).

La polymérase δ est composée de trois sous-unités: *POL3/CDC2* (125 kDa), *POL31/HYS2* (55 kDa) et *POL32* (40 kDa) (Johansson et al., 2001), et serait nécessaire pour poursuivre la synthèse du brin avancé et des fragments d'Okazaki. Seuls *POL3/CDC2* et *POL31/HYS2* sont des gènes essentiels (Boulet et al., 1989; Sitney et al., 1989; Sugimoto et al., 1995).

La polymérase ϵ est formée de quatre sous-unités protéiques, Pol2p, Dbp2p, Dbp3p et Dbp4p (Araki et al., 1991a; Araki et al., 1991b; Hamatake et al., 1990; Ohya et al., 2000). Pol2p est la sous-unité catalytique de la polymérase encodée par le gène essentiel *POL2* (Morrison et al., 1990). Dbp2p, encodée par le gène *DBP2*, est aussi essentielle pour la viabilité cellulaire et pour la réplication de l'ADN. Les gènes *DBP3* et *DBP4*, codant pour les deux autres sous-unités, ne sont pas essentielles malgré leur rôle important dans la stabilisation de la structure du complexe et dans l'établissement des interactions avec d'autres protéines (Araki et al., 1991b; Araki et al., 1995; Kamimura et al., 1998; Ohya et al., 2000). Le rôle de la polymérase ϵ est cependant beaucoup plus controversé. Il a été démontré qu'une délétion du domaine polymérase de Pol2p n'affecte pas la viabilité des cellules, suggérant que la fonction essentielle de cette protéine n'est pas de répliquer l'ADN (Kesti et al., 1999). Récemment, certaines évidences expérimentales ont suggérées que cette polymérase serait impliquée dans la cohésion des chromatides sœurs (Edwards et al., 2003). Néanmoins, plusieurs données permettent de croire que la polymérase ϵ est réellement nécessaire pour une réplication rapide et efficace du génome et des télomères (Ohya et al., 2002). Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour bien comprendre les rôles de la polymérase ϵ .

Réplication des télomères

La réplication complète des chromosomes linéaires eucaryotes présente un problème qui a été soulevé pour la première fois par Watson et Olovnikov (Olovnikov, 1973; Watson, 1972). La réplication de l'ADN s'effectue dans une seule direction, soit de 5' vers 3', et nécessite une amorce d'ARN pour initier la réplication. Dans le

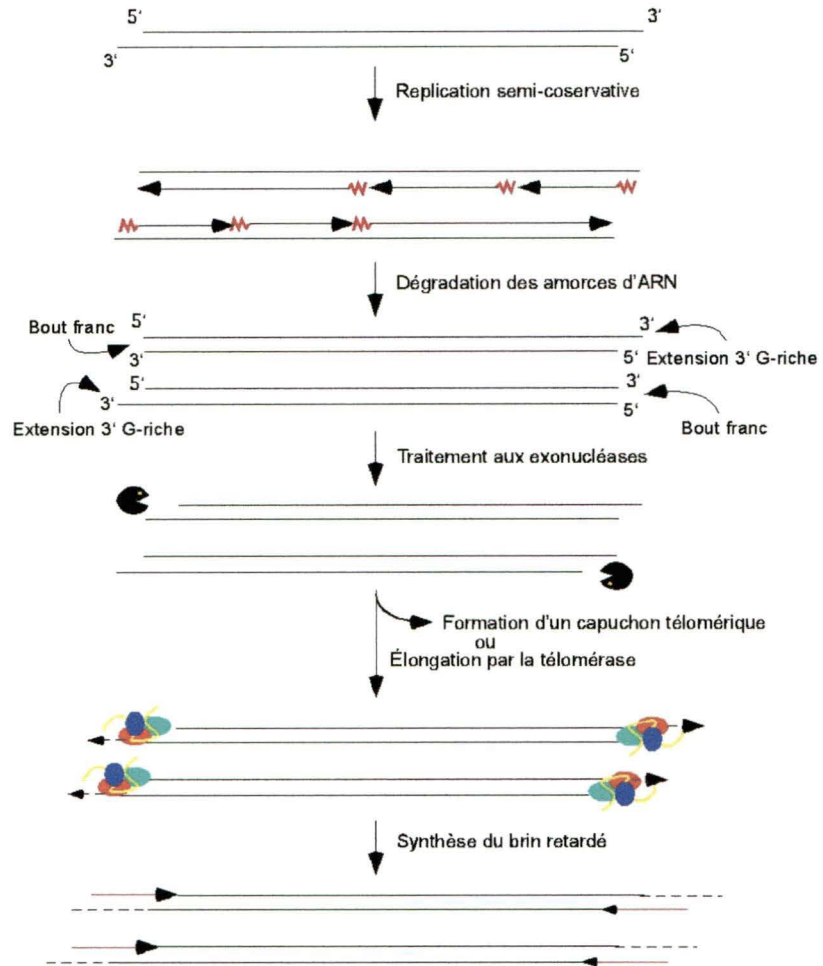


Figure 3: **Schéma de la réplication complète d'un chromosome.** La réplication semi-conservative produit deux nouvelles molécules filles avec une extrémité franche et une extrémité avec une extension 3' simple brin riche en G. Des exonucléases traiteraient les extrémités permettant la formation d'un capuchon télomérique fonctionnel ou l'élongation du brin riche en G par la télomérase. La synthèse du brin allongé par la télomérase est complétée par la machinerie de synthèse du brin retardé.

2). Cependant, aux extrémités des chromosomes, il est impossible de remplacer la dernière amorce d'ARN après sa dégradation, puisqu'il n'y a aucun brin d'ADN synthétisé en amont de celui-ci. C'est ce qu'on appelle le problème de réplication des extrémités. En absence de mécanisme compensatoire, il y aura perte de séquence d'ADN aux extrémités des chromosomes à

chaque réplication, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de séquences télomériques et que des gènes importants soient dégradés. Chez la plupart des organismes eucaryotes, ce problème de réplication des extrémités est résolu par la télomérase, un complexe ribonucléoprotéique capable de synthétiser de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN interne au complexe (Greider, 1995). Dû aux propriétés inhérentes des polymérase, la réplication bidirectionnelle d'un chromosome linéaire eucaryote génère une molécule fille avec une extrémité franche et une extrémité avec une courte extension 3' simple brin (figure 3) (Lingner et Cech, 1996). Jusqu'à maintenant, tous les organismes étudiés possèderaient des extensions 3' simple brin riche en G aux deux extrémités des chromosomes (Wellinger et Sen, 1997). Sans cette extension, les télomères ne pourraient pas être protégés, ce qui provoquerait la mort des cellules (Chakhparonian et Wellinger, 2003). La télomérase est le meilleur candidat pour la création de ces extensions riche en G. Cependant, il a été démontré que, *in vitro*, la télomérase est incapable d'utiliser un bout franc d'ADN comme substrat (Lingner et Cech, 1996) et que ces extensions riches en G sont générées même en absence de la télomérase (Wellinger et al., 1996). Ces données suggèrent que la télomérase n'est pas responsable de la création de l'extension 3' simple brin aux deux extrémités des chromosomes, et permet de poser l'hypothèse qu'une exonucléase modifierait les extrémités des chromosomes. De plus, la création d'une extension 3' simple brin par une exonucléase permettrait la formation d'un bon substrat à chaque télomère pour la télomérase. La réplication serait complétée de façon coordonné par la machinerie de synthèse du brin retardé (Adams Martin et al., 2000; Diede et Gottschling, 1999; Price, 1997) (figure 3).

La télomérase

Chez *S. cerevisiae*, cinq gènes ont été identifiés comme étant essentiels pour le maintien des

télomères par la télomérase *in vivo*: *TLC1* ("*TeLomerase Component 1*"), *EST1*, *EST2*, *EST3* ("*Ever Shorter Telomeres*") et *CDC13/EST4* (Lendvay et al., 1996; Lundblad et Szostak, 1989; Singer et Gottschling, 1994). La délétion de *TLC1*, *EST1*, *EST2* et *EST3* mène à la perte progressive de séquences télomériques dû au problème de réplication des extrémités, jusqu'à ce que les 300 pb soient entièrement perdues. En absence de mécanismes compensatoires, la perte de l'amorce d'ARN (environ 10 bases) à l'extrémité répliquée par la synthèse du brin retardé provoque le raccourcissement du télomère. Ainsi, une moyenne d'environ 5 pb d'ADN est perdue à chaque extrémité des chromosomes par cycle cellulaire, de sorte que les cellules entrent en crise entre 60 et 80 générations provoquant la mort des cellules ou l'apparition de survivants, qui sont capable de maintenir leurs télomères en absence de la télomérase. (Lendvay et al., 1996; Lundblad et Szostak, 1989; Singer et Gottschling, 1994). Pour sa part, *CDC13* est un gène essentiel de sorte que sa délétion provoque une mort rapide des cellules. Cependant, l'allèle *cdc13-2^{est}* provoque aussi la sénescence des cellules, qui serait causée par l'incapacité de Cdc13-2^{est}p de recruter la télomérase à son substrat (Lingner et al., 1997; Nugent et al., 1996). *In vitro*, seuls *TLC1* et *EST2*, la composante ARN et la sous-unité catalytique de la télomérase, sont essentielles pour l'activité de la télomérase (Lingner et al., 1997).

Chromatine télomérique

Plusieurs protéines sont impliquées dans la formation d'une structure terminale fonctionnelle. Chez *S. cerevisiae*, Rap1p, les protéines Sir, Rif1p et Rif2p, Cdc13p et l'hétérodimère KU sont entre autres responsables de la formation de l'hétérochromatine télomérique.

Rap1p, Sir2p, Sir3p et Sir4p

Chez *S. cerevisiae* Rap1p ("Repressor Activator Protein 1") est une protéine essentielle qui agit comme facteur de transcription en réprimant ou en activant l'expression de certains gènes (Shore, 1994; Shore, 1997), joue un rôle important dans l'établissement du silencing en se liant aux sites adjacents aux locus HML et HMR (Hofmann et al., 1989) et qui participe à la formation de l'hétérochromatine télomérique. Rap1p se lie à la séquence d'ADN consensus (A/G)(A/C)ACCCANNCA(C/T)(C/T) (Buchman et al., 1988). En plus de participer directement à la formation de l'hétérochromatine télomérique, cette protéine interagit avec les protéines SIR ("Silent Information Regulator") pour permettre le repliement du télomère grâce à l'interaction des protéines SIR entre elles et avec les histones des nucléosomes sous télomériques (Figure 1C) (de Bruin et al., 2000; de Bruin et al., 2001; Grunstein, 1997). Le complexe formé par Rap1p et les protéines Sir joue un rôle dans le TPE ("Telomere Position Effect"), répression transcriptionnelle établie par l'hétérochromatine télomérique sur les gènes sous télomériques (Kyrion et al., 1993). Rap1p serait aussi impliqué dans un mécanisme de comptage qui permet de réguler négativement l'élongation des télomères (discuté plus loin dans la section Régulation de la taille des télomères, page 9) (Marcand et al., 1997).

Rif1p et Rif2p

Rif1p et Rif2p ("Rap1p Interacting Factor") ont été identifiés comme étant des protéines qui interagissent avec la portion C-terminale de Rap1p (Wotton et Shore, 1997). Une souche portant une mutation *rif1Δ* ou *rif2Δ* possède des télomères plus hétérogènes et plus long d'environ 300 pb que les télomères de cellules de type sauvage (Hardy et al., 1992). De plus, la double délétion de *RIF1* et *RIF2* accentue le rallongement par rapport aux simples mutants, indiquant que les deux

protéines agissent en synergie (Wotton et Shore, 1997). Ces deux protéines peuvent être considérées comme des inhibiteurs de la télomérase (Teng et al., 2000). Cependant, le mécanisme par lequel l'inhibition s'effectue est inconnu (discuté plus loin).

Cdc13p

CDC13 est un gène essentiel qui code pour une protéine liant l'ADN simple brin télomérique TG₁₋₃ *in vitro* et qui se lie spécifiquement aux télomères *in vivo* (figure 1C) (Bourns et al., 1998; Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996). Sa liaison à l'ADN simple brin télomérique permettrait de distinguer un télomère d'une cassure double brin de l'ADN (Pang et al., 2003). Cdc13p est essentiel pour l'activité *in vivo* de la télomérase sans pour autant être essentiel pour son activité *in vitro* (Lingner et al., 1997). Cette protéine agirait comme régulateur positif de la taille des télomères via son interaction avec la télomérase, mais aussi comme régulateur négatif via son interaction avec Stn1p (figure 4) (Chandra et al., 2001; Grandin et al., 2000; Grandin et al., 1997). L'interaction de Cdc13p avec la sous-unité Est1p de la télomérase à la fin de la phase S pourrait servir d'élément déclencheur pour l'activation de Est2p, la sous-unité catalytique de la télomérase déjà présente aux télomères sous une forme inactive (figure 4) (Taggart et al., 2002). En absence de *CDC13*, le brin riche en C des télomères est dégradé jusque dans les régions sous télomériques, provoquant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Garvik et al., 1995). *CDC13* a donc différents rôles reliés aux télomères. Dans la réplication, en plus d'interagir avec Est1p, Cdc13p interagit avec Pol1p, impliqué dans la synthèse du brin retardé (Qi et Zakian, 2000). Dans la protection, Cdc13p interagit avec Stn1p et Ten1p, de façon stable ou transitoire, selon le cycle cellulaire. Ceci suggère l'existence d'un complexe Stn1p-Cdc13p-Ten1p, potentiellement dynamique, impliqué dans la protection des télomères. *TEN1* serait aussi nécessaire pour la régulation de la taille des télomères (Grandin et al., 2001).

L'hétérodimère KU

Les protéines encodées par les gènes *YKU70* et *YKU80* forment un complexe, appelé KU, impliqué dans la réparation des extrémités non-homologues (NHEJ) . En plus de ce rôle dans la réparation de l'ADN, l'hétérodimère KU est impliqué dans la protection, la réplication et le maintien de la structure des télomères (Gravel et al., 1998). Au niveau de la réplication des télomères, KU pourrait participer au recrutement de la télomérase via une interaction avec l'ARN de la télomérase en plus de promouvoir le recrutement de la télomérase par Cdc13p (figure 4) (Boulton et Jackson, 1996b; Grandin et al., 2000; Peterson et al., 2001). La délétion de *YKU70* ou de *YKU80*, de même qu'une double délétion provoquent les mêmes phénotypes. Ces mutants sont thermosensibles (Boulton et Jackson, 1996b), plus sensibles aux agents endommageant l'ADN que les cellules de type sauvage (Boulton et Jackson, 1996a), sont incapables de faire du NHEJ (Bennett et al., 1997), ont une perte du TPE (Boulton et Jackson, 1998; Gravel et al., 1998; Laroche et al., 1998; Nugent et al., 1998), de longues extensions riche en G simple brin tout au long du cycle cellulaire (Gravel et al., 1998), ainsi que des télomères plus courts que des télomères de cellule de type sauvage (Boulton et Jackson, 1996a; Porter et al., 1996). Le complexe KU serait aussi important pour la localisation des télomères en périphérie nucléaire (Laroche et al., 1998).

Régulation de la taille des télomères

À cause du problème de réplication des extrémités, les télomères raccourcissent au fil des générations. La télomérase est responsable d'ajouter des répétitions télomériques aux extrémités des chromosomes afin de contrecarrer l'érosion des télomères. Certains gènes sont directement impliqués dans des mécanismes de régulation de la taille des télomères, alors que d'autres le sont

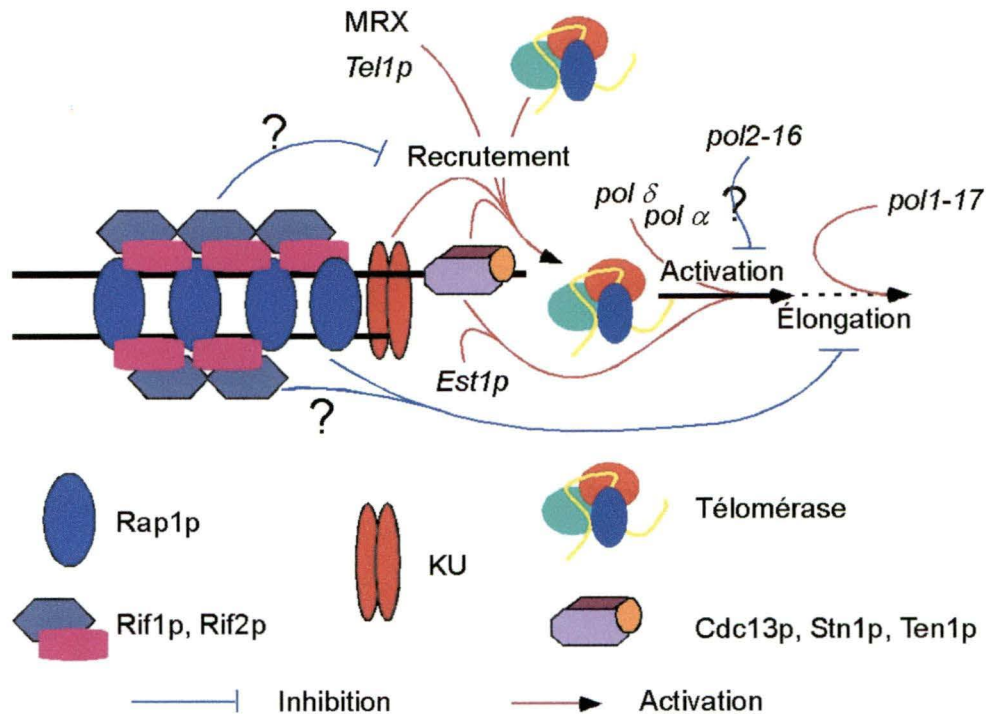


Figure 4: **Régulation de la télomérase.** Le recrutement de la télomérase serait régulé par le complexe MRX, Tel1p, l'hétérodimère KU et Cdc13p. Son activation serait régulé par Cdc13p et Est1p qui interagissent et grâce à une bonne coordination entre la réplication semi-conservative et la télomérase. Finalement, l'élongation serait régulé par le mécanisme de comptage par Rap1p et grâce à une bonne coordination entre la machinerie de synthèse du brin retardé et la télomérase. L'inhibition de la télomérase par Rif1p et Rif2p pourrait agir sur l'accès de la télomérase pour son substrat, donc sur le recrutement de la télomérase, ou inhiber directement la télomérase.

indirectement par leurs rôles dans la réplication et le maintien des télomères. Il est possible de diviser la régulation de la taille des télomères en trois étapes: 1) le recrutement de la télomérase à son substrat, 2) l'activation de la télomérase et 3) l'élongation des télomères. La figure 4 représente schématiquement les gènes impliqués dans les différentes étapes de régulation de la télomérase. Cependant, cette catégorisation schématique est sûrement plus simple que la réalité. Le texte décrira plus en détail comment chaque gène est impliqué dans la régulation.

Les gènes de *S. cerevisiae* *TEL1* et *MEC1*, respectivement homologues de ATM et ATR de l'humain, sont impliqués dans le maintien de la stabilité du génome et dans le contrôle des

réponses aux dommages à l'ADN. Pour le maintien des télomères, Tel1p agirait dans la même voie que le complexe protéique MRX (Mre11p/Rad50p/Xrs2p) (Ritchie et Petes, 2000) et serait impliqué dans l'étape de préparation du substrat de la télomérase (Tsukamoto et al., 2001). La délétion du gène codant pour Tel1p provoque un raccourcissement graduel des télomères jusqu'à une taille stable d'environ 100 pb de séquences télomériques (Greenwell et al., 1995). Le complexe MRX est impliqué dans le maintien des télomères et dans le NHEJ. La délétion de *MRE11*, *XRS2* ou *RAD50* provoque un raccourcissement des télomères similaire au raccourcissement observé dans une souche dont le gène *TEL1* a été délété (Craven et Petes, 2000; Ritchie et Petes, 2000). Pour sa part *MEC1* est un gène essentiel. Deux allèles de *MEC1*, *mec1-21* et *mec1-14*, ont des télomères faiblement raccourcis (Craven et Petes, 2000; Longhese et al., 2000). Le défaut télomérique d'une souche mutante portant l'allèle *mec1-14* est contourné par la délétion de *SML1* ("*Suppressor of mec1 Lethality*") (le rôle de *SML1* est discuté plus loin dans la section Régulation de la synthèse des nucléotides chez *Saccharomyces cerevisiae*, page 20), suggérant que la diminution de la concentration des nucléotides serait la cause de la diminution de la taille des télomères dans ces mutants (Longhese et al., 2000). L'analyse d'un double mutant *tell1 mec1* indique que ces deux gènes agissent dans des voies différentes pour le maintien des télomères (Mallory et Petes, 2000; Ritchie et Petes, 2000).

À chaque cycle cellulaire, la réplication semi-conservative réplique la totalité d'un chromosome, incluant les télomères. Les travaux de Diede et Gottschling suggèrent que l'ajout de séquences TG₁₋₃ par la télomérase est dépendante des polymérases δ et α . À température restrictive, les souches possédant l'allèle *cdc2-2* (pol δ) ou *cdc17-2* (pol α) sont incapables d'ajouter des séquences télomériques sur un télomère nouvellement formé (Diede et Gottschling, 1999). Ainsi,

une bonne coordination entre la réplication semi-conservative et la télomérase serait nécessaire pour l'activation de la télomérase. Par ailleurs, l'arrivée d'Est1p aux télomères à la fin de la phase S pourrait servir d'élément déclencheur pour l'activation de Est2p déjà présent sous une forme inactive (Taggart et al., 2002). Malgré le rôle controversé de la polymérase ϵ , le raccourcissement des télomères des mutants de *POL2* (*pol2-16*) démontrent l'implication de ce gène dans la réplication des télomères (Ohya et al., 2002). Cependant, la cause précise de ce défaut télomérique est inconnue (représenté par un "?" sur la figure 4). L'analyse d'un mutant thermosensible portant l'allèle *pol1-17* suggère que la coordination entre la télomérase et la machinerie de synthèse du brin retardé est importante pour réguler la taille des télomères. À température permissive, ces mutants ont des télomères plus longs que des télomères de cellules de type sauvage. À température semi-permissive, ce phénotype s'aggrave et s'accompagne d'une forte apparition d'ADN simple brin télomérique. L'allongement des télomères de ces mutants serait provoqué par une perte de coordination entre la télomérase et la réplication semi-conservative. Par conséquent, l'allongement serait dépendant de la télomérase alors que l'apparition d'ADN simple brin serait dépendante à la fois de la télomérase et de la machinerie de synthèse du brin retardé incapable de bien compléter la synthèse du brin riche en C des télomères (Adams Martin et al., 2000).

Comme mentionné auparavant, le nombre de molécules de Rap1p pouvant lier l'extrémité d'un chromosome permet de réguler la taille de ce télomère par un mécanisme de comptage (Marcand et al., 1997). Finalement, Rif1p et Rif2p sont considérés comme des inhibiteurs de la télomérase (Teng et al., 2000). Cependant, il est difficile de déterminer si ces protéines inhibent directement la télomérase ou inhibent plutôt l'accès de la télomérase à son substrat (représenté par "?" sur la figure 4).

Synthèse des nucléotides

Les nucléotides sont essentiels pour la réplication et la réparation du génome. La figure 5 montre la voie de biosynthèse des nucléotides chez *S. cerevisiae*. Premièrement, la ribonucléotide réductase (RNR) réduit les ribonucléosides diphosphate en désoxyribonucléosides diphosphate. Le dCMP est produit par la dCMP kinase qui interconvertit le dCDP en dCMP et le dCMP en dCDP. La dCMP déaminase transforme par la suite le dCMP en dUMP. Le dUMP peut aussi être produit par la déphosphorylation du dUTP par une pyrophosphatase. La thymidylate synthase modifie le dUMP en dTMP, qui est phosphorylé en dTDP par la thymidylate kinase. L'étape finale pour la production des nucléotides triphosphate est assurée par une enzyme commune pour toutes les desoxyribonucléosides diphosphate, la nucléoside diphosphate kinase (NDPK) (Reichard, 1988). Chez la plupart des organismes, une voie de recyclage existe afin de récupérer le matériel produit par la dégradation de l'ADN.

Chez *S. cerevisiae*, les gènes *CDC21*, *CDC8* et *DUT1* encodent respectivement la thymidylate synthase, la thymidylate kinase et la pyrophosphatase. Étant donné l'absence de thymidine kinase chez *S. cerevisiae*, il est impossible de récupérer la thymidine par la voie de recyclage (Grivell et Jackson, 1968). Ainsi, la synthèse *de novo* est la seule façon d'obtenir du dTTP.

Ribonucléotide réductase

La ribonucléotide réductase (RNR) catalyse l'étape limitante dans la production des dNTP (figure 5). L'activité des RNR affecte directement la concentration de nucléotides et subséquemment la viabilité des cellules. Ainsi, en tant qu'enzyme très important dans la biosynthèse des précurseurs pour la synthèse de l'ADN, l'activité de la RNR est très étroitement régulée durant la réplication

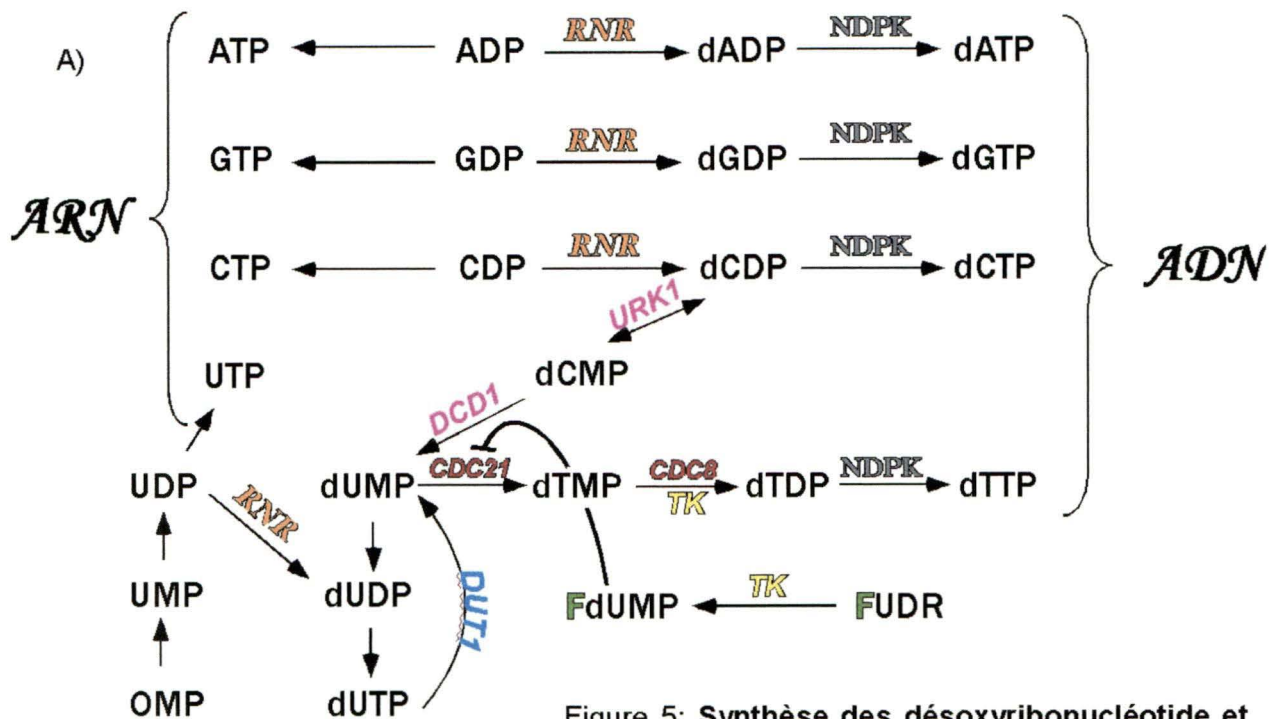
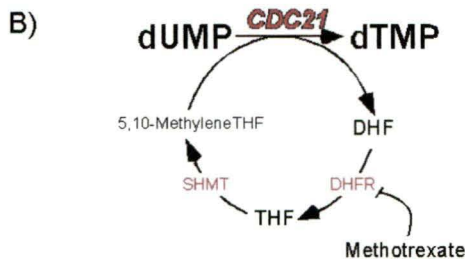


Figure 5: Synthèse des désoxyribonucléotide et des ribonucléotides chez *S. cerevisiae*. A) (RNR) ribonucléotide réductase, (NDPK) nucléoside diphosphate kinase, (CDC21) thymidylate synthase, (CDC8) thymidylate kinase, (TK) thymidine kinase du virus de l'herpès, (DUT1) dUTPase, (DCD1) dCMP déaminase, (URK1) dCMP kinase. B) (DHF) dihydrofolate, (THF) tétrahydrofolate, (DHFR) dihydrofolate réductase, (SHMT) Sérine hydroxyméthyltransférase.



et la réparation du génome. Nous discuterons en détail de la régulation de la RNR chez *S. cerevisiae* dans la section sur la régulation de la synthèse des nucléotides. La plupart des RNR eucaryotes sont formées d'un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$. La grosse sous-unité α_2 est un homodimère contenant deux sites allostériques dans chaque sous-unité α . Le site de spécificité régule le niveau relatif de chaque nucléotide alors que le site d'activité régule la concentration totale des dNTP. La petite sous-unité β_2 est aussi formée d'un homodimère renfermant un domaine d'interaction avec un cofacteur métallique et un radical tyrosil libre essentiel pour l'activité de l'enzyme. Puisque la sous-unité α_2 contient les sites de régulation de l'enzyme et que β_2 contient les régions essentielles pour la catalyse, on nomme souvent α_2 la sous-unité de

régulation et β_2 la sous-unité catalytique. Cependant, aucune sous-unité possède une activité catalytique seule, suggérant que le centre catalytique actif est formé par l'interaction entre la petite et la grosse sous-unité (Jordan et Reichard, 1998; Stubbe et al., 2001).

Chez *S. cerevisiae*, quatre gènes sont impliqués dans la formation du complexe RNR : *RNR1* et *RNR3* encodent les protéines formant la sous-unité α_2 , alors que le produit du gène *RNR2* forme un hétérodimère avec le produit du gène *RNR4* pour former la sous-unité β_2 . *RNR1* et *RNR2* sont des gènes essentiels. Cependant, la surexpression de *RNR3*, gène non essentiel, complémente une mutation de *RNR1* (Elledge et Davis, 1990). Le produit du gène *RNR4* serait nécessaire pour la formation d'une holoenzyme fonctionnelle (Jordan et Reichard, 1998).

La RNR peut être inhibée en utilisant l'hydroxyurée (HU). Cet agent chimique se lie au radical tyrosil libre de la petite sous-unité, essentiel pour l'activité de l'enzyme. Avec de fortes doses, il y a inhibition complète de la synthèse des nucléotides et arrêt de la réplication (Moore et Hurlbert, 1985). Cependant, des mécanismes de résistance au HU ont été décrits chez des cellules de mammifères. Dans ces cas, une surproduction de l'ARNm et des protéines de la RNR permet aux cellules de résister à cet agent chimiothérapeutique (Tagger et Wright, 1988; Yen et al., 1994; Zhou, B. S. et al., 1995). Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré que le niveau d'ARNm de certaines sous-unités était fortement augmenté lors d'un traitement à l'hydroxyurée (Averbeck et Averbeck, 1994).

Thymidylate synthase: *CDC21*

Le gène codant pour la thymidilate synthase chez *S. cerevisiae* a été cloné par Taylor et al. (Taylor et al., 1982). La réaction enzymatique assurée par la thymidilate synthase est couplée

chez la levure, comme chez la plupart des organismes eucaryotes, à la transformation du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en dihydrofolate. Le dihydrofolate est par la suite recyclé en 5,10-méthylène tétrahydrofolate par la dihydrofolate réductase (DHFR) et la sérine hydroxyméthyltransférase (figure 5B). Chez l'humain, la thymidylate synthase est une cible de plusieurs agents chimiothérapeutiques pour traiter les leucémies, les cancers du cou, du sein et les cancers gastrointestinaux (Moertel, 1994). La thymidylate synthase est responsable d'une étape critique dans le métabolisme du dTTP, essentiel pour la réplication de l'ADN. En absence d'un apport adéquat en dTTP, les cellules sont incapables de répliquer leur matériel génétique et vont mourir par un mécanisme appelé "*Thymineless death*" (Ahmad et al., 1998). Nous reviendrons en détail sur ce phénomène plus bas. Plusieurs agents existent pour inhiber la thymidylate synthase. Parmi eux, les antifolates ciblent la réaction couplée du métabolisme du folate. Par exemple, le méthotrexate inhibe la dihydrofolate réductase empêchant le retour du DHF en 5,10-méthylène THF, bloquant indirectement la production de dTTP. De façon plus importante dans le cadre de cette étude, les membres de la famille des fluoropyrimidines ciblent directement la thymidylate synthase (Ackland S, 2002). Notamment, le métabolite actif du FUDR (le FdUMP) forme un complexe extrêmement stable avec le 5,10-méthylène THF et la thymidylate synthase, bloquant ainsi la production de dTTP (Santi et al., 1974). Chez *S. cerevisiae*, la TK du virus de l'herpès permet de phosphoryler le FUDR, présent dans le milieu de culture, en FdUMP pour inhiber Cdc21p (Taylor et al., 1982) (figure 5A). L'allèle de *cdc21-1* utilisé dans la présente étude a été produit par Hartwell et al. par mutagenèse aléatoire avec du N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (Hartwell, L.H. et al., 1973). Le changement d'une guanine en adénine à la position 912 de la séquence codante du gène, provoque le changement de la glycine en position 94 pour une sérine dans la protéine (Taylor et al., 1987). À température permissive, ce mutant possède une phase S allongée, et il cesse de se diviser à température restrictive (Hartwell, 1973).

Thymidylate kinase: *CDC8*

Le gène *CDC8* de *S. cerevisiae* a été cloné par Kuo et al. (Kuo et Campbell, 1983). Le produit de ce gène essentiel est responsable de l'activité thymidylate kinase (Jong et al., 1984). La souche possédant la mutation *cdc8-1* utilisée dans cette étude a été produite par mutagenèse chimique aléatoire avec du N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (Hartwell, L.H. et al., 1973). La glutamine en position 75 de la protéine est modifiée pour une lysine. Ce mutant ne possède aucune activité thymidylate kinase *in vitro*, peu importe la température (Jong et al., 1984). Malgré une phase S allongée, ces mutants se divisent quand même à température permissive, alors qu'à température restrictive, ils arrêtent en phase S à cause d'une incapacité à synthétiser l'ADN (Hartwell, L. H., 1971). Par ailleurs, il a été démontré que la TK du virus de l'herpès supprime la thermosensibilité de tous les mutants thermosensibles qui ont été isolés (Sclafani et Fangman, 1984).

Thymineless death

Ce phénomène a été décrit pour la première fois chez *E. coli* par Cohen et Barner en 1954. Ils ont remarqué que l'absence de thymine était létale pour ces cellules (Cohen et Barner, 1954). Ce phénomène nommé "*thymineless death*" (TLD) est unique puisque la privation de ces bactéries en acides aminés ou en vitamine arrête la croissance des cellules sans provoquer leur mort. Depuis sa découverte, ce phénomène a été décrit chez plusieurs organismes, incluant les cellules de mammifères et la levure *S. cerevisiae*. L'étude du TLD a une importance clinique puisque plusieurs agents anticancers utilisés en chimiothérapie ciblent le métabolisme du dTTP et provoquent la mort des cellules par un mécanisme s'apparentant au TLD (Ahmad et al., 1998).

Chez *S. cerevisiae*, l'inhibition de Cdc21p provoque un déséquilibre dans le ratio dUTP/dTTP. Le dUTP est un intermédiaire du métabolisme du dTTP qui s'accumule lorsque la synthèse du dTTP est bloquée (figure 5). Lorsque la concentration de dUTP augmente au profit de la concentration du dTTP, le dUTP peut être utilisé lors de la synthèse de l'ADN (Ahmad et al., 1998). Les résidus uracile (U) incorporés dans l'ADN doivent être corrigés par réparation par excision des bases (BER), engendrant la formation de bris simple brin et double brin de l'ADN (Tinkelenberg et al., 2002). L'incapacité de bien remplacer les mauvaises bases étant donné l'excès de dUTP provoquerait la mort des cellules par TLD. En plus de l'augmentation de la concentration du dUTP, les cellules incapables de synthétiser du dTTP ont une concentration élevée de dATP, de dCTP et de dGTP (respectivement 120; 8,5 et 3,6 fois d'augmentation par rapport aux cellules de type sauvage isogéniques) (Kohalmi et Kunz, 1993).

Régulation de la synthèse des nucléotides chez *Saccharomyces cerevisiae*

Un déséquilibre dans le ratio entre les différents nucléotides a des effets variés sur les cellules, pouvant entre autres provoquer des mutations et la carcinogénèse chez les mammifères (Kunz et al., 1994). La RNR catalyse l'étape limitante pour la production des dNTPs. Ainsi, l'activité de la RNR doit être étroitement régulée. Chez *S. cerevisiae*, cette régulation s'effectue par trois mécanismes: une régulation transcriptionnelle, une régulation post-traductionnelle et une régulation allostérique. Ces trois mécanismes sont responsables de la régulation de la synthèse des nucléotides dans une situation normale, mais aussi lorsqu'une forte concentration de nucléotides est nécessaire pour répliquer ou réparer le génome.

La régulation transcriptionnelle s'effectue par Crt1p ("Constitutive RNR3 transcription"). Durant la phase S et en réponse aux dommages à l'ADN, Mec1p phosphorylerait Rad53p, qui à son tour

phosphorylerait Dun1p. En bout de ligne, l'activation de ces kinases mène à la phosphorylation de Crt1p. Crt1p phosphorylé est incapable de lier l'ADN, ce qui provoque l'activation de la transcription des RNR (figure 6) (Huang et al., 1998).

La régulation post-traductionnelle s'effectue par un mécanisme utilisant le

produit du gène *SML1* ("*Suppressor of mec1*

Lethality") qui se lie à la RNR pour inhiber son activité (Zhao et al., 1998). Durant la phase S, le niveau de Sml1p diminue et disparaît complètement en réponse aux dommages à l'ADN, permettant ainsi une activation des RNR. Sml1p se détache des RNR après sa phosphorylation par Dun1p et Rad53p, qui sont eux-mêmes activés par Mec1p. Par ailleurs, la fonction essentielle de Mec1p et Rad53p serait de réguler Sml1p durant une phase S normale (Zhao et al., 2001). L'incapacité de phosphoryler Sml1p dans un mutant *rad53Δ* ou *mec1Δ* résulterait en une inhibition constante des RNR, une diminution de la concentration de nucléotides, puis en une incapacité à bien compléter la répllication du matériel génétique menant à la mort de la cellule.

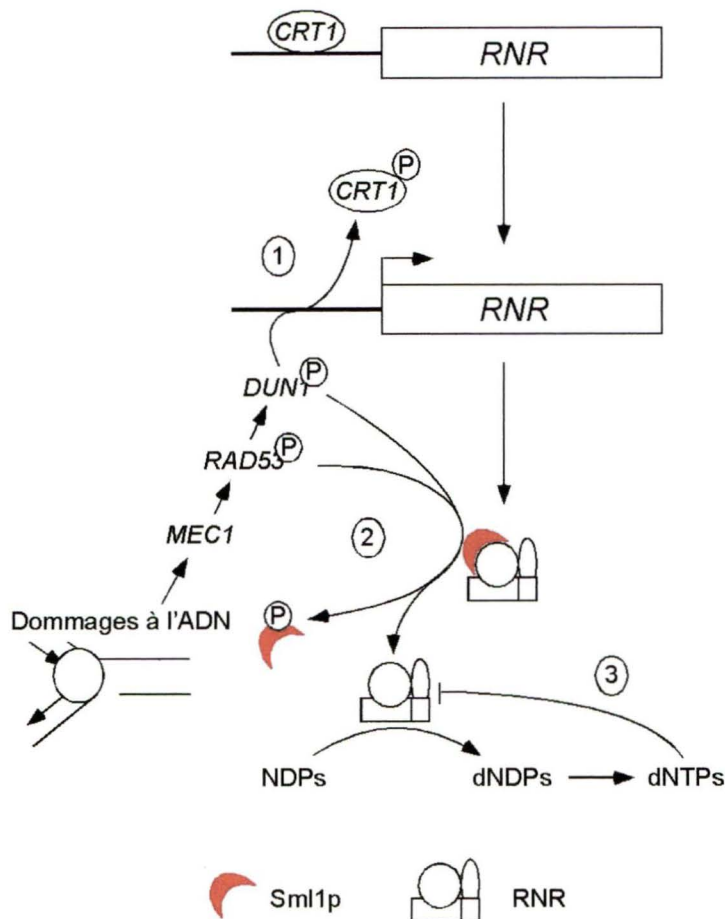


Figure 6: **Régulation de la synthèse des nucléotides chez *S. cerevisiae*.** La synthèse des nucléotides est régulé à trois niveaux. 1- Régulation transcriptionnelle par Crt1p. 2- Régulation post-traductionnelle par Sml1p. 3- Rétroinhibition allostérique par le ratio de ATP/dATP.

Le troisième mécanisme, une régulation allostérique, a été mis à jour récemment chez *S. cerevisiae*, mais a été largement étudié chez d'autres organismes (Chabes et al., 2003; Thelander et Reichard, 1979). Chez les mammifères comme chez la levure, la grosse sous-unité α_2 de la RNR contient deux sites allostériques dans chaque sous-unité α . Le site de spécificité régule le niveau relatif de chaque nucléotide, alors que le site d'activité régule la concentration totale des dNTPs en mesurant le ratio de dATP/ATP (Jordan et Reichard, 1998). Lorsque le niveau de dATP atteint un certain niveau, l'activité des RNR est inhibée par un mécanisme de rétroinhibition.

Objectif du projet

Le but initial du projet était d'expliquer "pourquoi et comment" une mutation dans les gènes codant pour la thymidilate synthase (*CDC21*) et la thymidilate kinase (*CDC8*), impliqués dans la synthèse des dTTP, provoquaient un raccourcissement des télomères (Adams et Holm, 1996). Rapidement, cette étude a pris de l'envergure nous menant à analyser l'effet d'un désordre en général dans la régulation de la synthèse des nucléotides sur la réplication des télomères. Le projet se divise en deux parties. Premièrement, nous avons tenté de démontrer que la régulation de la concentration de nucléotides était importante pour une réplication complète et adéquate des télomères. Deuxièmement, nous avons tenté de démontrer comment un déséquilibre dans la concentration des nucléotides pouvait affecter la réplication des télomères.

2. Matériels et Méthodes

Souches

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées pour cette étude sont décrites dans le tableau 1. Plusieurs mutants *cdc* ("cell division cycle"), incapables de compléter un cycle cellulaire à la température restrictive ont été isolés à la suite d'une mutagenèse aléatoire (Hartwell, L.H. et al., 1973). En plus des allèles désirés, les souches CH532 (*cdc8-1*) et CH545 (*cdc21-1*) issues de cette mutagenèse contiennent potentiellement une ou plusieurs autres mutations non identifiées (Adams et Holm, 1996). À partir de la souche CH532, on a obtenu les souches RWY42-22A (*CDC8*) et RWY42-22B (*cdc8-1*), sélectionnées après trois croisements consécutifs de cellules portant l'allèle *cdc8-1* avec une souche de type sauvage BY4705. RWY45-5A, RWY45-9B et RWY45-9A sont respectivement des spores *cdc21-1*, *cdc21-1* et *CDC21*, sélectionnées après trois croisements consécutifs d'une souche possédant la mutation *cdc21-1* avec une souche de type sauvage BY4705. Dans ce cas, CH545 a été la souche de départ utilisée. Les souches issues du troisième croisement avec une souche de type sauvage contiennent, en principe, comme seule mutation l'allèle recherché. RWY51-3B, RWY51-3C et RWY51-3D (respectivement *mecl^{ts}*, *telΔ* et *sml1Δ*) sont issus d'une microdissection des tétrades de la souche diploïde RWY51 (MAT *a/α ade2ΔhisG/ade2ΔhisG his3Δ200/his3Δ200 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/lys2Δ0 met15Δ0/met15Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 ura3Δ0/ura3Δ0 mecl^{ts}::HIS3/MEC1 sml1Δ::TRP1/SML1 tel1Δ::LEU2/TEL1*). Ces dernières souches ont été construites par Isabelle Dionne. MCY5150-26A construite par Mikhaïl Chakhparonian est une spore issue d'une microdissection d'une souche diploïde MCY5150 (MAT *a/α ade2Δ::hisG/ade2 ADE3/ade3 his3Δ200/his3 leu2Δ0/leu2 lys2Δ0/?*

met15Δ0/? trp1Δ63/trp1 ura3Δ0/ura3 ?/cyh2 mec1^{ts}::HIS3/MEC1 sml1Δ::TRP1/SML1 tel1Δ::LEU2/TEL1 RAD50/rad50Δ::kanMX4 résultant d'un croisement entre RWY51-28D et 50 648. Finalement, CSHY76-3C a été construit par Alain Dandjinou en remplaçant la séquence codante de *RIF1* (-1 à +5752 en fonction du codon d'initiation de *RIF1*) par le gène *kanMX4* codant pour une résistance à la généticine, selon la technique de remplacement de gène en une étape (Brachmann et al., 1998) dans la souche CSHY76 qui nous a été fournis par Carol Greider (Le et al., 1999).

Tableau 1 : Souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées durant cette étude.

Souche	Génotype	Origine ou référence
CH532	MATa <i>ade1 ade2 ura1 lys2 tyr1 gal1 his7 cdc8-1</i>	(Adams et Holm, 1996)
CH545	MATa <i>ade1 ade2 ura1 lys2 tyr1 gal1 his7 cdc21-1</i>	(Adams et Holm, 1996)
RWY42-22A	MATa <i>ade2 (ade1?) leu2Δ0 lys2 trp1Δ63 ura3Δ0 et/ou ura1</i>	Cette étude
RWY42-22B	MATa <i>ade2 (ade1?) leu2Δ0 lys2 trp1Δ63 ura3Δ0 et/ou ura1 cdc8-1</i>	Cette étude
RWY45-5A	MATa <i>ade2 (ade1?) leu2Δ0 lys2 trp1Δ63 ura3Δ0 et/ou ura1 cdc21-1</i>	Cette étude
RWY45-9A	MATα <i>ade2 (ade1?) leu2Δ0 lys2 trp1Δ63 ura3Δ0 et/ou ura1 CDC21</i>	Cette étude

RWY45-9B	MAT α <i>ade2 (ade1?) leu2Δ0 lys2 trp1Δ63 ura3Δ0 et/ou ura1 cdc21-1</i>	Cette étude
RWY51-3B	MAT α <i>ade2::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 mec1^{ts}::HIS3</i>	Cette étude
RWY51-3C	MAT α <i>ade2::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 tel1Δ::LEU2</i>	Cette étude
RWY51-3D	MAT α <i>ade2::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 sml1Δ::trp1</i>	Cette étude
MCY5150-26A	MAT α <i>ade2 ade3? leu2 trp1 ura3 rad50Δ::kanMX4</i>	Cette étude
CSHY76-3C	<i>ade2 ura3 leu2 his3 trp1 rif1Δ::kanMX4</i>	Cette étude
E1000	MAT α <i>ade2-1 tr1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 Gal URA3::GPD-TK_{7X}</i>	(Lengronne et al., 2001)
BY4705	MAT α <i>ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
W1588-4C	MAT α <i>ade2-1 can1-100 his3-115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	(Chabes et al., 2003)
W3779-2C	MAT α <i>ade2-1 can1-100 his3-115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 rnr1-D57N</i>	(Chabes et al., 2003)
W3930-13C	MAT α <i>ade2-1 can1-100 his3-115 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 dun1Δ::URA3</i>	(Chabes et al., 2003)
W3779-12B	MAT α <i>ade2-1 can1-100 his3-115 leu2-3,112 trp1-1</i>	(Chabes et al., 2003)

	<i>ura3-1 dun1Δ::URA3 rnr1-D57N</i>	
RWY12	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 tlc1Δ::LEU2</i> télomère VR marqué par ADE2	(Dionne et Wellinger, 1996)
Y300	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-115 trp1-1 ura3-1</i>	(Huang et al., 1998)
Y585	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-115 trp1-1 ura3-1 rnr1-240</i>	(Huang et al., 1998)
Y586	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-115 trp1-1 ura3-1 rnr2-68</i>	(Huang et al., 1998)
CH2377	MATa <i>ura3-52 trp1-289 ade2-101 tyr1 gal2 can1 poll-17 URA3/VII-L-TEL</i>	(Adams Martin et al., 2000)
BYku70Δ	MATa <i>ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0 yku70Δ::LEU2</i>	(Gravel et Wellinger, 2002)

Milieux de culture

Les souches ont été cultivées aux températures indiquées dans du milieu riche (YEPD: 1 % (P/V) Bacto-yeast extract, 2 % (P/V) Bacto-peptone, supplémenté de 0,004 % (P/V) uracile et 2 % (P/V) de glucose) ou dans du milieu minimal synthétique (0,12 % (P/V) "yeast nitrogen base" sans acides aminés, 0,5 % (P/V) sulfate d'ammonium, 1 % (P/V) acide succinique) supplémenté au besoin avec des acides aminés (0,005 % (P/V) de valine, de proline, d'acide aspartique, de sérine, d'histidine, de méthionine, de tyrosine, d'isoleucine et de phénylalanine et 0,01 % (P/V) d'adénine, d'uracile, de tryptophane, d'arginine, de leucine, de lysine, de cystéine et de thréonine). Le milieu contenant l'acide 5-Fluoro-orotic (5FOA) est un milieu minimal synthétique

supplémenté de 0,75 mg/l de 5FOA (American Biorganics Inc.), 0,005 % (P/V) d'uracil, 0,002 % (P/V) d'adénine et d'histidine et 0,03 % (P/V) de tyrosine en remplacement des concentrations indiquées pour le milieu synthétique. Le 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR) (Sigma F-0503) est dissous dans de l'eau déionisée à une concentration de 20 mg/ml, stérilisé par filtration sur un filtre de 0,22 µm et conservé à -20°C en aliquots de 500 µl. Le FUDR est ajouté à la concentration désirée au milieu de culture.

Plasmides

Le plasmide pRS281 (2µm *ARS1 TRP1 HIS3 TK amp^R kan^R*) contenant un fragment d'ADN codant pour la thymidine kinase (*TK*) du virus de l'herpès nous a été fourni par Robert Sclafani (non publié). Le vecteur contrôle pRS424 est un vecteur contenant une origine de répllication 2µm et le marqueur de sélection *TRP1* (Christianson et al., 1992). Le plasmide YEp245 qui contient *RNR1* est issu d'une librairie d'ADN génomique qui a été construite en clonant des fragments génomiques *Sau3AI* d'environ 10 kb issue d'une digestion partielle, dans le site *BamHI* de YEp24 (non publié). Le plasmide pAZ1 est un plasmide centromérique contenant *TLC1* (Beeler et al., 1994). Le plasmide pTEL1 a été construit par Mikhaïl Chakparonian en insérant un fragment génomique *SpeI-SalI* d'environ 9 kb contenant *TEL1*, dans les sites *SpeI* et *SalI* de pRS316 (Christianson et al., 1992). Le gène *DUT1* a été amplifié à partir d'ADN génomique de cellule de type sauvage, en créant des sites *BamHI* de chaque côté du gène, à l'aide des amorces pDUT1-forw (CGGGATCCCTATGTACATACACACGCACC) et pDUT1-Rev (CGGGATCCGCCCATGGCTTATGCATGCTAC). Ce fragment de PCR a été cloné dans le site *BamHI* de pRS425 (Christianson et al., 1992) pour donner le plasmide pDUT1.

Transformation de levure

Les différentes souches de levures sont transformées à l'aide d'une modification de la technique de "Transformation Efficace" de Gietz et al. (Gietz et al., 1992). Brièvement, un amas de cellules (environ 10^8 cellules) est prélevé d'une culture fraîche cultivée sur milieu solide. Ces cellules sont lavées dans l'eau déionisée stérile et dans du TE/Li-Acétate 1X stérile (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 M Li-Acétate) avant d'être resuspendues dans 50 μ l TE/ Li-Acétate 1X. On y ajoute environ 1 μ g d'ADN plasmidique à introduire, 50 μ g d'ADN simple brin de sperme de saumon et 300 μ l de solution 40 % PEG 4000 (40 % (P/V) PEG 4000, 1X TE, 0,1 M Li-Acétate). Le mélange est incubé à 30°C pendant 30 minutes suivi d'un choc thermique à 42°C pendant 15 minutes. Les cellules transformées sont étalées sur du milieu approprié selon le ou les plasmides utilisés.

Analyse de la taille des télomères

Afin d'alléger le texte, l'appellation "analyse des TRF" sera désormais utilisée pour désigner l'analyse des fragments télomériques libérés par digestion à l'aide d'enzyme de restriction. Brièvement, l'ADN génomique de levure est extrait à partir d'une culture cultivée en milieu liquide approprié en phase stationnaire à l'aide de la méthode des billes de verre (Huberman et al., 1987; Wellinger et al., 1993). Brièvement, cette méthode consiste à lyser les cellules à l'aide de billes de verre dans un tampon de lyse (0,1 M Tris-HCl, 50 mM EDTA, 1% (P/V) SDS pH 8,0). Le lysat est traité à la RNAase A, à la protéinase K et extrait au phénol/chloroforme avant de précipiter l'ADN à l'isopropanol. Le culot est lavé à l'éthanol 70 % et resuspendu dans 30 μ l de

TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). 12 µl d'ADN génomique est digéré pendant 16 heures à 37°C par *XhoI* dans un tampon de digestion (1 X Magic, 0,1 % (P/V) Digitonine, 10 mM DTT et 0,5 mg/ml RNase A) (Magic 10 X : 0,2 M Tris-HCl, 0,7 M NaCl, 0,2 M KCl, 0,1 M MgCl₂, 0,5 mM spermine, 0,125 mM spermidine et 0,1 % (P/V) aprotinine) dans un volume total de 100 µl. La digestion est arrêtée par un ajout de 100 µl de tampon d'arrêt (20 mM NaCl, 20 mM EDTA). L'ADN est précipité à l'isopropanol et le culot est lavé à l'éthanol 70 % avant d'être resuspendu dans 12 µl de TE. 0,5 à 1 µg d'ADN de chaque échantillon est déposé sur un gel d'agarose 0,7 % (P/V) dans du TBE 1X (1,08 % (P/V) Trizma-base, 0,55 % (P/V) acide borique et 2 mM Na₂EDTA). Le gel submergé dans du tampon TBE 1X dans une chambre à électrophorèse est soumis à l'électrophorèse pendant environ 16 heures à 0,8 V/cm. La photo du gel coloré au bromure d'éthidium sert de référence pour confirmer que la concentration d'ADN est équivalente entre les échantillons. L'ADN est transféré sur une membrane de nylon par transfert à la Southern (Sambrook et al., 1989). La membrane est pré-hybridée à 42°C pendant une heure dans une solution super-stock (0,5 % (P/V) lait en poudre faible en gras, 2 % (P/V) SDS, 50 % formamide deionisé, 5 X SSC (20X SSC: 17,53 % NaCl, 6,3 % acide citrique, ajusté le pH à 7 avec du NaOH), 1 X denhardtts et 1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon) (denhardtts 50 X : 2 % (P/V) Ficoll 10g/l, 2 % (P/V) polyvinylpyrrolidone 10g/l, 2 % (P/V) BSA 10 g/l). À moins d'indication contraire, l'hybridation s'effectue avec une sonde Y' ou pCT 300 (voir page 30) durant 16 heures dans une solution super-stock dextran (8 % (P/V) dextran sulfate dans du super-stock. La membrane est finalement lavée 20 minutes à la température ambiante dans un bain de 2X SSC et une heure à 55°C dans un bain de 0,1X SSC-0,1 % SDS, avant d'être exposé dans une cassette avec un film à -80°C pendant environ 16 heures. Une sonde Y' révèle des fragments terminaux d'environ 1,3 Kb, ainsi que deux bandes de 5,2 et 6,7 Kb, correspondant aux fragments Y' présent

de zéro à quatre copies par télomères. En plus de ces mêmes fragments, la sonde pCT 300 révèle aussi des bandes correspondant aux télomères ne possédant pas de Y' et des bandes correspondant à des répétitions télomériques internes. La figure 7 résume la procédure expérimentale utilisée.

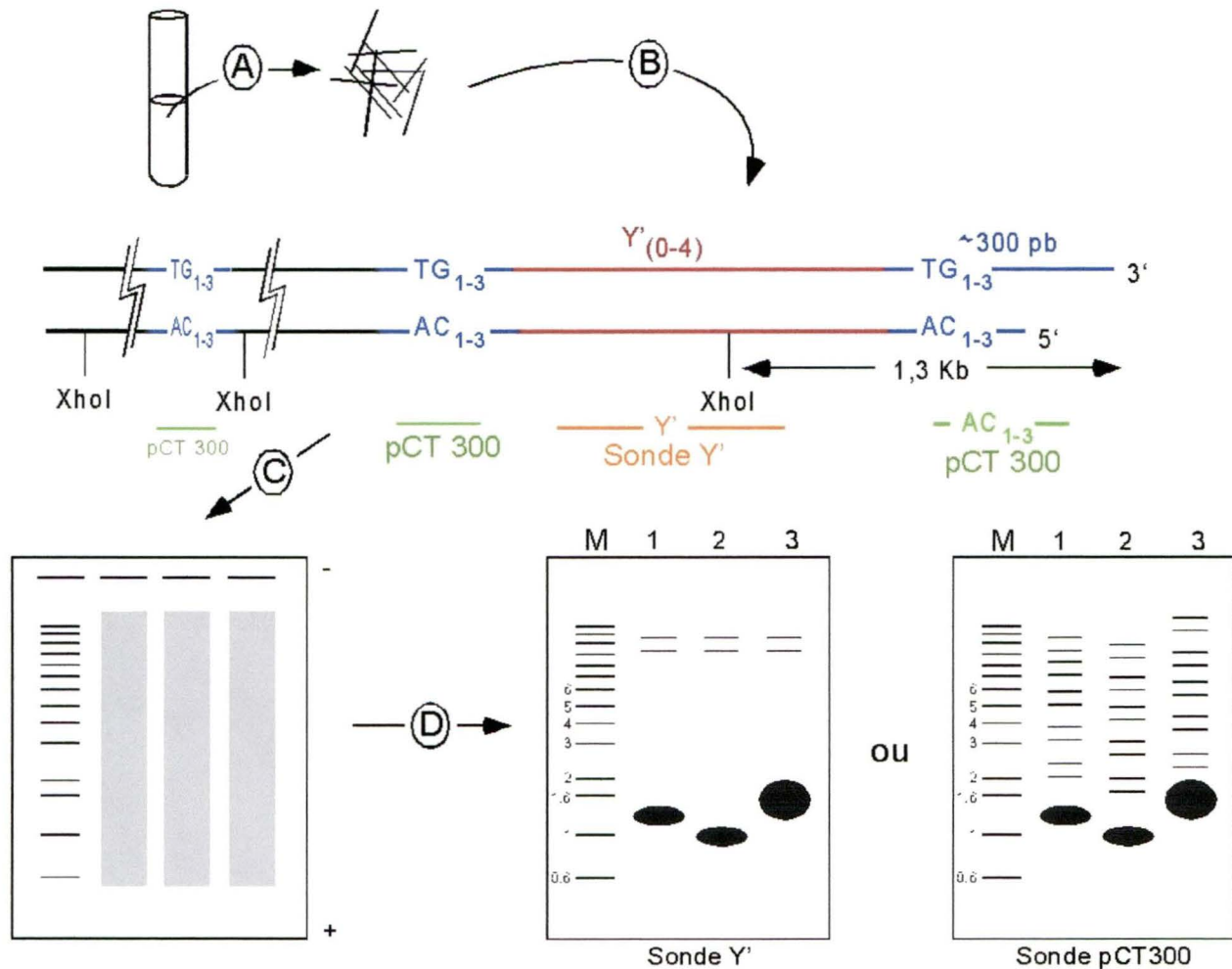


Figure 7: Analyse de la taille des télomères. L'ADN génomique extrait à partir d'une culture en phase stationnaire (A) est digéré par *XhoI* (B), séparé sur gel d'agarose (C) et analysé par transfert à la Southern (D). L'autoradiogramme d'une membrane hybridée avec une sonde Y' ou pCT 300 montre des télomères de taille normale de 1,3 kb (piste 1), des télomères courts d'environ 1 kb (piste 2) et des télomères longs d'environ 1,6 kb (piste 3). M, Marqueur de poids moléculaire. La taille des fragments est indiquée en kilobase (kb).

Sondes utilisées

Les sondes sont radiomarquées par la technique d'amorçage aléatoire préalablement décrit par Feinberg et Vogelstein (Feinberg et Vogelstein, 1983). Le fragment Y' utilisé est un fragment de 600 pb obtenu à partir d'une digestion *KpnI* du plasmide pVZY'K (Dionne et Wellinger, 1996), alors que le fragment pCT300 est un fragment de 300 pb obtenu à la suite d'une digestion *EcoRI* du plasmide pCT300 (Parenteau et Wellinger, 1999). Les fragments sont purifiés sur gel d'agarose avant leur marquage. Brièvement, un mélange de courtes amorces aléatoires est ajouté à 50-150 ng d'ADN préalablement dénaturé. Par la suite, une élongation des amorces est effectuée à l'aide d'une polymérase (fragment klenow; NEB M0210S) en présence de nucléotides dont des dCTP marqués au ^{32}P . Les fragments d'ADN marqués sont purifiés sur une colonne d'exclusion (Sephadex G-50) (Feinberg et Vogelstein, 1983).

Test de croissance sur milieu solide

Les cellules sont cultivées dans du milieu liquide approprié jusqu'en phase logarithmique. La quantité de cellules est déterminée en comparant l'absorbance de notre culture à 660 nm avec une courbe standard. Chaque échantillon est dilué à 1×10^7 cellules par ml. Par la suite, des dilutions en série d'un facteur de 10 entre sont effectuées et 10 μl de chaque dilution est déposé sur un milieu solide approprié. Les milieux sont incubés selon les conditions à analyser.

Courbe de croissance

Les cultures des différents clones à analyser sont diluées à une concentration de $0,02 * 10^7$ cellules/ml. 100 μ l de chaque échantillon est déposé dans un puit d'une plaque 96 puits. Le FUDR est ajouté aux concentrations désirées directement dans les puits. La plaque est déposée dans un lecteur multiplaque PowerWave X₃₄₀ de BioTech. Les lectures d'absorbance sont effectuées à 660 nm toutes les dix minutes avec une agitation constante entre chaque lecture. La chambre de lecture est maintenue à une température constante de 30°C.

Élongation des télomeres des souches possédant l'allèle *poll-17* à température semi-permissive

Les souches sont cultivées sur du milieu sélectif contenant 5 μ g/ml de FUDR pendant 140 générations à température permissive (23°C). À partir d'une culture liquide contenant 5 μ g/ml de FUDR en phase logarithmique à température permissive, on dilue les cultures à $0.1 * 10^7$ cellules par ml. On place un aliquot de cette culture diluée à 23°C et un aliquot à 30°C pendant 16 heures. Par la suite, les cultures sont centrifugées et traitées tel que décrit pour effectuer une analyse des fragments terminaux de restriction.

3. Résultats

Les souches possédant les mutations *cdc8-1* et *cdc21-1* ont des télomères courts à température permissive.

Plusieurs mutations dans des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN provoquent un allongement ou un raccourcissement des télomères (Adams et Holm, 1996; Dahlen et al., 2003).

Notamment, une mutation dans le gène de la polymérase α (*POL1*), impliqué dans la synthèse du brin retardé, provoque un rallongement des télomères (Adams Martin et al., 2000), alors qu'une mutation dans la polymérase ϵ (*POL2*), dont le rôle est moins connu, provoque un

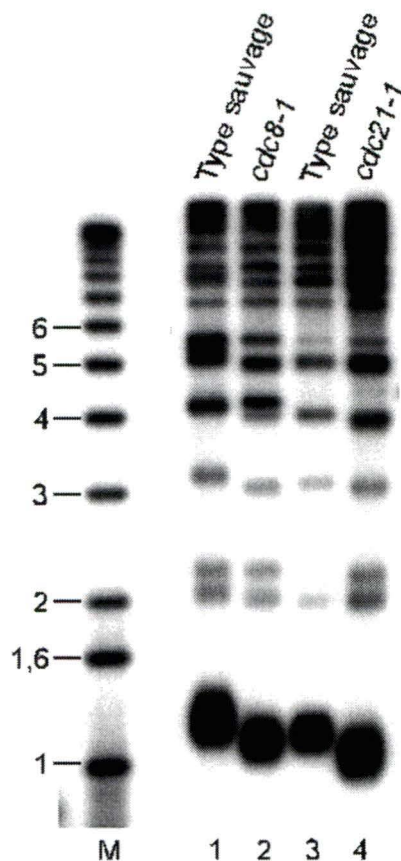
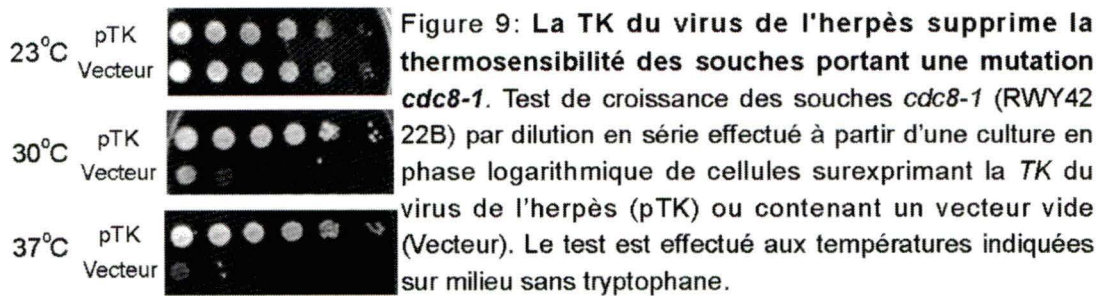


Figure 8: Les mutants *cdc8-1* et *cdc21-1* ont des télomères courts à température permissive. L'ADN des souches RWY42 22A (type sauvage), RWY42-22B (*cdc8-1*), RWY45-9A (type sauvage) et RWY45-9B (*cdc21-1*) a été extrait à partir de cultures en phase stationnaire à 23°C et traité pour l'analyse des TRF tel que décrit dans la section matériels et méthodes. La membrane a été hybridé avec une sonde pCT300. M, marqueur de poids moléculaire.

raccourcissement des télomères (Ohya et al., 2002). Adams & Holm ont démontré pour la première fois qu'une mutation dans les gènes codant pour la thymidilate synthase (*CDC21*) ou la thymidilate kinase (*CDC8*), impliqués dans la synthèse des dTTP, provoquaient un raccourcissement des télomères, toutefois sans apporter d'explications (Adams et Holm, 1996). Cependant, les souches utilisées par ces auteurs proviennent d'une mutagenèse aléatoire chimique et contiennent potentiellement d'autres mutations pouvant interférer dans le phénotype étudié (Hartwell, L.H. et al., 1973). Après trois croisements consécutifs avec une souche de type sauvage, les mutations non désirées créées par la mutagenèse sont, en principe, éliminées. Les cellules portant les mutations *cdc8-1* et *cdc21-1* issues du troisième croisement ont bel et bien des télomères courts même à température permissive (figure 8).

La thermosensibilité des cellules portant l'allèle *cdc8-1* est supprimée par la thymidine kinase du virus de l'herpès.

Le gène *CDC8* est essentiel pour la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Des mutations thermosensibles du gène ont été isolées, dont l'allèle *cdc8-1* (Hartwell, L.H. et al., 1973). À température permissive (23°C), les souches portant cet allèle ont une phase S presque deux fois plus longue que celles des cellules de type sauvage isogéniques. À température restrictive (30°C), ces mutants meurent. Il a été démontré que la *TK* du virus de l'herpès, grâce à son activité kinase, complémente l'activité thymidilate kinase de Cdc8p, et supprime la thermosensibilité des souches *cdc8-1*. De la même façon, la *TK* du virus de l'herpès permet aussi aux cellules avec une délétion du gène *CDC8* de survivre (Sclafani et Fangman, 1984). Selon ces données, la thermosensibilité des souches *cdc8-1* serait due à une diminution de la production de dTTP et la



TK du virus de l'herpès permettrait de rétablir la concentration de dTTP. Cette diminution de synthèse de nucléotides dans les souches *cdc8-1* pourrait aussi être responsable de l'apparition du défaut télomérique observé. Notre but étant de vérifier l'effet de la TK du virus de l'herpès sur le phénotype télomérique des souches portant l'allèle *cdc8-1*, nous avons tout d'abord vérifié l'effet de la surexpression de la TK du virus de l'herpès sur la thermosensibilité des nos cellules (*cdc8-1*). Comme prévu, ces souches (*cdc8-1*) meurent à température restrictive et la présence d'un plasmide à copie multiples contenant le gène de la TK du virus de l'herpès permet aux cellules de survivre à température restrictive (figure 9). Ainsi, la thermosensibilité de nos souches portant l'allèle *cdc8-1* est supprimée par la surexpression de la TK du virus de l'herpès.

Le défaut télomérique des souches portant la mutation *cdc8-1* est complémenté par la thymidine kinase du virus de l'herpès.

Afin de démontrer que la diminution de la concentration de dTTP est responsable de l'apparition du défaut télomérique des souches portant la mutation *cdc8-1*, nous avons vérifié l'effet de la TK du virus de l'herpès sur le phénotype télomérique. À température permissive (23°C) les souches *cdc8-1* ont des télomères courts (figure 8 piste 2 et figure 10, pistes 1 à 4). À cette même température, l'ajout d'un plasmide à copies multiples contenant le gène de la TK du virus de

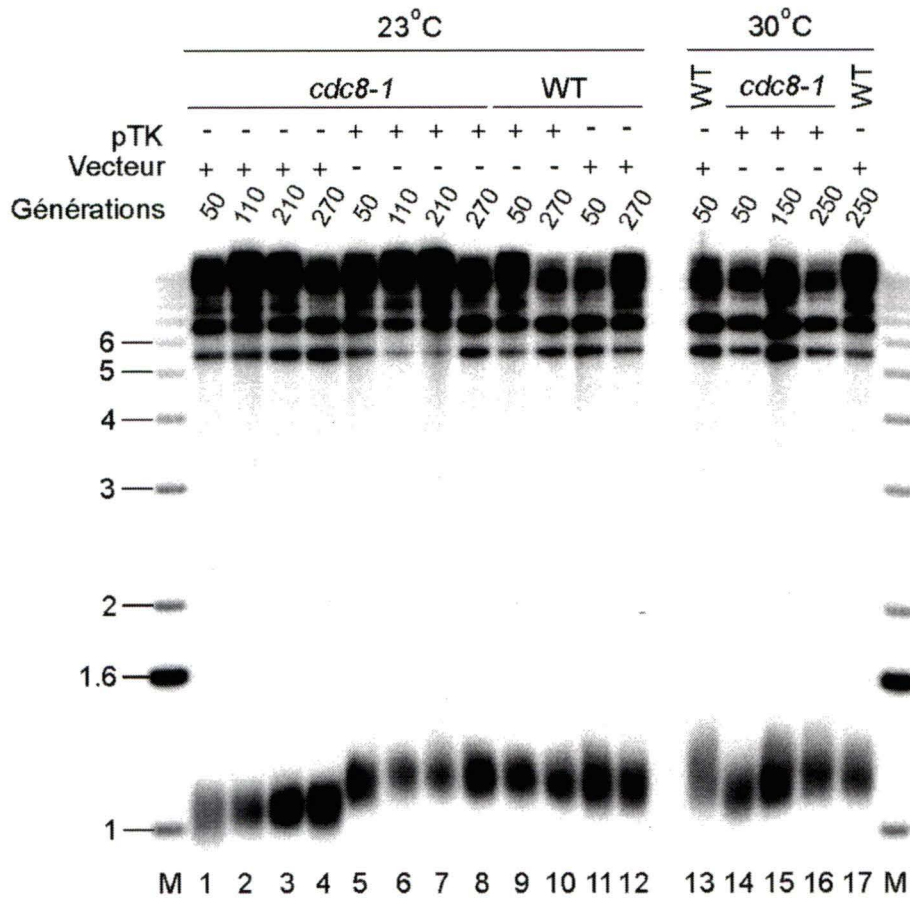


Figure 10: La *TK* du virus de l'herpès complète le défaut télomérique des cellules avec une mutation *cdc8-1*. À 23°C, l'ajout d'un plasmide à copies multiples contenant le gène de la *TK* du virus de l'herpès (pTK) permet un rallongement des télomères au fil des générations (pistes 1 à 4 en comparaison avec les pistes 5 à 8). La *TK* du virus de l'herpès complète aussi le défaut télomérique des souches *cdc8-1* à 30°C (pistes 14 à 16). La *TK* du virus de l'herpès et le vecteur vide (Vecteur) n'ont aucun effet sur la taille des télomères des cellules de type sauvage isogéniques à 23°C (pistes 9 à 12) et à 30°C (pistes 13 et 17). L'analyse des TRF est effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes. M, marqueur de poids moléculaire.

l'herpès permet de rétablir la taille des télomères au fil des générations (figure 10 pistes 5 à 8). À 23°C, la *TK* du virus de l'herpès et le vecteur vide n'ont aucun effet sur la taille des télomères de cellules de type sauvage isogéniques (pistes 9 à 12). À 30°C, la *TK* du virus de l'herpès permet aussi de rétablir la taille des télomères au fil des générations (pistes 14 à 16) en comparaison à la

taille des télomères des cellules de type sauvage isogéniques possédant un vecteur vide (pistes 13 et 17). Étant donné la thermosensibilité des mutants, il est impossible de vérifier l'effet du plasmide vide sur les cellules portant la mutation *cdc8-1* à 30°C. En plus de supprimer la thermosensibilité, la *TK* du virus de l'herpès permet donc de rétablir la taille des télomères des cellules possédant l'allèle *cdc8-1* à 23°C et 30°C.

L'inhibition de la thymidylate synthase provoque un raccourcissement des télomères des cellules de type sauvage.

À température permissive, les souches portant l'allèle *cdc21-1* ont une phase S allongée et des télomères courts (figure 8 piste 4). Sachant que Cdc21p est impliqué dans la synthèse des dTTP, on croit que la diminution de la concentration de dTTP dans ces souches (*cdc21-1*) serait responsable de l'apparition du défaut télomérique. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé l'effet de la *TK* du virus de l'herpès en combinaison avec du FUDR (5-fluoro-2'-déoxyuridine) sur des cellules de type sauvage. Chez *S. cerevisiae*, la *TK* du virus de l'herpès phosphoryle le FUDR en FdUMP qui se lie de façon covalente à Cdc21p et l'inhibe (figure 5A). Des tests de croissance ont préalablement établis que 5 µg/ml de FUDR permet de reproduire le phénotype de croissance des cellules portant l'allèle *cdc21-1* en ralentissant le cycle cellulaire sans affecter la survie des cellules (résultats non montrés). Les télomères des cellules de type sauvage contenant la *TK* du virus de l'herpès incubés en présence de 5 µg/ml de FUDR pendant plusieurs générations raccourcissent graduellement (figure 11 pistes 1 à 4) avant d'atteindre une taille "plancher" d'environ 150 pb plus court que des télomères de cellules de type sauvage (piste 5 à 7). La présence du vecteur vide n'a aucun effet sur la taille des télomères même après 100

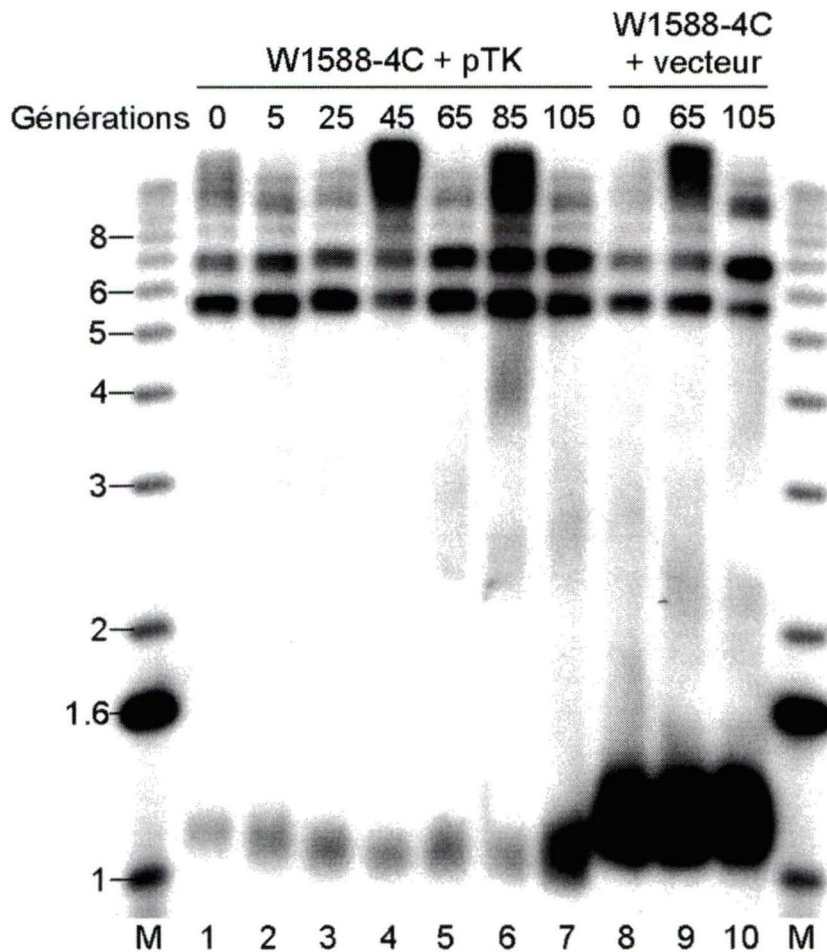


Figure 11: L'inhibition de la thymidylate synthase des cellules de type sauvages provoque un raccourcissement des télomères. Les cellules de type sauvage W1588-4C contenant la *TK* du virus de l'herpès (pTK) (pistes 1 à 7) ou un vecteur vide (Vecteur) (pistes 8 à 10) ont été incubées en présence de 5 µg/ml de FUDR pendant plusieurs générations à 30°C. L'analyse des TRF a été effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes aux générations indiquées. M, marqueur de poids moléculaire.

génération de culture en présence de FUDR (pistes 8 à 10). L'inhibition spécifique de Cdc21p à l'aide de la *TK* du virus de l'herpès et du FUDR provoque donc un raccourcissement des télomères des cellules de type sauvage au fil des générations.

Est-ce que la diminution de la concentration de tous les nucléotides affecte la taille des télomères?

Après avoir démontré qu'une diminution de la synthèse des dTTP peut provoquer un raccourcissement des télomères, on s'est demandé si la diminution de la synthèse de tous les nucléotides peut provoquer l'apparition du même phénotype. L'hydroxyurée inhibe la biosynthèse des nucléotides en interagissant avec la petite sous-unité de la RNR (Moore et Hurlbert, 1985). Par test de croissance de dilutions en série et par courbe de croissance, nous avons analysé l'effet de différentes concentrations d'hydroxyurée sur la croissance de cellules de type sauvage BY4705. À 100 mM d'hydroxyurée, ces cellules ont une phase S allongée sans subir de mortalité (figure 12A et 12B). De façon surprenante, le traitement des cellules de type sauvage pendant plusieurs générations avec 40 mM ou 100 mM d'hydroxyurée n'a aucun effet sur la taille des télomères (figure 12C et 12D). Le traitement des cellules avec l'hydroxyurée ne semble donc pas affecter la taille des télomères. Cependant, il est connu que les cellules traitées avec de l'hydroxyurée à faible dose s'adaptent rapidement en surexprimant certaines sous-unités de la RNR, ce qui fait partie des mécanismes de réparations des dommages à l'ADN (Elledge et Davis, 1989). Ainsi, l'utilisation de cette drogue pour diminuer la concentration de tous les nucléotides ne semble pas adéquate. L'analyse de souches contenant des mutations dans des gènes impliqués dans la synthèse de tous les nucléotides serait plus appropriée. Des allèles thermosensibles de différentes sous-unités du complexe RNR (*rnr1-240* et *rnr2-68*) ont été isolées et les souches correspondantes nous ont été gracieusement fournies (Huang et al., 1998). À température permissive, les télomères des souches avec les mutations *rnr1-240* et *rnr2-68* (figure 13 respectivement pistes 3 et 4) sont plus courts comparativement aux télomères des cellules de type sauvage isogéniques (piste 2). Ainsi, la diminution de la synthèse de tous les nucléotides provoque le raccourcissement des télomères.

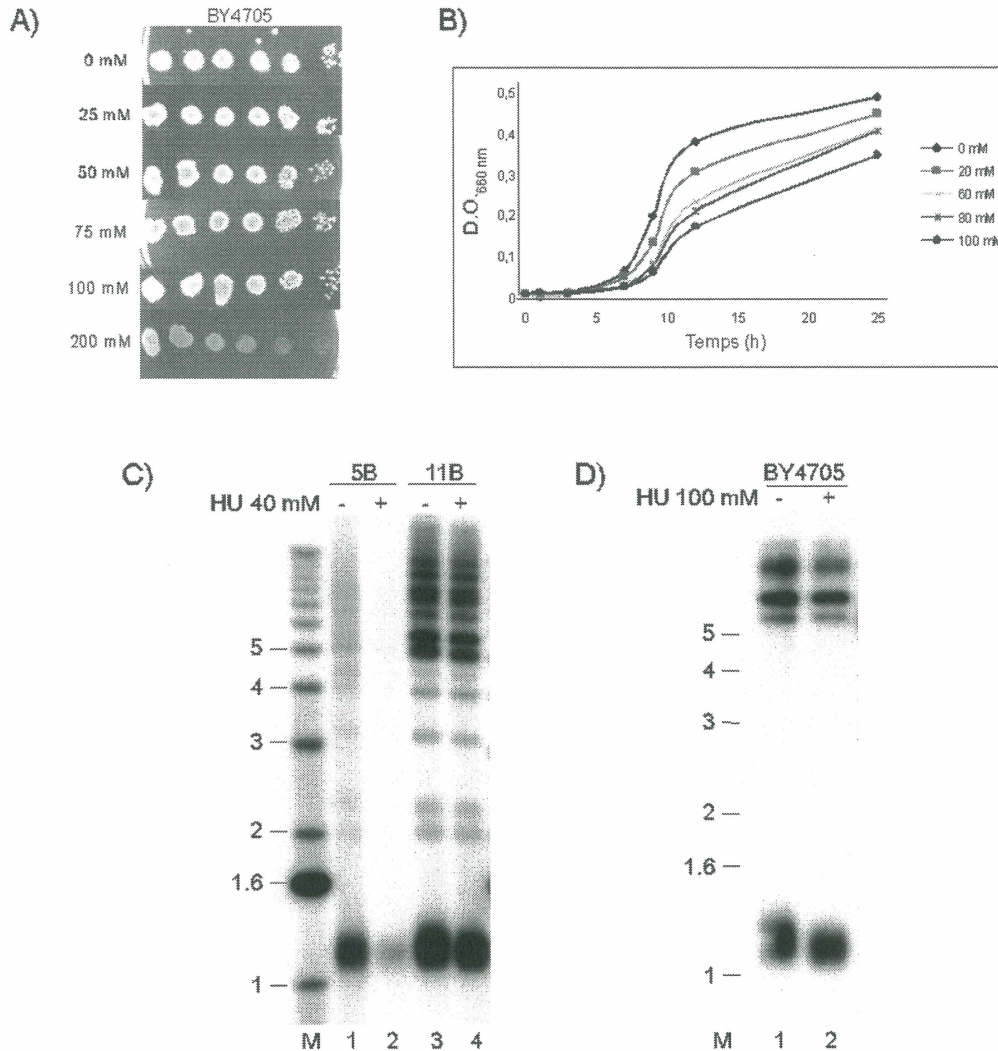


Figure 12: L'hydroxyurée n'affecte pas la taille des télomères des cellules de type sauvage. A) Effet de différentes concentrations d'hydroxyurées (0 à 200 mM) sur la croissance des cellules BY4705 par dilution en série. B) Courbe de croissance de BY4705 en présence de différentes concentrations d'hydroxyurées (0 à 100 mM). C) Analyse des TRF de deux clones indépendants de BY4705 (5B et 11B) à la suite d'un traitement avec 40 mM d'HU pendant 40 générations (Sonde PCT 300). D) Analyse des TRF d'une autre souche parentale de BY4705 à la suite d'un traitement avec 100 mM d'HU pendant 60 générations (sonde Y'). L'analyse des TRF est effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes. M, marqueur de poids moléculaire.

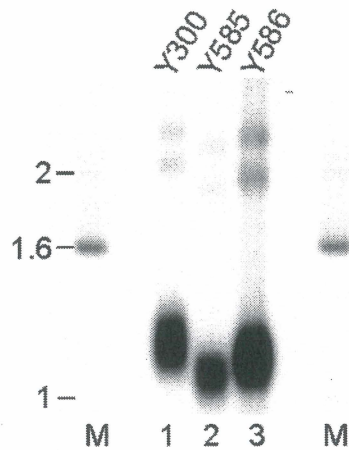


Figure 13: La diminution de la synthèse de tous les nucléotides provoque un raccourcissement des télomères. L'analyse des TRF des souches Y300 (type sauvage), Y585 (*rnr1-240*) et Y586 (*rnr2-68*) a été effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes à partir de culture fait à 23°C (sonde pCT300).

La surexpression de *RNR1* rétablit partiellement la taille des télomères des souches portant l'allèle *cdc21-1*.

De façon surprenante, des souches avec la mutation *cdc21-1* traités avec de l'hydroxyurée ont des télomères plus longs que des mutants non traités (résultats non montrés). Sachant que le traitement de cellules avec de faibles doses d'hydroxyurées provoque une rétroaction positive sur la transcription de certaines sous-unités de la RNR (Averbeck et Averbeck, 1994; Elledge et Davis, 1989), l'augmentation de la concentration de tous les nucléotides, et par conséquent des dTTP, pourrait provoquer le rallongement des télomères des souches avec l'allèle *cdc21-1* traités avec de l'hydroxyurée. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons voulu vérifier l'effet de la surexpression directe d'une sous-unité de la RNR sur le phénotype télomérique de ces souches (*cdc21-1*). Des travaux indépendants à cette étude ont démontré que la surexpression de *RNR1* est suffisante pour augmenter la concentration de tous les nucléotides et supprimer la létalité des cellules possédant la délétion *mec1Δ* et des cellules avec les mutations *mec1^{ts} tel1Δ* à 37°C, comme le fait la délétion de *SML1* (résultats non montrés) (Zhao et al., 1998). Dans notre cas, la surexpression de *RNR1* provoque le rallongement des télomères de deux clones *cdc21-1*

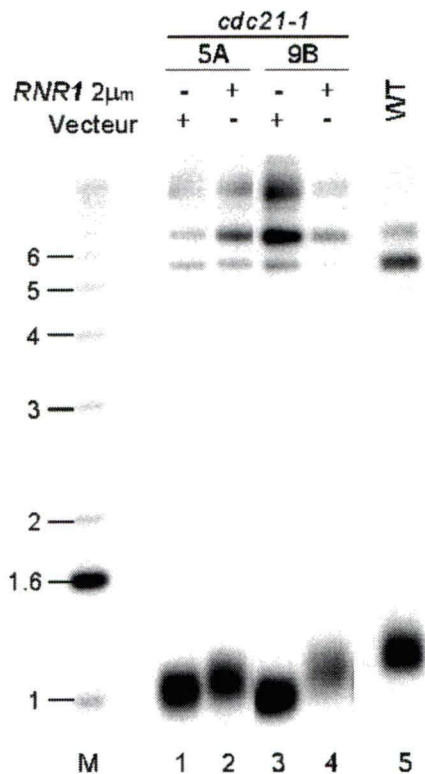


Figure 14: La surexpression de *RNR1* rétablit partiellement la taille des télomères des souches portant une mutation *cdc21-1*. L'analyse des TRF a été effectuée comme décrit dans la section matériels et méthodes après avoir cultivé les cellules à 23°C pendant 110 générations sur milieu sans uracile. Deux clones *cdc21-1* (RWY45-5A et RWY45-9B) possédant un vecteur vide (Vecteur) (piste 1 et 3) ou un plasmide surexprimant *RNR1* (*RNR1* 2 μ m) (piste 2 et 4) ont été analysés. La piste 5 montre la taille des télomères de cellules de type sauvage non isogéniques. M, marqueur de poids moléculaire.

différents (RWY45-5A et RWY45-9B) (figure 14 pistes 1 et 3 en comparaison avec les pistes 2 et 4) sans que la taille des télomères atteigne celle de cellules de type sauvage (piste 5). Ainsi, la surexpression de *RNR1* peut rétablir partiellement le défaut télomérique des souches portant la mutation *cdc21-1*, exactement comme nous l'avions vu précédemment lors du traitement de ces souches (*cdc21-1*) avec l'hydroxyurée.

Le défaut télomérique des cellules ayant une délétion du gène *DUNI* est complété par une augmentation de la concentration de tous les nucléotides.

Dun1p est une kinase impliquée dans les mécanismes de régulation de la synthèse des nucléotides (figure 6). Sa délétion provoque une incapacité des cellules à induire la production des nucléotides lors des mécanismes de réponses aux dommages à l'ADN, rendant les souches *dun1 Δ*

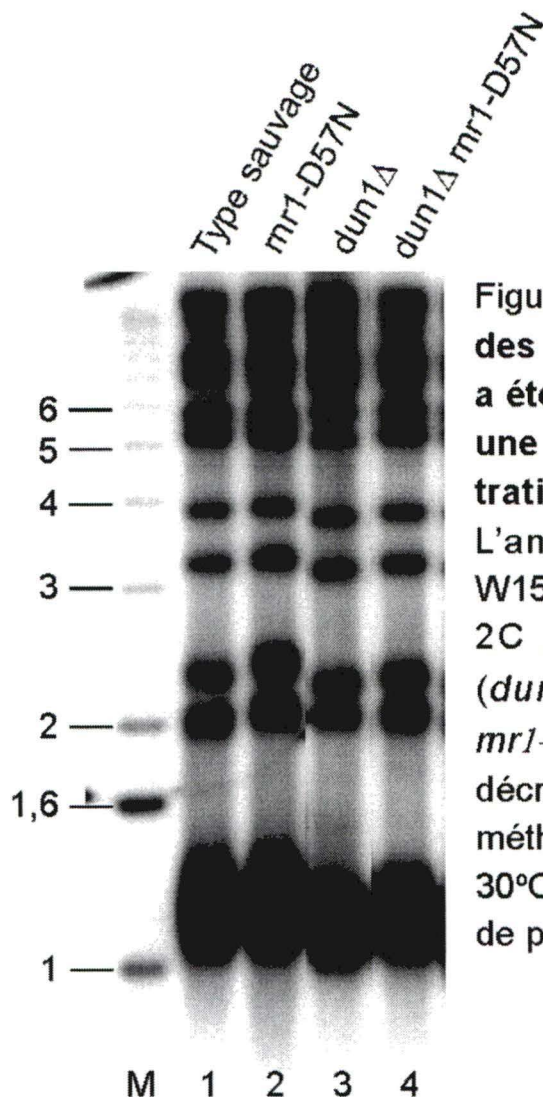


Figure 15: Le défaut télomérique des souches dont le gène *DUN1* a été délété est complémenté par une augmentation de la concentration de tous les nucléotides. L'analyse des TRF des souches W1588-4C (type sauvage), W3779 2C (*rnr1-D57N*) et W3930-13C (*dun1Δ*) et W3930-12B (*dun1Δ rnr1-D57N*) a été effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes à partir de culture fait à 30°C (sonde pCT300). M, Marqueur de poids moléculaire.

incapables de réparer les bris (*DUN1*: "*DNA Damage UNinducible*") (Zhou, Z. et Elledge, 1993). Par ailleurs, la délétion de *DUN1* provoque aussi un faible raccourcissement des télomères (figure 15 piste 3). Afin de démontrer que la diminution de la concentration de nucléotides dans les souches *dun1Δ* serait responsable de ce défaut télomérique, nous avons utilisé un double mutant *dun1Δ rnr1-D57N*. La mutation *rnr1-D57N* rend le complexe RNR incapable de répondre à la rétroinhibition allostérique exécuté par le niveau de nucléotides. Les cellules portant cette mutation ont donc de 1,6 à 2 fois plus de nucléotides que des cellules de type sauvage (Chabes et al., 2003). L'allèle *rnr1-D57N* complémente le faible défaut télomérique des souches *dun1Δ*

(piste 4). Les souches étant isogéniques et traités de façon identique, nous pouvons conclure avec confiance que la faible différence dans la taille des télomères (piste 3 vs piste 4) est significative. Par conséquent, l'augmentation de la concentration de tous les nucléotides complèterait le défaut télomérique des souches *dun1Δ*, suggérant que la diminution de la concentration de nucléotides dans ces mutants serait responsable du défaut télomérique.

L'augmentation de la concentration de tous les nucléotides complèment le défaut télomériques des souches portant la mutation *mec1^{ts}*.

Mec1p est une kinase homologue à ATR de l'humain. La délétion du gène encodant cette protéine provoque la mort des cellules à moins que la concentration de nucléotides soit augmentée par la délétion de *SML1* ("*Suppressor of MEC1 Lethality*") ou par la surexpression de *RNR1* (Zhao et al., 1998). L'augmentation de la concentration de tous les nucléotides par la surexpression de *RNR1* provoque un rétablissement de la taille des télomères des souches portant l'allèle *mec1^{ts}* (figure 16B piste 6), qui à température permissive, ont des télomères très légèrement raccourcis (piste 5). Cependant, l'augmentation de la synthèse de tous les nucléotides par la surexpression de *RNR1*, n'affecte pas la taille des télomères des cellules de type sauvage, des souches *tel1Δ*, des souches *yku80Δ* et des souches *rad50Δ* (figure 16). La surexpression de la sous-unités *RNR1* dans la souche Y585 (*rnr1-240*) nous sert de contrôle positif (figure 16B pistes 1 et 2) .

Avec les résultats précédents, nous avons démontré qu'il semble y avoir une corrélation entre la capacité de synthèse des nucléotides et la taille des télomères. La prochaine section est consacrée à l'analyse du mécanisme provoquant le raccourcissement des télomères des mutants ayant une

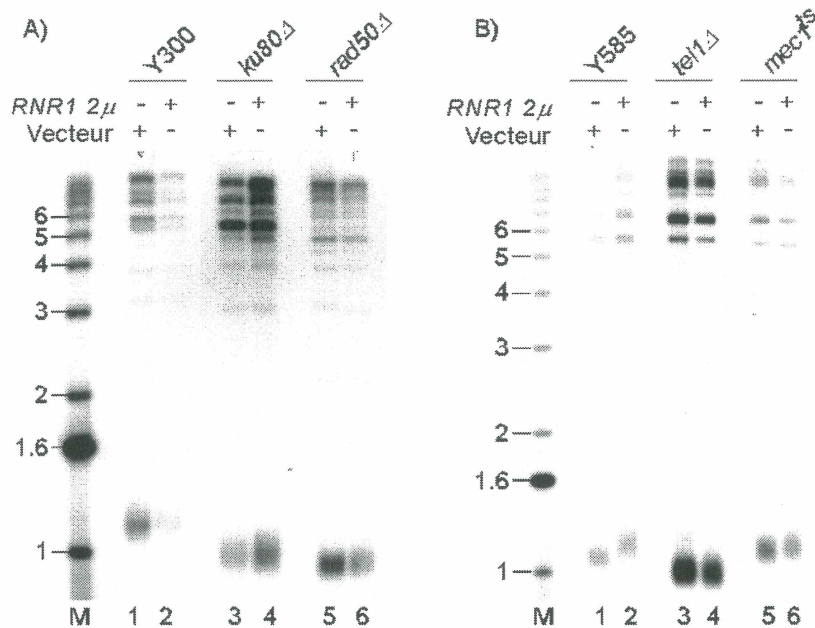


Figure 16: Effet de l'augmentation de la concentration de tous les nucléotides sur la taille des télomères de différents mutants. Les souches Y300 (type sauvage), *rad50*Δ et *tel1*Δ ont été cultivée à 30°C alors que les souches *ku80*Δ, Y585 (*mr1-240*) et *mec1*^{ts} ont été cultivées à 23°C pendant 100 générations sur milieu sans uracile avec un plasmide à copie multiples contenant le gène *RNR1* (*RNR1 2μm*) ou avec un vecteur vide (vecteur). A) La surexpression de *RNR1* n'a aucun effet sur la taille des télomères des cellules de type sauvage (pistes 1 et 2), des cellules *ku80*Δ (pistes 3 et 4), des cellules *rad50*Δ (pistes 5 et 6). B) Les télomères courts des mutants Y585 (*mr1-240*) (piste 1) et des mutants *mec1*^{ts} (piste 5) sont allongés lorsqu'on surexprime *RNR1* (piste 2 et 6 respectivement). Cependant, cette surexpression n'a aucun effet sur la taille des télomères des mutans *tel1*Δ (pistes 3 et 4). L'analyse des TRF a été effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes. M, marqueur de poids moléculaire.

synthèse des nucléotides diminuée. D'un point de vue technique, grâce à la TK du virus de l'herpès en combinaison avec le FUDR, il a été plus facile d'étudier le mécanisme provoquant le raccourcissement des télomères dans des cellules ayant une synthèse des dTTP diminuée. Le but des prochaines expériences est de déterminer comment la télomérase et/ou la réplication semi-conservative sont affectées lors de la réplication des télomères lorsque la synthèse des dTTP est diminuée.

La réplication semi-conservative des télomères semble être affectée par une diminution de la synthèse des dTTP.

Chez *S.cerevisiae*, le brin 3' riche en GT est allongé par la télomérase (figure 1 et 3). Selon une première hypothèse, seule la télomérase serait incapable d'ajouter suffisamment de répétitions télomériques lorsque la synthèse des dTTP, nécessaires en bonne quantité pour l'allongement des télomères par la télomérase, est diminuée. Dans ce cas, en absence de la télomérase, la cinétique de perte de séquences télomériques devrait être indépendante de la capacité de synthèse des dTTP. La figure 17 A résume la procédure expérimentale. La souche RWY12 (*tlc1Δ::LEU2*) est maintenue en vie par le plasmide pAZ1 qui contient le gène encodant pour la composante ARN de la télomérase (*TLC1*) et un marqueur de sélection *URA3*. Les cellules ayant perdu le plasmide pAZ1, et par conséquent la composante ARN de la télomérase, sont sélectionnées sur du milieu contenant de l'acide 5-fluoro-orotic (5-FOA). Le 5-FOA est toxique pour les cellules qui ont conservé le marqueur *URA3* et par conséquent le plasmide pAZ1. En absence de la télomérase, il y a perte de répétitions télomériques à un rythme de 3 à 5 paires de base (pb) par génération due au problème de réplication des extrémités. Ainsi, après environ 60 générations, les 300 pb de répétitions télomériques sont perdues, provoquant l'entrée en crise des cellules menant à la mort ou à l'apparition de survivants (Lendvay et al., 1996; Lundblad et Szostak, 1989; Singer et Gottschling, 1994). Lors de l'analyse des TRF par transfert à la Southern, l'apparition de survivants se caractérise par la perte du signal des fragments télomériques d'environ 1,3 kb et l'augmentation du signal correspondant aux fragments Y' de 5,2 et 6,7 kb (figure 17B pistes 6 à 8, 12 à 16). Sur milieu solide, l'apparition de survivants se caractérise par la perte des colonies vers la fin de l'étalement et l'apparition de petites colonies au début de l'étalement par épuisement

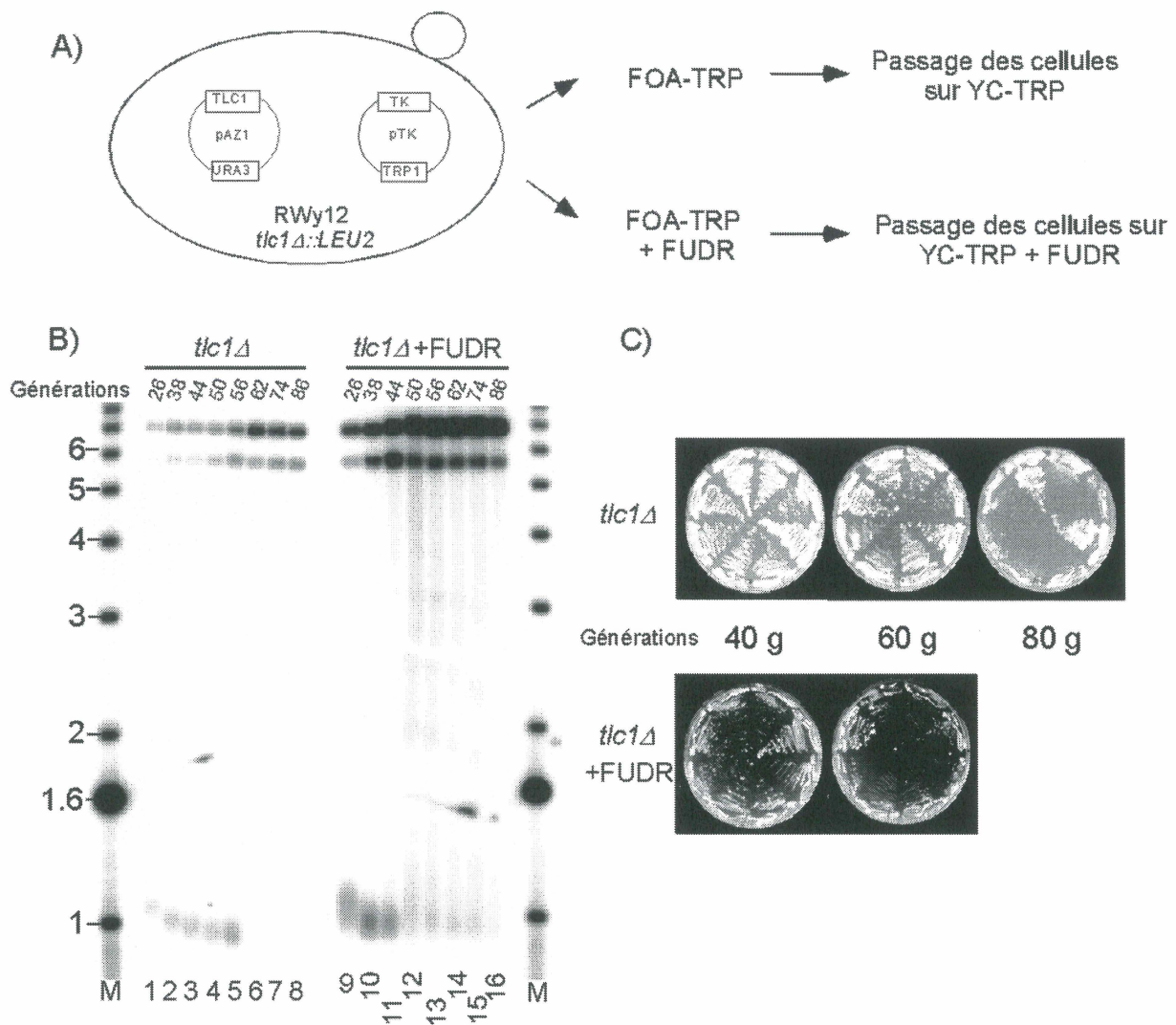


Figure 17: **En absence de la télomérase, la réplication semi-conservative des télomères semble être affectée lorsque la synthèse de dTTP est diminuée.** A) Les cellules ayant perdues la télomérase sont sélectionnées sur milieu sans tryptophane, contenant du 5-FOA avec ou sans FUDR. B) Sans FUDR les télomères raccourcissent graduellement dû au problème de réplication des extrémités (pistes 1 à 5) jusqu'à ce qu'ils atteignent une taille critique entre 50 et 56 générations (pistes 5 et 6) provoquant la mort des cellules et/ou l'apparition des survivants, caractérisée par la perte du signal télomérique à 1,3 kb et l'augmentation du signal Y' à 5,2 et 6,7 kb (pistes 6 à 8). En présence de FUDR, les télomères raccourcissent plus rapidement, de sorte que la taille critique est atteinte après 44 générations (pistes 9 à 11) provoquant la mort des cellules et/ou l'apparition des survivants; perte des fragments télomériques et amplification des Y' (pistes 12 à 16). L'analyse des TRF est effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes. M, marqueur de poids moléculaire. C) Sur milieu solide, le traitement des cellules sans télomérase avec du FUDR accélère aussi la mort et l'apparition des survivants, caractérisée par la disparition des colonies vers la fin de l'étalement et l'apparition de petites colonies au début de l'étalement.

(figure 17C). Lorsque les cellules sans télomérase qui contiennent la *TK* du virus de l'herpès sont traitées avec du FUDR, la perte de séquences télomériques est accélérée. Rapidement, après 30 générations, les cellules entrent en crise provoquant la mort ou l'apparition de survivants (figure 17B pistes 9 à 16 et 17C). Ainsi, en absence de la télomérase, la réplication semi-conservative des télomères semble être affectée lorsque la synthèse des dTTP est diminuée.

La diminution de la synthèse des dTTP accélère la cinétique de perte de séquences télomériques des cellules dont le gène *TEL1* a été délété.

Tel1p est un homologue de ATM de l'humain. Au niveau du maintien des télomères, Tel1p serait impliqué dans la préparation du substrat pour faciliter l'accès de la télomérase (Ritchie et al.,

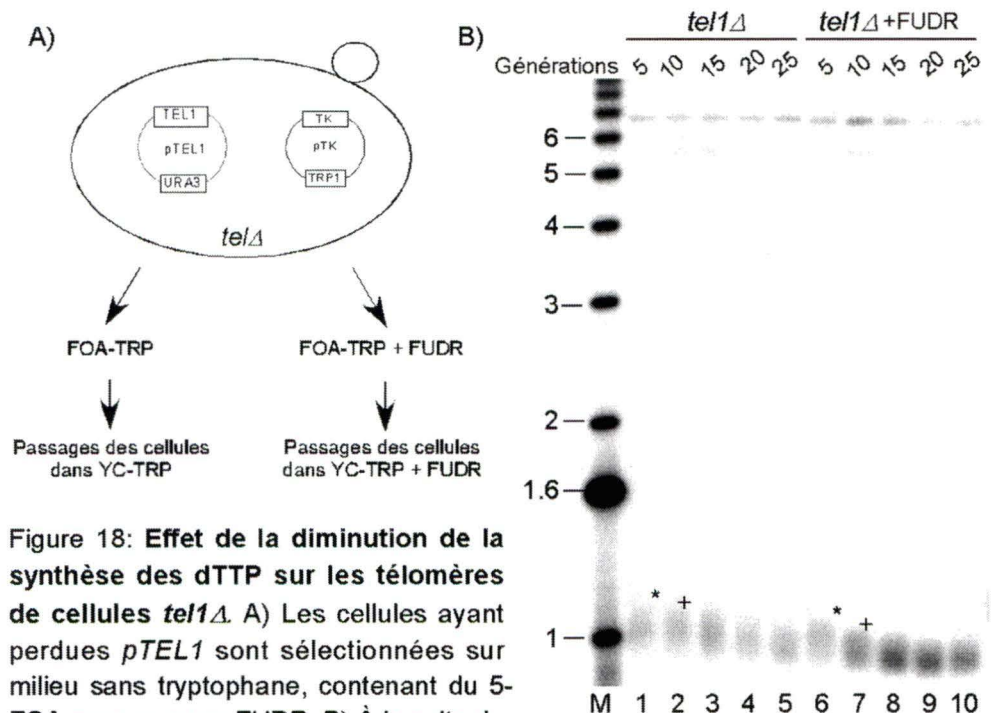


Figure 18: Effet de la diminution de la synthèse des dTTP sur les télomères de cellules *tel1Δ*. A) Les cellules ayant perdues *pTEL1* sont sélectionnées sur milieu sans tryptophane, contenant du 5-FOA avec ou sans FUDR. B) À la suite de la perte de Tel1p, les télomères des cellules *tel1Δ* raccourcissent au fil des générations (pistes 1 à 5). Lorsque ces cellules sont traitées avec du FUDR, la perte de répétitions télomériques s'accélère (pistes 6 à 10). Il faut comparer la taille des télomères en fonction du nombre de générations, piste 1 avec 6, piste 2 avec 7, etc.

1999). Ainsi, dans une souche dont le gène *TELI* a été délété, les télomères raccourcissent graduellement à la suite de la perte de la protéine. Nous avons vérifié la cinétique de perte de séquences télomériques dans un mutant *tel1Δ* en comparaison avec un mutant *tel1Δ* contenant la *TK* du virus de l'herpès traité avec du FUDR. La procédure expérimentale est résumée à la figure 18A. Comme prévu, les télomères raccourcissent graduellement à la suite de la perte de Tel1p (figure 18 B pistes 1 à 5). Lorsque ces cellules sont traitées avec du FUDR, la vitesse de perte de séquences télomériques est accélérée (comparaison de la piste 1 avec 6, toutes deux marquées de " * ", piste 2 avec 7 marquées de " + ", etc.). Ceci suggère que la diminution de la synthèse des dTTP affecte la réplication des télomères dans une voie différente que la voie de recrutement de la télomérase.

La capacité de la télomérase à ajouter des séquences télomériques ne semble pas affectée par la diminution de la synthèse des dTTP.

L'expérience précédente a permis de démontrer que la diminution de la synthèse des dTTP semble avoir un effet sur la réplication semi-conservative des télomères en absence de la télomérase. Cependant, dans cette expérience il est impossible de vérifier l'effet de la diminution de la synthèse des dTTP sur la télomérase puisque celle-ci est absente des cellules. Les souches thermosensibles *pol1-17* ont une mutation dans le gène codant pour la polymérase α , qui empêcherait une bonne coordination entre la télomérase et la machinerie de synthèse du brin retardé. À température permissive, cette perte de coordination provoque un allongement des télomères (figure 19A piste 1) de façon dépendante de la télomérase. Lorsque ces mutants sont incubés à température semi-permissive (16h à 30°C), les télomères s'allongent davantage (piste 2) (Adams Martin et al., 2000). Ce même phénotype d'élongation des télomères à température semi-

permissive est toujours visible malgré le traitement des cellules contenant la *TK* du virus de l'herpès avec du FUDR (pistes 3 et 4). À température semi-permissive (30°C), le défaut télomérique des souches *pol1-17* s'accroît au fil des générations (Adams Martin et al., 2000). Après plusieurs générations à la température semi-permissive, l'élongation des télomères des souches *pol1-17* n'est pas affectée par la diminution de la synthèse de dTTP (figure 19B pistes 1 et 2). Ensemble, ces résultats suggèrent que la capacité de la télomérase à ajouter des répétitions télomériques n'est pas affectée par la diminution de la synthèse des dTTP.

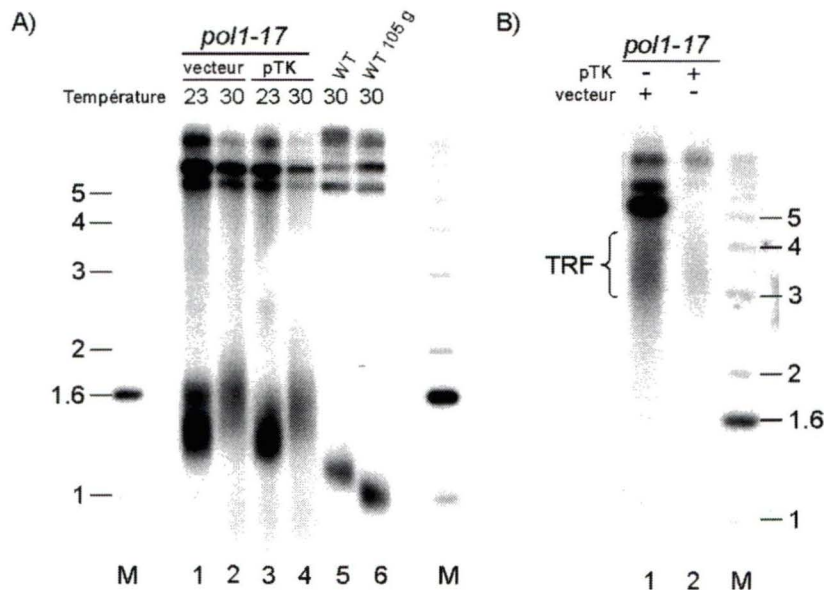


Figure 19: La capacité de la télomérase à ajouter des séquences télomériques ne semble pas affectée par la diminution de la synthèse des dTTP. A) Les mutants *pol1-17* contenant un vecteur vide (Vecteur) ou la *TK* du virus de l'herpès (pTK) ont été précultivées sur du milieu sélectif avec du FUDR pendant 140 générations à 23°C. À cette température les mutants *pol1-17* ont des télomères plus longs (piste 1) que des télomères de cellules de type sauvage (piste 5). Après une incubation de 16h à 30°C, les télomères des mutants *pol1-17* s'allongent (piste 2). Ce même phénotype est toujours présent malgré la présence de la *TK* du virus de l'herpès (pistes 3 et 4). En parallèle, des cellules de type sauvage contenant la *TK* du virus de l'herpès ont été traitées du FUDR afin de contrôler l'efficacité du FUDR (pistes 5 et 6). B) Après 70 générations à 30°C, les mutants *pol1-17* ont de très longs télomères (piste 1). Dans les mêmes conditions, la présence de la *TK* du virus de l'herpès et du FUDR n'a aucun effet sur la taille des télomères de ces mutants. L'analyse des TRF a été effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes. M, marqueur de poids moléculaire. TRF, fragments terminaux de restrictions.

La télomérase est incapable d'ajouter suffisamment de répétitions télomériques lorsque la synthèse des dTTP est diminuée dans des souches dont le gène *RIF1* a été délété.

Les protéines Rif1p et Rif2p sont impliquées dans la construction de l'hétérochromatine télomérique et agiraient comme inhibiteurs de la télomérase (Teng et al., 2000). Ainsi, la délétion de *RIF1* provoque une élévation des télomères dépendante de la télomérase. Lorsque des souches *rif1Δ* contenant la *TK* du virus de l'herpès sont traitées avec du FUDR, les télomères raccourcissent au fil des générations (figure 20 pistes 2 à 7) toutefois sans atteindre la taille des télomères des cellules de type sauvage (piste 8). Ainsi, la diminution de la concentration de dTTP peut affecter à un certain niveau la capacité de la télomérase à ajouter des séquences télomériques dans des cellules sans Rif1p.

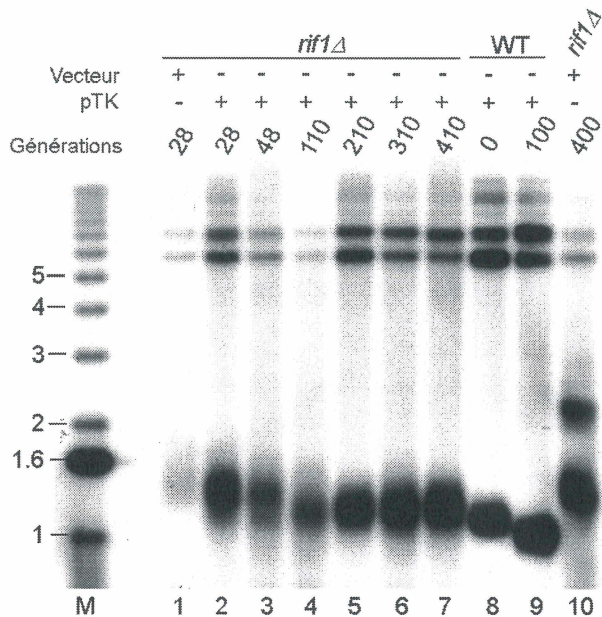


Figure 20: Effet de la diminution de la synthèse des dTTP sur les télomères des cellules dont le gène *RIF1* a été délété. La taille des télomères des cellules *rif1Δ* diminue au fil des générations lorsque les cellules contenant la *TK* du virus de l'herpès (pTK) sont cultivées en présence de FUDR (pistes 2 à 7). Comme point de référence, on voit la taille des télomères des cellules *rif1Δ* avec un vecteur vide (Vecteur) à 28 générations et 400 générations (respectivement pistes 1 et 10) et la taille des télomères de cellules de type sauvage avant et après le traitement avec du FUDR (respectivement pistes 8 et 9). L'analyse des TRF a été effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes. M, marqueur de poids moléculaire.

L'incorporation des résidus uraciles (U) dans les télomères ne provoque pas l'apparition du défaut télomérique des cellules dont la synthèse des dTTP est diminuée.

Les résultats précédents suggèrent que la capacité de la télomérase à ajouter des répétitions télomériques n'est pas affectée lorsque la synthèse des dTTP est diminuée. Le raccourcissement serait plutôt provoqué par un défaut de la réplication semi-conservative. Il a été démontré que la diminution de synthèse de dTTP provoque une accumulation de dUTP, intermédiaire de la synthèse des dTTP (Tinkelenberg et al., 2002). Ce déséquilibre dans le ratio dUTP/dTTP pourrait provoquer l'utilisation du dUTP au lieu du dTTP lors de la synthèse de l'ADN (Ahmad et al., 1998). La présence des U dans l'ADN doit être réparée par BER (réparation par excision des bases), provoquant la formation de bris simple brin et éventuellement double brin de l'ADN (Ahmad et al., 1998). La dUTPase (Dut1p chez *S.cerevisiae*) est responsable de transformer le dUTP en dUMP (figure 5) afin d'éviter une accumulation du dUTP, qui serait fatale pour la cellule (Gadsden et al., 1993). Nous posons donc l'hypothèse que la réparation des résidus uraciles (U) incorporés dans un télomère, pourrait induire la formation de bris simple brin et double brin de l'ADN, provoquant le raccourcissement des télomères. La surexpression de la dUTPase permet d'éviter une accumulation du dUTP lorsque la synthèse de dTTP est bloquée et ainsi de réduire l'incorporation du dUTP dans l'ADN (Tinkelenberg et al., 2002). La surexpression de la dUTPase permet aux cellules contenant la *TK* du virus de l'herpès traitées avec du FUDR de pousser plus rapidement. L'effet est peu visible avec 5 µg/ml de FUDR, mais beaucoup plus évident avec 10 µg/ml de FUDR (figure 21A). Ceci suggère que la surexpression de la dUTPase permet bel et bien de diminuer l'incorporation des U dans l'ADN, permettant aux cellules de se diviser plus rapidement en évitant de réparer massivement l'ADN. Par ailleurs, le

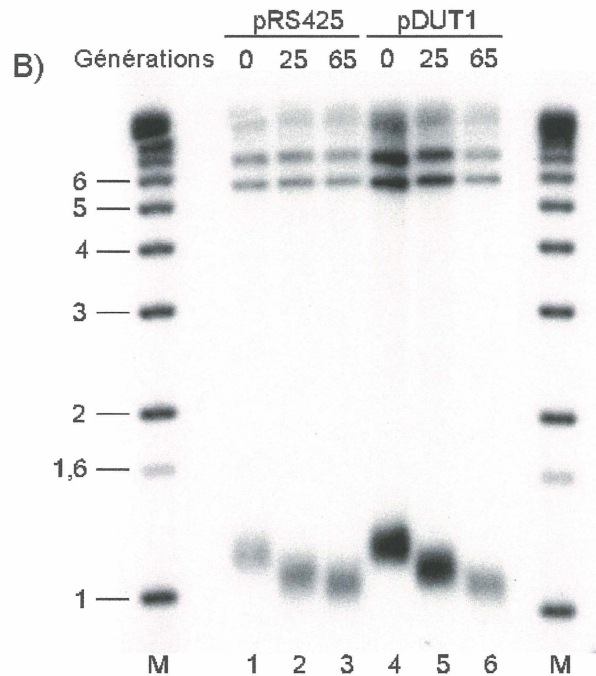
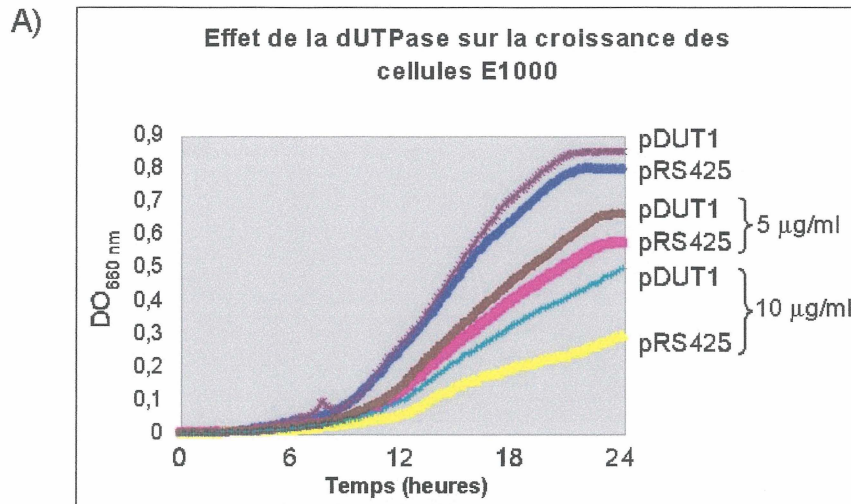


Figure 21: L'incorporation des résidus uraciles (U) dans les télomères ne provoque pas l'apparition du défaut télomérique des cellules dont la synthèse des dTTP est diminuée. A) Courbe de croissance des cellules E1000, non traitées, traitées avec 5 et 10 µg/ml de FUDR. La surexpression de la dUTPase permet aux cellules traitées avec du FUDR de pousser plus rapidement, visible par l'augmentation plus rapide de la densité optique. B) Le défaut télomérique des cellules E1000 traitées avec du FUDR (pistes 1 à 3) se développe malgré la surexpression de la dUTPase (pistes 4 à 6). L'analyse des TRF a été effectuée tel que décrit dans la section matériels et méthodes. M, Marqueur de poids moléculaire

phénotype télomérique des cellules contenant la *TK* du virus de l'herpès traitées avec du FUDR, est indépendant de la surexpression de la dUTPase (figure 21B). Ceci nous suggère que l'incorporation des U dans un télomère n'est pas responsable de l'apparition du défaut télomérique lorsque la synthèse du dTTP est diminuée.

4. Discussion

Les polymérases, responsables de la synthèse des nouveaux brins d'ADN, ont besoin d'un apport approprié de nucléotides afin d'assurer la réplication et la réparation du génome. Une diminution, voire une absence de tous les nucléotides peut provoquer l'arrêt de la réplication ou l'incapacité de réparer l'ADN. Un déséquilibre dans la concentration relative des nucléotides peut aussi avoir des effets dramatiques en créant des mutations dans le génome pouvant en bout de ligne provoquer la mort des cellules (Kunz et al., 1994). Notamment, la diminution de la synthèse des dTTP peut provoquer la mort des cellules par un mécanisme nommé "*thymineless death*" (TLD). Ce phénomène a été identifié et caractérisé chez plusieurs organismes (Ahmad et al., 1998). Avec cette étude, nous ajoutons quelques détails à tout ce qui est connu sur les répercussions d'un désordre dans la synthèse des nucléotides.

Une diminution de la synthèse des dTTP peut provoquer un raccourcissement des télomères.

Nous avons tout d'abord confirmé que des souches thermosensibles possédant l'allèle *cdc21-1* ou *cdc8-1* avaient des télomères courts même à température permissive (figure 8). Cdc21p et Cdc8p sont impliqués dans la synthèse des dTTP. La diminution de la synthèse des dTTP dans ces mutants pourrait être responsable de l'apparition du défaut télomérique. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons premièrement tenté de compléter le défaut télomérique des souches possédant la mutation *cdc8-1* en surexprimant la *TK* du virus de l'herpès. Grâce à son activité kinase, la *TK* du virus de l'herpès supprime la thermosensibilité des mutants *cdc8-1* (Sclafani et

Fangman, 1984) (figure 9) et permet de rétablir la taille de leurs télomères (figure 10). Nous avons aussi recréé le défaut télomérique des souches possédant la mutation *cdc21-1* en inhibant spécifiquement Cdc21p à l'aide de la *TK* du virus de l'herpès en combinaison avec du FUDR dans des cellules de type sauvage (figure 11). Ces résultats suggèrent que la diminution de la synthèse des dTTP serait responsable du défaut télomérique des souches possédant l'allèle *cdc21-1* et *cdc8-1*.

Une diminution de la synthèse de tous les nucléotides peut provoquer un raccourcissement des télomères.

Après avoir démontré qu'une diminution de la synthèse des dTTP peut provoquer le raccourcissement des télomères, on s'est demandé si la diminution de la synthèse de tous les nucléotides pourrait provoquer le même phénotype. Pour ce faire, nous avons ciblé la RNR, responsable de l'étape limitante dans la production de tous les nucléotides. De façon surprenante, l'hydroxyurée, qui inhibe la RNR, et par conséquent devrait diminuer la synthèse de tous les nucléotides, n'a aucun effet sur les télomères de cellules de type sauvage (figure 12). Cependant, les télomères courts des cellules possédant l'allèle *cdc21-1* rallongent à la suite d'un traitement identique (résultats non montrés). Sachant que des cellules traitées avec de l'hydroxyurée s'adaptent en surexprimant certaines sous-unités de la RNR, nous avons voulu vérifier l'effet de la surexpression directe de *RNR1* sur le phénotype télomérique des mutants *cdc21-1*. Ceci nous a permis de mettre à jour le fait que l'augmentation de la concentration de tous les nucléotides, par la surexpression de *RNR1*, provoque le rallongement partiel des télomères des cellules possédant une mutation *cdc21-1* (figure 14).

L'utilisation de l'hydroxyurée ne semble donc pas approprié pour diminuer la synthèse de tous les nucléotides, puisque les cellules s'adaptent aux traitements en surexprimant certaines sous-unités de la RNR, provoquant plutôt une augmentation de la synthèse de tous les nucléotides. L'analyse de mutants thermosensibles de certaines sous-unités de la RNR (*rnr1-240* et *rnr2-68*), connus pour avoir une phase S très allongée à température permissive (Huang et al., 1998), nous a démontré qu'une diminution de la synthèse de tous les nucléotides peut provoquer un raccourcissement des télomères (figure 13). Par ailleurs, les souches dont le gène *DUN1* a été délété ont aussi des télomères courts (figure 15). Ces mutants sont incapables de bien induire la transcription des sous-unités de la RNR nécessaire à la production de nucléotides (Zhou, Z. et Elledge, 1993). L'allèle *rnr1-D57N*, est incapable de répondre à la rétroinhibition allostérique exercée par le niveau de nucléotides, provoquant une augmentation de la concentration de tous les nucléotides dans les mutants portant cet allèle (figure 6) (Chabes et al., 2003). Dans une souche mutante *dun1Δ*, la régulation transcriptionnelle et la régulation post-traductionnelle sont non fonctionnelles. Seule la rétroinhibition allostérique est effective (figure 6). Le défaut télomérique des souches portant la mutation *dun1Δ* est supprimé par l'allèle *rnr1-D57N*, suggérant qu'une diminution de la concentration de tous les nucléotides serait responsable de l'apparition du défaut télomérique de ces mutants. De la même façon, le défaut télomérique conféré par l'allèle *mec1^{ts}* est complété par la surexpression de *RNR1*, suggérant une fois de plus que la diminution de la concentration de tous les nucléotides serait responsable de l'apparition du défaut télomérique de ces mutants (*mec1^{ts}*).

Comment une diminution de la synthèse des nucléotides pourrait affecter la réplication des télomères?

D'un point de vue technique, grâce aux propriétés de la *TK* du virus de l'herpès en combinaison avec le FUDR, il a été plus facile d'analyser le mécanisme provoquant le raccourcissement des télomères des mutants dont la synthèse des dTTP est diminuée par rapport à une diminution de la synthèse de tous les nucléotides. Différentes hypothèses peuvent expliquer comment la diminution de la synthèse des dTTP affecte la réplication des télomères. 1-La télomérase serait incapable d'ajouter suffisamment de répétitions télomériques lorsque la synthèse des dTTP est diminuée. 2-La réplication semi-conservative des télomères éprouverait certains problèmes lorsque la synthèse des dTTP est diminuée. Ces deux mécanismes hypothétiques ne sont pas exclusifs, et pourraient agir de concert pour provoquer le raccourcissement des télomères.

La réplication semi-conservative est incapable de répliquer entièrement les télomères lorsque la synthèse de dTTP est diminuée.

La première hypothèse stipule que la télomérase serait incapable d'ajouter suffisamment de répétitions télomériques lorsque la synthèse de dTTP est affectée. En absence de télomérase, il y a perte de répétitions télomériques à un rythme de 3 à 5 pb par cycle cellulaire, dû au problème de réplication des extrémités (Lendvay et al., 1996; Lundblad et Szostak, 1989; Singer et Gottschling, 1994). Dans le cas où seul la télomérase serait affectée par la diminution de la synthèse des dTTP, la cinétique de perte de séquences télomériques de cellules sans télomérase devrait être indépendante de la capacité de synthèse des dTTP. En fait, en absence de la télomérase, la cinétique de perte de séquences télomériques est accélérée par la diminution de la synthèse des dTTP (figure 17). Par ailleurs, à la suite de la perte de *Tel1p*, qui agirait dans la même voie que la télomérase pour la réplication des télomères, il y a aussi une perte de séquences télomériques jusqu'à une taille stable d'environ 100 pb de répétitions télomériques (Greenwell et

al., 1995). Cette diminution progressive de la taille des télomères est attribuée à un mauvais recrutement de la télomérase à son substrat, jusqu'à ce qu'une taille minimale soit atteinte, où la télomérase redevient capable d'ajouter des répétitions télomériques. Encore une fois, dans le cas où seulement la télomérase serait affectée par la diminution de la synthèse des dTTP, la cinétique de perte de séquences télomériques à la suite de la perte de *Tel1p* devrait être indépendante de la capacité de synthèse des dTTP. Nos données montrent que la cinétique de perte de séquences télomériques des souches dont le gène *TEL1* a été délété est aussi accélérée par la diminution de la synthèse des dTTP (figure 18). Avec ces expériences, il est impossible de tirer quelconque conclusion sur l'effet de la diminution de la synthèse des dTTP sur la capacité de la télomérase à ajouter des répétitions télomériques, ce que nous appellerons la processivité de la télomérase. Dans le premier cas, la télomérase est absente, alors que dans l'autre cas, à la suite de la perte de *Tel1p*, la voie d'élongation des télomères par la télomérase serait inefficace avant qu'une taille minimale soit atteinte. Néanmoins, ces expériences démontrent que la réplication semi-conservative des télomères éprouverait certains problèmes lorsque la synthèse des dTTP est diminuée.

Comment la réplication semi-conservative des télomères est affectée par la diminution de synthèse des dTTP?

Différentes hypothèses peuvent expliquer comment la réplication semi-conservative serait affectée par la diminution de la synthèse des dTTP. 1- La réplication semi-conservative pourrait être incapable de répliquer les télomères en entier lorsque la synthèse des dTTP est diminuée. 2- Les exonucléases auraient un accès accru aux télomères lorsque la concentration de dTTP est diminuée. 3- La réparation de l'ADN dans un télomère pourrait provoquer la formation d'un

télomère plus court.

Selon la première hypothèse, la fourche de réplication s'arrêterait avant d'avoir répliqué un télomère en entier. L'arrêt d'une fourche de réplication doit être résolu, afin de redémarrer et terminer la réplication (Klein et Kreuzer, 2002). Les arrêts qui surviendraient dans un télomère pourraient être résolus provoquant la formation d'un télomère plus court, ce qui éviterait de redémarrer la réplication inutilement, puisque malgré le raccourcissement, ce télomère serait quand même fonctionnel. De tels arrêts ont été identifiés dans une souche ne possédant pas le gène *RRM3*. Cependant, les télomères de ces cellules (*rrm3Δ*) sont allongés plutôt que raccourcis (Ivessa et al., 2002), ce qui va à l'encontre de notre hypothèse. De plus, hormis l'implication de *RRM3*, les mécanismes responsables de la résolution des fourches de réplication arrêtées sont peu connus. Il est donc difficile de vérifier expérimentalement si un arrêt de la fourche de réplication dans un télomère peut provoquer son raccourcissement.

Selon la deuxième hypothèse, lorsqu'une fourche de réplication éprouve quelconque problème durant la réplication d'un télomère, il se pourrait que l'ADN se retrouve momentanément plus exposé aux exonucléases, provoquant une dégradation accrue des télomères et par conséquent un raccourcissement. Les exonucléases connues (*MRE11*, *EXO1* et *RAD27*) seraient nécessaires pour la réparation de l'ADN, pour la réplication du génome et des télomères (D'Amours et Jackson, 2002). Puisqu'il a été impossible jusqu'à ce jour de bien comprendre les rôles de chaque exonucléase dans ces processus, il est difficile de vérifier expérimentalement cette hypothèse. De plus, il y aurait de la redondance entre les exonucléases, rendant ainsi encore plus difficile la vérification génétique de cette hypothèse.

La réparation des résidus uracile incorporés dans un télomère ne provoquerait pas le raccourcissement des télomères.

Selon la troisième hypothèse, la réparation des bases incorrectes incorporées dans un télomère pourrait provoquer la formation d'un télomère plus court, ce qui éviterait de réparer les mauvaises bases incorporées en aval du site de coupure et permettrait de compléter la réplication. Ce télomère serait fonctionnel malgré ce raccourcissement. L'inhibition de Cdc21p provoque la diminution de la synthèse des dTTP, l'accumulation de dUTP et par conséquent un déséquilibre dans le ratio dUTP/dTTP. Ce déséquilibre peut provoquer l'utilisation de dUTP à la place des dTTP lors de la réplication de l'ADN. Les résidus uracile (U) incorporés dans l'ADN doivent être réparés par excision des bases. Lorsque la concentration de dTTP demeure faible, et par conséquent la concentration de dUTP reste élevée, le remplacement des U par des T est difficile, voire impossible. Dans ces cas, la réparation massive du génome provoquerait la formation de bris simple brin et double brin de l'ADN pouvant mener à la mort des cellules si la concentration de dTTP demeure faible. Ce phénomène expliquerait pourquoi les cellules meurent par TLD (Ahmad et al., 1998). La surexpression de la dUTPase, responsable de déphosphoryler le dUTP en dUMP (figure 5), permet de diminuer la concentration intracellulaire de dUTP, de minimiser l'incorporation de dUTP dans l'ADN et par conséquent, d'augmenter la survie des cellules dont la concentration de dTTP est diminuée (Tinkelenberg et al., 2002). Dans notre cas, la surexpression de la dUTPase permet aux cellules dont la synthèse des dTTP est diminuée de se diviser plus rapidement, puisque l'incorporation des dUTP dans l'ADN serait limitée (figure 21A). Cependant, le phénotype télomérique de ces cellules est indépendant de la surexpression de la dUTPase (figure 21B). Ainsi, le raccourcissement des télomères des cellules dont la synthèse des dTTP diminuée ne serait pas provoqué par la réparation des U incorporés dans un télomère.

La capacité de la télomérase à ajouter des répétitions télomériques ne semble pas affectée par la diminution de la synthèse des dTTP.

Les expériences précédentes démontrent que la réplication semi-conservative serait affectée lorsque la synthèse des dTTP est diminuée. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, avec ces expériences, il est difficile de tirer quelque conclusion sur l'effet de la diminution de la synthèse des dTTP sur la capacité de la télomérase à ajouter des répétitions télomériques. C'est pourquoi nous avons analysé l'effet de la diminution de synthèse des dTTP sur le phénotype télomérique de souches ayant de longs télomères à cause d'une augmentation de la capacité de la télomérase d'ajouter des répétitions télomériques. L'allongement des télomères des souches possédant la mutation *poll-17* est dépendant de la télomérase et serait causé par une perte de coordination entre la machinerie de synthèse du brin retardé et la télomérase (Adams Martin et al., 2000). Le phénotype télomérique de ces mutants est insensible à la diminution de la synthèse des dTTP à court et à long terme (figure 19). Ceci suggère que la capacité de la télomérase à ajouter des répétitions télomériques n'est pas affectée par la diminution de la synthèse des dTTP. Les souches sans le gène *RIFI* ont aussi des télomères allongés. Dans ce cas, l'allongement serait causé par la perte d'inhibition effectuée par les protéines Rif sur la télomérase et par conséquent, serait dépendant de la télomérase (Teng et al., 2000). Les télomères des cellules sans le gène *RIFI* dont la synthèse de dTTP est diminuée raccourcissent graduellement, toutefois sans atteindre la taille des télomères de cellules de type sauvage (figure 20).

Selon l'expérience avec les souches possédant l'allèle *poll-17*, la processivité de la télomérase ne serait pas affectée par une diminution de la synthèse des dTTP. Néanmoins, les télomères des mutants sans Rif1p dont la synthèse des dTTP est affectée raccourcissent. Il devrait donc y avoir

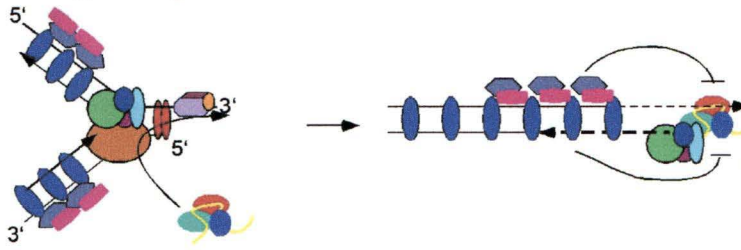
une étape "X" de l'allongement des télomères par la télomérase en amont de l'étape de l'élongation, qui serait sensible à la diminution de la synthèse des dTTP dans le cas des cellules sans le gène *RIF1*, ce qui provoquerait le raccourcissement observé. De plus, cette étape "X" serait insensible dans les souches portant l'allèle *pol1-17*, de sorte que malgré la diminution de la synthèse des dTTP, il est impossible de l'affecter. En amont de l'étape de l'élongation des télomères, la télomérase doit être recrutée à son substrat et activée. Nous avons brièvement discuté des protéines impliquées dans ce que serait le recrutement de la télomérase en introduction. Pour ce qui est de l'activation, une bonne coordination entre la fourche de réplication et la télomérase serait absolument nécessaire pour bien positionner et/ou activer la télomérase. Cette coordination entre la fourche de réplication et la télomérase serait déstabilisée dans les souches portant l'allèle *pol1-17*. Ainsi, nous croyons que cette étape "X" affectée dans les souches *rif1Δ* dont la synthèse de dTTP est diminuée, et insensible dans les souches *pol1-17*, serait la coordination entre la fourche de réplication et la télomérase.

La réplication semi-conservative, et par conséquent la coordination entre la fourche de réplication et la télomérase seraient affectée lorsque la synthèse des nucléotides est diminuée; un modèle.

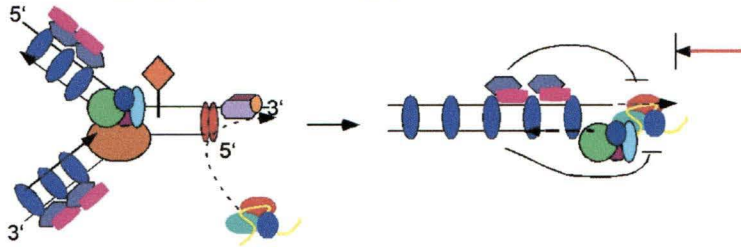
Lorsque la synthèse des dTTP est diminuée, la réplication semi-conservative des télomères serait affectée, provoquant la sénescence accélérée des cellules sans télomérase et une accélération de la perte de séquences télomériques à la suite de la perte de Tel1p (respectivement figures 17 et 18). Il est cependant difficile de déterminer comment la réplication semi-conservative serait affectée. Il semble du moins que la réparation des U incorporés dans un télomère n'affecterait pas

la fourche de réplication. Nous avons choisi de présenter un modèle où la progression de la fourche de réplication dans un télomère est problématique (figure 22). Ce choix arbitraire n'est basé sur aucune donnée expérimentale, mais permet toutefois de bien rallier tous les résultats dans un seul modèle. En principe, la télomérase devrait être capable de compenser la perte de répétitions télomériques survenue durant la réplication semi-conservative lorsque la synthèse des dTTP est diminuée. En fait, les télomères sont courts même en présence de la télomérase, démontrant qu'une étape de l'élongation des télomères par la télomérase est inefficace. Lorsque la synthèse des dTTP est diminuée, la coordination entre la fourche de réplication et la télomérase serait déficiente, provoquant une incapacité de la télomérase à bien allonger les télomères (figure 22 B). Dans une souche *pol1-17* dont la synthèse des dTTP est diminuée, les problèmes de la fourche de réplication surviendraient. Cependant la perte de la coordination entre la fourche de réplication et la télomérase dans ces mutants rend cette étape du processus insensible à la diminution de synthèse des dTTP, permettant une élongation des télomères des souches *pol1-17* indépendante de la capacité de synthèse des dTTP (figure 22 D). Dans une souche *rif1Δ*, dont la synthèse des dTTP est diminuée, les problèmes de la fourche de réplication surviendraient, de sorte que la coordination entre la fourche de réplication et la télomérase serait déficiente, provoquant une incapacité de la télomérase d'allonger les télomères, comme dans des cellules portant la mutation *rif1Δ* dont la synthèse des nucléotides est intacte. Cependant, l'absence de Rif^p enlève une inhibition de la télomérase, de sorte que les télomères de ces cellules sont plus longs que des télomères de cellules de type sauvage dont la synthèse des nucléotides est intacte (figure 22 C). On ne peut pas exclure que la coordination entre la fourche de réplication et la télomérase ne serait pas affectée lorsque la synthèse des dTTP est diminuée. Certaines hypothèses stipulent que la télomérase ajoute une quantité définie de répétitions télomériques à

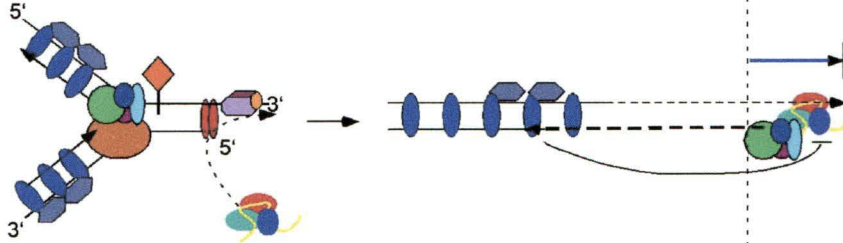
A) Cellule de type sauvage



B) Diminution de la concentration de nucléotides



C) Diminution de la concentration de nucléotides dans *rif1Δ*



D) Diminution de la concentration de nucléotides dans *pol1-17*

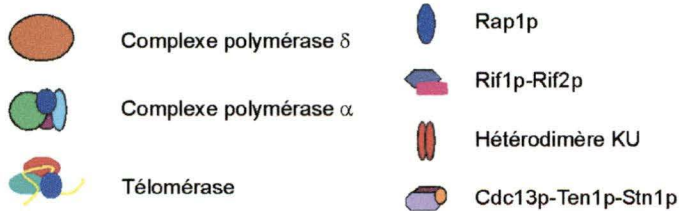
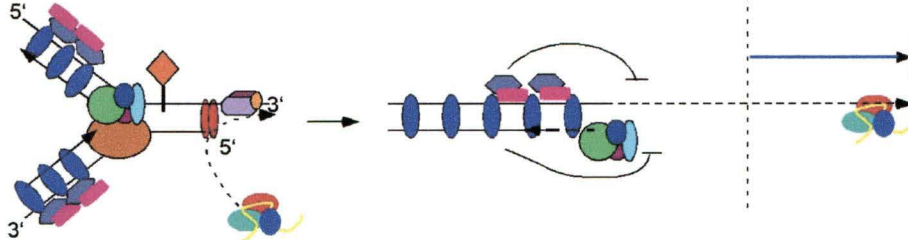


Figure 22: **Modèle de réplication des télomères.** La diminution de la concentration de nucléotides provoque des problèmes à la fourche de réplication, empêchant une coordination adéquate entre la fourche de réplication et la télomérase, ce qui provoquerait un raccourcissement des télomères (B). L'absence d'inhibition par Rif1p, provoque l'allongement des télomères malgré une coordination innéficace (C). Lorsque la coordination entre la télomérase et la fourche de réplication est rompue dans les cellules *pol1-17*, la télomérase allonge fortement les télomères malgré un arrêt de la fourche de réplication dans le télomère (D). L'allongement d'un seul télomère est représenté pour alléger la figure.

chaque cycle de réplication. Cette quantité serait insuffisante pour compenser la perte de séquences causée par les problèmes de la fourche de réplication. Cependant, avec ce modèle il est difficile d'expliquer comment les télomères des cellules *rif1Δ* dont la synthèse de dTTP est diminuée pourraient être plus longs que des télomères de cellules de type sauvage dont la synthèse des dTTP est intacte. Selon ce modèle, les télomères des cellules *rif1Δ* devraient après un certain temps raccourcir autant que les télomères des cellules de type sauvage.

Est-ce que ce modèle s'applique lorsque la synthèse de tous les nucléotides est diminuée?

On a démontré qu'une diminution de la concentration de dTTP, de même qu'une diminution de la concentration de tous les nucléotides peut provoquer le raccourcissement des télomères. De plus, la surexpression de *RNR1*, suffisante pour augmenter la synthèse de tous les nucléotides, provoque le rétablissement partiel du défaut télomérique des mutants *cdc21-1* (figure 14). Est-ce que le raccourcissement des télomères est provoqué par le même mécanisme dans les mutants dont la synthèse des dTTP est diminuée et dans les mutants dont la synthèse de tous les nucléotides est diminuée? Est-ce que les mutants dont la synthèse de tous les nucléotides est diminuée ont des télomères courts parce que la synthèse des dTTP est diminuée? Est-ce que les mutants dont la synthèse des dTTP est diminuée ont des télomères courts parce que la synthèse de tous les nucléotides est diminuée? Il est difficile de bien répondre à ces questions. Cependant, voici quelques éléments de réponse. Il a été démontré que les cellules incapables de synthétiser du dTTP ont une concentration élevée de dATP, de dCTP et de dGTP (respectivement d'un facteur de 120; 8,5 et 3,6 fois plus élevée par rapport aux cellules de type sauvage isogéniques) (Kohalmi et Kunz, 1993). Ainsi, le raccourcissement des télomères des mutants dont la synthèse

des dTTP est diminuée ne serait pas provoqué par la diminution de la synthèse de tous les nucléotides. Dans ce cas, ce serait plutôt un déséquilibre dans le ratio entre les différents nucléotides qui pourrait être responsable de l'apparition du défaut télomérique. Du moins, les essais de surexpression de la dUTPase, afin de rétablir le ratio dUTP/dTTP, démontre que ce déséquilibre n'affecte pas la taille des télomères. Ainsi, il est raisonnable de croire que le même mécanisme est responsable de la diminution de la taille des télomères peu importe que la synthèse des dTTP ou celle de tous les nucléotides soit diminuée.

Ce même mécanisme pourrait aussi provoquer le raccourcissement des télomères des souches possédant les allèles *mec1-21*, *mec1-14* et *rad53-K227A*. Le défaut télomérique de ces mutants est complémenté par une augmentation de la synthèse des tous les nucléotides, exactement comme nous le décrivons dans cette étude (Longhese et al., 2000). Par ailleurs, ce modèle permettrait aussi de préciser le mécanisme qui mène à la sénescence d'un double mutant *mec1-21 tell1Δ* (Ritchie et al., 1999). Dans ce cas, la sénescence serait provoquée par la combinaison de deux problèmes. Le recrutement de la télomérase serait affecté par la perte de Tel1p, alors que la coordination entre la fourche de réplication et la télomérase serait affectée par la diminution de la concentration des nucléotides à la suite de la mutation de Mec1p. Ces problèmes cumulatifs provoqueraient un raccourcissement constant des télomères, de sorte que les cellules seraient incapables de maintenir leurs télomères par la télomérase.

Par ailleurs, plusieurs mutations dans des protéines de vérification de l'ADN ("*checkpoint*") (*ddc1* et *rad17 par exemple*), pourraient avoir des télomères courts par un mécanisme similaire. Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de détection des dommages à l'ADN, et sont,

peut-être directement associées à la réplication semi-conservative pour assurer une détection rapide des dommages à la suite de la réplication. La mutation de ces protéines pourrait provoquer une progression incorrecte de la fourche, rendant la coordination entre la fourche de réplication et la télomérase inefficace et par conséquent, un raccourcissement des télomères de ces mutants. Il est à noter que l'augmentation de la synthèse des nucléotides dans ces mutants ne complémente pas le défaut télomérique (Longhese et al., 2000). Ce défaut serait donc dû à un problème direct de la fourche de réplication plutôt qu'un problème indirect sur la fourche créé par la diminution de la concentration des nucléotides. Ce même genre de problème de progression de la fourche de réplication pourrait aussi expliquer pourquoi les mutants possédant l'allèle *pol2-16* ont des télomères courts (Ohya et al., 2002).

Implication chez humain

La synthèse des dTTP est une cible largement utilisée pour le traitement de plusieurs cancers. Avec les données présentées dans cette étude, certaines questions se posent. Est-ce que le raccourcissement des télomères est une étape de la mort des cellules par TLD? Est-ce qu'une diminution de la concentration de dTTP chez l'humain lors de traitements chimiothérapeutiques pourrait provoquer le raccourcissement des télomères des cellules somatiques non cancéreuses? Dans ces cellules, où la télomérase n'est pas activée, est-ce que le raccourcissement des télomères pourrait engendrer une instabilité génétique et par conséquent, avoir des effets opposés aux effets escomptés? Est-ce qu'il existe des maladies génétiques où la synthèse des nucléotides est problématique, ce qui pourrait provoquer une instabilité génétique liée à un raccourcissement des télomères?

5. Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Raymund Wellinger de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour le soutien scientifique tout au long de ma maîtrise et pour son ouverture d'esprit. Je remercie également Dr Antonio Conconi et Dr Darell Hunting d'avoir accepté de composer le jury de mon mémoire. Je voudrais remercier tout spécialement Isabelle Dionne et Andréa Moore qui ont démarré et avancé cette étude, ce qui m'a permis de mener à terme ce projet fort intéressant et très stimulant. Un gros merci aussi à Mikhaïl Chakhparonian pour son aide constante sur le projet en général. Je voudrais aussi remercier tous les membres présents et passés du laboratoire pour les discussions, leurs aides techniques et leurs camaraderies fort appréciées.

Ackland S (2002) Thymidylate Synthase Inhibitors. In 'Cancer Chemotherapy & Biological Response Modifiers Annual 20' pp. 1-36)

Adams A. K. & Holm C. Specific DNA replication mutations affect telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**(9): 4614-20.(1996)

Adams Martin A., Dionne I., Wellinger R. J. & Holm C. The function of DNA polymerase alpha at telomeric G tails is important for telomere homeostasis. *Mol Cell Biol* **20**(3): 786-96.(2000)

Ahmad S. I., Kirk S. H. & Eisenstark A. Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* **52**(591-625).(1998)

Araki H., Hamatake R. K., Johnston L. H. & Sugino A. DPB2, the gene encoding DNA polymerase II subunit B, is required for chromosome replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4601-5.(1991a)

Araki H., Hamatake R. K., Morrison A., Johnson A. L., Johnston L. H. & Sugino A. Cloning DPB3, the gene encoding the third subunit of DNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **19**(18): 4867-72.(1991b)

Araki H., Leem S. H., Phongdara A. & Sugino A. Dpb11, which interacts with DNA polymerase II(epsilon) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11791-5.(1995)

Averbeck D. & Averbeck S. Induction of the genes RAD54 and RNR2 by various DNA damaging agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **315**(2): 123-38.(1994)

Beeler T., Gable K., Zhao C. & Dunn T. A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**(10): 7279-84.(1994)

Bennett R. A., Wilson D. M., 3rd, Wong D. & Demple B. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(14): 7166-9.(1997)

Boulet A., Simon M., Faye G., Bauer G. A. & Burgers P. M. Structure and function of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC2 gene encoding the large subunit of DNA polymerase III. *Embo J* **8**(6): 1849-54.(1989)

Boulton S. J. & Jackson S. P. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* **24**(23): 4639-48.(1996a)

Boulton S. J. & Jackson S. P. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *Embo J* **15**(18): 5093-103.(1996b)

Boulton S. J. & Jackson S. P. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J* **17**(6): 1819-28.(1998)

Bourns B. D., Alexander M. K., Smith A. M. & Zakian V. A. Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol Cell Biol* **18**(9): 5600-8.(1998)

Brachmann C. B., Davies A., Cost G. J., Caputo E., Li J., Hieter P. & Boeke J. D. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**(2): 115-32.(1998)

Brush G. S. & Kelly T. J. (1996) Mechanisms for replicating DNA. In 'DNA Replication in Eukaryotic Cells'. (Ed. ML DePamphilis) pp. 1-43. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York)

Buchman A. R., Kimmerly W. J., Rine J. & Kornberg R. D. Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**(1): 210-25.(1988)

Budd M. & Campbell J. L. Temperature-sensitive mutations in the yeast DNA polymerase I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(9): 2838-42.(1987)

Campbell J. L. Yeast DNA replication. *J Biol Chem* **268**(34): 25261-4.(1993)

Chabes A., Georgieva B., Domkin V., Zhao X., Rothstein R. & Thelander L. Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**(3): 391-401.(2003)

Chakhparonian M. & Wellinger R. J. Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? *Trends Genet* **19**(8): 439-46.(2003)

Chandra A., Hughes T. R., Nugent C. I. & Lundblad V. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev* **15**(4): 404-14.(2001)

Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H. & Hieter P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**(1): 119-22.(1992)

Cohen S. & Barner H. Studies on unbalanced growth in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci US A* **40**(885-893).(1954)

Craven R. J. & Petes T. D. Involvement of the checkpoint protein Mec1p in silencing of gene expression at telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**(7): 2378-84.(2000)

Dahlen M., Sunnerhagen P. & Wang T. S. Replication proteins influence the maintenance of telomere length and telomerase protein stability. *Mol Cell Biol* **23**(9): 3031-42.(2003)

D'Amours D. & Jackson S. P. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(5): 317-27.(2002)

de Bruin D., Kantrow S. M., Liberatore R. A. & Zakian V. A. Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast. *Mol Cell Biol* **20**(21): 7991-8000.(2000)

de Bruin D., Zaman Z., Liberatore R. A. & Ptashne M. Telomere looping permits gene activation by a downstream UAS in yeast. *Nature* **409**(6816): 109-113.(2001)

Diede S. J. & Gottschling D. E. Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* **99**(7): 723-33.(1999)

Dionne I. & Wellinger R. J. Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13902-7.(1996)

Edwards S., Li C. M., Levy D. L., Brown J., Snow P. M. & Campbell J. L. Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase epsilon and polymerase sigma interact physically and functionally, suggesting a role for polymerase epsilon in sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol* **23**(8): 2733-48.(2003)

Elledge S. J. & Davis R. W. DNA damage induction of ribonucleotide reductase. *Mol Cell Biol* **9**(11): 4932-40.(1989)

Elledge S. J. & Davis R. W. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev* **4**(5): 740-51.(1990)

Feinberg A. P. & Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**(1): 6-13.(1983)

Foiani M., Marini F., Gamba D., Lucchini G. & Plevani P. The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication. *Mol Cell Biol* **14**(2): 923-33.(1994)

Gadsden M. H., McIntosh E. M., Game J. C., Wilson P. J. & Haynes R. H. dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **12**(11): 4425-31.(1993)

Garvik B., Carson M. & Hartwell L. Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* **15**(11): 6128-38.(1995)

Gietz D., St Jean A., Woods R. A. & Schiestl R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**(6): 1425.(1992)

Grandin N., Damon C. & Charbonneau M. Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and stn1 To regulate telomerase recruitment. *Mol Cell Biol* **20**(22): 8397-408.(2000)

Grandin N., Damon C. & Charbonneau M. Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *Embo J* **20**(5): 1173-83.(2001)

Grandin N., Reed S. I. & Charbonneau M. Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev* **11**(4): 512-27.(1997)

Gravel S., Larrivee M., Labrecque P. & Wellinger R. J. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**(5364): 741-4.(1998)

Gravel S. & Wellinger R. J. Maintenance of double-stranded telomeric repeats as the critical determinant for cell viability in yeast cells lacking Ku. *Mol Cell Biol* **22**(7): 2182-93.(2002)

Greenwell P. W., Kronmal S. L., Porter S. E., Gassenhuber J., Obermaier B. & Petes T. D. TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* **82**(5): 823-9.(1995)

Greider C. W. (1995) Telomerase biochemistry and regulation. In 'Telomeres'. (Eds EH Blackburn and CW Greider) pp. 35-68. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York)

Griffith J. D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R. M., Bianchi A., Moss H. & de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**(4): 503-14.(1999)

Grivell A. R. & Jackson J. F. Thymidine kinase: evidence for its absence from *Neurospora crassa* and some other micro-organisms, and the relevance of this to the specific labelling of deoxyribonucleic acid. *J Gen Microbiol* **54**(2): 307-17.(1968)

Grunstein M. Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **9**(3): 383-7.(1997)

Hamatake R. K., Hasegawa H., Clark A. B., Bebenek K., Kunkel T. A. & Sugino A. Purification and characterization of DNA polymerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the catalytic core and a possible holoenzyme form of the enzyme. *J Biol Chem* **265**(7): 4072-83.(1990)

Hardy C. F., Sussel L. & Shore D. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev* **6**(5): 801-14.(1992)

Harley C. B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* **256**(2-6): 271-82.(1991)

Hartwell L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation. *J Mol Biol* **59**(1): 183-94.(1971)

Hartwell L. H. Three additional genes required for deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **115**(3): 966-74.(1973)

Hartwell L. H., Mortimer R. K., Culotti J. & Culotti M. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of cdc mutants. *Genetics* **74**(267-286).(1973)

Hofmann J. F., Laroche T., Brand A. H. & Gasser S. M. RAP-1 factor is necessary for DNA loop formation in vitro at the silent mating type locus HML. *Cell* **57**(5): 725-37.(1989)

Huang M., Zhou Z. & Elledge S. J. The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* **94**(5): 595-605.(1998)

Huberman J. A., Spotila L. D., Nawotka K. A., el-Assouli S. M. & Davis L. R. The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid. *Cell* **51**(3): 473-81.(1987)

Ivessa A. S., Zhou J. Q., Schulz V. P., Monson E. K. & Zakian V. A. Saccharomyces Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes Dev* **16**(11): 1383-96.(2002)

Johansson E., Majka J. & Burgers P. M. Structure of DNA polymerase delta from Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **276**(47): 43824-8.(2001)

Jong A. Y., Kuo C. L. & Campbell J. L. The CDC8 gene of yeast encodes thymidylate kinase. *J Biol Chem* **259**(17): 11052-9.(1984)

Jordan A. & Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **67**(71-98).(1998)

Kamimura Y., Masumoto H., Sugino A. & Araki H. Sld2, which interacts with Dpb11 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for chromosomal DNA replication. *Mol Cell Biol* **18**(10): 6102-9.(1998)

Kesti T., Flick K., Keranen S., Syvaaja J. E. & Wittenberg C. DNA polymerase epsilon catalytic domains are dispensable for DNA replication, DNA repair, and cell viability. *Mol Cell* **3**(5): 679-85.(1999)

Kipling D. & Cooke H. J. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**(6291): 400-2.(1990)

Klein H. L. & Kreuzer K. N. Replication, recombination, and repair: going for the gold. *Mol Cell* **9**(3): 471-80.(2002)

Kohalmi S. E. & Kunz B. A. Mutational specificity of thymine nucleotide depletion in yeast. *Mutat Res* **289**(1): 73-81.(1993)

Kunz B. A., Kohalmi S. E., Kunkel T. A., Mathews C. K., McIntosh E. M. & Reidy J. A. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat Res* **318**(1): 1-64.(1994)

Kuo C. L. & Campbell J. L. Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* DNA replication genes: isolation of the CDC8 gene and two genes that compensate for the cdc8-1 mutation. *Mol Cell Biol* **3**(10): 1730-7.(1983)

Kyrion G., Liu K., Liu C. & Lustig A. J. RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **7**(7A): 1146-59.(1993)

Laroche T., Martin S. G., Gotta M., Gorham H. C., Pryde F. E., Louis E. J. & Gasser S. M. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* **8**(11): 653-6.(1998)

Le S., Moore J. K., Haber J. E. & Greider C. W. RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**(1): 143-52.(1999)

Lendvay T. S., Morris D. K., Sah J., Balasubramanian B. & Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**(4): 1399-412.(1996)

Lengronne A., Pasero P., Bensimon A. & Schwob E. Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation in TK(+) yeast strains. *Nucleic Acids Res* **29**(7): 1433-42.(2001)

Lin J. J. & Zakian V. A. The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13760-5.(1996)

Lingner J. & Cech T. R. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10712-7.(1996)

Lingner J., Cech T. R., Hughes T. R. & Lundblad V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11190-5.(1997)

Longhese M. P., Paciotti V., Neecke H. & Lucchini G. Checkpoint proteins influence telomeric silencing and length maintenance in budding yeast. *Genetics* **155**(4): 1577-91.(2000)

Lundblad V. & Szostak J. W. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**(4): 633-43.(1989)

Mallory J. C. & Petes T. D. Protein kinase activity of *tell1p* and *mec1p*, two *saccharomyces cerevisiae* proteins related to the human ATM protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13749-54.(2000)

Marcand S., Gilson E. & Shore D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**(5302): 986-90.(1997)

McClintock B. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis.

Proc Natl Acad Sci U S A **25**(405-416).(1939)

McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**(234-

282).(1941)

Moertel C. G. Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* **330**(16): 1136-42.(1994)

Moore E. C. & Hurlbert R. B. The inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrazoloimidazole (IMPY). *Pharmacol Ther* **27**(2): 167-96.(1985)

Morrison A., Araki H., Clark A. B., Hamatake R. K. & Sugino A. A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*. *Cell* **62**(6): 1143-51.(1990)

Muller H. J. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* **13**(181-95, 198).(1938)

Munoz-Jordan J. L., Cross G. A., Lange T. & Griffith J. D. t-loops at trypanosome telomeres.

Embo J **20**(3): 579-588.(2001)

Murti K. G. & Prescott D. M. Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14436-9.(1999)

Nugent C. I., Bosco G., Ross L. O., Evans S. K., Salinger A. P., Moore J. K., Haber J. E. & Lundblad V. Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* **8**(11): 657-60.(1998)

Nugent C. I., Hughes T. R., Lue N. F. & Lundblad V. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**(5285): 249-52.(1996)

Ohya T., Kawasaki Y., Hiraga S., Kanbara S., Nakajo K., Nakashima N., Suzuki A. & Sugino A. The DNA polymerase domain of pol(epsilon) is required for rapid, efficient, and highly accurate chromosomal DNA replication, telomere length maintenance, and normal cell senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**(31): 28099-108.(2002)

Ohya T., Maki S., Kawasaki Y. & Sugino A. Structure and function of the fourth subunit (Dpb4p) of DNA polymerase varepsilon in *saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **28**(20): 3846-52.(2000)

Olovnikov A. M. A theory of marginotomy. *J Theor Biol* **41**(181-190).(1973)

Pang T. L., Wang C. Y., Hsu C. L., Chen M. Y. & Lin J. J. Exposure of single-stranded telomeric DNA causes G2/M cell cycle arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**(11): 9318-21.(2003)

Parenteau J. & Wellinger R. J. Accumulation of single-stranded DNA and destabilization of telomeric repeats in yeast mutant strains carrying a deletion of RAD27. *Mol Cell Biol* **19**(6): 4143-52.(1999)

Peterson S. E., Stellwagen A. E., Diede S. J., Singer M. S., Haimberger Z. W., Johnson C. O., Tzoneva M. & Gottschling D. E. The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat Genet* **27**(1): 64-7.(2001)

Plevani P., Foiani M., Valsasini P., Badaracco G., Cheriathundam E. & Chang L. M. Polypeptide structure of DNA primase from a yeast DNA polymerase-primase complex. *J Biol Chem* **260**(11): 7102-7.(1985)

Porter S. E., Greenwell P. W., Ritchie K. B. & Petes T. D. The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**(4): 582-5.(1996)

Price C. M. Synthesis of the telomeric C-strand. A review. *Biochemistry (Mosc)* **62**(11): 1216-23.(1997)

Qi H. & Zakian V. A. The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev* **14**(14): 1777-88.(2000)

Reichard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **57**(349-74).(1988)

Ritchie K. B., Mallory J. C. & Petes T. D. Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**(9): 6065-75.(1999)

Ritchie K. B. & Petes T. D. The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* **155**(1): 475-9.(2000)

Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989) Analysis of genomic DNA by southern hybridization. In 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition.' (Ed. NY Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.) pp. 9,31-9,43)

Santi D. V., McHenry C. S. & Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* **13**(3): 471-81.(1974)

Sclafani R. A. & Fangman W. L. Yeast gene CDC8 encodes thymidylate kinase and is complemented by herpes thymidine kinase gene TK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(18): 5821-5.(1984)

Shore D. RAP1: a protean regulator in yeast. *Trends Genet* **10**(11): 408-12.(1994)

Shore D. Telomere length regulation: getting the measure of chromosome ends. *Biol Chem* **378**(7): 591-7.(1997)

Singer M. S. & Gottschling D. E. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**(5184): 404-9.(1994)

Sitney K. C., Budd M. E. & Campbell J. L. DNA polymerase III, a second essential DNA polymerase, is encoded by the *S. cerevisiae* CDC2 gene. *Cell* **56**(4): 599-605.(1989)

Starling J. A., Maule J., Hastie N. D. & Allshire R. C. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res* **18**(23): 6881-8.(1990)

Stubbe J., Ge J. & Yee C. S. The evolution of ribonucleotide reduction revisited. *Trends Biochem Sci* **26**(2): 93-9.(2001)

Sugimoto K., Sakamoto Y., Takahashi O. & Matsumoto K. HYS2, an essential gene required for DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **23**(17): 3493-500.(1995)

Taggart A. K., Teng S. C. & Zakian V. A. Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* **297**(5583): 1023-6.(2002)

Tagger A. Y. & Wright J. A. Molecular and cellular characterization of drug resistant hamster cell lines with alterations in ribonucleotide reductase. *Int J Cancer* **42**(5): 760-6.(1988)

Taylor G. R., Barclay B. J., Storms R. K., Friesen J. D. & Haynes R. H. Isolation of the thymidylate synthetase gene (TMP1) by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **2**(4): 437-42.(1982)

Taylor G. R., Lagosky P. A., Storms R. K. & Haynes R. H. Molecular characterization of the cell cycle-regulated thymidylate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **262**(11): 5298-307.(1987)

Teng S. C., Chang J., McCowan B. & Zakian V. A. Telomerase-Independent Lengthening of Yeast Telomeres Occurs by an Abrupt Rad50p-Dependent, Rif-Inhibited Recombinational Process. *Mol Cell* **6**(4): 947-952.(2000)

Thelander L. & Reichard P. Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem* **48**(133-58).(1979)

Tinkelenberg B. A., Hansbury M. J. & Ladner R. D. dUTPase and uracil-DNA glycosylase are central modulators of antifolate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* **62**(17): 4909-15.(2002)

Tsukamoto Y., Taggart A. K. & Zakian V. A. The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Curr Biol* **11**(17): 1328-35.(2001)

Watson J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**(94): 197-201.(1972)

Wellinger R. J., Ethier K., Labrecque P. & Zakian V. A. Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**(3): 423-33.(1996)

Wellinger R. J. & Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* **33**(5): 735-49.(1997)

Wellinger R. J., Wolf A. J. & Zakian V. A. Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**(1): 51-60.(1993)

Wotton D. & Shore D. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev* **11**(6): 748-60.(1997)

Yen Y., Grill S. P., Dutschman G. E., Chang C. N., Zhou B. S. & Cheng Y. C. Characterization of a hydroxyurea-resistant human KB cell line with supersensitivity to 6-thioguanine. *Cancer Res* **54**(14): 3686-91.(1994)

Zhao X., Chabes A., Domkin V., Thelander L. & Rothstein R. The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *Embo J* **20**(13): 3544-53.(2001)

Zhao X., Muller E. G. & Rothstein R. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* **2**(3): 329-40.(1998)

Zhou B. S., Hsu N. Y., Pan B. C., Doroshow J. H. & Yen Y. Overexpression of ribonucleotide reductase in transfected human KB cells increases their resistance to hydroxyurea: M2 but not M1 is sufficient to increase resistance to hydroxyurea in transfected cells. *Cancer Res* **55**(6): 1328-33.(1995)

Zhou Z. & Elledge S. J. DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell* **75**(6): 1119-27.(1993)