

**UNIVERSITE PARIS 7- DENIS DIDEROT**

**UFR de BIOLOGIE**

**DOCTORAT**

Spécialité:  
**Génétique humaine**

**Lorène ROZIER**

Sujet:

**Cassures induites par les stress, rôle dans l'instabilité  
génomique et dans la progression tumorale**

**Thèse dirigée par Michelle DEBATISSE**

Soutenue le 13 Mai 2005

**JURY**

Mme Claudie LAMOUR-ISNARD  
M. Daniel BIRNBAUM  
Mme Jessica ZUCMAN-ROSSI  
M. Bernard DUTRILLAUX  
M. Bruno GOUD  
Mme Michelle DEBATISSE

présidente  
rapporteur  
rapporteur  
examineur  
examineur  
examineur

## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le professeur Michelle Debatisse qui m'a encadrée depuis mon DEA et tout au long de cette thèse pour sa disponibilité, ses conseils, son soutien et l'intérêt qu'elle a porté à mon travail et pour m'avoir permis de le réaliser dans les meilleures conditions.

Je remercie le professeur Gérard Buttin de m'avoir accueillie dans l'Unité de Génétique Somatique de l'Institut Pasteur pendant mon DEA et ma première année de ma thèse, et d'avoir suivi par la suite avec intérêt la progression de mes travaux.

Je remercie également monsieur Bernard Dutrillaux de m'avoir accueillie par la suite dans son unité à l'Institut Curie, ainsi que pour les discussions scientifiques que nous avons eues. Je le remercie ainsi que Bruno Goud d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je remercie madame Jessica Zucman-Rossi et monsieur Daniel Birnbaum d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et le professeur Claudie Lamour-Isnard d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie aussi tous les membres de l'Unité de Génétique somatique puis ceux de l'UMR 147/FRE2584 pour leur soutien et leur gentillesse et plus spécialement Véronique qui m'a initiée aux techniques de FISH; Anne-Marie et Sandra pour leur aide précieuse; Frédérique, Mauro, Gerd, Sylvain, Eliane, Françoise, mes "collègues" de paillasse; Romain, Marie-Emmanuelle, Karène, Anne, Christine, Nathalie, Nausica et Marie-France pour les bons moments partagés.

Je voudrais aussi remercier également François Traincard et Catherine Arnaudeau-Bégar, de m'avoir fait faire mes premiers pas expérimentaux à l'Institut Pasteur puis à Stockholm et de m'avoir donné goût à la recherche.

Je remercie enfin toute ma famille qui m'ont sans cesse accompagnée et encouragée dans mes études et permis de les accomplir dans les meilleures conditions. Merci pour votre soutien constant au cours de ces années. Merci enfin à tous mes amis.

Merci à tous

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b>	p 9
<b>I) Les sites fragiles ou cassures associées à la perturbation de la phase S</b>	p 13
1) <u>La découverte des sites fragiles</u>	p 13
2) <u>Les sites fragiles rares</u>	p 14
a) Les sites sensibles au folate	p 14
b) Les sites sensibles à la distamycine-A	p 17
c) Les sites fragiles sensibles au BrdU	p 18
d) Les mécanismes de l'instabilité des SFRs	p 18
3) <u>Les sites fragiles communs</u>	p 21
a) Les caractéristiques des SFA	p 22
b) Le clonage des SFAs	p 22
<b>b-1</b> <u>Exemple de FRA3B</u>	p 22
<b>b-2</b> <u>Les autres sites clonés</u>	p 24
c) Les caractéristiques moléculaires des SFAs	p 25
4) <u>Mécanismes d'instabilité des SFCs</u>	p 26
5) <u>Rôle des SFC dans la progression tumorale</u>	p 28
a) Délétions et translocations associées aux SFA	p 28
b) Amplification génique et SFC	p 31
<b>b-1</b> <u>Rappels sur les mécanismes d'amplifications</u>	p 31
<b>b-2</b> <u>Apport des systèmes modèles</u>	p 31
<b>b-3</b> <u>Analyse des amplifications dans les cellules tumorales</u>	p 35
<b>II) Stress et perturbation de la mitose : le point de contrôle du fuseau mitotique</b>	p 36
1) <u>Généralités</u>	p 36
2) <u>Découverte de l'existence du point de contrôle du fuseau mitotique</u>	p 37
a) quelques repères historiques	p 37
b) données obtenues chez la levure	p 37

3) <u>Le centromère et le kinétochore siège du point de contrôle du fuseau mitotique</u>	p 38
a) Les protéines de structures	p 39
b) Les complexes adaptateurs	p 39
c) Les protéines "passagères" des chromosomes	p 40
d) Les protéines de régulation	p 40
e) Les fonctions du kinétochore	p 41
<b>e-1</b> <u>Le rôle dans l'attachement des chromosomes</u>	p 41
<b>e-2</b> <u>Le rôle dans le mouvement des chromosomes</u>	p 42
<b>e-3</b> <u>Le maintien de l'attachement</u>	p 44
4) <u>Le point de contrôle du fuseau dans les cellules de mammifères</u>	p 44
a) Activation par un défaut d'attachement ou de tension ?	p 44
<b>a-1</b> <u>Le contrôle de l'attachement</u>	p 44
<b>a-2</b> <u>Le contrôle de la tension</u>	p 45
b) La transition métaphase-anaphase; APC/C <sup>Cdc20</sup> cible du point de contrôle	p 46
c) Les protéines impliquées dans ce mécanisme de surveillance	p 48
d) Comment ces protéines sont-elles recrutées au kinétochore?	p 55
e) Comment ces protéines agissent-elles ?	p 56
<b>e-1</b> <u>Les différents complexes inhibiteurs</u>	p 56
<b>e-2</b> <u>Les modes d'actions du MCC ou de ses composants sur APC/C</u>	p 57
f) Extinction du signal et inactivation du point de contrôle	p 58
g) Sortie de mitose et dégradation des cyclines	p 59
5) <u>Conséquences d'une activation prolongée du point de contrôle de fuseau mitotique</u>	p 59
a) Les causes	p 59
b) Durée de l'arrêt	p 61
c) Les conséquences d'un arrêt prolongé en mitose	p 61
<b>c-1</b> <u>La mort en mitose</u>	p 62
<b>c-2</b> <u>Le glissement mitotique: un mécanisme peu connu</u>	p 62
<b>c-3</b> <u>Le G1 post-glissement</u>	p 63
6) <u>Anomalies du point de contrôle et tumorigénèse</u>	p 65
a) Inactivation des gènes du point de contrôle dans les cancers	p 65
<b>a-1</b> <u>Inactivation par mutation</u>	p 66
<b>a-2</b> <u>Dérégulation de la transcription</u>	p 66
<b>a-3</b> <u>Inhibition post-traductionnelle</u>	p 70

<b>a-4</b> <u>Prédisposition au cancer et aneuploidie constitutionnelle</u>	p 70
b) Autres défauts de mitose	p 71
<b>b-1</b> <u>Cohésion anormale des chromatides sœurs</u>	p 71
<b>b-2</b> <u>Anomalies du centrosome</u>	p 71
<b>b-3</b> <u>Mutations du gène APC et instabilité chromosomique</u>	p 71
<b>RESULTATS</b>	p 73
<b>I) Article 1</b>	p 74
<b>II) Article 2</b>	p 78
<b>III) Article 3</b>	p 81
<b>IV) Article 4</b>	p 84
<b>DISCUSSION</b>	p 89
A) Rôle des sites fragiles dans l'instabilité chromosomique : progression tumorale et maladies génétiques héréditaires	p 90
B) Rôle de l'hypoxie dans l'activation des sites fragiles <i>in vivo</i> : un inducteur physiologique ?	p 94
C) Conservations des sites fragiles communs au cours de l'évolution ?	p 96
D) Le point de contrôle G1 tétraploïde après une perturbation de la mitose	p 98
E) Conséquences de la perturbation de la mitose : une relation entre activation du point de contrôle, les dommages de l'ADN et l'apoptose ?	p 100
F) Relation entre les cassures survenues après traitement prolongé par les poisons du fuseau et les sites fragiles ?	p 102
G) Contrôle de la mitose et progression tumorale	p 103
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	p 104

## Table des illustrations

Tableau 1: Classification des SFR en fonction de leurs inducteurs	p 14
Figure 1: Schéma du métabolisme des nucléotides et implication dans l'induction des SFR sensibles au folate	p 15
Tableau 2: Taille des répétitions CCG dans les SFR sensibles au folate clonés	p 16
Tableau 3: Maladies causées par les mutations par expansion de triplet	p 19
Figure 2: Modèle de formation des changements de nombre de répétitions aux SFRs	p 20
Figure 3: Carte des SFAs humains	p 23
Tableau 4: Sites Fragiles sensibles à l'AP clonés chez l'homme et la souris	p 25
Figure 4: Mécanismes des cycles de cassures-fusion-pont (CFP) chromatidiens dans la formation d'amplification intrachromosomique	p 32
Figure 5: Les mécanismes de formation des dmin	p 34
Figure 6: Schéma des différentes étapes de la mitose	p 36
Figure 7: La structure du kinétochore	p 39
Figure 8: Schéma des différents attachements des chromosomes aux microtubules	p 41
Figure 9: Modèle de la correction des attachements instables par MCAK, Aurora-B et PP1	p 42
Figure 10: Rôle des protéines associées au microtubules dans le mouvement des chromosomes pendant la congression	p 43
Figure 11: Organisation des cohésines.	p 46
Figure 12: Profil d'activation des complexes APC/C au cours du cycle cellulaire et de la dégradation de certains de leur substrat	p 47
Figure 13: Schéma du contrôle de la transition métaphase-anaphase	p 48
Figure 14: Schéma de la structure des protéines du point de contrôle	p 48
Tableau 5: Taille et interaction des protéines du point de contrôle du fuseau mitotique	p 49
Tableau 6: Rôle des protéines dans le point de contrôle du fuseau mitotique	p 51
Figure 15: Schéma des différentes conformations de Mad2	p 53
Tableau 7: Phénotypes chez la souris des knock-out de certains gènes du point de contrôle de mitose	p 54
Figure 16: Schéma d'un modèle d'assemblage des protéines au kinétochore chez le Xénope	p 55
Tableau 8: Mode d'action de différents poisons des microtubules	p 60
Figure 17: Devenir des cellules après un arrêt prolongé en mitose.	p 62
Figure 18: Schéma des voies de régulation du cycle cellulaire p53 et pRb chez l'homme	p 64
Tableau 9 : Mutations des gènes du point de contrôle du fuseau mitotique dans les lignées de cellules cancéreuses ou les tumeurs.	p 67-69
Figure 19: Schéma des trois types de traitements appliqués aux cellules après sélection mitotique et leurs conséquences phénotypiques.	p 87

## Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique  
ADR: adriamycine  
AMD: actinomycine D  
AP: aphidicoline  
APC: adenomatous polyposis coli  
APC/C: APC/cyclosome  
ARN: acide ribonucléique  
BrdC: bromodésoxycytidine  
BrdU: bromodésoxyuridine  
dmin: double-minute  
DSB: cassure double-brin  
FCdR: fluorodésoxycytidine  
FISH: hybridation in situ fluorescente ("fluorescent in situ hybridization")  
FUdR: fluorodésoxyuridine  
HCC: hépatocarcinome  
HSR: région à coloration homogène (homogenously staining region)  
kb: kilobase  
KO: knock-out  
KTC: kinétochore  
LOE: perte d'expression (loss of expression)  
LOH: perte d'hétérozygotie (loss of heterozygosity)  
MAP: protéine associée au microtubule  
MCC: complexe du point de contrôle mitotique (BubR1-Bub3-Mad2-Cdc20)  
MTX: méthothrexate  
pb: paire de base  
SFA: site fragile commun sensible à l'aphidicoline  
SFC: site fragile commun  
SFR: site fragile rare  
TNR: répétitions de trinuécléotides  
TSG: gène suppresseur de tumeur  
VB: vinblastine

## RESUME

L'instabilité génomique est l'une des propriétés les plus anciennement reconnues aux cellules cancéreuses qui présentent fréquemment des anomalies de structure et de nombre de chromosomes. Depuis plusieurs années, mon laboratoire cherche à reconstituer les mécanismes moléculaires mis en œuvre lors de la formation des réarrangements chromosomiques associés à la progression tumorale, notamment lors de l'amplification génique, et plus particulièrement au rôle des sites fragiles communs sensibles à l'aphidicoline (SFA) dans ces mécanismes. Les sites fragiles sont des locus chromosomiques où des cassures se produisent quand les cellules sont cultivées dans des conditions de stress.

Nous avons montré, dans des cellules amplifiées *in vitro* pour divers gènes, que des cassures au niveau des sites fragiles communs peuvent engendrer des remaniements secondaires des structures portant les copies surnuméraires (inversions, translocations, interconversions entre copies intra- et extrachromosomiques). Nous avons également contribué à montrer que les mécanismes d'amplification peuvent être initiés *in vivo* par des événements survenant au niveau des SFAs. En effet, la duplication du gène *PIP1* dans la lignée de cancer du sein T47D a été initiée au niveau du site fragile FRA7I, probablement par une cassure ayant déclenché le processus de cassure-fusion-pont.

Nous nous sommes par ailleurs intéressés au gène *grid2*, fréquemment inactivé par des réarrangements chez la souris, donnant des animaux ataxiques (mutant hotfoot). Nous avons identifié et cloné *Fra6C1*, un SFA couvrant ce gène chez la souris, ainsi son orthologue du génome humain, FRA4F, situé au niveau de *GRID2* humain en 4q22 dans une région de synténie avec le génome murin s'étendant sur environ 7Mb. Cette étude révèle un lien entre maladie génétique à transmission mendélienne et SFA. De plus, le bras long du chromosome 4 est fréquemment délété dans les cancers du foie, notamment la région de FRA4F, suggérant que ce site pourrait aussi jouer un rôle dans le développement de la cancérogénèse hépatique.

Des stress variés induisent des cassures dans les chromosomes et contribuent aux remodelages génomiques observés dans les cancers. Ainsi, la destruction du fuseau mitotique par les poisons des microtubules induit un arrêt irréversible des cellules normales de mammifères au cours de la phase G1 suivant la mitose perturbée. Nous avons montré qu'un retard prolongé au franchissement de la mitose induit des cassures chromosomiques. Ce phénomène, qui dépend de BubR1 mais pas de Mad2 (deux protéines impliquées dans le contrôle de la mitose), couple le point de contrôle peu efficace qui surveille le fuseau au point de contrôle plus stringent des dommages de l'ADN. Les cellules déficientes pour ce dernier continuent leur cycle et peuvent acquérir, en un cycle, à la fois des anomalies de nombre et de structure des chromosomes, ressemblant aux réarrangements complexes observés dans de nombreuses tumeurs solides.



# **Introduction**

Le maintien de l'information génétique au cours des divisions cellulaires successives est assuré par la succession des phases S et M, étapes clés qui conduisent respectivement à dupliquer les chromosomes et à les répartir de façon égale entre les cellules filles. Ces processus étant intrinsèquement générateurs d'erreurs, ils doivent être étroitement contrôlés par différents mécanismes de surveillance, appelés points de contrôle. Ces points de contrôles sont répartis tout au long du cycle et surveillent 1) en G1, au niveau du "point de restriction", que toutes les conditions soient réunies (présence de facteurs de croissance ou de signaux de prolifération) pour que la cellule puisse s'engager dans un nouveau cycle (entrer en S, répliquer son ADN puis se diviser), ou dans le cas contraire, sortir du cycle pour un état quiescent (phase G0). Une fois le point de restriction franchi, la cellule est engagée irréversiblement dans le cycle (Sherr, 2004); 2) à la sortie de G1 (point de contrôle G1/S), l'état des chromosomes avant d'entrer en phase S; 3) en S, le bon déroulement de la réplication (Takeda and Dutta, 2005); 4) à l'entrée en mitose (point de contrôle G2/M) que l'ADN a été correctement et complètement répliqué; 5) en mitose, que le fuseau est correctement formé, puis que les chromosomes sont bien accrochés au fuseau mitotique (contrôle de la transition métaphase-anaphase) et enfin que les chromosomes sont complètement séparés avant le déclenchement de la sortie de mitose (voie MEN) (Wassmann and Benezra, 2001); 6) Un dernier paramètre important pour les cellules soumises à l'action des stress génotoxiques est le contrôle de l'intégrité de leur génome grâce aux points de contrôle des dommages de l'ADN. Quand des cassures sont détectées, si les dommages ne sont pas réparables, les cellules s'engageront dans une voie de mort cellulaire (apoptose ou sénescence). Dans le cas contraire, ATM/ATR et Chk1/Chk2 déclenchent des signalisations qui retardent la progression du cycle en G1, S ou G2, en ciblant les complexes cyclines/CDK spécifiques de chaque phase et permettent ainsi aux cellules de réparer leurs lésions (Lukas et al., 2004).

La transformation physiologique d'une cellule normale en une cellule cancéreuse s'effectue souvent en plusieurs étapes qui conduisent progressivement à la perte de la capacité d'exercer ces contrôles et à l'acquisition de nouvelles capacités comme l'autosuffisance aux signaux de prolifération, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance, l'échappement au programme de mort cellulaire, la perte de la limitation du potentiel de prolifération (échappement à la crise) et, dans les stades avancés, l'invasion des tissus, à la formation de métastase (Hanahan and Weinberg, 2000). Cette évolution résulte de l'accumulation de mutations ou de modifications épigénétiques conduisant à la dérégulation de l'expression de certains gènes (activation des oncogènes, inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs)

facilitée par la perte des points de contrôle du cycle. Cette instabilité génétique assure la constitution d'un important réservoir de cellules mutantes à partir duquel sont sélectionnées celles qui ont acquis un avantage de croissance, assurant ainsi la progression tumorale.

Au niveau chromosomique, la plupart des tumeurs présentent des anomalies caryotypiques, variables d'un groupe de tumeurs à l'autre. En effet, dans les leucémies et les tumeurs des tissus mous, des translocations récurrentes, bien caractérisées, constituent souvent le seul réarrangement détectable et conduisent, au niveau moléculaire, à l'activation d'oncogènes (gène de fusion ou dérégulation de la transcription) (Dutrillaux, 2000; Gisselsson, 2003). Au contraire, les caryotypes des tumeurs solides (foie, sein, poumon ...) sont souvent complexes (Mitelman, 2002) et présentent soit des anomalies de structure (délétions, translocations, inversions, amplifications intra ou extrachromosomique), soit des anomalies de nombre de chromosomes (aneuploïdies), soit les deux. Si des réarrangements variés surviennent dans les différentes tumeurs, ils ne surviennent pas de façon aléatoire. Les mécanismes mis en œuvre lors de la formation des réarrangements chromosomiques à l'origine de ces anomalies ne sont pas encore vraiment élucidés mais sont en cours d'études, notamment au laboratoire. La formation de réarrangements structuraux pourrait s'expliquer par la présence de cassures doubles brins persistant dans le génome, qu'elles aient pour origine des stress intracellulaires ou environnementaux. Les cellules sont particulièrement sensibles aux stress qui entraînent un ralentissement, voire un arrêt, des fourches de réplication. C'est notamment le cas des stress qui induisent les sites fragiles communs, conduisant à la formation de cassures ciblées dans le génome. Il est actuellement largement établi que ces cassures sont souvent à l'origine de la formation de certaines structures amplifiées intrachromosomiques ou d'autres remaniements observées fréquemment dans les cellules tumorales. La persistance dans les cellules de cassures doubles brins non ou mal réparées au moment de la réplication ou de la mitose, liée à des défauts dans les points de contrôle des dommages de l'ADN (voies ATM, ATR, voies de réparation des cassures par exemple), va favoriser la formation de délétions, translocations, chromosomes dicentriques, ponts chromatidiens ... entretenant et développant certaines formes d'instabilité. L'étude des sites fragiles communs, activés en réponse aux stress induits en phase S, a constitué la première partie de mon travail de thèse.

En ce qui concerne les anomalies de nombre des chromosomes, il est généralement admis qu'elles résultent d'échecs de la mitose dus à des problèmes de formation du fuseau mitotique, de séparation des centrosomes, du point de contrôle de mitose, de ségrégation des chromosomes, de cohésion des chromosomes ou de cytokinèse. Cette vision dichotomique de

l'évolution chromosomique par cassures en phase S et ségrégation aberrante en mitose a été en partie remise en cause par l'observation de remaniements chromosomiques dans les cellules après une culture prolongée en présence de poison du fuseau suggérant que ces drogues considérées non-clastogènes sont quand capables d'induire, en plus des anomalies de nombre, des réarrangements de la structure des chromosomes. Dans la seconde partie de mon travail de thèse, j'ai étudié, sur les cellules de mammifères, les conséquences des traitements prolongés par différentes drogues qui perturbent la mitose (les inhibiteurs du fuseau mitotique). J'ai ainsi pu montrer que les perturbations mitotiques déclenchent une signalisation de stress induisant des cassures, ce qui conduit simultanément à des anomalies de nombre et de structure et reproduit en une seule étape certains réarrangements complexes observés dans les tumeurs.

## I) Les sites fragiles : cassures associées à la perturbation de la phase S

### 1) La découverte des sites fragiles

Dekaban a le premier, en 1965, décrit l'existence d'une "région de fragilité récurrente" après l'observation dans des cultures de lymphocytes d'une de ses patientes d'une cassure récurrente sur le chromosome 9q (Dekaban, 1965). Par la suite, d'autres exemples de cassures observées de façon répétée sur les différents chromosomes sont venus confirmer cette notion de "fragilité récurrente" (Lejeune et al., 1968; Lubs, 1969; Reeves and Lawler, 1970). Le caractère transmissible de certains de ces sites a été découvert par Lejeune et collaborateurs après l'observation chez une mère et sa fille d'un site en 2q21 (Lejeune et al., 1968). L'intérêt porté à ces sites s'est accru après la découverte de l'association entre un site fragile localisé vers l'extrémité du bras long du chromosome X et la forme familiale la plus commune de retard mental connu sous le nom de "syndrome de l'X fragile" (Lubs, 1969). Dans les premiers temps, néanmoins, la caractérisation de ces sites était rendue difficile par la grande variabilité des fréquences de cassure observées d'une étude à l'autre, qui brouillait les résultats.

Dans les années 1970, Sutherland a observé qu'en fonction de la composition du milieu de culture, des cassures pouvaient ou non apparaître fréquemment au niveau de certains sites, notamment dans les milieux pauvres en acide folique et thymidine. Ces observations ont amené l'idée que les sites fragiles sont inductibles (Sutherland, 1977a, 1979a; Sutherland, 1991). La découverte en 1984 d'un inducteur d'un nouveau type de site, l'aphidicoline (AP), a conduit à la définition actuelle des sites fragiles à savoir "des locus chromosomiques où des cassures et des constriction se produisent de façon récurrente quand les cellules sont soumises à des conditions spécifiques de culture" en particulier celles qui perturbent la réplication (Glover et al., 1984).

Au cours des études cytogénétiques sur le syndrome de l'X fragile, des cassures chromosomiques récurrentes, survenant notamment en 3p14.2, 16q23 et Xp22.3, ont été observées chez les individus malades comme chez les témoins. Ces observations ont conduit à la distinction de 2 classes de sites caractérisées par leur fréquence dans les populations (Glover et al., 1984): les sites dits rares (SFR), présents chez un petit nombre d'individus d'une population, et les sites dits communs (SFC), présents chez tous les individus d'une population.

## 2) Les sites fragiles rares

Le plus fréquent des SFRs, FRA16B, est observé chez environ 5% des individus de la population européenne (Schmid et al., 1986). A l'opposé certains SFRs n'ont été décrits qu'une fois (Baker and Sutherland, 1991). Les analyses cytogénétiques ont permis de caractériser 29 SFRs, répartis en 3 catégories en fonction des conditions de culture qui les induisent (Tableau 1) : les sites sensibles au folate (a), les sites induits par la distamycine-A (b), les sites induits par la bromodésoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine (c).

Tableau 1: Classification des SFRs en fonction de leurs inducteurs

Groupe	Inducteurs	Nombre (cloné)	Motif répété
a- sensible au folate	Faibles concentrations d'acide folique et de thymidine; méthotrexate; FudR; FcdR; haute concentration de thymidine.	22 (6)	(CCG) <sub>n</sub>
b- sensible à la distamycine A	1- Distamycine A, BrdU, oligopeptides antibiotiques qui ciblent le petit sillon de l'ADN	2 (1)	minisatellite 33 pb riche AT
	2- Tous les inducteurs (1) sauf le BrdU (observé seulement dans la population japonaise).	3 (0)	??
c- sensible BrdU	BrdU, BrdC	2 (1)	minisatellite ~ 42pb riche AT

### a) Les sites sensibles au folate

Ces sites, au nombre de 22, sont induits par une carence en folate (un co-facteur dans la conversion de l'uridine monophosphate en thymidine monophosphate). Ils sont également induits par divers traitements qui aboutissent à la perturbation des pools nucléotidiques pendant la synthèse de l'ADN (déficit de dCTP ou dTTP) (Figure 1, Tableau 1) : les faibles concentrations d'acide folique et de thymidine dans le milieu de culture, l'inhibition du métabolisme du folate par le méthotrexate (MTX), l'inhibition de la synthèse de la désoxycytidine diphosphate par des concentrations élevées de thymidine (inhibant la ribonucléotide réductase), l'inhibition de la thymidilate synthase par la fluorodésoxyuridine (FUdR) ou la fluorodeoxycytidine (FCdR) (revue dans (Sutherland, 1991; Sutherland and Richards, 1999)).



Tableau 2: Taille des répétitions CCG dans les SFRs sensibles au folate clonés

Site fragile (localisation)	Nombre de copie			gène	Référence
	normal	prémutation	mutation		
FRA10A (10q23.3)	8-14 (9 le fréquent)	? (non obs dans 81 témoins)	~ > 200	FRA10AC1	(Sarafidou et al., 2004)
FRA11B (11q23.3)	8-14 (11 fréquent)	80-100	> 400	CBL2	(Jones et al., 1995)
FRA16A (16p13.11)	16-50	50-200?	1000-2000?	inconnu	(Nancarrow et al., 1994)
FRAXA (Xq27.3)	6-55	55-230	> 230	FMR1	(Verkerk et al., 1991)
FRAXE (Xq28)	6-35	50-200 ?	> 200	FMR2, FMR3	(Gecz, 2000b; Knight et al., 1993)
FRAXF (Xq28)	6-38	?	300-500	FAM11A	(Parrish et al., 1994; Shaw et al., 2002)

Quand la mère transmet un allèle muté ou prémuté, le nombre de répétitions va en augmentant. Au contraire, les pères ne transmettent que des allèles prémutés, suggérant que les cellules germinales paternelles avec des prémutations ont un avantage sélectif par rapport à celles qui portent un allèle muté (pour revue (Sutherland et al., 1998; Sutherland and Richards, 1999)).

La présence d'un nombre variable de répétitions CCG a été également retrouvée lors de l'analyse moléculaire des autres sites sensibles au folate, qu'ils soient localisés sur l'X ou sur un autosome (Tableau 2) (Sarafidou et al., 2004; Sutherland and Richards, 1995b). Comme dans le cas de *FRAXA/FMRI*, un nombre de répétitions CCG important (mutation) est associé à une hyperméthylation de l'ADN qui n'est pas présente dans les allèles normaux. La méthylation observée est donc une conséquence de l'expansion des trinuécléotides plutôt que d'un effet d'empreinte parentale ou de l'inactivation du chromosome X, comme suggéré initialement (Laird, 1987a). Sauf dans le cas de FRA16A, les SFRs ont été localisés dans la partie 5' non traduite d'un gène (Tableau 2) et la méthylation des CCG aboutit à leur inactivation (Sutherland and Richards, 1999). Un traitement des cellules par un agent déméthylant (5-azadésoxycytidine) peut les réactiver (Chiurazzi et al., 1998; Shaw et al., 2002).

Comme indiqué ci-dessus, l'inactivation de *FMRI* par méthylation sur les allèles étendus de *FRAXA* (Devys et al., 1993; Pieretti et al., 1991), mais aussi par délétion (Gedeon et al., 1992) ou par mutation ponctuelle (De Boule et al., 1993) est la cause du



développement du syndrome de l'X fragile (Cummings and Zoghbi, 2000). D'autres SFRs ont aussi été associés à des maladies héréditaires. FRAXE est associé à certains cas de retard mental léger non spécifique (incidence entre 1/50000 à 1/100000 garçons) (Knight et al., 1993; Mulley et al., 1995), liés à une diminution de l'expression du gène *FMR2* (Gecz, 2000a) dont la fonction est encore inconnue. Il a été suggéré que FRAXF, souvent confondu avec FRAXE en cytogénétique, pourrait être impliqué dans certains cas de retard mental (Hirst et al., 1993; Parrish et al., 1994), mais ceci reste à démontrer. Enfin, FRA11B, en 5' du proto-oncogène *CBL2*, est associé à des cassures chromosomiques du 11q chez un petit nombre de patients présentant le syndrome de Jacobsen (Jones et al., 2000).

#### b) Les sites sensibles à la distamycine-A

Ces sites, au nombre de 5, sont tous induits par des ligands des bases AT du petit sillon de l'ADN comme la distamycine-A, le netropsin, le bérénil, le DAPI, le Hoechst (pour revue (Sutherland, 1991; Sutherland and Richards, 1999)). Les sites du sous-groupe b-1, FRA16B (16q22) et FRA17A (17p12) sont également inductibles par le BrdU, à la différence des sites du sous-groupe b-2 (Tableau 1). Ces derniers, FRA8E (8q24.1) (Takahashi et al., 1988a), FRA11I (11p15.1) (Takahashi et al., 1988b) et FRA16E (16p12.1) (Hori et al., 1988) n'ont été jusqu'à présent observés que dans la population japonaise.

FRA16B, présent chez un individu sur 20 dans la population européenne, est le plus fréquent des SFRs et son activation a quelques fois été observée dans 90% des métaphases après traitement au bérénil (Schmid et al., 1986). Il a été le premier SFR non sensible au folate décrit, et actuellement le seul site sensible à la distamycine-A cloné (Yu et al., 1997). Sa fragilité provient de l'expansion de répétitions d'une séquence de 33pb (ATATATTATAT-ATTATATCTAATAATATAT(C/A)TA)<sub>n</sub>, où n peut atteindre plusieurs milliers dans les allèles FRA16B (représentant 15 à 70 kb de séquence) contre 7 à 12 dans la population générale (Yu et al., 1997). Ces grandes expansions ne sont détectables que par électrophorèse en champ pulsé, ce qui rend impossible la détection de faibles augmentations de taille et donc l'étude de variations somatiques ou familiale du nombre de répétitions. La composition de ce site est cohérente avec son mode d'induction par des drogues qui se lient au petit sillon de l'ADN de séquences composées presque exclusivement de AT. Aucun gène n'a été détecté au niveau de ce site.

### c) Les sites fragiles sensibles au BrdU

Ces sites FRA10B (10q25.2) et FRA12C (12q24.2) sont spécifiquement induits par des traitements prolongés par le BrdU ou la bromodésoxycytidine (BrdC) (Scheres and Hustinx, 1980; Sutherland et al., 1980). Le BrdU est incorporé dans l'ADN en substitution de la thymidine et pourrait affecter la voie de synthèse des pyrimidines. FRA10B, le deuxième SFR le plus fréquent, est observé chez 1 personne sur 40 (2,5%) dans la population australienne (Sutherland, 1982).

L'analyse moléculaire de FRA10B a révélé, dans les allèles fragiles, la présence d'expansions d'une séquence complexe d'environ 42 pb s'étendant sur 5 à 100 kb. Cette séquence présente une région centrale très riche en AT (91%) contenant des motifs minisatellites variables en taille et composition d'une famille à l'autre, entourée de régions non répétitives (58% d'AT). Les séquences "étendues" montrent à la fois de l'instabilité somatique et génétiquement transmissibles (Hewett et al., 1998).

### d) Les mécanismes de l'instabilité des SFRs

Jusqu'à présent, les SFRs clonés et analysés au niveau moléculaire apparaissent composés soit de répétitions de trinuécléotides (TNR), soit de minisatellites (riches en AT) (Tableau 2). Dans la dernière décennie, les expansions de TNR (CCG, CAG, GAA) dans le génome, ont été impliquées dans le développement de maladies héréditaires neurologiques humaines (Tableau 3) (pour revue (Cummings and Zoghbi, 2000; Handt et al., 2000)). Dans ces maladies à anticipation, l'augmentation du nombre de répétitions au cours des générations est associée à une aggravation de la maladie (apparition plus précoce des symptômes) (Sutherland and Richards, 1995a).

De nombreuses études ont été menées ces dernières années dans différents systèmes modèles (bactérie, levure, souris, cellules de mammifères) et *in vitro* pour déterminer quels paramètres influencent l'expansion ou la contraction des TNR (Cleary and Pearson, 2003; Cummings and Zoghbi, 2000; Hirst and White, 1998; Sutherland et al., 1998; Wells, 1996). Cette instabilité dépend, entre autres, de la longueur de la séquence répétée (seuils prémutation-mutation, Tableau 2), du nombre de répétitions ininterrompues (Kunst and Warren, 1994; Montermini et al., 1997) (l'interruption des (CCG)<sub>n</sub> par AGG stabilise la séquence (Eichler et al., 1994; Fu et al., 1991; Oberle et al., 1991)), de la capacité à former des structures secondaires comme des épingle à cheveux (polyCCG, polyCAG), des tétraplexes (polyCCG) ou des triples hélices (polyGAA) (Chen et al., 1995; Cleary and

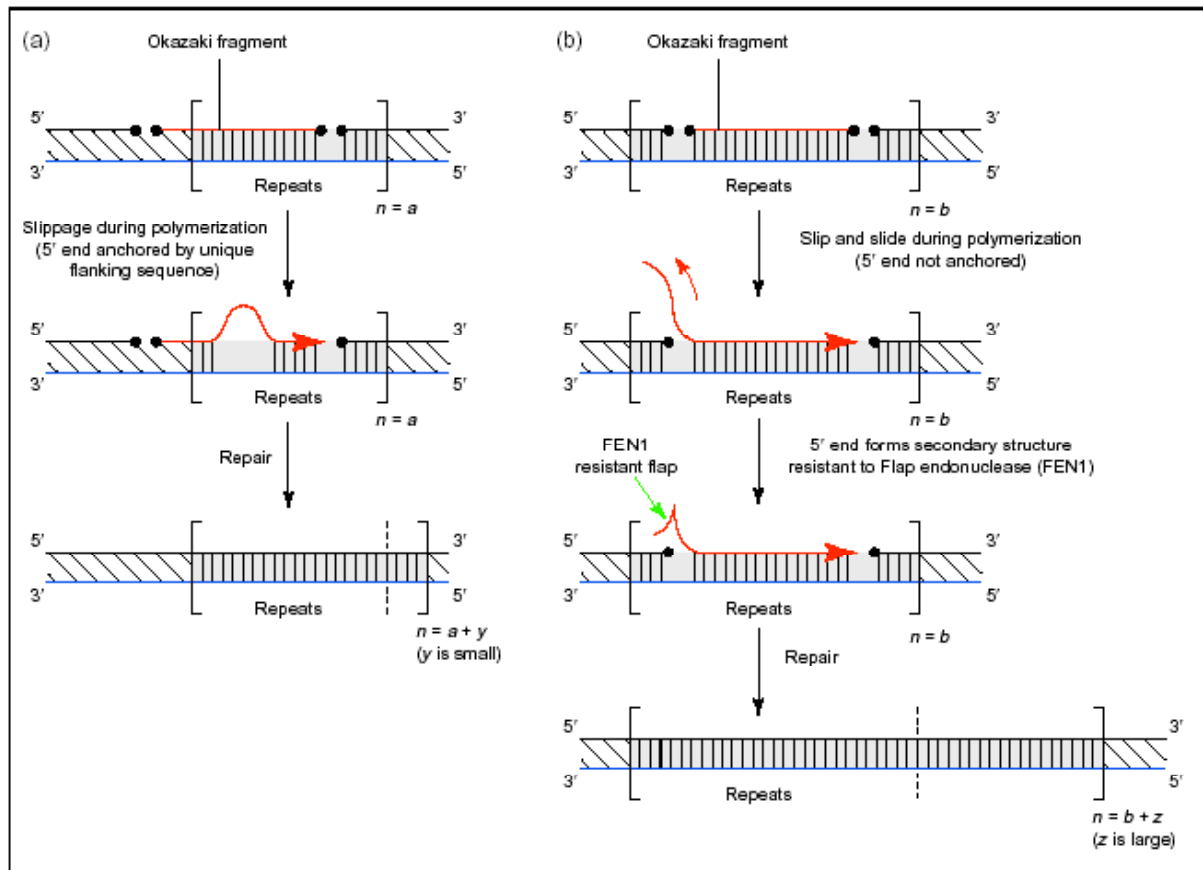
Pearson, 2003; Fojtik and Vorlickova, 2001; Gacy et al., 1998; Heidenfelder et al., 2003; Mitas et al., 1995; Nadel et al., 1995). Les séquences riches en AT présentes au niveau de FRA10B et FRA16B peuvent également former des structures secondaires en épingles à cheveux (Handt et al., 2000). Des études ont également permis d'exclure certains facteurs comme la méthylation de l'ADN (Nancarrow et al., 1994) ou un niveau élevé d'instabilité génétique globale de la cellule (comme cela peut être observé dans certains cancers avec instabilité des microsatellites) (Goellner et al., 1997).

Tableau 3: Maladies causées par des mutations par expansion de triplet

Maladie – Syndrome	Gène	Type de répétition	Localisation des répétitions	OMIM
Syndrome de l'X fragile	FMR1	(CCG) <sub>n</sub>	5'-UTR	+309550
Retard mental léger associé à FRAXE	FMR2, FMR3 (?)	(CCG) <sub>n</sub>	5'-UTR	+309548
Ataxie de Friedreich	frataxine	(GAA) <sub>n</sub>	Intron 1	# 229300
Dystrophie myotonique	DMPK	(CAG) <sub>n</sub>	3'-UTR	#160900
Atrophie musculaire spinobulbaire (maladie de Kennedy)	AR (recepteur aux androgènes)	(CAG) <sub>n</sub>	CDS <sup>a</sup>	#313200
Maladie de Huntington	HD (huntington)	(CAG) <sub>n</sub>	CDS	+143100
Atrophie dentatorubrale pallidoluisienne (syndrome de Haw river)	DRPLA (atrophine-1)	(CAG) <sub>n</sub>	CDS	#125370
Ataxie spinocerebelleuse de type 1	SCA1 (ataxin-1)	(CAG) <sub>n</sub>	CDS	#164400
Ataxie spinocerebelleuse de type 2	SCA2 (ataxin-2)	(CAG) <sub>n</sub>	CDS	#183090
Ataxie spinocerebelleuse de type 3 (maladie de Machado-Joseph)	SCA3 (ataxin-3)	(CAG) <sub>n</sub>	CDS	#109150
Ataxie spinocerebelleuse de type 6	SCA6	(CAG) <sub>n</sub>	CDS	#183086
Ataxie spinocerebelleuse de type 7	SCA7 (ataxin-7)	(CAG) <sub>n</sub>	CDS	#164500
Ataxie spinocerebelleuse de type 12	SCA12 (ataxin-12)	(CAG) <sub>n</sub>	5'-UTR	#604326

<sup>a</sup> CDS : mutation dans la séquence codante

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le changement du nombre de répétitions ne sont pas encore élucidés. Plusieurs modèles non exclusifs ont été proposés (pour revue (Cleary and Pearson, 2003)), reposant sur la mise en œuvre d'évènements de conversion génique (Igarashi et al., 1996; Jeffreys et al., 1994), sur des anomalies de réparation de l'ADN (Kovtun and McMurray, 2001; Oussatcheva et al., 2001; Parniewski et al., 2000) ou de réplication (Richards and Sutherland, 1994; Viguera et al., 2001; Wells, 1996). Le modèle réplication-glisement est le plus étudié actuellement, il permet d'expliquer à la fois les changements d'un faible ou d'un grand nombre de répétitions (Figure 2). Il propose qu'un défaut d'alignement des TNRs ( lorsque la taille des répétitions ininterrompues est inférieure à



**Figure 2:** Modèle de formation des changements de nombre de répétitions. (a) nombre de copie  $n < 80$ . Le glissement du brin au cours de l'élongation peut conduire à l'addition (ou à la délétion) d'un faible nombre de copies ( $y$ ). (b) pour  $n > 80$ , aucune des extrémités du fragment d'okazaki nouvellement synthétisé n'est liguée. Il est donc libre de se décrocher et de glisser (flèche rouge) aboutissant à la synthèse d'un certain nombre ( $z$ ) de copies supplémentaires. La capacité de l'extrémité 5' libre à former une structure secondaire inhibera l'activité de FEN1 (flèche verte) augmentant l'instabilité de la séquence. La réparation de la structure entraînera l'addition de copies supplémentaires. D'après (Sutherland et al., 1998).

la taille d'un fragment d'okazaki ou un glissement entre un fragment d'okazaki et la matrice (lorsque la taille des répétitions ininterrompues est supérieure à celle des fragments d'okazaki) survenant pendant la réplication du brin discontinu induiraient la formation de structures secondaires capables de bloquer l'élongation (Balakumaran et al., 2000; Freudenreich et al., 1997; Kunst and Warren, 1994; Viguera et al., 2001). La protéine FEN1 (flap endonucléase 1), qui normalement élimine la partie 5' libre des fragments d'okazaki déplacés par la polymérase pendant la synthèse d'ADN avant l'intervention de la ligase, est inactive sur les doubles brins, donc sur les structures secondaires formées au niveau des SFRs (Henricksen et al., 2000). En accord avec un rôle de FEN1 (Liu and Bambara, 2003), il a été montré que l'absence de Rad27 (scFEN1) augmente l'expansion des répétitions di- et tri-nucléotides (Schweitzer and Livingston, 1998; White et al., 1999). Chez les mammifères, la réparation

préférentielle de ces structures par " end joining " induirait l'acquisition de copies supplémentaires.

Il faut noter cependant que les répétitions de trinuécléotides ne conduisent pas toutes à former des SFRs. Le mécanisme qui conduit à la fragilité d'une sous-classe particulière de ces séquences est peu compris. Il a été proposé que les cassures pourraient dépendre de la capacité de ces séquences à perturber la structure chromatinienne. Des études *in vitro* ont montré que les nucléosomes pouvaient être exclus, ou leur incorporation limitée, au niveau des répétitions du trinuécléotide CCG et de la séquence minisatellite de FRA16B (en présence de distamycine-A). Ce phénomène, qui pourrait être accentué par la méthylation des CCG, perturberait l'organisation et la compaction de la chromatine au niveau des SFRs (Hsu and Wang, 2002; Wang et al., 1996; Wang and Griffith, 1996), conduisant à l'apparition de régions faiblement colorées (gaps) ou de cassures sur les chromosomes en métaphase (Hsu and Wang, 2002).

### 3) Les sites fragiles communs

Contrairement aux SFRs, les sites fragiles communs (SFC) sont présents sur les chromosomes de tous les individus d'une espèce et seraient des éléments structuraux normaux des chromosomes. Bien que présents chez tous les individus, leur fréquence d'activation varie entre différentes populations, d'une personne à l'autre au sein d'une même population et d'un tissu à l'autre pour un même sujet (Austin et al., 1992; Caporossi et al., 1995; Craig-Holmes et al., 1987; Furuya et al., 1989; Hecht et al., 1987; Morgan et al., 1988; Murano et al., 1989; Tedeschi et al., 1992). Décrits initialement chez l'homme, des SFCs ont été trouvés dans toutes les espèces de mammifères dans lesquelles ils ont été recherchés : les rongeurs (Djalali et al., 1987; Elder and Robinson, 1989; Greenbaum et al., 1994; Robinson and Elder, 1987), le chien (Stone et al., 1991a; Stone et al., 1991b), le chat (Ronne, 1995; Stone et al., 1993b), le cochon (Riggs et al., 1993; Yang and Long, 1993), le buffle (Pires et al., 1998), le cheval (Ronne, 1992), les primates non humains (Ruiz-Herrera et al., 2004; Ruiz-Herrera et al., 2002; Schmid et al., 1985; Smeets and van de Klundert, 1990).

Dans l'espèce humaine, plus de 86 SFCs ont été répertoriés, mais leur nombre exact est une question d'interprétation. En effet, plus le stress auquel les cellules sont soumises est violent, plus le nombre de cassures et de sites détectables est élevé. Les SFCs sont, comme les SFRs, classés en fonction des agents qui les induisent : les sites sensibles à l'AP (SFA), un inhibiteur spécifique des ADN polymérases  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (Ikegami et al., 1978), de loin les plus nombreux (76) (Arlt et al., 2003; Sutherland et al., 1998), les sites sensibles à la 5-azacytidine,

un inhibiteur de l'ADN méthyl-transférase (au nombre de 4) et ceux induits par un traitement court au BrdU (au nombre de 7) (Hecht et al., 1988; Sutherland et al., 1985). Des facteurs du régime alimentaire, par exemple la caféine et l'éthanol (Kuwano and Kajii, 1987; Yunis et al., 1987), des facteurs environnementaux, comme la fumée de cigarette ou l'amiante (Ban et al., 1995; Chen et al., 1989; Kao-Shan et al., 1987; Nelson et al., 1998) peuvent faciliter l'activation des SFAs ou induire d'autres types de SFCs. Enfin, il a été montré dans mon laboratoire que des facteurs physiologiques comme l'hypoxie, un paramètre important du microenvironnement de certaines tumeurs, est également un inducteur potentiel de SFCs (dont certains semblent induits spécifiquement par ce stress) (Coquelle et al., 1998). Seuls les SFAs ayant été étudiés au niveau moléculaire, la suite de cette revue leur sera spécifiquement consacrée.

#### a) Les caractéristiques des SFAs

Du point de vue des fréquences d'activation, une vingtaine de SFAs rendent compte de presque 80% des cassures totales détectées (Glover et al., 1984). Dans les lymphocytes, c'est FRA3B, localisé en 3p14.2, qui est le plus fréquent, puis viennent dans l'ordre FRA16D (16q23), FRA6E (6q26), FRA7H (7q32.3) et FRAXB (Xp22.3) (Figure 3 et pour revue (Richards, 2001)).

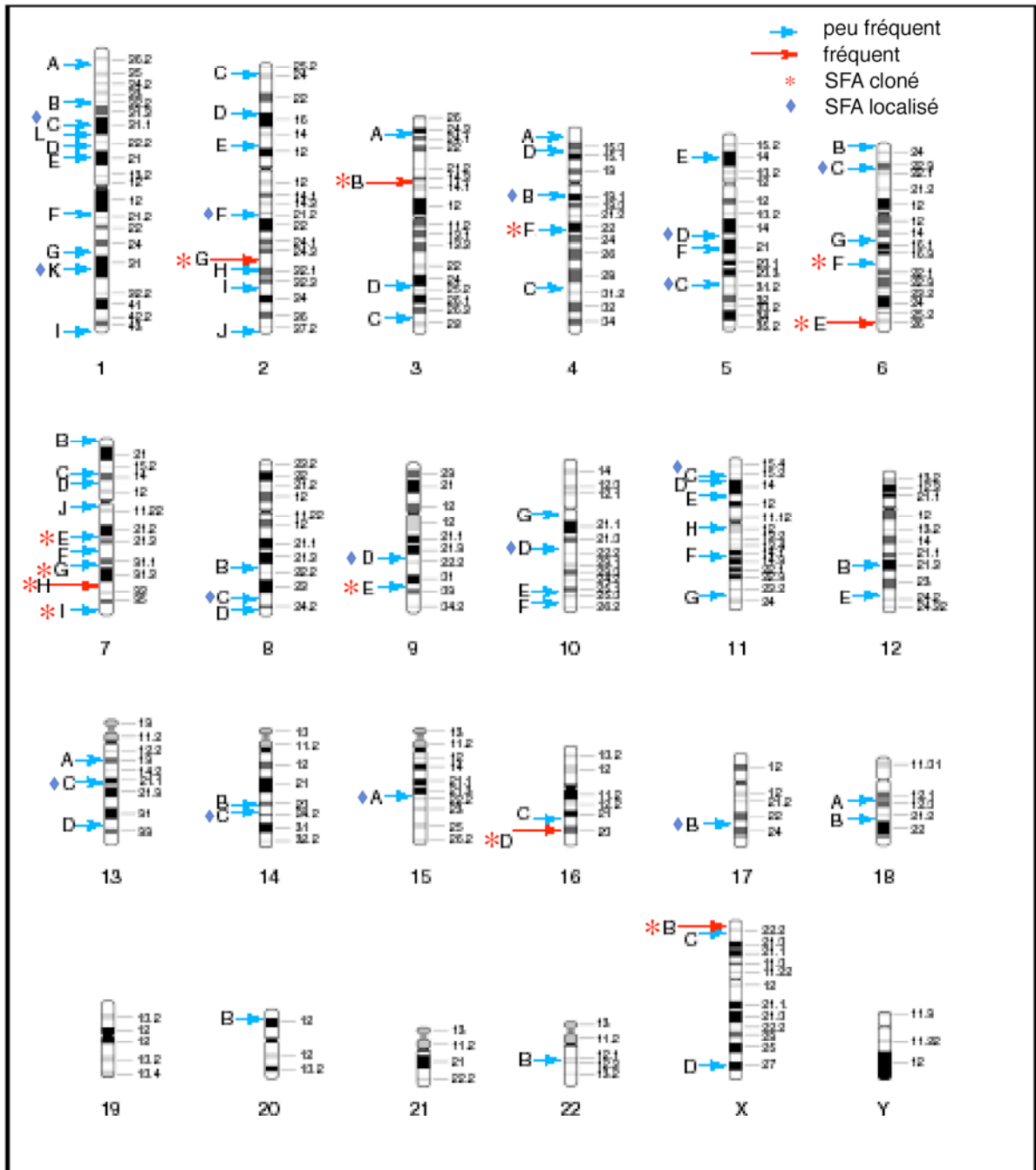
Les SFAs possèdent des caractéristiques d'ADN instable et hautement recombinogène. En effet, ce sont des sites préférentiels d'échanges entre chromatides sœurs (Glover and Stein, 1987; Hirsch, 1991), de réarrangements chromosomiques (Glover and Stein, 1988; Wang et al., 1997), d'intégrations de plasmides (Matzner et al., 2003; Rassool et al., 1991) et d'ADN viral (Ferber et al., 2003; Luo et al., 2004a; Mishmar et al., 1998; Popescu et al., 1990; Ragin et al., 2004; Smith et al., 1992b; Thorland et al., 2003; Wilke et al., 1996). Certaines de ces propriétés des SFAs ont été utilisées pour les cloner (voir § suivant).

Leur localisation par rapport à celle de points de cassures impliqués dans la formation de délétions et de translocations dans les cancers a conduit, dans les années 1980, à émettre l'hypothèse qu'ils contribuent activement à la progression tumorale (Yunis and Soreng, 1984) (voir §I-5, p27-34). C'est pour mieux caractériser ces sites que leur clonage a été entrepris.

#### b) Le clonage des SFAs

##### **b-1 Exemple de FRA3B**

FRA3B, le plus exprimé des SFAs humains, est localisé en 3p14.2 où se situe également un point de translocation t(3;8) retrouvé dans une famille avec des cancers rénaux



*Figure 3: Carte des SFAs humains. Les flèches indiquent la fréquence des sites: rouge, les plus fréquents, bleues les moins fréquents. Les \* indiquent les sites clonés à ce jour, les ◆ les sites localisés au niveau moléculaire (par au moins 1 BAC). Adapté de (Richards, 2001).*

héréditaires (hRCC) (Cohen et al., 1979). FRA3B a été cloné le premier, de façon concomitante, par différentes équipes (Tableau 4) (Boldog et al., 1994; Paradee et al., 1996; Rassool et al., 1996; Wilke et al., 1994; Wilke et al., 1996). Certaines équipes l'ont cloné par une approche positionnelle, combinée avec de l'hybridation in situ fluorescente (FISH) en utilisant comme sondes des YACs du chromosome 3 (Boldog et al., 1994; Wilke et al., 1994).

Une autre équipe a tiré parti de la propriété des SFAs de constituer des sites préférentiels d'intégration de plasmides (Rassool et al., 1991). L'ADN de cellules ayant intégré un plasmide au niveau de FRA3B a été digéré, re-circularisé, et la population de molécules ainsi obtenue a été utilisée pour transférer des bactéries. Le plasmide ainsi reclone porte les séquences génomiques flanquant le site d'intégration, qui ont pu être déterminées par séquençage (technique de récupération de plasmide) (Rassool et al., 1996; Rassool et al., 1991). Le gène *FHIT* (fragile histidine triad) qui s'étend sur plus d'une mégabase au niveau de FRA3B, pour un transcrit d'environ 1 kb, a été cloné à partir de cancers gastriques et de cancers du poumon et sa caractérisation a contribué au clonage de la région (Ohta et al., 1996; Sozzi et al., 1996). L'analyse de la séquence de la région dans des carcinomes du col de l'utérus a également révélé que FRA3B contient au moins 2 sites d'intégration du virus HPV16 (Becker et al., 2002; Wilke et al., 1996). L'étude de 2002 identifiant le deuxième site d'intégration virale (loin de la région la plus active du site fragile) a permis de caractériser complètement FRA3B, qui s'étend sur 4 Mb et contient 4 gènes en plus de *FHIT* (Tableau 4) (Becker et al., 2002). L'homologue murin de *FHIT* a également été cloné et est contenu dans un SFA, *Fra14A2'* (Glover et al., 1998b), la région étant très conservée dans les deux génomes (Matsuyama et al., 2003; Shiraishi et al., 2001).

### **b-2 Les autres sites clonés**

Par la suite, FRA7H a été cloné par récupération de plasmide (Mishmar et al., 1998), FRA7G (Huang et al., 1998a; Huang et al., 1998b), FRA16D (Krummel et al., 2000; Mangelsdorf et al., 2000; Ried et al., 2000) et FRAXB (Arlt et al., 2002) par clonage positionnel, FRA6C, FRA17B et récemment FRA8C et FRA13C (clonage partiel) par la technique de caractérisation des sites préférentiels d'intégration virale (HPV16 et HPV18) dans des lignées de cancers du col de l'utérus (Ferber et al., 2003; Thorland et al., 2003; Thorland et al., 2000). Depuis la fin du séquençage du génome humain, la disponibilité de BACs ordonnés couvrant tous les chromosomes a grandement facilité la mise en œuvre de la technique du clonage positionnel et a permis de cloner 7 nouveaux sites depuis 2002 (FRA2G, FRA4F, FRA6E, FRA6F, FRA7E, FRA7I et FRA9E) (Tableau 4 et Figure 3).

---

<sup>1</sup> Chez la souris, la nomenclature des sites fragiles indique leur localisation, par exemple ici au niveau du chromosome 14 dans la bande A2 (*Fra14A2*). Chez l'homme, la nomenclature indique seulement le numéro du chromosome et une lettre (ajoutée par ordre alphabétique en fonction du moment de caractérisation du site) (Berger et al., 1985).



Comme *Fra14A2*, un autre site murin *Fra8E1* (contenant le gène *Wox1*) a été cloné grâce à l'homologie de séquence avec son orthologue humain FRA16D/*WWOX* (Krummel et al., 2002).

Tableau 4: Sites Fragiles sensibles à l'AP clonés chez l'homme et la souris.

Site Fragile	Localisation	Taille	Gènes	Références
FRA2G	2q31	~ 1 Mb	> 7	(Limongi et al., 2003)
FRA3B	3p14.2	~4 Mb	<i>FHIT</i> , <i>PTPRG</i> , <i>HT021</i> , <i>CADPS</i> , <i>SCA7</i>	(Becker et al., 2002; Boldog et al., 1997; Boldog et al., 1994; Inoue et al., 1997; Rassool et al., 1996; Wilke et al., 1994; Zimonjic et al., 1997)
FRA4F	4q22	~ 7 Mb	<i>GRID2</i> + 10 gènes	(Rozier et al., 2004)
FRA6E	6q26	3,6 Mb	<i>Parkin (PARK2)</i> + 7 gènes	(Cesari et al., 2003; Denison et al., 2003a)
FRA6F	6q21	~ 1,2 Mb	> 19	(Morelli et al., 2002)
FRA7E	7p21.11	~ 4,5 Mb	NA	(Zlotorynski et al., 2003)
FRA7G	7q31.2	~4,7 Mb	<i>CAVI</i> , <i>CAV2</i> , <i>Testin</i>	(Hellman et al., 2002; Huang et al., 1998a; Huang et al., 1998b; Zenklusen et al., 2000)
FRA7H	7q32.2	161 kb*	??	(Mishmar et al., 1998)
FRA7I	7q35	~2 Mb	<i>TPK1</i> , <i>CNTNAP2</i>	(Ciullo et al., 2002)
FRA9E	9q32	~ 9,8 Mb	<i>PAPPA</i>	(Callahan et al., 2003)
FRA16D	16q23.2	> 1 Mb	<i>WWOX (FOR)</i>	(Krummel et al., 2000; Mangelsdorf et al., 2000; Ried et al., 2000)
FRAXB	Xp22.3	~ 500 kb	<i>GSI</i> , <i>STS</i>	(Arlt et al., 2002)
<i>Fra14A2</i>	14A2	~1 Mb	<i>fhit</i>	(Matsuyama et al., 2003; Shiraishi et al., 2001)
<i>Fra6C1</i>	6C1	~ 9 Mb	<i>grid2</i> + 10 gènes	(Rozier et al., 2004)
<i>Fra8E1</i>	8E1	~1 Mb	<i>Wox1</i>	(Krummel et al., 2002)

les sites humains sont sur fond blanc; les sites murins sur fond jaune pâle; ND non déterminé

### c) Les caractéristiques moléculaires des SFAs

Le clonage de 15 SFAs (Tableau 4) a permis de montrer que ces régions fragiles, à la différence des SFRs, s'étendent sur plusieurs centaines, voire plusieurs milliers, de kilobases (10 mégabases pour FRA9E) (Callahan et al., 2003), et que les cassures surviennent au niveau de quelques sous-régions préférentielles (point chaud) dispersées dans ces larges zones. Leur séquence est globalement riche en AT, mais ne contient pas de motifs particuliers qui

pourraient expliquer la fragilité (Arlt et al., 2003; Richards, 2001; Sutherland et al., 1998). Il est probable que d'autres facteurs que la séquence *per se* soient importants dans la fragilité car la délétion de différentes séquences à l'intérieur de FRA3B n'altère pas le taux global de cassure au site (Corbin et al., 2002). L'analyse de la variation de torsion de l'angle de l'hélice d'ADN (paramètre appelé flexibilité) au locus de FRA7H a révélé des régions de quelques centaines de nucléotides présentant une forte déviation pour ce paramètre (pics de flexibilité) (Mishmar et al., 1998). Depuis, un enrichissement en pics de flexibilité a été trouvé au niveau de FRA3B, FRA16D, FRAXB, FRA6F, FRA7I et FRA4F (Ciullo et al., 2002; Mimori et al., 1999; Mishmar et al., 1998; Morelli et al., 2002; Ried et al., 2000; Rozier et al., 2004). Ces pics, bien que présents tout au long du génome, semblent plus fréquents et plus groupés dans les zones fragiles (Zlotorynski et al., 2003). Il faut en outre noter qu'un des paramètres du calcul de flexibilité dépend de la richesse en AT de la séquence (Sarai et al., 1989). La signification biologique de ces observations reste à démontrer.

#### 4) Mécanismes d'instabilité des SFAs

La nature des traitements qui induisent les sites fragiles, c'est-à-dire des drogues qui perturbent la progression des fourches de réplication, a suggéré que l'instabilité de ces locus est associée avec des perturbations de la synthèse de l'ADN (Glover, 1998a; Glover et al., 1984). En 1987, Laird et collaborateurs ont émis l'hypothèse que les sites fragiles (les rares comme les communs) correspondent à des régions chromosomiques répliquées tardivement en phase S et que leur fragilité peut être augmentée par les traitements qui raccourcissent le temps séparant la fin de la réplication des chromosomes de leur compaction (Laird et al., 1987b). Quelques études ont été menées pour tester cette hypothèse et étudier le "timing" de réplication des SFCs. Lebeau et al. ont montré par FISH interphasique que le locus FRA3B répliquait tardivement en phase S et que l'AP retardait cette réplication suggérant que certaines cellules rentreraient en phase G2 sans avoir complété la réplication des séquences FRA3B (Le Beau et al., 1998a). Wang et al. ont montré, dans une lignée cellulaire permettant de différencier les 2 chromosomes 3, que les 2 allèles de FRA3B répliquent de façon asynchrone, les cassures étant plus fréquemment observées sur l'allèle qui réplique le plus tardivement (Wang et al., 1999). L'étude de FRA7H a montré que la réplication de ce site a lieu pendant le premier tiers de la phase S, mais une analyse plus approfondie a suggéré la présence de sous-régions présentant des temps de réplication différents (phénomènes amplifiés par l'ajout d'AP), certaines répliquant tardivement (Hellman et al., 2000). De même, au niveau de FRA7G, une perturbation intrinsèque de la réplication de la région (alternance de

régions de réplication précoce et tardive) a été observée ainsi qu'une organisation complexe de la chromatine (Hellman et al., 2002). Enfin, il semble que FRA16D réplique de façon synchrone en fin de S et jusqu'en G2 (Palakodeti et al., 2004). Ces études suggèrent que les SFAs contiennent des régions de réplication tardive ou des sites de pause pour les fourches, sensibles aux retards de réplication engendrés par l'inhibition partielle des polymérases.

Il a été également proposé que les mécanismes de réparation de l'ADN soient impliqués dans la fragilité. En effet, la caféine, un inhibiteur des kinases ATM et ATR (Dimitrova and Gilbert, 2000; Schlegel and Pardee, 1986), ainsi que la 2-aminopurine (dont le mécanisme d'action est semblable à celui de la caféine), augmentent sensiblement l'expression des SFAs (Casper et al., 2002; Glover et al., 1984; Yunis and Soreng, 1984). ATM et ATR fonctionnent en parallèle dans le point de contrôle de S, le premier répondant à la présence de cassures double brin (DSB), le deuxième à la présence de fourches de réplication arrêtées (Sancar et al., 2004). ATR joue en effet un rôle important dans la stabilisation des fourches arrêtées et donc dans la prévention de la formation de cassures qui peuvent survenir après une pause de la fourche de réplication (Brown and Baltimore, 2003). De plus, ATR est nécessaire à la réponse aux traitements par l'AP, l'hydroxyurée (Nghiem et al., 2001) et à l'hypoxie (Hammond et al., 2002). Il a été démontré clairement par différents moyens (délétion conditionnelle (les KO ATR ne sont pas viables), ARN interférence, mutant dominant négatif) que l'inactivation d'ATR mais pas celle d'ATM conduit à des cassures aux SFAs en présence ou non d'AP (Arlt et al., 2003; Casper et al., 2002). Les patients souffrant du syndrome de seckel [OMIM # 210600], ont une mutation dans le gène ATR qui conduit à un épissage alternatif et une faible expression de la protéine. Les cellules de ces patients présentent une grande instabilité chromosomique (particulièrement aux SFAs) après traitement à l'AP (Casper et al., 2004) confirmant le rôle d'ATR dans la fragilité. Le rôle d'autres protéines impliquées dans la réponse aux cassures de l'ADN, comme BLM (hélicase du syndrome de Bloom) et certains intervenants de la voie de réparation NHEJ a également été évalué, mais aucune corrélation n'a pu être établie avec les fréquences de cassures aux SFAs (Arlt et al., 2003).

En réponse au blocage de la réplication, BRCA1 est phosphorylée par ATR (Tibbetts et al., 2000). Son inactivation par mutation, par interférence ARN ou par invalidation du gène chez la souris augmente le niveau de gaps et de cassures détectés aux SFAs. La réintroduction de la protéine BRCA1 dans les cellules mutées complémente cet effet (Arlt et al., 2004; Turner et al., 2002). La voie de signalisation FA (Fanconi anemia, 11 gènes différents) est activée par traitement par les stress réplcatifs et ATR est nécessaire à son activation. Howlett

et collègues viennent de démontrer l'existence d'une forte instabilité chromosomique, particulièrement au niveau des SFAs, dans des cellules de patients FA ou dans des cellules inactivées pour FANCD2 (par ARN interférence ou oligonucléotide antisens) (Howlett et al., 2005).

Enfin, SMC1 (structural maintenance chromosome 1), appartenant au complexe des cohésines, est impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN (via ATM) (Kim et al., 2002; Yazdi et al., 2002), dans la réparation des DSB post-répliquatives (levure) (Sjogren and Nasmyth, 2001) et dans la prévention de l'effondrement (collapse) des fourches de réplication arrêtées par un mécanisme dépendant d'ATR (phosphorylation de SMC1) (Musio et al., 2005). L'inhibition de SMC1 par ARN interférence (et dans une moindre mesure de SMC3) est suffisante pour induire des cassures aux SFAs et cet effet est renforcé par le traitement des cellules à l'AP (Musio et al., 2005).

#### 5) Rôle des SFCs dans la progression tumorale

L'instabilité génomique est une des propriétés des cellules cancéreuses. Une grande variété de réarrangements chromosomiques a pu être observée dans ces cellules (Mitelman, 1994), leur permettant d'acquérir de nouvelles fonctions et d'échapper à la régulation de la prolifération cellulaire. Dès les années 1980, Yunis et al. ont proposé un rôle des SFCs dans la progression tumorale (Yunis and Soreng, 1984). Jusque récemment, cette association était basée principalement sur la corrélation statistique de la distribution cytogénétique des réarrangements dans les tumeurs et la localisation des sites fragiles (résolution à la bande près) (Hecht and Glover, 1984; Yunis and Soreng, 1984), ainsi que sur le fait que de nombreuses substances carcinogènes sont capables d'induire des cassures au niveau des SFCs (Yunis et al., 1987). Plus récemment, il a été montré dans notre laboratoire que l'hypoxie, un stress observé fréquemment *in vivo* au cours du développement tumoral (Bindra and Glazer, 2005; Hammond and Giaccia, 2004) est capable d'induire les SFCs (Coquelle et al., 1998). Le clonage des SFAs a permis par la suite de montrer au niveau moléculaire que certains sites sont impliqués dans une partie des réarrangements (délétion, translocation) ou des amplifications fréquemment observés dans les tumeurs.

##### a) Délétions et translocations associées aux SFAs

Le clonage de FRA3B en 3p14.2 a permis de démontrer pour la première fois, le rôle d'un SFC dans une translocation, ici la translocation récurrente réciproque t(3;8)(p14.2;q24) décrite, presque 20 ans auparavant, dans une forme familiale de cancer rénal (hRCC

hereditary renal cell carcinoma) (Cohen et al., 1979; Ohta et al., 1996; Paradee et al., 1996). Cette translocation aboutit à la délétion de l'exon 5 du gène *FHIT* contenu dans FRA3B (Ohta et al., 1996). Trois autres translocations impliquant FRA3B ont été observées dans une lignée de cancer du sein, dans un adénome des glandes salivaires et dans des cancers de l'œsophage (Fang et al., 2001; Geurts et al., 1997; Popovici et al., 2002). De nombreuses études ont rapporté que *FHIT* est fréquemment réarrangé, partiellement délété ou anormalement transcrit dans des types de cancers variés incluant, poumon, rein, pancréas, ovaire, sein, œsophage, col de l'utérus, estomac, prostate (pour revue (Huebner et al., 1998a; Ishii et al., 2003a; Pekarsky et al., 2002)). L'instabilité de FRA3B est aussi illustrée par la présence de délétions multiples et variables à ce locus dans les lignées tumorales (Corbin et al., 2002). L'hypothèse a été émise que *FHIT* soit un gène suppresseur de tumeur (TSG) et la cible de ces réarrangements. Après quelques controverses (Boldog et al., 1997; Le Beau et al., 1998b; Michael and Rajewsky, 2001), les résultats d'expériences récentes semblent confirmer cette hypothèse (Huebner and Croce, 2001). En effet, la réexpression du gène *FHIT* dans des cellules cancéreuses *FHIT*<sup>-/-</sup> inhibe le développement de tumeurs *in vivo* sur souris nude et la croissance des cellules *in vitro* possiblement grâce à un effet pro-apoptotique de *fhit* (Dumon et al., 2001; Ishii et al., 2001; Siprashvili et al., 1997). De plus, l'homologue murin du gène *FHIT*, situé au niveau de *Fra14A2*, code une protéine très semblable à la protéine humaine (90% d'identité) (Glover et al., 1998b; Pekarsky et al., 1998). Des transcrits aberrants du gène ont également été trouvés dans les cellules tumorales de souris mais pas dans les cellules normales (Pekarsky et al., 1998) et les souris *fhit*<sup>-/-</sup> ont une susceptibilité accrue au développement de tumeurs spontanées et induites ((Fong et al., 2000; Zanesi et al., 2001a), pour revue (Huebner and Croce, 2001)).

De la même façon, de grandes délétions (typiquement monoalléliques, mais parfois aussi bialléliques) ont été fréquemment observées au niveau du site FRA16D dans le gène *WWOX* (WW domain containing Oxidoreductase aussi appelé FOR, Fragile site FRA16D oxidoreductase) dans une variété de tumeurs (estomac, colon, poumon, ovaire, prostate, sein, foie, œsophage) (Bednarek et al., 2000; Krummel et al., 2000; Kuroki et al., 2002; Mangelsdorf et al., 2000; Paige et al., 2001; Ried et al., 2000; Yacicier et al., 2001). *WWOX* s'étend sur plus d'une mégabase, pour un transcrit d'environ 2 kb et des transcrits alternatifs du gène (au moins 4) ont été observés (pour revue (Ludes-Meyers et al., 2003)). Une faible expression du gène ou des transcrits tronqués ont été décrits dans des lignées cellulaires et dans des cancers gastriques, du sein, du poumon, de l'œsophage, du pancréas, du foie et hématopoïétiques (Aqeilan et al., 2004; Bednarek et al., 2001; Ishii et al., 2003b; Kuroki et

al., 2002; Kuroki et al., 2004; Park et al., 2004). De plus, la réexpression de *WWOX* dans des lignées cellulaires de cancers du sein inhibe leur tumorigénicité *in vivo* et leur capacité à croître en absence d'ancrage à un support solide (Bednarek et al., 2001), et dans des lignées de cancer du pancréas inhibe la formation de colonie (Kuroki et al., 2004). Ceci suggère que *WWOX* fonctionne également comme un TSG, peut-être aussi via un rôle dans l'apoptose (Chang et al., 2001). Enfin, 4 points de cassures de translocations t(14;16)(q32.3;q23) récurrentes dans les myélomes multiples ont été clonés dans FRA16D (dans les introns du gène *WWOX*) (Chesi et al., 1998; Krummel et al., 2000). Ces translocations rapprochent l'enhancer des IgH (14q32.3) de l'oncogène *c-MAF* (juste télomérique à FRA16D) conduisant à la dérégulation de son expression (Chesi et al., 1998).

Maintenant, la plupart des SFAs clonés ont été associés à des réarrangements chromosomiques spécifiques dans des cancers variés, des régions de fréquentes perte d'hétérozygotie (LOH) ou perte d'expression (LOE): FRA6F (leucémies, cancers gastriques, de l'ovaire, de la prostate) (Morelli et al., 2002), FRA9E (cancer de l'ovaire) (Callahan et al., 2003), FRA6E (cancer du sein, de l'ovaire, du foie, du poumon) (Cesari et al., 2003; Denison et al., 2003b; Picchio et al., 2004; Wang et al., 2004a), FRA7G (cancers du sein, de la prostate, de l'ovaire) (Huang et al., 1998b; Huang et al., 1999; Sagara et al., 2004). La présence de TSG a été proposée pour certains de ces sites: *PARKIN* dans FRA6E (Cesari et al., 2003), *TESTIN*, *Cav-1*, *Cav-2* dans FRA7G (Capozza et al., 2003; Engelman et al., 1998; Tatarelli et al., 2000).

Le développement du cancer du col de l'utérus est fortement associé à l'infection par les papillomavirus humain (HPV), une famille de virus divisée en 2 catégories selon qu'ils sont "à faible risque" (associé à des lésions bénignes), ou "à fort risque" (associé à des carcinomes agressifs) comme HPV16 et HPV18. Leur intégration dans le génome des cellules entraîne le remaniement du génome viral et l'activation des oncoprotéines virales E6 et E7 (des antagonistes de p53 et pRB), favorisant la malignité. L'analyse des locus d'intégration d'HPV16 et d'HPV18 dans les carcinomes du col de l'utérus a démontré que leur intégration ne se faisait pas au hasard et que dans plus de la moitié des cas, ces virus sont intégrés au niveau de SFAs, par exemple FRA3B, FRA6C, FRA13C, FRA17B pour HPV16 (Thorland et al., 2003; Thorland et al., 2000; Wilke et al., 1996) et FRA1K, FRA8C, FRA14C pour HPV18 (Ferber et al., 2004; Ferber et al., 2003), leur intégration entraînant en outre l'interruption de nombreux gènes cellulaires impliqués dans le développement tumoral (Ferber et al., 2003; Thorland et al., 2003).

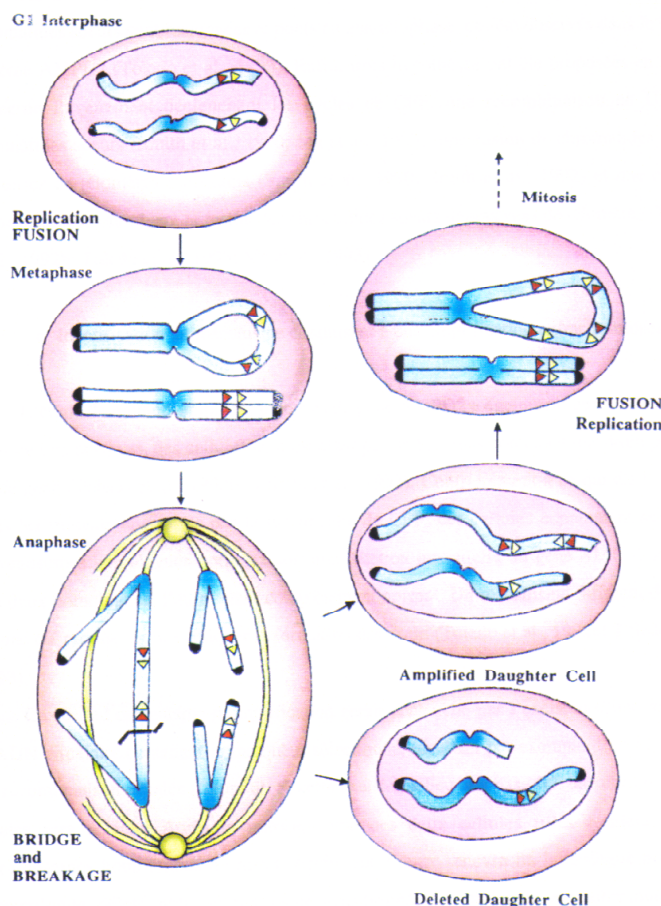
## b) Amplification génique et SFCs

### **b-1** Rappels sur les mécanismes d'amplifications

L'amplification génique, qui correspond à une augmentation du nombre de copies de certains gènes entraînant leur surexpression, est fréquemment observée dans les cellules cancéreuses (pour revue (Schwab, 1999)). Les régions amplifiées (amplicons) contiennent en général un ou plusieurs oncogène(s) et des séquences d'ADN flanquantes. Ces amplicons sont localisés au niveau de 2 types de structures : les expansions intrachromosomiques (HSR homogeneously stained region) (Biedler and Spengler, 1976; Cowell, 1982) et les molécules extrachromosomiques circulaires (fragments acentriques, répliquant de façon autonome) appelées, en fonction de leur taille, double-minutes (dmins) (Cowell, 1982; Cox et al., 1965; Spriggs et al., 1962) ou épisomes (Carroll et al., 1987; Maurer et al., 1987). Dans les cellules cancéreuses, les amplicons présentent souvent une organisation complexe, liée à la survenue de réarrangements secondaires qui rendent difficile l'étude et la compréhension des mécanismes précoces d'amplification (Knudson, 2000). Pour contourner cette difficulté, des systèmes modèles *in vitro* ont été développés dans plusieurs laboratoires, dont le nôtre. Ils sont basés sur la sélection de mutants résistants à une drogue par amplification du gène codant la protéine cible de l'agent sélectif. Les agents les plus utilisés pour étudier ces mécanismes initiaux ont été le méthotrexate (MTX), la cofomycine, et le PALA (N-phosphonacéthyl L-aspartate), sélectionnant respectivement l'amplification des gènes dihydrofolate réductase (*dhfr*) (Ma et al., 1993; Trask and Hamlin, 1989; Windle et al., 1991), adénylate désaminase 2 (*ampd2*) (Toledo et al., 1993; Toledo et al., 1992b; Toledo et al., 1992a) et *CAD* (carbamyl aspartate synthétase, aspartate transcarbamylase, dihydroorotase) (Smith et al., 1990; Smith et al., 1992a). Un autre système est basé sur l'amplification du gène *mdr1* (multidrug resistance1), sélectionnable par des drogues variées comme l'actinomycine D (AMD), l'adriamycine (ADR), la vinblastine (VB) ou la colchicine (Coquelle et al., 1997; Coquelle et al., 1998; Roninson, 1992). Ces systèmes ont été développés dans des cellules de hamster chinois ou syrien permissives pour l'amplification, ce qui n'est pas le cas des cellules "normales".

### **b-2** Apport des systèmes modèles

Ces systèmes modèles ont permis d'élucider certains mécanismes d'amplification génique et de montrer que la formation des expansions intra et extrachromosomiques résulte de mécanismes différents.



*Figure 4: Mécanismes des cycles de cassures-fusion-pont (CFP) chromatidiens dans la formation d'amplification intrachromosomique.*

1) 1 cassure chromatidienne survient en G1, en position télomérique par rapport au gène sous sélection. Le fragment télomérique est perdu. 2) Après la réplication, les 2 extrémités cassées des chromatides sœurs sont hautement recombino-gènes et ont une probabilité élevée de fusionner. 3) Au moment de la séparation des chromosomes en mitose, le pont anaphasique est résolu par une autre cassure. 4) La ségrégation des copies est aléatoire et inégale. En présence de sélection, seule la cellule ayant récupéré les copies amplifiées survit. 5) Le cycle de CFP est entretenu par la cassure engendrée lors de la résolution du pont. D'après (Pipiras et al., 1998)

Dans les années 1950, Barbara McClintock en étudiant les délétions chez le maïs a décrit pour la première fois le mécanisme des cycles de cassures-fusion-pont (CFP) chromatidiens (Figure 4) (McClintock, 1951). Dans ce modèle, une cassure chromatidienne survient en G1, en position télomérique par rapport au gène sous sélection, conduisant le plus fréquemment à la perte du fragment télomérique. Après la réplication, les deux extrémités cassées des chromatides sœurs sont hautement recombino-gènes et ont une probabilité élevée de fusionner. Au moment de la séparation des chromosomes en mitose, le pont entre les chromatides sœurs est résolu par une autre cassure. La localisation de cette dernière peut entraîner une ségrégation inégale des copies dans les cellules filles. En présence d'une pression de sélection, les cellules ayant acquis des copies supplémentaires du gène sous sélection auront un avantage sélectif et envahiront la population. La cassure engendrée lors de la résolution du pont entretient le cycle de CFP (Figure 4). Ce modèle a pu être vérifié grâce à l'analyse en FISH double-couleur des mutants amplifiés aux stades précoces du phénomène. En effet, les intermédiaires prédits par le modèle des cycles CFP (chromatides soeurs fusionnées, chromosomes dicentriques) ont été observés (Coquelle et al., 1997; Ma et al., 1993; Toledo et al., 1993; Toledo et al., 1992b). De plus, les unités amplifiées ne sont



localisées que sur un des 2 chromosomes portant le gène dans les cellules normales (l'homologue étant normal) (Smith et al., 1990; Toledo et al., 1992a; Trask and Hamlin, 1989) et sont organisées en orientation inverse avec des plans de symétrie successifs (Ma et al., 1993; Toledo et al., 1992b) (Figure 4). La partie distale du chromosome portant l'amplification est toujours remaniée. Dans les amplicons précoces, la taille des unités amplifiées est identique.

Plusieurs mécanismes pourraient initier les cycles de CFP : une fusion des chromatides sœurs survenant au niveau de télomères raccourcis (Smith et al., 1990; Smith et al., 1992a), un échange inégal entre les chromatides sœurs (Ma et al., 1993; Smith et al., 1990) ou une cassure chromatidienne conduisant à la fusion des chromatides sœurs (Coquelle et al., 1997; Ma et al., 1993; Toledo et al., 1993; Toledo et al., 1992b). Dans le laboratoire, il a été démontré que les cycles de CFP peuvent être initiés par des cassures au niveau des SFCs et que leur position relative par rapport au gène sous sélection détermine la taille et la séquence des amplicons précoces (Coquelle et al., 1997). De plus, un traitement à l'hypoxie (capable également d'induire des cassures aux SFCs) (Coquelle et al., 1998) ou une cassure unique double brin (générée par l'enzyme I-Sce1, voir les résultats de l'article 1 pour la description du système) (Pipiras et al., 1998) peut initier les amplifications intrachromosomiques. Ceci n'exclut pas que d'autres mécanismes puissent aussi déclencher le processus intrachromosomique.

Le(s) mécanisme(s) à l'origine de l'amplification extrachromosomique est (sont) plus controversé(s). Dans les systèmes modèles utilisés (cellules de hamster), l'amplification intrachromosomique semble favorisée. Néanmoins, des clones contenant des dmns ont pu être obtenus. Dans la majorité de ces clones, la partie télomérique du chromosome portant le gène sous sélection n'est pas remaniée. Par contre, une délétion interstitielle correspondant à la séquence amplifiée est souvent présente sur l'un des homologues. Les dmns pourraient se former par excision d'une molécule d'ADN circulaire (looping-out LO, Figure 5) en phases G1 ou G2 (Coquelle et al., 1997; Coquelle et al., 1998; Toledo et al., 1993). Les dmns étant acentriques, ils ségrègent de façon aléatoire au cours de la mitose, permettant la survie en milieu sélectif des cellules ayant reçu des copies multiples de ces molécules. D'autres mécanismes plus complexes, impliquant d'abord la formation d'une HSR puis sa dégradation, pourraient également conduire à la formation des dmns ((Singer et al., 2000), article 1). Dans les cellules tumorales, l'amplification extrachromosomique est fréquente mais l'évolution des dmns est variable.

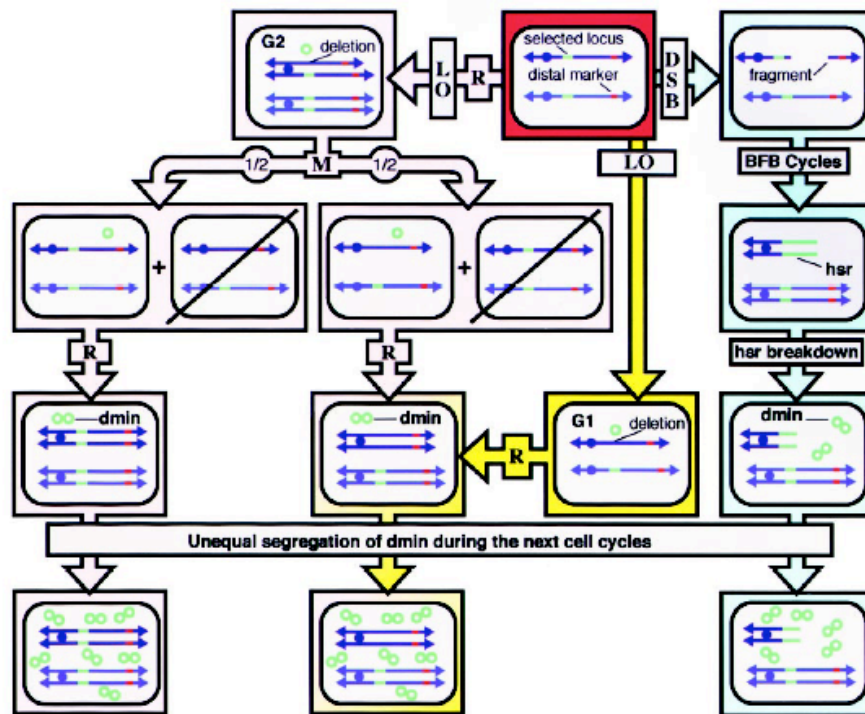


Figure 5: Les mécanismes de formation des dmin. D'après (Coquelle et al., 2002).

Selon les tumeurs et les lignées, on peut observer des dmins de petite taille et homogènes (Hahn et al., 1992; Pauletti et al., 1990) ou de gros dmins hétérogènes, très remaniés (fusionnés entre eux, et parfois réintégrés dans les chromosomes) (Schoenlein et al., 1992; VanDevanter and Yirdaw, 1993; Von Hoff et al., 1990; Wahl, 1989). Il semble que des facteurs amplifiés en cis avec le marqueur sous sélection soient importants pour cette évolution des dmins. Par exemple, il a été montré dans le laboratoire que si un SFC est présent dans les dmins et si l'agent sélectif utilisé active ce SFC, les dmins auront tendance à fusionner et deviendront rapidement très hétérogènes. En revanche, si la drogue utilisée n'active pas ce SFC, les dmins restent stables et de petites tailles (Coquelle et al., 1998). La réintégration des dmins fusionnés dans les chromosomes peut conduire à la formation d'HSR hétérogène ne provenant pas du mécanisme de CFP (Coquelle et al., 1998). Dans les systèmes modèles, les SFCs semblent donc impliqués dans les mécanismes d'amplification intrachromosomiques et dans l'évolution des dmins.

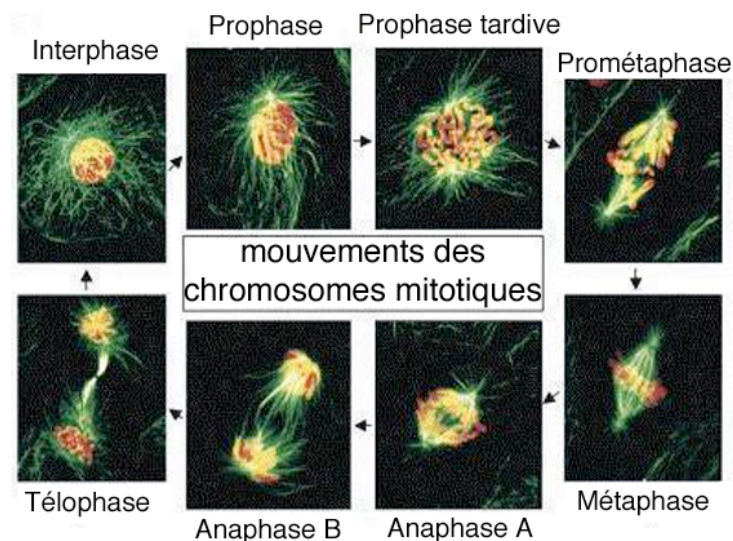
### **b-3 Analyse des amplifications dans les cellules tumorales**

Comme dans les systèmes modèles, les événements d'amplification semblent, dans certains cas au moins, résulter du mécanisme de CFP. Par exemple, l'accumulation de larges répétitions inversées a été observée dans les cellules tumorales (Ciullo et al., 2002; Gisselsson et al., 2000; Hellman et al., 2002; Lo et al., 2002; Pedoutour et al., 1994; Saunders et al., 2000; Shuster et al., 2000). *In vivo*, le déclenchement des cycles de CFP pourrait résulter de la perte, de l'érosion des télomères (Lo et al., 2002) ou de cassures non aléatoires (par exemple aux SFCs). Le locus 11q13 (contenant le gène de la cycline D1) est amplifié dans les cancers de la tête et du cou (HNSCC : head and neck squamous cell carcinoma), dans des cancers de l'appareil "aerodigestif" (entre autre OSCC : oral squamous cell carcinoma) et dans les cancers du sein (Shuster et al., 2000; Szepetowski et al., 1993). La région amplifiée est organisée en répétition inversée dans les cancers oraux et 2 sites fragiles FRA11A (centromérique) et FRA11F (télomérique) sont localisés dans cette région et pourraient être à l'origine de cette amplification (Perucca-Lostanlen et al., 1997; Shuster et al., 2000). De plus, Hellman et al. ont montré dans des lignées cellulaires de cancers gastriques que l'amplification intrachromosomique de l'oncogène *MET* (7q31) survenait par des cycles de CFP et que la borne centromérique de l'amplicon était située au niveau de FRA7G (Hellman et al., 2002). Dans l'article 2 (voir section résultat), nous montrons également qu'une cassure survenant au niveau d'un site fragile, FRA7I, a conduit à l'amplification intrachromosomique du gène *PIP1* dans une lignée de cancer du sein.

## II) Stress et perturbation de la mitose : le point de contrôle du fuseau mitotique

### 1) Généralités

La mitose, comme l'a appelée Flemming il y a plus de 100 ans (revue dans (Paweletz, 2001)) est classiquement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase (A et B) et télophase (Figure 6). En prophase, les chromosomes commencent à se condenser et l'enveloppe nucléaire se fragmente puis disparaît. En prométaphase, le fuseau mitotique se forme et les chromosomes condensés recherchent l'attachement aux microtubules<sup>2</sup> du fuseau.



*Figure 6: Schéma des différentes étapes de la mitose du point de vue des chromosomes. D'après (Cleveland et al., 2003).*

L'attachement d'un premier microtubule aux kinétochores<sup>3</sup> est stabilisé par l'attachement de microtubules supplémentaires. Les chromosomes ancrés commencent alors à se déplacer vers un des pôles, et des cycles de capture/désassemblage vont se produire jusqu'à l'attachement du kinétochore frère à des microtubules issus du pôle opposé. Lorsque l'attachement bipolaire des chromatides sœurs est réalisé, les chromosomes migrent vers la plaque métaphasique où ils s'alignent, c'est la métaphase. L'anaphase débute quand tous les chromosomes sont correctement alignés et reliés à chacun des pôles du fuseau. Elle se caractérise par la séparation des chromatides sœurs (anaphase A), l'éloignement des pôles consécutifs à l'allongement du fuseau et la migration de chaque chromatide sœur vers le pôle du fuseau

<sup>2</sup> microtubule: élément du cytosquelette de la cellule, composé de 13 protofilaments, formés chacun d'un assemblage d'hétérodimères d'  $\alpha$  et de  $\beta$ -tubuline qui sont ajoutés *in vivo* à l'extrémité "plus" des microtubules. L'hydrolyse du GTP lié à la  $\beta$ -tubuline permet la polymérisation de chaque nouveau dimère.

<sup>3</sup> Kinétochore: structure chromosomique par laquelle les chromosomes s'attachent au fuseau mitotique (§ II 3, pages 38-41)

auquel elle est reliée (anaphase B). En télophase, les chromosomes se décondensent et une enveloppe nucléaire se forme autour de chaque lot de chromosomes. Enfin, au cours de la cytokinèse, la cellule se divise en 2 cellules filles.

L'attachement bipolaire de tous les chromosomes au fuseau mitotique est capital pour assurer une ségrégation correcte des chromosomes en anaphase et la transmission de l'information génétique au cours des générations. Le point de contrôle du fuseau mitotique encore appelé point de contrôle de l'assemblage du fuseau surveille et coordonne le déroulement de ces processus en transmettant un signal d'attente émis par le(s) chromosome(s) non ou mal attaché(s), qui inhibe le déclenchement de l'anaphase.

Dans cette seconde partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux stress qui perturbent le bon déroulement de la mitose et activent ainsi le point de contrôle du fuseau mitotique, ainsi qu'aux conséquences de cette activation sur le devenir des cellules.

## 2) Découverte de l'existence du point de contrôle du fuseau mitotique

### a) quelques repères historiques

En 1956, grâce à des études cytologiques, Carlson chez la sauterelle, Bajer et Molè-Bajer chez les plantes ont suggéré que les chromosomes régulaient le cycle cellulaire (Bajer and Molè-Bajer, 1956; Carlson, 1956). En effet, ils ont observé que l'anaphase ne se déclenchait pas tant que les chromosomes ne sont pas alignés sur la plaque équatoriale.

De la même façon, grâce à l'analyse de cellules dont le fuseau avait été lésé par irradiation en mitose, Zirkle a montré en 1970 que l'intégrité du fuseau et l'accrochement du dernier chromosome sur la plaque métaphasique sont également impliqués dans la régulation du déclenchement de l'anaphase (Zirkle, 1970).

### b) données obtenues chez la levure

Il faut attendre les années 90, et les études génétiques réalisées chez *S. cerevisiae* par Hoyt et collaborateurs (Hoyt et al., 1991) et Li et Murray (Li and Murray, 1991) pour que les 6 premières protéines impliquées dans ce point de contrôle soient découvertes. Deux groupes de mutants ont été criblés sur la base de leur sensibilité à la dépolymérisation des microtubules du fuseau : les mutants bub (bub1-3) pour "budding uninhibited in benzimidazole" (une drogue qui inhibe l'assemblage du fuseau mitotique et bloque les cellules normales en mitose) (Hoyt et al., 1991) et les mutants mad (mad1-3) pour "mitotic arrest deficient " (Li and Murray, 1991). Dans tous les cas, les cellules mutantes poursuivent leur

cycle malgré la présence de benzimidazole, re-répliquent leur ADN et reforment un bourgeon avant de mourir. Dans les 2 groupes de mutants, cette progression dans le cycle est directement impliquée dans la sensibilité au benzimidazole, ce qui suggère que la létalité résulte d'un problème dans le mécanisme de surveillance de la mitose plutôt que d'un défaut structural des microtubules ou du fuseau.

D'autres études ont permis par la suite d'isoler les mutants *mps1* (monopolar spindle), d'abord identifiés pour leur incapacité à dupliquer leur centrosome ou SPB (spindle pole body chez la levure) en G1 (Winey and Byers, 1993). Weiss et Winey ont montré que ces mutants ne s'arrêtent pas en mitose après dépolymérisation du fuseau mitotique, à la différence des autres mutants connus de duplication du SPB (Weiss and Winey, 1996). La protéine Mps1 est une sérine-thréonine-tyrosine kinase, dont le rôle dans le point de contrôle du fuseau chez la levure a été confirmé par la suite (pour revue (Winey and Huneycutt, 2002)). En particulier, la surexpression de Mps1 active de façon constitutive le checkpoint de mitose, sauf dans un contexte mutant *mad* ou *bub*, plaçant ainsi Mps1 en amont de la cascade de signalisation (Hardwick et al., 1996).

### 3) Le centromère et le kinétochore siège du point de contrôle du fuseau mitotique

Le mouvement des chromosomes sur le fuseau mitotique est généré et régulé par le centromère, identifié à l'origine en 1882 par Flemming en cytogénétique comme la constriction primaire des chromosomes (Paweletz, 2001). Chez les vertébrés, le centromère est constitué d'un domaine central (cœur) composé de motifs de séquences hautement répétés, de taille variable d'une espèce à l'autre, flanqué par des régions d'hétérochromatine constitutive<sup>4</sup> (Choo, 1997) (Amor et al., 2004).

Le kinétochore, lieu d'attachement des chromosomes au fuseau mitotique, s'assemble au niveau de ces séquences répétées (Figure 7B) et ne correspond donc qu'à une partie des centromères. Des études par microscopie électronique ont montré que le kinétochore des métazoaires est une structure trilaminaire comportant : - un kinétochore interne ("inner kinetochore"), à l'interface avec l'ADN centromérique, composé des protéines de structure des kinétochores (les seules présentes tout au long du cycle) - un espace central translucide aux électrons - un kinétochore externe (outer kinetochore), interagissant avec les microtubules et portant les moteurs des microtubules et des protéines du checkpoint (Figure 7A). Les

---

<sup>4</sup> région du génome riche en séquences répétées, pauvre en gènes, retrouvée au niveau des centromères et des télomères, qui reste condensée en interphase et où la transcription est réprimée.



McClelland et al., 2003; McClelland et al., 2004). Ce complexe pourrait interagir avec au moins une des protéines du checkpoint pour surveiller l'état du kinétochore et déterminer si les chromosomes ont établi une orientation bipolaire sur le fuseau (tension) (McClelland et al., 2003).

#### c) Les protéines "passagères" des chromosomes

Les protéines passagères des chromosomes ("passenger proteins"), comme les a décrites Cooke en 1987 (Cooke et al., 1987), sont nucléaires en G2, distribuées le long des chromosomes en prophase, puis concentrées au kinétochore interne à partir de la prométaphase. A l'entrée en anaphase, elles quittent les chromosomes pour le fuseau central et finalement migrent vers le "midbody" à la cytokinèse (Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Dans les protéines passagères on classe: (1) Aurora-B une sérine/thréonine kinase conservée au cours de l'évolution qui est nécessaire à la localisation aux kinétochores de protéines telles que la dynéine, CENP-E, BubR1 et Mad2; (2) INCENP qui peut interagir avec Aurora-B, dont l'activité est alors stimulée (boucle de rétro-contrôle), et avec les microtubules (3) Survivine, une protéine de la famille des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP), dont l'expression est maximale en G2/M et inhiberait l'activation de la pro-caspase 9; (4) Boréaline/Dasra-B identifiée très récemment est conservée chez les vertébrés (Gassmann et al., 2004; Sampath et al., 2004). Elle peut se lier à INCENP et à la survivine (pour revue (Andrews et al., 2003; Meraldi et al., 2004b; Vagnarelli and Earnshaw, 2004)).

Ces protéines interagissent les unes avec les autres dans un complexe requis pour former un fuseau bipolaire et pour corriger les attachements défectueux entre microtubules et chromatine (Gassmann et al., 2004; Vagnarelli and Earnshaw, 2004). La perturbation de ce complexe entraîne un défaut d'alignement des chromosomes sur le fuseau, des défauts de cytokinèse (pour revue (Andrews et al., 2003; Carmena and Earnshaw, 2003; Meraldi et al., 2004b)) ou l'inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique en réponse à un manque de tension (pour revue (Carmena and Earnshaw, 2003; Meraldi et al., 2004b)).

#### d) Les protéines de régulations

Un nombre important de protéines du kinétochore externe jouent un rôle dans le contrôle de la transition métaphase-anaphase (pour revue (Bharadwaj and Yu, 2004; Cleveland et al., 2003)). Chez les métazoaires, on retrouve les homologues des protéines Bub et Mad identifiées chez la levure (à l'exception de bub2): Bub1 (Taylor and McKeon, 1997), Bub3 (Kalitsis et al., 2000; Taylor et al., 1998), Mad1 (Chen et al., 1998; Jin et al., 1998),



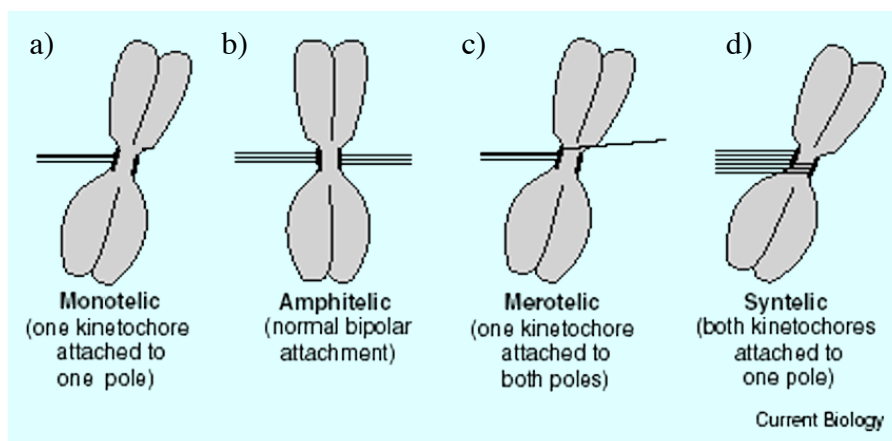
Mad2 (Li and Benezra, 1996; Michel et al., 2001), BubR1 (un homologue de mad3, possédant en plus le domaine kinase de bub1) (Abrieu et al., 2000; Chan et al., 1999; Taylor et al., 1998), Mps1 (Abrieu et al., 2001) et des protéines sans équivalent connu chez la levure comme CENP-E (Abrieu et al., 2000; Mao et al., 2003). Les protéines nécessaires à l'assemblage d'un kinétochore mature, en particulier celles du complexe des "protéines passagères" sont aussi nécessaires à l'établissement du point de contrôle. La liaison de ces différentes protéines aux kinétochores se fait selon un ordre séquentiel, encore incomplètement élucidé, dépendant de la présence des protéines de structure du kinétochore. Nous détaillerons cela dans la section 4.

#### e) Les fonctions du kinétochore

Les protéines, localisées au kinétochore externe sont impliquées dans 3 grandes fonctions: la capture des microtubules et l'attachement des chromosomes de façon bipolaire au fuseau, le mouvement des chromosomes et la régulation du déroulement de la mitose (voir II-4) (Amor et al., 2004; Putkey et al., 2002; Rieder, 1981).

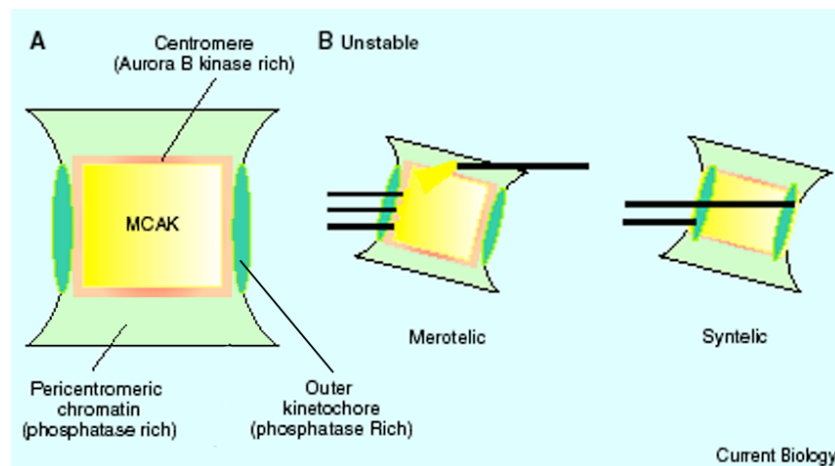
##### e-1 Le rôle dans l'attachement des chromosomes

Lorsque les chromosomes s'attachent au fuseau en début de mitose, ils peuvent le faire de 4 façons différentes: monotélique, amphitélique, mérotélique et syntélique (Figure 8) mais seuls les attachements amphitéliques assureront la ségrégation correcte des chromosomes en mitose. Le complexe des protéines passagères contribue à corriger les attachements défectueux entre microtubules et chromatine (Gassmann et al., 2004; Vagnarelli and Earnshaw, 2004).



*Figure 8: Schéma des différents attachements microtubules - chromosome. a) monotélique: un seul kinétochore attaché à un pôle. b) amphitélique: attachement bipolaire normal. c) mérotélique: un kinétochore attaché aux 2 pôles. d) syntélique: les 2 kinétochores attachés au même pôle. Modifié d'après (Gorbsky, 2004)*

Certaines des "protéines passagères" semblent impliquées dans la déstabilisation des interactions syntéliques et mérotéliques entre microtubules et kinétochore via la régulation de la localisation et de l'activation de MCAK (une protéine de la famille des kinésines KinI) qui désassemble les microtubules (Gorbsky, 2004; Kline-Smith et al., 2004; McIntosh et al., 2002; Wordeman et al., 1991). L'activation-inactivation de MCAK au kinétochore repose sur l'équilibre entre l'activité de la phosphatase PP1 et de la kinase Aurora-B (Andrews et al., 2004; Gorbsky, 2004; Lan et al., 2004) (Figure 9). L'activation de MCAK permettrait donc de déstabiliser les liaisons incorrectes jusqu'à l'attachement amphitélique de chaque chromosome. MCAK est ensuite inactivée et l'interaction kinétochore-microtubules est stabilisée.



*Figure 9: Modèle de la correction des attachements instables par MCAK. A) localisation de Aurora-B (rouge), MCAK (jaune) PP1 (vert) au centromère. B) Un attachement mérotélic délocalise MCAK dans une zone riche en PP1 où MCAK activée dépolymérise et relargue le microtubule. L'attachement syntélic cause une perte de la tension interkinétochore induisant le déplacement du kinétochore externe riche en PP1 vers le centromère, l'activation de MCAK et le relargage du microtubule. Modifié d'après (Gorbsky, 2004).*

## e-2 Le rôle dans le mouvement des chromosomes

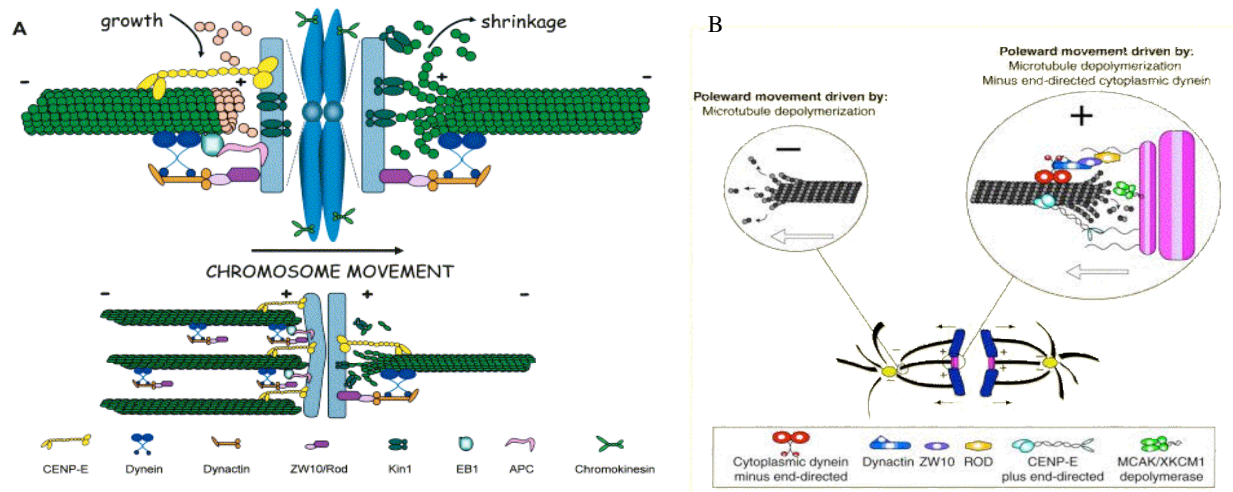
Les mouvements des chromosomes pendant la mitose correspondent à 2 grandes étapes: la congression<sup>5</sup> et la migration des chromatides sœurs de la plaque équatoriale vers les pôles du fuseau à l'anaphase. Le mouvement des chromosomes pendant la congression dépend des forces d'éjection polaire<sup>6</sup> (impliquant notamment la chromokinésine kid), de la dépolymérisation des microtubules au kinétochore "meneur"<sup>7</sup> (rôle de MCAK), de la polymérisation des microtubules liés au kinétochore frère et des moteurs dynéine et CENP-E

<sup>5</sup> Congression: mouvement des chromosomes vers la plaque équatoriale du fuseau pour s'y aligner

<sup>6</sup> force qui repousse le chromosome du pôle vers la plaque équatoriale

<sup>7</sup> kinétochore meneur: kinétochore lié au pôle vers lequel le chromosome se déplace.

(Figure 10A) (Cleveland et al., 2003). La stabilisation sur la plaque équatoriale dépend de l'équilibre des forces exercées sur chacun des kinétochores frères (la tension) et de la résistance opposée par la cohésion des chromatides sœurs.



**Figure 10:** Schéma des mouvements des chromosomes pendant la congruence et l'anaphase. A) Rôle des protéines motrices dans le mouvement des chromosomes pendant la congruence: en haut) schéma de la capture des microtubules kinétochoriens par les protéines MAPs (microtubules associated protein), en bas) Modèle du rôle de la dynéine dans la congruence des chromosomes en prométaphase. D'après (Cleveland et al., 2003). B) Schéma expliquant les mouvements des chromosomes en anaphase. D'après (Banks and Heald, 2001)

Le mouvement des chromosomes vers les pôles à l'anaphase (Figure 10B) dépend d'au moins 4 mécanismes (Banks and Heald, 2001; Karki and Holzbaur, 1999): (1) la dépolymérisation des microtubules aux pôles du fuseau (extrémité "moins"), (2) la dépolymérisation des extrémités plus des microtubules par MCAK (Gorbsky, 2004) et le maintien de l'interaction microtubules-kinétochores par CENP-E (McIntosh et al., 2002; Schaar et al., 1997; Wood et al., 1997; Yao et al., 2000; Yen et al., 1991), (3) la translocation des microtubules en direction des pôles associée au mouvement le long de la surface des microtubules des protéines motrices localisées aux kinétochores comme le complexe dynéine-dynactine (Banks and Heald, 2001; Pidoux and Allshire, 2000). (4) la croissance des extrémités "plus" des microtubules non-kinétochoriens<sup>8</sup>, permet l'éloignement des pôles du fuseau.

<sup>8</sup> le fuseau mitotique est composé de 2 types de microtubules, les microtubules qui s'attachent aux kinétochores (microtubules kinétochoriens ou fibre-K) et les microtubules représentant l'armature du fuseau dont l'extrémité + ne se lie pas au kinétochoire mais interagit (via des MAPs) avec les microtubules issus du pôle opposé, ce sont les microtubules non-kinétochoriens

### **e-3 Le maintien de l'attachement**

D'autres protéines (non moteurs), les MAPs (microtubule associated protein) sont impliquées dans le maintien de l'attachement des microtubules au kinétochore. Chez les vertébrés, la protéine EB1 par exemple interagit avec l'extrémité plus des microtubules ainsi qu'avec le domaine C-terminal de la protéine APC, adenomatous polyposis coli, fréquemment mutée dans les cancers du colon (à ne pas confondre avec APC/C), elle-même détectée aux kinétochores et pouvant jouer un rôle dans l'assemblage des microtubules (Figure 10A). Le complexe EB1-APC pourrait réguler la stabilité des microtubules et connecter directement les microtubules au kinétochore (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001). APC peut se complexer avec Bub1 et Bub3 et peut être phosphorylée par Bub1 et BubR1 *in vitro* (Kaplan et al., 2001). Les cellules mutantes dans le domaine C-terminal d'APC présentent un nombre élevé d'erreurs de ségrégation des chromosomes et deviennent aneuploïdes, mais conservent un point de contrôle mitotique fonctionnel.

#### **4) Le point de contrôle du fuseau dans les cellules de mammifères**

##### **a) Activation par un défaut d'attachement ou de tension ?**

Ce point de contrôle évite les pertes de matériels génétiques pendant la mitose en vérifiant que tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau avant le déclenchement de l'anaphase. Si ces conditions ne sont pas remplies, un signal d'attente est émis par le point de contrôle qui conduit à différer la séparation des chromatides sœurs et la sortie de mitose. Deux types de signaux pourraient être à l'origine de l'activation de cette voie. Selon la première hypothèse, c'est l'occupation des kinétochores par les microtubules qui serait surveillée et les kinétochores non-attachés qui activeraient le checkpoint (Rieder et al., 1995; Waters et al., 1998). Selon l'hypothèse de McIntosh (McIntosh, 1991; McIntosh et al., 2002), c'est la tension au kinétochore qui serait contrôlée et le manque de tension active le checkpoint.

##### **a-1 Le contrôle de l'attachement**

En présence d'agent dépolymérisant les microtubules, comme le nocodazole ou la colchicine, l'absence d'attachement des kinétochores active le point de contrôle, conduisant à un arrêt des cellules en mitose (pour revue (Bharadwaj and Yu, 2004; Cleveland et al., 2003)). En effet, un marquage intense est observé à chaque kinétochore non attaché pour toutes les protéines du checkpoint à savoir Bub1 (Taylor and McKeon, 1997), BubR1 (Chan et al.,

1999; Taylor et al., 1998), CENP-E (Chan et al., 1999; Jablonski et al., 1998), Mad2 (Chen et al., 1996; Waters et al., 1998) et ZW10/Rod (Chan et al., 2000). De plus, en absence d'une de ces protéines (par délétion chez la souris (Mad2, Bub3, BubR1), ou par ARN interférence (Mad1, Mad2, BubR1)) les cellules ne marquent plus l'arrêt en mitose après exposition au nocodazole (Abrieu et al., 2001; Dai et al., 2004; Dobles et al., 2000; Mao et al., 2003; Michel et al., 2001; Taylor et al., 1998; Taylor and McKeon, 1997). Ceci semble indiquer que ces protéines sont nécessaires pour la surveillance de l'occupation des kinétochores par les microtubules. Il faut cependant noter qu'un chromosome non attaché n'étant plus sous tension, ces résultats ne tranchent pas clairement entre les 2 hypothèses.

### **a-2 Le contrôle de la tension**

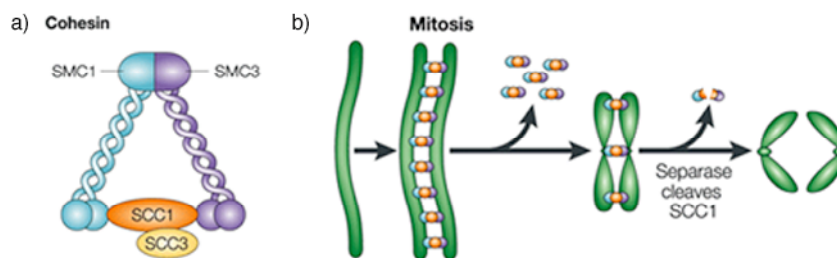
Pour la cellule, surveiller la tension au kinétochore est un moyen de détecter les kinétochores mal attachés (syntéliques, mérotéliques) avant le début de l'anaphase et d'éviter ainsi les pertes et les gains de chromosomes. Chez la levure, le manque de tension au niveau des kinétochores attachés (produit par inhibition de la réplication) est capable d'activer le point de contrôle (Piatti et al., 1995; Stern and Murray, 2001), sauf dans les mutants Ipl1 (homologue de Aurora-B). Ces expériences sont en accord avec un rôle d'Ipl1/Aurora-B dans la surveillance de la tension et la régulation du désassemblage microtubules-kinétochore (dépendant de la tension) chez la levure (Biggins and Murray, 2001, Tanaka, 2002 #200; Tanaka, 2002) comme chez les mammifères (Carmena and Earnshaw, 2003; Ditchfield et al., 2003; Gorbsky, 2004; Hauf et al., 2003; Kallio et al., 2002; Meraldi et al., 2004b). Le manque de tension aux kinétochores peut être provoqué par une stabilisation des microtubules résultant de traitements par les poisons de la famille des taxanes (taxol, taxotère ...) (Jordan and Wilson, 2004; Peterson and Mitchison, 2002). Dans ces cellules, le marquage est intense aux kinétochores pour Bub1 et BubR1 mais peu visible pour Mad2 (Skoufias et al., 2001; Waters et al., 1998; Zhou et al., 2002b). Chez les vertébrés, CENP-E pourrait être également un des acteurs de ce mécanisme de surveillance de la tension (Abrieu et al., 2000).

Cela a conduit à l'hypothèse que le point de contrôle aurait 2 branches, Mad2 contrôlerait principalement l'attachement des microtubules, alors que Bub1, BubR1, CENP-E et les "protéines passagères" contrôleraient la tension. Néanmoins, cette vision est probablement trop simple. En effet, l'injection d'anticorps bloquant anti-Mad2 inhibe l'activation du checkpoint de mitose aussi bien en présence de nocodazole (Gorbsky et al., 1998), que de taxol (Waters et al., 1998). Il semble donc que Mad2 soit importante pour l'arrêt

lié à l'activation du checkpoint dans toutes les conditions mais que sa localisation au kinétochore ne soit pas toujours nécessaire (Shannon et al., 2002). De même, une analyse précise de la localisation de Bub1 aux kinétochores en présence de nocodazole ou de taxol suggère que cette protéine répond aux 2 signaux (Zhou et al., 2002a). Il s'avère donc difficile de départager ces hypothèses et d'assigner un rôle spécifique à chaque protéine du point de contrôle, probablement parce qu'*in vivo*, l'attachement de microtubules aux kinétochores génère la tension, permettant en retour l'attachement d'autres microtubules (Nicklas et al., 2001).

b) La transition métaphase-anaphase; APC/C<sup>Cdc20</sup>, cible du point de contrôle

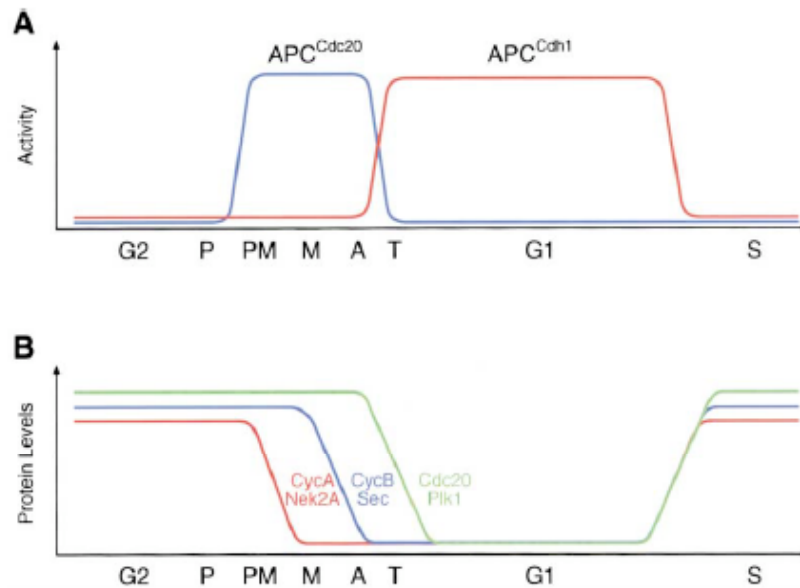
Jusqu'au début de l'anaphase, les chromatides sœurs de chaque chromosome restent connectées au niveau du centromère grâce au complexe des cohésines. Ce complexe multiprotéique contient 2 sous-unités SMC (structural maintenance of chromosome) SMC1 et SMC3 et 2 sous-unités non SMC, SCC1 (Rad21/Mcd1) et SCC3 ((Nasmyth, 2002), pour revue (Hagstrom and Meyer, 2003)) (Figure 11a).



*Figure 11: Organisation des cohésines. a) structure du complexe cohésine b) localisation des cohésines au cours de la mitose. D'après (Hagstrom and Meyer, 2003)*

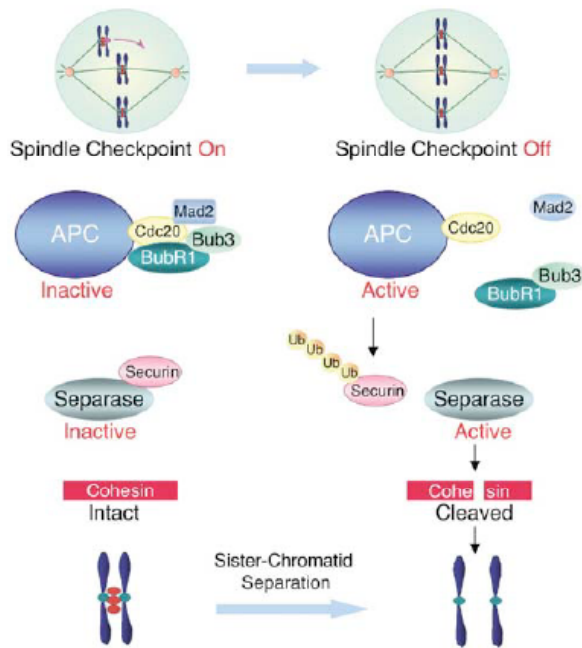
Chez les métazoaires, en prophase, la perte de l'association de SCC1 avec les bras des chromosomes conduit à leur séparation (Hauf et al., 2001). Cette dissociation dépend entre autre de Polo-like kinase1 (plk1). La protéine shugoshin (Sgo, homologue de MEI-S322 (drosophile) et Sgo1 (levure)), dont la localisation et le niveau d'expression dépendent de Bub1, semble protéger les cohésines du centromère d'une dégradation précoce (McGuinness et al., 2005; Salic et al., 2004; Tang et al., 2004b). A l'anaphase, la destruction de la sous-unité SCC1 des cohésines, au niveau du centromère, par les séparases (protéases) provoque la séparation des chromatides sœurs (Figure 11b) ((Nasmyth, 2002; Nasmyth et al., 2000; Vagnarelli et al., 2004) revue dans (Bharadwaj and Yu, 2004)). L'activité des séparases est inhibée par leur liaison avec la sécurine (Nasmyth, 2002), laquelle est dégradée par le complexe Anaphase Promoting Complexe /Cyclosome (APC/C) déclenchant alors l'anaphase

(Figure 13) (Peters, 2002). Le complexe APC/C est un complexe multiprotéique ubiquitine-ligase E3 qui ajoute des résidus ubiquitine sur ses substrats et les dirige vers la voie de dégradation du protéasome (Yu, 2002). La spécificité de reconnaissance des substrats est assurée par la liaison d'APC/C avec ses cofacteurs, Cdc20 (aussi nommé p55cdc chez les mammifères ou fizzy chez la drosophile) ou Cdh1, formant les complexes APC/C<sup>Cdc20</sup> (actif jusqu'à l'anaphase) et APC/C<sup>Cdh1</sup> (stades tardifs de la mitose et G1) (Figure 12).



*Figure 12: Profil d'activation des complexes APC/C au cours du cycle cellulaire (A) et de la dégradation de certains de leur substrat (B). APC/C<sup>Cdc20</sup> est activé en prométaphase (PM) où il commence la dégradation de la cycline A et de Nek2A. La protéolyse des cyclines B (cycB) et de la sécurine (Sec) dépendent aussi d' APC/C<sup>Cdc20</sup> mais est retardée jusqu'à la métaphase (M) par le point de contrôle du fuseau. Pendant l'anaphase (A) et la télophase (T), APC/C<sup>Cdh1</sup> est activé et régule la destruction de substrats supplémentaires comme Cdc20 et Plk1. APC/C<sup>Cdc20</sup> est inactivé à la sortie de mitose, alors qu'APC/C<sup>Cdh1</sup> reste actif jusqu'au déclenchement de la phase S. P (prophase) (Peters, 2002).*

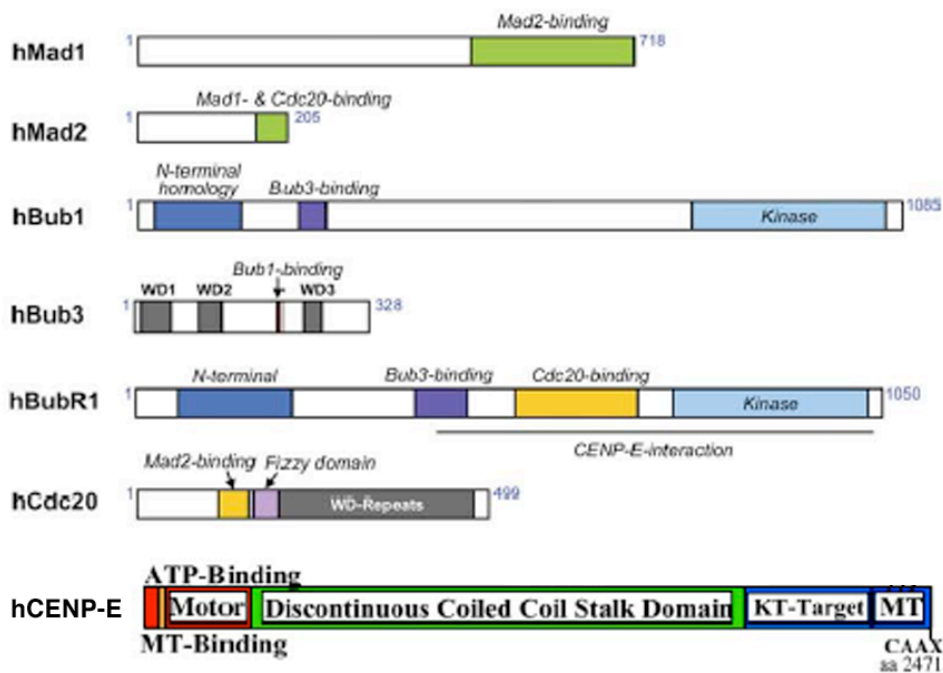
La conséquence de l'activation du point de contrôle du fuseau est l'inhibition de l'activité d'APC/C<sup>Cdc20</sup> (Figure 13). Ce complexe est donc la cible la plus en aval du checkpoint (pour revue (Bharadwaj and Yu, 2004; Cleveland et al., 2003)). Quand les chromosomes sont correctement attachés au fuseau, le point de contrôle est désactivé, APC/C<sup>Cdc20</sup> devient actif, dégradant la sécurine et déclenchant l'anaphase (Figure 13).



*Figure 13: Schéma du contrôle de la transition métaphase-anaphase et de la régulation de la voie de dégradation des cohésines. D'après (Bharadwaj and Yu, 2004)*

c) Les protéines impliquées dans ce mécanisme de surveillance

Chez les métazoaires, les protéines du point de contrôle de mitose sont localisées au kinétochore. Leur taille, structure et domaines d'interaction sont présentés dans la Figure 14 et dans le Tableau 5.



*Figure 14: Schéma de la structure des protéines du point de contrôle. Leur domaine d'interaction et leur taille sont indiqués. D'après (Weaver et al., 2003; Yoon et al., 2004)*



Tableau 5: Taille et interaction des protéines du point de contrôle du fuseau mitotique

Protéines	Taille (aa)	Domaines importants	Interaction
Bub1	1085	Serine/thréonine kinase domaine GLEBS <sup>a</sup>	est activée (autophosphorylation) par son interaction (via son domaine GLEBS <sup>a</sup> ) avec Bub3. hMad1 et xBubR1 sont ces substrats potentiels <i>in vitro</i> (Chen, 2004; Kaplan et al., 2001; Seeley et al., 1999). Le complexe Bub1-Bub3 est un inhibiteur catalytique d'APC/C <sup>cdc20</sup> (Tang et al., 2004a).
Bub3	328	4 motifs répétés WD <sup>b</sup>	reconnaît le domaine GLEBS <sup>a</sup> , interagit avec Bub1 et BubR1 (Campbell and Hardwick, 2003; Taylor et al., 1998; Wang et al., 2001). Appartient au MCC <sup>d</sup> .
Mps1 (TTK, PYT)	841	Serine/thréonine-tyrosine kinase	s'associe par son domaine N-terminal (aa 1-305) au kinétochore (Liu et al., 2003; Stucke et al., 2004) et par son domaine catalytique aux microtubules (Stucke et al., 2004).
CENP-E	2474	Moteur de type kinésine	interagit avec les microtubules (2 domaines), les kinétochores (Cterminal) (Weaver et al., 2003; Zecevic et al., 1998) et BubR1 (Chan et al., 1998; Yao et al., 2000). CENP-E est nécessaire pour l'activation de BubR1 (Mao et al., 2003).
BubR1	1050	Serine/thréonine kinase domaine GLEBS <sup>a</sup>	contient un domaine KEN (reconnu par APC/C <sup>cdh1</sup> ) (Logarinho et al., 2004), se lie avec Bub3 (domaine GLEBS <sup>a</sup> ), cdc16, cdc27phosphorylé, APC7 (3 sous-unités du complexe APC/C), CENP-E et Cdc20 et peut phosphoryler les 2 derniers (Chan et al., 1999; Skoufias et al., 2001; Taylor et al., 1998; Wang et al., 2001). C'est un puissant inhibiteur d'APC/C <sup>cdc20</sup> <i>in vitro</i> . Appartient au MCC <sup>d</sup> .
Mad1	718	Coiled-coil Domaine leucine-zipper	interagit avec elle-même (oligomère), avec Mad2 (domaine leucine-zipper), en double-hybride avec Ndc80. Son domaine Coiled-coil est nécessaire à sa localisation au kinétochore. C'est un substrat <i>in vitro</i> de Bub1 et Mps1. (Chen et al., 1998; Iwanaga et al., 2002; Martin-Lluesma et al., 2002; Seeley et al., 1999)
Mad2 (Mad2L1)	205	domaine HORMA <sup>c</sup>	interagit avec Mad1 ou Cdc20 par le même domaine; Appartient au MCC <sup>d</sup>
Rae1	368	motifs répétés WD <sup>b</sup>	Interagit avec le domaine GLEBS de Bub1 (Wang et al., 2001)
Cdc20	499	7 motifs répétés WD <sup>b</sup>	Interagit avec Mad2, BubR1; appartient au MCC

<sup>a</sup>: Gle2-binding sequence: séquence de liaison à Gle2, l'homologue chez *S cerevisiae* de Rae1. <sup>b</sup>: WD représente un motif de 40 aa, souvent impliqué dans les interactions protéines-protéines, retrouvé dans les protéines appartenant à des complexes multiprotéiques (Neer et al., 1994; Smith et al., 1999). <sup>c</sup>: domaine retrouvé chez Hop1, Rev7 (Mad2B) et Mad2, impliqué dans les interactions protéines-protéines et l'oligomérisation <sup>d</sup>: MCC, complexe contenant Mad2-BubR1-Bub3-Cdc20

**Bub1** est une protéine sérine/thréonine kinase (Figure 14) (Taylor et al., 1998). Sa liaison avec Bub3 est nécessaire à la localisation des 2 protéines au kinétochore dès la prophase et jusqu'à l'anaphase, ou en présence de kinétochores non attachés après traitement par les poisons du fuseau (Jablonski et al., 1998; Tang et al., 2004a; Taylor et al., 1998; Taylor and McKeon, 1997). L'état de phosphorylation de Bub1 et son niveau d'expression sont régulés au cours du cycle cellulaire. En effet, en mitose, Bub1 est hyperphosphorylée par elle-même ou par la MAPK (mitogen-activated protein kinase) en présence de dommage du fuseau (Chen, 2004; Taylor et al., 2001). Son niveau diminue à la sortie de mitose puis re-augmente progressive jusqu'au G2/M suivant (Tang et al., 2004a; Taylor et al., 2001).

**Bub3** est nucléaire tout au long du cycle, elle est localisée au kinétochore de la prophase jusqu'à la métaphase (Basu et al., 1998; Campbell and Hardwick, 2003; Martinez-Exposito et al., 1999; Taylor et al., 1998). Sa liaison avec Bub1 permet l'activation de cette dernière en mitose (Bharadwaj and Yu, 2004; Wang et al., 2001).

**Mps1** est une kinase aussi appelée chez l'homme TTK (T-cell tyrosine kinase) ou PYT (phosphotyrosine-picked threonine kinase). Si sa localisation au kinétochore et son rôle dans le point de contrôle sont reconnus chez les mammifères (Abrieu et al., 2001; Fisk and Winey, 2001; Liu et al., 2003; Stucke et al., 2004), sa localisation aux centrosomes et son implication dans leur duplication restent controversées (Fisk et al., 2003; Liu et al., 2003; Stucke et al., 2004). Chez le xénope, l'absence de Mps1 abolit le point de contrôle (Tableau 6), qui peut-être restauré par la surexpression de Mad2 indiquant que, dans ce système, Mps1 agit en amont de Mad2 (Abrieu et al., 2001). En bon accord avec un rôle de Mps1 dans le contrôle de la mitose, le niveau d'expression de la protéine ainsi que son activité kinase (coïncidant avec un état hyperphosphorylé de Mps1 jusqu'à l'anaphase) sont maximum en mitose (Liu et al., 2003; Stucke et al., 2002). Chez les vertébrés, la régulation de Mps1 et ses substrats sont encore inconnus.

**Cenp-E** s'accumule en G2/M, est localisée au kinétochore de la prométaphase à l'anaphase (Chan et al., 1998; Cooke et al., 1997), puis est dégradée à la télophase. L'absence de CENP-E conduit à un défaut d'alignement des chromosomes dans différents systèmes (xénope, drosophile, cellules humaines ou murines) (Mao et al., 2003; Schaar et al., 1997; Weaver et al., 2003), suggérant que cette protéine joue un rôle dans le mouvement des chromosomes et dans la stabilisation des microtubules après capture par les kinétochores (Putkey et al., 2002) (voir p42-43). Le rôle de Cenp-E dans l'activation et le maintien du checkpoint de mitose dépend de son interaction avec le domaine C-terminal de BubR1 (Chan et al., 1998; Yao et al., 2000). En effet, chez le xénope, la souris et l'homme, CENP-E est

Tableau 6: Rôle des protéines dans le point de contrôle du fuseau mitotique

Gènes	Perturbation des gènes du point de contrôle	Arrêt en mitose en présence de poison du fuseau	Anomalie des chromosomes-aneuploidie	Références
Bub1	mutant dominant négatif (mmu) ARN interférence (hsa)	-	+	(Tang et al., 2004a; Taylor and McKeon, 1997)
Bub3	anticorps -bloquant (xla) ARN interférence (hsa)	-	+	(Campbell and Hardwick, 2003; Howell et al., 2004; Meraldi et al., 2004a)
Mps1	anticorps -bloquant (hsa, xla), mutant kinase dead (xla), ARN interférence (hsa)	-	+	(Abrieu et al., 2001; Fisk et al., 2003; Liu et al., 2003; Stucke et al., 2002)
CENP-E	anticorps -bloquant (xla) ARN interférence (hsa)	- (réduit activité de BubR1) + <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	(Mao et al., 2003; Tanudji et al., 2004; Weaver et al., 2003)
BubR1	mutant dominant négatif ou kinase dead (mmu, hsa), anticorps-bloquant (hsa), ARN interférence (hsa) surexpression BubR1 (hsa)	- ++	+ NA	(Chan et al., 1999; Dai et al., 2004; Shin et al., 2003; Wang et al., 2004b) (Shin et al., 2003; Wu et al., 2000)
Mad1	anticorps -bloquant (xla), mutant dominant négatif (hsa) surexpression (xla, hsa)	- -	+ NA	(Chen et al., 1998; Chung and Chen, 2002) (Chung and Chen, 2002; Luo et al., 2002)
Mad2	ARN interférence (hsa) surproduction Mad2 (hsa)	- ++	+ +	(Meraldi et al., 2004a; Michel et al., 2004) (Luo et al., 2002)
Rod ou ZW10	mutants (dme), anticorps -bloquant (hsa) ARN interférence (cel)	-	+	(Basto et al., 2000; Chan et al., 2000; Scaerou et al., 2001)

<sup>a</sup>: quand un ou 2 kinétochores ne sont pas attachés, le signal qu'ils produisent est insuffisant pour arrêter les cellules, conduisant à de l'aneuploidie (25%); quand aucun des kinétochores n'est correctement attaché (en présence de poison du fuseau), les cellules avec de nombreux défauts d'alignements des chromosomes, marquent l'arrêt.

mmu: *Mus musculus*, hsa: *Homo sapiens*, xla: *Xenopus laevis*, dme: *Drosophila melanogaster*, cel: *Ceanorhabditis elegans*

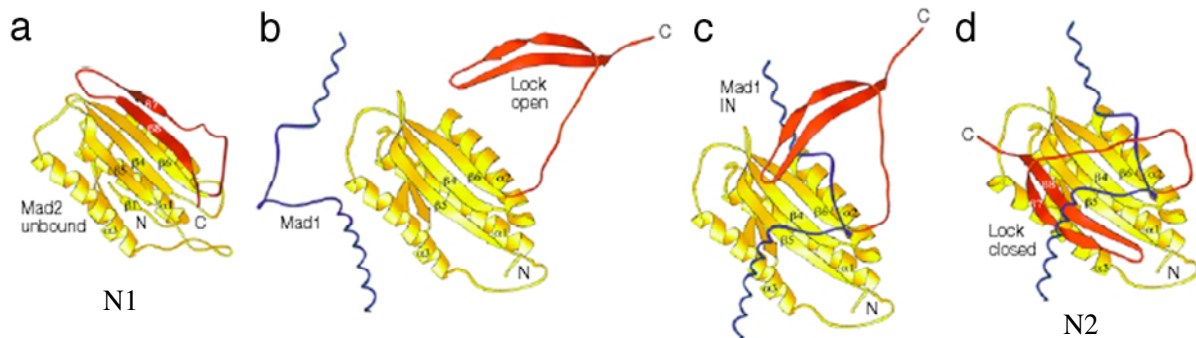
nécessaire *in vitro* et *in vivo* pour l'activation de BubR1 (Chan et al., 1999; Mao et al., 2003; Yao et al., 2000). De façon intéressante, CENP-E n'est retrouvée jusqu'à présent que dans les espèces où BubR1 possède un domaine kinase (du xénope à l'homme). Chez les mammifères, CENP-E semble nécessaire à l'amplification d'un signal d'attente basal produit par chaque kinétochore non attaché. En effet, en absence de CENP-E (Tableaux 6 et 7), l'entrée en anaphase n'est bloquée que si l'ensemble des kinétochores est incorrectement attaché (en présence de poison du fuseau), (Tanudji et al., 2004; Weaver et al., 2003) alors que si un ou 2 kinétochores seulement ne sont pas attachés, le signal qu'ils produisent est insuffisant pour arrêter les cellules.

**BubR1** (Bub1-related kinase ou MAD3) ressemble à ScMad3 avec en plus la partie C-terminale de ScBub1 (notamment le domaine kinase) (Figure 14) (Li et al., 1999). En mitose, quand les chromosomes ne sont pas attachés, ou pas sous tension, BubR1 est hyperphosphorylée (par autophosphorylation, action de MAPK, de Bub1 ou d'autres kinases) (Chan et al., 1999; Chen, 2004; Li et al., 1999). L'interaction de CENP-E et BubR1 au kinétochore est nécessaire à l'activation de l'activité kinase de BubR1 et à la propagation du signal d'attente pour l'anaphase (Chan et al., 1999; Mao et al., 2003; Weaver et al., 2003). Cependant, seule une partie des actions de BubR1 pour le point de contrôle semble nécessiter son activité kinase ((Chen, 2002; Mao et al., 2003), pour revue (Bharadwaj and Yu, 2004)). Enfin, en réponse à une activation prolongée du point de contrôle en présence de poison du fuseau, BubR1 pourrait avoir un rôle pro-apoptotique (via la cascade des caspases) pour éliminer les cellules polyploïdes (Shin et al., 2003).

**Mad1**, présente tout au long du cycle, est située à l'enveloppe nucléaire en interphase puis au niveau des kinétochores non attachés en mitose. hNdc80 et Mps1 sont nécessaires *in vivo* à sa localisation au kinétochore (Martin-Lluesma et al., 2002).

**Mad2** (Mad2L1), recrutée aux kinétochores non attachés via Mad1, est relarguée en métaphase après leur attachement (pour revue (Bharadwaj and Yu, 2004)). Elle a 2 ligands mutuellement exclusifs, Mad1 et Cdc20, portant la même séquence de 10 aa d'interaction avec Mad2 (Figure 14). La liaison de Mad2 avec Mad1 (comme avec Cdc20) entraîne un changement de conformation de la partie C-terminale de Mad2 (passage de l'état N1 non lié à l'état N2) rappelant un mécanisme de fermeture-ouverture de "ceinture de sécurité" (pour revue (Musacchio and Hardwick, 2002)). Ce changement de conformation contribuerait à son activation (Luo et al., 2002; Luo et al., 2004b; Sironi et al., 2002) (Figure 15). Seule une fraction des protéines Mad2 est liée à ses ligands, il existe également un pool

de Mad2 cytosolique libre, également important pour le contrôle de la mitose (Chung and Chen, 2002).



*Figure 15: Schéma du changement de conformation de Mad2 en fonction de sa liaison avec Mad1. a, Mad2 libre (conformation N1); b, ouverture de Mad2 pour permettre la fixation de Mad1; c, Mad1 est dans la poche de fixation; d, Mad2 est en position fermée, Mad1 est stablement fixée à Mad2. D'après (Musacchio and Hardwick, 2002)*

Des expériences de fluorescence sur cellules vivantes montrent que Mad2 cycle très rapidement au kinétochore (Howell et al., 2000; Meraldi et al., 2004a), suggérant que le passage de Mad2 au kinétochore permet son activation, sa fixation sur Cdc20 et l'inhibition de l'activité d'APC/C<sup>Cdc20</sup>. En effet, les momomères de Mad2 sont incapables *in vitro* de fixer Cdc20.

**Le complexe Rod-ZW10-Zwilch.** Les protéines Rod (rough deal), ZW10 (zeste white 10), identifiées au départ chez la drosophile (Basto et al., 2000; Karess and Glover, 1989; Scaerou et al., 1999; Starr et al., 1997; Williams et al., 1992) sont conservées au cours de l'évolution bien qu'absentes chez les levures (Scaerou et al., 2001; Starr et al., 1997; Wojcik et al., 2001), indiquant peut-être un niveau de régulation supplémentaire de la mitose chez les eucaryotes supérieurs. Ces 2 protéines interagissent et sont associées dans un complexe plus large contenant également la protéine Zwilch (Scaerou et al., 2001; Williams et al., 2003).

Le complexe Rod-ZW10 se localisent au kinétochore en prophase et prométaphase, puis les protéines migrent en un flux continu le long du fuseau quand les chromosomes sont bi-orientés; en fin de mitose Rod est localisée aux pôles et ZW10 dans la zone centrale du fuseau (midzone) (Basto et al., 2000; Basto et al., 2004; Chan et al., 2000; Scaerou et al., 1999; Scaerou et al., 2001; Williams and Goldberg, 1994). Le complexe Rod-ZW10 est nécessaire également à la localisation au kinétochore du complexe dynéine/dynactine avec lequel il interagit (Basto et al., 2000; Basto et al., 2004). Leur rôle dans le point de contrôle n'est pas encore compris, mais pourrait être séparé de celui des autres protéines du checkpoint,

leur absence n'empêchant pas le recrutement de Bub1, Bub3, BubR1 ou Mad2 au kinétochore (Basto et al., 2000; Chan et al., 2000).

**Rae1** (Gle2 ou mrnp41) est un facteur de transport nucléaire très conservé, possiblement impliqué en interphase dans l'export d'ARN messenger, possédant de fortes homologies de séquence avec Bub3 (Taylor et al., 1998) et reconnaissant le domaine GLEBS (identifié au départ chez la nucléoporeine Nup98 mais présent également chez Bub1) (Wang et al., 2001). Son rôle dans le point de contrôle de mitose identifié récemment chez la souris (Tableau 7) est encore loin d'être compris (Babu et al., 2003).

Le rôle de ces différentes protéines a été établi dans différents systèmes cellulaires par analyse des conséquences de leur inhibition sur l'arrêt en mitose après traitement par des poisons du fuseau (Tableau 6). Pour certaines de ces protéines, des knock-out (KO) ont pu être réalisés chez la souris. Les phénotypes des animaux et des cellules dérivées de ces KO sont décrits dans le Tableau 7.

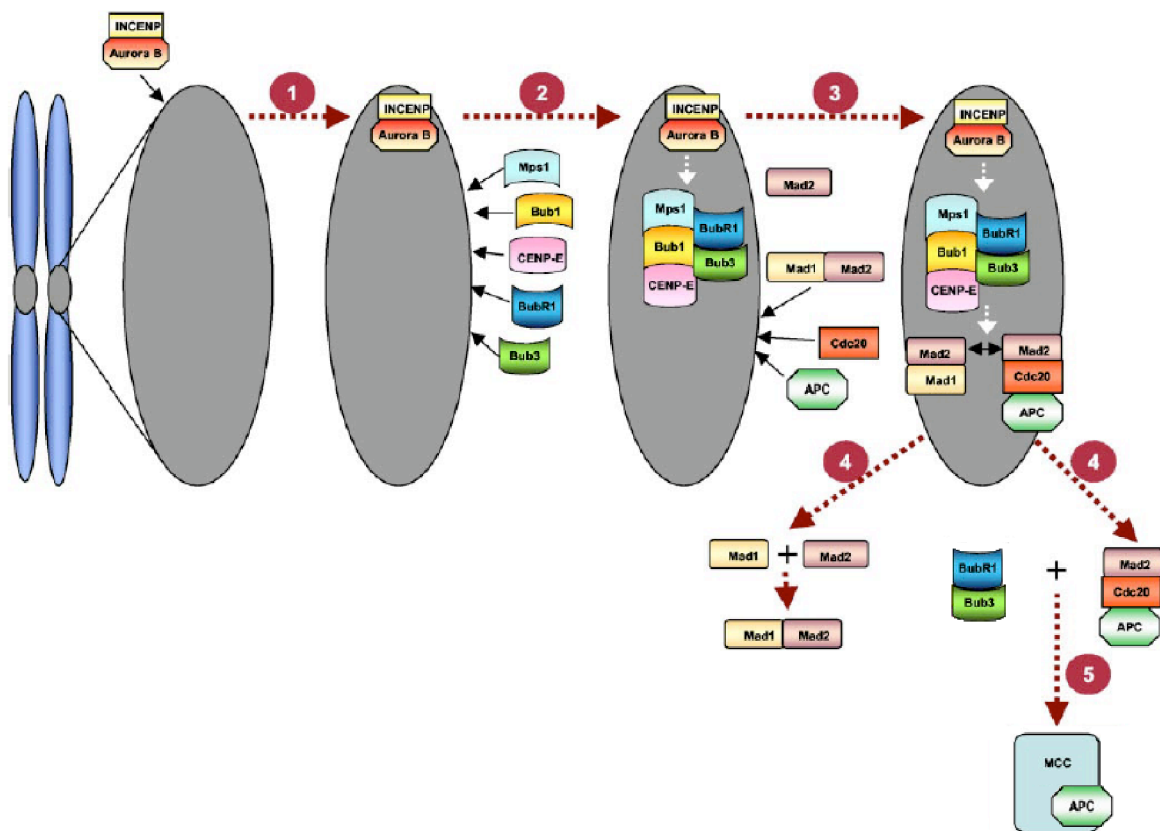
Tableau 7: Phénotypes des knock-out (KO) chez la souris de certains gènes du point de contrôle de mitose et des cellules MEFs issues de ces KO

Gènes	Phénotype souris / cellules MEFs	Références
Bub3	Bub3 <sup>-/-</sup> sont létales embryonnaires (dpc 4,5-6,5), Bub3 <sup>+/-</sup> viables. MEF Bub3 <sup>+/-</sup> : défaut de ségrégation des chromosomes et aneuploidie	(Babu et al., 2003; Kalitsis et al., 2000)
CENP-E	CENP-E <sup>-/-</sup> sont létales embryonnaires (dpc-3,5), CENP-E <sup>+/-</sup> sont viables. Les MEF CENP-E <sup>-/-</sup> présentent de grosses anomalies de ségrégations des chromosomes. Les cellules des KO conditionnels réalisés dans le foie marque l'arrêt en présence de nombreux défauts d'alignements des chromosomes.	(Putkey et al., 2002; Weaver et al., 2003)
BubR1	BubR1 <sup>-/-</sup> sont létales embryonnaires (avant dpc 8,5), BubR1 <sup>H/H</sup> (hypomorphe) sont viables (mais stérile), BubR1 <sup>+/-</sup> viables. MEFs BubR1 <sup>H/H</sup> ou BubR1 <sup>H/-</sup> : anomalie de mitose, faible accumulation en mitose en présence de nocodazole	(Baker et al., 2004; Dai et al., 2004; Wang et al., 2004b)
Mad2	Mad2 <sup>-/-</sup> sont létales embryonnaires. Mad2 <sup>+/-</sup> développent des cancers. MEFs Mad2 <sup>+/-</sup> ou HCT116-Mad2 <sup>+/-</sup> ont une séparation prématurée des chromatides sœurs en présence de poisons du fuseau, aneuploidie.	(Dobles et al., 2000; Michel et al., 2004)
Rae1	Rae1 <sup>-/-</sup> létales embryonnaires, les Rae1 <sup>+/-</sup> sont viables. MEF Rae <sup>+/-</sup> : défaut du checkpoint, de ségrégation des chromosomes et aneuploidie. La surexpression de Rae1 peut compenser la perte de Bub3	(Babu et al., 2003)

dpc: day post-coïtum

d) Comment ces protéines sont-elles recrutées au kinétochore?

Des études récentes chez le Xénope (système acellulaires d'extraits d'œufs de Xénope) et chez l'homme (par ARN interférence dans les cellules HeLa) ont permis une meilleure caractérisation de l'ordre d'assemblage des protéines sur les pré-kinétochores (Johnson et al., 2004; Vigneron et al., 2004). Dans les 2 systèmes, la première protéine fixée en prophase (à l'exception des protéines de structure du kinétochore qui sont présentes tout au long du cycle) est Aurora-B. Sa localisation nécessite la présence des autres membres du complexe des "protéines passagères" (et inversement) (Vigneron et al., 2004). Chez le xénope, la formation du complexe INCENP-Aurora-B stimule la deuxième vague de recrutement de protéines comprenant Mps1, Bub1, CENP-E (dépendante l'une de l'autre dans ce système) et probablement Bub3 et BubR1. Les protéines Mad1, Mad2 sont recrutées par la suite (Figure 16).



*Figure 16: Schéma d'un modèle d'assemblage des protéines au kinétochore chez le Xénope. MCC (Bub3, BubR1, Mad2, Cdc20). Modifié d'après (Vigneron et al., 2004)*

Chez l'homme la localisation des différentes protéines du checkpoint est régulée de façon temporelle, mais aussi spatiale et dépend de la bonne localisation des protéines en amont dans le point de contrôle (voir (Johnson et al., 2004; Maiato et al., 2004) pour détail).

e) Comment ces protéines agissent-elles ?

### **e-1 Les différents complexes inhibiteurs**

Selon l'hypothèse actuellement en vigueur, les kinétochores sont à l'origine de la formation du signal, diffusible mais restreint localement, qui inhibe le déclenchement de l'anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas alignés. Des expériences sur les cellules Ptk1 possédant, après fusion, deux fuseaux et deux lots de chromosomes dans le même cytoplasme ont permis de montrer que les chromosomes mal attachés du premier fuseau retardent la séparation des chromatides de tous les chromosomes accrochés à ce fuseau, mais n'empêchent pas les chromosomes du 2<sup>ème</sup> d'entrer en anaphase une fois tous les chromosomes attachés à ce second fuseau (Rieder et al., 1997).

*In vitro*, l'activité ubiquitine-ligase d'APC/C<sup>Cdc20</sup> peut être inhibée de façon stoechiométrique par différentes protéines: Mad2, BubR1 (la plus efficace, qu'elle soit seule ou en association avec Bub3), ou par les différents complexes dont elles font partie, comme le MCC (Mad2-BubR1-Bub3-Cdc20), Mad2-Cdc20 ou BubR1-Bub3-Cdc20 (pour revue (Bharadwaj and Yu, 2004)). *In vivo*, le MCC semble l'inhibiteur le plus probable d'APC/C<sup>Cdc20</sup>. Deux modèles existent quand à sa formation: pour les uns, le MCC est spécifique de la mitose et sa formation serait catalysée au kinétochore non attachés (où sont concentrés tous ses constituants); pour les autres, le MCC serait présent tout au long du cycle (formé indépendamment des kinétochores), mais ne serait converti en une forme pouvant se lier à APC/C (et l'inhiber) qu'au kinétochore après activation du point de contrôle mitotique (pour revue (Bharadwaj and Yu, 2004)). Il existerait dans ce cas un niveau basal de MCC en interphase qui augmenterait fortement dans les cellules en mitose possédant un checkpoint actif (pour revue (Bharadwaj and Yu, 2004)). Selon des études de fluorescence sur cellules vivantes (Howell et al., 2004), en mitose, Mad2 serait continuellement recrutée via Mad1 au kinétochore. Elle y serait activée et subirait un changement de conformation permettant sa liaison à Cdc20, puis le complexe Mad2-Cdc20 quitterait le kinétochore seul ou en association avec BubR1-Bub3 (qui cyclent également rapidement) pour former le MCC et inhiber l'APC/C libre. En présence d'un point de contrôle fonctionnel, certains constituants du complexe APC/C (APC3, APC6, APC1 phosphorylé) ont été détectés aux kinétochores non attachés (Acquaviva et al., 2004; Vigneron et al., 2004), laissant supposer que l'APC/C pourrait aussi être inhibé directement au kinétochore par le MCC ou y être modifié (notamment par phosphorylation) pour devenir sensible au MCC (Acquaviva et al., 2004).



## e-2 Les modes d'actions du MCC ou de ses composants sur APC/C

Comme nous l'avons mentionné plus haut, Mad2 et BubR1 sont des inhibiteurs d'APC/C<sup>Cdc20</sup>. Mad2 n'empêche pas, *in vitro*, la fixation des substrats sur APC/C<sup>Cdc20</sup>, mais peut ralentir leur dissociation du complexe, inhibant leur relargage et freinant ainsi leur dégradation (Pfleger et al., 2001). Mad2 pourrait aussi inhiber la liaison de Cdc20 sur APC/C suggérant un rôle de séquestration de Cdc20 par Mad2 (Reimann et al., 2001; Tang et al., 2001). De la même façon, BubR1 peut *in vitro* empêcher Cdc20 de s'associer à APC/C et ainsi inhiber APC/C (Tang et al., 2001). Ces 2 protéines sont inefficaces pour inhiber le complexe APC/C<sup>Cdc20</sup> déjà activé (Chen and Fang, 2001; Pfleger et al., 2001; Tang et al., 2001).

Récemment, un rôle direct de Bub1 dans l'inhibition d'APC/C<sup>Cdc20</sup> a été démontré dans les cellules humaines (HeLa) (Tang et al., 2004a). En effet, *in vitro*, Bub1 peut phosphoryler Cdc20 et l'étude du phénotype de cellules exprimant un mutant de Cdc20 dont les sites de phosphorylation par Bub1 sont mutés a montré une déficience partielle de l'arrêt en mitose en présence de poison du fuseau (Tang et al., 2004a). De plus, pendant l'activation du checkpoint, Bub1 est hyperphosphorylée et son activité kinase envers Cdc20 est stimulée. Ce mécanisme catalytique pourrait venir en complément de l'inhibition stoechiométrique d'APC/C par le MCC.

APC/C est également régulé par d'autres protéines à des étapes différentes du cycle. Emi1 est une protéine importante pour la régulation d'APC/C en S et G2, et tout début de M notamment avant que le MCC ne soit activé. Elle reconnaît à la fois APC/C<sup>Cdc20</sup> et APC/C<sup>Cdh1</sup> et inhibe l'activité de ces complexes en empêchant la fixation de leurs substrats (Peters, 2002; Reimann et al., 2001). A la différence de Mad2, Emi1 peut inhiber les complexes APC/C déjà activés, permettant ainsi l'accumulation de la cyclineA jusqu'à l'entrée en mitose (Reimann et al., 2001). Emi1 est dégradée en prophase (Margottin-Goguet et al., 2003). La protéine RASSF1A, localisée aux pôles du fuseau, contrôlerait APC/C<sup>Cdc20</sup> en prophase et prometaphase indépendamment du MCC et sa surexpression stabiliserait les cyclines mitotiques (Mathe, 2004; Song et al., 2004).

Enfin, la protéine Mad2B (Mad2L2 ou Rev7), cloné chez l'homme et le xénope comme le paralogue de Mad2 (Cahill et al., 1999; Murakumo et al., 2000), joue un rôle dans le contrôle de l'activité APC/C<sup>Cdh1</sup> au cours du cycle mais pas dans le point de contrôle mitotique. Mad2B est une protéine nucléaire, mais pas kinétochorienne, qui peut inhiber *in vitro* la dégradation des substrats d'APC/C<sup>Cdh1</sup>, notamment la cyclineB et Cdc20, par un mécanisme similaire à celui qui contrôle l'activité d'APC/C<sup>Cdc20</sup> via Mad2 (Chen and Fang, 2001; Pfleger et al., 2001). La surproduction de Mad2B chez l'embryon de xénope conduit à

un arrêt en mitose tardive (rôle possible dans le contrôle de la cytotinèse) et en interphase, cohérent avec le "timing" d'activation d'APC/C<sup>Cdh1</sup> au cours du cycle (Pfleger et al., 2001). Son action ne semble pas restreinte aux cellules cyclantes, elle pourrait donc avoir un autre rôle physiologique, encore non déterminé (Chen and Fang, 2001).

f) Extinction du signal et inactivation du point de contrôle

Lorsque tous les chromosomes sont correctement accrochés au fuseau mitotique, le point de contrôle est désactivé et l'inhibition sur Cdc20 levée, autorisant l'activation d'APC/C, la dégradation des cohésines et la progression en anaphase. L'inactivation du checkpoint reposerait sur au moins 3 mécanismes différents (Bharadwaj and Yu, 2004; Cleveland et al., 2003; Howell et al., 2001; Wojcik et al., 2001) : l'inactivation de la signalisation au kinétochore, l'inactivation du complexe MCC cytoplasmique et/ou la levée de l'inhibition d'APC/C.

Le premier mécanisme implique l'inactivation des composantes du MCC, notamment via le contrôle de l'état de phosphorylation de Mad2. En effet, *in vitro*, certaines phosphorylations de son domaine C-terminal ont un effet inhibiteur sur sa capacité à lier Cdc20 et donc sur l'activation d'APC/C (Bharadwaj and Yu, 2004; Wassmann et al., 2003). De plus, chez le xénope, l'activation de la kinase BubR1 requiert CENP-E et son inactivation nécessite la capture de microtubules par le kinétochore (via CENP-E). Cette liaison kinétochore-microtubules, ou la tension qui en résulte, pourrait altérer l'interaction de CENP-E avec BubR1 (sans dissocier le complexe), inactiver BubR1 et éteindre la cascade de signalisation (Mao et al., 2003).

Le deuxième mécanisme est le démantèlement des complexes inhibiteurs d'APC/C présents dans le cytoplasme. Il est possible que ces complexes se dissocient spontanément après un certain temps mais il semble plus probable que cette dissociation résulte d'un phénomène actif, qui pourrait impliquer la protéine Cmt2 (p31<sup>comet</sup>) (Habu et al., 2002). En effet, Cmt2 interagit avec Mad2 en double hybride, dans les extraits de d'œufs de xénope et *in vivo* (Habu et al., 2002; Xia et al., 2004). De plus, Cmt2 se lie préférentiellement à Mad2 lorsque Mad2 est elle-même associée à Cdc20 (conformation N2 de Mad2) (Xia et al., 2004). La surexpression de Cmt2 permet à des cellules traitées au nocodazole d'échapper au blocage, et son invalidation (par ARN interférence) dans les cellules HeLa entraîne une activation prolongée du point de contrôle du fuseau mitotique (Xia et al., 2004). L'ensemble de ces

résultats suggère que l'implication de Cmt2 dans l'inactivation du MCC résulterait d'un rôle antagoniste de Cmt2 sur Mad2.

Enfin, un troisième mécanisme d'extinction du checkpoint repose sur l'apparition de contraintes spatiales qui éloignent les composants du MCC des kinétochores, lieu de son assemblage. La dynéine et la dynamitine (une sous-unité du complexe dynactine), qui s'accumulent aux kinétochores non-attachés en prométaphase puis migrent vers le pôle après ancrage des chromosomes, pourraient être impliquées dans ce processus. En bon accord avec cette hypothèse, une mutation particulière de la dynéine a été isolée chez la drosophile qui bloque la redistribution aux pôles de Rod, une protéine cargo liant la dynéine et conduit à l'activation permanente du point de contrôle du fuseau (Wojcik et al., 2001). De plus, l'injection d'anticorps bloquant anti-dynamitine aboutit au maintien des protéines du checkpoint au kinétochore, ce qui diminue la tension au kinétochore et induit un blocage en métaphase. Ce blocage peut être levé par une inactivation du checkpoint par ciblage de Mad2. La dynéine permettrait également le transport de Mad2, CENP-E et BubR1 le long des microtubules jusqu'aux pôles du fuseau, les éloignant ainsi de leurs cibles (Howell et al., 2001).

#### g) Sortie de mitose et dégradation des cyclines

Les cyclines B jouent un rôle majeur dans le contrôle de la mitose. Ces cyclines, synthétisées en interphase, sont essentielles à l'activation de cdk1 (cyclin-dependent kinase 1, aussi appelée cdc2) et à l'entrée en mitose (avec l'aide d'autres cyclines, notamment la cycline A inactivée en métaphase). L'inactivation de cdk1 est importante pour la sortie de mitose, notamment pour la décondensation des chromosomes, la reformation de l'enveloppe nucléaire et la division cellulaire (Peters, 2002). L'inactivation de cdk1 en fin de mitose résulte de la dégradation des cyclines B via un ciblage au protéasome par APC/C<sup>Cdc20</sup> en métaphase puis par APC/C<sup>Cdh1</sup> en anaphase (Figure 12). Une voie alternative est l'inhibition de cdk1 (moins fréquente chez les vertébrés).

### 5) Conséquences d'une activation prolongée du point de contrôle de fuseau mitotique

#### a) Les causes

Plusieurs types de traitements provoquent une perturbation prolongée de la mitose, notamment ceux qui bloquent la séparation des chromosomes, qui perturbent l'ancrage des

microtubules au kinétochores, qui empêchent l'inactivation des complexes cyclineB/cdk1 (indépendamment du checkpoint de G2/M) (pour revue (Morrison and Rieder, 2004; Rieder and Maiato, 2004)). Notons également que les traitements qui induisent des cassures en mitose, ou des anomalies de décaténation (inhibiteurs de topoisomérase II (Vogel et al., 2005)), gérées indépendamment du checkpoint des dommages de l'ADN et d'ATM (Mikhailov et al., 2002; Nitta et al., 2004; Skoufias et al., 2004). Des cellules peuvent également rentrer en mitose avec des cassures dans leur ADN si le point de contrôle qui surveille l'entrée en mitose (point de contrôle de la transition G2/M) est inhibé ou peu efficace (Nitta et al., 2004; Vogel et al., 2004; Vogel et al., 2005), ce qui est le cas pour de nombreuses cellules cancéreuses. Nous ne détaillerons ici que les traitements par les poisons du fuseau.

De nombreuses molécules, réparties en 2 grandes catégories selon leur mode d'action, perturbent la dynamique des microtubules et, de ce fait, la fonction du fuseau mitotique. Les premières, comme le nocodazole, la colchicine et la famille des vinka-alcaloïdes (vinblastine, navelbine, vincristine...), entraînent la dépolymérisation des microtubules. Les secondes, telles les drogues de la famille des taxanes (taxol, taxotère), stabilisent au contraire les microtubules (Tableau 8, pour revue (Peterson and Mitchison, 2002)).

Tableau 8: Mode d'action de différents poisons des microtubules.

Nom	Activité biologique	Classe <sup>a</sup>	Origine
Colchicine	se lie à la tubuline et empêche sa polymérisation dans les microtubules	<b>I</b>	Extrait de la colchique
Colcémide			Dérivé de la colchicine
Nocodazole (oncodazole)	se lie aux hétérodimères $\alpha$ - $\beta$ tubulines libres, catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP rendant ces dimères non incorporables dans les microtubules.	<b>I</b>	Synthétique de la famille du benzimidazole
Vinblastine (VB)	Inhibe l'assemblage des microtubules en se liant à la tubuline et induisant son auto-association (agrégats).	<b>I</b>	2 composés de la famille des vinca-alkaloïdes, chimiquement proches, extraits des feuilles de la pervenche de Madagascar
Vincristine (VC)	Utilisé dans le traitement des lymphomes de Hodgkin's (VB) et des leucémies (VC)		
Navelbine (vinorelbine)	Inhibe l'assemblage du fuseau mitotique. Agent anti-tumoral efficace car il a plus d'affinité pour les microtubules mitotiques que neuronaux.	<b>I</b>	Dérivé de la synthèse de la vinblastine
Taxol (paclitaxel)	Se fixe sur la $\beta$ -tubuline des microtubules et les stabilise, les rendant résistant à la dépolymérisation. Utilisé en chimiothérapie (cancer du sein et de l'ovaire, NSCLC).	<b>II</b>	Issu de l'écorce de <i>Taxus Brevifolia</i> (if du pacifique), synthétisé maintenant à partir de <i>Taxus yunnanensis</i> ou en semi-synthétique
Taxotère (docetaxel)	Se fixe sur la $\beta$ -tubuline des microtubules et les stabilise, les rendant résistant à la dépolymérisation. Utilisé en chimiothérapie.	<b>II</b>	Dérivé hémi-synthétique. issu de la baccatine III (précurseur non cytotoxique issu des aiguilles de <i>Taxus Baccata</i> ).

<sup>a</sup> **I** = dépolymérisation des microtubules; **II** = stabilisation des microtubules

Le traitement des cellules par les différents poisons du fuseau entraîne l'activation du point de contrôle du fuseau et un arrêt des cellules en mitose (voir §II-4 à partir p44). Certaines de ces drogues, comme le taxol ou la navelbine, sont utilisées en chimiothérapie (pour revue (Jordan and Wilson, 2004)).

#### b) Durée de l'arrêt

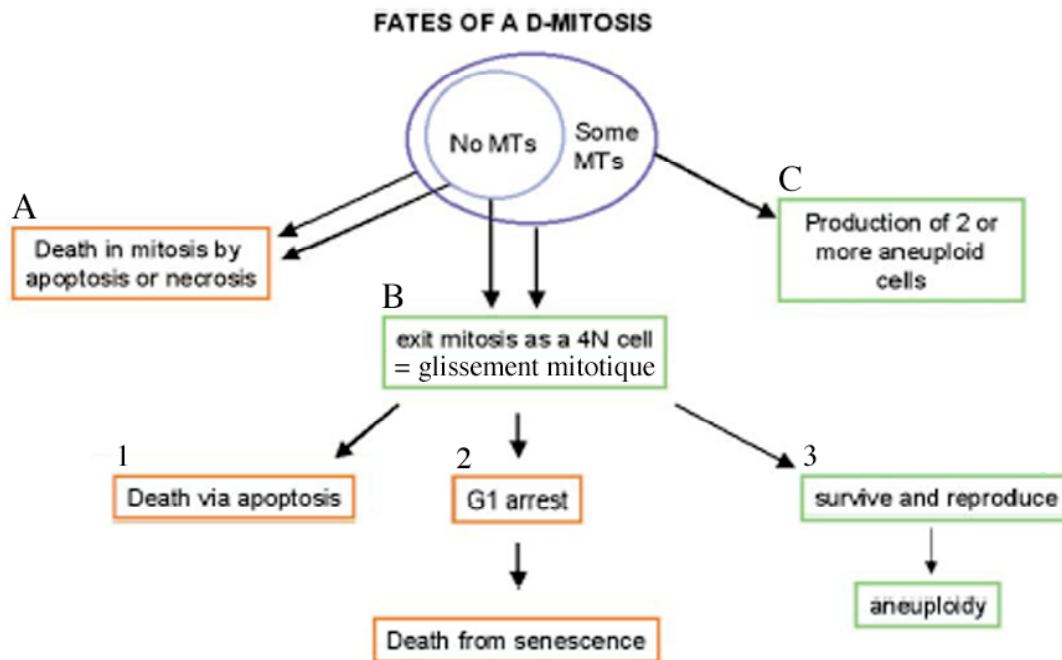
Il a été montré que l'arrêt en mitose de cellules cultivées en présence de ces drogues est transitoire, même si le défaut de fuseau persiste. La durée pendant laquelle les cellules restent bloquées est variable suivant les organismes et le type cellulaire. Elle est corrélée à la capacité des cellules à concentrer les drogues et au degré de perturbation du réseau des microtubules (nombre et dynamique) (pour revue (Rieder and Maiato, 2004)). Par exemple, une sortie prématurée de mitose peut être induite par inhibition d'Aurora-B dans des cellules traitées par de faibles concentrations de nocodazole ou de taxol, mais pas par de fortes concentrations (Ditchfield et al., 2003; Hauf et al., 2003). Le maintien de l'arrêt dépend aussi du profil génétique des cellules étudiées, notamment pour les gènes du point de contrôle du fuseau. En effet, les cellules invalidées pour les gènes du checkpoint (ARN interférence, anticorps bloquant, KO ...) sortent rapidement de mitose en absence de fuseau (Babu et al., 2003; Chan et al., 1999; Dai et al., 2004; Howell et al., 2004; Kalitsis et al., 2003; Meraldi et al., 2004a; Michel et al., 2001; Taylor and McKeon, 1997).

#### c) Les conséquences d'un arrêt prolongé en mitose

Après un temps de blocage variable, les cellules maintenues en présence de poisons du fuseau peuvent, en fonction de leur profil génétique, (A) mourir en mitose; (B) sortir de mitose avec un contenu en ADN 4C par un phénomène appelé "adaptation" ou "glissement mitotique"<sup>9</sup>. Ces cellules vont ensuite, soit mourir par apoptose en G1, soit rester à l'arrêt en G1 (viables plusieurs jours), soit poursuivre le cycle tétraploïde entamé (Figure 17) ((Rieder and Maiato, 2004) et article 4); (C) s'il reste quelques microtubules, une mitose imparfaite sur le plan de la ségrégation des chromosomes pourra donner des descendants aneuploïdes.

---

<sup>9</sup> Les chromosomes décondensent leur ADN, l'enveloppe nucléaire se reforme et les cellules rentrent dans une phase G0/G1 avec un contenu d'ADN 4C (C représentant ici un équivalent génome haploïde).



*Figure 17: Devenir des cellules après un arrêt prolongé en mitose. D'après (Rieder and Maiato, 2004)*

### **c-1 La mort en mitose**

La mort en mitose, au moins dans le cas de la catastrophe mitotique <sup>10</sup> (Castedo et al., 2004), implique l'activation des caspases-2, la perméabilisation des membranes mitochondriales puis l'activation de la caspase-3, indépendamment de p53 (Casenghi et al., 1999). Lorsque les cellules ne peuvent sortir rapidement de mitose, l'activation de la caspase 2 déclenche irréversiblement le processus apoptotique ((Gajate et al., 2000; Masuda et al., 2003; Taylor and McKeon, 1997) pour revue (Rieder and Maiato, 2004)). La résistance de certaines cellules à un agent comme le taxol, utilisé en chimiothérapie, a été corrélée à la perte du point de contrôle du fuseau ou à celle de l'activité des caspases (Burns et al., 2003; DeLuca et al., 2002; Sudo et al., 2004).

### **c-2 Le glissement mitotique: un mécanisme peu connu**

Bien que certaines cellules des vertébrés meurent après un traitement prolongé par les poisons du fuseau, beaucoup de cellules primaires ou transformées effectuent le glissement mitotique et entrent en G1 tétraploïde (Ciciarello et al., 2001; Jimenez et al., 1999; Khan et al., 2000; Mantel et al., 2002; Rieder and Maiato, 2004; Stewart et al., 2001; Trielli et al., 1996; Tsuiki et al., 2001).

<sup>10</sup> La catastrophe mitotique est une mort cellulaire intervenant en mitose à la suite de l'accumulation de dommages extensifs et persistants (dont l'origine n'est pas toujours mitotique).

Dans une mitose "normale", l'inhibition des cyclines mitotiques est requise pour sortir de mitose (cf § II-4g, p59). Le glissement pourrait théoriquement survenir par 3 mécanismes mutuellement non exclusifs: la destruction des cyclines mitotiques (voie du protéasome), l'inhibition de cdk1/cyclineB par phosphorylation sur les tyrosines, l'inhibition des CDK par les CKI (CDK inhibitor) (Chibazakura et al., 2004). En fait, le mécanisme par lequel les cellules sortent effectivement de mitose sans avoir satisfait le point de contrôle du fuseau mitotique est largement inconnu, et les informations dont nous disposons proviennent principalement d'études chez *S. cerevisiae* et la drosophile (pour revue (Rieder and Maiato, 2004)). En effet, en présence d'un signal persistant du point de contrôle mitotique, l'inhibition de cyclineB/CDK1 par les CKI Sic1 chez la levure et Rux chez la drosophile semble permettre la sortie de mitose, indépendamment de la dégradation des cyclines B (pour revue (Rieder and Maiato, 2004)). Chez les vertébrés, qui semblent manquer de CKI spécifiques des complexes CDK1/cyclineB, presque rien n'est connu sur le mécanisme d'adaptation. Il semble que la disparition de l'activité des CDK associée aux cyclines A, nécessaire au déclenchement des premières étapes de mitose (Furuno et al., 1999), soit assurée par 2 voies redondantes : la dégradation de ces cyclines et l'inhibition des CDKs qui leur sont associées par p21, p27 ou p107 (une protéine " pocket " de la famille pRB) (Chibazakura et al., 2004). Nous ne savons pas actuellement s'il en est de même pour la régulation des cyclines B.

### **c-3 Le G1 post-glissement**

Les cellules "normales" ayant subi le glissement mitotique resteront bloquées en G1 post-mitotique tétraploïde (Figure 17,B2) alors qu'une majorité des cellules transformées ou cancéreuses, re-répliqueront leur ADN et continueront à cycler (Figure 17, B3) ( article 4). L'activité p53 est requise pour empêcher les cellules G1 tétraploïdes de continuer leur cycle et d'entrer en phase S (Andreassen et al., 2003; Baek et al., 2003; Casenghi et al., 1999; Ciciarello et al., 2001; Jimenez et al., 1999; Sablina et al., 1999; Tsuiki et al., 2001). D'autres protéines impliquées dans le contrôle de la phase G1 (Figure 18) comme p21, une des cibles de p53 (Khan et al., 2000; Khan and Wahl, 1998; Lanni and Jacks, 1998; Mantel et al., 2002; Tsuiki et al., 2001), p19/ARF (souris; p14/ARF chez l'homme) impliquée dans la stabilisation de p53 par inhibition de MDM2 (qui dirige p53 vers la voie du protéasome) (Khan et al., 2000), WARTS (serine/thréonine kinase) (Iida et al., 2004), pRB (Di Leonardo et al., 1997), p16/Ink4a un inhibiteur de phosphorylation de pRB (Khan and Wahl, 1998) sont aussi importantes pour maintenir l'arrêt en "G1" après le glissement.

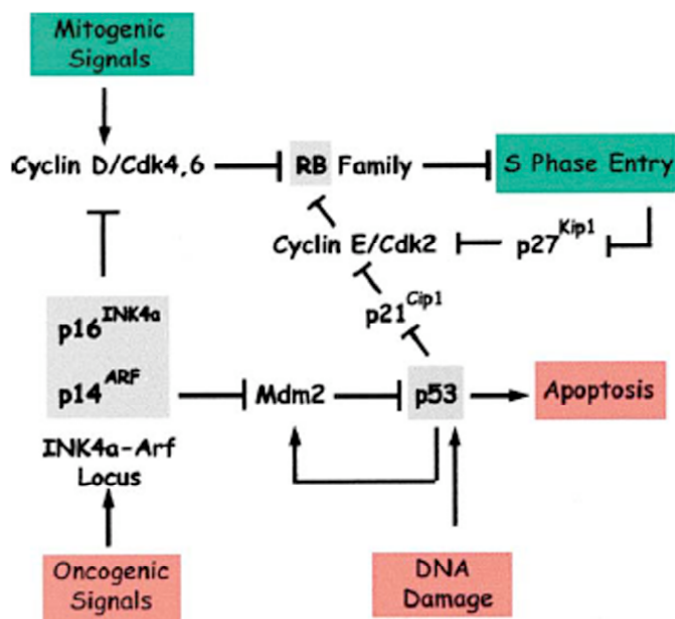


Figure 18: Schéma des voies de régulation du cycle cellulaire p53 et pRb chez l'homme. D'après (Sherr, 2004).

D'autres protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des dommages de l'ADN tels BRCA2 ou la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) semblent aussi contribuer au blocage de la reréplication après le glissement mitotique (Futamura et al., 2000; Halappanavar and Shah, 2004; Lee, 2003; Lee et al., 1999). Les signaux à l'origine de cet arrêt en G1 post-mitotique sont encore mal compris. De plus, quand la cytokinèse est perturbée par traitement à la dihydrocytochalasineB (DCB), un inhibiteur de l'actine qui n'active pas le point de contrôle de mitose, des cellules tétraploïdes binucléées sont formées. Ces cellules s'arrêtent en G1 de façon dépendante de pRB, p107, p130 (les pockets protéines) ainsi que de p53 (Andreassen et al., 2003; Lohez et al., 2003). Margolis et collaborateurs ont proposé l'existence d'un point de contrôle dépendant de p53 et pRB qui arrête en G1 les cellules devenues tétraploïdes (G1 tetraploidy checkpoint) après glissement mitotique ou suite à un problème de clivage cellulaire (pour revue (Andreassen et al., 2003)). Ce point de contrôle surveillerait le nombre de chromosomes et/ou de centrosomes par cellule. Cependant, des études récentes ((Ciciarello et al., 2001; Stukenberg, 2004; Uetake and Sluder, 2004), voir Discussion) contredisent ce modèle en montrant que la ploïdie n'est pas la cause de l'arrêt.

Les cellules en G1 tétraploïde qui passent ce second blocage re-répliquent leur ADN et continuent à cycliser. Elles vont accumuler des erreurs dans les cycles suivants notamment des erreurs de ségrégation des chromosomes, conduisant au développement de cellules filles aneuploïdes. Certaines d'entre elles pourront survivre et éventuellement devenir hautement tumorigène.



## 6) Anomalies du point de contrôle et tumorigénèse

Dès 1914, Théodore Boveri a proposé que l'instabilité chromosomique soit un des mécanismes majeurs conduisant à la néoplasie (Boveri, 1914). L'instabilité génomique<sup>11</sup> est une étape importante par laquelle une cellule peut acquérir les mutations caractéristiques d'un état cancéreux. Parmi les cellules tumorales, certaines ont un caryotype relativement stable et présentent un fort taux de mutations au niveau nucléotidique. Ce phénotype, souvent associé à une forte instabilité des microsatellites (MIN) (dans les HNPCC par exemple), résulte fréquemment d'altérations dans les gènes de réparation (mismatch repair ou nucleotide excision repair). Dans une majorité des cancers solides (environ 80 % des cancers colorectaux par exemple, (Dutrillaux, 1995; Lengauer et al., 1997)), les cellules présentent des anomalies de nombre et/ou de structure des chromosomes (translocations, inversions, délétions, amplifications (HSR, dmin)...) (Dutrillaux, 2000; Lengauer et al., 1998). Cette catégorie de tumeurs, dont les cellules manifestent une forte instabilité chromosomique (CIN), a fait l'objet de classifications plus précises, basées sur des études cytogénétiques poussées (Dutrillaux, 2000). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'instabilité chromosomique (Masuda and Takahashi, 2002), parmi lesquels des défauts des points de contrôle des dommages de l'ADN tout au long du cycle, l'érosion des télomères (conduisant à des fusions de chromosomes et à l'initiation de certains mécanismes d'amplification), et des défauts du contrôle de la mitose (les seuls que nous détaillerons ici).

### a) Inactivation des gènes du point de contrôle dans les cancers

L'altération du point de contrôle du fuseau mitotique, vu son importance pour la ségrégation correcte des chromosomes en mitose, semble un mécanisme probable pour le développement de cellules aneuploïdes (Cahill et al., 1998; Jallepalli and Lengauer, 2001). En bon accord avec cette hypothèse, environ 50% des lignées de cellules cancéreuses aneuploïdes testées ne marquent pas (ou peu) l'arrêt en mitose en présence de poisons du fuseau (Cahill et al., 1998; Li and Benezra, 1996; Matsuura et al., 2000; Minhas et al., 2003; Ouyang et al., 2002; Saeki et al., 2002; Takahashi et al., 1999; Wang et al., 2000; Weitzel and Vandre, 2000).

---

<sup>11</sup> Instabilité génomique: état cellulaire associée à une augmentation du taux d'altérations génomiques (mutations, réarrangements chromosomiques, délétions et inversions)

### **a-1 Inactivation par mutation**

En analysant une collection de lignées dérivées de tumeurs du côlon, Cahill et collaborateurs ont identifié deux mutations somatiques dominantes dans le gène Bub1 et deux mutations dans le gène BuBR1 (les effets de ces dernières sur la fonction de BubR1 restant à démontrer) (Cahill et al., 1998). Par la suite, de nombreuses équipes ont recherché des mutations dans les gènes du point de contrôle du fuseau dans des tumeurs ou des lignées cellulaires tumorales de différentes provenances (Tableau 9). Leurs résultats suggèrent que ces gènes sont rarement mutés dans ces cancers. Cependant, on ne peut exclure, étant donné le nombre important de gènes impliqués dans ce point de contrôle, que chacun d'eux puisse être muté seulement dans une petite fraction des cancers.

### **a-2 Dérégulation de la transcription**

D'autres mécanismes que les mutations existent pour inactiver le point de contrôle. Par exemple, en 1996, Li et collaborateurs ont observé une diminution de l'expression du gène Mad2 dans une lignée de cancer du sein déficiente pour l'arrêt en mitose (Li and Benezra, 1996). Des anomalies de transcription de ce gène, associées à des défauts du point de contrôle, ont été également observées dans des lignées cellulaires dérivées de cancers de l'ovaire (Wang et al., 2002), de cancers du sein (Percy et al., 2000), de cancers nasopharyngés (Wang et al., 2000) et dans des lignées d'hépatocarcinome (HCC) (Jeong et al., 2004). Dans l'étude la plus récente, la faible expression du gène Mad2 a été corrélée avec une hyperméthylation de son promoteur (Jeong et al., 2004), suggérant un mécanisme d'inactivation par un processus épigénétique. Une expression atténuée de BubR1 a aussi été observée dans des adénocarcinomes du colon (31%) (Shin et al., 2003) et des cancers colorectaux (10%) (Shichiri et al., 2002), ainsi que de Bub1 dans des cancers colorectaux (10%) (Shichiri et al., 2002) et des leucémies myéloïde aigue (AML) (30%) (Lin et al., 2002). De plus, les cellules dans lesquelles un gène du checkpoint a été intentionnellement inactivé ont un taux élevé de perte de chromosomes à chaque génération conduisant à un fort degré d'aneuploïdie (Babu et al., 2003; Baker et al., 2004; Dai et al., 2004; Michel et al., 2001; Weaver et al., 2003) et les souris hétérozygotes mutantes pour ces gènes développent des cancers du poumon (Dai et al., 2004; Michel et al., 2001).

Tableau 9 : Mutations dans les gènes du point de contrôle du fuseau mitotique dans les lignées de cellules cancéreuses ou les tumeurs.

Références	Echantillons	Gène	technique	Commentaires
(Cahill et al., 1998)	19 lignées cellulaires de cancer colorectal avec un phénotype CIN	<i>Bub1</i>	RT-PCR + séquençage	1mutation DCL (somatique) 1mutation FS <sup>1</sup> (somatique)
		<i>BubR1</i>		1mutation FS (germinale) 1mutation DCL (somatique)
(Cahill et al., 1999)	19 lignées cellulaires de cancer colorectal (les mêmes que (Cahill et al., 1998))	<i>Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, Mps1, Cdc20</i>	PCR séquençage	Pas de mutations somatiques mais des polymorphismes (sauf Bub3)
(Imai et al., 1999)	32 cancers sporadiques du tube digestif	<i>Mad2</i>	RT-PCR - SSCP + séquençage	pas de mutation dans le gène Mad2
		<i>Bub1</i>		1mutation FS (?)
(Yamaguchi et al., 1999)	6 HNSCC 25 cancers du poumon	<i>Bub1</i>	Test expression + séquençage	Bub1 est exprimé partout 1 mutation S (poumon)
(Takahashi et al., 1999)	21 lignées de cancer du poumon	<i>Mad2</i> <i>Cdc20</i>	RT-PCR - SSCP	1 mutation S (Mad2) pas de mutation de cdc20
	25 tumeurs primaires du poumon			pas de mutation Mad2 ou de cdc20
(Nomoto et al., 1999)	49 tumeurs du poumon	<i>Mad1</i>	RT-PCR - SSCP	1 mutation FS (somatique) 1 mutation FS (?)
(Sato et al., 2000)	50 lignées du cancer du poumon à petite cellules 52 lignées de cancer du poumon non à petite cellules (NSCLC) 4 lignées de mésothéliome	<i>BubR1</i>	Southern blot- Northern Blot PCR-SSCP	pas de délétions, remaniements, différence de niveau d'expression, de mutations dans BubR1
		<i>Bub1</i>		1 mutation FS (NCI-H345) (Bub1)
(Ohshima et al., 2000)	10 ATLL (lymphoma/leucémies des cellules T adultes) 8 lymphomes de cellules B (LB)	<i>Bub1</i>	RT-PCR, PCR nichée, Séquençage	1mutation FS (ATLL)
		<i>BubR1</i>		1 délétion 47pb (ATLL) 2 mutations FS (ATLL) 2 mutations S (ATLL; LB)
(Gemma et al., 2000)	30 lignées de cancer du poumon 30 tumeurs primaires du poumon	<i>Bub1</i>	PCR-SSCP, séquençage	3*1 mutation S (lignées Lu134, Lu135, SBC-5) (Pol?) 1mutation FS (somatique) (tumeur)
(Jaffrey et al., 2000)	32 cancers colorectaux (CRC) primaires 20 NSCLC	<i>Bub1</i>	Séquençage partiel + LOH	Aucune mutation mais de l'instabilité allélique (CRC uniquement)
(Percy et al., 2000)	22 lignées aneuploïdes de cancer du sein 5 lignées d'épithéliales mammaires normales immortalisées	<i>Mad2</i>	Northern Blot RT-PCR séquençage	différences d'expression de Mad2 (1+ /2-) dans 3 lignées cancéreuses. 1 mutation (DCL) protéine tronquée (CAL51)

(Myrie et al., 2000)	19 lignées de cancer du sein aneuploïdes	<i>Bub1</i> <i>BubR1</i>	Northern Blot RT-PCR séquençage	Niveau d'expression variable Pas de mutations mais des polymorphismes
(Wang et al., 2000)	5 lignées cellulaires de carcinome "nasopharyngeal"	<i>Mad1</i> , <i>cdc20</i> , <i>Mad2</i>	Séquençage Western blot	2 lignées déficientes pour le point de contrôle M diminution expression de <i>Mad2</i> mais pas de mutation
(Hernando et al., 2001)	44 tumeurs primaires de la vessie 42 sarcomes des tissus mous 10 carcinomes hépatiques	<i>Mad2</i> ,	PCR-SSCP séquençage	1 mutation FS (Pol) 2 mutations S (Pol)
	43 tumeurs de la vessie 9 lignées cellulaires de cancer de la vessie	<i>Bub1</i>		2 mutations S (Pol)
	9 lignées de cellulaires de cancer de la vessie	<i>Bub3</i>		Pas de variation de séquence
(Mimori et al., 2001)	59 lignées cellulaires de cancer multiple (dont 25 carcinomes de l'œsophage)	<i>Bub1</i>	RT-PCR-SSCP séquençage	2 mutations S (KYSE190, TE8 ) (œsophage) 1 mutation S (KATOIII) (cancer gastrique) 1 mutation S (697) (leucémie B)
(Haruki et al., 2001)	44 cas de cancer du poumon	<i>Bub1</i>	RT-PCR-SSCP	Pas de mutation somatique
		<i>BubR1</i>		3* 1 mutation FS (Pol?)
		<i>Bub3</i>		5'UTR -6 C→T (Pol)
(Olesen et al., 2001)	15 tumeurs invasives de la vessie 6 lignées cellulaires aneuploïdes de cancer de vessie	<i>Bub1</i> , <i>Bub3</i> <i>BubR1</i> <i>TTK (Mps1)</i>	RT-PCR séquençage LOH	Polymorphisme (sauf <i>Bub3</i> ) 1 mutation FS (Pol ?) (TTK) 1 cas de LOH détecté pour chaque gène sauf <i>Bub1</i> .
(Reis et al., 2001)	22 glioblastomes	<i>Bub1</i>		1 mutation S
		<i>BubR1</i>		2 mutations S (pol?)
		<i>Bub3</i>		5'UTR -6 C→T (Pol)
(Iwanaga et al., 2002)	17 tumeurs solides 6 lignées transformées par HTLV-1	<i>Mad1</i>	séquençage	4 mutations S 3 mutations FS 1 mutation FS ( <i>Arg→His</i> ) 50% (pol) <sup>3</sup>
(Nakagawa et al., 2002)	9 lignées cellulaires de cancer "oral"	<i>Bub1</i>	PCR-SSCP	Pas de mutation détectée dans les exons analysés (8, 10, 12, 15 et le domaine kinase)
(Ouyang et al., 2002)	9 adénomes folliculaires (FA) de la thyroïde 9 carcinomes folliculaires (FC) de la thyroïde 8 lignées cellulaires de tumeurs de la thyroïde	<i>Bub1</i> <i>BubR1</i>	SSCP séquençage	3/8 (NPA, FRO, WRO) pas d'accumulation en M en nocodazole. 1 mutation S (FRO) ( <i>BubR1</i> ) 1 mutation DCL (FC #7) ( <i>Bub1</i> )

(Ru et al., 2002)	6 Lignées cellulaires de cancer du sein	<i>Bub1</i>	RT-PCR, séquençage	Aucune mutation dans les lignées de cancer du sein.	
	7 lignées de leucémies lymphoblastiques T et leucémie myéloïde chronique			3 mutations par délétion (MOLT3, MOLT4A3, K562)	
	2 leucémies lymphoblastiques aiguës (ALL)			1 délétion (ALL2)	Δdans le domaine de liaison au KTC
	2 lymphome de Hodgkin's			2 délétions (HD1, HD2)	
	2 leucémies myéloïdes aiguës (AML)			Aucune mutation	
(Saeki et al., 2002)	8 lignées d'hépatocarcinome (HCC)	<i>Bub1, BubR1, Mad2B, Bub3, Cdc20</i>	Northern + séquençage	5/8 HCC ont un problème de checkpoint mitotique mais aucun changement d'expression (Bub1) ni mutation détectée (les 5 gènes)	
	50 HCC (patients)	<i>Bub1</i>		2 polymorphismes	
(Shichiri et al., 2002)	111/ 31 cancers coloproctaux (expression/mutations) 6 lignées cancéreuses	<i>Bub1, BubR1</i>	RT-PCR quantitative, PCR SSCP	1 mutation FS (Bub1) Pas de mutation pour BubR1 Expression <i>Bub1</i> ou <i>BubR1</i> <50% dans 10% cancers	
(Hempfen et al., 2003)	9 lignées cellulaires de cancer du pancréas 9 xénogreffes	<i>Bub1</i>	RT-PCR, séquençage	2 mutations FS (Hs766T) sur le même allèle	
(Langerod et al., 2003)	20 cas de tumeur du sein, instable génétiquement (CGH), p53 <sup>+/+</sup>	<i>BubR1</i>	PCR, séquençage	Pas de mutation dans <i>BubR1</i> , (Pol)	
		<i>Bub1</i>		2 *1 mutation S (MT5, MT18) (pol) 2 *1 mutation (MT31, MT51) (intron) ""	
(Wang et al., 2004c)	24 tumeurs colorectales (premier screen) 168 tumeurs colorectales supplémentaires	100 gènes analysés dont <i>Zw10, Rod, Zwilch</i>	PCR séquençage	2 mutation FS (ZW10) (somatique) 1 mutation FS (Rod) (homozygote/somatique) 1 DCL protéine tronquée (Zwilch) (changement G/A site accepteur d'épissage)	

<sup>1</sup>mutation DN quand l'allèle est surexprimé dans des lignées cellulaires MIN.

<sup>2</sup> devrait entraîner la délétion d'une partie du domaine kinase

<sup>3</sup> ce polymorphisme induit un changement dans un des 2 domaines "leucine zipper" de Mad1, conduisant à une diminution de l'interaction Mad1/Mad2, entraînant une moins bonne activité du checkpoint.

DCL: mutation induisant un décalage du cadre de lecture, FS: mutation faux-sens, S: mutation silencieuse, Pol: polymorphisme, Les cases rouges représentent les études dans lesquelles des mutations des gènes du checkpoint sont avérées, les cases bleues celles avec des changements d'expression de gènes.

La surexpression de certains gènes perturbe également le point de contrôle. Ainsi le gène Mad2, qui semble répondre à l'activateur transcriptionnel E2F, est surexprimé dans les cellules où ce facteur est activé constitutivement par inactivation de RB, un évènement fréquent dans les cellules cancéreuses (Hernando et al., 2004). Cette dérégulation est corrélée à l'apparition d'une anomalie du point de contrôle du fuseau et d'un phénotype CIN (Hernando et al., 2004). Une surexpression de Mad1 a également été détectée dans certains cancers ainsi que dans les cellules exprimant un mutant gain de fonction de p53 (Iwanaga and Jeang, 2002; Iwanaga et al., 2002).

### **a-3 Inhibition post-traductionnelle**

Des mécanismes additionnels d'inactivation du point de contrôle ont été décrits dans certains cancers. Par exemple, la protéine Tax du virus HTLV-1 (human T lymphotropic virus type 1), perturbe l'homodimérisation de Mad1. Les monomères étant préférentiellement ciblés pour la dégradation, le point de contrôle est inactivé dans les cellules infectées, favorisant la formation de cellules aneuploïdes multinucléées typiques des leucémies des cellules T de l'adulte (Jin et al., 1998). L'antigène T du virus SV40 (Simian Virus 40), quant à lui, perturbe le point de contrôle via sa capacité à interagir avec Bub1. Cette propriété est corrélée avec la capacité de transformation du virus (Cotsiki et al., 2004).

Enfin, l'expression de la protéine BCSG1 (breast cancer-specific gene1) dans les cellules de cancers du sein entraîne la dégradation de BubR1, probablement via le protéasome, et la perte du checkpoint de fuseau. L'expression de BCSG1 est spécifiquement associée au développement et à la progression des cancers du sein vers des stades avancés (Gupta et al., 2003).

### **a-4 Prédisposition au cancer et aneuploidie constitutionnelle**

Le syndrome MVA (mosaic variegated aneuploidy [OMIM 257300]) est caractérisé par un retard de croissance, une microcéphalie, un risque élevé de cancer chez l'enfant (tumeur de Wilms, rhabdomyosarcome, leucémie) et une aneuploidie "mosaïque" (principalement des monosomies et trisomies) impliquant de nombreux chromosomes dans les cellules de différents tissus (Hanks et al., 2004; Matsuura et al., 2000). Une première étude a montré que des fibroblastes issus de patient MVA ne s'arrêtent pas en mitose après traitement par un inhibiteur des microtubules (Matsuura et al., 2000). Très récemment, Hanks et collaborateurs ont démontré que ce phénotype résulte, dans 5 familles sur 8 étudiées, de mutations germinales récessives dans le gène BubR1. En effet, dans chacune des 5 familles ont été

trouvées une mutation faux-sens sur un allèle et une mutation conduisant soit à une absence de transcrite soit à une protéine tronquée sur l'autre allèle (Hanks et al., 2004). L'identification de mutation de BubR1 dans un syndrome de prédisposition au cancer renforce la conclusion des études précédentes montrant que l'aneuploidie contribue au développement des cancers.

## b) Autres défauts de mitose

### **b-1 Cohésion anormale des chromatides soeurs**

Des défauts dans la voie de signalisation en aval du point de contrôle peuvent également contribuer au développement de tumeurs. En effet, le gène de la sécurine, d'abord identifié comme "pituitary tumour-transforming gene" (PTTG), est surexprimé dans certains cancers colorectaux (Heaney et al., 2000), dans des adénomes pituitaires (Saez et al., 1999) et des cancers hématopoïétiques (Dominguez et al., 1998). Sa surexpression dans des fibroblastes les rend tumorigènes chez la souris nude (Pei and Melmed, 1997). Les cellules securine<sup>-/-</sup>, qui activent prématurément la séparase (Jallepalli et al., 2001), présentent, comme les cellules qui la surexpriment, des défauts de séparation des chromatides sœurs (non-disjonction), une mauvaise ségrégation des chromosomes et des aneuploïdies (revue dans (Jallepalli and Lengauer, 2001)).

### **b-2 Anomalies du centrosome**

Les centrosomes ont un rôle central dans l'organisation du fuseau mitotique: leur non-duplication ou leur amplification pouvant respectivement conduire à la formation d'un fuseau monopolaire ou multipolaire et à des défauts de ségrégation. Des centrosomes anormaux (en nombre, structure, taille) sont fréquemment observés dans les cellules cancéreuses. Les causes de ces anomalies sont multiples, elles peuvent par exemple résulter d'un échec de la mitose ou de la cytokinèse suivi d'un cycle de replication. De même, la surexpression d'Aurora-A provoque une augmentation du nombre de centrosomes et de l'aneuploidie (Andrews et al., 2003; Meraldi et al., 2004b). La région 20q13 qui porte le gène Aurora-A a été fréquemment trouvée amplifiée dans les cancers (pour revue (Masuda and Takahashi, 2002)).

### **b-3 Mutations du gène APC et instabilité chromosomique**

Le gène suppresseur de tumeur adenomatous polyposis coli (APC) est fréquemment muté dans les cancers (notamment dans les formes familiales de cancers du côlon), conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée (Sieber et al., 2002). Outre son rôle dans la voie de

signalisation Wnt et la régulation la dégradation de la  $\beta$ -caténine (Polakis, 2000), APC est important pour la ségrégation des chromosomes en mitose (Kaplan et al., 2001). La protéine se lie au cortex cellulaire ainsi qu'aux extrémités des microtubules, les stabilisant. L'expression d'une forme tronquée d'APC suffit à induire des défauts d'attachement des extrémités plus des microtubules et se comporte donc comme un dominant négatif (Green and Kaplan, 2003). Les cellules exprimant ces formes mutées d'APC présentent, *in vivo* et *in vitro*, des défauts de ségrégation des chromosomes (ponts chromatidiens, chromosomes non alignés) et une forte instabilité chromosomique (CIN) (Kaplan et al., 2001).



## **Résultats**

## ARTICLE 1

### **Induction of multiple double-strand breaks within an hsr by meganuclease I-SceI expression or fragile site activation leads to formation of double minutes and other chromosomal rearrangements**

Arnaud Coquelle, Lorène Rozier, Bernard Dutrillaux and Michelle Debatisse

Oncogene, 2002, **21** (50) p 7671-7679

L'amplification génique est une caractéristique fréquemment observée dans les cellules tumorales. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction (voir I-5b), les mécanismes à l'origine de l'amplification extrachromosomique sont encore mal connus. En effet, dans les systèmes modèles, les dmins sont souvent observés dans des cellules n'ayant pas d'anomalies chromosomiques détectables, indiquant que leur formation survient par un mécanisme différent de celui de l'amplification intrachromosomique. Le mécanisme le plus probable impliquerait l'excision d'une boucle d'ADN (looping-out), un processus qui, à la différence des cycles de CFP, n'affecte pas la région télomérique du chromosome (Coquelle et al., 1997; Toledo et al., 1993). Cependant dans d'autres cas, la présence de copies extrachromosomiques a été corrélée à des réarrangements importants du chromosome qui portait initialement le locus (Ruiz and Wahl, 1990; Windle et al., 1991), indiquant que la formation des dmins dépend soit d'un mécanisme encore non identifié, soit d'événements secondaires provoquant une réorganisation des copies amplifiées initiales. Dans les systèmes modèles, des réarrangements des structures amplifiées ont été fréquemment observés au cours de l'expansion clonale. Un type d'évolution actuellement bien démontré correspond à la fusion des dmins et leur réintégration dans les chromosomes, formant des HSR secondaires qui ressemblent aux structures complexes et composites observées dans certaines tumeurs avancées (Coquelle et al., 1998; Ruiz and Wahl, 1990; Windle et al., 1991). L'analyse de l'amplification dans des lignées de cellules tumorales humaines (HeLa, lignées de neuroblastome) a suggéré que dans certains cas, les dmins peuvent être formés par fragmentation d'une HSR (Balaban-Mallenbaum et al., 1981; Singer et al., 2000). Dans cet article, nous avons cherché à déterminer si un tel mécanisme d'interconversion des HSRs en dmins existe et dans ce cas, s'il est activé par la présence de cassures double brin (DSB).

Nous avons employé pour répondre à ces questions un système expérimental basé sur l'utilisation de la méganucléase I-Sce1 (*S. cerevisiae*) qui génère des DSB ciblées dans l'ADN (Dujon, 1989). Cette enzyme reconnaît un site (IS) de 18 bp qui est absent de la plupart des génomes et peut y être introduit par transfection. L'expression de l'enzyme I-Sce1 dans les cellules contenant l'IS induit alors des DSB site-spécifique (Jasin, 2000; Pipiras et al., 1998; Richardson and Jasin, 2000). Dans le laboratoire, des clones dérivés de la lignée de hamster chinois GMA32, contenant l'IS inséré dans divers chromosomes ont été isolés, parmi lesquels le clone 112. Dans ce clone, un site unique a été intégré sur le bras p du chromosome 2 à environ 3 Mb du gène *dhfr*, en position télomérique par rapport à ce gène, sans causer d'autres réarrangements (Pipiras et al., 1998). La sélection de mutants résistants au MTX à partir des

cellules 112 conduit à la formation d'HSR contenant des copies multiples du gène *dhfr*, cible de la sélection par MTX, et d'IS passivement co-amplifiés avec ce gène (des exemples de l'organisation des structures amplifiées observées dans le clone 112-MTX1 sont présentés dans la figure 2 de l'article) (Pipiras et al., 1998). Deux clones mutants, 112-MTX1 et 112-MTX2, ont servi de modèle pour étudier l'effet de cassures multiples ciblées dans l'HSR après transfection de ces cellules par un plasmide permettant l'expression du gène I-Sce1.

Nous avons ainsi pu démontrer que la transfection par le plasmide codant I-Sce1, mais pas par le plasmide contrôle, conduit à déstabiliser l'HSR dans environ 25% des cellules (correspondant à l'efficacité de transfection). L'apparition de dmins a été observée dans 20% des cellules I-Sce1 contre 1% dans les contrôles (Tableau 1). Cette apparition des dmins est associée à une disparition de l'HSR ou au moins à une diminution de sa taille (figure 3). Si dans ces conditions expérimentales la formation des dmins représente la majorité des événements, d'autres remaniements ont été également observés dans ces cellules, parmi lesquels des inversions de la région 2p portant l'amplification. Ces inversions paracentriques sont explicables par 2 cassures I-Sce1, l'une dans l'HSR et l'autre au site IS initial (présent dans les clones 112), le fragment excisé étant ensuite réintégré en orientation inverse dans le chromosome. Plus rarement, les cassures ont déclenché la formation d'anneaux et de translocations (figure 4). Ces 2 derniers types de réarrangement peuvent s'expliquer par la formation d'une cassure I-Sce1 au niveau du locus amplifié et d'une cassure indépendante d'I-Sce1 en 2q (anneau) ou sur un autre chromosome (translocation). La présence constante de MTX dans le milieu de culture pourrait expliquer ce taux basal de cassures indépendantes d'I-Sce1.

Nous avons ensuite analysé l'effet des traitements par des inducteurs des sites fragiles (AP, AMD, hypoxie) sur les cellules 112-MTX dans des conditions produisant entre 5 et 10 cassures par métaphase. Nous montrons ici, que ces traitements, comme l'expression d'I-Sce1, conduisent à la déstabilisation de l'HSR (25% des cas). Des dmins de différentes tailles portant un nombre variable de copies du gène *dhfr* ont été observés dans 20% (drogues) ou 10% (hypoxie) des métaphases (Tableau 2). D'autres réarrangements, tels des translocations (de tout ou partie des copies amplifiées), des anneaux, des chromosomes dicentriques (surtout dans les cellules en hypoxie) ont été observés (figure 5) mais pas d'inversion. La formation de dmins à partir d'HSR a été également obtenue dans des clones amplifiés pour le gène *dhfr* sans IS après traitement AP, AMD, hypoxie, ainsi que dans des clones amplifiés pour le gène *mdr1* (après sélection par ADR ou AMD), après traitement par l'AP ou le MTX. Ceci démontre que l'interconversion des HSRs en dmins après induction de cassures n'est pas

restreinte à un locus particulier. Nous démontrons donc ici l'existence d'une nouvelle voie de formation des dmms (figure 1) expliquant l'existence de réarrangements du chromosome portant la copie endogène du gène.

# Induction of multiple double-strand breaks within an hsr by meganuclease I-SceI expression or fragile site activation leads to formation of double minutes and other chromosomal rearrangements

Arnaud Coquelle<sup>1</sup>, Lorène Rozier<sup>1</sup>, Bernard Dutrillaux<sup>1</sup> and Michelle Debatisse<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Unité de Cytogénétique Moléculaire et Oncologie (UMR 147 CNRS), Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cédex 05, France

Gene amplification is frequently associated with tumor progression, hence, understanding the underlying mechanisms is important. The study of *in vitro* model systems indicated that different initial mechanisms accumulate amplified copies within the chromosomes (hsr) or on extra-chromosomal elements (dmin). It has long been suggested that formation of dmin could also occur following hsr breakdown. In order to check this hypothesis, we developed an approach based on the properties of the I-SceI meganuclease, which induces targeted DNA double-strand breaks. A clone containing an I-SceI site, integrated by chance close to an endogenous *dhfr* gene locus, was used to select for methotrexate resistant mutants. We recovered clones in which the I-SceI site was passively co-amplified with the *dhfr* gene within the same hsr. We show that I-SceI-induced hsr breakdown leads to the formation of dmin and creates different types of chromosomal rearrangements, including inversions. This demonstrates, for the first time, a direct relationship between double-strand breaks and inversions. Finally, we show that activation of fragile sites by aphidicolin or hypoxia in hsr-containing cells also generates dmin and a variety of chromosomal rearrangements. This may constitute a valuable model to study the consequences of breaks induced in hsr of cancer cells *in vivo*.

*Oncogene* (2002) 21, 7671–7679. doi:10.1038/sj.onc.1205880

**Keywords:** I-SceI meganuclease; mammalian gene amplification; double-strand break repair; fragile sites; hypoxia; chromosomal rearrangements

## Introduction

Gene amplification is one of the most frequent alterations found in cancer cells and has been repeatedly correlated with over-expression of many different cellular oncogenes. Because this phenomenon contributes to tumor progression and tumorigenesis (Brison, 1993; Schwab, 1999), it is of importance to

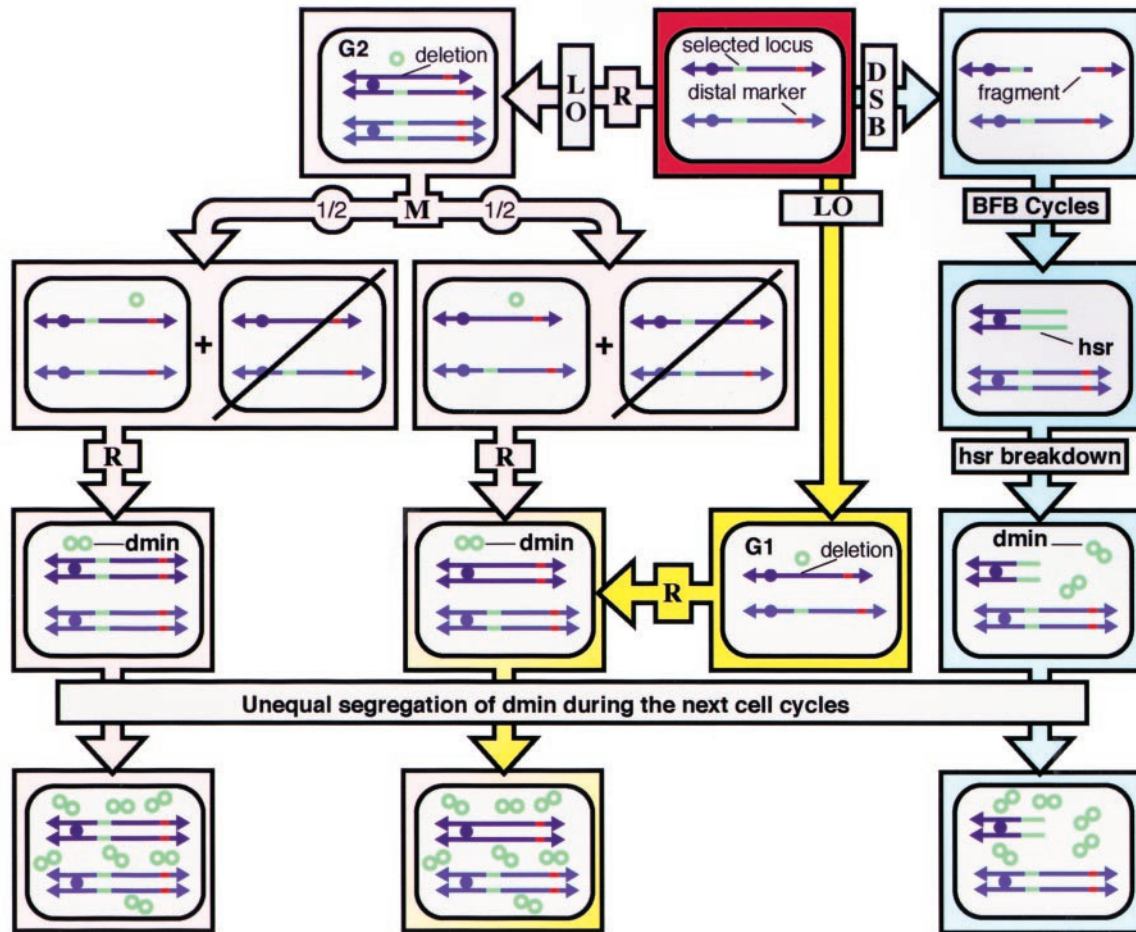
identify the mechanisms driving gene amplification in mammalian cells. In cells from advanced tumors, the reconstitution of these mechanisms is obscured by the occurrence of secondary rearrangements (Knudson, 2000; Nowell *et al.*, 1998). To avoid this problem, model systems were developed of cultured cells selected *in vitro* to resist inhibitors of enzymes essential for cell growth. This has enabled analysis of mutant cells a few generations after the initial event triggering the amplification process (Smith *et al.*, 1990).

These studies led to the identification of at least two different initial gene amplification mechanisms (Coquelle *et al.*, 1997; Carroll *et al.*, 1988; Ma *et al.*, 1993; Ruiz and Wahl, 1988; Smith *et al.*, 1992; Toledo *et al.*, 1992, 1993; Trask and Hamlin, 1989; Windle *et al.*, 1991). The breakage-fusion-bridge (BFB) cycle mechanism, first described by McClintock (1942), accumulates copies organized as large inverted repeats on a chromosome arm where one normal gene copy maps in non-amplified cells (Coquelle *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1993; Toledo *et al.*, 1992, 1993). The operation of this mechanism has been associated with the observation of fused sister chromatid, anaphase bridges and deletion of the distal part of the amplified chromosome arm (Figure 1) (Coquelle *et al.*, 1997; Toledo *et al.*, 1993). We also demonstrated that fragile sites, which are regions where recurrent breaks are detected in metaphase chromosomes when cells are grown under stressful conditions (Richards, 2001; Sutherland *et al.*, 1998), determine the size and the sequence content of early amplicons (Coquelle *et al.*, 1997).

Intermediates of BFB cycles, such as anaphase bridges and fused sister chromatids, were observed in cells amplified for different oncogenes (Gisselsson *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 2000), establishing the key role of BFB cycles during tumor progression (Knudson, 2000). More recently, the involvement of fragile sites in oncogene amplification in human cells as also been described (Hellman *et al.*, 2002).

Studies on model systems showing that cells containing dmin can be completely free of chromosomal rearrangements revealed the existence of an independent amplification mechanism, relying on looping out of megabase-long extra-chromosomal DNA sequences (Figure 1) (Coquelle *et al.*, 1997; Toledo *et al.*, 1992, 1993). Other observations correlated the presence of

\*Correspondence: M Debatisse; E-mail: michelle.debatisse@curie.fr  
Received 15 April 2002; revised 16 July 2002; accepted 16 July 2002



**Figure 1** Initial and secondary mechanisms of formation of dmin. Two homologue chromosomes are represented (light and dark blue). Symbols on the chromosomes are; arrowheads: telomeres, blue circles: centromeres, green sequence: sequence to be amplified, red sequence: distal marker. M: mitosis, R: replication, LO: looping-out, DSB: double-strand break, Red cell: parental cell in G1 phase. Pink and yellow pathways: initial mechanism relying on looping out of a sequence containing the selected gene. Yellow pathway: looping out of the sequence to be amplified in a cell in G1 phase. After one step of replication a dmin is formed. Uneven segregation of the extrachromosomal acentric molecules at mitosis during subsequent cell cycles leads to higher levels of amplification. The cells of the resulting clone are characterized by an interstitial deletion, corresponding to the excised sequence, on one homologue. Pink pathway: looping out in a cell in phase G2. One of the four chromatids of the cell is deleted. After mitosis, one daughter receives two normal chromosomes while the other one receives a normal and a deleted chromosome. In half the cases, the acentric molecule segregates within a cell with two normal chromosomes (left) which later gives rise to an amplified clone devoid of chromosomal abnormalities. In the other cases, the acentric molecule segregates within a cell with one normal and one deleted chromosome (right), a situation indistinguishable from the one depicted in the yellow pathway. The daughter cells that do not receive an extrachromosomal molecule are counter-selected in selective medium (black line). Blue pathway: mechanism relying on hsr breakdown. A DSB induces the BFB cycle mechanism, leading to intrachromosomal *in loco* amplification. Breakage of the hsr and subsequent formation of circular acentric molecules give rise to clones with dmin, the cells of which have a deletion of the distal part of one homologue. Until healing, this chromosome is unstable

dmin to chromosome breakage (Ruiz and Wahl, 1988; Windle *et al.*, 1991) but whether these features result from the operation of a particular mechanism or from secondary events leading to hsr disintegration is still debated. Thus, the nature of the mechanism(s) generating dmin *in vitro* and *in vivo* remains controversial.

In all model systems, rearrangements of the amplified copies were observed upon clonal expansion. For example, dmin can fuse and reintegrate into the chromosomes, giving rise to secondary hsr (Coquelle *et al.*, 1998; Ruiz and Wahl, 1988; Windle *et al.*, 1991), and it was demonstrated that these events are

stimulated by DNA double-strand breaks (DSB) (Coquelle *et al.*, 1998). On the other hand, the formation of dmin following breakdown of an hsr has also been proposed (Balaban-Mallenbaum *et al.*, 1981; Singer *et al.*, 2000). The aim of this study was to determine unambiguously whether such an inter-conversion pathway operates efficiently and whether double-strand breaks activate this putative process. For that purpose, we developed an experimental approach allowing us to generate multiple DSBs within an hsr by using a mitochondrial group I intron-encoded nuclease of *Saccharomyces cerevisiae* (I-SceI) (Dujon, 1989). The 18 bp recognition sequence of I-SceI (IS) is absent

from most genomes and can be introduced in mammalian cells upon transfection (Rouet *et al.*, 1994). I-SceI expression in cells containing IS induces site-specific DSBs (Jasin, 2000). Here, we isolated cells in which numerous copies of IS lie within an hsr, and we show for the first time that hsr breakdown resulting from multiple DSBs induced by Isce-I expression gives rise to dmin and/or chromosomal rearrangements. This clearly demonstrates that dmin can form through hsr breakage and points to the role of DSBs in triggering this phenomenon. Among the rearrangements observed, inversions were recurrently observed, which demonstrates that DSBs actively contribute to generate this category of chromosomal rearrangements.

We next studied the consequences of induction of fragile sites in cells containing an hsr. We previously demonstrated that oxygen privation (hypoxia), an important parameter of the tumor microenvironment (Brizel *et al.*, 1996; Graeber *et al.*, 1996; Kinzler and Vogelstein, 1996), which enhances gene amplification frequency (Luk *et al.*, 1990; Rice *et al.*, 1986), induces breaks at fragile sites (Coquelle *et al.*, 1998). Here we show that activation of fragile sites, by drugs such as aphidicolin or by hypoxia, induces hsr breakdown as do I-SceI induced DSBs. Therefore, various stresses are able to promote both the interconversion of hsr into dmin, and the formation of most types of chromosomal rearrangements frequently associated with late stages of gene amplification.

## Results

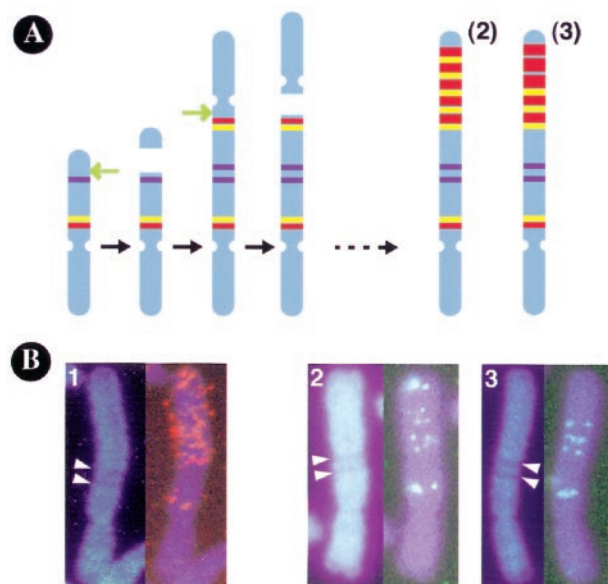
### *Design of a cellular model permitting induction of site-specific DSBs within an hsr*

In order to address the question of the possible generation of dmin from breakdown of a pre-existing hsr, we took advantage of a previously selected derivative of the GMA32 Chinese hamster cell line, named 112. Briefly, GMA32 cells were transfected with a plasmid bearing the I-SceI site (IS) and the neo gene. G418 resistant clones were selected for, and we mapped integrated plasmids in a large number of independent clones by using the fluorescent *in situ* hybridization technique (FISH). In cells of clone 112, a single copy of the plasmid was integrated by chance on the p arm of one chromosome 2, about 3 megabases telomeric to the *dhfr* locus, without further rearrangement of that chromosome (Pipiras *et al.*, 1998).

We reasoned that because of the localization of IS relative to the *dhfr* gene, methotrexate (MTX)-induced *dhfr* amplification events should lead to a passive co-amplification of IS. Thus, cells of line 112 were plated in MTX-containing medium at a concentration allowing the recovery of mutants amplified for the *dhfr* gene, without expression of the I-sceI enzyme. Clones were recovered at similar frequencies, regardless of whether the gene was amplified from the chromosome 2 bearing the plasmid or from the normal chromosome 2. Moreover, the localization of the extra-copies of the *dhfr* gene on the p arm of chromosome 2, and their

organization relative to the position of the characteristic DAPI band of this chromosome arm (an example is shown in Figure 2), were similar in the two categories of clones as well as in previously described mutants selected from the parental GMA32 cell line (Pipiras *et al.*, 1998). All these observations indicate that the transgene was neither initiating nor driving the amplification process in these experimental conditions.

We further analysed two clones, 112-MTX1 and 112-MTX2, in which the plasmid containing IS was passively co-amplified with the *dhfr* gene within an hsr exhibiting the structural features that characterize the operation of BFB cycles (Figure 2). In both mutants, we observed, from centromere to telomere of the amplified chromosome arm, one *dhfr* copy at its wild type location, a typical duplication of a dark DAPI band specific to a normal 2p arm, and a variable number of extra-copies of the *dhfr* gene. Figure 2B1 shows an example of such an hsr in 112-MTX1 cells. As expected from the joint operation of the BFB cycles



**Figure 2** Co-amplification of the I-SceI recognition sequence (IS) and the *dhfr* gene by BFB cycles in MTX-resistant mutants derived from line 112. (A) Model for the formation of an hsr containing both *dhfr* genes and IS. Red: *dhfr* gene. Yellow: IS. Dark blue: dark DAPI band specific to Chinese hamster chromosome 2p. Dotted arrow: multi-step formation of *dhfr*-containing hsr. Green arrows: breaks at fragile sites distal and proximal to the *dhfr* gene. According to the BFB cycle mechanism, a break at a fragile site distal to the *dhfr* gene initiates the process when followed by fusion of the broken sister chromatids, bridge formation and further break at mitosis. (2), (3) models for the structure of chromosomes exemplified in B2 and B3 respectively. (B) Examples of hsr in cells of clone 112-MTX1. (1), (2), (3): Left: DAPI staining. Arrowheads point to the duplicated 2p arm dark DAPI band, which indicates that the initiating break occurred distal to this band. Right: FISH with probes for the *dhfr* gene (1; revealed by rhodamine) or for the plasmid containing IS (2, 3; revealed by fluorescein). In cells of these clones, as shown (1), numerous *dhfr* extra-copies were present and distributed up to the extremity of the amplified chromosome 2p. (2) and (3) point to the high level of heterogeneity observed from cell to cell within each clone, both for the number and organization of IS along the hsr



and of superimposed mechanisms leading to rearrangement and shortening of the initial amplicons (Toledo *et al.*, 1992), the relative numbers of *dhfr* genes and of the IS-containing plasmid within the hsr vary from cell to cell in each clone. We generally detected three to seven copies of the plasmid within the hsr, as compared to tens of extra-copies of the *dhfr* gene (see Figure 2B for examples in clone 112-MTX1). In all the cells, the extra-copies of the *dhfr* gene were distributed up to the end of the amplified 2p (Figure 2B1), while significant variations were seen in the localization of the copies of the plasmid along the hsr of different cells (Figure 2B2,3). However, the existence of cells containing several IS within an hsr offered a convenient model to study the consequences of multiple site-specific DSBs occurring on a chromosome arm.

#### Formation of *dmin* through DSB-mediated hsr breakdown

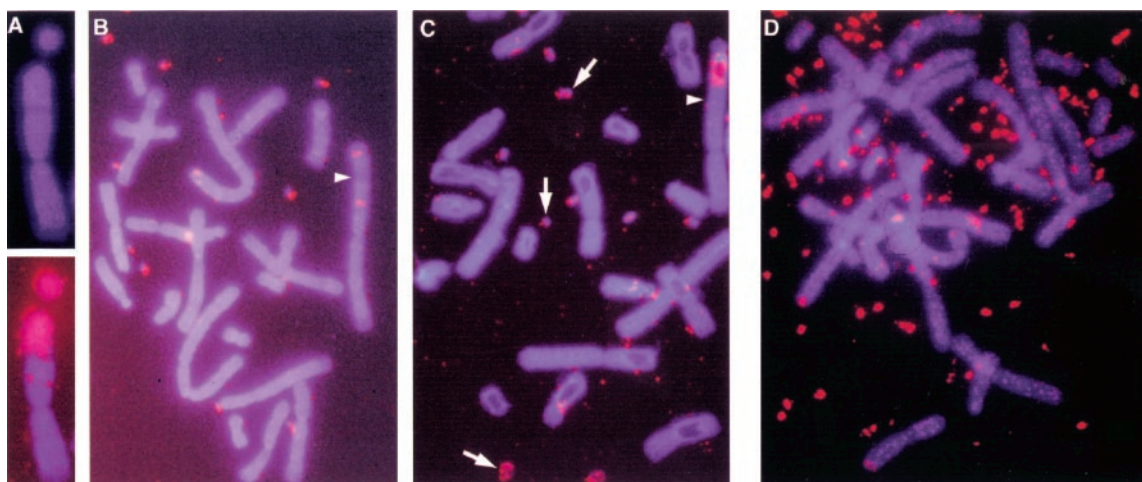
Clones 112-MTX1 and 112-MTX2 were transfected with a control plasmid (pcDL-SR $\alpha$ 296) or with a plasmid coding the I-SceI nuclease (pI-SceI) (Pipiras *et al.*, 1998). Experiments based on cotransfection of either plasmid with a plasmid coding for the green fluorescent protein (*gfp*) indicated that the transfection efficiencies routinely reached 20–25% (see Material and methods). Unless specifically mentioned, MTX was present in the culture medium at all steps of the experiments in order to select for cells that retain amplified copies of the *dhfr* gene. Five days after transfection, the cells were recovered and studied by FISH with cosmid probes specific for the *dhfr* locus. Following transfection with pI-SceI, about 25% of the cells demonstrated marked rearrangements associated with changes in the organization of the hsr. In particular, extrachromosomal copies of the selected

gene were frequently present in place of, or in association with, intrachromosomal copies of the gene (Figure 3). The extent of hsr breakdown was variable from cell to cell, possibly depending on the number and the localization of IS copies within individual hsr (Figure 3A,B,C). Hence, under such experimental conditions, *dmin* and hsr could be present in a single cell, at least transiently. Moreover, the size and the number of *dhfr* genes present on each extrachromosomal element were heterogeneous from cell to cell, as well as within individual cells in either clone (Figure 3C). The rest of the cells (about 75%) were apparently unaffected (not shown). The similarity of the frequencies of rearranged cells and of cells expressing the *gfp* protein strongly suggests that breaks occurred in all the cells that received the plasmid and that hsr breakage efficiently lead to *dmin* formation. In good agreement with this hypothesis, control experiments indicated that 3% at most of the cells transfected with pcDL-SR $\alpha$ 296 (or untreated) exhibited a rearranged hsr (Table 1) and/or *dmin*.

When transfected cell populations were grown for a few more days in medium containing MTX, some cells acquired a large number of *dmin* (Figure 3D). In striking contrast, cells containing extrachromosomal elements were no longer observed after around 2 weeks of growth in the absence of MTX (not shown). Taken together, these observations strongly suggest that the extrachromosomal elements formed upon hsr breakdown segregate unequally at mitosis, as do classical *dmin*.

#### I-SceI induced DSBs generate several types of chromosomal rearrangements, including inversions

The results presented above indicate that conversion of hsr into *dmin* represents the majority of the rearrange-



**Figure 3** Examples of I-SceI-induced hsr degradation generating extra chromosomal elements. (A) Formation of a chromosome fragment. Top: DAPI staining. Note the presence of a faint link between the fragment and the rest of the chromosome. Bottom: FISH with a probe for the *dhfr* gene (revealed by rhodamine). (B, C, D) Examples of cells containing extra chromosomal elements resulting from the degradation of the initial hsr. FISH with a probe for the *dhfr* gene (revealed by rhodamine). (B, C) Arrowheads point to amplified chromosome 2p. Note the variable number of extra-copies of the *dhfr* gene remaining on this chromosome. (C) Arrows point to extra chromosomal elements heterogeneous in size and in *dhfr* gene copy number within the same cell. (D) Cell exhibiting a very high number of *dmin*

**Table 1** Effects of I-SceI transfection on the stability of hsr containing amplified *dhfr* genes

Clone	Transfection	Total number of metaphase plates scored	Cells with a rearranged hsr		Cells with <i>dmin</i> <sup>a</sup>		Cells with other rearrangements <sup>a</sup>	
			N	%	N	%	N	%
112-MTX1	None	318	7	2.2	4	1.3	3	0.9
	pcDL-SR $\alpha$ 296	301	10	3.3	7	2.3	4	1.3
	pI-SceI	405	111	27.4	97	24.0	41	10.1
112-MTX2	None	334	8	2.4	4	1.2	5	1.5
	pcDL-SR $\alpha$ 296	274	6	2.2	3	1.1	3	1.1
	pI-SceI	385	90	23.4	79	20.5	31	8.1

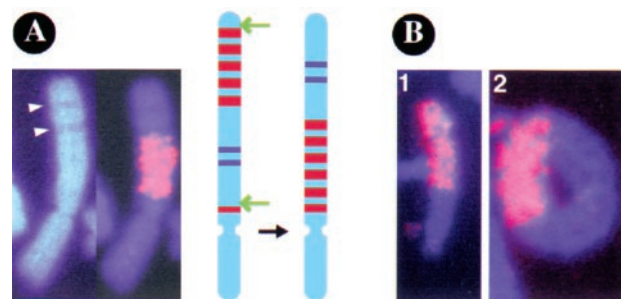
<sup>a</sup>In some cells, *dmin* and other rearrangements were observed on the same mitotic plate. N: number of metaphase plates

ments occurring in these experimental conditions (Table 1). However, they also disclose the formation of other types of chromosomal rearrangements. Among them, we observed inversions involving the amplified segment from chromosome 2p (Figure 4A). Indeed, such inversions are simply accounted for by the induction of breaks at the parental IS (the one present in cells of line 112) and at an extra-copy of IS, followed by reintegration within the broken chromosome arm of the excised megabase-long linear molecule in an inverted orientation. Inversions looking like the one shown in Figure 4A represented about 9% of the rearrangements involving the hsr. This frequency is certainly underestimated because inversions occurring between two extra-copies of IS escape detection by the cytogenetic analysis performed here.

In addition, ring chromosomes and translocations were also observed at low frequencies (Figure 4B). One of the breakpoints that triggers these rearrangements occurred on the long arm of chromosome 2 or another chromosome, and thus does not rely on an IS. Indeed, the constant presence of MTX in the culture medium could be responsible for this low background of I-SceI-independent breaks.

#### Fragile site activation in clones 112-MTX1 and 112-MTX2 also triggers formation of *dmin* and chromosomal rearrangements

We determined whether treatment of hsr-containing cells by fragile site activators could induce the same pattern of rearrangements as I-Sce-I expression in IS containing cells. Clones 112-MTX1 and 112-MTX2 were treated by hypoxia, or by aphidicolin or actinomycin D, two drugs that efficiently activate fragile sites in these cells, in conditions giving rise to 5–10 breaks per metaphase plate. The treatments were repeated up to four times on the same cell population. Twenty-four to 72 h after the last treatment, we determined whether the initial hsr was rearranged. The two clones gave comparable results and those obtained for clone 112-MTX1 are presented in Table 2. Compared to control experiments, obvious rearrangements of the hsr were observed in around 25% of the cells upon repeated treatment by hypoxia or either drug. Like the experiments with I-SceI described above, *dmin* and different types of chromosomal rearrangements were generated (Figure 5). In 17 to



**Figure 4** Examples of I-SceI-induced hsr rearrangements. (A) Inversion within amplified chromosome 2p. Left: DAPI and FISH with a probe for the *dhfr* gene (revealed by rhodamine). Note the position of the duplicated DAPI band (arrowheads) relative to the cluster of *dhfr* gene copies. Right: model for the formation of this inversion. Red: *dhfr* gene, dark blue: dark DAPI band specific to Chinese Hamster chromosome 2p, green arrows: I-SceI induced breaks. In this example, the location of the breaks left no *dhfr* gene between the double DAPI band and the chromosome end. (B) Single color FISH with a probe for the *dhfr* gene (red) showing: (1) a translocation of the amplified copies on an unidentified acrocentric chromosome, (2) a ring chromosome bearing *dhfr* amplified genes

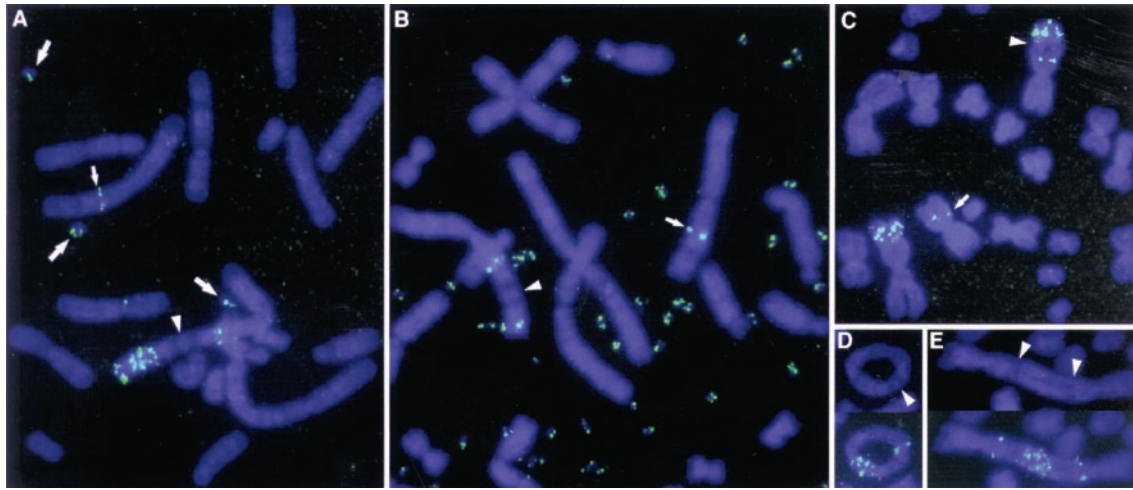
20% of the cells treated with either drug and in 10% of the cells submitted to oxygen deprivation, extra-copies were found on extra-chromosomal elements (Figure 5A). Again, a striking heterogeneity was observed both in the size of the *dmin* and in the number of *dhfr* copies remaining within the hsr after treatment. When the treated populations were grown for a few more generations in the presence of MTX, cells containing large numbers of *dmin* could also be observed (Figure 5B). In striking contrast, when MTX was removed from the culture media, cells with *dmin* rapidly disappeared. Thus, these *dmin* behave like *dmin* formed upon I-SceI-induced DSBs.

In 10, 11 or 18% of the cells challenged by actinomycin D, aphidicolin or hypoxia, respectively, additional chromosomal rearrangements involving the hsr were observed (Table 2). In about 7 to 10% of treated cells, all or a fraction of the amplified copies were translocated to other chromosomes (Figure 5C). We also observed ring chromosomes at low frequency (3%) (Figure 5D) and dicentric chromosomes (Figure 5E). While the latter type of rearrangement was relatively infrequent with drug treatments, dicentric chromosomes were observed in 12% of hypoxia-treated

**Table 2** Effects of treatments activating fragile sites on the stability of hsr containing amplified *dhfr* genes

Treatment	Total number of metaphase plates scored	Cells with a rearranged hsr		Cells with <i>dmin</i> <sup>a</sup>		Cells with other rearrangements <sup>a</sup>	
		N	%	N	%	N	%
None	384	9	2.3	5	1.3	5	1.3
Actinomycin D	181	42	23.2	31	17.1	19	10.5
Aphidicolin	207	58	28.0	41	19.8	23	11.1
Hypoxia	221	59	26.7	23	10.4	40	18.1

<sup>a</sup>In some cells, *dmin* and other rearrangements were observed on the same mitotic plate. N: number of metaphase plates. Percentage of rearrangements in control experiments was determined at the beginning of the experiment. Untreated cells were re-examined some 10 days later in parallel of treated cells and we found that the frequency of rearrangements was stable during this period of time



**Figure 5** Examples of formation of *dmin* and hsr rearrangements upon treatment by hypoxia. FISH with a probe for the *dhfr* gene (revealed by fluorescein). Arrowheads point to duplicated dark DAPI bands specific for *dhfr* amplified mutants. (A, B, C) Small arrows point to the normal chromosome 2. (A) Example of partial hsr breakdown, large arrows point to three extra chromosomal elements present in this metaphase plate. (B) Example of a cell presenting extensive hsr breakdown associated with the presence of a high number of *dmin*. (C) Translocation of part of the *dhfr* extra-copies on a chromosome 1, leaving *dhfr* copies in the initial hsr. (D) Example of ring chromosome involving the amplified chromosome 2. Top: DAPI staining, bottom: FISH. Note the conservation of the typical organization of amplified *dhfr* gene copies relative to the duplicated dark DAPI band. (E) Example of a symmetric dicentric chromosome involving amplified chromosomes 2. Top: DAPI staining, bottom: FISH. The typical structure of *dhfr* amplified mutants is also maintained

cells (Table 2). In contrast to the results obtained in cell populations transfected with plasmid pI-SceI, inversions taking place within chromosome 2p were not observed among more than 600 metaphase plates analysed after fragile site induction.

*Fragile site activation in clones recovered from parental GMA32 cells, amplified for the dhfr or the mdr1 genes, generates extra-chromosomal elements behaving like classical dmin*

In order to verify that the genome instability detected in cells challenged with DNA damaging drugs is not influenced by the presence of IS within the hsr, we repeated the experiments described above with *dhfr* amplified cells derived from the parental GMA32 cell line. Fragile sites were activated in cells of two clones, GMA32-MTX1 and GMA32-MTX2 (Coquelle *et al.*, 1997), exhibiting an hsr with the cytogenetic features of BFB cycles. Results were very similar to those described above for clones 112-MTX1 and 112-MTX2.

In particular, cells with *dmin* were observed in 18 to 25% of the cells treated with actinomycin D or aphidicolin, and in some 12% of the cells challenged by hypoxia. This definitively establishes that the presence of the plasmid did not influence the outcomes of fragile site activation in our previous experiments.

We then extended our analysis to another locus by studying two clones amplified for the *mdr1* gene, which also exhibited the cytogenetic features of the BFB cycles (Coquelle *et al.*, 1997). We chose to study clones recovered upon adriamycin (GMA32-ADR1) or actinomycin D (GMA32-AMD1) selection. The cells were challenged with aphidicolin or MTX, two drugs that are not detoxified through the *mdr1* pathway and still induce fragile sites in these lines. In both clones, hsr destabilization generated *dmin*, at a frequency close to that observed in the case of cells amplified for the *dhfr* gene analysed above (not shown). Thus, inter-conversion of hsr into *dmin* upon fragile site activation is not restricted to the *dhfr* locus.

## Discussion

### *Site-specific DSBs and chromosomal rearrangements*

Accurate repair of DNA damage, such as DSB, is of crucial importance for the maintenance of genome stability. Recently, model systems based on I-SceI targeted DSBs have been developed, which make it possible to evaluate the contribution of DSBs to the generation of chromosomal rearrangements observed in tumor cells. Imperfect repair of a DSB induced within a cell containing a single copy of IS generates interstitial deletions or triggers BFB cycles (Pipiras *et al.*, 1998). More recent work demonstrated that I-SceI-induced DSBs, initiated from two IS lying on different chromosomes, promotes reciprocal translocations (Richardson and Jasin, 2000). Here we show that multiple I-SceI-induced DSBs on chromosome 2p generated paracentric inversions, easily identified by the relative positions of characteristic DAPI bands that mark the amplified chromosome arm and of the extra-copies of the *dhfr* gene. In contrast, pericentric inversions, centric ring chromosomes and translocations, the formation of which requires DSBs on both arms of a chromosome or on two different chromosomes, occur infrequently under these conditions. We propose that these latter rearrangements result from a background level of breakage taking place outside the hsr, which probably is a consequence of the presence of MTX in the culture medium. As expected, these rearrangements were more frequently observed in cells treated under conditions that efficiently activate fragile sites, while paracentric inversions affecting chromosome 2p were not observed.

### *Mechanisms of dmin formation and inter-conversion of amplified structures*

We show that in cells bearing amplified copies of the *dhfr* gene within an hsr, treatments generating DSB induce various rearrangements, including hsr disintegration and formation of dmin. Drugs and hypoxia were less prone than I-SceI to promote dmin formation. Indeed, the localization of the breaks induced by each treatment—specifically within the hsr or both within the hsr and the rest of the genome—determine the relative frequency and the pattern of genome reshuffling in each case. We also show that growth conditions strongly select for some types of cells and/or amplified structures during clonal expansion. Cells containing dmin are no longer observed upon removal of MTX from the culture medium for a few generations. This is in good agreement with the general instability of acentric extra-chromosomal elements. In striking contrast, when treated populations are maintained in selective medium, numerous cells contain a number of dmin which is far higher than what could be expected from the number of breaks induced by I-SceI expression or fragile site activation. The observation of such cells strongly suggests that the extrachromosomal elements formed upon hsr degrada-

tion segregate unequally at mitosis as do classical dmin. As observed previously (Coquelle *et al.*, 1998), we also observed here that when a cell contains numerous dmin, they are generally small, homogeneous in size and bear only a few copies of the selected gene. This suggests that large extra-chromosomal elements are rapidly lost, possibly because they are particularly unstable. We propose that, in the presence of MTX, some cells that accumulate extra-copies of the *dhfr* gene through uneven segregation of a sub-population of small and more stable elements rapidly overgrow the population.

Finally, we confirmed that dmin can be formed through hsr breakdown by studying the effects of fragile site activation on hsr containing amplified *mdr1* genes, a conclusion also supported by results recently obtained in human cells (Singer *et al.*, 2000). Thus, the phenomenon described here is limited neither to a particular locus nor to Chinese hamster cells.

Previous studies have shown that, at early stages of the amplification process, hsr and dmin bearing extra-copies of the *ampd2* or *mdr1* genes result from independent amplification mechanisms. Indeed, while the operation of the BFB cycles is accompanied by heavy rearrangements of the amplified chromosome arm (Coquelle *et al.*, 1997), such rearrangements are not present in early mutants that exhibit extra-copies of the *ampd2* or the *mdr1* genes on dmin. Moreover, DNA damaging agents that activate common fragile sites trigger BFB cycles at both loci while they fail to induce the formation of dmin. This unambiguously establishes the existence of an initial mechanism of dmin formation, that does not rely on DSB at fragile sites (Coquelle *et al.*, 1997; Toledo *et al.*, 1992, 1993). We show here that dmin can also be formed through hsr breakdown, which reveals a second pathway leading to dmin formation (Figure 1). A third mechanism, relying on chromosome breakage occurring within replication eyes, was proposed a number of years ago (Ruiz and Wahl, 1988; Windle *et al.*, 1991). However, all observations reported by this group, including the palindromic organization of the repeated sequences on extrachromosomal elements, are equally consistent with the operation of a mechanism generating dmin from hsr breakdown, the existence of which is unambiguously established by the results presented here. Indeed, the BFB cycle mechanism generates intrachromosomal copies arranged as large palindromes and subsequent breakdown of such hsr is expected to give rise to dmin containing inverted repeats.

Fragile sites have also been involved in a growing number of chromosomal rearrangements found in human cancer, such as deletions of tumor suppressor genes, translocations and oncogene amplifications (Fang *et al.*, 2001; Krummel *et al.*, 2000; Le Beau, 1986; Perucca-Lostanlen *et al.*, 1997; Richards, 2001; Smith *et al.*, 1998; Sutherland *et al.*, 1998; Yunis, 1983). *In vivo*, stresses resulting from variations in the tumor microenvironment may be important for fragile site activation. We show here that hypoxia induces hsr breakdown, formation of dmin and other chromosomal

rearrangements. Thus, stresses activating fragile sites might directly drive most genome rearrangements involved in tumor progression.

## Materials and methods

### Selection of amplified mutants

The wild type GMA32 cell line, line 112 and respective culture media have been previously described (Pipiras *et al.*, 1998). The method used to observe cells at early stages of gene amplification is derived from Smith *et al.* (1990). Subpopulations of 50 cells were plated in separate dishes and grown in regular medium for about 12 generations. Cells were then plated in selective medium containing actinomycin D (100 ng/ml) or MTX (9 or 18 ng/ml) for *mdr1* and *dhfr* selection, respectively. Drug-resistant colonies were recovered and expanded for a few cell generations before cytogenetic analysis. Exponentially growing cells were treated with nocodazole (10  $\mu$ M) for 2–4 h, then spread on slides as previously described (Toledo *et al.*, 1992) and used for FISH analysis.

### Induction of I-SceI breaks

The experiments were performed with two independent clones, 112-MTX1 and 112-MTX2, exhibiting a co-amplification of IS and the *dhfr* gene within an hsr. Cells of both populations were transfected with a plasmid coding for the I-SceI nuclease (pI-SceI), or with an empty vector (pcDL-SR $\alpha$ 296) as previously described (Pipiras *et al.*, 1998). Transfection efficiencies were monitored by co-transfecting plasmid pEGFP-N1 (Clontech), a plasmid coding for the green fluorescent protein (gfp). Fluorescent positive cells were scored 48 h after transfection. Transfection experiments were performed using lipofectamine<sup>TM</sup> reagent (Life Technologies).

## References

- Balaban-Mallenbaum G, Grove G and Gilbert FW. (1981). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **2**, 339–348.
- Brison O. (1993). *Biochem. Biophys. Acta*, **1155**, 25–41.
- Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR and Dewhirst MW. (1996). *Cancer Res.*, **56**, 941–943.
- Carroll SM, DeRose ML, Gaudray P, Moore CM, Needham-Vandevanter DR, Von Hoff DD and Wahl GM. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1525–1533.
- Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G and Debatisse M. (1997). *Cell*, **89**, 215–225.
- Coquelle A, Toledo F, Stern S, Bieth A and Debatisse M. (1998). *Mol. Cell*, **2**, 259–265.
- Dujon B. (1989). *Gene*, **82**, 91–114.
- Fang JM, Arlt MF, Burgess AC, Dagenais SL, Beer DG and Glover TW. (2001). *Genes Chromosomes Cancer*, **30**, 292–298.
- Gisselsson D, Pettersson L, Hoglund M, Heidenblad M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F and Mandahl N. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5357–5362.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW and Giaccia AJ. (1996). *Nature*, **379**, 88–91.
- Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI, Trakhtenbrot L and Kerem B. (2002). *Cancer Cell*, **1**, 89–97.
- Jasin M. (2000). *Cancer Invest.*, **18**, 78–86.
- Kinzler KW and Vogelstein B. (1996). *Nature*, **379**, 19–20.
- Knudson AG. (2000). *Annu. Rev. Genet.*, **34**, 1–19.
- Krummel KA, Roberts LR, Kawakami M, Glover TW and Smith DI. (2000). *Genomics*, **69**, 37–46.
- Le Beau MM. (1986). *Blood*, **67**, 849–858.
- Luk CK, Veinot-Drebot L, Tjan E and Tannock IF. (1990). *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 684–692.
- Ma C, Martin S, Trask B and Hamlin JL. (1993). *Genes Dev.*, **7**, 605–620.
- McClintock B. (1942). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **28**, 458–463.
- Nowell PC, Rowley JD and Knudson AG. (1998). *Nat. Med.*, **4**, 1107–1111.
- Perucca-Lostanlen D, Hecht BK, Courseaux A, Grosgeorge J, Hecht F and Gaudray P. (1997). *Cytogenet. Cell Genet.*, **79**, 88–91.
- Pipiras E, Coquelle A, Bieth A and Debatisse M. (1998). *EMBO J.*, **17**, 325–333.
- Rice GC, Hoy C and Schimke RT. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5978–5982.
- Richards RI. (2001). *Trends Genet.*, **17**, 339–345.
- Richardson C and Jasin M. (2000). *Nature*, **405**, 697–700.
- Rouet P, Smith F and Jasin M. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 8096–8106.

Cells were treated for 5 h as recommended by the supplier. Five days after transfection, the cells were recovered and studied by FISH.

### Induction of fragile sites and FISH analysis

Exponentially growing cells (5.10<sup>5</sup> cells per 10 cm diameter petri dishes) amplified for the *dhfr* gene were continuously grown in the presence of 18 ng/ml MTX. They were submitted to anoxia for 5 h as previously described (Coquelle *et al.*, 1998) or challenged for 18 h in medium supplemented with actinomycin D (100 ng/ml) or aphidicolin (0.4 or 0.6  $\mu$ g/ml) and allowed to recover for 24–48 h in MTX-containing medium. Treatments were repeated four times as previously described (Coquelle *et al.*, 1998). Six hours after the last treatment, the cells were treated with nocodazole (10  $\mu$ M) for 2–4 h, then spread on slides and used for FISH studies. Cosmids KP 454 and KZ 381 (kind gifts of J Hamlin) were used to probe the *dhfr* locus and plasmid pI-SceI to probe the plasmid. The hybridization conditions and the revelation protocols were previously described (Coquelle *et al.*, 1998; Pipiras *et al.*, 1998).

## Acknowledgments

We thank Drs M Weiss and G Buttin for careful reading of the manuscript and helpful discussion, B Dujon for providing the I-SceI gene and the protein recognition sequence, J Hamlin for the cosmids of the *dhfr* locus. This work was supported in part by the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Fondation de France, the Ligue Nationale Française contre le Cancer (Comité de Paris). A Coquelle is supported by a fellowship of the Ligue Nationale Contre le Cancer and L Rozier is a Fellow of the MENRT.

- Ruiz JC and Wahl GM. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4302–4313.
- Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I and Gollin SM. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 303–308.
- Schwab M. (1999). *Semin. Cancer Biol.*, **9**, 319–325.
- Singer MJ, Mesner LD, Friedman CL, Trask BJ and Hamlin JL. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7921–7926.
- Smith DI, Huang H and Wang L. (1998). *Int. J. Oncol.*, **12**, 187–196.
- Smith KA, Gorman PA, Stark MB, Groves RP and Stark GR. (1990). *Cell*, **63**, 1219–1227.
- Smith KA, Stark MB, Gorman PA and Stark GR. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5427–5431.
- Sutherland GR, Baker E and Richards RI. (1998). *Trends Genet.*, **14**, 501–506.
- Toledo F, Buttin G and Debatisse M. (1993). *Curr. Biol.*, **3**, 255–264.
- Toledo F, LeRoscouet D, Buttin G and Debatisse M. (1992). *EMBO J.*, **11**, 2665–2673.
- Trask BJ and Hamlin JL. (1989). *Genes Dev.*, **3**, 1913–1925.
- Windle B, Draper BW, Yin Y, O’Gorman S and Wahl GM. (1991). *Genes Dev.*, **5**, 160–174.
- Yunis JJ. (1983). *Science*, **221**, 227–236.

## ARTICLE 2

### **Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I**

Marina Ciullo, Marie-Anne Debily\*, Lorène Rozier\*, Monica Autiero, Alain Billault, Véronique Mayau, Sandrine El Marhomy, John Guardiola, Alain Bernheim, Philippe Coullin, Dominique Piatier-Tonneau et Michelle Debatisse.

\* ces auteurs ont contribué de façon équivalente au travail

Human Molecular Genetics, 2002, **11** (23), p1-8

Le gène *PIP* (Prolactin- inducible protein), localisé en 7q34, s'étend sur 8 kb et code un facteur sécrété, pouvant se lier à CD4, avec une fonction aspartyl protéase spécifique de la fibronectine (Autiero et al., 1995; Caputo et al., 2000; Myal et al., 1991). Ce gène est réarrangé dans plusieurs tumeurs solides (prostate, seins) (Autiero et al., 2002; Autiero et al., 1999). De plus, il est surexprimé dans 60 à 80% des tumeurs du sein (primaires et métastatiques) et dans certaines lignées cellulaires de carcinome du sein, dont la lignée T47D (Clark et al., 1999; Murphy et al., 1987). Nous avons cherché à déterminer si cette surexpression provenait d'une amplification du gène *PIP* dans la lignée T47D. Grâce à une analyse par FISH de cette lignée (en métaphase comme sur les noyaux interphasiques), avec 2 BACs couvrant *PIP*, nous montrons que ce gène est dupliqué (figure 1A-B) sur un des chromosomes 7 et que ces 2 copies ont une localisation globalement normale, indiquant que la duplication est survenue "in loco". L'analyse de ces métaphases par FISH double couleur, avec une sonde au niveau de *PIP* (verte) et une sonde localisée à 2Mb en position centromérique par rapport à *PIP* (rouge) a montré que toute la région est dupliquée et que les copies sont organisées en orientation inverse (les 2 signaux verts sont flanqués des signaux rouges) (figure 1C). L'organisation des copies et le fait qu'elles soient localisées au niveau du locus endogène, suggèrent que cette duplication est le résultat d'un cycle de CFP.

Comme mentionné dans l'introduction (I-5b-3), la signature des cycles de CFP a été observée dans les cellules tumorales, mais la contribution des SFCs au déclenchement de ce processus *in vivo* reste à démontrer. Sur les 9 SFAs présents sur le chromosome 7, seuls FRA7G (7q31.2) et FRA7H (7q32.3) étaient clonés et caractérisés au niveau moléculaire (Huang et al., 1998b; Mishmar et al., 1998). FRA7I, localisé en 7q36 (Yunis et al., 1987), en position télomérique par rapport au gène *PIP*, nous a intéressé car une cassure à ce site pourrait être à l'origine de la duplication. Nous avons donc entrepris de localiser précisément ce site. Les cassures dans la région représentent 2% des cassures totales observées après traitement AP des cellules humaines HT1080. Une série de sondes couvrant les régions 7q34-36 a été utilisée (figure 2A) et l'analyse de la position relative des cassures par rapport à ces sondes a permis de relocaliser FRA7I en 7q35, entre les BACs RP4-545C24 (AC004534) et RP4-803F10 (AC006004) délimitant une région d'environ 2Mb (figure 2B-C, Tableau 1). Ces analyses ont également été conduites sur des lymphocytes traités à l'AP (issus d'un donneur sain). Dans ces cellules, ce site est très peu fréquent (3 cassures sur 160 du chromosome 7) ce qui est en accord avec des résultats obtenus précédemment (Smith et al., 1998). Néanmoins, l'analyse par FISH double-couleur avec les sondes RP4-545C24 et RP4-803F10 a confirmé la localisation de FRA7I (figure 3). L'analyse de la flexibilité de la séquence de FRA7I a montré



la présence de pics de flexibilité dans cette région (figure 4), comme cela a déjà été observé pour les autres SFAs clonés (pour revue (Arlt et al., 2003)).

Nous avons enfin testé l'hypothèse selon laquelle la duplication de la région du gène *PIP* dans les cellules T47D a été générée par un cycle de CFP initié par une cassure au niveau de FRA7I. Selon ce modèle, la séquence allant de FRA7I au gène *PIP* inclus devrait être dupliquée alors que celle comprise entre FRA7I et le télomère devrait être exclue des répétitions (Coquelle et al., 1997). L'analyse par FISH double-couleur avec une sonde couvrant PIP (verte) et une sonde télomérique à FRA7I (rouge), a montré la présence d'un seul signal rouge sur les chromatides portant 2 signaux verts (figure 5). Ceci a été confirmé par l'utilisation de diverses sondes télomériques et centromériques à FRA7I. Nous avons donc conclu que l'activation de FRA7I conduisait au remaniement observé dans les T47D. Enfin, nous avons montré par FISH que la région télomérique du chromosome 7 coiffait la duplication (figure 5), ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle la duplication inversée a été générée par un cycle de CFP, initié par une cassure à FRA7I, et stoppé immédiatement après ce premier cycle par recapture du fragment télomérique du chromosome 7 (figure 6). La recapture du fragment télomérique n'avait jamais été observée dans les mutants sélectionnés *in vitro*, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que, dans ces systèmes modèles, plusieurs cycles de CFP sont nécessaires pour atteindre le niveau d'amplification requis pour que les cellules résistent à l'agent sélectif. Le fragment télomérique acentrique étant probablement perdu ou dégradé après plusieurs cycles cellulaires, il ne pourrait pas contribuer à la réparation du chromosome cassé.

Nous montrons donc ici que les SFA contribuent au déclenchement de cycles de CFP, et à l'amplification d'oncogènes, dans les cellules tumorales.

# Initiation of the breakage–fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of *PIP* gene duplication from a break at FRA7I

Marina Ciullo<sup>1</sup>, Marie-Anne Debily<sup>1,†</sup>, Lorène Rozier<sup>2,†</sup>, Monica Autiero<sup>1</sup>, Alain Billault<sup>3</sup>, Véronique Mayau<sup>4</sup>, Sandrine El Marhomy<sup>1</sup>, John Guardiola<sup>5</sup>, Alain Bernheim<sup>6</sup>, Philippe Coullin<sup>6</sup>, Dominique Piatier-Tonneau<sup>1,\*</sup> and Michelle Debatisse<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Génomique Fonctionnelle et Biologie Systémique en Santé, FRE 2571, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 19 rue Guy Moquet, 94801 Villejuif, France, <sup>2</sup>UMR 147, CNRS, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France, <sup>3</sup>Molecular Engines Laboratories, 20 rue Bouvier, 75011 Paris, France, <sup>4</sup>URA 1960, CNRS, Institut Pasteur, 36 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France, <sup>5</sup>International Institute of Genetics and Biophysics, CNR, via G. Marconi 10, 80125 Naples, Italy and <sup>6</sup>Laboratoire de Génomique des Cancers, UMR 1599 CNRS, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France

Received July 1, 2002; Revised and Accepted September 6, 2002

Gene amplification plays a critical role in tumor progression. Hence, understanding the factors triggering this process in human cancers is an important concern. Unfortunately, the structures formed at early stages are usually unavailable for study, hampering the identification of the initiating events in tumors. Here, we show that the region containing the *PIP* gene, which is overexpressed in 80% of primary and metastatic breast cancers, is duplicated in the breast carcinoma cell line T47D. The two copies are organized as a large palindrome, lying '*in loco*' on one chromosome 7. Such features constitute the landmark of the breakage–fusion-bridge (BFB) cycle mechanism. In hamster cells selected *in vitro* to resist cytotoxic drugs, common fragile site (CFS) activation has been shown to trigger this mechanism. Here, we characterize FRA7I at the molecular level and demonstrate that it lies 2 Mb telomeric to the *PIP* gene and sets the distal end of the repeated sequence. Moreover, our results suggest that the BFB process was frozen within the first cycle by healing of the broken chromosome. T47D cells thus offer a unique opportunity to observe the earliest products of the BFB cycle mechanism. Our findings constitute the first evidence that this amplification mechanism can be initiated *in vivo* by fragile site activation.

## INTRODUCTION

Gene amplification is a genetic alteration through which a cell gains additional copies of a small part of its genome. In mammalian cells, such mutations significantly contribute to tumor progression and possibly to tumorigenesis (1,2). The mechanisms responsible for amplification have been extensively studied in model systems of drug-resistant mutants selected *in vitro* from rodent cell lines (3). More recently, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) has proven to be a very powerful tool to analyse the structures formed in the early events of amplification. This allowed the discovery that at least

two different mechanisms, relying on unequal segregation of chromosomal sequences at mitosis, can drive amplification. One of them, the BFB cycle mechanism (4), is responsible for the accumulation of intra-chromosomal extra-copies creating chromosomal expansions known as homogeneously staining regions (HSR) (5–9). This amplification mechanism can be triggered by a double-strand break distal to the selected gene (10), followed by fusion of the broken sister chromatids after replication, which in turn leads to the formation of a bridge and further break in mitosis. The cytogenetic manifestations of this mechanism, such as accumulation of extra-copies organized as large inverted repeats within a chromosome have also been

\*To whom correspondence should be addressed at: FRE 2571 CNRS, 19 rue Guy Moquet, BP 8, 94801 Villejuif, France. Tel: +33 149583496; Fax: +33 149583509, Email: piatier@vjf.cnrs.fr

†The authors wish it to be known that, in their opinion, these two authors should be considered as joint Second Authors.

observed in tumor cells (11–14). Thus, it is now generally agreed that the BFB cycle mechanism operates, at least in some cases, in tumors. The demonstration that breaks are able to initiate this amplification mechanism suggested that the drugs used *in vitro* to select resistant mutants, particularly when they are well known DNA damaging agents, could contribute to trigger the process (15). Indeed, we have established that the ability of a drug to induce amplification directly relies on its ability to activate a CFS distal to the selected gene (9).

Fragile sites are chromosomal regions prone to breakage under specific culture conditions (16,17). They are classified as common and rare depending on their frequency in the populations [reviewed in (18,19)]. CFS are present in cells of all individuals and are well conserved when examined within linkage groups of different mammalian species (20–22). These observations identify them as full part components of the chromosomes. So far, seven human CFS have been characterized at the molecular level (23–29). In each case, a fragile region extending over hundreds of kilobases was identified. Several works suggested that fragility relies on particular sequences and/or chromatin structures that delay replication of the fragile locus (30–32). CFS have been involved in a growing number of chromosome rearrangements that drive tumor progression, such as deletions of tumor suppressor genes (33,34), virus integration (28) and translocations (26,35). More recently, they have also been involved in breakage of anaphase bridges formed during the amplification process (14). However, whether breaks at CFS are also responsible for the initiation of the BFB cycles in cells of human cancers remains to be established.

The *PIP* gene encodes a secreted factor known as prolactin-inducible protein (PIP) (36), which binds to CD4 (37–39) and carries a fibronectin-specific aspartyl protease (40). According to the human genome sequence public database ([http://www.nhgri.nih.gov/genome\\_hub.html](http://www.nhgri.nih.gov/genome_hub.html)), the *PIP* gene maps to 7q34. It is present as a single copy and spans ~8 kb of genomic DNA (41). We have recently found that the *PIP* gene exhibits various rearrangements in several solid tumors (42,43). It is also overexpressed in 60 to 80% of primary and metastatic breast cancers (36,44), as well as in some breast carcinoma cell lines. However, the mechanisms responsible for the overexpression of this gene are still poorly understood. Cytogenetic analyses and comparative genomic hybridization have shown that breast cancers frequently exhibit numerical and structural alterations of chromosome 7 (45–48). Strikingly, six CFS sensitive to aphidicolin, the archetype of CFS inducing-drugs (49), have been described along the long arm of chromosome 7 (17). Only two of them, FRA7G and FRA7H, which map at 7q31.2 and 7q32.3, respectively, have been characterized at the molecular level (24,25). Poor information is available about FRA7I, which was assigned to the 7q36 region by G/Q banding (17).

Using the breast carcinoma cell line T47D, which constitutively overexpresses *PIP*, we demonstrate that the *PIP* gene is duplicated as part of a large inverted repeat, localized at a normal position on 7q. Moreover, we localize FRA7I to 7q35 in a chromosomal region spanning 2 Mb and we show that FRA7I sets the telomeric boundary of the duplicated region. Altogether, our results strongly suggest that the duplication was generated by one cycle of BFB initiated from a break at FRA7I.

## RESULTS

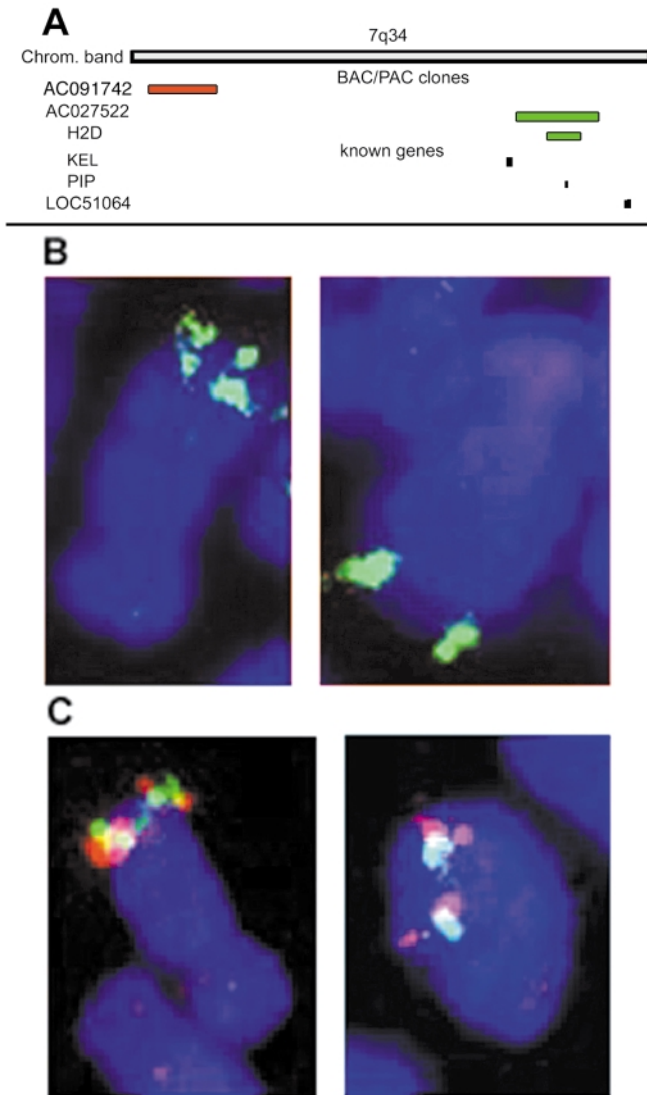
### Inverted repeat of the region containing *PIP*

By using the FISH technique, we examined whether the *PIP* gene is amplified in the breast carcinoma cell line T47D. Upon hybridization of T47D metaphase spreads with two independently isolated BAC clones, H2D and AC027522, overlapping *PIP* (Fig. 1A), duplicated signals were observed on one chromosome (Fig. 1B). To verify the specificity of this double signal, FISH was performed with the same probes on cells of the HT1080 fibrosarcoma line. The HT1080 karyotype is essentially normal and rearrangements of chromosome 7 were not detected by chromosome painting or G banding. We observed a single hybridization signal on each chromatid of the two chromosomes 7 in a relatively distal position (not shown) as expected from the position of *PIP* at 7q34. In T47D cells, chromosome painting failed to detect chromosome 7 alterations (data not shown) and the duplicated copies of *PIP* were observed at an apparently normal localization on one homologue, indicating that the duplication was generated '*in loco*'. With both probes, duplicated spots were observed in only a fraction of the metaphase spreads, which could reflect either cell to cell heterogeneity in line T47D or technical limitations due to a tight linkage of the duplicated copies. The observation of interphase nuclei, in which chromosomes are far less condensed than in metaphase spreads, allowed us to exclude the first possibility. Indeed, an extra-spot was clearly visible in almost all nuclei (not shown).

In order to further characterize the duplication involving *PIP*, two-color FISH was performed with a probe located about 2 Mb centromeric to *PIP* (AC091742, red) and a probe overlapping the gene (AC027522, green). We observed two red signals flanking the green signals (Fig. 1C). This result confirms the existence of a duplication and indicates that the two copies are organized as a large inverted repeat. This pattern and the normal localization of the extra-copy strongly suggest that the duplication was generated by a BFB cycle. It is now agreed that this mechanism can operate in tumors, but whether CFS activation contributes to initiate the process in these cases is still unknown.

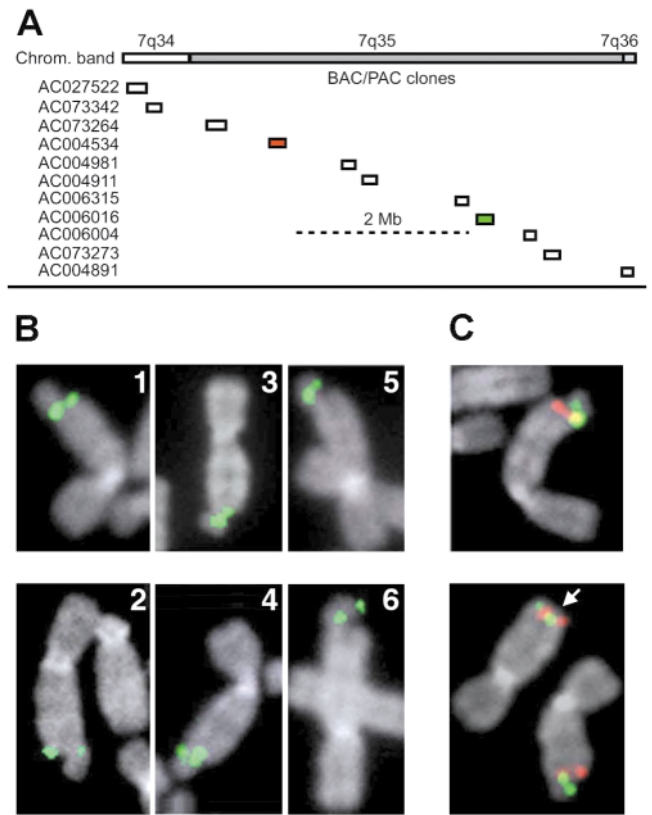
### Mapping of FRA7I

To address this issue, we have examined the distribution of known CFS on the long arm of chromosome 7. Since FRA7I was assigned to 7q36 (17), the formation of the inverted duplication identified in T47D cells may rely on that site. In order to test this hypothesis, we mapped FRA7I by using HT1080 cells. In aphidicolin-treated cells, breaks in this region represented about 2% of the total gaps scored. FISH analysis was performed with a panel of probes spanning the 7q34–q36 region (Fig. 2A). We identified a first set of probes that gave only signals centromeric to all the breaks observed in this chromosomal domain (Fig. 2B, panels 1 and 2; Table 1). A second series of BAC clones revealed both centromeric and telomeric signals and occasionally signals crossing the breaks, indicating that they all span the fragile region (Fig. 2B, panels 3 and 4; Table 1). A third set of probes gave only signals telomeric to the breaks (Fig. 2B, panels 5 and 6; Table 1).



**Figure 1.** Inverted duplication of the chromosomal region containing *PIP*. (A) BAC/PAC clones used as probes: mapping of clones (colored bars) and genes (black bars) is derived from [http://www.nhgri.nih.gov/genome\\_hub.html](http://www.nhgri.nih.gov/genome_hub.html). The clone H2D was isolated from a human DNA library constructed by us (see Materials and Methods) and contains the whole *PIP* gene; clones AC027522, overlapping H2D and AC091742, located ~2 Mb centromeric to *PIP*, are from commercial sources. Clones are designated by their accession number. (B) FISH of T47D breast carcinoma cell metaphase spreads with H2D and AC027522 probes: two green signals are visible on each chromatid of one chromosome. (C) Two-color FISH of T47D metaphase spreads with probes AC091742 (red) and AC027522 (green): two red signals flank the green signals. The results shown are representative of four independent experiments.

Two-color FISH experiments with probes from the first (AC004534, red) and the third (AC006016, green) group repeatedly showed hybridization signals on both sides of the breaks (Fig. 2C). This definitely establishes that these probes flank a fragile region. Thus, our results identified a CFS extending over an ~2 Mb long sequence that lies at 7q35 (Fig. 2A, dotted line). Since no other loci activated by aphidicolin were detected in the 7q34–q36 region, we concluded that this site is FRA71.



**Figure 2.** Localization of FRA71 by FISH in HT1080 cells. (A) Probes spanning the 7q34–q36 region used to hybridize metaphase spreads of aphidicolin-treated HT1080 fibrosarcoma cell line. (B) Examples of hybridization signals centromeric to (probe AC004534, panels 1 and 2), crossing (probe AC006315, panels 3 and 4) and telomeric to (probe AC006016, panels 5 and 6) the breaks. (C) Two color FISH with probes AC004534 (red) and AC006016 (green): the signals line the breaks. Arrow points to the normal homologue. Representative results of three independent experiments are shown.

**Table 1.** BAC clone hybridization signals on chromosomes expressing FRA71

BAC/PAC clones	No. of signals		
	Centromeric	On	Telomeric
AC073264	25	—	—
AC004534	27	—	—
AC004981	3	—	9
AC004911	4	1	9
AC006315	3	3	7
AC006016	—	—	21
AC006004	—	—	29

Analysis and counting of hybridization signals observed on chromosomes expressing FRA71 in aphidicolin-treated HT1080 cells. The clones are ordered in accordance to the physical map, centromeric (top of the table) to telomeric (bottom).

To determine whether the unstable region detected in HT1080 fibrosarcoma cells is also expressed in normal human cells, FISH experiments were performed on aphidicolin-treated human lymphocytes isolated from the blood of a healthy donor.

Previous works have established that this site is expressed at very low level in lymphocytes (19,34). In agreement with these results, we observed only 3 breaks in the 7q35 region out of 160 scored on chromosome 7, which prevents statistical analysis of the results. However, two-color FISH experiments with probes AC004534 (green) and AC006016 (red) clearly showed red and green hybridization signals on each side of all 3 breakpoints (Fig. 3). Hence, these results support our conclusions that we characterized FRA7I and indicate that this site is more active in HT1080 cells than in lymphocytes.

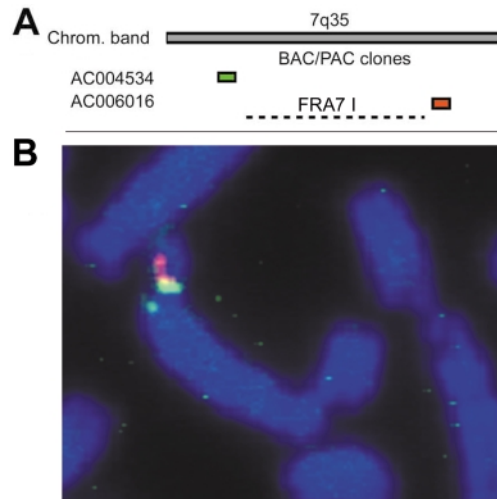
### Flexibility analysis of the region containing FRA7I

Previous work proposed that hotspots of breakage within common fragile sites correlate with peaks of enhanced flexibility (25). Accordingly, the FlexStab computer program was used to determine flexibility variations of the 2 Mb long sequence spanning FRA7I. This analysis revealed several regions deviating significantly ( $>4.5$  SD) from the average flexibility value of the analysed sequence (Fig. 4). For example, an about 300 kb long sequence located within FRA7I showed up to 17 peaks of high flexibility (Fig. 4B). Very few peaks were found in the region proximal to FRA7I (Fig. 4A). Surprisingly, analysis of sequences distal to FRA7I also disclosed regions highly enriched in peaks of flexibility (Fig. 4C). These results confirm that common fragile sites contain highly flexible regions but also indicate that such structural features can also be found outside the core fragile domain. Therefore, if DNA flexibility is a hallmark of CFS, additional yet unknown structural components also contribute to fragility.

### Inverted duplication of the 7q34 region as a result of one BFB cycle

We then addressed the question as to whether the inverted duplication of the region containing *PIP* in T47D cells was generated by a cycle of BFB initiated at FRA7I. According to this model, sequences centromeric to the break could be amplified, whereas regions telomeric to the break should be excluded from the repeat (9,10). To check this point, we performed two-color FISH on T47D metaphase spreads using a probe overlapping *PIP* (green) and probes telomeric to FRA7I (red) (Fig. 5A). A single red signal was observed on each chromatid of all chromosomes that exhibited a duplication of the green signal, suggesting that the region telomeric to FRA7I is not duplicated (Fig. 5B). This was confirmed by using a second set of probes more distant from each other: AC091742 (red) and AC004891 (green) (Fig. 5C and D). The observation of interphase nuclei definitely established this point (Fig. 5D). Hence, we concluded that activation of FRA7I triggered the rearrangement.

Moreover, the position of the green signal on chromosome 7q (Fig. 5D) suggested that the telomeric part of the chromosome caps the duplicated region. This hypothesis was confirmed by using more distal probes, up to the sub-telomeric region of the long arm of chromosome 7 (Fig. 5C). In each case, we observed a single hybridization spot, distal to the duplication (data not shown). These results support the hypothesis that the inverted duplication was generated by one cycle of BFB



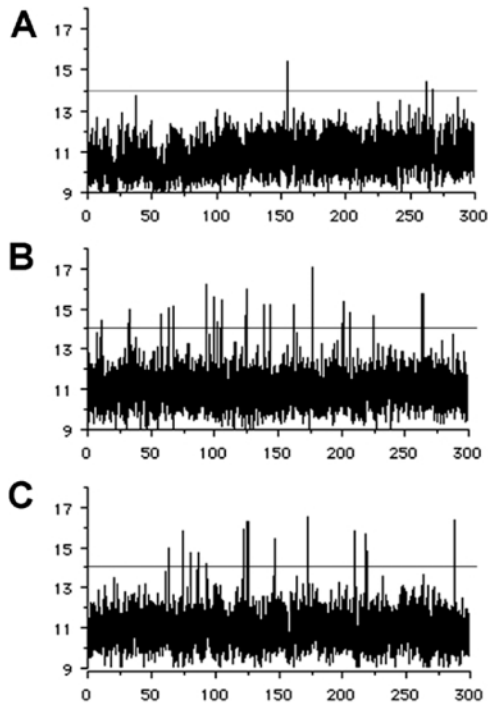
**Figure 3.** Localization of FRA7I in human lymphocytes. (A) Probes used to hybridize metaphase spreads of aphidicolin-treated lymphocytes from a healthy donor. (B) Two color FISH with probes AC004534 (green) and AC006016 (red): example of signals lining the break.

initiated from a break at FRA7I and that amplification was frozen within the first cycle by recapture of the chromosome fragment bearing the telomeric part of the long arm of chromosome 7. We therefore propose that the following steps lead to duplicate the *PIP* region (Fig. 6): in G1 interphase, a break at FRA7I on one homologue initiated the BFB cycle mechanism (Fig. 6A); the two broken sister chromatids fused after replication (Fig. 6B); at anaphase, a bridge was formed when the two centromeres of the dicentric chromatid moved to opposite poles of the mitotic spindle and was broken upon completion of anaphase or telophase (Fig. 6C). The broken chromatid bearing the duplication was healed by recapture of one copy of the chromosome fragment bearing the telomeric part of 7q (Fig. 6D), giving rise to one deleted and counter-selected (Fig. 6E), and one amplified selected (Fig. 6F) daughter cell.

## DISCUSSION

Growing evidence indicates that gene amplification may arise from the BFB cycle mechanism in cancer cells and that recurrent breaks resolve the mitotic bridge formed at each cell cycle (11–14). However, it is presently unknown whether breaks at CFS, especially in cells of patients that were neither treated by chemotherapy or submitted to drastic environmental injury, contribute to initiate BFB cycles *in vivo*.

Here we show that a region containing the *PIP* gene at 7q34 is duplicated in the breast carcinoma cell line T47D, which overexpresses this gene. The duplicated *PIP* region appears as part of a large palindrome lying '*in loco*' on the distal part of the long arm of one chromosome 7 and exhibits the inverted repeat organization generated by the BFB cycle mechanism. Moreover, upon identification of FRA7I at 7q35, ~2 Mb telomeric to the *PIP* gene, we were able to show that FRA7I sets the distal boundary of the inverted repeat. These results

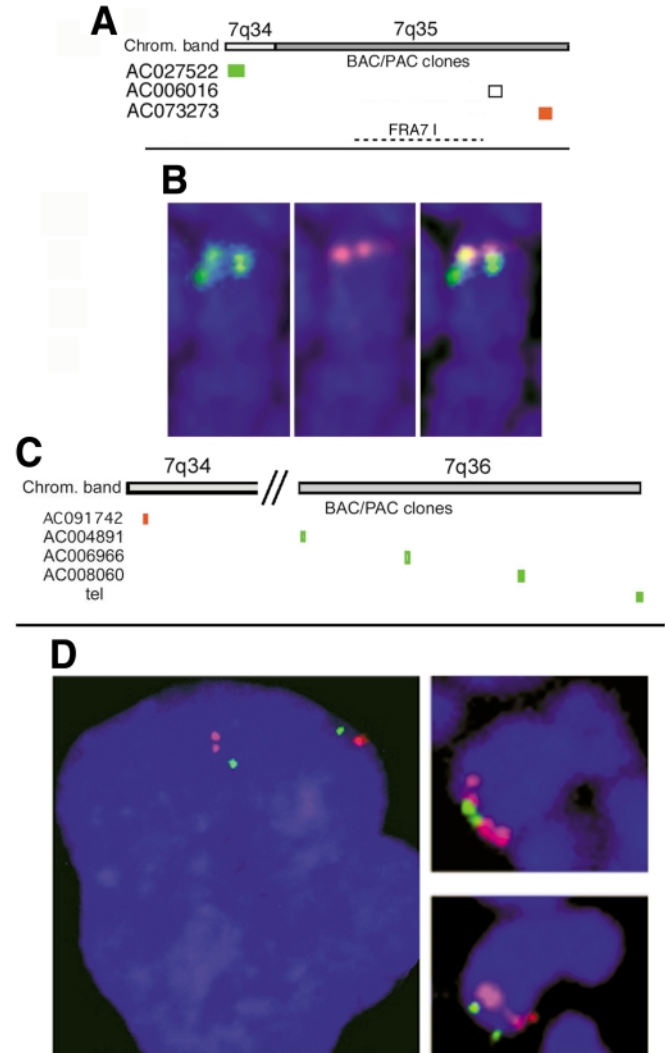


**Figure 4.** Flexibility analysis of the 7q35 region. Analysis of DNA flexibility of a 300 kb long region was performed using FlexStab computer program. x Axis, nucleotide position, y axis, degree of inclination in the twist angle. The value corresponding to 4.5 SD above the average value is indicated with a line. Peaks higher than this threshold value correspond to regions with significant high flexibility. Examples of sequences located (A) centromeric to FRA7I (AC004534), (B) within FRA7I (AC006315) and (C) telomeric to FRA7I (AC073273).

support the conclusion that the event initiating the BFB cycle took place within FRA7I.

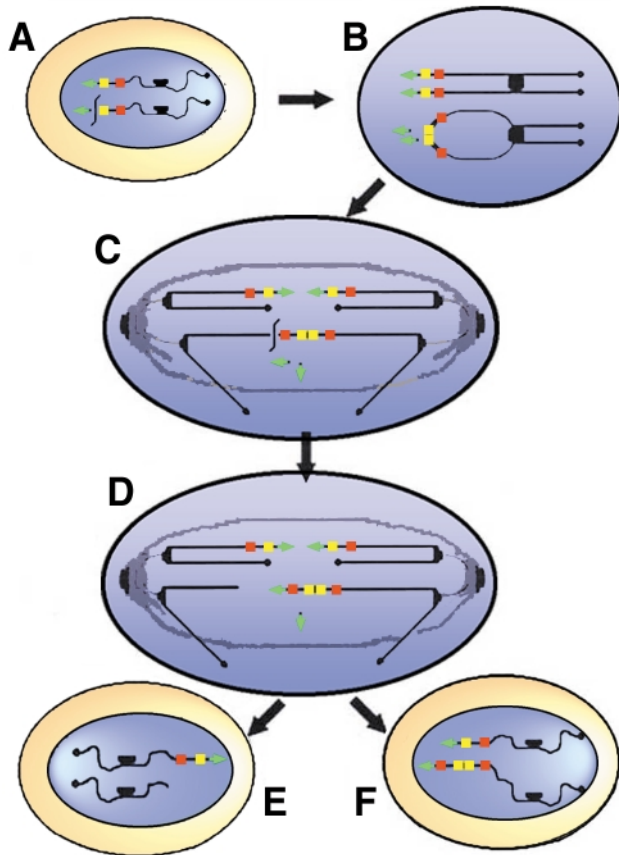
In Hamster cells selected *in vitro* to resist cytotoxic drugs, BFB cycles have been shown to accumulate intra-chromosomal copies of the target gene within large inverted repeats lying on a chromosome arm where one gene copy maps in normal cells (6–9). Fused sister chromatids and anaphase bridges, two typical intermediates of this mechanism, were repeatedly observed in cell populations undergoing intra-chromosomal amplification (7,9). The cytogenetic manifestations of the BFB cycles have also been observed in some tumor cells, indicating that this mechanism also operates in human cancers (11–14). In all cases, recurrent cycles of BFB did occur, leading to progressive accumulation of extra copies during clonal expansion. In the breast carcinoma cell line T47D, we show that the BFB cycle mechanism generates an inverted repeat involving the *PIP* gene region rather than typical ladder-like structures, such as those previously described in rodent cells (6–9) and a human gastric carcinoma cell line (14). Moreover, the detection of sequences telomeric to the duplicated region and FRA7I in T47D cells strongly suggests that amplification was frozen within the first cycle of BFB by recapture of the chromosome fragment bearing the telomeric part of the broken chromosome (Fig. 6).

Repair of amplified chromosomes with fragments generated by the initial break was not observed previously (6–9,14). In



**Figure 5.** Lack of duplication of the region telomeric to FRA7I and recapture of the telomeric fragment. (A and C) Probes telomeric to FRA7I used to hybridize metaphase spreads of T47D cells; tel: a 7q telomere DNA probe. (B) Two-color FISH with AC027522 (green) containing *PIP* and AC073273 (red) telomeric to FRA7I: a single red signal and two green signals are visible on each chromatid of one chromosome. Identical results were observed with probe AC006016. FITC (left) and rhodamine (middle) labeling are shown separately and merged (right). (D) Two-color FISH with AC091742 (red) centromeric to *PIP* and AC004891 (green) telomeric to FRA7I. Example of an interphase nucleus with one chromosome 7 bearing duplicated red signals, specific for the inverted duplication of the *PIP* containing region and one green signal distal to FRA7I; note the presence of the normal homologue with a single red signal. A single green signal is also observed on each chromatid of all metaphase chromosomes bearing duplicated red signals. The results shown are representative of four independent experiments.

mutant cells selected *in vitro* for drug resistance (6–9), this may be due to prolonged selection pressure. Indeed, as long as copies sufficient to overcome the toxic effects of the selective drug are not acquired, early repair of the amplified chromosome would block amplification and prevent the cells from growing in selective medium. Thus, the acentric fragment is probably lost or degraded long before healing of the broken chromosome (6–9). The same constraint can account for the lack of



**Figure 6.** Model for the generation of the inverted duplication found in T47D cells. The two chromosomes 7 are represented with the *PIP* gene region (yellow), the region centromeric to *PIP* (red) and the telomeric part of the 7q arm distal to FRA7I (green). (A) Initial break at FRA7I (black broken line), (B) fusion of the broken sister chromatids after replication, (C) break (black broken line) of the bridge formed at anaphase, (D) healing of the broken chromatid by recapture of one copy of the chromosome fragment bearing the telomeric part of 7q. The behavior of the second copy of the fragment is unknown. (E) One deleted and (F) one amplified daughter cell are formed. The normal homologue is shown above the rearranged chromosome at each step (A–F).

sequences telomeric to the *MET* amplicons derived from multiple BFB cycles, as recently described (14). Here, the results suggest that a single extra copy of *PIP* and/or of a neighboring gene gives a growth advantage to T47D breast carcinoma cells. It is unlikely that the weak increase in *PIP* copy number by itself accounts for the ~5-fold higher level of *PIP* RNA detected in these cells as compared with the *PIP* expression level in normal mammary gland (M.A.D., unpublished data). We may thus hypothesize that, following a first event leading to gene overexpression in T47D cells, BFB cycle-driven duplication significantly increased the *PIP* expression level, thereby permitting an early repair of the broken chromatid.

In model systems, evidence has been obtained that breaks at fragile sites distal and proximal to the selected gene frame the repeated sequences at early stages of the process. Indeed, it has been demonstrated that a targeted break telomeric to the gene efficiently triggered the initial sister chromatid fusion (9,10,50), while a break centromeric to the gene recurrently resolved the

bridge formed in anaphase at each cell cycle (9). Amplicons limited by two CFS have been identified in mutant cells recovered upon selection with drugs that are potent CFS activators, thus indicating that the selective agent both selects for amplification and induces the BFB cycle mechanism (9). In tumor cells exhibiting BFB cycle-driven *MET* amplification, breaks resolving anaphase bridges have been shown to repeatedly occur at FRA7G, a CFS proximal to *MET* (14). Here we identified FRA7I at the molecular level and showed that the fragile region encompasses a megabase long sequence and is enriched in peaks of enhanced flexibility. Both the size and the properties of the fragile sequence disclosed are typical of CFS. FRA7I lies at 7q35, about two Mb telomeric to the *PIP* gene and we demonstrate that it sets the distal boundary of the repeated sequence in T47D breast carcinoma cells. This finding establishes for the first time that the BFB cycle mechanism can be initiated by a break occurring within a CFS in human cancer cells.

It has been reported that telomere dysfunction may play a role in the initiation of the BFB cycle mechanism. Fusions of sister chromatids with shortened telomeres in rodent cell models (5,51) and examples of chromosome or chromatid fusions in cells with short or unprotected telomeres have been reported *in vitro* and *in vivo* in a variety of genetic backgrounds in mice and possibly in human cancers (52–55). In the T47D breast carcinoma cells it is most unlikely that the initial break and subsequent sister chromatid fusion originate from such a mechanism. The finding that FRA7I sets the telomeric boundary of the inverted repeat, and that the fragment of the long arm of chromosome 7 telomeric to FRA7I retained its original structure, points to the initial break occurring within FRA7I.

The mechanisms responsible for activation of CFS in cancer cells are not fully understood. It has been demonstrated that stresses resulting from variations in tumor microenvironment, such as oxygen starvation, activate some CFS (56). Alternatively, fragile site expression may be consecutive to spontaneous changes in chromatin organization and/or impairment of the rate or the timing of DNA replication (14,30–32). Whether chromosomal instability, tumor microenvironment variations or other unknown events led to FRA7I activation remain to be elucidated.

In conclusion, our results highlight for the first time that BFB cycles can be initiated *in vivo* by events taking place within CFS in tumor cells. Moreover, the observation of the earliest products of the BFB cycle mechanism in the breast carcinoma cell line T47D is unprecedented.

## MATERIALS AND METHODS

### Genomic library construction and BAC/PAC clones

A BAC library was constructed from human seminal vesicle DNA and cloned into the pBeloBAC11 vector, as reported (57). The H2D BAC clone was isolated by screening the library with a *PIP* cDNA probe (58). The other BAC/PAC clones were chosen according to their position in draft genome sequence assembly ([http://www.nhgri.nih.gov/genome\\_hub.html](http://www.nhgri.nih.gov/genome_hub.html)) and were purchased from BACPAC Resources, web site (<http://>

www.chori.org/bacpac). A 7q telomere DNA probe (QBiogene, Illkirch, France) was also used.

### Cell culture and fragile site induction

T47D breast carcinoma and HT1080 fibrosarcoma cell lines were obtained from American Type Culture Collection and grown in classical culture medium. The induction of fragile sites in HT1080 cells and lymphocytes and metaphase spreads were performed as described (59).

### Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

BAC and PAC DNA was labeled using the BioPrime labeling system (Life Technology, Cergy-Pontoise, France) with digoxigenin (DIG)-11-dUTP (Boehringer, Mannheim, Germany) or biotin. Competitor Cot-1 DNA was added to the probes, samples were denatured at 70°C for 5 min and incubated for 3 h at 37°C. FISH hybridization was performed as adapted (60). After an overnight hybridization in a moist chamber at 37°C, slides were washed in 4× SSC/0.3% Tween 20 for 1 min at 70°C, then in PBS for 5 min at room temperature. Probe detection was performed using FITC-avidin/rhodamine anti-DIG antibody (Oncor, Illkirch, France) and DAPI was used as counterstain. The slides were examined under a Zeiss (Jena, Germany) epifluorescence microscope with a combination of filters for DAPI, FITC and TRITC. Pictures were acquired using a tri-CCD camera and Vysis (Downer Grove, IL) computer software (Smart capture).

### Computer analysis of helix flexibility

DNA flexibility was measured using the FlexStab program available at the Hebrew University of Jerusalem, web site (<http://leonardo.ls.huji.ac.il/departements/genesite/faculty/bkerem.htm>), as previously reported (25).

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) to D.P.T., M.D and P.C; Fondation de France to D.P.T; the Ligue Nationale Française contre le Cancer and Fondation pour la Recherche Médicale to M.D; the Institut National de la Santé et Recherche Médicale and Institut Gustave Roussy to P.C; and the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) to J.G. M.C. is a fellow of the ARC and AIRC. M.A.D. and L.R. received grants from the French government (M.E.N.R.T.) and M.A. from the Fondation pour la Recherche Médicale.

### REFERENCES

1. Brison, O. (1993) Gene amplification and tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta*, **1155**, 25–41.
2. Schwab, M. (1999) Oncogene amplification in solid tumors. *Semin. Cancer Biol.*, **9**, 319–325.
3. Stark, G.R., Debatisse, M., Giulotto, E. and Wahl, G.M. (1989) Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell*, **57**, 901–908.
4. McClintock, B. (1951) Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **16**, 13–47.
5. Smith, K.A., Stark, M.B., Gorman, P.A. and Stark, G.R. (1992) Fusions near telomeres occur very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 5427–5431.
6. Toledo, F., Le Roscouet, D., Buttin, G. and Debatisse, M. (1992) Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *EMBO J.*, **11**, 2665–2673.
7. Toledo, F., Buttin, G. and Debatisse, M. (1993) The origin of chromosome rearrangements at early stages of *AMPD2* gene amplification in Chinese hamster cells. *Current Biol.*, **3**, 255–264.
8. Ma, C., Martin, S., Trask, B. and Hamlin, J.L. (1993) Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster cells. *Genes Dev.*, **7**, 605–620.
9. Coquelle, A., Pipiras, E., Toledo, F., Buttin, G. and Debatisse, M. (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell*, **89**, 215–225.
10. Pipiras, E., Coquelle, A., Bieth, A. and Debatisse, M. (1998) Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *EMBO J.*, **17**, 325–333.
11. Gisselsson, D., Pettersson, L., Hoglund, M., Heidenblad, M., Gorunova, L., Wiegant, J., Mertens, F., Dal Cin, P., Mitelman, F. and Mandahl, N. (2000) Chromosomal breakage–fusion–bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 5357–5362.
12. Saunders, W.S., Shuster, M., Huang, X., Gharaibeh, B., Enyenihi, A.H., Petersen, I. and Gollin, S.M. (2000) Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 303–308.
13. Shuster, M.I., Han, L., Le Beau, M.M., Davis, E., Sawicki, M., Lese, C.M., Park, N.H., Colicelli, J. and Gollin, S.M. (2000) A consistent pattern of RIN1 rearrangements in oral squamous cell carcinoma cell lines supports a breakage–fusion–bridge cycle model for 11q13 amplification. *Genes Chromosomes Cancer*, **28**, 153–163.
14. Hellman, A., Zlotorynski, E., Scherer, S.W., Cheung, J., Vincent, J.B., Smith, D.I., Trakhtenbrot, L. and Kerem, B. (2002) A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell*, **1**, 89–97.
15. Debatisse, M., Coquelle, A., Toledo, F. and Buttin, G. (1998). Gene amplification mechanisms: the role of fragile sites. In Schwab, M. (ed.), *Recent Results in Cancer Research*. Springer-Verlag, Heidelberg, **154**, pp. 216–226.
16. Sutherland, G.R. (1977) Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*, **197**, 265–266.
17. Yunis, J.J., Soreng, A.L. and Bowe, A.E. (1987) Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogene*, **1**, 59–69.
18. Sutherland, G.R., Baker, E. and Richards, R.I. (1998) Fragile sites still breaking. *Trends Genet.*, **14**, 501–506.
19. Richards, R.I. (2001) Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet.*, **17**, 339–345.
20. Sutherland, G.R. and Richards, R.I. (1995) The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 323–327.
21. Glover, T.W. (1998) Instability at chromosomal fragile sites. *Recent Results Cancer Res.*, **154**, 185–199.
22. Shiraishi, T., Druck, T., Mimori, K., Flomenberg, J., Berk, L., Alder, H., Miller, W., Huebner, K. and Croce, C.M. (2001) Sequence conservation at human and mouse orthologous common fragile regions, FRA3B/FHIT and Fra14A2/Fhit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 5722–5727.
23. Boldog, F., Gemmill, R.M., West, J., Robinson, M., Robinson, L., Li, E., Roche, J., Todd, S., Waggoner, B., Lundstrom, R. *et al.* (1997) Chromosome 3p14 homozygous deletions and sequence analysis of FRA3B. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 193–203.
24. Huang, H., Qian, J., Proffit, J., Wilber, K., Jenkins, R. and Smith, D.I. (1998) FRA7G extends over a broad region: coincidence of human endogenous retroviral sequences (HERV-H) and small polydispersed circular DNAs (spcDNA) and fragile sites. *Oncogene*, **16**, 2311–2319.
25. Mishmar, D., Rahat, A., Scherer, S.W., Nyakatura, G., Hinzmann, B., Kohwi, Y., Mandel-Gutfroind, Y., Lee, J.R., Drescher, B., Sas, D.E. *et al.* (1998) Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on



- human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8141–8146.
26. Krummel, K.A., Roberts, L.R., Kawakami, M., Glover, T.W. and Smith, D.I. (2000) The characterization of the common fragile site FRA16D and its involvement in multiple myeloma translocations. *Genomics*, **69**, 37–46.
  27. Ried, K., Finnis, M., Hobson, L., Mangelsdorf, M., Dayan, S., Nancarrow, J.K., Woollatt, E., Kremmidiotis, G., Gardner, A., Venter, D. *et al.* (2000) Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1651–1663.
  28. Thorland, E.C., Myers, S.L., Persing, D.H., Sarkar, G., McGovern, R.M., Gostout, B.S. and Smith, D.I. (2000) Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res.*, **60**, 5916–5921.
  29. Arlt, M.F., Miller, D.E., Beer, D.G. and Glover, T.W. (2002) Molecular characterization of FRAXB and comparative common fragile site instability in cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, **33**, 82–92.
  30. Le Beau, M.M., Rassool, F.V., Neilly, M.E., Espinosa, R., Glover, T.W., Smith, D.I. and McKeithan, T.W. (1998) Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 755–761.
  31. Wang, L., Darling, J., Zhang, J.S., Huang, H., Liu, W. and Smith, D.I. (1999) Allele-specific late replication and fragility of the most active common fragile site, FRA3B. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 431–437.
  32. Hellman, A., Rahat, A., Scherer, S.W., Darvasi, A., Tsui, L.C. and Kerem, B. (2000) Replication delay along FRA7H, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 4420–4427.
  33. Huebner, K., Garrison, P.N., Barnes, L.D. and Croce, C.M. (1998) The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu. Rev. Genet.*, **32**, 7–31.
  34. Smith, D.I., Huang, H. and Wang, L. (1998) Common fragile sites and cancer (Review). *Int. J. Oncol.*, **12**, 187–196.
  35. Fang, J.M., Arlt, M.F., Burgess, A.C., Dagenais, S.L., Beer, D.G. and Glover, T.W. (2001) Translocation breakpoints in FHIT and FRA3B in both homologs of chromosome 3 in an esophageal adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **30**, 292–298.
  36. Murphy, L.C., Lee-Wing, M., Goldenberg, G.J. and Shiu, R.P.C. (1987) Expression of the gene encoding a prolactin-inducible protein in human breast cancers *in vivo*: a correlation with steroid receptor status. *Cancer Res.*, **47**, 4160–4164.
  37. Autiero, M., Abrescia, P. and Guardioli, J. (1991) Interaction of seminal plasma proteins with cell surface antigens: presence of a CD4-binding glycoprotein in human seminal plasma. *Exp. Cell Res.*, **197**, 268–271.
  38. Autiero, M., Cammarota, G., Friedlein, A., Zulauf, M., Chiappetta, G., Dragone, V. and Guardioli, J. (1995) A 17 kDa CD4-binding glycoprotein present in human seminal plasma and in breast tumor cells. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 1461–1464.
  39. Basmaciogullari, S., Autiero, M., Culerrier, R., Mani, J.C., Gaubin, M., Mishal, Z., Guardioli, J., Granier, C. and Piatier-Tonneau, D. (2000) Mapping the interaction site between CD4 and gp17, a glycoprotein secreted from seminal vesicles and breast carcinomas. *Biochemistry*, **39**, 5332–5340.
  40. Caputo, E., Manco, G., Mandrich, L. and Guardioli, J. (2000) A novel aspartyl-proteinase from apocrine epithelia and breast tumors. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7935–7941.
  41. Myal, Y., Robinson, D.B., Iwasaki, B., Tsuyuki, D., Wong, P. and Shiu, R.P. (1991) The prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP-15) gene: cloning, structure and regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **80**, 165–175.
  42. Autiero, M., Culerrier, R., Bouchier, C., Basmaciogullari, S., Gaubin, M., El Marhomy, S., Blanchet, P., Paradis, V., Jardin, A., Guardioli, J. and Piatier-Tonneau, D. (1999) Abnormal restriction pattern of PIP gene associated with human primary prostate cancers. *DNA Cell Biol.*, **18**, 481–487.
  43. Autiero, M., Camarca, A., Ciullo, M., Debily, M.A., El Marhomy, S., Pasquinelli, R., Capasso, I., D' Aiuto, G., Anzisi, A.M., Piatier-Tonneau, D. and Guardioli, J. (2002) Intragenic amplification and formation of extrachromosomal small circular DNA molecules from the PIP gene on chromosome 7 in primary breast carcinomas. *Int. J. Cancer*, **99**, 370–377.
  44. Clark, J.W., Snell, L., Shiu, R.P., Orr, F.W., Maitre, N., Vary, C.P., Cole, D.J. and Watson, P.H. (1999) The potential role for prolactin-inducible protein (PIP) as a marker of human breast cancer micrometastasis. *Br. J. Cancer*, **81**, 1002–1008.
  45. Dutrillaux, B., Gerbault-Seureau, M., Saint-Ruf, C., Prieur, M., Muleris, M. and Bardot, V. (1993) The causes and consequences of chromosomal aberrations. In Kirsch, I.R. (ed.), *Cytogenetical characterisation of colorectal and breast carcinomas*, CRS Press, Bethesda, MD, pp. 447–467.
  46. Thompson, F., Emerson, J., Dalton, W., Yang, J.M., McGee, D., Villar, H., Knox, S., Massey, K., Weinstein, R., Bhattacharyya, A. and Trent, J. (1993) Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinomas. Twenty-eight cases with primary disease. *Genes Chromosome Cancer*, **7**, 185–193.
  47. Kallionemi, A., Kallionemi, O.P., Piper, J., Tanner, M., Stokkes, T., Chen, L., Smith, H.S., Pinkel, D., Gray, J.W. and Waldam, F.M. (1994) Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2156–2160.
  48. Pandis, N., Jin, Y., Gorunova, L., Petersson, C., Bardi, G., Idvall, I., Johansson, B., Ingvar, C., Mandahl, N., Mitelman, F. and Heim, S. (1995) Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer*, **12**, 173–185.
  49. Glover, T.W., Berger, C., Coyle, J. and Echo, B. (1984) DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.*, **67**, 136–142.
  50. Kuo, M.T., Vyas, R.C., Jiang, L.X. and Hittelman, W.N. (1994) Chromosome breakage at a major fragile site associated with P-glycoprotein gene amplification in multidrug-resistant CHO cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5202–5211.
  51. Stark, G.R. (1993) Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification. *Adv. Cancer Res.*, **61**, 87–113.
  52. Chan, S.W. and Blackburn, E.H. (2002) New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*, **21**, 553–563.
  53. Hackett, J.A. and Greider, C.W. (2002) Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene*, **21**, 619–626.
  54. Chang, S., Khoo, C. and DePinho, R.A. (2001) Modeling chromosomal instability and epithelial carcinogenesis in the telomerase-deficient mouse. *Semin. Cancer Biol.*, **11**, 227–239.
  55. Bouffler, S.D., Blasco, M.A., Cox, R. and Smith, P.J. (2001) Telomeric sequences, radiation sensitivity and genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, **77**, 995–1005.
  56. Coquelle, A., Toledo, F., Stern, S., Bieth, A. and Debatisse, M. (1998) A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol. Cell*, **2**, 259–265.
  57. Brosch, R., Gordon, S.V., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Soravito, C., Barrell, B.G. and Cole, S.T. (1998) Use of a Mycobacterium tuberculosis H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect. Immun.*, **66**, 2221–2229.
  58. Autiero, M., Bouchier, C., Basmaciogullari, S., Zaboriski, P., El Marhomy, S., Martin, M., Guardioli, J. and Piatier-Tonneau, D. (1997) Isolation from a human seminal vesicle library of the cDNA for gp17, a CD4 binding factor. *Immunogenetics*, **46**, 345–348.
  59. Toledo, F., Coquelle, A., Svetlova, E. and Debatisse, M. (2000) Enhanced flexibility and aphidicolin-induced DNA breaks near mammalian replication origins: implications for replicon mapping and chromosome fragility. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4805–4813.
  60. Goguel, A.F., Pulcini, F., Danglot, G., Fauvet, D., Devignes, M.D. and Bernheim, A. (1996) Mapping of 22 YACs on human chromosomes by FISH using yeast DNA Alu-PCR products for competition. *Ann. Genet.*, **39**, 64–68.

## ARTICLE 3

### **Characterization of a conserved aphidicolin-sensitive common fragile site at human 4q22 and mouse 6C1: possible association with an inherited disease and cancer**

Lorène Rozier, Eliane El-Achkar, Françoise Apiou et Michelle Debatisse

Oncogene, 2004, **23** (41) p 6872-6880

Les SFCs sont impliqués dans la progression tumorale (Introduction I-5) mais à la différence des SFRs, leur rôle (s'il existe) dans la génération de mutations responsables de maladie génétique héréditaire est peu documenté. Récemment, FRA6E a été cloné en 6q26 et couvre le gène *PARKIN* (associé à une forme autosomale récessive juvénile de la maladie de parkinson, ARJP). Des délétions de cette région, qui pourraient être liées à la présence de FRA6E, ont été observées chez des patients ARJP (Denison et al., 2003a).

Nous avons étudié une région du génome de souris contenant le gène *grid2* (récepteur ionotropique au glutamate delta 2), qui paraissait particulièrement intéressante. En effet, une haute fréquence de mutations spontanées (allèles hotfoot, tapdancer) a été observée dans ce gène chez des souris de fonds génétiques différents (Lalouette et al., 1998). Les souris hotfoot présentent un phénotype caractéristique d'une ataxie cérébelleuse (Zuo et al., 1997). La majorité des allèles mutants décrits sont récessifs. Treize d'entre eux ont été caractérisés au niveau moléculaire : l'un présente une intégration spontanée d'un transgène, dix autres portent une délétion dans *grid2* qui conduit à l'expression d'une protéine tronquée ou à son absence (Lalouette et al., 1998; Lalouette et al., 2001; Wang et al., 2003), finalement les deux derniers allèles caractérisés ont des translocations réciproques impliquant le gène *grid2* (Robinson et al., 2005). L'existence de cette instabilité génétique nous a incité à chercher si un SFA était présent dans cette région. Notons qu'actuellement seuls deux SFAs du génome de souris ont été clonés, *Fra14A2* et *Fra8E1*. Ces sites chevauchent les gènes *fhit* (*Fra14A2*) et *wox1* (*Fra8E1*), homologues des gènes *FHIT* et *WWOX* humains, localisés respectivement dans FRA3B et FRA16D, les deux SFAs les plus actifs dans les lymphocytes humains (Glover et al., 1998b; Krummel et al., 2002; Pekarsky et al., 1998).

Le gène *grid2* code une protéine de la famille des récepteurs ionotropiques de fonction méconnue dont l'expression est restreinte aux cellules de purkinje (Yuzaki, 2004). Ce gène présente un certain nombre de similarités avec les gènes *fhit* et *wox1*, comme sa richesse en AT et sa grande taille (il s'étend sur 1.5 Mb et code un ARNm de 3 kb). En étudiant par FISH des chromosomes de fibroblastes murins (cellules 531) traités à l'AP, avec des sondes de BACs couvrant environ 11 Mb autour de *grid2*, nous avons confirmé la localisation de ce gène dans la bande 6C1 et démontré la présence de cassures récurrentes dans cette région (figure 1, Tableau 1). En effet, environ 30% des cassures du chromosome 6 surviennent au niveau des sondes (soit 4% des cassures totales) ce qui démontre la présence d'un site fragile dans la région. La position relative de chaque BAC par rapport aux cassures a été déterminée (Tableau 1). Une analyse plus fine par FISH double-couleur a permis de mettre en évidence 2 régions de cassures préférentielles, séparées par une région centrale assez stable de 2,3 Mb (figure 2). La présence de cassures récurrentes, a été confirmée avec les mêmes sondes par

analyse de lymphocytes de souris traités à l'AP. Il est important de noter que les mutations de *grid2* caractérisées au niveau moléculaire sont situées dans la partie du gène qui coïncide avec une des régions de cassures préférentielles (figure 2b), suggérant que ces mutations récurrentes pourraient résulter de l'expression de ce nouveau site, appelé *Fra6C1*, dans les cellules de la lignée germinale. Ces résultats sont particulièrement intéressants dans la mesure où ils établissent l'existence d'une relation entre un SFA et une maladie héréditaire à transmission mendélienne.

L'homologue humain de *grid2* (*GRID2*), situé en 4q22, a été cloné par homologie de séquence avec le gène murin (Hu et al., 1998). Nous avons entrepris de déterminer si cette région contenait également un SFA. La région d'homologie entre les 2 génomes s'étend sur 7 Mb (figures 2 et 4). Nous avons observé grâce à une sonde spécifique de la bande 4q22 que 15 à 30 % des cassures induites par l'AP sur le chromosome 4, dans les cellules HT1080 et dans des lymphocytes de 3 donneurs sains, sont localisées dans cette bande (figure 3). Cela représente entre 1,9 et 2,4% des cassures totales. L'analyse d'un contig de BAC a confirmé l'existence d'une région de cassures récurrentes, chevauchant *GRID2* (tableau 2) et s'étendant sur 7 Mb, ce qui révèle clairement qu'un SFA est présent à ce locus dans le génome humain. L'analyse détaillée de ce site, que nous avons nommé FRA4F, a permis de caractériser 2 sous régions où les cassures surviennent à haute fréquence (figure 4e). L'analyse de la région fragile n'a pas révélé de différences significatives par rapport aux séquences contrôles (composition, distribution des séquences répétées). De nombreux pics de flexibilités ont été trouvés dans la région fragile (culminant au niveau de *GRID2*) mais également, bien que moins nombreux, dans la région télomérique au site (figure 4f).

Si les SFC sont présents chez toutes les espèces de mammifères chez qui ils ont été cherchés (Introduction I-3), leur conservation entre les espèces est peu documentée. Seuls les deux SFAs FRA3B/*Fra14A2* et FRA16D/*Fra8E1* avaient été comparés entre l'homme et la souris. Dans les 2 cas, l'organisation relative des gènes et des régions fragiles est bien conservé, ce que nous trouvons également ici sur les 7 Mb de synténie (figures 2 et 4).

L'analyse des données de la littérature montre que la région 4q22 est fréquemment délétée dans les cancers du foie (30 à 70%) (Laurent-Puig et al., 2001; Nagai et al., 1997; Wong et al., 2000; Yeh et al., 1996), du col de l'utérus et de l'œsophage (Mitra et al., 1994; Rumpel et al., 1999). Récemment, Bluteau et collaborateurs ont analysé par LOH 36 tumeurs primaires du foie et trouvé 3 régions minimales de délétions sur le bras q du chromosome 4, dont une en 4q22 (Bluteau et al., 2002). Cette région minimale de délétion (15 Mb) est centrée sur la région FRA4F, suggérant que ce site pourrait jouer un rôle dans la cancérogénèse du foie.

# Characterization of a conserved aphidicolin-sensitive common fragile site at human 4q22 and mouse 6C1: possible association with an inherited disease and cancer

Lorène Rozier<sup>1</sup>, Eliane El-Achkar<sup>1</sup>, Françoise Apiou<sup>1</sup> and Michelle Debatisse<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>*Instabilité du génome et cancer, FRE2584-CNRS, Institut Curie, 26 rue d'Ulm 75248 Paris Cédex 05, France*

**Fragile sites are classified as common or rare depending on their occurrence in the populations. While rare sites are mainly associated with inherited diseases, common sites have been involved in somatic rearrangements found in the chromosomes of cancer cells. Here we study a mouse locus containing the ionotropic glutamate receptor delta 2 (*grid2*) gene in which spontaneous chromosome rearrangements occur frequently, giving rise to mutant animals in inbred populations. We identify and clone common fragile sites overlapping the mouse *grid2* gene and its human ortholog *GRID2*, lying respectively at bands 6C1 and 4q22 in a 7-Mb-long region of synteny. These results show a third example of orthologous common sites conserved at the molecular level, and reveal an unexpected link between an inherited disease and an aphidicolin-sensitive region. Recurrent deletions of subregions of band 4q22 have been previously described in human hepatocellular carcinomas. This 15-Mb-long region appears precisely centered on the site described here, which strongly suggests that it also plays a specific role in hepatic carcinogenesis.**

*Oncogene* (2004) 23, 6872–6880. doi:10.1038/sj.onc.1207809  
Published online 2 August 2004

**Keywords:** common fragile site; hepatic carcinogenesis; inherited disease, chromosome rearrangement; *grid2*; aphidicolin

## Introduction

Fragile sites are chromosomal loci where breaks, constrictions or gaps (BCG) occur recurrently when cells are grown under stressing conditions (Sutherland and Baker, 2000). More than 100 fragile sites have been described and classified into two groups according to their occurrence in the population. Rare fragile sites (RFS) result from the expansion of unstable micro- or minisatellites and are present in a few percent of the individuals of a population (Jones *et al.*, 2000; Hsu and Wang, 2002). In contrast, common sites (CFS) are

expressed in all individuals, and appear to be constitutive elements of mammalian chromosomes (Smith *et al.*, 1998). Aphidicolin (AP), an inhibitor of DNA polymerases  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$ , is the archetype of CFS-inducing drugs (Glover *et al.*, 1984). Presently, the only sequence properties common to these sites are a high AT content and the presence of clusters of peaks of enhanced flexibility (Mishmar *et al.*, 1998; Arlt *et al.*, 2003).

The contribution of RFS and CFS to genome rearrangements and diseases has long been studied but is still unclear. Some of the RFS, that is, *FRAXA* (fragile X syndrome), *FRAXE* and *FRA11B* (Jacobsen syndrome), have been associated with heritable genetic diseases, especially mental retardation (Smith *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000). In contrast, CFS have been proposed to play a role in the development of cancer (Yunis and Soreng, 1984). Until recently, this was mostly inferred from cytogenetic correlation between their locations and those of cancer-associated chromosome rearrangements, and from the ability of a variety of carcinogenic drugs to induce CFS. More recently, hypoxia, a tumor microenvironment-dependent stress, was also shown to induce CFS (Coquelle *et al.*, 1998). It was further demonstrated that the human *FHIT* gene and its murine ortholog *fhit*, which respectively lie within *FRA3B* and *Fra14A2*, are often deleted or abnormally transcribed in various primary carcinomas (Smith *et al.*, 1998; Huebner and Croce, 2001; Ginestier *et al.*, 2003). The demonstration that *fhit* behaves as a tumor suppressor gene again reinforced the hypothesis (Fong *et al.*, 2000; Ginestier *et al.*, 2003). Deletions were also frequently found in the vicinity of other CFS, which suggests that their expression also inactivates tumor suppressor genes and drives the development of cancers (Arlt *et al.*, 2003). Cancer progression relies also on oncogene amplification (Brison, 1993). Strikingly, it was shown that CFS activation drives the cycles of breakage-fusion-bridge, a mechanism responsible for accumulation of intrachromosomal amplicons in drug-resistant mutant cells (Coquelle *et al.*, 1997). More recent works identified human *FRA7I* and *FRA7G* at one boundary of the amplicons found in two tumor cell lines (Ciullo *et al.*, 2002; Hellman *et al.*, 2002). Finally, breaks at CFS were also involved in the generation of secondary rearrangements formed at late stages of the amplifica-

\*Correspondence: M Debatisse; E-mail: michelle.debatisse@curie.fr  
Received 26 January 2004; revised 29 March 2004; accepted 13 April 2004; published online 2 August 2004

tion process (Coquelle *et al.*, 1998, 2002). Altogether, these studies link chromosome rearrangements that drive tumor progression to CFS activation.

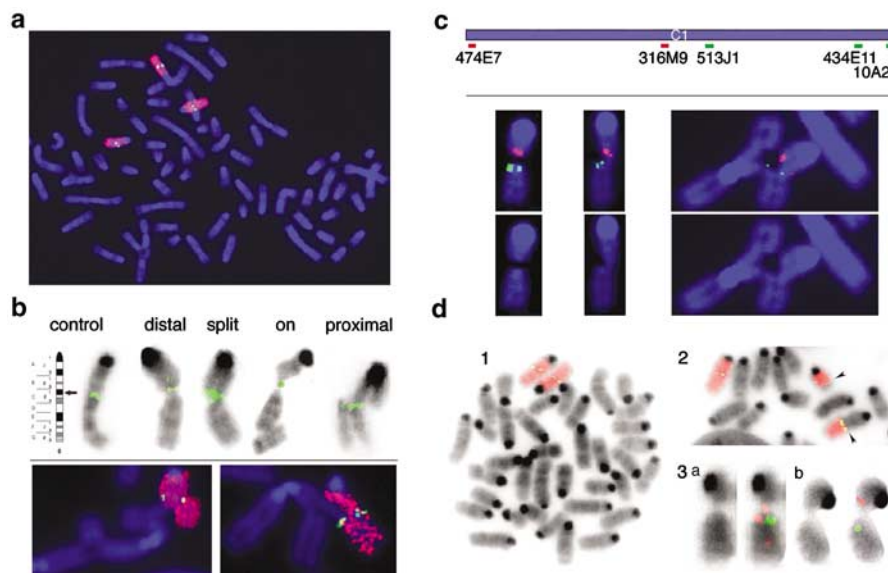
Whether CFS are also involved in the generation of mutations responsible for inherited disease is still poorly documented. Here we studied an intriguing region of the mouse genome that contains the ionotropic glutamate receptor delta 2 (*grid2*) gene, which was shown to be allelic to hotfoot (Lalouette *et al.*, 1998). A high frequency of mutant animals presenting an ataxic phenotype arose spontaneously in different genetic backgrounds. Since the first hotfoot allele described in 1960, at least 16 new alleles have been reported in the mouse genome database (MGD, <http://www.informatics.jacks.org>). The existence of this genetic instability in *grid2* made it of special interest to study this region with regard to the potential presence of a fragile site. By studying AP-treated mouse cells, we establish that a CFS does overlap *grid2*. *GRID2*, its human ortholog, was cloned by sequence homology with the mouse gene and mapped at 4q22 (Hu *et al.*, 1998). Here we show that the *GRID2* gene also lies within a CFS, the location of which accounts well for the initiation of deletions recurrently found in hepatocellular carcinomas (HCC) (Bluteau *et al.*, 2002). We also show that the organization of the two sites, called *Fra6C1* and *FRA4F*, is well conserved in the two genomes, especially the localization of subregions in which BCG occur more frequently.

## Results

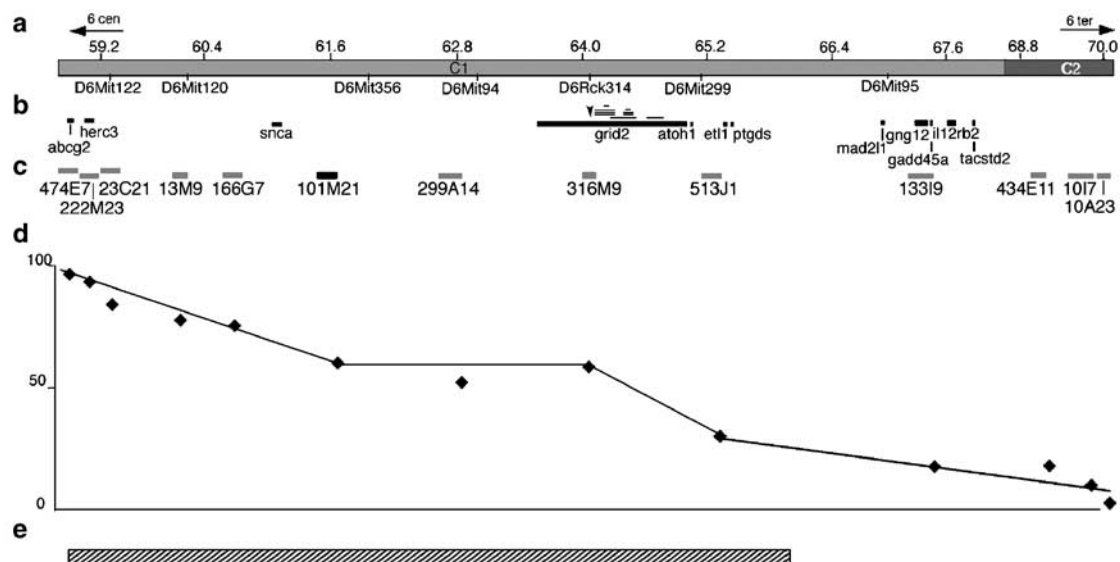
### *A fragile site overlaps the grid2 locus in the mouse genome*

In order to determine whether a CFS is present at the *grid2* locus, we analysed AP-treated mouse cells of the fibroblastic line 531. In contrast to cells of lines 3T3, 3T6 or CL1D that failed to efficiently enter mitosis with damaged DNA, metaphase spreads with broken chromosomes were readily observed in cells 531. Since the *grid2* gene has been assigned to band 6C1, we first determined the status of chromosomes 6 in these cells (Figure 1a). Metaphase spreads of untreated cells were hybridized with a painting probe specific to chromosome 6 and BAC 513J1, located as shown in Figure 2. As exemplified in Figure 1a, we found three copies of chromosome 6 per cell. Two of them seem normal while the third one is involved in a Robertsonian fusion with an unidentified partner. At least at the cytogenetic level, this fusion did not further alter the structure of chromosome 6. Hence, line 531 appears well adapted to analyse the fragility of the *grid2* locus.

Spreads of AP-treated cells were hybridized with a series of bacterial artificial chromosome (BAC) delimiting an 11.2 Mb-region overlapping the gene (Figure 2). We confirmed the localization of *grid2* at 6C1 (Figure 1b top, control panel) and showed that about 30% of the BCG observed on chromosome 6 occur in close proximity or within the fluorescent *in situ* hybridization



**Figure 1** Localization of *Fra6C1* by FISH in mouse cells. (a–e): cells 531. (a) Example of metaphase spread hybridized with BAC 513J1 and a painting probe specific to chromosome 6. (b) Top, mapping of BAC and examples of BCG. Control: (left) ideogram of G-banded mouse chromosome 6, the black arrow points to 6C1, (right) reverse-DAPI staining of a normal chromosome 6 hybridized with BAC 166G7 (green). Examples of different localization of BCG with respect to the FISH signals are shown: distal, split signal, signal within the break (on), proximal. Bottom: examples of recombination events involving chromosome 6 (red), taking place respectively distal (left panel) or proximal (right panel) to BAC 166G7 and 133I9. (c) Two-color FISH. Top: localization of the probes and color of the fluorochrome used to reveal each of them. Bottom: two-color FISH on chromosomes with BCG; from left to right probes 474E7 and 10A23, 474E7 and 434E11, 316M9 and 513J1 (note that the broken chromosome is engaged in a recombination event). Dapi-staining alone is shown under each panel. (d) Splenocytes of normal Swiss mice. 1, 2: hybridization with a chromosome 6 painting probe and BAC 513J1. 1: normal metaphase. 2: reciprocal translocation with a breakpoint proximal to 513J1 (arrowhead). 3: two-color FISH with probes 166G7 (red) and 299A14 (green), lining the breaks. Inverted DAPI-banding of chromosomes is shown (left)



**Figure 2** Map and organization of *Fra6C1*. (a) Mapping and sequencing tracks. Above: scale in megabases, below: some STS markers. (b) Localization of the known genes (dark bars). Mutations in *grid2* are mapped above the gene: deletions (black line, each line correspond to one mutant allele), insertion (inverted triangle). (c) BAC used in FISH experiments (gray boxes). (d) The percentage of BCG distal to the hybridization signal obtained with each BAC (black diamonds) is plotted against its localization within the region. (e) Location of the region of synteny with human 4q22 (hatched bar). The genes and BAC mapping information are derived from the UCSC browser (February 2003 release). The scale is constant all over the figure

**Table 1** Localization of *Fra6C1* by FISH analysis of metaphase spreads from cell line 531

Clone name	BCG scored by FISH				
	Total (T)	Proximal (P) <sup>a</sup>	On (O) <sup>b</sup>	Distal (D) <sup>c</sup>	%D <sup>d</sup>
RP23-474E7	22	1	0	21	96
RP23-222M23	22	0	3	19	93
RP23-23C21	22	4	0	18	82
RP23-13M9	51	10	2	39	78
RP23-166G7	21	5	0	16	76
RP23-101M21	43	15	4	24	60
RP23-299A14	29	13	1	15	53
CITB-316M9	99	36	9	54	59
CITB-513J1	59	36	7	16	33
RP23-13319	12	10	0	2	17
RP23-434E11	52	42	1	9	18
RP23-1017	23	19	3	1	11
RP23-10A23	29	28	0	1	3

<sup>a</sup>Number of metaphases where the BCG appear proximal to the hybridization signal. <sup>b</sup>Number of metaphases where the hybridization signal is split by or lies within the BCG. <sup>c</sup>Number of metaphases where the BCG appear distal to the hybridization signal. <sup>d</sup>%D = 100 (D + 0.5O)/(T). BAC are ordered from centromere (top) to telomere (bottom) according to their position on the UCSC browser (February 2003 release)

(FISH) signals obtained with these BAC (Figure 1b top), both on normal and fused chromosomes. Ongoing recombination events involving this region were also repeatedly detected (Figure 1b, bottom). Altogether, BCG targeted to 6C1 represent some 4% of the total number of events observed within the whole genome.

We then determined the position of BCG relative to the FISH signal of each BAC (Figure 1b, Table 1). From

BAC 474E7 to BAC 101M21, the percentage of BCG distal to the signal decreases regularly from approximately 100 to 60%. Hybridization with BAC 101M21, 299A14 and 316M9 identifies an about 2.4-Mb-long region in which BCG distal to the FISH signal take place at relatively similar frequencies, which indicates that, although constituting the core of the site, this sequence is not particularly prone to BCG. The percentage of BCG distal to the signal of BAC 513J1 decreases to 33%, showing that breaks occur frequently in the region delimited by BAC316M9 and BAC 513J1, which contains the 3' end of the *grid2* gene. The high number of BCG scored with BAC 101M21, 316M9 and 513J1 (43, 99 and 59 respectively) makes these conclusions highly reliable. From BAC 513J1 to 10A23, the percentage of BCG distal to the signals decreases progressively to almost 0. Figure 2d recapitulates these data on a curve, the slope of which directly reflects the relative level of fragility of the sequences along the region under study.

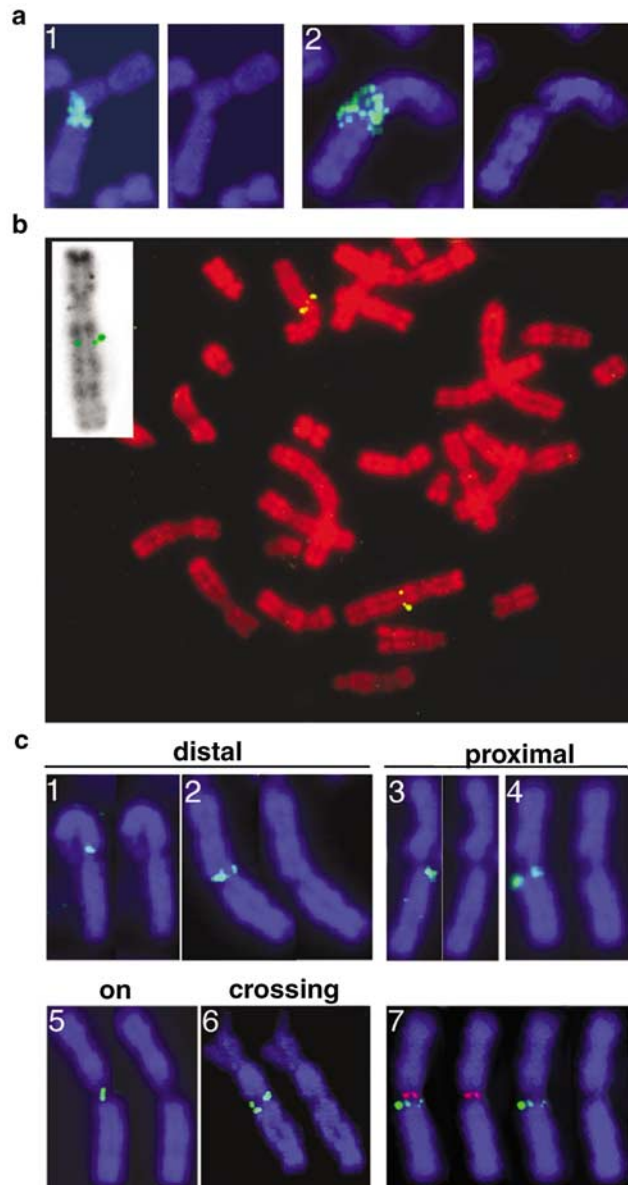
In order to confirm the limits of the site, we performed two-color FISH experiments with BAC 474E7 and 434E11 or 10A23. As expected, the two signals appear separated by the BCG observed at 6C1. We also verified that BCG occur frequently in the region delimited by BAC 316M9 and 513J1. Among 24 BCG observed within band 6C1, 10 separated the two probes and two split signals were seen for each BAC, five breaks were proximal and five were distal to both BAC (Figure 1c).

An unstable region is defined as a CFS when recurrent breaks can be observed in cells of most individuals of a species. To determine whether the unstable region detected in cells of line 531 is fragile in cells of other

mice, FISH experiments were performed on metaphase spreads of normal splenocytes of Swiss mice that were treated *in vitro* with AP (see Materials and methods). Metaphase spreads were hybridized with a painting probe specific to chromosome 6 and BAC 513J1. As expected, two normal chromosomes 6 were observed in each cell (Figure 1d1). However, we observed one cell with a reciprocal translocation, a breakpoint of which lies just proximal to the BAC probe (Figure 1d2). We scored fewer events than above because, in contrast to cells 531, metaphase spreads of normal splenocytes displaying BCG were infrequent, and the frequency of BCG per metaphase was also very low. This could result from differences in the genetic background of the two cell types. For example, a stringent G2/M checkpoint in primary splenocytes cells may prevent cells with broken chromosomes to enter mitosis. However, almost 40% (24 out of 66) of the BCG taking place on chromosome 6 were observed in the *grid2* region, which indicates that a fragile region is also present in these cells. This conclusion is supported by the results of the two-color FISH experiments with probes 166G7 and 513J1 showing that 30% of the BCG occur between the two signals, or split one of them (Figure 1d3).

*This fragile site is conserved in the human genome*

The *grid2/GRID2* genes belong to a region of synteny extending over a total of 7 Mb at mouse 6C1 and human 4q22 (Figures 2b and 4b). In order to determine whether a fragile site also lies in the human genome, we performed preliminary experiments with a probe specific to band 4q22 on AP-treated lymphocytes of three healthy blood donors (Figure 3a). Some 2.2% of the BCG scored were present within the FISH signals, which represents about 30 % of those occurring on chromosome 4 (average of the three donors), indicating that a CFS lies within that band. We mapped it precisely by studying metaphase spreads of one donor with 11 BAC surrounding *GRID2* (Figure 4c). The assignment of BAC 604B8 to 4q22 was verified by probing R-banded metaphases (Figure 3b). The location of BCG relative to the FISH signal of each BAC was determined as above (Figure 3c1–6). The results are summarized in Table 2 and Figure 4e. More than 90% of the BCG were distal to the FISH signals of BAC 466G12 to 549C16, indicating that the fragile region is telomeric to these probes. For BAC 604B8, 254A24 and 9B6, BCG occurred proximal or distal to the FISH signals at relatively similar frequency, which defines the core of the fragile site. From BAC 9B6 to 145G20, the percentage of BCG distal to the FISH signals decreases progressively to almost 0 (Figure 4e). Comparing the slope of the curve in Figures 4e and 2d discloses conserved distributions of the breaks along the regions of synteny. Two-color FISH experiments performed with probes 9B6 and 198E18 confirmed the presence of BCG in *GRID2* (Figure 3c7) and definitely established that a CFS, named *FRA4F*, overlaps this region in the human genome.

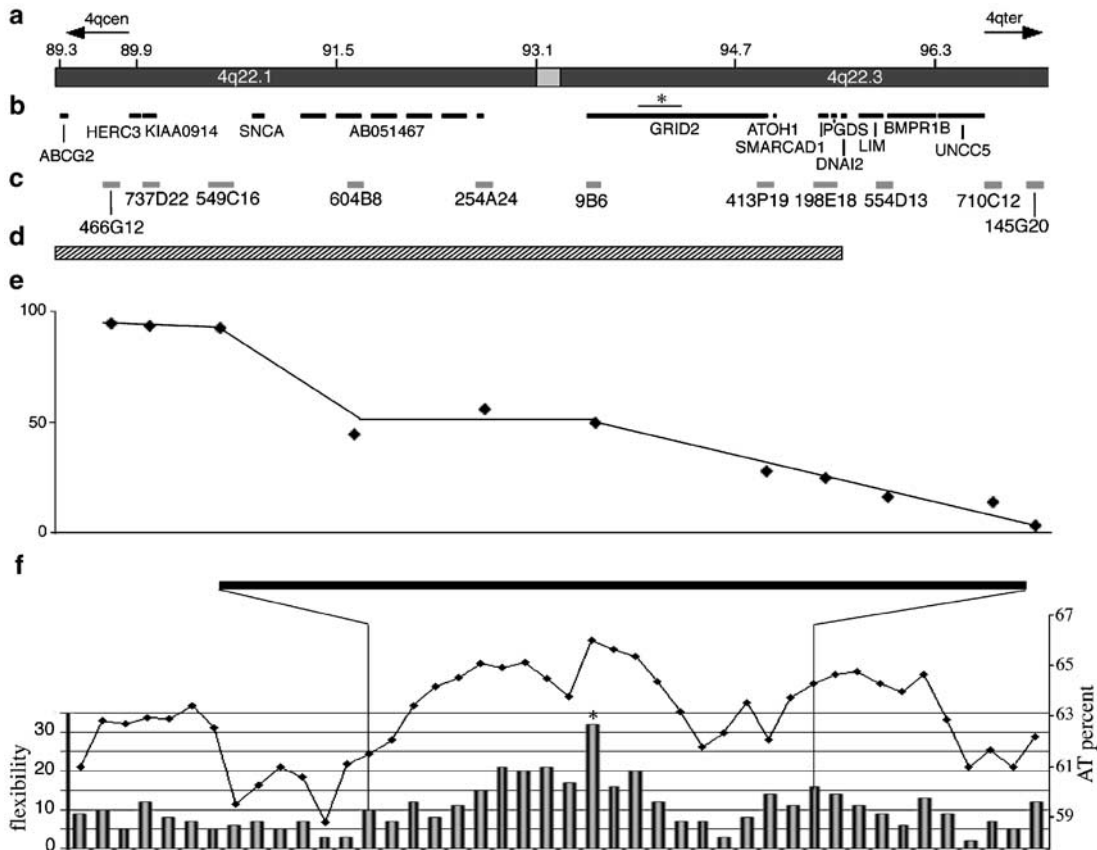


**Figure 3** Identification of *FRA4F* on human cells (a) Chromosomes of AP-treated cells hybridized with a probe for band 4q22 (left panel), DAPI staining alone (right panel). Note the breaks within the band. (b) Localization of BAC 604B8 (green) on R-banded chromosomes of normal lymphocytes. Left up corner: one chromosome 4 is shown with computer-generated inverted staining. (c) Hybridization patterns in AP-treated lymphocytes with probes proximal to (1: BAC 549C16, 2: BAC 9B6), distal to (3: BAC 9B6, 4: BAC 198E18) or on/crossing (5–6: BAC 9B6) the fragile region. (7) Two-color FISH experiments with probes 9B6 (red) and 198E18 (green) lining a BCG. From left to right: red and green FISH signals, red only, green only. DAPI staining only is shown on the right part of each panel

*Analysis of sequence features within the human locus*

We compared the base composition of the two orthologous regions and found that the mouse and human loci exhibit, respectively, 62.4 and 63% of AT in the fragile site. The detail in AT composition of the human region is shown in Figure 4f. By analysing the





**Figure 4** Map of human 4q22 region. (a) Mapping and sequencing tracks, above scales in megabases. (b) Localization of the known genes (dark bars), or putative coding genes (dotted bars). The star above *GRID2* indicates the region where the maximum number of peaks of enhanced flexibility has been found (see f). (c) BAC used in FISH experiments. (d) Region of synteny with mouse 6C1. (e) Percentage of BCG distal to the hybridization signal along the locus (as in Figure 2). The genes and BAC mapping information are derived from the UCSC browser releases from November 2002. (f) Analysis of DNA flexibility and AT-content in and outside *FRA4F*. The histogram represents the number of peaks of flexibility per window of 350 kb. Only the deviations of the twist angle higher than 14 were scored. The plot represents the mean percentage of AT per 350 kb (right ordinate axis). Star: region with the highest number of peaks. The position of *FRA4F* is indicated by two black lines

**Table 2** Localization of *FRA4F* by FISH analysis of metaphase spreads of normal lymphocytes

Clone name	BCG scored				%D <sup>d</sup>
	Total (T)	Proximal (P) <sup>a</sup>	On (O) <sup>b</sup>	Distal (D) <sup>c</sup>	
RP11-466G12	35	1	2	32	94
RP11-737D22	20	1	1	18	93
RP11-549C16	24	1	2	21	92
RP11-604B8	23	13	0	10	43
RP11-254A24	30	12	2	16	57
RP11-9B6	32	14	4	14	50
RP11-413P19	39	26	4	9	28
RP11-198E18	42	31	1	10	25
RP11-554D13	23	19	0	4	17
RP11-710C12	23	18	3	2	15
RP11-145G20	20	19	1	0	3

<sup>a,b,c,d</sup>As in Table 1. BAC are ordered from centromere (top) to telomere (bottom) according to their position on the UCSC browser (November 2002 release).

repeat composition of the region with the repeat masker program, we found that both sequences display a high proportion of LINE (mostly LINE1) and a few SINE, a profile similar to the one found in mouse and human

control regions with comparable AT-content (Smit, 1999). Moreover, no significant differences were disclosed between the subregions of the sites and the sequences extending outside the sites (not shown). Thus,

it is unlikely that the density and/or the type of repeats found in these orthologous CFS contribute efficiently to the fragility.

We also studied the DNA flexibility along the 7-Mb-long human fragile region and control sequences extending over 3.5 Mb on each side of the site, by using the FlexStab computer program (Mishmar *et al.*, 1998). A sequence is considered to be flexible when clusters of peaks (fluctuation of the twist angle higher than the mean + 4.5 s.d.) appear per window of 350 kb, the maximum length of DNA that can be studied at once with the program. Figure 4f shows that the frequency of peaks is low in the 3.5-Mb-long control region centromeric to the site. Within the site, their frequency increases and culminates within *GRID2* (more than 30 peaks per window). Outside the site towards the telomere, the frequency of peaks remains high, even though lower than inside the site. Sequencing of the orthologous region in the mouse genome is not finished yet, which prevented us to perform the same type of analysis.

## Discussion

Spontaneous *grid2* mutants appear at high frequencies in inbred mouse populations, which suggested that the *grid2* gene lies in an unstable chromosomal region. In complete agreement with this hypothesis, we showed that 30–40% of the BCG induced by AP on chromosome 6, in cells of line 531 and in normal splenocytes from Swiss mice, occur within an about 11-Mb-long sequence containing the gene (Figures 1 and 2). Owing to its amino acid similarity with the family of kainate and aspartate receptors, the protein encoded by the *grid2* gene is believed to be an ionotropic glutamate receptor, the expression of which appears restricted to purkinje cells in the cerebellum (Yuzaki, 2003). Until now, no ligand has been identified for the  $\delta 2$  receptor and its function remains largely unknown. However, mutations in *grid2* cause cerebellum ataxia. In total, 11 recessive mutations abolishing *grid2* expression were analysed at the molecular level. Among them, nine result from deletions of one or more exons and one corresponds to the spontaneous integration of an exogenous DNA sequence (Figure 2b) (Lalouette *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003). Interestingly, all the mutations lie in the part of *grid2* that is especially prone to breakage (Figure 1c, Figure 2d). This suggests that recurrent mutations in the *grid2* gene result from the expression of *Fra6C1* in germline cells.

We studied the fragility associated with human 4q22 in the lymphocytes of three healthy blood donors, and found that 30% of the BCG induced on chromosome 4 by AP-treatment occur within this band (Figures 3a, c and 4c). These BCG account for 1.9 to 2.4% of the total events scored. Human CFS described so far display important variations in length, from 200 kb for *FRA7H* (Mishmar *et al.*, 1998) to 9 Mb for *FRA9E* (Callahan

*et al.*, 2003). Detailed analysis along the 7 Mb of *FRA4F* disclosed 2 subregions where BCG occur at a relatively high frequency. They flank an about 2-Mb-long more stable sequence (Figure 4e), a situation resembling the one disclosed at *FRA9E*, but contrasts with the relatively compact core region of most other CFS described so far. The *grid2/GRID2* genes extend on more than a megabase while coding a few kb-long mRNA. *Fra6C1/FRA4F* share this property with at least three other cloned CFS, *FRA3B (FHIT)*, *FRA16D (WWOX)* and *FRA6E (PARKIN)* (Krummel *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2002; Denison *et al.*, 2003a). This suggests that some features present in large genes lying in AT-rich regions, such as particular chromatin organization, favor chromosome instability.

Previous work on *FRA7H* suggested that regions of preferential BCG within CFS correlate with sequences enriched in peaks of enhanced flexibility (Mishmar *et al.*, 1998). In good agreement with this hypothesis, a high number of peaks of flexibility were found in all cloned CFS to date (Arlt *et al.*, 2003). Clusters of peaks of flexibility are also present in *FRA4F*, but their density does not completely account for the relative fragility of the different subregions of the site and its flanking regions. We also studied the AT-richness of this region by using the same 350 kb-window. As shown Figure 4f, the AT-content does not exactly parallel but is correlated to flexibility. This was expected since AT-content is one of the parameter taken into account to calculate flexibility. Indeed, the 350-kb-long region exhibiting the highest number of flexibility peaks (more than 30) has also the highest AT-content (> 65%) and is located in *GRID2* (Figure 4f), a result in agreement with the analysis of the other AP-CFS.

The conservation of CFS among different species is still poorly documented. Only two human sites, *FRA3B* and *FRA16D*, have been compared at the molecular level to their mouse orthologs, *Fra14A2* and *Fra8E1* (Glover *et al.*, 1998; Pekarsky *et al.*, 1998; Krummel *et al.*, 2002). The relative organization of the genes and of the fragile regions was found well conserved in both cases. Here, the comparison of the about 7-Mb-long regions of synteny also discloses a good conservation of the location of the genes relative to the two subregions prone to BCG and of the large relatively stable region that separates them (Figures 2 and 4).

Whether the mouse and human sites cloned here have been previously mapped by classical cytogenetic analysis is unclear. Furuya *et al.* (1989) described a CFS that accounts for 13.4% of the total BCG scored in human bone marrow cells of healthy persons at 4q21–25 (the most expressed in these cells). Recurrent BCG were also localized at 4q21 or 4q23 in other types of cells (Murano *et al.*, 1989; Caporossi *et al.*, 1995; Gericke *et al.*, 1996; Simonic *et al.*, 1997). In the mouse genome, no CFS was described at 6C1, but one analysis localized a relatively weak site at 6B3, the band directly adjacent to 6C1 (Elder and Robinson, 1989). Taking into account the low precision of G-banding mapping, the BCG observed in these studies may take place at the sites identified here at the molecular level.

Whether the 4q22 region also constitutes a hotspot of deletion in human germinal cells has not been extensively studied. However, a constitutive deletion of 8 cM at 4q21–22 has been reported once in an infant, which developed an hepatoblastoma (Terada *et al.*, 2001). Germline deletions involving 4q22 have also been reported in 11 patients presenting an overgrowth of the central nervous system (Nowaczyk *et al.*, 1997). Some of these deletions have a border in/near *FRA4F* and may result from its expression in germinal cells. Together with the properties of *grid2* mutations, these observations suggest that recurrent mutations in germ-line cells may result from the location of target genes in CFS. This conclusion is actually supported by several lines of evidence. For example, mutant mice presenting the ‘dominant white spotting’ phenotype, which resembles human piebaldism, also appear at high frequency in inbred populations. These animals bear mutations in the *kit* gene. Some 30% of the mutations characterized at the molecular level are deletions or other chromosome rearrangements (MGD). We have shown that an AP-CFS also overlaps the *kit* gene (to be published). Interestingly, the gene responsible for human piebaldism, *c-KIT*, was assigned to a subregion of 4q12 within which lies the AP-CFS *FRA4B* (Denison *et al.*, 2002). Together with the conclusions of a recent work on *FRA6E* (Denison *et al.*, 2003a, b), our results show that instability at CFS not only accounts for the high frequency of chromosome rearrangements involved in cancer progression but also for recurrent mutations in genes responsible for various inherited diseases. Conversely, the position of *FRA11A* relative to the boundaries of amplicons found in human cancers suggests that some RFS play a role in tumor progression (Perucca-Lostanlen *et al.*, 1997). Hence, depending on the nature of the genes embedded in a site, it may contribute to both germinal and somatic mutations, independent of its classification as rare or common.

In order to determine whether *FRA4F* activation triggers chromosome rearrangements found in cancers, we screened the literature searching for recurrent events involving 4q22. Deletions on the long arm of chromosome 4, complete or partial, have been reported in 30–70% of HCC tumors (Yeh *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2000; Laurent-Puig *et al.*, 2001). Deregulation of the Wnt/Wingless pathway has been associated recently with the development of some HCC (Buendia, 2000). This deregulation could be mediated either by  $\beta$ -catenin activation, which correlates with overexpression of three genes of the glutamine pathway (Glutamine Synthetase, Ornithine AminoTransferase, glutamate transporter GLT-1) or by Axin-1 inactivation (Legoix *et al.*, 1999; Laurent-Puig *et al.*, 2001; Cadoret *et al.*, 2002). Chromosomal instability and LOH on chromosome 1p, 4q, 16p, 16q have been correlated to axin-1 inactivation. At least in aflatoxin B1-induced HCC, LOH at 16q results from activation of *FRA16D*, but the target gene remains to be found (Yakicier *et al.*, 2001). In a recent work (Bluteau *et al.*, 2002), 36 primary liver tumors with partial deletions of 4q have been studied by high-density allelotyping, which identified

three distinct regions of LOH. Among them, nine interstitial deletions map at 4q22. The minimal region common to these deletions extends over 15 Mb from A/C-231 to D4S2986. Strikingly, *FRA4F* lies at the center of that region, which supports the hypothesis that, like *FRA16D*, this site is involved in liver carcinogenesis. Deletions in the same region were also found in cervical cancer (Mitra *et al.*, 1994). A gene involved in cellular senescence was also postulated to lie in this region in squamous cell carcinoma (Forsyth *et al.*, 2002) and in HeLa cells (Bryce *et al.*, 2002). However, none of the genes analysed so far were mutated in cancer cells, which indicates that the relevant one remains to be discovered (Bluteau *et al.*, 2002; Bryce *et al.*, 2002; Forsyth *et al.*, 2002). Nevertheless, taken together, these results suggest that *FRA4F*, like most other cloned CFS, contributes to the inactivation of a tumor suppressor gene.

## Materials and methods

### *BAC clones and probes*

The human/mouse BAC were chosen according to their position in the genome draft sequence assembly and from BLAST htgs (standard option) analysis, with *GRID2/grid2* mRNA sequences. Human BAC were all chosen in the RPCI-11 library, and mouse BAC from the RPCI-23 library, except BAC CITB-513J1 previously described (De Jager *et al.*, 1997) and BAC 316M9 a kind gift from A Lalouette. BAC were purchased from the BACPAC Resources web site (<http://www.chori.org/bacpac>), their DNAs were prepared according to the recommendations of the supplier and verified by PCR. Mouse chromosome 6 and human 4q22 painting probes were obtained from Qbiogene, Illkirch, France.

### *Cell culture and fragile site induction*

The fibroblastic cell line 531 was obtained from O Acuto and was routinely grown in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS) and penicillin/streptomycin (1/100). Splenocytes from Swiss mice were recovered and cultured as previously described (Elder and Robinson, 1989). Human lymphocytes were obtained from three informed healthy peripheral blood donors, and cultured 72 h in RPMI medium supplemented with 10% FCS, and 30  $\mu$ g/ml of PHA (BioSeptra). Fragile sites were induced by treating the cells 18 h with AP (0.1–0.8  $\mu$ g/ml), nocodazole (10  $\mu$ M) was added 4–6 h before harvesting, and 2.5 mM of caffeine (Sigma) 1 h prior to nocodazole addition.

### *FISH and cytogenetic techniques*

BAC labelling, chromosome preparations and FISH were performed as described (Toledo *et al.*, 1992; Coquelle *et al.*, 1997) with minor changes, that is, 200 ng of the probe was mixed with 1  $\mu$ g of competitor Cot-1 DNA (human or mouse; Life Technologies). In some experiments, chromosomes were stained with DAPI and identified by computer-generated reverse-DAPI banding. *GRID2* localization was performed on human metaphasic chromosomes prepared from human peripheral blood lymphocytes grown for the last 7 h before harvesting in the presence of BrdU (10  $\mu$ g/ml, Sigma). Direct R-banding of 5-BrdU-substituted chromosomes was obtained as previously described (Lemieux *et al.*, 1992).

### Computer analysis of repeat sequences and helix flexibility

Human and mouse DNA sequences were downloaded from the genome draft assembly browser of the University of California, Santa-Cruz (<http://genome.ucsc.edu>) and their content in DNA repeats was determined using the Repeat-Masker program (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>). DNA flexibility was measured using the FlexStab program, as previously reported (Mishmar *et al.*, 1998). The data were analysed using the statview software.

### Abbreviations

AP, aphidicolin; BAC, bacterial artificial chromosome; BCG, break, constriction or gap; CFS, common fragile site; FCS,

fetal calf serum; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; Grid2, glutamate ionotropic delta 2 receptor; HCC, hepatocellular carcinomas; MGD, mouse genome database (<http://www.informatics.jacks.org>); RFS, rare fragile site.

### Acknowledgements

We thank A Lalouette for providing the BAC 316M9, J-L Guenet and B Dutrillaux for interesting discussions and G Buttin for critical reading of the manuscript and helpful discussions. This work was supported in part by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Ligue Nationale Française contre le Cancer (Comité d'Ile-de-France), and the Fondation pour la Recherche Médicale. LR is a Fellow of the French government (MENRT).

### References

- Arlt MF, Casper AM and Glover TW. (2003). *Cytogenet. Genome Res.*, **100**, 92–100.
- Becker NA, Thorland EC, Denison SR, Phillips LA and Smith DI. (2002). *Oncogene*, **21**, 8713–8722.
- Bluteau O, Beaudoin JC, Pasturaud P, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P and Zucman-Rossi J. (2002). *Oncogene*, **21**, 1225–1232.
- Brison O. (1993). *Biochim. Biophys. Acta*, **1155**, 25–41.
- Bryce SD, Morrison V, Craig NJ, Forsyth NR, Fitzsimmons SA, Ireland H, Cuthbert AP, Newbold RF and Parkinson EK. (2002). *Neoplasia*, **4**, 544–550.
- Buendia MA. (2000). *Semin. Cancer Biol.*, **10**, 185–200.
- Cadoret A, Ovejero C, Terris B, Souil E, Levy L, Lamers WH, Kitajewski J, Kahn A and Perret C. (2002). *Oncogene*, **21**, 8293–8301.
- Callahan G, Denison SR, Phillips LA, Shridhar V and Smith DI. (2003). *Oncogene*, **22**, 590–601.
- Caporossi D, Vernole P, Nicoletti B and Tedeschi B. (1995). *Hum. Genet.*, **96**, 269–274.
- Ciullo M, Debily MA, Rozier L, Autiero M, Billault A, Mayau V, El Marhomy S, Guardiola J, Bernheim A, Coullin P, Piatier-Tonneau D and Debatisse M. (2002). *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2887–2894.
- Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G and Debatisse M. (1997). *Cell*, **89**, 215–225.
- Coquelle A, Rozier L, Dutrillaux B and Debatisse M. (2002). *Oncogene*, **21**, 7671–7679.
- Coquelle A, Toledo F, Stern S, Bieth A and Debatisse M. (1998). *Mol. Cell.*, **2**, 259–265.
- De Jager PL, Zuo J and Heintz N. (1997). *Genome Res.*, **7**, 736–746.
- Denison SR, Becker NA, Ferber MJ, Phillips LA, Kalli KR, Lee J, Lillie J, Smith DI and Shridhar V. (2002). *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 406–415.
- Denison SR, Callahan G, Becker NA, Phillips LA and Smith DI. (2003a). *Genes Chromosomes Cancer*, **38**, 40–52.
- Denison SR, Wang F, Becker NA, Schule B, Kock N, Phillips LA, Klein C and Smith DI. (2003b). *Oncogene*, **22**, 8370–8378.
- Elder FF and Robinson TJ. (1989). *Chromosoma*, **97**, 459–464.
- Fong LY, Fidanza V, Zanesi N, Lock LF, Siracusa LD, Mancini R, Siphraşvili Z, Ottey M, Martin SE, Druck T, McCue PA, Croce CM and Huebner K. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4742–4747.
- Forsyth NR, Morrison V, Craig NJ, Fitzsimmons SA, Barr NI, Ireland H, Gordon KE, Downen S, Cuthbert AP, Newbold RF, Bryce SD and Parkinson EK. (2002). *Oncogene*, **21**, 5135–5147.
- Furuya T, Ochi H and Watanabe S. (1989). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **43**, 131–138.
- Gericke GS, Simonic I, Cloete E and Becker PJ. (1996). *Am. J. Med. Genet.*, **67**, 25–30.
- Ginestier C, Bardou VJ, Popovici C, Charafe-Jauffret E, Bertucci F, Geneix J, Adelaide J, Chaffanet M, Hassoun J, Viens P, Jacquemier J and Birnbaum D. (2003). *Int. J. Cancer*, **107**, 854–862.
- Glover TW, Berger C, Coyle J and Echo B. (1984). *Hum. Genet.*, **67**, 136–142.
- Glover TW, Hoge AW, Miller DE, Ascara-Wilke JE, Adam AN, Dagenais SL, Wilke CM, Dierick HA and Beer DG. (1998). *Cancer Res.*, **58**, 3409–3414.
- Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI, Trakhtenbrot L and Kerem B. (2002). *Cancer Cell*, **1**, 89–97.
- Hsu YY and Wang YH. (2002). *J. Biol. Chem.*, **5**, 5.
- Hu W, Zuo J, De Jager PL and Heintz N. (1998). *Genomics*, **47**, 143–145.
- Huebner K and Croce CM. (2001). *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 214–221.
- Jones C, Mullenbach R, Grossfeld P, Auer R, Favier R, Chien K, James M, Tunnacliffe A and Cotter F. (2000). *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1201–1208.
- Krummel KA, Denison SR, Calhoun E, Phillips LA and Smith DI. (2002). *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 154–167.
- Krummel KA, Roberts LR, Kawakami M, Glover TW and Smith DI. (2000). *Genomics*, **69**, 37–46.
- Lalouette A, Guenet JL and Vríz S. (1998). *Genomics*, **50**, 9–13.
- Lalouette A, Lohof A, Sotelo C, Guenet J and Mariani J. (2001). *Neuroscience*, **105**, 443–455.
- Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P and Zucman-Rossi J. (2001). *Gastroenterology*, **120**, 1763–1773.
- Legoix P, Bluteau O, Bayer J, Perret C, Balabaud C, Belghiti J, Franco D, Thomas G, Laurent-Puig P and Zucman-Rossi J. (1999). *Oncogene*, **18**, 4044–4046.
- Lemieux N, Dutrillaux B and Viegas-Pequignot E. (1992). *Cytogenet. Cell Genet.*, **59**, 311–312.
- Mishmar D, Rahat A, Scherer SW, Nyakatura G, Hinzmann B, Kohwi Y, Mandel-Gutfröind Y, Lee JR, Drescher B, Sas DE, Margalit H, Platzer M, Weiss A, Tsui LC, Rosenthal A and Kerem B. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8141–8146.
- Mitra AB, Murty VV, Li RG, Pratap M, Luthra UK and Chaganti RS. (1994). *Cancer Res.*, **54**, 4481–4487.

- Murano I, Kuwano A and Kajii T. (1989). *Hum. Genet.*, **84**, 71–74.
- Nagai H, Pineau P, Tiollais P, Buendia MA and Dejean A. (1997). *Oncogene*, **14**, 2927–2933.
- Nowaczyk MJ, Teshima IE, Siegel-Bartelt J and Clarke JT. (1997). *Am. J. Med. Genet.*, **69**, 400–405.
- Pekarsky Y, Druck T, Cotticelli MG, Ohta M, Shou J, Mendrola J, Montgomery JC, Buchberg AM, Siracusa LD, Manenti G, Fong LY, Dragani TA, Croce CM and Huebner K. (1998). *Cancer Res.*, **58**, 3401–3408.
- Perucca-Lostanlen D, Hecht BK, Courseaux A, Grosgeorge J, Hecht F and Gaudray P. (1997). *Cytogenet. Cell Genet.*, **79**, 88–91.
- Simonin I, Gericke GS, Lippert M and Schoeman JF. (1997). *Am. J. Med. Genet.*, **74**, 331–337.
- Smit AF. (1999). *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 657–663.
- Smith DI, Huang H and Wang L. (1998). *Int. J. Oncol.*, **12**, 187–196.
- Sutherland GR and Baker E. (2000). *Clin. Genet.*, **58**, 157–161.
- Terada Y, Imoto I, Nagai H, Suwa K, Momoi M, Tajiri T, Onda M, Inazawa J and Emi M. (2001). *Am. J. Med. Genet.*, **103**, 176–180.
- Toledo F, Le Roscouet D, Buttin G and Debatisse M. (1992). *EMBO J.*, **11**, 2665–2673.
- Wang Y, Matsuda S, Drews V, Torashima T, Meisler MH and Yuzaki M. (2003). *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 1581–1590.
- Wong N, Lai P, Pang E, Fung LF, Sheng Z, Wong V, Wang W, Hayashi Y, Perlman E, Yuna S, Lau JW and Johnson PJ. (2000). *Clin. Cancer Res.*, **6**, 4000–4009.
- Yakicier MC, Legoix P, Vaury C, Gressin L, Tubacher E, Capron F, Bayer J, Degott C, Balabaud C and Zucman-Rossi J. (2001). *Oncogene*, **20**, 5232–5238.
- Yeh SH, Chen PJ, Lai MY and Chen DS. (1996). *Gastroenterology*, **110**, 184–192.
- Yunis JJ and Soreng AL. (1984). *Science*, **226**, 1199–1204.
- Yuzaki M. (2003). *Neurosci. Res.*, **46**, 11–22.

## ARTICLE 4

### **Mammalian BubR1 couples the spindle checkpoint to the DNA damage response by eliciting chromosome breakage**

Frédérique Quignon\*, Lorène Rozier\*, Anne-Marie Lachagès, Anne Bieth, Sandra Carignon, Esme McKernan, Marcella Simili and Michelle Debatisse

\* ces auteurs ont contribué de façon équivalente au travail

Soumis

Après traitement par des agents qui perturbent la formation du fuseau mitotique (nocodazole, vinblastine, colchicine), les cellules de mammifères ne peuvent entrer en anaphase et restent bloquées en mitose avec des chromosomes condensés non ancrés. Si le traitement est prolongé, les cellules échappent au blocage et subissent ce qui a été appelé un glissement mitotique. En effet, les chromosomes se décondensent, l'enveloppe nucléaire se reconstitue et les cellules entrent en pseudo-G1 sans division, donc avec un contenu d'ADN tétraploïde (introduction II-5). Ceci indique que le point de contrôle qui bloque les cellules en mitose, appelé point de contrôle du fuseau, n'est pas très stringent. Le fait que les cellules normales s'arrêtent définitivement à ce stade pseudo-G1 suggère fortement que le point de contrôle du fuseau est couplé à un second contrôle, plus stringent, intervenant avant l'entrée en S du cycle tétraploïde amorcé en présence des drogues. Certains gènes impliqués dans cet arrêt ont été identifiés (introduction II-5c3), mais la nature de ce point de contrôle et les signaux à l'origine de son activation sont encore inconnus. Au contraire des cellules normales, certains types de cellules immortalisées et tumorales s'engagent dans un processus de re-réplication et deviennent rapidement polyploïdes et aneuploïdes. De plus, des réarrangements chromosomiques ont été observés après glissement mitotique dans la descendance des cellules permissives pour la re-réplication (Aardema et al., 1998). Cette apparition d'une instabilité touchant à la fois le nombre et la structure des chromosomes nous a paru particulièrement intéressante et nous avons entrepris d'analyser certains aspects de ce processus .

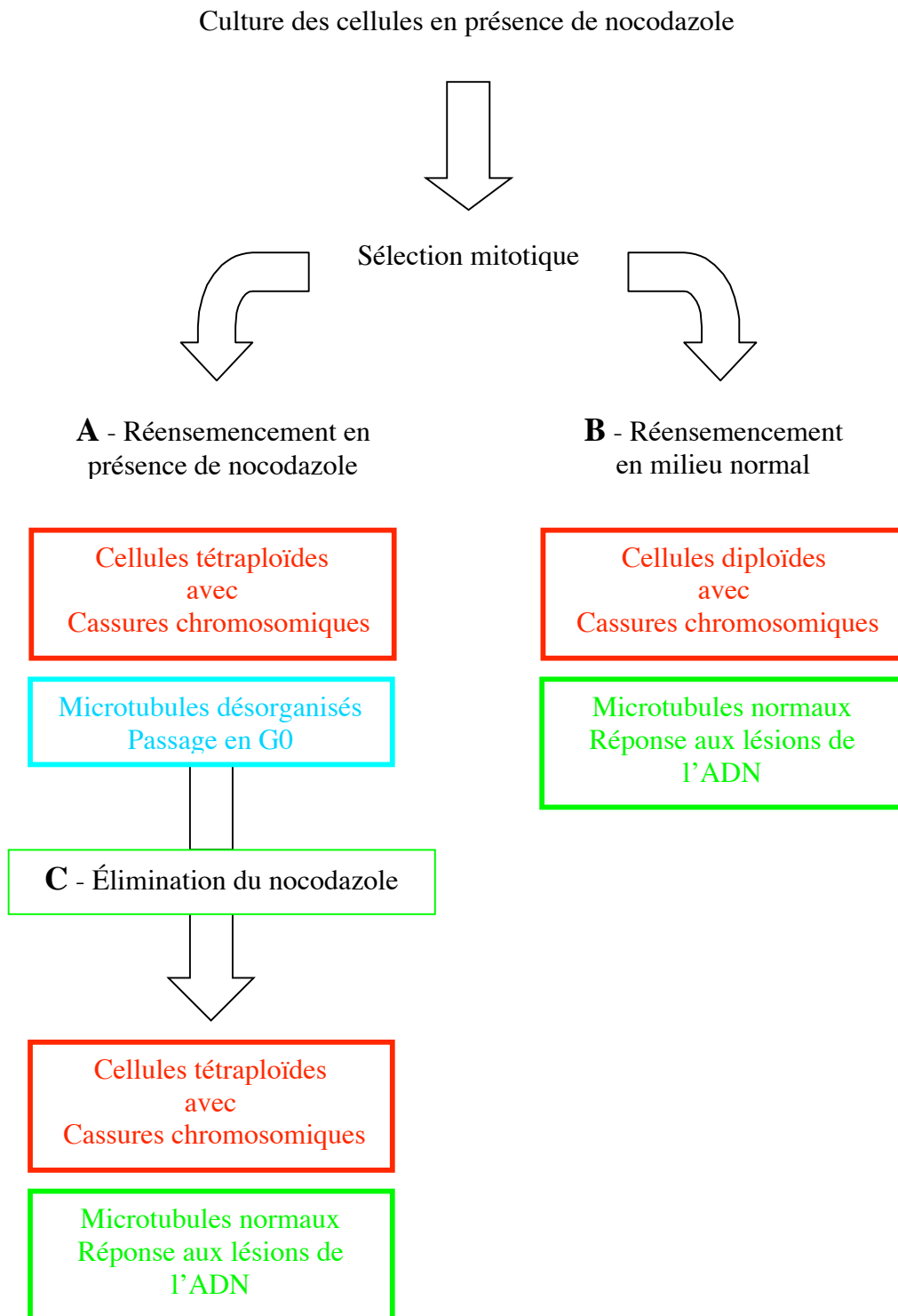
Dans cet article, nous avons vérifié qu'après un traitement prolongé par le nocodazole, les cellules normales de hamster (CHEF) ou humaines (MRC-5) sont bloquées en pseudo-G1 avant l'entrée en phase S du cycle tétraploïde suivant le glissement mitotique (figures 2A-B, 4A). Au contraire, les cellules de hamster chinois GMA32, déficientes pour p53, continuent de cycler. Après 22h de traitement nocodazole, une majorité d'entre elles sont en mitose tétraploïde (figure 1A). Des analyses par FISH double-couleur nous ont permis de montrer que ces mitoses tétraploïdes présentent de nombreux remaniements chromosomiques alors que les mitoses diploïdes accumulées en présence de la drogue sont normales (figure 1B). Cette comparaison révèle qu'une instabilité chromosomique importante est déclenchée au cours du cycle qui suit une mitose perturbée. Nous avons ensuite établi que des cassures surviennent lors de l'entrée en G1 après le glissement. Ces cassures ont été détectées par 3 méthodes différentes. 1°) Nous avons exploité le fait que le noyau d'une majorité des cellules est fragmenté après glissement. Cette fragmentation, connue de longue date (Stubblefield, 1964), provient de la reformation de l'enveloppe nucléaire autour de chromosomes isolés ou de groupes de chromosomes, donnant naissance à des micronoyaux. Ce phénomène résulte

probablement de l'absence de rassemblement des chromosomes aux pôles de la cellule, qui survient en télophase au cours des mitoses normales. Nous avons déterminé, par FISH, la fréquence de ségrégation de deux marqueurs synténiques dans des micronoyaux différents, qui reflète la présence de cassures chromosomiques (figure 1C). 2°) Nous avons recherché, par immunocytochimie, la présence de foyers contenant l'histone H2AX phosphorylée sur la sérine 139 ( $\gamma$ -H2AX), spécifique de la réponse aux cassures (figure 1E). 3°) Nous avons analysé au FACS des populations de cellules marquées par une méthode dérivée de la technique TUNEL, comportant des étapes supplémentaires d'amplification du signal (TUNEL-amplifié) (figure 1D).

Nous avons ensuite établi que ces cassures sont également présentes après glissement (Figure 24, protocole A) dans des fibroblastes normaux de hamster Chinois (CHEFs) (figure 2) et humains (MRC5) ainsi que dans les cellules de deux lignées humaines dérivées de cancers du côlon (LoVo et HCT116) (figure 4). Nous avons pu montrer que les cassures chromosomiques surviennent également dans des cellules traitées transitoirement par des poisons du fuseau. En effet, lorsque les cellules mitotiques accumulées pendant plusieurs heures en présence de drogue sont ré-ensemencées en milieu normal (Figure 24, protocole B), la formation quasi instantanée d'un fuseau mitotique fonctionnel leur permet d'entrer en anaphase et de terminer leur division pour donner deux cellules diploïdes. Ces cellules diploïdes, qui présentent aussi des cassures chromosomiques, restent bloquées avant l'entrée en S (figure 2C,D). Ces résultats indiquent que ces lésions de l'ADN ne sont induites ni en réponse à la tétraploïdie, ni au glissement mitotique *per se* ni par l'absence de cytokinèse (figures 2C-D, 4). Nous avons émis l'hypothèse que ces cassures sont induites en réponse à une perturbation durable de la mitose (voir plus loin).

Nos résultats laissent par ailleurs supposer que l'arrêt des cellules normales pourrait survenir à la frontière G1/S en réponse à la présence de ces cassures. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé par western blot l'expression et les modifications des protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN et dans le contrôle de la progression en G1. Des cellules irradiées ou bloquées en G0 par confluence ont été utilisées comme contrôles (figures 3,4). Nous avons montré que l'arrêt qui empêche la re-réplication de l'ADN dans les cellules normales correspond à un double bloc. L'un d'eux, observable lorsque le nocodazole reste présent dans le milieu (Figure 24, protocole A), semble correspondre à une entrée des cellules en G0. Lorsque la drogue est éliminée, les cellules sortent de G0 (Figure 24, protocoles B,C), indiquant que ce blocage est réversible. Nous avons montré que le réseau des





*Figure 19: Schéma des trois types de traitements appliqués aux cellules après sélection mitotique et leurs conséquences phénotypiques.*

microtubules se reconstitue presque instantanément après élimination du nocodazole, dans ces différents types cellulaires (figure 3D). Comme suggéré précédemment par les travaux d'un autre groupe, cette entrée en G0 pourrait être déclenchée lorsque les cellules entrent en G1 avec un réseau de microtubules désorganisé (figure 3) (Khan and Wahl, 1998). Nous avons montré qu'un blocage non réversible, dont la signature moléculaire est identique à la réponse aux cassures, prend le relai du premier bloc après retour en milieu normal (Figure 24, protocoles B et C), (figures 3C-D, 4). Nous avons vérifié que le phénotype imposé par la présence de nocodazole est dominant sur la réponse aux lésions de l'ADN en irradiant des cellules mitotiques avant de les ré-ensemencer en présence de la drogue. Ces cellules présentent le même phénotype que les cellules traitées par le nocodazole seul (figures 3B, 4).

Pour tester l'hypothèse selon laquelle le signal conduisant à l'induction de cassures dans les cellules résulte d'une perturbation durable de la mitose, nous avons inactivé par ARN interférence 2 protéines clés du point de contrôle du fuseau, BubR1 et Mad2. Nous avons validé ces expériences en montrant, dans les 2 cas, que le point de contrôle n'est plus fonctionnel : en présence de nocodazole les cellules glissent en G1 tétraploïde sans marquer aucun arrêt en mitose (figure 5A). Nous avons ensuite recherché par immunocytochimie la présence de cassures dans ces cellules (anticorps  $\gamma$ -H2AX). Des foci  $\gamma$ -H2AX sont présents après traitement au nocodazole dans la majorité des cellules invalidées pour Mad2 ou dans les cellules contrôles (non transfectées ou transfectées par un oligonucléotide contrôle) (figure 5D-E). Par contre, l'absence de BubR1 entraîne la disparition des foci  $\gamma$ -H2AX induit par le traitement au nocodazole (figure 5D-E), ce qui est en accord avec les résultats de western blot montrant que les protéines p53 et p21 ne s'accumulent plus dans les cellules ainsi traitées (figure 5F). Ces résultats suggèrent que l'activation de BubR1 déclenche une voie de signalisation conduisant à la formation de cassures chromosomiques couplant le point de contrôle de mitose à celui, plus efficace, des dommages de l'ADN. Les cellules déficientes pour ce dernier point de contrôle pourraient continuer de cycler et acquérir simultanément des réarrangements chromosomiques et des anomalies de nombre, deux types d'instabilité qui cohabitent souvent dans les cellules des cancers.

**MAMMALIAN BUBR1 COUPLES ACTIVATION OF THE SPINDLE CHECKPOINT  
TO THE DNA DAMAGE RESPONSE BY ELICITING CHROMOSOME BREAKAGE**

Frédérique QUIGNON<sup>+Δ</sup>, Lorène ROZIER<sup>+Δ</sup>, Anne-Marie LACHAGES<sup>+</sup>, Anne BIETH<sup>++</sup>, Sandra  
CARIGNON<sup>+</sup>, Esme MCKERNAN<sup>x</sup>, Marcella SIMILI<sup>#</sup> and Michelle DEBATISSE<sup>+\*</sup>

<sup>+</sup> Institut Curie, Section de Recherche, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cédex 05, France

<sup>++</sup> Present address: Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS  
UPR9062, 31077 Toulouse, Cedex 4, France

<sup>x</sup> Student from the University of Manchester, School of Biological Sciences

<sup>#</sup> Institute of Mutagenesis and Differentiation, National Council of Research, Via Svezia  
10, 56124 Pisa, Italy

<sup>Δ</sup> These authors contributed equally to the work

Running head: Mammalian BubR1 elicits DNA breaks

Key words: spindle checkpoint / BubR1 / Mad2 / chromosome breakage / DNA damage  
checkpoint / mammalian.

\* Corresponding author: Michelle Debatisse

E-mail: michelle.debatisse@curie.fr

Unité « Instabilité du génome et cancer » (FRE 2584 CNRS). Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248  
Paris Cedex 05, France.

## **Abstract**

Following prolonged mitotic spindle disruption by microtubule poisons, mammalian cells delay their entry into anaphase, then progressively slip out of mitosis and become tetraploid. Normal cells then arrest their cell cycle before re-replication, but the mechanisms underlying this arrest are still unclear. Here we show that a prolonged block to M phase completion triggers chromosome breakage. We find that breaks are committed to occur in M but actually take place in early G1 phase. To determine whether the breaks are elicited in response to prolonged activation of the spindle checkpoint, we used RNA interference to silence two essential checkpoint proteins, BubR1 and Mad2. We show that BubR1 mediates this phenomenon, though the spindle checkpoint itself is not responsible, since DNA damage still occurs when Mad2 is silenced. Therefore, activation of BubR1 specifically triggers DNA damage, which couples the leaky spindle checkpoint to the stringent DNA damage checkpoint. Cells defective for the latter checkpoint continue cycling and acquire within a single cell cycle both chromosome rearrangements and an abnormal chromosome number that remarkably mimic the complex genetic hallmark of tumorigenesis.

## **Introduction**

Eukaryotic cells are protected from genomic instability by checkpoints that monitor the replication status of the chromosomes, their integrity and proper segregation (Hartwell and Kastan 1994). Among them, the spindle checkpoint specifically controls the distribution of chromosomes at mitosis by delaying the onset of anaphase until the kinetochores of all the chromosomes are properly attached to the spindle and aligned on the metaphase plate, thereby avoiding the loss of genetic material (Bharadwaj and Yu 2004). Disruption of the mitotic spindle by microtubule poisons, such as nocodazole, vinblastine or colcemid, activates this checkpoint and arrests the cells before anaphase (Rudner and Murray 1996).

Several proteins involved in the spindle checkpoint have been identified in yeast, most notably proteins of the BUB (budding uninhibited by benzimidazole) and the MAD (mitotic arrest deficient) families. Homologues of these proteins have been characterized in various vertebrate species, in which they are also required for execution of the spindle checkpoint (Taylor and McKeon 1997; Taylor et al. 1998; Abrieu et al. 2001; Michel et al. 2001; Cleveland et al. 2003; Mao et al. 2003; Bharadwaj and Yu 2004). Mad2, BubR1, Bub3 and Cdc20 form the mitotic checkpoint complex (MCC) that, when activated, inhibits the ubiquitin ligase activity of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), thus preventing securin and cohesin degradation, and sister chromatid separation (Cleveland et al. 2003; Bharadwaj and Yu 2004).

Not surprisingly, a growing number of observations now link the chromosomal instability seen in many cancers and cancer cells to dysfunction of the spindle checkpoint (Cahill et al. 1998; Nomoto et al. 1999; Takahashi et al. 1999; Dai et al. 2004). Low expression or mutations of Mad2, Bub1 or BubR1 genes were identified in some cases (Li and Benezra 1996; Cahill et al. 1998; Ru et al. 2002; Shichiri et al. 2002; Shin et al. 2003; Grady 2004; Michel et al. 2004). Overexpression of Aurora-A, a mitotic kinase often overproduced in breast, colorectal and gastric cancers, also correlates with bypass of the spindle checkpoint (Meraldi et al. 2002; Anand et al. 2003; Jiang et al. 2003; Meraldi et al. 2004). Moreover, it has been recently shown that BubR1 deficiency protects

cells with an abnormal chromosome number from apoptosis, suggesting a route by which tumor cells might escape death (Baek et al. 2003; Shin et al. 2003).

Following prolonged spindle disruption by drugs such as colcemid or nocodazole, mammalian cells first undergo mitotic arrest but then progressively exit mitosis, a phenomenon called mitotic slippage (Jimenez et al. 1999). At this point in normal rodent and human cells, a second checkpoint prevents tetraploid G1 cells from further replicating their DNA. A growing number of factors have been implicated in this arrest, including p53, pRb, and the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p19 (Cross et al. 1995; Di Leonardo et al. 1997; Gualberto et al. 1998; Khan and Wahl 1998; Lanni and Jacks 1998; Casenghi et al. 1999; Stewart et al. 1999; Khan et al. 2000; Ciciarello et al. 2001; Tsuiki et al. 2001; Mantel et al. 2002; Tritarelli et al. 2004). Proteins involved in the recognition and repair of DNA damage, such as BRCA2 or poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), also contribute to block re-replication following slippage (Lee et al. 1999; Futamura et al. 2000; Lee 2003; Halappanavar and Shah 2004). Hence, this G1 phase check on the tetraploid cell cycle initiated upon slippage displays many of the molecular hallmarks of the well-characterized DNA damage response (Jimenez et al. 1999).

In all these studies, the cells were arrested in mitosis by treating them with microtubule poisons, which are not recognized as DNA damaging agents (Aardema et al. 1998). However, some chromosome rearrangements have been observed in the progeny of cells treated with these drugs *in vivo* and *in vitro* (Aardema et al. 1998). Yet, how these spindle poisons might induce such DNA damage and whether coupling of the spindle checkpoint to a G1 checkpoint relies on such damage remained to be determined.

Here we show that upon treatment with microtubule poisons, normal embryonic and p53-deficient Chinese hamster fibroblasts as well as normal embryonic human fibroblasts and human colon cancer cells exhibit chromosome breaks early after mitotic slippage. As these cells slip out of mitosis, two blocks prevent them from entering a new round of DNA replication. The first one, which looks like a G0 block, is a fully reversible response elicited in cells exiting mitosis with a disorganized microtubule network. The second one is irreversible and results from the activation of the DNA damage checkpoint by DNA breaks. We demonstrate that breakage is a direct

consequence of sustained mitotic impairment and depends on BubR1 expression, but not on Mad2. We conclude that the BubR1 kinase plays a specific role in the trigger of DNA breaks and, in turn, couples the spindle checkpoint to the DNA damage checkpoint.

## Results

### **Nocodazole treatment induces chromosome rearrangements in GMA32 cells**

GMA32 cells are immortalized Chinese hamster lung fibroblasts, in which we identified a mutation in one p53 allele, leading to an isoleucine to histidine substitution within the DNA interacting domain (unpublished results). Western blot analysis also showed that p53 protein accumulates in untreated GMA32 cells (not shown), as generally observed in cells heterozygous for dominant negative mutations of p53.

We analyzed the DNA content of GMA32 cells by flow cytometry (FACS) following treatment with increasing concentrations of nocodazole. As shown in Figure 1A, 200nM was the lowest dose that efficiently blocked mitosis, leading to a disappearance of diploid cells in G1 and S phases. Hence, unless specifically stated, this drug concentration was used in all subsequent experiments. Following a 10h treatment, almost 60% of the cells were diploid mitotic cells (DNA content, 4C). At later time points, however, cells underwent re-replication, as indicated by the presence of cells with a DNA content above 4C.

Cytogenetic analysis of the tetraploid mitotic cells (DNA content 8C) generated 22h after drug addition (Fig. 1Ba–c) revealed the presence of chromosome fragments in almost all of them. Two color fluorescence in situ hybridization (FISH) with markers P3C3 and P3C4 that respectively label the p and q arms of Chinese hamster chromosome 1 (Toledo et al. 1992), showed that around 30% of these tetraploid mitotic cells also displayed major chromosome rearrangements. However, extensive cell death was not observed in these populations; cells often cycled up to three or four times upon prolonged growth in the presence of the drug and acquired multiple chromosome rearrangements (Fig. 1Bd). By contrast, less than 3% of the diploid mitotic cells accumulated after 10h of treatment presented chromosome abnormalities or chromosome fragments (not shown). Hence, striking genomic instability takes place during the tetraploid cell cycle induced upon nocodazole treatment.



### **Breaks are present in tetraploid GMA32 cells in G1 interphase**

To determine at which step of the tetraploid cell cycle the DNA breaks were generated, we took advantage of the well-known nuclear fragmentation (micronucleation) that occurs after slippage (Stubblefield 1964). Whereas only 0.3% of untreated cells had an abnormal nucleus, fragmented nuclei were present in up to 70% of GMA32 cells that underwent slippage. These cells did not label by TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labeling) indicating that micronuclei are distinct from apoptotic bodies (data not shown). We analyzed 70 micronucleated cells, formed after 10h of nocodazole treatment, by two color FISH with the same probes as before. Since very few cells, if any, started to replicate their DNA at that time (Fig. 1A), these cells were tetraploid and in G1 phase. Uneven segregation of the two syntenic markers in micronuclei was found in 11 cases (16%) (Fig. 1C) which indicated that chromosome breaks are present at that stage.

Since analysis of uneven segregation of syntenic markers in micronucleated cells inherently underestimates the frequency of breaks and is limited to the study of cells with a highly fragmented nucleus, we developed a technique derived from TUNEL labeling by adding two steps of signal amplification (see Materials and Methods). Figure 1D shows a FACS analysis of GMA32 cells labeled by amplified-TUNEL. Only about 2% of untreated cells (0h) appeared labeled. Strikingly, however, the proportion of labeled cells increased in parallel with the number of cells that underwent slippage (10h and 14h). Similar results were obtained with antibodies specific to Ser139-phosphorylated histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX), a marker for DNA breaks (not shown).

DNA breaks might result from mechanical shearing after slippage in early G1, when the nuclear envelope reforms around isolated chromosomes or groups of chromosomes. To test this possibility, we searched for  $\gamma$ -H2AX foci using fluorescence microscopy. Following 14h of treatment, most cells contained foci of  $\gamma$ -H2AX, and fragmented and non-fragmented nuclei labeled similarly (Fig. 1E). Altogether, our results indicate that chromosome breaks are induced during the G1 phase that follows slippage and that breakage is not a consequence of the micronucleation process.

### **Breaks are neither specific to nocodazole treatment nor dose dependent**

The number of breaks per cell following treatment with DNA-damaging agents generally parallels the dose of the agent. To determine whether nocodazole concentration influences the frequency of the DNA breaks we observed, we studied micronucleated cells formed during 10h of treatment with 10 $\mu$ M nocodazole. Note that the rate of accumulation of cells with a 4C DNA content is similar with 200nM and 10 $\mu$ M nocodazole (Fig 1A and data not shown). FISH analysis showed unequal segregation of markers P3C3 and P3C4 in 16% (16/103) of the fragmented nuclei, a proportion identical to the one determined following treatment with 200nM nocodazole (see above). Hence, the induction of breaks is not dose-dependent in this range of concentrations.

We also determined whether breaks resulted from a secondary effect specific to nocodazole by challenging GMA32 cells with two other spindle poisons, vinblastine (18nM) and colcemid (35nM). FACS analysis showed similar kinetics of accumulation of tetraploid cells with all the drugs (not shown). Cells treated for 10h with vinblastine or colcemid were also analyzed by FISH with markers P3C3 and P3C4. Uneven segregation was observed in 14% (7/50) of vinblastine-treated and 16% (9/56) of colcemid-treated cells with fragmented nuclei. Less than 3% of the diploid mitotic cells we observed on the same slides contained a rearranged chromosome 1, as previously observed for nocodazole treatment (not shown). Thus, breaks occurred within the same window of the cell cycle and at comparable frequencies with the three spindle poisons.

### **Phenotype of normal Chinese hamster embryonic fibroblasts (CHEF cells)**

We wanted to know whether the breaks we observed in GMA32 cells also occur in normal cells and might cause their arrest in G1 phase. We therefore analyzed the behavior of CHEF cells at different times following treatment with 200nM nocodazole (Fig. 2), a concentration that also blocks mitosis in CHEF cells (Supplementary Fig. S1A). Mitotic cells accumulated markedly during 9h of treatment (Fig. 2A), but after 24h, most cells had escaped the block and entered a G1-like phase with 4C DNA content. Their DNA profiles remained unchanged up to 72h, except for the progressive accumulation of apoptotic cells beyond 48h of treatment. This cell death was inhibited by z-vad-fmk, an inhibitor of apoptosis (Fig. 2B; see Materials and Methods), the

presence of which interferes neither with the kinetics of accumulation of mitotic cells nor with the timing of slippage

In contrast to GMA32 cells, 10–15% of CHEF cells remained with a 2C DNA content upon treatment with nocodazole (Fig. 2A, B). Since we wanted to study only those cells that were blocked in mitosis and then underwent mitotic slippage, we selected the mitotic cells after 8h of growth in the presence of nocodazole (see Materials and Methods), and replated them in drug-containing medium. Cytogenetic analysis showed that 8h after replating the mitotic index decreased to about 0.3%, indicating that almost all the cells underwent slippage. Two color FISH with the P3C3 and P3C4 markers revealed uneven segregation of the red and green signals in about 23% of the fragmented nuclei at that time (not shown). The presence of DNA breaks in these cells was confirmed by using amplified-TUNEL. Figure 2D shows that very few selected mitotic cells were positive (M), whereas 8h after replating most cells appeared labeled (+8hNoc). We confirmed by immunocytochemistry that in CHEF cells, as shown in Figure 1E for GMA32 cells, both fragmented and apparently normal nuclei had  $\gamma$ -H2AX foci (not shown). Thus, breaks are also present early after slippage in the chromosomes of normal Chinese hamster cells and may correlate with the arrest of these cells in a G1-like phase.

### **Breaks depend on the duration of the mitotic block but not on cell ploidy**

To analyze further the triggers of chromosome breakage, we investigated the behavior of cells released from the mitotic block before slippage. Mitotic GMA32 and CHEF cells were recovered after 8h of growth in the presence of nocodazole, then washed and replated in drug-free medium. Cells were collected at various time points following replating and analyzed by FACS (Fig. 2C and data not shown). After 3h in nocodazole-free medium, about two thirds of GMA32 and CHEF cells displayed a 2C DNA content, indicating that the majority of selected cells were still capable of proceeding through mitosis. While diploid and tetraploid GMA32 cells continued to cycle (not shown), however, the distribution of CHEF cells remained unchanged up to 42h, the last time point studied here. Moreover, CHEF cells failed to incorporate BrdU (a marker of DNA replication) up to 42h following replating (not shown), which confirms that they arrested before S

phase entry. These results indicate that normal Chinese hamster fibroblasts arrest irreversibly after 8h in nocodazole, regardless of their ploidy.

To determine whether this G1 arrest was accompanied by DNA damage, we searched for evidence of chromosome breaks by FACS analysis of amplified-TUNEL labeled cells. Figure 2D (+8h-Noc) shows that positively labeled cells were equally present in diploid (2C) and tetraploid (4C) subpopulations of CHEF cells, with more than 60% of cells labeled in both peaks. Similar results were obtained with GMA32 cells (data not shown). We concluded that cells are committed to have DNA breaks even before they undergo mitotic slippage.

We took advantage of this finding to determine whether the formation of breaks depends on the length of nocodazole treatment. Mitotic GMA32 cells accumulated during 4h or 6h of growth in the presence of the drug were selected and replated in normal medium for 3h (note that the doubling time of these cells is about 12h). FACS analysis indicated that almost 100% of the cells were diploid with a 2C DNA content at that time. We found after 4h and 6h that 5% and 30% of the nuclei, respectively, exhibited  $\gamma$ -H2AX foci. Hence, chromosome breaks are triggered by prolonged mitotic block rather than by tetraploidy, failure of cytokinesis or mitotic slippage *per se*.

To check this conclusion, we treated GMA32 and CHEF cells with dihydroxycytochalasine B (DCB) (Supplementary Fig. S1B). This drug does not perturb the mitotic process but impairs cytokinesis, which generates multinucleate polyploid cells. Following 12h of treatment, most GMA32 cells were binucleate (Supplementary Fig. S1Bb), then acquired three or four nuclei at later time points (Supplementary Fig. S1Bc). By contrast, CHEF cells arrested with two nuclei (Supplementary Fig. S1Be), which confirms other results showing that cytokinesis failure prevents normal cells from entering S phase (Andreassen et al. 2001; Lohez et al. 2003). Remarkably,  $\gamma$ -H2AX foci were observed neither in GMA32 nor in CHEF cells under these conditions, which further supports our hypothesis that breaks are specifically triggered in response to mitotic impairment.

### **The damage response is masked in CHEF cells arrested in the presence of nocodazole**

We next compared proteins involved in the DNA damage response in CHEF cells challenged either with nocodazole or with  $\gamma$ -rays. As shown in Figure 3A (left panel) following irradiation, the level of p53 increased rapidly accompanied by its phosphorylation on Ser15. High levels of p21 and cyclin D1 were observed a few hours after treatment and were maintained until 48h, and hyperphosphorylated forms of pRb were progressively dephosphorylated – all typical features of DNA damage.

Mitotic cells selected after 8h of growth in the presence of nocodazole (M) were analyzed at 3h and 24h after replating in drug-containing medium. Figure 3A (right panel) shows that p53 level increased up to 24h after replating, but p53 was not substantially phosphorylated on Ser15 at any time point and the level of p21 remained constant (or increased slightly, depending on the experiment). The hyperphosphorylated form of pRb, which predominates in mitotic cells (Buchkovich et al. 1989), progressively converted to the hypophosphorylated form. In parallel, cyclin D1 disappeared progressively. Thus, the status of the proteins involved in cell cycle arrest bears more similarity to the G0 hallmark found in confluent cells (Fig. 3A right panel, cf) than to the DNA damage response.

To determine whether the damage response is masked in the presence of nocodazole, we selected mitotic cells and irradiated them before replating in drug-containing medium (Fig. 3B). Remarkably, under these conditions the protein patterns resembled those observed in cells treated with nocodazole alone (compare Fig. 3B with 3A, right panel). This demonstrates that nocodazole imposes a specific molecular phenotype, which masks the DNA damage response in CHEF cells.

### **A double block arrests CHEF cells upon prolonged spindle disruption**

In an attempt to unmask the DNA damage response, mitotic cells were replated in drug-free medium and analyzed 3h, 18h and 24h later in conditions under which more than 60% of arrested cells were diploid (Fig. 2C). Strikingly, the profiles of p53, p21, cyclin D1 and pRb were similar to those observed following irradiation (Fig. 3C). We also determined the DNA damage protein profile of tetraploid cells following nocodazole removal. For that purpose, selected mitotic

cells were replated in the presence of nocodazole and maintained in this medium for 4h. Cytogenetic analysis indicated that more than 95% of the cells underwent slippage at that time. Drug containing-medium was then replaced by normal medium, and cells were recovered at different time points. Protein patterns again appeared similar to those observed following irradiation (not shown). Thus, removing nocodazole unmasked the DNA damage response both in diploid and tetraploid cells that went through a perturbed mitosis.

We checked the status of the microtubule network in selected cells replated in the presence or in the absence of the drug. Figure 3D shows microtubule disorganization in cells grown in the presence of nocodazole. Removal of the drug allows reconstitution of an apparently normal network within a few minutes. Altogether, our results strongly suggest that reversal of microtubule disorganization permitted CHEF cells to exit from the G<sub>0</sub>-like stage. However, they were still prevented from entering S phase by activation of the DNA damage checkpoint.

#### **Chromosome breakage also occurs in nocodazole-treated human cells**

To determine whether the phenomenon described above is specific to Chinese hamster cells, we studied normal human MRC-5 fibroblasts and two human tumor cell lines, LoVo and HCT116. These colorectal carcinoma cell lines were chosen because they have normal DNA damage and spindle checkpoints (Tighe et al. 2001). FACS analysis showed that in the presence of 200nM nocodazole (an efficient concentration to arrest mitosis in these human cells, as shown in Supplementary Fig. S2), cells accumulated in mitosis then underwent slippage. Depending on the cell type, most cells entered apoptosis following 24–48h of treatment. We verified that, as in CHEF cells, addition of z-VAD-fmk together with nocodazole blocked apoptosis without disturbing the kinetics of mitotic accumulation and slippage (Fig. 4 and data not shown). Hence, the peptide was added together with 200nM nocodazole in all experiments described below. Under these conditions, MRC-5 and LoVo cells remained blocked with a 4C DNA content up to 72h, the last time-point in our experiments (not shown). By contrast, after 24–36h of treatment, HCT116 cells escaped the block and underwent re-replication (Fig. 4).

We searched for the presence of  $\gamma$ -H2AX foci in cells recovered from mitotic selection. Figure 4 (MRC-5, B) shows that foci were present in the nuclei of the vast majority of MRC-5 cells replated in the presence of the drug or in regular medium. The same results were obtained with LoVo cells (not shown) and HCT116 cells (see below). We conclude that chromosome breakage is generated in normal human fibroblasts, but is not specific to fibroblasts. Our findings also indicate that, in human as in Chinese hamster cells, the appearance of DNA breaks depends neither on tetraploidy, cytokinesis failure, nor mitotic slippage.

We determined the protein profiles of cells selected following 10h of growth in the presence of nocodazole and replated with or without the drug (Fig. 4). When replated in the presence of nocodazole, MRC-5 and LoVo cells displayed p21, pRb and cyclin D1 patterns resembling those observed in CHEF cells grown under similar conditions. However, weak p53 accumulation and Ser15 phosphorylation were observed, which occurred with different kinetics in the two human cell lines (Fig. 4, MRC-5 and LoVo, upper panel right). We showed that the presence of nocodazole is responsible for this partial masking of the DNA damage response by studying, as before, irradiated mitotic cells replated in the presence of the drug (Fig. 4, MRC-5 and LoVo, lower panel). Finally, we confirmed that selected mitotic cells replated in regular medium exhibit a protein profile similar to the one induced in response to irradiation (Fig. 4, MRC-5 and LoVo, lower panel).

Altogether, these results indicate that, as in CHEF cells, a double block takes place in MRC-5 and LoVo cells maintained in the presence of the drug. In HCT116 cells, by contrast, p53, p21 and cyclin D1 accumulated markedly and at similar levels whether or not nocodazole was maintained in the medium (Fig. 4, HCT116). This suggests that the genetic background of HCT116 allows them to escape the G0 block resulting from an altered microtubule network. Moreover, among the cell lines proficient for the DNA damage response studied here, HCT116 is the only one able to adapt and to enter tetraploid S phase following 24-36h of treatment.

### **Chromosome breakage depends on BubR1 but not on Mad2 function**

To determine whether DNA breaks are elicited in response to prolonged activation of the spindle checkpoint, we used RNA interference to silence the checkpoint. HCT116 cells were chosen for these experiments because they fail to arrest in G<sub>0</sub>, which permits observation of the DNA damage response without drug removal. We designed oligonucleotides that efficiently and specifically knock down the expression of BubR1 (oligonucleotides B1 and B2) or Mad2 (oligonucleotides M1 and M2) following transient transfection. As shown Figure 5A, although transfection with B1 efficiently inhibits BubR1 expression for up to 72h after transfection, Mad2 levels drop between 24h and 48h after transfection with M1, and a small but significant amount of protein reappears after 72h. The cells were, therefore, transfected twice in each experiment described below (see Materials and Methods), which allowed us to study tightly silenced cells during up to 48h of nocodazole treatment (Fig. 5B and data not shown). Figure 5C shows that removing BubR1 or Mad2, as expected, prevents accumulation of mitotic cells in the presence of nocodazole.

We searched for the presence of  $\gamma$ -H2AX foci when cells in which either the BubR1 or the Mad2 gene was silenced, were treated with nocodazole for different periods of time (see Fig. 5D for examples). Most cells transfected with M1 or M2 displayed foci of DNA damage, like untransfected cells and cells transfected with a control oligonucleotide. In striking contrast, there were no  $\gamma$ -H2AX foci in the vast majority of cells following transfection with B1 or B2. Figure 5E shows a quantitative analysis of nuclei displaying  $\gamma$ -H2AX foci in three independent experiments (150–200 cells examined per experiment for each condition). These findings indicate that silencing of BubR1 completely blocks nocodazole-induced chromosome breakage, while silencing of Mad2 has no effect. In good agreement with this conclusion, Figure 5F shows that, following nocodazole treatment, p53 and p21 accumulate in control cells and in cells transfected with M1, but not in cells transfected with B1.



## Discussion

A general conclusion from the study of mammalian cells is that activation of the spindle checkpoint blocks cell cycle progression only transiently, even when mitosis is permanently compromised by treatments that inhibit the formation of the mitotic spindle. The main control on the mitotic process appears to be executed in G1 phase, but the precise nature of this block and of the processes that link it to the spindle checkpoint remained to be determined (Jimenez et al. 1999). Here we show that treating a variety of human and Chinese hamster cells for prolonged periods with various spindle poisons produces DNA breaks in their chromosomes. Because cells with a functional DNA damage checkpoint stop cycling in response to DNA breaks, our observations offer a rationale for the permanent arrest of normal cells and some tumor cells that went through a prolonged mitotic block. To confirm the role of chromosome breakage in cell cycle arrest following nocodazole treatment we studied, in cells proficient for the DNA damage response, the status of proteins involved in that response and in G1 phase progression. Consistent with our observation of DNA breaks following mitotic impairment, when nocodazole was washed out, we saw a protein pattern typical of the DNA damage response in the four types of cells we tested.

When kept in the presence of nocodazole however, three of the four types of cells displayed a protein pattern resembling that observed in cells arrested in G0 by confluence. This suggested that a second block, imposing its phenotype over the DNA damage response, operates in the presence of microtubule poisons. We directly addressed this point by irradiating mitotic cells before re-plating them in nocodazole-containing medium. These cells displayed the G0-like pattern found in non-irradiated cells kept in the presence of the drug. The existence of such a nocodazole-dependent block was previously suggested by the results of Khan and Wahl, who showed that normal human and mouse fibroblasts fail to enter S phase when released from serum depletion in the presence of the drug, but resume cell cycle progression when returned to nocodazole-free medium (Khan and Wahl 1998). Altogether, the results suggest that the execution of a critical event in early G1 relies on the integrity of the microtubule network, the impairment of which drives the

cells towards G<sub>0</sub>. This block is relieved by nocodazole removal or in particular genetic backgrounds, such as the HCT116 cell line.

We observed here that p53 deficient GMA32 cells overcome both the DNA damage and the G<sub>0</sub> blocks, which implies either that p53 mediates both arrests or that an additional unidentified mutation prevents GMA32 cells from sensing microtubule defects in early G<sub>1</sub>. A double role for p53 is suggested by the fact that various types of p53 deficient cells failed to arrest following mitotic slippage when kept in the presence of spindle poisons (Jimenez et al. 1999). However, the contribution of p53 to cell cycle arrest remains unclear since, in other experiments, specific dominant “gain of function” mutations were required for S phase entry of cells maintained in the presence of spindle poisons (Gualberto et al. 1998).

Agents that disrupt the mitotic spindle are generally considered as potent aneugens, but not as DNA damaging agent. Consistently, nocodazole does not behave like canonical clastogens, since the frequency of chromosome breaks was independent of the drug concentration, and breakage was seen only in cells that went through a perturbed mitosis. Breaks were present in normal and fragmented nuclei, indicating that they were not induced by mechanical stress resulting from the micronucleation process. We also found that chromosome breakage occurs even when cells were released from the mitotic block before slippage, giving rise to diploid progeny. Altogether, our results demonstrate that neither impairment of the DNA replication process, micronucleation, failure of cytokinesis, tetraploidy nor slippage are directly responsible for breakage.

We hypothesized that breaks depend on a signal elicited upon sustained activation of the spindle checkpoint. To test this possibility, we silenced the checkpoint in HCT116 cell line, the genetic background of which allowed us to observe directly the DNA damage response. We designed silencing RNAs against BubR1 or Mad2 and observed, as expected, that cells transfected with either oligonucleotide failed to accumulate in M phase in the presence of nocodazole. With oligonucleotides against Mad2, we observed DNA damage following nocodazole treatment, as in nocodazole-treated control cells, implying that activation of the spindle checkpoint itself is not responsible for breakage. In striking contrast, there was no indication of DNA damage following nocodazole treatment of cells transfected with oligonucleotides against BubR1, which reveals a

specific role for that kinase in generating chromosome breaks. These findings are in good agreement with those of Shin et al., who showed that overexpression of BubR1 induces apoptosis in cells that underwent mitotic slippage, whereas overexpression of Mad2 does not (Shin et al. 2003). Further study is indeed needed to determine the exact nature of the relationship between DNA breakage and cell death, and to reconstitute the molecular mechanisms through which BubR1 specifically governs the fate of cells that experience a mitotic block.

Although induction of chromosome breaks in cells with a functional spindle checkpoint required a prolonged mitotic arrest, breaks were also present in Mad2-silenced cells, which slipped out of mitosis without any delay. To reconcile these data, we propose that, in cells with a normal checkpoint, Mad2 represses the BubR1-dependent pathway that elicits breakage, and that changes occur in Mad2 status when the mitotic block is maintained for prolonged periods of time, which alleviates the repression. Such a regulation would promote chromosome breakage and cell suicide when the mitotic process is deeply compromised, generating a major risk of uneven chromosome segregation. By contrast, only the well-documented primary role of the spindle checkpoint - anaphase delay without commitment to DNA damage - would appear when mitosis is only transiently perturbed.

Our demonstration that HCT116 cells are committed during the mitotic block, by a BubR1-dependent signal, to having DNA breaks when they return to interphase calls into question the tetraploid checkpoint model. This checkpoint was proposed to monitor the number of chromosomes or centrosomes per cell, and to irreversibly arrest tetraploid cells in G1 whether they arise from treatment with spindle poisons or DCB, an inhibitor of cytokinesis (Andreassen et al. 2001; Margolis et al. 2003). We showed that the two situations are not equivalent since chromosome breakage occurs specifically in cells treated with spindle poisons. Besides, at least in cells treated by nocodazole, none of the two blocks imposed on cell cycle progression relies on cell ploidy. Indeed, as also shown by Ciciarello et al, normal cells arrest regardless of their ploidy when nocodazole is washed out (Ciciarello et al. 2001), and the G0 block induced in the presence of the drug occurs in diploid cells (Khan and Wahl 1998).

Some tumors display mainly variations in chromosome number, *i.e.* loss or gain of a few chromosomes, whereas others have highly rearranged karyotypes, presenting alterations of both the number and the structure of chromosomes (Dutrillaux 1995; Lengauer et al. 1998; Jallepalli and Lengauer 2001; Masuda and Takahashi 2002). Whether these features reflect different stages of tumor progression or different pathways of genome remodeling is still unclear. Our demonstration of a time-dependent coupling between sustained activation of the spindle checkpoint and induction of chromosome breakage suggests a straightforward mechanism governing gross instability in cancer cells. Prolonged activation of the spindle checkpoint may occasionally occur *in vivo* upon failure of chromosome attachment to the spindle or perturbations of microtubule dynamics during mitosis. In p53-deficient cells, and, more generally, in cells permissive for DNA damage but retaining normal BubR1 function, slippage and chromosome breakage lead within a single cell cycle to tetraploidy, chromosome rearrangements and gene imbalance following loss of chromosome fragments. The rearranged genomes that result are likely to carry genetic alterations that allow the rapid selection of cells displaying all the hallmarks properties of highly aggressive cancer cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture and treatment**

The GMA32 cell line and culture medium have been previously described (Debatisse et al. 1982). CHEF and MRC-5 cells were used from passage 14 to 19 and were maintained in MEM medium (Gibco) supplemented with 1mM sodium pyruvate, 2mM glutamine, 1x MEM non-essential amino acids, 1x penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum. LoVo and HCT116 cells were maintained in DMEM medium (Gibco) supplemented with 2mM glutamine, 1x penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum. Both types of cells were incubated at 37°C in a humidified incubator with 7% CO<sub>2</sub>.

Typically,  $3 \times 10^5$  to  $8 \times 10^5$  cells were plated in 10cm diameter Petri dishes two days before treatment. For mitotic selection, cells were treated with 200nM nocodazole (Sigma) for 8-10h depending on the cell type. Loosely attached cells were collected by shake-off, washed and replated in the indicated medium. z-VAD-fmk (Bachem), an inhibitor of cell death, was used at a final concentration of 125µg/ml. Cell irradiation was performed with  $\gamma$ -rays from a <sup>137</sup>Cesium source.

### **Cell cycle analysis**

FACS analyzes were performed with a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Cells were collected, suspended in 1ml of cold GM buffer (6.5mM glucose, 137mM NaCl, 5.4mM KCl, 2mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KHPO<sub>4</sub>, 0.5mM EDTA), and stored at 4°C for at least 2h after addition of 3ml of cold 100% ethanol. At that stage, cells were eventually washed with 1xPBS, incubated for 30min in 1xPBS 1% BSA prior to treatment with specific antibodies, for the amplified TUNEL reaction and phospho-H2AX detection (see below). Cells were then stained for 30min at room temperature in PI solution (50µg/ml propidium iodide, 25µg/ml RNase A in 1x PBS buffer). 10,000 events were analyzed with Cellquest software, and cell aggregates were gated out.

### **Determination of the mitotic index**

Mitotic index was estimated either by scoring the number of mitotic cells in cytogenetic preparations or by FACS analysis of cells labeled with the mitotic phosphoepitope marker (MPM-2). In the latter case, fixed cells were washed in PBS before incubation with MPM-2 antibodies (05-365, Upstate) for 1h at 4°C. Cells were washed twice before incubation 1h at 4°C with FITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibodies (F0479, Dako).

### **In situ hybridization**

FISH was performed as previously described (Toledo et al. 1992; Coquelle et al. 1997). Cosmids P3C3 and P3C4 were isolated from a Chinese hamster chromosome 1-specific library (M. Debatisse, B. Labidi and P. Metezeau, unpublished).

### **Immunoblotting**

To detect p53, p53ser15, p21 and cyclinD1, BubR1 and Mad2, cells were lysed in Laemmli buffer. To detect pRb, lysates were prepared in RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 1% NP40, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 0.25% sodium deoxycholate), supplemented with phosphatase and protease inhibitors (1mM sodium orthovanadate, 1mM sodium fluoride, 1x protease inhibitor cocktail [Roche]). After centrifugation at 12000 rpm, the supernatant was recovered for protein analysis. Equal amounts of lysates were resolved on 3%-8% gradient (for pRb, BubR1) or 12% polyacrylamide gels (for all other proteins). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked with 5% nonfat milk before overnight incubation with antibodies diluted in TBST buffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% nonfat milk. We used anti-pRb antibody (554136, Pharmingen) 1/200, anti-p53 antibody (M7001, Dako) 1/1000, anti-p53Ser15 antibody (9284, Cell Signaling) 1/500, anti-p21 antibody (65951A, Pharmingen) 1/500, anti-cyclin D1 (sc-718, Santa Cruz) 1/500, anti-Mad2 (sc6329, Santa Cruz) 1/750, anti-BubR1 (ab5091, Abcam) 1/500. Blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibodies (PO447 or PO448 respectively, Dako) diluted 1/5000 in TBST or horseradish peroxidase-conjugated

donkey anti-goat IgG secondary antibody (sc2020, Santa-Cruz) 1/10000. Protein-antibody complexes were detected by enhanced chemiluminescence (RPN2106 ECL, Amersham).

### **Immunocytochemistry**

For microtubule detection, cells were washed in PHEM buffer (Hepes 450mM pH6.9, Pipes 450mM pH6.9, EGTA 200mM, MgCl<sub>2</sub> 500mM, PMSF 100mM). Free tubulin was extracted in PHEM buffer containing 0.1% Triton for 1 min at 37°C. Cells were then fixed for 4min in methanol at -20°C, and incubated in primary anti- $\beta$ tubulin antibody (556321, Beckton Dickinson) diluted 1/100 in PBS, 0.1% BSA for 1h at room temperature. Secondary FITC-conjugated goat anti-mouse antibody (F0479, Dako) was hybridized and cells were visualized by fluorescence microscopy.

### **Amplified TUNEL reaction and phospho-H2AX detection**

The TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labeling) reaction was performed according to the manufacturer's instructions (In situ cell death detection kit, fluorescein, [Roche]). Cells were washed in 1xPBS and incubated 1h at 37°C successively with rabbit anti-FITC antibody (molecular probes) diluted 1/500 in PBS 0.01% Triton X-100, then with FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (Vector) diluted in the same conditions. H2AX phosphorylated on serine 139 (Rogakou et al. 1998) was detected with rabbit antibodies (Trevigen) diluted 1/100 in 1xPBS, 1% BSA. Cells were washed three times with 1xPBS, 0.5% TritonX-100, then incubated for 1h at room temperature with goat anti-rabbit FITC (Zymed) diluted 1/250 in 1xPBS, 1% BSA for FACS analysis. For immunocytochemistry, we used goat anti-rabbit antibodies Alexa 594 (Molecular Probes) diluted 1/100 in 1xPBS, 1% BSA (cells pre-treated as above for p53). Counter staining with DiOC6-FITC (Molecular Probe) was previously described (Anglana and Debatisse 2001).

### **RNA interference**

21 bp-long oligonucleotides were designed for silencing BubR1 (B1, B2) or Mad2 (M1, M2) using the design website of Qiagen. B1 and B2 oligonucleotides started respectively at

positions 724 and 1415 of the BubR1 sequence (NM\_001211), M1 and M2 started respectively at positions 217 and 577 of Mad2 sequence (NM\_002358). By BLAST, we verified that the sequences B1, B2, M1 and M2 were respectively specific to BubR1 and Mad2. The oligonucleotides were purchased as duplexes (Proligo). The non-silencing oligonucleotide (NS) (Xeragon - Qiagen) was used as negative control.  $2 \times 10^5$  HCT116 cells were seeded in 6-well plates 24h before the first transfection of RNA (100nM final concentration) with effectene (Qiagen) as transfection agent, according to the manufacturer's instructions. The day after, cells were split and replated. A second transfection was performed in the same conditions 24h after replating. About 18h later, the cells were treated with nocodazole (200nM) and z-VAD-fmk (Bachem) for 8h-36h and recovered for western blot or FACS analyzes.



## **Acknowledgements**

We thank Dr G. Buttin and B. Dutrillaux for careful reading of the manuscript and helpful discussion. This work was supported in part by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Ligue Nationale Française contre le Cancer (Comité de Paris). L. R. was supported by a grant from the ARC.

## References

- Aardema, M.J., Albertini, S., Arni, P., Henderson, L.M., Kirsch-Volders, M., Mackay, J.M., Sarrif, A.M., Stringer, D.A., and Taalman, R.D.F. 1998. Aneuploidy : a report of an ECETOC task force. *Mut. Res.* **410**: 3-79.
- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J.A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D.W., and Labbe, J.C. 2001. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**: 83-93.
- Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., and Venkitaraman, A.R. 2003. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **3**: 51-62.
- Andreassen, P.R., Lohez, O.D., Lacroix, F.B., and Margolis, R.L. 2001. Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol. Biol. Cell* **12**: 1315-1328.
- Anglana, M. and Debatisse, M. 2001. Dual control of replication timing: Stochastic onset but programmed completion of mammalian chromosome duplication. *J. Biol. Chem.* **276**: 36639-36646.
- Baek, K.H., Shin, H.J., Yoo, J.K., Cho, J.H., Choi, Y.H., Sung, Y.C., McKeon, F., and Lee, C.W. 2003. p53 deficiency and defective mitotic checkpoint in proliferating T lymphocytes increase chromosomal instability through aberrant exit from mitotic arrest. *J. Leukoc. Biol.* **73**: 850-861.
- Bharadwaj, R. and Yu, H. 2004. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* **23**: 2016-2027.
- Buchkovich, K., Duffy, L.A., and Harlow, E. 1989. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* **58**: 1097-1105.
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**: 300-303.
- Casenghi, M., Mangiacasale, R., Tuynder, M., Caillet-Fauquet, P., Elhajouji, A., Lavia, P., Mousset, S., Kirsch-Volders, M., and Cundari, E. 1999. p53-independent apoptosis and p53-dependent block of DNA rereplication following mitotic spindle inhibition in human cells. *Exp. Cell Res.* **250**: 339-350.
- Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Casenghi, M., Zaira Limongi, M., D'Angelo, M., Soddu, S., Lavia, P., and Cundari, E. 2001. p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J. Biol. Chem.* **276**: 19205-19213.
- Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F. 2003. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**: 407-421.
- Coquelle, A., Pipiras, E., Toledo, F., Buttin, G., and Debatisse, M. 1997. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* **89**: 215-225.
- Cross, S.M., Sanchez, C.A., Morgan, C.A., Schimke, M.K., Ramel, S., Idzerda, R.L., Raskind, W.H., and Reid, B.J. 1995. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* **267**: 1353-1356.
- Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y.M., Xu, M., and Rao, C.V. 2004. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res.* **64**: 440-445.
- Debatisse, M., Berry, M., and Buttin, G. 1982. Stepwise isolation and properties of unstable Chinese hamster cell variants that overproduce adenylate deaminase. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1346-1353.

- Di Leonardo, A., Khan, S.H., Linke, S.P., Greco, V., Seidita, G., and Wahl, G.M. 1997. DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res.* **57**: 1013-1019.
- Dutrillaux, B. 1995. Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. *Adv. Cancer Res.* **67**: 59-82.
- Futamura, M., Arakawa, H., Matsuda, K., Katagiri, T., Saji, S., Miki, Y., and Nakamura, Y. 2000. Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1. *Cancer Res.* **60**: 1531-1535.
- Grady, W.M. 2004. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **23**: 11-27.
- Gualberto, A., Aldape, K., Kozakiewicz, K., and Tlsty, T.T. 1998. An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5166-5171.
- Halappanavar, S.S. and Shah, G.M. 2004. Defective Control of Mitotic and Post-mitotic Checkpoints in Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1(-/-) Fibroblasts After Mitotic Spindle Disruption. *Cell Cycle* **3**: 335-342.
- Hartwell, L.H. and Kastan, M.B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**: 1821-1828.
- Jallepalli, P.V. and Lengauer, C. 2001. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat. Rev. Cancer* **1**: 109-117.
- Jiang, Y., Zhang, Y., Lees, E., and Seghezzi, W. 2003. AuroraA overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer. *Oncogene* **22**: 8293-8301.
- Jimenez, G.S., Khan, S.H., Stommel, J.M., and Wahl, G.M. 1999. p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene* **18**: 7656-7665.
- Khan, S.H., Moritsugu, J., and Wahl, G.M. 2000. Differential requirement for p19ARF in the p53-dependent arrest induced by DNA damage, microtubule disruption, and ribonucleotide depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3266-3271.
- Khan, S.H. and Wahl, G.M. 1998. p53 and pRb prevent rereplication in response to microtubule inhibitors by mediating a reversible G1 arrest. *Cancer Res.* **58**: 396-401.
- Lanni, J.S. and Jacks, T. 1998. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 1055-1064.
- Lee, H. 2003. Impaired phosphorylation and mis-localization of Bub1 and BubR1 are responsible for the defective mitotic checkpoint function in Brca2-mutant thymic lymphomas. *Exp. Mol. Med.* **35**: 448-453.
- Lee, H., Trainer, A.H., Friedman, L.S., Thistlethwaite, F.C., Evans, M.J., Ponder, B.A., and Venkitaraman, A.R. 1999. Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2. *Mol. Cell* **4**: 1-10.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**: 643-649.
- Li, Y. and Benezra, R. 1996. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hSMAD2. *Science* **274**: 246-248.
- Lohez, O.D., Reynaud, C., Borel, F., Andreassen, P.R., and Margolis, R.L. 2003. Arrest of mammalian fibroblasts in G1 in response to actin inhibition is dependent on retinoblastoma pocket proteins but not on p53. *J. Cell. Biol.* **161**: 67-77.
- Mantel, C.R., Gelfano, V.M., Kim, Y.J., McDaniel, A., Lee, Y., Boswell, H.S., and Broxmeyer, H.E. 2002. P21waf-1-Chk1 pathway monitors G1 phase microtubule integrity and is crucial for restriction point transition. *Cell Cycle* **1**: 327-336.
- Mao, Y., Abrieu, A., and Cleveland, D.W. 2003. Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* **114**: 87-98.
- Margolis, R.L., Lohez, O.D., and Andreassen, P.R. 2003. G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J. Cell. Biochem.* **88**: 673-683.

- Masuda, A. and Takahashi, T. 2002. Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene* **21**: 6884-6897.
- Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E.A. 2002. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53<sup>-/-</sup> cells. *EMBO J.* **21**: 483-492.
- . 2004. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 29-36.
- Michel, L., Diaz-Rodriguez, E., Narayan, G., Hernando, E., Murty, V.V., and Benezra, R. 2004. Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 4459-4464.
- Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P.K., Murty, V.V., and Benezra, R. 2001. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* **409**: 355-359.
- Nomoto, S., Haruki, N., Takahashi, T., Masuda, A., Koshikawa, T., Fujii, Y., and Osada, H. 1999. Search for in vivo somatic mutations in the mitotic checkpoint gene, hMAD1, in human lung cancers. *Oncogene* **18**: 7180-7183.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**: 5858-5868.
- Ru, H.Y., Chen, R.L., Lu, W.C., and Chen, J.H. 2002. hBUB1 defects in leukemia and lymphoma cells. *Oncogene* **21**: 4673-4679.
- Rudner, A.D. and Murray, A.W. 1996. The spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**: 773-780.
- Shichiri, M., Yoshinaga, K., Hisatomi, H., Sugihara, K., and Hirata, Y. 2002. Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival. *Cancer Res.* **62**: 13-17.
- Shin, H.J., Baek, K.H., Jeon, A.H., Park, M.T., Lee, S.J., Kang, C.M., Lee, H.S., Yoo, S.H., Chung, D.H., Sung, Y.C., McKeon, F., and Lee, C.W. 2003. Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell* **4**: 483-497.
- Stewart, Z.A., Leach, S.D., and Pietsenpol, J.A. 1999. p21(Waf1/Cip1) inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 205-215.
- Stubblefield, E. 1964. DNA synthesis and chromosomal morphology of Chinese hamster cells cultured in media containing colcemid. *Symp. Intern. Soc. Cell Biol.* **3**: 223-248.
- Takahashi, T., Haruki, N., Nomoto, S., Masuda, A., Saji, S., Osada, H., and Takahashi, T. 1999. Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hSMAD2 and p55CDC, in human lung cancers. *Oncogene* **18**: 4295-4300.
- Taylor, S.S., Ha, E., and McKeon, F. 1998. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J. Cell. Biol.* **142**: 1-11.
- Taylor, S.S. and McKeon, F. 1997. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* **89**: 727-735.
- Tighe, A., Johnson, V.L., Albertella, M., and Taylor, S.S. 2001. Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint. *EMBO Rep.* **2**: 609-614.
- Toledo, F., LeRoscouet, D., Buttin, G., and Debatisse, M. 1992. Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *EMBO J.* **11**: 2665-2673.
- Tritarelli, A., Oricchio, E., Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Palena, A., Lavia, P., Soddu, S., and Cundari, E. 2004. p53 Localization at Centrosomes during Mitosis and Postmitotic

Checkpoint are ATM-Dependent and Require Serine 15 Phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **4**: 3751-3757.

Tsuiki, H., Nitta, M., Tada, M., Inagaki, M., Ushio, Y., and Saya, H. 2001. Mechanism of hyperploid cell formation induced by microtubule inhibiting drug in glioma cell lines. *Oncogene* **20**: 420-429.

## Legends to Figures

**Figure 1.** Chromosome instability in GMA32 cells following slippage. **(A)** FACS analysis of cell populations treated with nocodazole. Left: Percentages of cells with the indicated DNA content following 10h of growth in increasing drug concentrations. Right: Profiles of control cell population (0h) and populations grown for 10h or 22h in 200 nM nocodazole. Values in boxes: mitotic index. DNA content: 2C (diploid cells in G1),  $2C < S < 4C$  (diploid cells in S), 4C (diploid cells in G2 and mitosis, and tetraploid G1), 8C (tetraploid cells in G2 and mitosis, and octoploid cells in G1). **B-E:** Visualization of breakage in cells treated with 200nM nocodazole. **(B)** Chromosome spreads analyzed by FISH with probes for the p arm (red) and the q arm (green) of chromosome 1. Arrowheads point to chromosome fragments. **a-c:** near-tetraploid mitotic cells formed after 22h in the drug. **a**, cell with four normal chromosomes 1. **b**, cell with a dicentric chromosome 1 (arrow). **c**, cell with two normal and two broken chromosomes 1 (arrows). **d**, hyperploid cell generated after 36h of growth in nocodazole; several markers derived from chromosomes 1 are observed in multiple copies. **(C)** Interphase nuclei hybridized with the same probes as above. **a**, normal diploid nucleus. **b-d:** fragmented nuclei of cells recovered following a 10h-treatment. **b**, an example of normal segregation. **c** and **d**, examples of uneven segregation (arrowheads and arrows point to micronuclei containing abnormal numbers of FISH signals). **(D)** FACS quantification of amplified-TUNEL labeling (gray profile) and DNA content (black profile) at the indicated times of treatment. **(E)** Analysis of breaks by  $\gamma$ -H2AX labeling (red). Membranes were stained with DiOC6-FITC (green) and nuclei with DAPI (blue). **a**, control cells. **b**, cells treated for 14h with nocodazole. Both fragmented (arrow) and apparently normal (arrowhead) nuclei are positive. **c**, cells irradiated (7 Gy) 1h before labeling.

**Figure 2.** Relationships linking cell cycle arrest, breakage and ploidy. **A-D:** FACS analysis of CHEF cell populations treated with 200nM nocodazole. Mitotic index is quoted within boxes. 2C, 4C: as in Figure 1. **(A)** CHEF cells challenged with nocodazole alone were analyzed at the indicated time points. About 9% of the cells undergo apoptosis 48h after drug addition as indicated by the appearance of cells with less than 2C DNA. **(B)** Nocodazole and z-VAD-fmk were

simultaneously added to the medium. Time points: as in **A**. Note that apoptosis is suppressed. **(C)** Mitotic cells (M) selected following 8h of growth in the presence of nocodazole were replated in drug free medium. 3h after release, the population contained about 65% of diploid cells. This profile remained unchanged up to 42h. **(D)** FACS analysis of cells labeled by the amplified-TUNEL procedure (as in Fig. 1D). Selected cells (M) were analyzed 8h after replating in drug-containing medium (+8hNoc) or in drug-free medium (+8h-Noc).

**Figure 3.** Protein analysis following treatment of CHEF cells with nocodazole (200nM) or  $\gamma$ -rays (7Gy). **(A-C)**: Analysis of p53, p53 phosphorylated on serine 15 (p53s15), p21, cyclin D1 (cyD1) and pRb (pRb: hypo-phosphorylated, ppRb: hyperphosphorylated forms). c: untreated exponentially growing cells, cf: untreated confluent cells arrested in G0, M: mitotic cells selected after 8h of growth in nocodazole. Cells were analyzed at the indicated times (in hours) following replating of selected M cells. **(A)** Left: exponentially growing cells treated with  $\gamma$ -rays. Right: M cells replated in nocodazole-containing medium. **(B)** Selected M cells were irradiated before replating in drug-containing medium. **(C)** Protein analysis of selected M cells replated in drug-free medium. **(D)** Immunocytochemical analysis of CHEF cells with tubulin-specific antibody. a: untreated cells; b: cells grown for 24h with nocodazole. c: cells treated for 24h were washed with drug-free medium and immediately analyzed.

**Figure 4.** Breakage occurs in human cells grown in the presence of 200nM nocodazole. **(A)** FACS analysis of MRC-5 cell populations treated for the indicated period of time (hours). Mitotic index is quoted within boxes. 2C, 4C: as in Figure 1. Protein analysis as in Figure 3. **(B)** Microscopic visualization of  $\gamma$ -H2AX foci (staining as in Fig. 1E). a: control cells, b: cells irradiated with  $\gamma$ -rays (7Gy) 1h before analysis, c and d: selected mitotic cells replated for 7h in the presence of the drugs (c) or in drug-free medium (d). **LoVo** and **HCT116**: as MRC-5 (A).

**Figure 5.** Chromosome breakage in HCT116 cells treated with 200nM nocodazole depends on BubR1 but not on Mad2. NT: non-transfected cells, NS: cells transfected with a control

oligonucleotide, B1, B2, M1, M2: cells transfected with oligonucleotides silencing respectively BubR1 or Mad2. **(A and B)**: Level of BubR1 and Mad2 proteins in non-transfected cells and cells transfected with the indicated oligonucleotide **(A)** cells transfected once with B1 or M1 and analyzed at different times (in hours) following transfection. **(B)** NT cells, or cells transfected twice with M1, B1 or B2 were grown in nocodazole (Noc) for the indicated period of time before analysis. Nocodazole was added 24h after the second transfection, when BubR1 and Mad2 were undetectable. **(C)** The mitotic index of cell populations transfected as indicated and grown in nocodazole (time points: as in B). The mean and standard deviation of three independent experiments are shown for each graph. **(D)**  $\gamma$ -H2AX foci (staining: as in Fig. 1E). c: untreated control cells, NT, M1, B1: cells transfected as indicated were grown for 24h in nocodazole. **(E)** Effect of BubR1 and Mad2 silencing on the percentage of cells presenting  $\gamma$ -H2AX foci after the indicated time of growth in the presence of nocodazole. The mean and standard deviation of three independent experiments are shown. **(F)** Levels of p21 and p53 in cells transfected as indicated and incubated for different period of time with nocodazole (in hours).



## Legends to Supplementary Figures

**Figure S1:** The behavior of Chinese hamster embryonic fibroblast (CHEF) cells in nocodazole and dihydroxy-cytochalasine B (DCB). **(A)** Percentages of CHEF cells with the indicated DNA content following 10h of growth in increasing nocodazole concentrations. DNA content: 2C (diploid cells in G1),  $2C < S < 4C$  (diploid cells in S), 4C (diploid cells in G2 and mitosis, and tetraploid cells in G1). **(B)** Microscopic visualization of  $\gamma$ -H2AX foci (as in Fig. 1E) in GMA32 cells (a-c) and CHEF cells (d-e) treated with 10 $\mu$ M DCB. (a) and (d): untreated cells, (b): 12h of treatment, (c): 24h, (e): 16h. (f) Positive control: CHEF cells irradiated with  $\gamma$ -rays (7Gy).

**Figure S2:** Percentages of human cells with the indicated DNA content following 10h of growth in increasing nocodazole concentrations. DNA content (as in Fig. S1). **(A)** MRC-5 cells. **(B)** HCT116 cells.

Figure 1

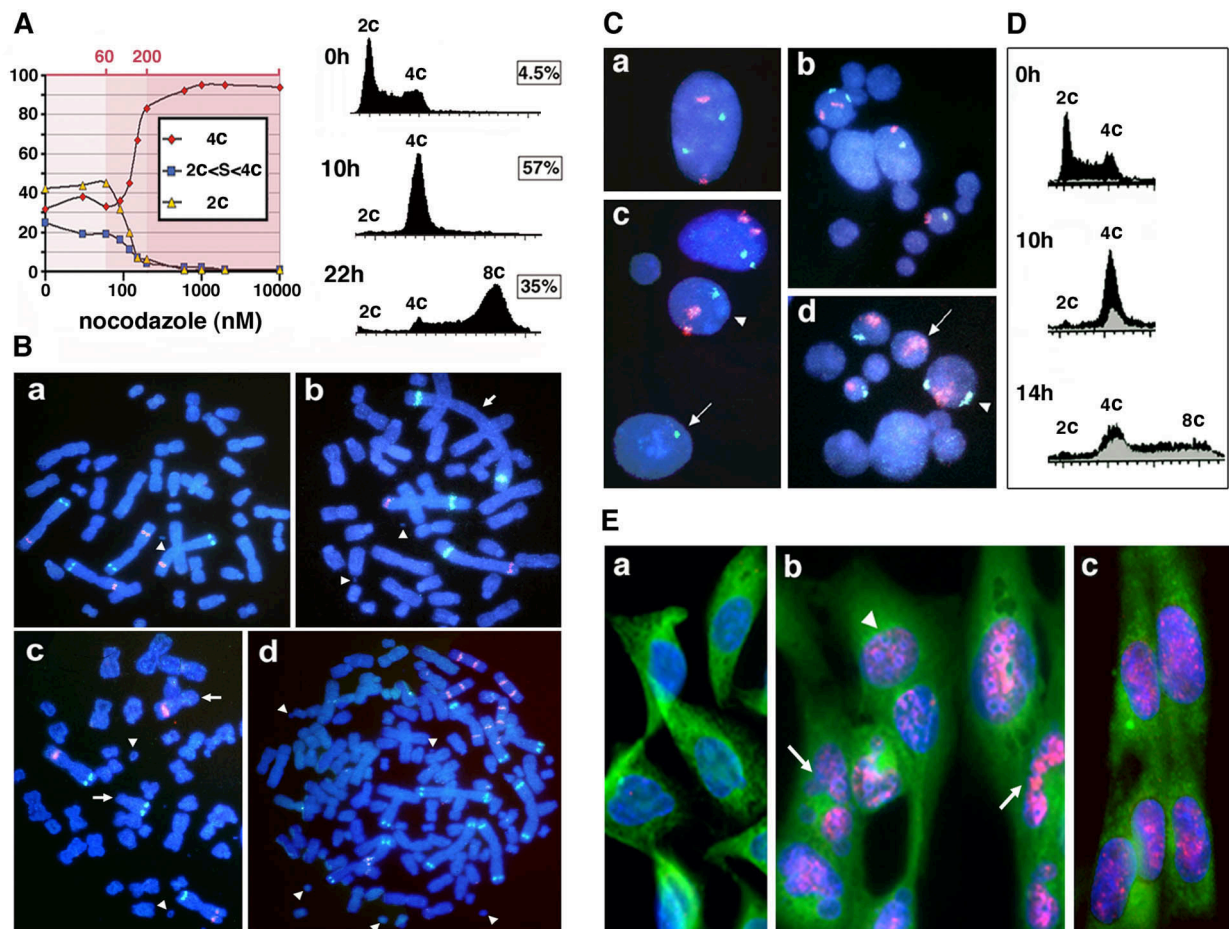


Figure 2

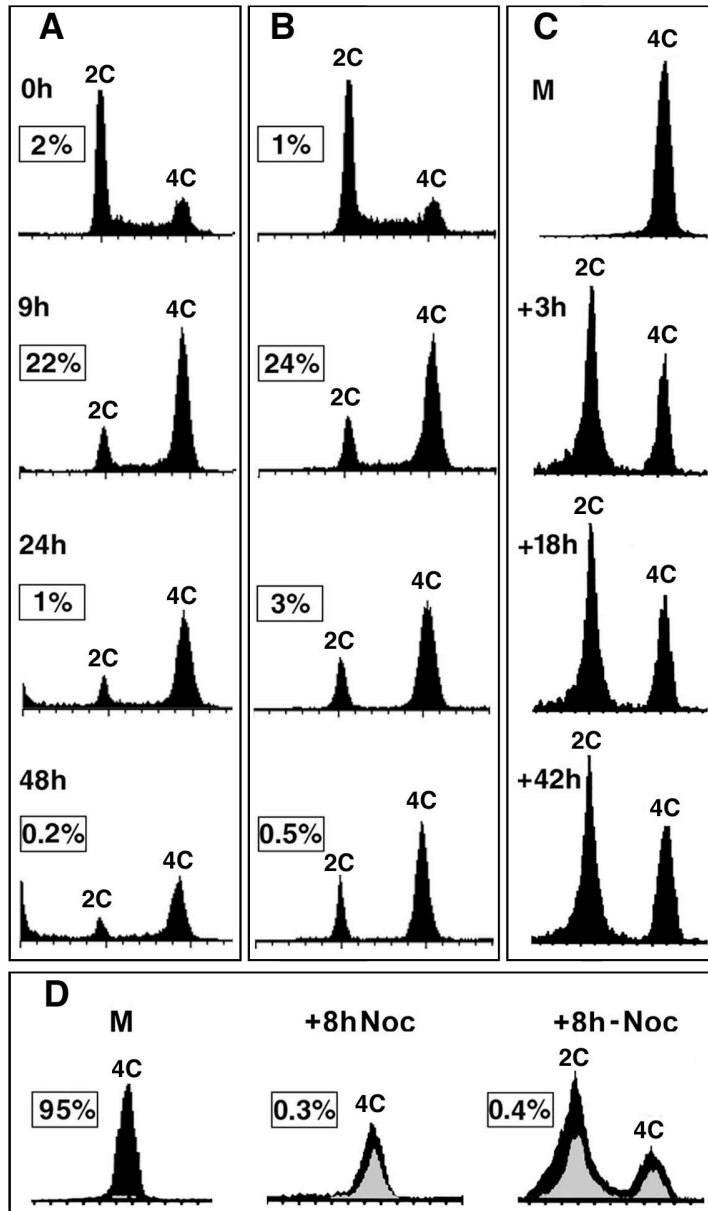


Figure 3

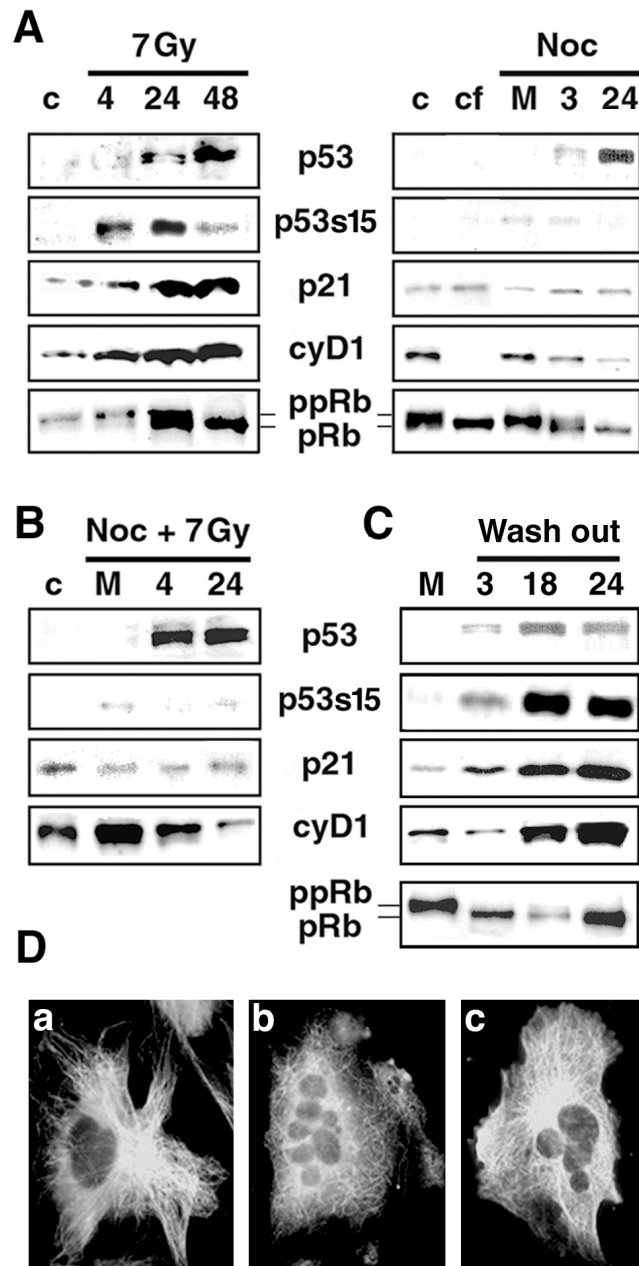


Figure 4

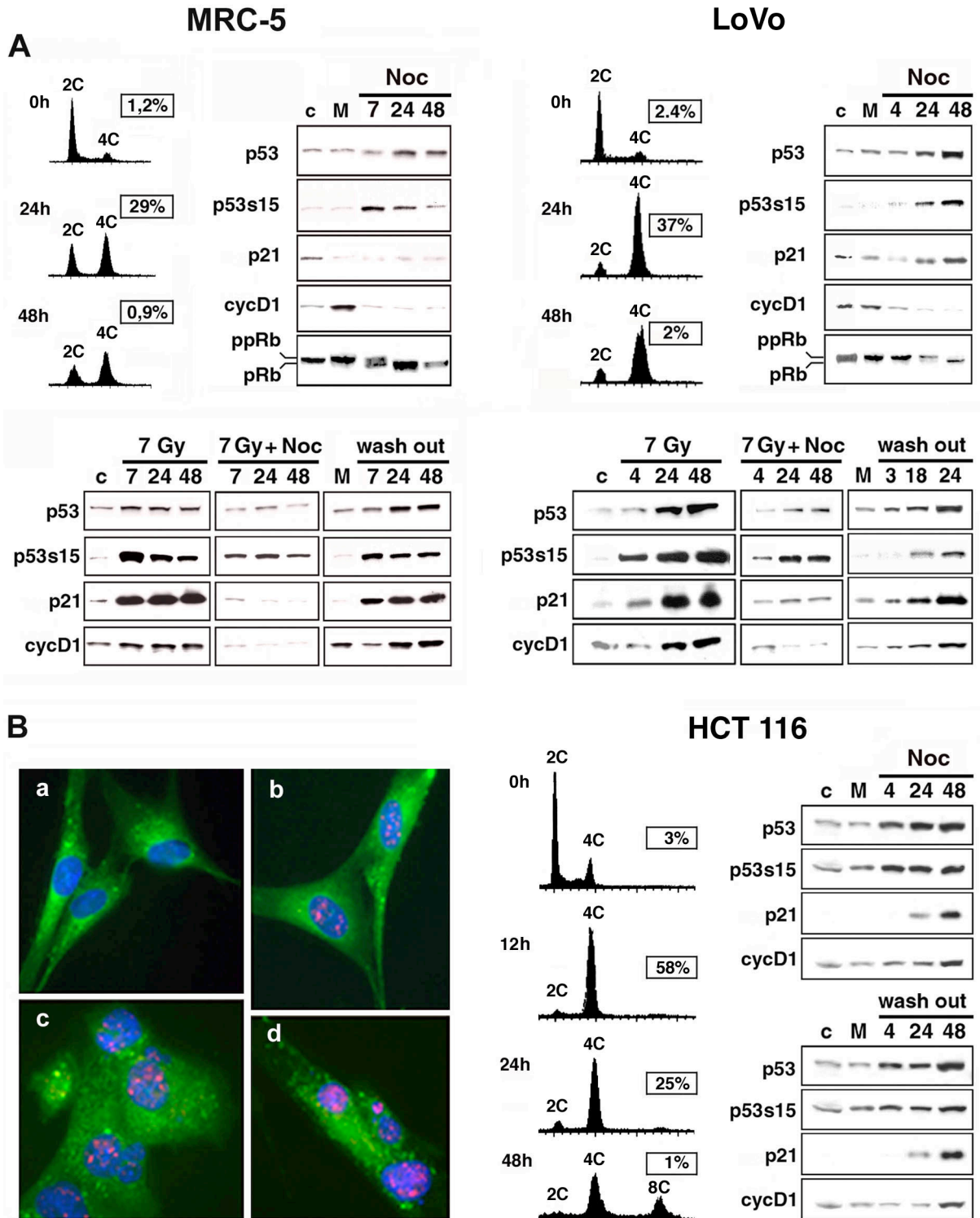


Figure 5

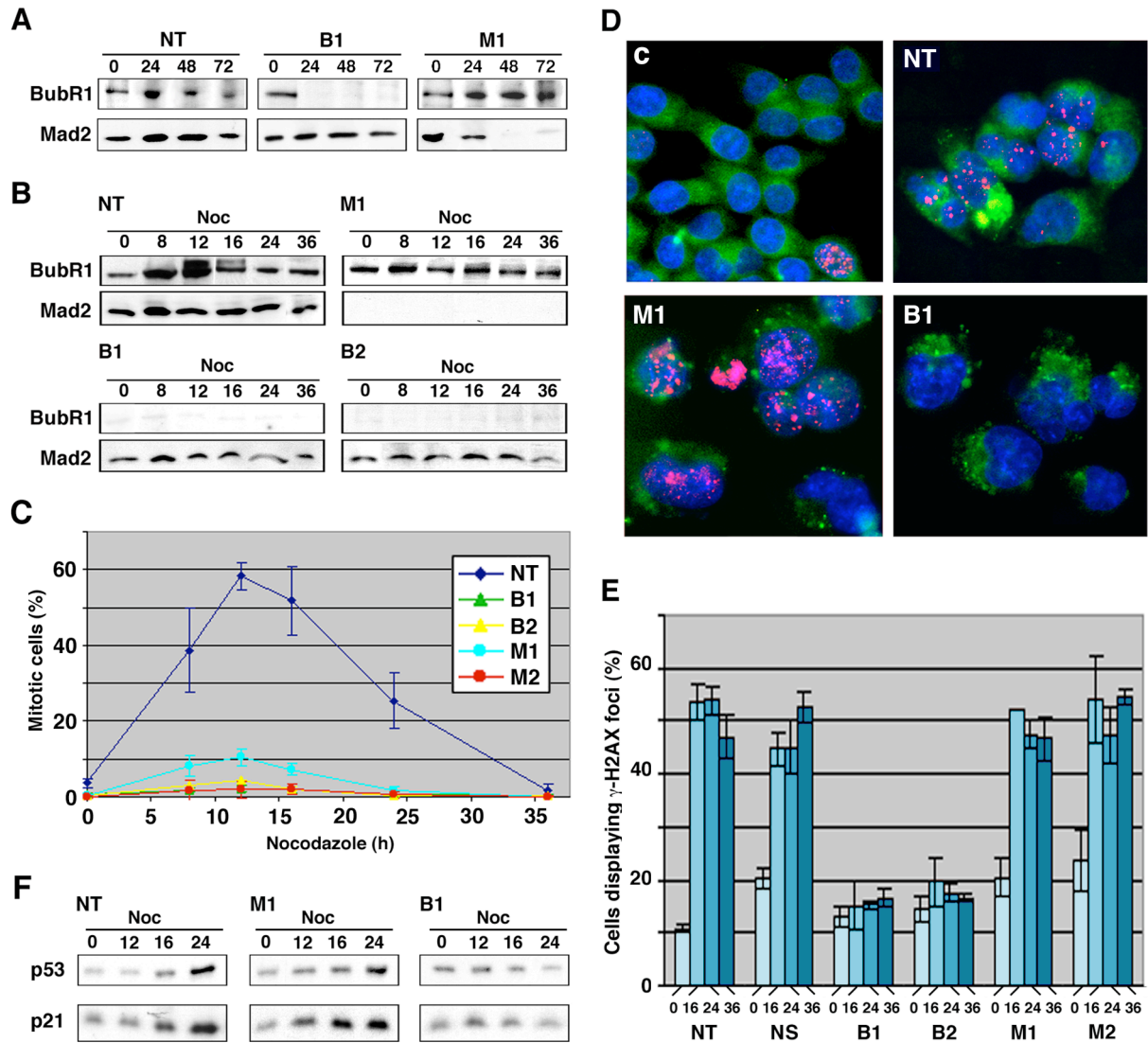


Figure S1

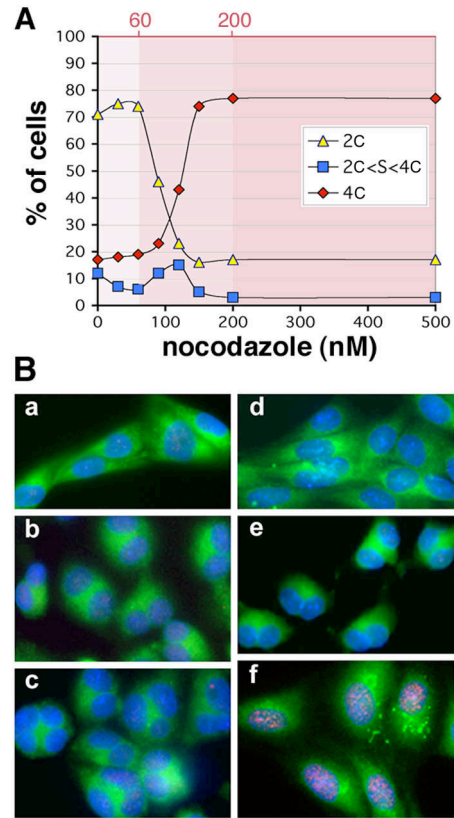
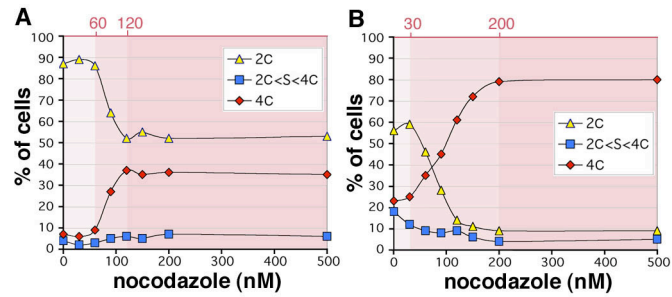


Figure S2



## **Discussion**



## **A) Rôle des sites fragiles dans l'instabilité chromosomique : progression tumorale et maladies génétiques héréditaires.**

Jusque récemment, la fragilité des sites rares était associée à des maladies génétiques héréditaires (Introduction I-2a,d) et celle des sites communs associée à la progression tumorale (Introduction I-5). Les données accumulées par le clonage des SFAs et par les travaux présentés dans cette thèse sont en accord avec cette hypothèse d'une relation entre SFCs et réarrangements récurrents dans les cancers. En effet, dans des cancers variés, de grandes délétions et des pertes d'hétérozygotie ont été observées au niveau des sites clonés (FRA3B, FRA16D, FRA6F, FRA9E, FRA7G, FRA6E) (pour revue (Arlt et al., 2003; Huebner and Croce, 2001)). Ce type d'évènements a également été observé pour le site humain FRA4F (4q22), cloné au cours de ce travail (Rozier et al., 2004). En effet, des délétions de cette région ont été décrites dans les cancers de l'œsophage (Rumpel et al., 1999). Dans de nombreux hépatocarcinomes, des délétions affectant le bras long du chromosome 4 ont été observées (Laurent-Puig et al., 2001; Nagai et al., 1997; Sy et al., 2004; Wong et al., 2000; Yeh et al., 1996). L'analyse de 36 tumeurs primaires du foie par LOH a permis d'identifier 3 régions minimales de délétion communes à toutes ces tumeurs, l'une d'elles étant centrée sur le site FRA4F (Bluteau et al., 2002). Il semble donc probable que FRA4F soit impliqué dans l'instabilité de la région 4q22 et qu'un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la tumorigénèse du foie soit présent dans cette région. Cependant, la recherche de mutation dans 25% des gènes de la région (7 sur environ 30 candidats possibles) n'a pas encore permis de l'identifier (Bluteau et al., 2002).

Le rôle des SFCs dans l'amplification génique a d'abord été démontré dans les systèmes modèles de cellules en culture, lors de la formation des HSRs par cycle de CFP. Comme indiqué précédemment, l'activation d'un site distal déclenche le processus et un site proximal contribue à résoudre le pont formé en anaphase aux stades précoces du processus (Coquelle et al., 1997). Aux stades plus tardifs, les SFCs participent également à l'interconversion des HSRs en dmns et des dmns en HSRs (Coquelle et al., 2002; Coquelle et al., 1998). Dans les cellules tumorales, la signature des cycles de CFP a été trouvée dans de nombreux cas (Ballif et al., 2004a; Gisselsson et al., 2000; Lo et al., 2002; Saunders et al., 2000; Shuster et al., 2000), mais la nature de l'événement qui déclenche le processus est encore mal comprise. En effet, aux stades où les cellules des tumeurs sont étudiées, de nombreux réarrangements secondaires ont généralement remanié les structures formées aux étapes précoces, masquant la trace de l'événement initiateur. En collaboration avec l'équipe

de D. Piattier-Tonneau, nous avons étudié les limites de la duplication du gène *PIP* dans la lignée de cancer du sein T47D (Ciullo et al., 2002). Nos résultats montrent que cette duplication a été initiée au niveau de FRA7I et suggèrent que la re-capture du fragment distal du chromosome a figé le processus après un cycle unique (modèle présenté dans la figure 6 de l'article 3). Cette hypothèse a été renforcée par les résultats d'études récentes sur les délétions terminales des chromosomes, montrant que la capture d'un télomère constitue un mécanisme assez fréquent de cicatrisation des cassures chromosomiques (Ballif et al., 2004a; Ballif et al., 2004b). L'équipe de B. Kerem a étudié la structure des amplicons portant l'oncogène *MET* dans un cancer gastrique et a trouvé la signature des cycles de CFP (Hellman et al., 2002). La localisation de l'événement initiateur est inconnue dans ce cas, par contre, la cassure qui résout le pont en anaphase à chaque cycle serait survenue de façon récurrente au niveau du site FRA7G (Hellman et al., 2002). Enfin, le gène *ABCG2* (MXR/BCRP), situé en 4q22, est impliqué dans la résistance de certaines cellules tumorales aux traitements par le mitoxantrone, le MTX et les dérivés de la camptothécine, notamment dans les cancers du sein (Doyle and Ross, 2003). Ce gène, situé à quelques mégabases de FRA4F vers le centromère, est très amplifié dans plusieurs lignées de cancers du sein (Knutsen et al., 2000). Les réarrangements conduisant à ces amplifications sont en général très complexes (Knutsen et al., 2000) mais une partie d'entre eux pourrait résulter de l'expression de FRA4F. Un nombre croissant d'observations vient donc confirmer le rôle des SFCs dans l'amplification des oncogènes sélectionnée *in vivo*. De plus, une étude a montré qu'une des bornes des amplicons trouvés dans les cellules d'une tumeur est précisément localisée au niveau du site fragile rare FRA11A (Perucca-Lostanlen et al., 1997), suggérant que les sites rares pourraient aussi contribuer à l'instabilité somatique.

Le clonage de nombreux SFCs et leur localisation au niveau moléculaire permettent maintenant de penser que l'expression de ce type de sites dans la lignée germinale pourrait conduire au développement de certaines maladies génétiques héréditaires. Nous avons montré que le gène *grid2*, dans lequel des mutants spontanés apparaissent à haute fréquence chez la souris, est localisé dans la région *Fra6C1*, homologue murin de FRA4F. Plus précisément, une région préférentielle de cassure de ce SFA coïncide avec la localisation des délétions germinales trouvées dans différents mutants spontanés (allèles hotfoot, tapdancer) ou induits (insertion aléatoire de transgène) de *grid2*. La présence de *Fra6C1* pourrait expliquer la fréquence élevée de mutants observés à ce locus. Cette région étant très conservée chez l'homme, nous avons cherché à savoir si des réarrangements de cette région avaient été décrits dans la littérature. Nous avons trouvé un cas de délétion constitutive de la région 4q21-4q22

chez un enfant ayant développé un hépatoblastome (Terada et al., 2001). De plus, chez 11 patients présentant un syndrome de croissance anormale du système nerveux central, des analyses cytogénétiques ont mis en évidence des délétions englobant la région 4q22 (Nowaczyk et al., 1997). Les limites de certaines d'entre elles semblent coïncider avec la localisation de FRA4F, suggérant que ces mutations pourraient résulter de l'expression de ce site. Enfin, des trisomies partielles du chromosome 4q sont quelquefois observées et dans 3 des 8 cas répertoriés, une des bornes de la région réarrangée est située en 4q22 (Zollino et al., 1995). Un autre locus murin nous a intéressé, dont les mutants présentent le phénotype "dominant white spotting". Ces mutants apparaissent à haute fréquence dans les élevages et 30% des mutations caractérisées au niveau moléculaire résultent de réarrangements, principalement des délétions. Nous avons montré que, comme *grid2*, ce gène est localisé dans un SFC, *Fra5E1*, orthologue du site humain FRA4B. Le gène *PARKIN* humain, dont certaines délétions sont impliquées dans la forme juvénile de la maladie de parkinson, est inclus dans FRA6E (Denison et al., 2003a; Denison et al., 2003b). Il a également été montré qu'une translocation t(5;16)(p15.3;q23.2) impliquant une cassure germinale dans FRA16D conduit à la dérégulation de l'oncogène *c-MAF* (situé à environ 1 Mb du site) et notamment au développement d'une forme juvénile de cataracte chez les individus porteurs du réarrangement sur l'un de leur chromosome (Jamieson et al., 2002). Enfin, Ballif et collaborateurs ont étudié des délétions terminales du chromosome 1p, s'étendant sur plusieurs mégabases et impliquées dans un syndrome de retard mental (probablement causé par l'haplo-insuffisance de certains gènes de cette région). L'analyse moléculaire de deux de ces délétions a révélé qu'elles sont associées à une duplication inversée initiée en 1p36 (Ballif et al., 2003). Ces caractéristiques suggèrent l'intervention de CFP, puisqu'elles rappellent les observations initiales de Barbara McClintock sur les délétions terminales chez le maïs (McClintock, 1951). Ballif et collègues ont proposé un modèle selon lequel une cassure chromosomique, suivie d'au moins un cycle de CFP, aurait eu lieu dans la lignée germinale avant méiose, conduisant à la production de gamètes portant un chromosome réarrangé (Ballif et al., 2004b; Ballif et al., 2003). Il est intéressant de noter qu'un SFA (FRA1A) a été décrit en 1p36, qui pourrait être impliqué dans le déclenchement de ces événements, mais il faudra attendre le clonage de ce site pour confirmer cette hypothèse. L'ensemble de ces travaux indique que la fragilité des SFC n'est pas restreinte aux cellules somatiques et que leur activation dans la lignée germinale peut conduire à des maladies héréditaires à transmission mendélienne. Puisque certains sites rares pourraient être à l'origine de remaniements dans les cancers, il semble donc que les deux types de sites contribuent à l'apparition de mutations somatiques ou germinales. Ceci est en

accord avec le fait que dans deux cas au moins, les allèles normaux des sites rares FRA16B et FRA10B coïncident avec les sites communs FRA16C et FRA10E, indiquant que les mécanismes moléculaires responsables des cassures pourraient, du moins dans certains cas, être commun aux deux types de sites (Zlotorynski et al., 2003).

## **B) Rôle de l'hypoxie dans l'activation des SFCs *in vivo* : un inducteur physiologique ?**

Les SFCs peuvent être activés *in vitro* par de nombreux stress qui perturbent la réplication (Aphidicoline, BrdU, MTX...) mais leur mode d'activation *in vivo* reste plus débattu. Dans certains cas, la présence de molécules capables de les induire dans l'environnement (fumée de cigarette, amiante...) ou lors de traitements par chimiothérapie (Yunis et al., 1987) pourrait expliquer l'activation de ces SFCs *in vivo*. Cependant, dans d'autres cas, les causes de cette activation restent incomprises.

L'hypoxie est un paramètre important du microenvironnement des tumeurs solides qui résulte d'un développement vasculaire insuffisant ou anormal. En effet, la quantité d'oxygène délivrée aux cellules dépend de la distance les séparant des vaisseaux sanguins. De plus, l'ouverture (ou la fermeture) de nouveaux vaisseaux produit une alternance de périodes d'hypoxie et de réoxygénation dans les tumeurs (Hammond et al., 2004). Parce que l'hypoxie est un activateur physiologique de p53, elle favorise l'expansion des cellules déficientes pour ce suppresseur de tumeur au cours du développement tumoral (Graeber et al., 1996; Koumenis et al., 2001).

Dans les systèmes modèles, il a été montré que l'hypoxie induit les phénomènes d'amplification génique. En effet, lorsque des cellules CHO (hamster chinois) sont carencées en oxygène avant sélection par le MTX, la fréquence de mutants résistants à cet agent par amplification du gène *dhfr* augmente notablement (Rice et al., 1986). Dans le laboratoire, il a été établi que l'hypoxie active les SFCs (Coquelle et al., 1998) et de ce fait contribue au déclenchement des cycles de CFP puis à la résolution des ponts anaphasiques formés aux stades précoces de l'amplification (Coquelle et al., 1997). Ce stress participe également à l'évolution des *dmns* (Coquelle et al., 1998), aux réarrangements secondaires des amplicons et à la formation de remaniements chromosomiques variés (translocations, anneaux, chromosomes dicentriques) (Coquelle et al., 2002; Coquelle et al., 1998). Quelques sites sensibles à l'hypoxie ont été cartographiés cytogénétiquement chez le hamster (Coquelle et al., 1998). Certains semblent colocalisés avec des sites sensibles à l'AP alors que d'autres paraissent spécifiques de ce stress.

Les mécanismes par lesquels l'hypoxie induit des cassures aux sites fragiles commencent à être compris. En effet, des études récentes viennent de montrer que dans des conditions d'hypoxie peu sévères (quelques % d'oxygène), les cellules sont transitoirement bloquées avant l'initiation de la phase S. Une hypoxie sévère (ou anoxie) entraîne un arrêt de réplication dépendant d'ATR, au moins partiellement médié par la kinase CHK1 (une des

cibles d'ATR). L'activation de cette voie de signalisation résulterait de l'apparition d'ADN simple brin lors de la réplication dans ces conditions de stress (Hammond et al., 2002; Hammond et al., 2004). La réoxygénation, quant à elle, provoque un grand nombre de DSB résultant probablement de la formation de ROS (espèce réactive à l'oxygène) qui activent la voie dépendante d'ATM (Hammond and Giaccia, 2004). Pour des raisons pratiques, les périodes d'hypoxie sont obligatoirement suivies de périodes de réoxygénation dans nos expériences et la contribution relative de l'hypoxie et de la réoxygénation dans l'induction des SFCs n'a pu être déterminée. Cependant, le fait que les cellules déficientes pour la voie ATR, mais pas les cellules affectées dans la voie ATM, présentent une instabilité chromosomique accrue au niveau des SFCs (Arlt et al., 2004; Casper et al., 2004; Casper et al., 2002) pourrait suggérer que l'hypoxie plutôt que la réoxygénation engendre des cassures aux niveau des sites sensibles aux perturbations de la réplication, mais cela reste à démontrer.

Chez l'homme, aucun site fragile sensible à l'hypoxie n'a encore été localisé, mais la caractérisation et la cartographie de tels sites seraient particulièrement intéressantes, notamment pour comparer leur localisation à celle des points chauds de remaniements dans les cancers. Si certains sites sont spécifiques de l'hypoxie (ou d'un autre inducteur physiologique encore non identifié), cela pourrait permettre d'expliquer la présence de remaniements récurrents (translocation, amplification) survenant dans des régions où aucun SFC n'a été décrit jusqu'à présent.

### C) Conservation des sites fragiles communs au cours de l'évolution ?

Les sites fragiles sont présents chez toutes les espèces mammifères dans lesquels ils ont été recherchés (Djalali et al., 1987; Elder and Robinson, 1989; Greenbaum et al., 1994; Pires et al., 1998; Riggs et al., 1993; Robinson and Elder, 1987; Ronne, 1992, 1995; Ruiz-Herrera et al., 2004; Ruiz-Herrera et al., 2002; Stone and Stephens, 1993a; Yang and Long, 1993). Avant notre travail, seuls deux SFAs orthologues humains et murins avait été comparés au niveau moléculaire: FRA3B/*Fra14A2* et FRA16D/*Fra8E1* (Glover et al., 1998b; Krummel et al., 2002; Pekarsky et al., 1998). Ces études ont révélé une bonne conservation de l'organisation globale des régions concernées et de la localisation des sites de cassure par rapport à l'emplacement des gènes *FHIT/fhit* et *WWOX/wox1*, respectivement. Il a été également montré que certains des points de cassures dans les cancers et des sites d'intégration virale au niveau de FRA3B correspondent à des régions hautement conservées chez la souris, ce qui laisse supposer la présence d'une structure particulière impliquée dans la fragilité de ces régions (Shiraishi et al., 2001). Au cours de ce travail, un nouveau site humain qui chevauche le gène *GRID2*, FRA4F, et son orthologue murin, *Fra6C1*, ont été localisés et caractérisés au niveau moléculaire. L'organisation des gènes dans les deux régions est très conservée, ainsi que la position relative des zones préférentielles de cassure par rapport à ces gènes (Rozier et al., 2004). Nous avons également confirmé des travaux précédents (Denison et al., 2002) localisant le site FRA4B humain au niveau des gènes *PDGFRA* et *c-KIT*. Nous avons identifié son orthologue, *Fra5E1*, au niveau de ces mêmes gènes chez la souris. Dans tous ces exemples, une bonne conservation de séquence a été trouvée au niveau des sites fragiles orthologues, mais aucun motif particulier (autre que leur richesse en AT) n'a été mis en évidence ni entre les sites d'une même espèce ni entre les sites orthologues. Le développement du séquençage et de la couverture en BAC du génome de souris devrait rendre le clonage de nouveaux sites plus faciles et permettre de vérifier leur conservation.

Pour déterminer si les SFCs ont joué un rôle au cours de l'évolution, ce type d'analyse comparative a été étendu à d'autres génomes de mammifères, notamment à des espèces proches. Certaines de ces études sont basées sur des localisations cytogénétiques des sites par banding et des comparaisons de caryotypes pour identifier les régions homologues (Elder and Robinson, 1989; Ruiz-Herrera et al., 2004; Ruiz-Herrera et al., 2002; Schmid et al., 1985; Smeets and van de Klundert, 1990). Dans les études plus récentes, reposant sur la technique de zoo-FISH, des BACs ou YACs humains ont été utilisés comme sonde sur des métaphases de différentes espèces de singes pour déterminer plus précisément les régions de synténie.

Dans la majorité des cas, les résultats montrent que lorsqu'un SFA est présent dans le génome humain, il est également présent chez le macaque (*M. fascicularis*), le mandrille (*M. sphinx*) ou le capucin (*C. apella*) (Ruiz-Herrera et al., 2004; Ruiz-Herrera et al., 2005a). De plus, ces études suggèrent qu'il existe une corrélation entre la localisation des SFCs et celle des réarrangements chromosomiques survenus au cours l'évolution car certains SFAs humains sont localisés au niveau, ou à proximité, de points de cassure détectés en comparant le caryotype humain à ceux des autres primates (Miro et al., 1987; Ruiz-Herrera et al., 2004; Ruiz-Herrera et al., 2002). Cette hypothèse est en bon accord avec une étude très récente montrant que 89% des bandes chromosomiques humaines qui constituent des frontières de segments chromosomiques ancestraux contiennent des SFC ou des séquences pseudo-télomérique (Ruiz-Herrera et al., 2005b).



## **D) Le point de contrôle G1 tétraploïde après une perturbation de la mitose**

Après une perturbation prolongée de la mitose par un traitement par les poisons du fuseau, de nombreux types de cellules de mammifères sortent de mitose sans se diviser et rentrent dans la phase G1 suivante avec un noyau tétraploïde (contenant 4 équivalents génome : 4C), généralement fragmenté (voir Introduction II-5c). Des cellules tétraploïdes, mais possédant deux noyaux normaux, peuvent apparaître après inhibition de la cytokinèse par les dérivés de la cytochalasine, qui perturbent le réseau d'actine, ou par la blebbistatine, un inhibiteur de la myosine II. De façon plus physiologique, la surexpression d'Aurora-A, d'Aurora-B ou de Plk1 peut également conduire à un échec de la cytokinèse et à la formation de cellules tétraploïdes binucléées (Meraldi et al., 2002). De nombreuses études indépendantes ont montré qu'après ces différents traitements, les cellules normales restent bloquées en phase G1, de façon dépendante de p53 (pour revue (Rieder and Maiato, 2004; Stukenberg, 2004)). L'ensemble de ces résultats a conduit Margolis et collègues à proposer l'existence d'un point de contrôle surveillant la ploïdie des cellules en G1 ("G1 tetraploidy checkpoint") (Andreassen et al., 2001). Ce point de contrôle serait activé par la présence d'un nombre anormal de chromosomes et/ ou de centrosomes dans ces cellules. Il empêcherait les cellules polyploïdes de cycler, bloquant ainsi le développement ultérieur de cellules fortement aneuploïdes.

Cependant des études plus poussées (nos travaux, et (Ciciarello et al., 2001; Stukenberg, 2004; Uetake and Sluder, 2004; Wong and Stearns, 2005)) suggèrent maintenant que la ploïdie n'est pas la cause de l'arrêt. Nous avons montré (article 4) que lorsque des cellules normales humaines ou de rongeurs accumulées en mitose après traitement au nocodazole sont récupérées (sélection mitotique) puis réensemencées en milieu normal, une majorité d'entre-elles sont capables de terminer leur mitose, donnant naissance à deux cellules filles diploïdes. Ces cellules sont cependant arrêtées en G1 dans le cycle suivant le traitement. Nous avons ensuite montré qu'après perturbation mitotique, les cellules diploïdes comme les cellules tétraploïdes présentent des cassures dans l'ADN, qui pourraient expliquer l'arrêt de cellules possédant une voie p53 fonctionnelle. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats d'autres études montrant que l'arrêt des cellules en G1 après exposition à un poison du fuseau présente de nombreuses caractéristiques moléculaires de l'arrêt résultant de dommages dans l'ADN (Jimenez et al., 1999; Lanni and Jacks, 1998; Minn et al., 1996). Ciciarello et al. ont aussi établi qu'un traitement transitoire des cellules de lignées lymphoblastoïdes par des inhibiteurs du fuseau conduit à une activation de p53 et un arrêt en G1, que les cellules soient

diploïdes ou polyploïdes après leur sortie de mitose (Ciciarello et al., 2001). De façon étonnante, nous sommes les seuls à avoir directement cherché, et montré, la présence de cassures dans les cellules traitées par les poisons du fuseau.

Pour ce qui concerne les échecs de cytokinèse, des résultats récents viennent également contredire l'hypothèse du " tétraploïde checkpoint ". Uetake et Sluder ont montré que des cellules tétraploïdes binucléées, obtenues après traitement de fibroblastes possédant une voie p53 fonctionnelle par de faibles concentrations de cytochalasine sont capables de ré-répliquer leur ADN (Uetake and Sluder, 2004). Wong et Stearns ont établi que les cellules issues d'une fusion de fibroblastes primaires humains en G1 cyclent normalement, du moins jusqu'à la mitose suivante (Wong and Stearns, 2005). Toutes ces expériences démontrent que l'arrêt en G1 observé après traitement des cellules par la cytochalasine (Andreassen et al., 2001) n'est dû ni à la polyploïdie, ni au nombre anormal de centrosomes, ni à la présence de deux noyaux par cellule, ni à l'échec de la cytokinèse *per se*. Dans le cas des traitements aux fortes doses de cytochalasine, une perturbation irréversible du réseau d'actine pourrait provoquer des effets secondaires délétères (article 4, (Khan and Wahl, 1998)). De plus, Wong et collègues ont montré que les traitements utilisés dans de nombreux travaux, incluant ceux du groupe de Margolis, pour synchroniser les cellules avant traitement par la cytochalasine induisent des cassures chromosomiques alors que la cytochalasine seule n'en provoque pas (Wong and Stearns, 2005). Nous avons également trouvé (résultats non publiés) que les cellules binucléées obtenues après traitement de cellules non synchronisées par la cytochalasine ne présentent pas de cassures chromosomiques. L'ensemble des données indique que l'arrêt en G1 observé après traitement par les poisons du fuseau ou les inhibiteurs de la cytokinèse résulte de mécanismes différents. Les perturbations mitotiques provoqueraient un arrêt dépendant des cassures alors que le mécanisme de blocage suivant un échec de la cytokinèse reste mal compris. Comme suggéré ci-dessus, dans certains cas au moins, l'arrêt observé après traitement par la cytochalasine pourrait résulter d'artefacts dus à des effets secondaires de la drogue ou aux prétraitements permettant de synchroniser les cellules.

## **E) Conséquences de la perturbation de la mitose : une relation entre l'activation du point de contrôle, les dommages de l'ADN et l'apoptose ?**

Les inhibiteurs du fuseau mitotique (nocodazole, colchicine, vinblastine..) ne sont pas considérés comme des agents clastogènes, ils sont en particulier négatifs par les tests Ames (tests de mutagénèse chez les bactéries). Nos expériences montrent cependant qu'ils entraînent l'apparition de cassures chromosomiques, indépendamment de la dose utilisée, dans les cellules en G1 après une perturbation prolongée de la mitose. La présence de ces cassures pourrait provoquer l'arrêt observé en G1 et finalement la mort des cellules normales. Dans les organismes multicellulaires, les cellules ont développé des réponses spécifiques permettant la réparation des lésions. Cependant, dans certains cas, la cellule répond à la présence de cassure par le déclenchement d'un programme de mort cellulaire. Le mécanisme qui sous-tend ce choix, réparation ou mort cellulaire, n'est pas encore bien compris. Il pourrait dépendre du niveau d'endommagement du génome, du fait que les lésions sont ou ne sont pas réparables et de la qualité de la machinerie de réparation.

Nous avons montré qu'après un traitement bref par les poisons du fuseau, une très faible fraction des cellules présente des cassures. Cette proportion augmente progressivement avec la durée du traitement, indiquant que le temps pendant lequel la mitose est bloquée joue un rôle déterminant dans ce processus. Nous avons émis l'hypothèse que la perturbation prolongée du réseau de microtubules et donc l'activation prolongée du point de contrôle de mitose, déclenche une signalisation de stress conduisant à la formation des cassures.

Nous avons montré que l'induction de ces cassures par les poisons du fuseau est dépendante de BubR1, mais pas de Mad2, indiquant un rôle spécifique de la kinase BubR1 dans cette signalisation. Ceci est en accord avec les résultats de Shin et collègues montrant que la surexpression de BubR1 mais pas celle de Mad2, Mad1 ou Bub3 induit une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans les cellules HeLa devenues hyperploïdes en présence de nocodazole (Shin et al., 2003). Il a par ailleurs été montré dans des cellules HL-60 (lignée de cellules leucémiques) que le déclenchement de l'apoptose par activation des caspases ne survient qu'après un arrêt prolongé en mitose et qu'il peut être bloqué par la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Gajate et al., 2000). En bon accord avec les résultats précédents, les populations cellulaires rendues déficientes pour BubR1 par ARN interférence ou par expression d'un mutant dominant négatif présentent un nombre réduit de cellules apoptotiques et une augmentation des cellules polyploïdes après traitement nocodazole (Baek et al., 2003; Shin et al., 2003).

L'expression de BubR1 à un niveau physiologique n'induisant pas l'apoptose lorsque le point de contrôle est activé transitoirement (dans les conditions normales de son fonctionnement), son action pro-apoptotique est très probablement régulée. Il a été proposé que la survivine, un inhibiteur de la caspase-9 colocalisée au kinétichore avec BubR1 en mitose, contribue à cette régulation (Shin et al., 2003). Par ailleurs, nous avons détecté des cassures après traitement par le nocodazole dans les cellules invalidées pour Mad2, bien que celles-ci échappent rapidement au blocage de mitose, ce qui suggère que Mad2 (directement ou non) exercerait un effet protecteur par rapport au déclenchement des cassures dans les mitoses normales.

D'autre part, nous avons observé qu'outre les agents qui dépolymérisent le fuseau, ceux qui affectent leur dynamique, comme le taxol, induisent également des cassures après une perturbation prolongée de la mitose. Il serait intéressant de déterminer si ces cassures sont déclenchées par la même voie et impliquent les mêmes protéines que dans le cas du nocodazole. La compréhension de l'effet inducteur de BubR1 dans le déclenchement des cassures, du rôle protecteur de la survivine et de Mad2, ainsi que des relations entre ces cassures et le déclenchement de l'apoptose nécessitera de poursuivre ce travail.

## **F) Relation entre les cassures survenues après traitement prolongé par les poisons du fuseau et les sites fragiles ?**

Nous avons démontré la présence de cassures en phase G1 dans les cellules après une perturbation prolongée de leur mitose par des traitements par les poisons du fuseau mitotique. Nous avons établi que ces cassures surviennent dans une fenêtre de temps comprise entre la fin de la mitose et la phase G1 suivante mais nous ne savons pour l'instant rien de leur localisation dans le génome. En effet, les cellules normales arrêtent de cycler bien avant d'atteindre la mitose suivante ce qui rend impossible leur par les techniques cytogénétiques classiques. Dans les cellules permissives pour la re-réplication, où les métaphases tétraploïdes peuvent être obtenues, des remaniements chromosomiques plutôt que des cassures ont été observés. Ces remaniements sont vraisemblablement la conséquence, les traces des cassures survenues en interphase qui ont été mal réparées, les cassures correctement réparées ne sont plus visibles. Deux hypothèses sont possibles quant à la localisation des cassures dans le génome : 1) ces cassures surviennent de façon aléatoire, 2) ces cassures surviennent au niveau de sites récurrents sensibles aux perturbations mitotiques. Pour tester ces hypothèses, la détermination cytogénétique de la localisation des cassures en G1 après traitement au nocodazole ou avec les autres inhibiteurs des microtubules est nécessaire. Elle est actuellement en cours au laboratoire. Ces expériences nécessitent de pouvoir condenser précocement les chromosomes. La condensation prématurée des chromosomes (PCC) était auparavant réalisée par fusion de cellules en mitose et de cellule en interphase mais les rendements des expériences étaient très faibles. Depuis, des méthodes chimiques de PCC sont disponibles et notamment l'utilisation de la calyculine A, un inhibiteur spécifique des phosphatases serine/thréonine de type 1 et 2A, qui permet de condenser les chromosomes quelle que soit la phase du cycle dans laquelle la cellule se trouve (Alsbeih and Raaphorst, 1999). Si les chromosomes condensés en G2 sont semblables aux chromosomes métaphasiques, les chromosomes des cellules en G1 sont monochromatidiens et sont beaucoup plus difficiles à reconnaître. L'utilisation de peinture chromosomique devrait permettre de faciliter leur identification et de tester la présence ou non de cassures récurrentes. Il nous faudra aussi vérifier qu'un traitement prolongé au nocodazole ne perturbe pas l'action de la calyculine A. Dans le cas où les cassures induites par les poisons du fuseau seraient récurrentes, il serait ensuite intéressant 1) de comparer leur localisation après traitement par différentes drogues (nocodazole, vinblastine, taxol ...), 2) de les comparer à celle connue des SFC sensibles à l'aphidicoline pour essayer de comprendre leur mécanisme de formation.

## **G) Contrôle de la mitose et progression tumorale**

Les anomalies chromosomiques sont l'une des caractéristiques les plus anciennement reconnues des cellules cancéreuses. Certaines cellules tumorales présentent principalement des variations du nombre des chromosomes (gain ou perte) alors que d'autres présentent des caryotypes très remaniés associant anomalies de nombre et de structure (Dutrillaux, 1995; Lengauer et al., 1998). Il est généralement admis que les anomalies de nombre proviennent d'une mauvaise ségrégation des chromosomes, pouvant résulter de déficiences du point de contrôle du fuseau mitotique, d'un problème de séparation des chromosomes ou de cytokinèse (pour revue (Gisselsson, 2003)). Les anomalies de structure seraient, quant à elles, associées à des réparations inexactes des DSB et donc favorisées par des défauts des points de contrôle des dommages ou des systèmes de réparations des cassures (pour revue (Masuda and Takahashi, 2002)).

De nombreux réarrangements chromosomiques ont été observés après un glissement mitotique dans les cellules permissives pour la re-réplication (Aardema et al., 1998). Nous avons montré que le point de contrôle du fuseau couple les problèmes de mitose à la réponse des dommages de l'ADN et pourrait contribuer à l'apparition de l'instabilité observée dans les cellules cancéreuses. Ce couplage arrête les cellules normales avant leur entrée en phase S du cycle tétraploïde. Par contre, les cellules de nombreuses lignées immortalisées et des tumeurs continuent de cycler et deviennent rapidement aneuploïdes (plusieurs centrosomes présents dans la cellule pouvant conduire à la formation d'un fuseau multipolaire à la mitose suivante), et acquièrent en même temps des réarrangements structuraux de leurs chromosomes. Dans des cellules tumorales permissives pour la re-réplication et ayant conservé une protéine BubR1 fonctionnelle, l'activation prolongée du point de contrôle du fuseau *in vivo* pourrait conduire après glissement à la formation en un seul cycle de cellules présentant à la fois des anomalies de nombre et de structure des chromosomes. Certaines de ces cellules pouvant ainsi acquérir des anomalies génétiques favorisant leur évolution vers des stades plus agressifs.

## **Bibliographie**

- Aardema, M. J., Albertini, S., Arni, P., Henderson, L. M., Kirsch-Volders, M., Mackay, J. M., Sarrif, A. M., Stringer, D. A., and Taalman, R. D. (1998). Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutat Res* 410, 3-79.
- Abrieu, A., Kahana, J. A., Wood, K. W., and Cleveland, D. W. (2000). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* 102, 817-826.
- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J. A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D. W., and Labbe, J. C. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 106, 83-93.
- Acquaviva, C., Herzog, F., Kraft, C., and Pines, J. (2004). The anaphase promoting complex/cyclosome is recruited to centromeres by the spindle assembly checkpoint. *Nat Cell Biol* 6, 892-898.
- Alsbeih, G., and Raaphorst, G. P. (1999). Differential induction of premature chromosome condensation by calyculin A in human fibroblast and tumor cell lines. *Anticancer Res* 19, 903-908.
- Amor, D. J., Kalitsis, P., Sumer, H., and Choo, K. H. (2004). Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol* 14, 359-368.
- Andreassen, P. R., Lohez, O. D., Lacroix, F. B., and Margolis, R. L. (2001). Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell* 12, 1315-1328.
- Andreassen, P. R., Lohez, O. D., and Margolis, R. L. (2003). G2 and spindle assembly checkpoint adaptation, and tetraploidy arrest: implications for intrinsic and chemically induced genomic instability. *Mutat Res* 532, 245-253.
- Andrews, P. D., Knatko, E., Moore, W. J., and Swedlow, J. R. (2003). Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr Opin Cell Biol* 15, 672-683.
- Andrews, P. D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L., and Swedlow, J. R. (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell* 6, 253-268.
- Aqeilan, R. I., Kuroki, T., Pekarsky, Y., Albagha, O., Trapasso, F., Baffa, R., Huebner, K., Edmonds, P., and Croce, C. M. (2004). Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 3053-3058.
- Arlt, M. F., Casper, A. M., and Glover, T. W. (2003). Common fragile sites. *Cytogenet Genome Res* 100, 92-100.
- Arlt, M. F., Miller, D. E., Beer, D. G., and Glover, T. W. (2002). Molecular characterization of FRAXB and comparative common fragile site instability in cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 82-92.
- Arlt, M. F., Xu, B., Durkin, S. G., Casper, A. M., Kastan, M. B., and Glover, T. W. (2004). BRCA1 is required for common-fragile-site stability via its G2/M checkpoint function. *Mol Cell Biol* 24, 6701-6709.
- Austin, M. J., Collins, J. M., Corey, L. A., Nance, W. E., Neale, M. C., Schieken, R. M., and Brown, J. A. (1992). Aphidicolin-inducible common fragile-site expression: results from a population survey of twins. *Am J Hum Genet* 50, 76-83.
- Autiero, M., Camarca, A., Ciullo, M., Debily, M. A., El Marhomy, S., Pasquinelli, R., Capasso, I., D'Aiuto, G., Anzisi, A. M., Piatier-Tonneau, D., and Guardiola, J. (2002). Intragenic amplification and formation of extrachromosomal small circular DNA molecules from the PIP gene on chromosome 7 in primary breast carcinomas. *Int J Cancer* 99, 370-377.
- Autiero, M., Cammarota, G., Friedlein, A., Zulauf, M., Chiappetta, G., Dragone, V., and Guardiola, J. (1995). A 17-kDa CD4-binding glycoprotein present in human seminal plasma and in breast tumor cells. *Eur J Immunol* 25, 1461-1464.
- Autiero, M., Culerrier, R., Bouchier, C., Basmaciogullari, S., Gaubin, M., El Marhomy, S., Blanchet, P., Paradis, V., Jardin, A., Guardiola, J., and Piatier-Tonneau, D. (1999). Abnormal restriction pattern of PIP gene associated with human primary prostate cancers. *DNA Cell Biol* 18, 481-487.
- Babu, J. R., Jeganathan, K. B., Baker, D. J., Wu, X., Kang-Decker, N., and van Deursen, J. M. (2003). Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *J Cell Biol* 160, 341-353.
- Baek, K. H., Shin, H. J., Yoo, J. K., Cho, J. H., Choi, Y. H., Sung, Y. C., McKeon, F., and Lee, C. W. (2003). p53 deficiency and defective mitotic checkpoint in proliferating T lymphocytes increase chromosomal instability through aberrant exit from mitotic arrest. *J Leukoc Biol* 73, 850-861.



- Bajer, A., and Molè-Bajer, J. (1956). Ciné-micrographic studies on mitosis in endosperm II. Chromosome, cytoplasm and brownian movements. *Chromosoma* 7, 558-607.
- Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R. B., de Groen, P. C., Roche, P., and van Deursen, J. M. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet* 36, 744-749.
- Baker, E., and Sutherland, G. R. (1991). A new folate sensitive fragile site at 1p21.3. *Journal of Medical Genetics* 28, 356-357.
- Balaban-Mallenbaum, G., Grove, G., and Gilbert, F. W. (1981). The proposed origin of double minutes from homogeneously staining regions (HSR)-marker chromosomes in human neuroblastoma hybrid cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2, 339-348.
- Balakumaran, B. S., Freudenreich, C. H., and Zakian, V. A. (2000). CGG/CCG repeats exhibit orientation-dependent instability and orientation-independent fragility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* 9, 93-100.
- Ballif, B. C., Gajecka, M., and Shaffer, L. G. (2004a). Monosomy 1p36 breakpoints indicate repetitive DNA sequence elements may be involved in generating and/or stabilizing some terminal deletions. *Chromosome Res* 12, 133-141.
- Ballif, B. C., Wakui, K., Gajecka, M., and Shaffer, L. G. (2004b). Translocation breakpoint mapping and sequence analysis in three monosomy 1p36 subjects with der(1)t(1;1)(p36;q44) suggest mechanisms for telomere capture in stabilizing de novo terminal rearrangements. *Hum Genet* 114, 198-206.
- Ballif, B. C., Yu, W., Shaw, C. A., Kashork, C. D., and Shaffer, L. G. (2003). Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions. *Hum Mol Genet* 12, 2153-2165.
- Ban, S., Cologne, J. B., and Neriishi, K. (1995). Effect of radiation and cigarette smoking on expression of FUDR-inducible common fragile sites in human peripheral lymphocytes. *Mutat Res* 334, 197-203.
- Banks, J. D., and Heald, R. (2001). Chromosome movement: dynein-out at the kinetochore. *Curr Biol* 11, R128-131.
- Basto, R., Gomes, R., and Karess, R. E. (2000). Rough deal and Zw10 are required for the metaphase checkpoint in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 2, 939-943.
- Basto, R., Scaerou, F., Mische, S., Wojcik, E., Lefebvre, C., Gomes, R., Hays, T., and Karess, R. (2004). In vivo dynamics of the rough deal checkpoint protein during *Drosophila* mitosis. *Curr Biol* 14, 56-61.
- Basu, J., Logarinho, E., Herrmann, S., Bousbaa, H., Li, Z., Chan, G. K., Yen, T. J., Sunkel, C. E., and Goldberg, M. L. (1998). Localization of the *Drosophila* checkpoint control protein Bub3 to the kinetochore requires Bub1 but not Zw10 or Rod. *Chromosoma* 107, 376-385.
- Becker, N. A., Thorland, E. C., Denison, S. R., Phillips, L. A., and Smith, D. I. (2002). Evidence that instability within the FRA3B region extends four megabases. *Oncogene* 21, 8713-8722.
- Bednarek, A. K., Keck-Waggoner, C. L., Daniel, R. L., Laflin, K. J., Bergsagel, P. L., Kiguchi, K., Brenner, A. J., and Aldaz, C. M. (2001). WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res* 61, 8068-8073.
- Bednarek, A. K., Laflin, K. J., Daniel, R. L., Liao, Q., Hawkins, K. A., and Aldaz, C. M. (2000). WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* 60, 2140-2145.
- Berger, R., Bloomfield, C. D., and Sutherland, G. R. (1985). Report of the Committee on Chromosome Rearrangements in Neoplasia and on Fragile Sites. *Cytogenet Cell Genet* 40, 490-535.
- Bharadwaj, R., Qi, W., and Yu, H. (2004). Identification of two novel components of the human NDC80 kinetochore complex. *J Biol Chem* 279, 13076-13085.
- Bharadwaj, R., and Yu, H. (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* 23, 2016-2027.
- Biedler, J. L., and Spengler, B. A. (1976). Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products. *Science* 191, 185-187.
- Biggins, S., and Murray, A. W. (2001). The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev* 15, 3118-3129.

- Bindra, R. S., and Glazer, P. M. (2005). Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 569, 75-85.
- Bluteau, O., Beaudoin, J. C., Pasturaud, P., Belghiti, J., Franco, D., Bioulac-Sage, P., Laurent-Puig, P., and Zucman-Rossi, J. (2002). Specific association between alcohol intake, high grade of differentiation and 4q34-q35 deletions in hepatocellular carcinomas identified by high resolution allelotyping. *Oncogene* 21, 1225-1232.
- Boldog, F., Gemmill, R. M., West, J., Robinson, M., Robinson, L., Li, E., Roche, J., Todd, S., Waggoner, B., Lundstrom, R., *et al.* (1997). Chromosome 3p14 homozygous deletions and sequence analysis of FRA3B. *Hum Mol Genet* 6, 193-203.
- Boldog, F. L., Waggoner, B., Glover, T. W., Chumakov, I., Le Paslier, D., Cohen, D., Gemmill, R. M., and Drabkin, H. A. (1994). Integrated YAC contig containing the 3p14.2 hereditary renal carcinoma 3;8 translocation breakpoint and the fragile site FRA3B. *Genes, Chromosomes & Cancer* 11, 216-221.
- Boveri, T. (1914). *Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren.* (Jena, Gustav Fischer Verlag).
- Brown, E. J., and Baltimore, D. (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* 17, 615-628.
- Burns, T. F., Fei, P., Scata, K. A., Dicker, D. T., and El-Deiry, W. S. (2003). Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol Cell Biol* 23, 5556-5571.
- Cahill, D. P., da Costa, L. T., Carson-Walter, E. B., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (1999). Characterization of MAD2B and other mitotic spindle checkpoint genes. *Genomics* 58, 181-187.
- Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300-303.
- Callahan, G., Denison, S. R., Phillips, L. A., Shridhar, V., and Smith, D. I. (2003). Characterization of the common fragile site FRA9E and its potential role in ovarian cancer. *Oncogene* 22, 590-601.
- Campbell, L., and Hardwick, K. G. (2003). Analysis of Bub3 spindle checkpoint function in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 116, 617-628.
- Caporossi, D., Vernole, P., Nicoletti, B., and Tedeschi, B. (1995). Characteristic chromosomal fragility of human embryonic cells exposed in vitro to aphidicolin. *Hum Genet* 96, 269-274.
- Capozza, F., Williams, T. M., Schubert, W., McClain, S., Bouzahzah, B., Sotgia, F., and Lisanti, M. P. (2003). Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol* 162, 2029-2039.
- Caputo, E., Manco, G., Mandrich, L., and Guardiola, J. (2000). A novel aspartyl proteinase from apocrine epithelia and breast tumors. *J Biol Chem* 275, 7935-7941.
- Carlson, J. G. (1956). On the mitotic movements of chromosomes. *Science* 124, 203-206.
- Carmena, M., and Earnshaw, W. C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 842-854.
- Carroll, S. M., Gaudray, P., DeRose, M. L., Emery, J. F., Meinkoth, J. L., Nakkim, E., Subler, M., VonHoff, D. D., and Wahl, G. M. (1987). Characterization of an episome produced in hamster cells that amplify a transfected CAD gene at high frequency: functional evidence for a mammalian replication origin. *Molecular and Cellular Biology* 7, 1740-1750.
- Casenghi, M., Mangiacasale, R., Tuynder, M., Caillet-Fauquet, P., Elhajouji, A., Lavia, P., Mousset, S., Kirsch-Volders, M., and Cundari, E. (1999). p53-independent apoptosis and p53-dependent block of DNA rereplication following mitotic spindle inhibition in human cells. *Exp Cell Res* 250, 339-350.
- Casper, A. M., Durkin, S. G., Arlt, M. F., and Glover, T. W. (2004). Chromosomal instability at common fragile sites in Seckel syndrome. *Am J Hum Genet* 75, 654-660.
- Casper, A. M., Nghiem, P., Arlt, M. F., and Glover, T. W. (2002). ATR Regulates Fragile Site Stability. *Cell* 111, 779-789.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825-2837.
- Cesari, R., Martin, E. S., Calin, G. A., Pentimalli, F., Bichi, R., McAdams, H., Trapasso, F., Drusco, A., Shimizu, M., Masciullo, V., *et al.* (2003). Parkin, a gene implicated in autosomal recessive

- juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5956-5961.
- Chan, G. K., Jablonski, S. A., Starr, D. A., Goldberg, M. L., and Yen, T. J. (2000). Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nat Cell Biol* *2*, 944-947.
- Chan, G. K., Jablonski, S. A., Sudakin, V., Hittle, J. C., and Yen, T. J. (1999). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol* *146*, 941-954.
- Chan, G. K., Schaar, B. T., and Yen, T. J. (1998). Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1. *J Cell Biol* *143*, 49-63.
- Chang, N. S., Pratt, N., Heath, J., Schultz, L., Sleva, D., Carey, G. B., and Zevotek, N. (2001). Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem* *276*, 3361-3370.
- Cheeseman, I. M., Niessen, S., Anderson, S., Hyndman, F., Yates, J. R., 3rd, Oegema, K., and Desai, A. (2004). A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. *Genes Dev* *18*, 2255-2268.
- Chen, A. T., Reidy, J. A., Annest, J. L., Welty, T. K., and Zhou, H. G. (1989). Increased chromosome fragility as a consequence of blood folate levels, smoking status, and coffee consumption. *Environmental and Molecular Mutagenesis* *13*, 319-324.
- Chen, J., and Fang, G. (2001). MAD2B is an inhibitor of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* *15*, 1765-1770.
- Chen, R. H. (2002). BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J Cell Biol* *158*, 487-496. Epub 2002 Aug 2005.
- Chen, R. H. (2004). Phosphorylation and activation of Bub1 on unattached chromosomes facilitate the spindle checkpoint. *Embo J* *23*, 3113-3121.
- Chen, R. H., Shevchenko, A., Mann, M., and Murray, A. W. (1998). Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J Cell Biol* *143*, 283-295.
- Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon, E. D., and Murray, A. W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. *Science* *274*, 242-246.
- Chen, X., Mariappan, S. V., Catasti, P., Ratliff, R., Moyzis, R. K., Laayoun, A., Smith, S. S., Bradbury, E. M., and Gupta, G. (1995). Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats: structure and biological implications. *PNAS* *92*, 5199-5203.
- Chesi, M., Bergsagel, P. L., Shonukan, O. O., Martelli, M. L., Brents, L. A., Chen, T., Schrock, E., Ried, T., and Kuehl, W. M. (1998). Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* *91*, 4457-4463.
- Chibazakura, T., McGrew, S. G., Cooper, J. A., Yoshikawa, H., and Roberts, J. M. (2004). Regulation of cyclin-dependent kinase activity during mitotic exit and maintenance of genome stability by p21, p27, and p107. *PNAS* *101*, 4465-4470.
- Chiurazzi, P., Pomponi, M. G., Willemsen, R., Oostra, B. A., and Neri, G. (1998). In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* *7*, 109-113.
- Choo, K. H., ed. (1997). *The centromere* (Oxford, Oxford University Press).
- Chung, E., and Chen, R. H. (2002). Spindle checkpoint requires Mad1-bound and Mad1-free Mad2. *Mol Biol Cell* *13*, 1501-1511.
- Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Casenghi, M., Zaira Limongi, M., D'Angelo, M., Soddu, S., Lavia, P., and Cundari, E. (2001). p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J Biol Chem* *276*, 19205-19213.
- Ciullo, M., Debily, M. A., Rozier, L., Autiero, M., Billault, A., Mayau, V., El Marhomy, S., Guardiola, J., Bernheim, A., Coullin, P., *et al.* (2002). Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I. *Hum Mol Genet* *11*, 2887-2894.
- Clark, J. W., Snell, L., Shiu, R. P., Orr, F. W., Maitre, N., Vary, C. P., Cole, D. J., and Watson, P. H. (1999). The potential role for prolactin-inducible protein (PIP) as a marker of human breast cancer micrometastasis. *Br J Cancer* *81*, 1002-1008.
- Cleary, J. D., and Pearson, C. E. (2003). The contribution of cis-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence. *Cytogenet Genome Res* *100*, 25-55.

- Cleveland, D. W., Mao, Y., and Sullivan, K. F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* *112*, 407-421.
- Cohen, A. J., Li, F. P., Berg, S., Marchetto, D. J., Tsai, S., Jacobs, S. C., and Brown, R. S. (1979). Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *New England Journal of Medicine* *301*, 592-595.
- Cooke, C. A., Heck, M. M., and Earnshaw, W. C. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* *105*, 2053-2067.
- Cooke, C. A., Schaar, B., Yen, T. J., and Earnshaw, W. C. (1997). Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma* *106*, 446-455.
- Coquelle, A., Pipiras, E., Toledo, F., Buttin, G., and Debatisse, M. (1997). Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* *89*, 215-225.
- Coquelle, A., Rozier, L., Dutrillaux, B., and Debatisse, M. (2002). Induction of multiple double-strand breaks within an hsr by meganucleaseI-SceI expression or fragile site activation leads to formation of double minutes and other chromosomal rearrangements. *Oncogene* *21*, 7671-7679.
- Coquelle, A., Toledo, F., Stern, S., Bieth, A., and Debatisse, M. (1998). A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol Cell* *2*, 259-265.
- Corbin, S., Neilly, M. E., Espinosa, R., 3rd, Davis, E. M., McKeithan, T. W., and Le Beau, M. M. (2002). Identification of unstable sequences within the common fragile site at 3p14.2: implications for the mechanism of deletions within fragile histidine triad gene/common fragile site at 3p14.2 in tumors. *Cancer Res* *62*, 3477-3484.
- Cotsiki, M., Lock, R. L., Cheng, Y., Williams, G. L., Zhao, J., Perera, D., Freire, R., Entwistle, A., Golemis, E. A., Roberts, T. M., *et al.* (2004). Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 947-952.
- Cowell, J. K. (1982). Double minutes and homogeneously staining regions : gene amplification in mammalian cells. *Ann Rev Genet* *16*, 21-59.
- Cox, D., Yuncken, C., and Spriggs, A. (1965). Minute chromatin bodies in malignant tumors of children. *Lancet* *2*, 55-58.
- Craig-Holmes, A. P., Strong, L. C., Goodacre, A., and Pathak, S. (1987). Variation in the expression of aphidicolin-induced fragile sites in human lymphocyte cultures. *Hum Genet* *76*, 134-137.
- Cummings, C. J., and Zoghbi, H. Y. (2000). Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *1*, 281-328.
- Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y. M., Xu, M., and Rao, C. V. (2004). Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res* *64*, 440-445.
- De Boulle, K., Verkerk, A. J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., Van den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B. A., and Willems, P. J. (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genetics* *3*, 31-35.
- Dekaban, A. (1965). Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated. *Journal of Nuclear Medicine* *6*, 740-746.
- DeLuca, J. G., Moree, B., Hickey, J. M., Kilmartin, J. V., and Salmon, E. D. (2002). hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. *J Cell Biol* *159*, 549-555.
- Denison, S. R., Becker, N. A., Ferber, M. J., Phillips, L. A., Kalli, K. R., Lee, J., Lillie, J., Smith, D. I., and Shridhar, V. (2002). Transcriptional profiling reveals that several common fragile-site genes are downregulated in ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer* *34*, 406-415.
- Denison, S. R., Callahan, G., Becker, N. A., Phillips, L. A., and Smith, D. I. (2003a). Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer* *38*, 40-52.
- Denison, S. R., Wang, F., Becker, N. A., Schule, B., Kock, N., Phillips, L. A., Klein, C., and Smith, D. I. (2003b). Alterations in the common fragile site gene Parkin in ovarian and other cancers. *Oncogene* *22*, 8370-8378.

- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P., and Mandel, J. L. (1993). The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nature Genetics* 4, 335-340.
- Di Leonardo, A., Khan, S. H., Linke, S. P., Greco, V., Seidita, G., and Wahl, G. M. (1997). DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res* 57, 1013-1019.
- Dimitrova, D. S., and Gilbert, D. M. (2000). Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis. *Nat Cell Biol* 2, 686-694.
- Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S. S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* 161, 267-280.
- Djalali, M., Adolph, S., Steinbach, P., Winking, H., and Hameister, H. (1987). A comparative mapping study of fragile sites in the human and murine genomes. *Hum Genet* 77, 157-162.
- Dobles, M., Liberal, V., Scott, M. L., Benzera, R., and Sorger, P. K. (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* 101, 635-645.
- Dominguez, A., Ramos-Morales, F., Romero, F., Rios, R. M., Dreyfus, F., Tortolero, M., and Pintor-Toro, J. A. (1998). hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. *Oncogene* 17, 2187-2193.
- Doyle, L. A., and Ross, D. D. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22, 7340-7358.
- Dujon, B. (1989). Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations-a review. *Gene* 82, 91-114.
- Dumon, K. R., Ishii, H., Vecchione, A., Trapasso, F., Baldassarre, G., Chakrani, F., Druck, T., Rosato, E. F., Williams, N. N., Baffa, R., *et al.* (2001). Fragile histidine triad expression delays tumor development and induces apoptosis in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 61, 4827-4836.
- Dutrillaux, B. (1995). Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. *Adv Cancer Res* 67, 59-82.
- Dutrillaux, B. (2000). Chromosome and gene alterations in human cancers in relation to aging. In *Chromosomes Today* (switzerland, Birkhäuser Verlag), pp. 207-223.
- Eichler, E. E., Holden, J. J., Popovich, B. W., Reiss, A. L., Snow, K., Thibodeau, S. N., Richards, C. S., Ward, P. A., and Nelson, D. L. (1994). Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet* 8, 88-94.
- Elder, F. F., and Robinson, T. J. (1989). Rodent common fragile sites: are they conserved? Evidence from mouse and rat. *Chromosoma* 97, 459-464.
- Engelman, J. A., Zhang, X. L., and Lisanti, M. P. (1998). Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett* 436, 403-410.
- Fang, J. M., Arlt, M. F., Burgess, A. C., Dagenais, S. L., Beer, D. G., and Glover, T. W. (2001). Translocation breakpoints in FHIT and FRA3B in both homologs of chromosome 3 in an esophageal adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 30, 292-298.
- Ferber, M. J., Eilers, P., Schuurig, E., Fenton, J. A., Fleuren, G. J., Kenter, G., Szuhai, K., Smith, D. I., Raap, A. K., and Brink, A. A. (2004). Positioning of cervical carcinoma and Burkitt lymphoma translocation breakpoints with respect to the human papillomavirus integration cluster in FRA8C at 8q24.13. *Cancer Genet Cytogenet* 154, 1-9.
- Ferber, M. J., Thorland, E. C., Brink, A. A., Rapp, A. K., Phillips, L. A., McGovern, R., Gostout, B. S., Cheung, T. H., Chung, T. K., Fu, W. Y., and Smith, D. I. (2003). Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 22, 7233-7242.
- Fisk, H. A., Mattison, C. P., and Winey, M. (2003). Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14875-14880.
- Fisk, H. A., and Winey, M. (2001). The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication. *Cell* 106, 95-104.

- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J. H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R. H., and Clevers, H. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 3, 433-438.
- Fojtik, P., and Vorlickova, M. (2001). The fragile X chromosome (GCC) repeat folds into a DNA tetraplex at neutral pH. *Nucl Acids Res* 29, 4684-4690.
- Fong, L. Y., Fidanza, V., Zanesi, N., Lock, L. F., Siracusa, L. D., Mancini, R., Siprashvili, Z., Ottey, M., Martin, S. E., Druck, T., *et al.* (2000). Muir-Torre-like syndrome in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4742-4747.
- Freudenreich, C. H., Stavenhagen, J. B., and Zakian, V. A. (1997). Stability of a CTG/CAG trinucleotide repeat in yeast is dependent on its orientation in the genome. *Mol Cell Biol* 17, 2090-2098.
- Fu, Y. H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S., Verkerk, A. J. M. H., Holden, J. J. A., Jr, R. G. F., Warren, S. T., *et al.* (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67, 1047-1058.
- Furuno, N., den Elzen, N., and Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *The Journal Of Cell Biology* 147, 295-306.
- Furuya, T., Ochi, H., and Watanabe, S. (1989). Common fragile sites in chromosomes of bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes from healthy persons and leukemia patients. *Cancer Genet Cytogenet* 43, 131-138.
- Futamura, M., Arakawa, H., Matsuda, K., Katagiri, T., Saji, S., Miki, Y., and Nakamura, Y. (2000). Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1. *Cancer Res* 60, 1531-1535.
- Gacy, A. M., Goellner, G. M., Spiro, C., Chen, X., Gupta, G., Bradbury, E. M., Dyer, R. B., Mikesell, M. J., Yao, J. Z., Johnson, A. J., *et al.* (1998). GAA instability in Friedreich's Ataxia shares a common, DNA-directed and intraallelic mechanism with other trinucleotide diseases. *Molecular Cell* 1, 583-593.
- Gajate, C., Barasoain, I., Andreu, J. M., and Mollinedo, F. (2000). Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X(L) and cell cycle arrest. *Cancer Research* 60, 2651-2659.
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Hudson, D. F., Honda, R., Nigg, E. A., Gerloff, D. L., and Earnshaw, W. C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* 166, 179-191.
- Gecz, J. (2000a). The FMR2 gene, FRAXE and non-specific X-linked mental retardation: clinical and molecular aspects. *Annals Of Human Genetics* 64, 95-106.
- Gecz, J. (2000b). FMR3 is a novel gene associated with FRAXE CpG island and transcriptionally silent in FRAXE full mutations. *J Med Genet* 37, 782-784.
- Gedeon, A. K., Baker, E., Robinson, H., Partington, M. W., Gross, B., Manca, A., Korn, B., Poustka, A., Yu, S., Sutherland, G. R., and *et al.* (1992). Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nature Genetics* 1, 341-344.
- Gemma, A., Seike, M., Seike, Y., Uematsu, K., Hibino, S., Kurimoto, F., Yoshimura, A., Shibuya, M., Harris, C. C., and Kudoh, S. (2000). Somatic mutation of the hBUB1 mitotic checkpoint gene in primary lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 29, 213-218.
- Geurts, J. M., Schoenmakers, E. F., Roijer, E., Stenman, G., and Van de Ven, W. J. (1997). Expression of reciprocal hybrid transcripts of HMGIC and FHIT in a pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer Res* 57, 13-17.
- Gisselsson, D. (2003). Chromosome instability in cancer: how, when, and why? *Adv Cancer Res* 87, 1-29.
- Gisselsson, D., Pettersson, L., Hoglund, M., Heidenblad, M., Gorunova, L., Wiegant, J., Mertens, F., Dal Cin, P., Mitelman, F., and Mandahl, N. (2000). Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5357-5362.
- Glover, T. W. (1998a). Instability at chromosomal fragile sites. *Recent Results Cancer Res* 154, 185-199.

- Glover, T. W., Berger, C., Coyle, J., and Echo, B. (1984). DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet* 67, 136-142.
- Glover, T. W., Hoge, A. W., Miller, D. E., Ascara-Wilke, J. E., Adam, A. N., Dagenais, S. L., Wilke, C. M., Dierick, H. A., and Beer, D. G. (1998b). The murine Fhit gene is highly similar to its human orthologue and maps to a common fragile site region. *Cancer Res* 58, 3409-3414.
- Glover, T. W., and Stein, C. K. (1987). Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites. *American Journal of Human Genetics* 41, 882-890.
- Glover, T. W., and Stein, C. K. (1988). Chromosome breakage and recombination at fragile sites. *American Journal of Human Genetics* 43, 265-273.
- Goellner, G. M., Tester, D., Thibodeau, S., Almqvist, E., Goldberg, Y. P., Hayden, M. R., and McMurray, C. T. (1997). Different mechanisms underlie DNA instability in Huntington disease and colorectal cancer. *American Journal of Human Genetics* 60, 879-890.
- Gorbsky, G. J. (2004). Mitosis: MCAK under the aura of Aurora B. *Curr Biol* 14, R346-348.
- Gorbsky, G. J., Chen, R. H., and Murray, A. W. (1998). Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J Cell Biol* 141, 1193-1205.
- Graeber, T. G., Osmian, C., Jacks, T., Housman, T., Koch, D. E., Lowe, S. W., and Giacca, A. J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91.
- Green, R. A., and Kaplan, K. B. (2003). Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol* 163, 949-961.
- Greenbaum, I. F., Gunn, S. J., Smith, S. A., McAllister, B. F., Hale, D. W., Baker, R. J., Engstrom, M. D., Hamilton, M. J., Modi, W. S., Robbins, L. W., and et al. (1994). Cytogenetic nomenclature of deer mice, *Peromyscus* (Rodentia): revision and review of the standardized karyotype. Report of the Committee for the Standardization of Chromosomes of *Peromyscus*. *Cytogenet Cell Genet* 66, 181-195.
- Gupta, A., Inaba, S., Wong, O. K., Fang, G., and Liu, J. (2003). Breast cancer-specific gene 1 interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1. *Oncogene* 22, 7593-7599.
- Habu, T., Kim, S. H., Weinstein, J., and Matsumoto, T. (2002). Identification of a MAD2-binding protein, CMT2, and its role in mitosis. *Embo J* 21, 6419-6428.
- Hagstrom, K. A., and Meyer, B. J. (2003). Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue. *Nat Rev Genet* 4, 520-534.
- Hahn, P. J., Nevaldine, B., and Longo, J. A. (1992). Molecular structure and evolution of double-minute chromosomes in methotrexate-resistant cultured mouse cells. *Molecular and Cellular Biology* 12, 2911-2918.
- Halappanavar, S. S., and Shah, G. M. (2004). Defective Control of Mitotic and Post-mitotic Checkpoints in Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1(-/-) Fibroblasts After Mitotic Spindle Disruption. *Cell Cycle* 3, 335-342. Epub 2004 Mar.
- Hammond, E. M., Denko, N. C., Dorie, M. J., Abraham, R. T., and Giaccia, A. J. (2002). Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Mol Cell Biol* 22, 1834-1843.
- Hammond, E. M., Dorie, M. J., and Giaccia, A. J. (2004). Inhibition of ATR leads to increased sensitivity to hypoxia/reoxygenation. *Cancer Res* 64, 6556-6562.
- Hammond, E. M., and Giaccia, A. J. (2004). The role of ATM and ATR in the cellular response to hypoxia and re-oxygenation. *DNA Repair (Amst)* 3, 1117-1122.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Handt, O., Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (2000). Fragile sites and minisatellite repeat instability. *Mol Genet Metab* 70, 99-105.
- Hanks, S., Coleman, K., Reid, S., Plaja, A., Firth, H., Fitzpatrick, D., Kidd, A., Mehes, K., Nash, R., Robin, N., et al. (2004). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet* 36, 1159-1161.
- Hardwick, K. G., Weiss, E., Luca, F. C., Winey, M., and Murray, A. W. (1996). Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science* 273, 953-956.

- Haruki, N., Saito, H., Harano, T., Nomoto, S., Takahashi, T., Osada, H., and Fujii, Y. (2001). Molecular analysis of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1 and BUB3 in human lung cancers. *Cancer Lett* 162, 201-205.
- Harvey, J., Judge, C., and Wiener, S. (1977). Familial X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality. *Journal of Medical Genetics* 14, 46-50.
- Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C. L., and Peters, J. M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 161, 281-294.
- Hauf, S., Waizenegger, I. C., and Peters, J. M. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 293, 1320-1323.
- He, X., Rines, D. R., Espelin, C. W., and Sorger, P. K. (2001). Molecular analysis of kinetochore-microtubule attachment in budding yeast. *Cell* 106, 195-206.
- Heaney, A. P., Singson, R., McCabe, C. J., Nelson, V., Nakashima, M., and Melmed, S. (2000). Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. *Lancet* 355, 716-719.
- Hecht, F., and Glover, T. W. (1984). Cancer chromosome breakpoints and common fragile sites induced by aphidicolin. *Cancer Genet Cytogenet* 13, 185-188.
- Hecht, F., Hecht, B. K., and Kirsch, I. R. (1987). Fragile sites limited to lymphocytes: molecular recombination and malignancy. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 26, 95-104.
- Hecht, F., Tajara, E. H., Lockwood, D., Sandberg, A. A., and Hecht, B. K. (1988). New common fragile sites. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 33, 1-9.
- Heidenfelder, B. L., Makhov, A. M., and Topal, M. D. (2003). Hairpin formation in Friedreich's ataxia triplet repeat expansion. *J Biol Chem* 278, 2425-2431.
- Hellman, A., Rahat, A., Scherer, S. W., Darvasi, A., Tsui, L. C., and Kerem, B. (2000). Replication delay along FRA7H, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability. *Mol Cell Biol* 20, 4420-4427.
- Hellman, A., Zlotorynski, E., Scherer, S. W., Cheung, J., Vincent, J. B., Smith, D. I., Trakhtenbrot, L., and Kerem, B. (2002). A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell* 1, 89-97.
- Hempfen, P. M., Kurpad, H., Calhoun, E. S., Abraham, S., and Kern, S. E. (2003). A double missense variation of the BUB1 gene and a defective mitotic spindle checkpoint in the pancreatic cancer cell line Hs766T. *Hum Mutat* 21, 445.
- Henricksen, L. A., Tom, S., Liu, Y., and Bambara, R. A. (2000). Inhibition of flap endonuclease 1 by flap secondary structure and relevance to repeat sequence expansion. *J Biol Chem* 275, 16420-16427.
- Hernando, E., Nahle, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., *et al.* (2004). Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 430, 797-802.
- Hernando, E., Orlow, I., Liberal, V., Nohales, G., Benezra, R., and Cordon-Cardo, C. (2001). Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int J Cancer* 95, 223-227.
- Hewett, D. R., Handt, O., Hobson, L., Mangelsdorf, M., Eyre, H. J., Baker, E., Sutherland, G. R., Schuffenhauer, S., Mao, J. I., and Richards, R. I. (1998). FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis. *Mol Cell* 1, 773-781.
- Hirsch, B. (1991). Sister chromatid exchanges are preferentially induced at expressed and nonexpressed common fragile sites. *Hum Genet* 87, 302-306.
- Hirst, M. C., Barnicoat, A., Flynn, G., Wang, Q., Daker, M., Buckle, V. J., Davies, K. E., and Bobrow, M. (1993). The identification of a third fragile site, FRAXF, in Xq27--q28 distal to both FRAXA and FRAXE. *Human Molecular Genetics* 2, 197-200.
- Hirst, M. C., Grewal, P. K., and Davies, K. E. (1994). Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus. *Hum Mol Genet* 3, 1553-1560.
- Hirst, M. C., and White, P. J. (1998). Cloned human FMR1 trinucleotide repeats exhibit a length- and orientation-dependent instability suggestive of in vivo lagging strand secondary structure. *Nucleic Acids Res* 26, 2353-2358.
- Hori, T., Takahashi, E., Ishihara, T., Minamihisamatsu, M., Kaneko, Y., and Murata, M. (1988). Distamycin A-inducible fragile sites and cancer proneness. *Cancer Genet Cytogenet* 34, 177-187.



- Howell, B. J., Hoffman, D. B., Fang, G., Murray, A. W., and Salmon, E. D. (2000). Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *J Cell Biol* *150*, 1233-1250.
- Howell, B. J., McEwen, B. F., Canman, J. C., Hoffman, D. B., Farrar, E. M., Rieder, C. L., and Salmon, E. D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol* *155*, 1159-1172.
- Howell, B. J., Moree, B., Farrar, E. M., Stewart, S., Fang, G., and Salmon, E. D. (2004). Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol* *14*, 953-964.
- Howlett, N. G., Taniguchi, T., Durkin, S. G., D'Andrea, A. D., and Glover, T. W. (2005). The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum Mol Genet*.
- Hoyt, M. A., Totis, L., and Roberts, B. T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* *66*, 507-517.
- Hsu, Y. Y., and Wang, Y. H. (2002). Human fragile site FRA16B DNA excludes nucleosomes in the presence of distamycin. *J Biol Chem* *277*, 5.
- Hu, W., Zuo, J., De Jager, P. L., and Heintz, N. (1998). The human glutamate receptor delta 2 gene (GRID2) maps to chromosome 4q22. *Genomics* *47*, 143-145.
- Huang, H., Qian, C., Jenkins, R. B., and Smith, D. I. (1998a). Fish mapping of YAC clones at human chromosomal band 7q31.2: identification of YACS spanning FRA7G within the common region of LOH in breast and prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* *21*, 152-159.
- Huang, H., Qian, J., Proffit, J., Wilber, K., Jenkins, R., and Smith, D. I. (1998b). FRA7G extends over a broad region: coincidence of human endogenous retroviral sequences (HERV-H) and small polydispersed circular DNAs (spcDNA) and fragile sites. *Oncogene* *16*, 2311-2319.
- Huang, H., Reed, C. P., Mordi, A., Lomber, G., Wang, L., Shridhar, V., Hartmann, L., Jenkins, R., and Smith, D. I. (1999). Frequent deletions within FRA7G at 7q31.2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer* *24*, 48-55.
- Huebner, K., and Croce, C. M. (2001). FRA3B and other common fragile sites: the weakest links. *Nature Rev Cancer* *1*, 214-221.
- Huebner, K., Garrison, P. N., Barnes, L. D., and Croce, C. M. (1998a). The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu Rev Genet* *32*, 7-31.
- Igarashi, S., Takiyama, Y., Cancel, G., Rogaeva, E. A., Sasaki, H., Wakisaka, A., Zhou, Y. X., Takano, H., Endo, K., Sanpei, K., *et al.* (1996). Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Human Molecular Genetics* *5*, 923-932.
- Iida, S., Hirota, T., Morisaki, T., Marumoto, T., Hara, T., Kuninaka, S., Honda, S., Kosai, K., Kawasuji, M., Pallas, D. C., and Saya, H. (2004). Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploidy checkpoint function. *Oncogene* *23*, 5266-5274.
- Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H., and Mano, Y. (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. *Nature* *275*, 458-460.
- Imai, Y., Shiratori, Y., Kato, N., Inoue, T., and Omata, M. (1999). Mutational inactivation of mitotic checkpoint genes, hSMAD2 and hBUB1, is rare in sporadic digestive tract cancers. *Jpn J Cancer Res* *90*, 837-840.
- Inoue, H., Ishii, H., Alder, H., Snyder, E., Druck, T., Huebner, K., and Croce, C. M. (1997). Sequence of the FRA3B common fragile region: implications for the mechanism of FHIT deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 14584-14589.
- Ishii, H., Dumon, K. R., Vecchione, A., Trapasso, F., Mimori, K., Alder, H., Mori, M., Sozzi, G., Baffa, R., Huebner, K., and Croce, C. M. (2001). Effect of adenoviral transduction of the fragile histidine triad gene into esophageal cancer cells. *Cancer Res* *61*, 1578-1584.
- Ishii, H., Ozawa, K., and Furukawa, Y. (2003a). Alteration of the fragile histidine triad gene early in carcinogenesis: an update. *J Exp Ther Oncol* *3*, 291-296.

- Ishii, H., Vecchione, A., Furukawa, Y., Sutheesophon, K., Han, S. Y., Druck, T., Kuroki, T., Trapasso, F., Nishimura, M., Saito, Y., *et al.* (2003b). Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies. *Mol Cancer Res* *1*, 940-947.
- Iwanaga, Y., and Jeang, K. T. (2002). Expression of mitotic spindle checkpoint protein hsMAD1 correlates with cellular proliferation and is activated by a gain-of-function p53 mutant. *Cancer Res* *62*, 2618-2624.
- Iwanaga, Y., Kasai, T., Kibler, K., and Jeang, K. T. (2002). Characterization of regions in hsMAD1 needed for binding hsMAD2. A polymorphic change in an hsMAD1 leucine zipper affects MAD1-MAD2 interaction and spindle checkpoint function. *J Biol Chem* *277*, 31005-31013.
- Jablonski, S. A., Chan, G. K., Cooke, C. A., Earnshaw, W. C., and Yen, T. J. (1998). The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* *107*, 386-396.
- Jaffrey, R. G., Pritchard, S. C., Clark, C., Murray, G. I., Cassidy, J., Kerr, K. M., Nicolson, M. C., and McLeod, H. L. (2000). Genomic instability at the BUB1 locus in colorectal cancer, but not in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* *60*, 4349-4352.
- Jallepalli, P. V., and Lengauer, C. (2001). Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* *1*, 109-117.
- Jallepalli, P. V., Waizenegger, I. C., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M. R., Peters, J. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2001). Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* *105*, 445-457.
- Jamieson, R. V., Perveen, R., Kerr, B., Carette, M., Yardley, J., Heon, E., Wirth, M. G., van Heyningen, V., Donnai, D., Munier, F., and Black, G. C. (2002). Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, MAF, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma. *Hum Mol Genet* *11*, 33-42.
- Janke, C., Ortiz, J., Lechner, J., Shevchenko, A., Magiera, M. M., Schramm, C., and Schiebel, E. (2001). The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control. *Embo J* *20*, 777-791.
- Jasin, M. (2000). Chromosome breaks and genomic instability. *Cancer Invest* *18*, 78-86.
- Jeffreys, A. J., Tamaki, K., MacLeod, A., Monckton, D. G., Neil, D. L., and Armour, J. A. (1994). Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genetics* *6*, 136-145.
- Jeong, S. J., Shin, H. J., Kim, S. J., Ha, G. H., Cho, B. I., Baek, K. H., Kim, C. M., and Lee, C. W. (2004). Transcriptional abnormality of the hsMAD2 mitotic checkpoint gene is a potential link to hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* *64*, 8666-8673.
- Jimenez, G. S., Khan, S. H., Stommel, J. M., and Wahl, G. M. (1999). p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene* *18*, 7656-7665.
- Jin, D. Y., Spencer, F., and Jeang, K. T. (1998). Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* *93*, 81-91.
- Johnson, V. L., Scott, M. I., Holt, S. V., Hussein, D., and Taylor, S. S. (2004). Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J Cell Sci* *117*, 1577-1589.
- Jones, C., Mullenbach, R., Grossfeld, P., Auer, R., Favier, R., Chien, K., James, M., Tunnacliffe, A., and Cotter, F. (2000). Co-localisation of CCG repeats and chromosome deletion breakpoints in Jacobsen syndrome: evidence for a common mechanism of chromosome breakage. *Hum Mol Genet* *9*, 1201-1208.
- Jones, C., Penny, L., Mattina, T., Yu, S., Baker, E., Voullaire, L., Langdon, W. Y., Sutherland, G. R., Richards, R. I., and Tunnacliffe, A. (1995). Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2. *Nature* *376*, 145-149.
- Jordan, M. A., and Wilson, L. (2004). MICROTUBULES AS A TARGET FOR ANTICANCER DRUGS. *Nature Reviews Cancer* *4*, 253-265.
- Kalitsis, P., Earle, E., Fowler, K. J., and Choo, K. H. (2000). Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. *Genes Dev* *14*, 2277-2282.

- Kalitsis, P., Fowler, K. J., Earle, E., Griffiths, B., Howman, E., Newson, A. J., and Choo, K. H. (2003). Partially functional Cenpa-GFP fusion protein causes increased chromosome missegregation and apoptosis during mouse embryogenesis. *Chromosome Res* *11*, 345-357.
- Kallio, M. J., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., and Gorbsky, G. J. (2002). Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. *Curr Biol* *12*, 900-905.
- Kao-Shan, C. S., Fine, R. L., Whang-Peng, J., Lee, E. C., and Chabner, B. A. (1987). Increased fragile sites and sister chromatid exchanges in bone marrow and peripheral blood of young cigarette smokers. *Cancer Res* *47*, 6278-6282.
- Kaplan, K. B., Burds, A. A., Swedlow, J. R., Bekir, S. S., Sorger, P. K., and Nathke, I. S. (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* *3*, 429-432.
- Karess, R. E., and Glover, D. M. (1989). rough deal: a gene required for proper mitotic segregation in *Drosophila*. *J Cell Biol* *109*, 2951-2961.
- Karki, S., and Holzbaur, E. L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 45-53.
- Khan, S. H., Moritsugu, J., and Wahl, G. M. (2000). Differential requirement for p19ARF in the p53-dependent arrest induced by DNA damage, microtubule disruption, and ribonucleotide depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3266-3271.
- Khan, S. H., and Wahl, G. M. (1998). p53 and pRb prevent rereplication in response to microtubule inhibitors by mediating a reversible G1 arrest. *Cancer Res* *58*, 396-401.
- Kim, S. T., Xu, B., and Kastan, M. B. (2002). Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev* *16*, 560-570.
- Kline-Smith, S. L., Khodjakov, A., Hergert, P., and Walczak, C. E. (2004). Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol Biol Cell* *15*, 1146-1159.
- Knight, S. J., Flannery, A. V., Hirst, M. C., Campbell, L., Christodoulou, Z., Phelps, S. R., Pointon, J., Middleton-Price, H. R., Barnicoat, A., Pembrey, M. E., and et al. (1993). Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell* *74*, 127-134.
- Knudson, A. G. (2000). Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* *34*, 1-19.
- Knutsen, T., Rao, V. K., Ried, T., Mickley, L., Schneider, E., Miyake, K., Ghadimi, B. M., Padilla-Nash, H., Pack, S., Greenberger, L., et al. (2000). Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* *27*, 110-116.
- Koumenis, C., Alarcon, R., Hammond, E., Sutphin, P., Hoffman, W., Murphy, M., Derr, J., Taya, Y., Lowe, S. W., Kastan, M., and Giaccia, A. (2001). Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol* *21*, 1297-1310.
- Kovtun, I. V., and McMurray, C. T. (2001). Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair. *Nat Genet* *27*, 407-411.
- Kremer, E. J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)<sub>n</sub>. *Science* *252*, 1711-1714.
- Krummel, K. A., Denison, S. R., Calhoun, E., Phillips, L. A., and Smith, D. I. (2002). The common fragile site FRA16D and its associated gene WWOX are highly conserved in the mouse at Fra8E1. *Genes Chromosomes Cancer* *34*, 154-167.
- Krummel, K. A., Roberts, L. R., Kawakami, M., Glover, T. W., and Smith, D. I. (2000). The characterization of the common fragile site FRA16D and its involvement in multiple myeloma translocations. *Genomics* *69*, 37-46.
- Kunst, C. B., and Warren, S. T. (1994). Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* *77*, 853-861.
- Kuroki, T., Trapasso, F., Shiraishi, T., Alder, H., Mimori, K., Mori, M., and Croce, C. M. (2002). Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* *62*, 2258-2260.

- Kuroki, T., Yendamuri, S., Trapasso, F., Matsuyama, A., Aqeilan, R. I., Alder, H., Rattan, S., Cesari, R., Nolli, M. L., Williams, N. N., *et al.* (2004). The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res* *10*, 2459-2465.
- Kuwano, A., and Kajii, T. (1987). Synergistic effect of aphidicolin and ethanol on the induction of common fragile sites. *Hum Genet* *75*, 75-78.
- Laird, C. D. (1987a). Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile-X syndrome of mental retardation. *Genetics* *117*, 587-599.
- Laird, C. D., Jaffe, E., Karpen, G., Lamb, M., and Nelson, R. (1987b). Fragile Sites in Human Chromosomes as Regions of Late Replicating DNA. *Trends in Genetics* *3*, 274-281.
- Lalouette, A., Guenet, J. L., and Vriz, S. (1998). Hotfoot mouse mutations affect the delta 2 glutamate receptor gene and are allelic to lurcher. *Genomics* *50*, 9-13.
- Lalouette, A., Lohof, A., Sotelo, C., Guenet, J., and Mariani, J. (2001). Neurobiological effects of a null mutation depend on genetic context: comparison between two hotfoot alleles of the delta-2 ionotropic glutamate receptor. *Neuroscience* *105*, 443-455.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S. L., Rosasco, S. E., Barrett-Wilt, G. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Walczak, C. E., and Stukenberg, P. T. (2004). Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol* *14*, 273-286.
- Langerod, A., Stromberg, M., Chin, K., Kristensen, V. N., and Borresen-Dale, A. L. (2003). BUB1 infrequently mutated in human breast carcinomas. *Hum Mutat* *22*, 420.
- Lanni, J. S., and Jacks, T. (1998). Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol* *18*, 1055-1064.
- Laurent-Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., Monges, G., Thomas, G., Bioulac-Sage, P., and Zucman-Rossi, J. (2001). Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* *120*, 1763-1773.
- Le Beau, M. M., Drabkin, H., Glover, T. W., Gemmill, R., Rassool, F. V., McKeithan, T. W., and Smith, D. I. (1998b). An FHIT tumor suppressor gene? *Genes Chromosomes and Cancer* *21*, 281-289.
- Le Beau, M. M., Rassool, F. V., Neilly, M. E., Espinosa, R., 3rd, Glover, T. W., Smith, D. I., and McKeithan, T. W. (1998a). Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum Mol Genet* *7*, 755-761.
- Lee, H. (2003). Impaired phosphorylation and mis-localization of Bub1 and BubR1 are responsible for the defective mitotic checkpoint function in Brca2-mutant thymic lymphomas. *Exp Mol Med* *35*, 448-453.
- Lee, H., Trainer, A. H., Friedman, L. S., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Ponder, B. A., and Venkitaraman, A. R. (1999). Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2. *Mol Cell* *4*, 1-10.
- Lejeune, J., Dutrillaux, B., Lafourcade, J., Berger, R., Abonyi, D., and Rethore, M. O. (1968). [Selective endoreduplication of the long arm of the 2 chromosome in a woman and her daughter]. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences - D: Sciences Naturelles* *266*, 24-26.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* *386*, 623-627.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* *396*, 643-649.
- Lew, D. J., and Burke, D. J. (2003). The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu Rev Genet* *37*, 251-282.
- Li, R., and Murray, A. W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* *66*, 519-531.
- Li, W., Lan, Z., Wu, H., Wu, S., Meadows, J., Chen, J., Zhu, V., and Dai, W. (1999). BUBR1 phosphorylation is regulated during mitotic checkpoint activation. *Cell Growth Differ* *10*, 769-775.
- Li, Y., and Benezra, R. (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* *274*, 246-248.
- Limongi, M. Z., Pelliccia, F., and Rocchi, A. (2003). Characterization of the human common fragile site FRA2G. *Genomics* *81*, 93-97.

- Lin, S. F., Lin, P. M., Yang, M. C., Liu, T. C., Chang, J. G., Sue, Y. C., and Chen, T. P. (2002). Expression of hBUB1 in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 43, 385-391.
- Liu, S. T., Chan, G. K., Hittle, J. C., Fujii, G., Lees, E., and Yen, T. J. (2003). Human MPS1 kinase is required for mitotic arrest induced by the loss of CENP-E from kinetochores. *Mol Biol Cell* 14, 1638-1651.
- Liu, Y., and Bambara, R. A. (2003). Analysis of Human Flap Endonuclease 1 Mutants Reveals a Mechanism to Prevent Triplet Repeat Expansion. *J Biol Chem* 278, 13728-13739.
- Lo, A. W., Sabatier, L., Fouladi, B., Pottier, G., Ricoul, M., and Murnane, J. P. (2002). DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. *Neoplasia* 4, 531-538.
- Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, and Darnell (1995). *Molecular Biology of the Cell*, Vol 1, 3rd edn (New York, W.H Freeman and Compagny).
- Logarinho, E., Bousbaa, H., Dias, J. M., Lopes, C., Amorim, I., Antunes-Martins, A., and Sunkel, C. E. (2004). Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in Drosophila cells. *J Cell Sci* 117, 1757-1771.
- Lohez, O. D., Reynaud, C., Borel, F., Andreassen, P. R., and Margolis, R. L. (2003). Arrest of mammalian fibroblasts in G1 in response to actin inhibition is dependent on retinoblastoma pocket proteins but not on p53. *J Cell Biol* 161, 67-77.
- Lubs, H. A. (1969). A marker X chromosome. *American Journal of Human Genetics* 21, 231-244.
- Ludes-Meyers, J. H., Bednarek, A. K., Popescu, N. C., Bedford, M., and Aldaz, C. M. (2003). WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. *Cytogenet Genome Res* 100, 101-110.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3, 997-1007.
- Luo, W. J., Takakuwa, T., Ham, M. F., Wada, N., Liu, A., Fujita, S., Sakane-Ishikawa, E., and Aozasa, K. (2004a). Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL-11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2). *Lab Invest* 84, 1193-1199.
- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., and Yu, H. (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol Cell* 9, 59-71.
- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J., and Yu, H. (2004b). The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat Struct Mol Biol* 11, 338-345.
- Ma, C., Martin, S., Trask, B., and Hamlin, J. L. (1993). Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in chinese hamster cells. *Genes Dev* 7, 605-620.
- Maiato, H., DeLuca, J., Salmon, E. D., and Earnshaw, W. C. (2004). The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci* 117, 5461-5477.
- Mangelsdorf, M., Ried, K., Woollatt, E., Dayan, S., Eyre, H., Finnis, M., Hobson, L., Nancarrow, J., Venter, D., Baker, E., and Richards, R. I. (2000). Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer. *Cancer Res* 60, 1683-1689.
- Mantel, C. R., Gelfano, V. M., Kim, Y. J., McDaniel, A., Lee, Y., Boswell, H. S., and Broxmeyer, H. E. (2002). P21waf-1-Chk1 pathway monitors G1 phase microtubule integrity and is crucial for restriction point transition. *Cell Cycle* 1, 327-336.
- Mao, Y., Abrieu, A., and Cleveland, D. W. (2003). Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* 114, 87-98.
- Margottin-Goguet, F., Hsu, J. Y., Loktev, A., Hsieh, H. M., Reimann, J. D., and Jackson, P. K. (2003). Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* 4, 813-826.
- Martin-Lluesma, S., Stucke, V. M., and Nigg, E. A. (2002). Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science* 297, 2267-2270.
- Martinez-Exposito, M. J., Kaplan, K. B., Copeland, J., and Sorger, P. K. (1999). Retention of the BUB3 checkpoint protein on lagging chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8493-8498.
- Masuda, A., Maeno, K., Nakagawa, T., Saito, H., and Takahashi, T. (2003). Association between mitotic spindle checkpoint impairment and susceptibility to the induction of apoptosis by anti-microtubule agents in human lung cancers. *American Journal Of Pathology* 163, 1109-1116.

- Masuda, A., and Takahashi, T. (2002). Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene* *21*, 6884-6897.
- Mathe, E. (2004). RASSF1A, the new guardian of mitosis. *Nat Genet* *36*, 117-118.
- Matsuura, S., Ito, E., Tauchi, H., Komatsu, K., Ikeuchi, T., and Kajii, T. (2000). Chromosomal instability syndrome of total premature chromatid separation with mosaic variegated aneuploidy is defective in mitotic-spindle checkpoint. *Am J Hum Genet* *67*, 483-486.
- Matsuyama, A., Shiraishi, T., Trapasso, F., Kuroki, T., Alder, H., Mori, M., Huebner, K., and Croce, C. M. (2003). Fragile site orthologs FHIT/FRA3B and Fhit/Fra14A2: evolutionarily conserved but highly recombinogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 14988-14993.
- Matzner, I., Savelyeva, L., and Schwab, M. (2003). Preferential integration of a transfected marker gene into spontaneously expressed fragile sites of a breast cancer cell line. *Cancer Lett* *189*, 207-219.
- Maurer, B. J., Lai, E., Hamkalo, B. A., Hood, L., and Attardi, G. (1987). Novel submicroscopic extrachromosomal elements containing amplified genes in human cells. *Nature* *327*, 434-437.
- McClelland, M. L., Gardner, R. D., Kallio, M. J., Daum, J. R., Gorbsky, G. J., Burke, D. J., and Stukenberg, P. T. (2003). The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes Dev* *17*, 101-114.
- McClelland, M. L., Kallio, M. J., Barrett-Wilt, G. A., Kestner, C. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Gorbsky, G. J., and Stukenberg, P. T. (2004). The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. *Curr Biol* *14*, 131-137.
- McClintock, B. (1951). Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* *16*, 13-47.
- McGuinness, B., Hirota, T., Kudo, N., Peters, J., and Nasmyth, K. (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol* *3*, 1-17.
- McIntosh, J. R. (1991). Structural and mechanical control of mitotic progression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *56*, 613-619.
- McIntosh, J. R., Grishchuk, E. L., and West, R. R. (2002). Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *18*, 193-219.
- Meraldi, P., Draviam, V. M., and Sorger, P. K. (2004a). Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell* *7*, 45-60.
- Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E. A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53<sup>-/-</sup> cells. *Embo J* *21*, 483-492.
- Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E. A. (2004b). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* *14*, 29-36.
- Michael, D., and Rajewsky, M. F. (2001). Induction of the common fragile site FRA3B does not affect FHIT expression. *Oncogene* *20*, 1798-1801.
- Michel, L., Diaz-Rodriguez, E., Narayan, G., Hernando, E., Murty, V. V., and Benezra, R. (2004). Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 4459-4464.
- Michel, L. S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P. K., Murty, V. V., and Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* *409*, 355-359.
- Mikhailov, A., Cole, R. W., and Rieder, C. L. (2002). DNA Damage during Mitosis in Human Cells Delays the Metaphase/Anaphase Transition via the Spindle-Assembly Checkpoint. *Current Biology* *12*, 1797-1806.
- Mimori, K., Druck, T., Inoue, H., Alder, H., Berk, L., Mori, M., Huebner, K., and Croce, C. M. (1999). Cancer-specific chromosome alterations in the constitutive fragile region FRA3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 7456-7461.
- Mimori, K., Inoue, H., Alder, H., Ueo, H., Tanaka, Y., and Mori, M. (2001). Mutation analysis of hBUB1, human mitotic checkpoint gene in multiple carcinomas. *Oncol Rep* *8*, 39-42.
- Minhas, K. M., Singh, B., Jiang, W. W., Sidransky, D., and Califano, J. A. (2003). Spindle assembly checkpoint defects and chromosomal instability in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* *107*, 46-52.

- Minn, A. J., Boise, L. H., and Thompson, C. B. (1996). Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes Dev* 10, 2621-2631.
- Miro, R., Clemente, I. C., Fuster, C., and Egozcue, J. (1987). Fragile sites, chromosome evolution, and human neoplasia. *Hum Genet* 75, 345-349.
- Mishmar, D., Rahat, A., Scherer, S. W., Nyakatura, G., Hinzmann, B., Kohwi, Y., Mandel-Gutfroind, Y., Lee, J. R., Drescher, B., Sas, D. E., *et al.* (1998). Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8141-8146.
- Mitas, M., Yu, A., Dill, J., Kamp, T. J., Chambers, E. J., and Haworth, I. S. (1995). Hairpin properties of single-stranded DNA containing a GC-rich triplet repeat: (CTG)<sub>15</sub>. *Nucleic Acids Research* 23, 1050-1059.
- Mitelman, F. (1994). Catalog of chromosome aberrations in cancer. fifth edition, Johansson and Mertens (eds), Wiley-Liss, New York.
- Mitelman, F. (2002). Mitelman database of chromosome aberration in cancer, <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- Mitra, A. B., Murty, V. V., Li, R. G., Pratap, M., Luthra, U. K., and Chaganti, R. S. (1994). Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res* 54, 4481-4487.
- Montermini, L., Andermann, E., Labuda, M., Richter, A., Pandolfo, M., Cavalcanti, F., Pianese, L., Iodice, L., Farina, G., Monticelli, A., *et al.* (1997). The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum Mol Genet* 6, 1261-1266.
- Morelli, C., Karayianni, E., Magnanini, C., Mungall, A. J., Thorland, E., Negrini, M., Smith, D. I., and Barbanti-Brodano, G. (2002). Cloning and characterization of the common fragile site FRA6F harboring a replicative senescence gene and frequently deleted in human tumors. *Oncogene* 21, 7266-7276.
- Morgan, R., Morgan, S. S., Hecht, B. K., and Hecht, F. (1988). Fragile sites at 4q23 and 7q11.23 unique to bone marrow cells. *Cancer Genet Cytogenet* 31, 47-53.
- Morrison, C., and Rieder, C. L. (2004). Chromosome damage and progression into and through mitosis in vertebrates. *DNA Repair (Amst)* 3, 1133-1139.
- Mulley, J. C., Yu, S., Loesch, D. Z., Hay, D. A., Donnelly, A., Gedeon, A. K., Carbonell, P., Lopez, I., Glover, G., Gabarron, I., and *et al.* (1995). FRAXE and mental retardation. *Journal of Medical Genetics* 32, 162-169.
- Murakumo, Y., Roth, T., Ishii, H., Rasio, D., Numata, S., Croce, C. M., and Fishel, R. (2000). A human REV7 homolog that interacts with the polymerase zeta catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2. *J Biol Chem* 275, 4391-4397.
- Murano, I., Kuwano, A., and Kajii, T. (1989). Cell type-dependent difference in the distribution and frequency of aphidicolin-induced fragile sites: T and B lymphocytes and bone marrow cells. *Hum Genet* 84, 71-74.
- Murphy, L. C., Lee-Wing, M., Goldenberg, G. J., and Shiu, R. P. (1987). Expression of the gene encoding a prolactin-inducible protein by human breast cancers in vivo: correlation with steroid receptor status. *Cancer Res* 47, 4160-4164.
- Musacchio, A., and Hardwick, K. G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 731-741.
- Musio, A., Montagna, C., Mariani, T., Tilenni, M., Focarelli, M. L., Brait, L., Indino, E., Benedetti, P. A., Chessa, L., Albertini, A., *et al.* (2005). Smc1 Involvement in Fragile Site Expression. *Hum Mol Genet*.
- Myal, Y., Robinson, D. B., Iwasiow, B., Tsuyuki, D., Wong, P., and Shiu, R. P. (1991). The prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP-15) gene: cloning, structure and regulation. *Mol Cell Endocrinol* 80, 165-175.
- Myrie, K. A., Percy, M. J., Azim, J. N., Neeley, C. K., and Petty, E. M. (2000). Mutation and expression analysis of human BUB1 and BUB1B in aneuploid breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 152, 193-199.
- Nadel, Y., Weisman-Shomer, P., and Fry, M. (1995). The fragile X syndrome single strand d(CGG)<sub>n</sub> nucleotide repeats readily fold back to form unimolecular hairpin structures. *Journal of Biological Chemistry* 270, 28970-28977.

- Nagai, H., Pineau, P., Tiollais, P., Buendia, M. A., and Dejean, A. (1997). Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 14, 2927-2933.
- Nakagawa, H., Yokozaki, H., Oue, N., Sugiyama, M., Ishikawa, T., Tahara, E., and Yasui, W. (2002). No mutations of the Bub1 gene in human gastric and oral cancer cell lines. *Oncol Rep* 9, 1229-1232.
- Nancarrow, J. K., Kremer, E., Holman, K., Eyre, H., Doggett, N. A., Le Paslier, D., Callen, D. F., Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1994). Implications of FRA16A structure for the mechanism of chromosomal fragile site genesis. *Science* 264, 1938-1941.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297, 559-565.
- Nasmyth, K., Peters, J. M., and Uhlmann, F. (2000). Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* 288, 1379-1385.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., and Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371, 297-300.
- Nelson, H. H., Wiencke, J. K., Gunn, L., Wain, J. C., Christiani, D. C., and Kelsey, K. T. (1998). Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos. *Cancer Res* 58, 1804-1807.
- Nghiem, P., Park, P. K., Kim, Y., Vaziri, C., and Schreiber, S. L. (2001). ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9092-9097.
- Nicklas, R. B., Waters, J. C., Salmon, E. D., and Ward, S. C. (2001). Checkpoint signals in grasshopper meiosis are sensitive to microtubule attachment, but tension is still essential. *J Cell Sci* 114, 4173-4183.
- Nitta, M., Kobayashi, O., Honda, S., Hirota, T., Kuninaka, S., Marumoto, T., Ushio, Y., and Saya, H. (2004). Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene* 28, 28.
- Nomoto, S., Haruki, N., Takahashi, T., Masuda, A., Koshikawa, T., Fujii, Y., and Osada, H. (1999). Search for in vivo somatic mutations in the mitotic checkpoint gene, hMAD1, in human lung cancers. *Oncogene* 18, 7180-7183.
- Nowaczyk, M. J., Teshima, I. E., Siegel-Bartelt, J., and Clarke, J. T. (1997). Deletion 4q21/4q22 syndrome: two patients with de novo 4q21.3q23 and 4q13.2q23 deletions. *Am J Med Genet* 69, 400-405.
- Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M. F., and Mandel, J. L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252, 1097-1102.
- Ohshima, K., Haraoka, S., Yoshioka, S., Hamasaki, M., Fujiki, T., Suzumiya, J., Kawasaki, C., Kanda, M., and Kikuchi, M. (2000). Mutation analysis of mitotic checkpoint genes (hBUB1 and hBUBR1) and microsatellite instability in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Lett* 158, 141-150.
- Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M. G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., McCue, P., Druck, T., and et al. (1996). The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84, 587-597.
- Olesen, S. H., Thykjaer, T., and Orntoft, T. F. (2001). Mitotic checkpoint genes hBUB1, hBUB1B, hBUB3 and TTK in human bladder cancer, screening for mutations and loss of heterozygosity. *Carcinogenesis* 22, 813-815.
- Oussatcheva, E. A., Hashem, V. I., Zou, Y., Sinden, R. R., and Potaman, V. N. (2001). Involvement of the nucleotide excision repair protein UvrA in instability of CAG\*CTG repeat sequences in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276, 30878-30884.
- Ouyang, B., Knauf, J. A., Ain, K., Nacev, B., and Fagin, J. A. (2002). Mechanisms of aneuploidy in thyroid cancer cell lines and tissues: evidence for mitotic checkpoint dysfunction without mutations in BUB1 and BUBR1. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56, 341-350.
- Paige, A. J., Taylor, K. J., Taylor, C., Hillier, S. G., Farrington, S., Scott, D., Porteous, D. J., Smyth, J. F., Gabra, H., and Watson, J. E. (2001). WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11417-11422.



- Palakodeti, A., Han, Y., Jiang, Y., and Le Beau, M. M. (2004). The role of late/slow replication of the FRA16D in common fragile site induction. *Genes Chromosomes Cancer* 39, 71-76.
- Paradee, W., Wilke, C. M., Wang, L., Shridhar, R., Mullins, C. M., Hoge, A., Glover, T. W., and Smith, D. I. (1996). A 350-kb cosmid contig in 3p14.2 that crosses the t(3;8) hereditary renal cell carcinoma translocation breakpoint and 17 aphidicolin-induced FRA3B breakpoints. *Genomics* 35, 87-93.
- Park, S. W., Ludes-Meyers, J., Zimonjic, D. B., Durkin, M. E., Popescu, N. C., and Aldaz, C. M. (2004). Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 91, 753-759.
- Parniewski, P., Jaworski, A., Wells, R. D., and Bowater, R. P. (2000). Length of CTG.CAG repeats determines the influence of mismatch repair on genetic instability. *J Mol Biol* 299, 865-874.
- Parrish, J. E., Oostra, B. A., Verkerk, A. J., Richards, C. S., Reynolds, J., Spikes, A. S., Shaffer, L. G., and Nelson, D. L. (1994). Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE. *Nat Genet* 8, 229-235.
- Pauletti, G., Lai, E., and Attardi, G. (1990). Early appearance and long-term persistence of the submicroscopic extrachromosomal elements (amplisomes) containing the amplified DHFR genes in human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 2955-2959.
- Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 72-75.
- Pedeutour, F., Suijkerbuijk, R. F., Forus, A., Van Gaal, J., Van de Klundert, W., Coindre, J. M., Nicolo, G., Collin, F., Van Haelst, U., Huffermann, K., and et al. (1994). Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 85-94.
- Pei, L., and Melmed, S. (1997). Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 11, 433-441.
- Pekarsky, Y., Druck, T., Cotticelli, M. G., Ohta, M., Shou, J., Mendrola, J., Montgomery, J. C., Buchberg, A. M., Siracusa, L. D., Manenti, G., et al. (1998). The murine Fhit locus: isolation, characterization, and expression in normal and tumor cells. *Cancer Res* 58, 3401-3408.
- Pekarsky, Y., Zanesi, N., Palamarchuk, A., Huebner, K., and Croce, C. M. (2002). FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *Lancet Oncol* 3, 748-754.
- Percy, M. J., Myrie, K. A., Neeley, C. K., Azim, J. N., Ethier, S. P., and Petty, E. M. (2000). Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 29, 356-362.
- Perucca-Lostanlen, D., Hecht, B. K., Courseaux, A., Grosgeorge, J., Hecht, F., and Gaudray, P. (1997). Mapping FRA11A, a folate-sensitive fragile site in human chromosome band 11q13.3. *Cytogenet Cell Genet* 79, 88-91.
- Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 9, 931-943.
- Peterson, J. R., and Mitchison, T. J. (2002). Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem Biol* 9, 1275-1285.
- Pfleger, C. M., Salic, A., Lee, E., and Kirschner, M. W. (2001). Inhibition of Cdh1-APC by the MAD2-related protein MAD2L2: a novel mechanism for regulating Cdh1. *Genes Dev* 15, 1759-1764.
- Piatti, S., Lengauer, C., and Nasmyth, K. (1995). Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a 'reductional' anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 14, 3788-3799.
- Picchio, M. C., Martin, E. S., Cesari, R., Calin, G. A., Yendamuri, S., Kuroki, T., Pentimalli, F., Sarti, M., Yoder, K., Kaiser, L. R., et al. (2004). Alterations of the tumor suppressor gene Parkin in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10, 2720-2724.
- Pidoux, A. L., and Allshire, R. C. (2000). Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Curr Opin Cell Biol* 12, 308-319.
- Pieretti, M., Zhang, F. P., Fu, Y. H., Warren, S. T., Oostra, B. A., Caskey, C. T., and Nelson, D. L. (1991). Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66, 817-822.
- Pipiras, E., Coquelle, A., Bieth, A., and Debatisse, M. (1998). Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *Embo J* 17, 325-333.

- Pires, R. M., Reichert, R. H., and Kasahara, S. (1998). Cytogenetics of three breeds of river buffalo (*Bubalus bubalis* L.), with evidence of a fragile site on the X chromosome. *Theriogenology* *49*, 529-538.
- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* *14*, 1837-1851.
- Popescu, N. C., Zimonjic, D., and DiPaolo, J. A. (1990). Viral integration, fragile sites, and proto-oncogenes in human neoplasia. *Hum Genet* *84*, 383-386.
- Popovici, C., Basset, C., Bertucci, F., Orsetti, B., Adelaide, J., Mozziconacci, M. J., Conte, N., Murati, A., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., *et al.* (2002). Reciprocal translocations in breast tumor cell lines: cloning of a t(3;20) that targets the FHIT gene. *Genes Chromosomes Cancer* *35*, 204-218.
- Putkey, F. R., Cramer, T., Morphew, M. K., Silk, A. D., Johnson, R. S., McIntosh, J. R., and Cleveland, D. W. (2002). Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell* *3*, 351-365.
- Ragin, C. C., Reshmi, S. C., and Gollin, S. M. (2004). Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. *Int J Cancer* *110*, 701-709.
- Rassool, F. V., Le Beau, M. M., Shen, M. L., Neilly, M. E., Espinosa, R. r., Ong, S. T., Boldog, F., Drabkin, H., McCarroll, R., and McKeithan, T. W. (1996). Direct cloning of DNA sequences from the common fragile site region at chromosome band 3p14.2. *Genomics* *35*, 109-117.
- Rassool, F. V., McKeithan, T. W., Neilly, M. E., van Melle, E., Espinosa, R. d., and Le Beau, M. M. (1991). Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p14: an approach to cloning fragile sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 6657-6661.
- Reeves, B. R., and Lawler, S. D. (1970). Preferential breakage of sensitive regions of human chromosomes. *Humangenetik* *8*, 295-301.
- Reimann, J. D., Gardner, B. E., Margottin-Goguet, F., and Jackson, P. K. (2001). Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes Dev* *15*, 3278-3285.
- Reis, R. M., Nakamura, M., Masuoka, J., Watanabe, T., Colella, S., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001). Mutation analysis of hBUB1, hBUBR1 and hBUB3 genes in glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* *101*, 297-304.
- Rice, G. C., Hoy, C., and Schimke, R. T. (1986). Transient hypoxia enhances the frequency of dihydrofolate reductase gene amplification in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *83*, 5978-5982.
- Richards, R. I. (2001). Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet* *17*, 339-345.
- Richards, R. I., and Sutherland, G. R. (1994). Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nature Genetics* *6*, 114-116.
- Richardson, C., and Jasin, M. (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* *405*, 697-700.
- Ried, K., Finnis, M., Hobson, L., Mangelsdorf, M., Dayan, S., Nancarrow, J. K., Woollatt, E., Kremmidiotis, G., Gardner, A., Venter, D., *et al.* (2000). Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum Mol Genet* *9*, 1651-1663.
- Rieder, C. L. (1981). The structure of the cold-stable kinetochore fiber in metaphase PtK1 cells. *Chromosoma* *84*, 145-158.
- Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A., and Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* *130*, 941-948.
- Rieder, C. L., Khodjakov, A., Paliulis, L. V., Fortier, T. M., Cole, R. W., and Sluder, G. (1997). Mitosis in vertebrate somatic cells with two spindles: implications for the metaphase/anaphase transition checkpoint and cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5107-5112.
- Rieder, C. L., and Maiato, H. (2004). Stuck in Division or Passing through: What Happens When Cells Cannot Satisfy the Spindle Assembly Checkpoint. *Developmental Cell* *7*, 637-651.
- Riggs, P. K., Kuczek, T., Chrisman, C. L., and Bidwell, C. A. (1993). Analysis of aphidicolin-induced chromosome fragility in the domestic pig (*Sus scrofa*). *Cytogenet Cell Genet* *62*, 110-116.
- Robinson, K. O., Petersen, A. M., Morrison, S. N., Elso, C. M., and Stubbs, L. (2005). Two reciprocal translocations provide new clues to the high mutability of the Grid2 locus. *Mamm Genome* *16*, 32-40.

- Robinson, T. J., and Elder, F. F. (1987). Multiple common fragile sites are expressed in the genome of the laboratory rat. *Chromosoma* *96*, 45-49.
- Roninson, I. B. (1992). From amplification to function: the case of the MDR1 gene. *Mutat Res* *276*, 151-161.
- Ronne, M. (1992). Putative fragile sites in the horse karyotype. *Hereditas* *117*, 127-136.
- Ronne, M. (1995). Localization of fragile sites in the karyotype of *Felis catus*. *Hereditas* *122*, 279-283.
- Rozier, L., El-Achkar, E., Apiou, F., and Debatisse, M. (2004). Characterization of a conserved aphidicolin-sensitive common fragile site at human 4q22 and mouse 6C1: possible association with an inherited disease and cancer. *Oncogene* *23*, 6872-6880.
- Ru, H. Y., Chen, R. L., Lu, W. C., and Chen, J. H. (2002). hBUB1 defects in leukemia and lymphoma cells. *Oncogene* *21*, 4673-4679.
- Ruiz, J. C., and Wahl, G. M. (1990). Chromosomal destabilization during gene amplification. *Mol Cell Biol* *10*, 3056-3066.
- Ruiz-Herrera, A., Garcia, F., Fronicke, L., Ponsa, M., Egozcue, J., Caldes, M. G., and Stanyon, R. (2004). Conservation of aphidicolin-induced fragile sites in Papionini (Primates) species and humans. *Chromosome Res* *12*, 683-690.
- Ruiz-Herrera, A., Garcia, F., Giulotto, E., Attolini, C., Egozcue, J., Ponsa, M., and Garcia, M. (2005a). Evolutionary breakpoints are co-localized with fragile sites and intrachromosomal telomeric sequences in primates. *Cytogenet Genome Res* *108*, 234-247.
- Ruiz-Herrera, A., Garcia, F., Mora, L., Egozcue, J., Ponsa, M., and Garcia, M. (2005b). Evolutionary conserved chromosomal segments in the human karyotype are bounded by unstable chromosome bands. *Cytogenet Genome Res* *108*, 161-174.
- Ruiz-Herrera, A., Ponsa, M., Garcia, F., Egozcue, J., and Garcia, M. (2002). Fragile sites in human and *Macaca fascicularis* chromosomes are breakpoints in chromosome evolution. *Chromosome Res* *10*, 33-44.
- Rumpel, C. A., Powell, S. M., and Moskaluk, C. A. (1999). Mapping of genetic deletions on the long arm of chromosome 4 in human esophageal adenocarcinomas. *Am J Pathol* *154*, 1329-1334.
- Sablina, A. A., Agapova, L. S., Chumakov, P. M., and Kopnin, B. P. (1999). p53 DOES NOT CONTROL THE SPINDLE ASSEMBLY CELL CYCLE CHECKPOINT BUT MEDIATES G1 ARREST IN RESPONSE TO DISRUPTION OF MICROTUBULE SYSTEM. *Cell Biology International* *23*, 323-334.
- Saeki, A., Tamura, S., Ito, N., Kiso, S., Matsuda, Y., Yabuuchi, I., Kawata, S., and Matsuzawa, Y. (2002). Frequent impairment of the spindle assembly checkpoint in hepatocellular carcinoma. *Cancer* *94*, 2047-2054.
- Saez, C., Japon, M. A., Ramos-Morales, F., Romero, F., Segura, D. I., Tortolero, M., and Pintor-Toro, J. A. (1999). hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias. *Oncogene* *18*, 5473-5476.
- Sagara, Y., Mimori, K., Yoshinaga, K., Tanaka, F., Nishida, K., Ohno, S., Inoue, H., and Mori, M. (2004). Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neu mRNA expression in human breast cancer. *Br J Cancer* *91*, 959-965.
- Salic, A., Waters, J. C., and Mitchison, T. J. (2004). Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* *118*, 567-578.
- Sampath, S. C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A., and Funabiki, H. (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* *118*, 187-202.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* *73*, 39-85.
- Sarafidou, T., Kahl, C., Martinez-Garay, I., Mangelsdorf, M., Gesk, S., Baker, E., Kokkinaki, M., Talley, P., Maltby, E. L., French, L., *et al.* (2004). Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein. *Genomics* *84*, 69-81.
- Sarai, A., Mazur, J., Nussinov, R., and Jernigan, R. L. (1989). Sequence dependence of DNA conformational flexibility. *Biochemistry* *28*, 7842-7849.
- Sato, M., Sekido, Y., Horio, Y., Takahashi, M., Saito, H., Minna, J. D., Shimokata, K., and Hasegawa, Y. (2000). Infrequent mutation of the hBUB1 and hBUBR1 genes in human lung cancer. *Jpn J Cancer Res* *91*, 504-509.

- Saunders, W. S., Shuster, M., Huang, X., Gharaibeh, B., Enyenihi, A. H., Petersen, I., and Gollin, S. M. (2000). Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 303-308.
- Scaerou, F., Aguilera, I., Saunders, R., Kane, N., Blottiere, L., and Karess, R. (1999). The rough deal protein is a new kinetochore component required for accurate chromosome segregation in *Drosophila*. *J Cell Sci* 112 ( Pt 21), 3757-3768.
- Scaerou, F., Starr, D. A., Piano, F., Papoulas, O., Karess, R. E., and Goldberg, M. L. (2001). The ZW10 and Rough Deal checkpoint proteins function together in a large, evolutionarily conserved complex targeted to the kinetochore. *J Cell Sci* 114, 3103-3114.
- Schaar, B. T., Chan, G. K., Maddox, P., Salmon, E. D., and Yen, T. J. (1997). CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *J Cell Biol* 139, 1373-1382.
- Scheres, J. M., and Hustinx, T. W. (1980). Heritable fragile sites and lymphocyte culture medium containing BrdU. *American Journal of Human Genetics* 32, 628-629.
- Schlegel, R., and Pardee, A. B. (1986). Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells. *Science* 232, 1264-1266.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Jessberger, A., Kohler, J., and Lange, R. (1986). The fragile site (16)(q22). I. Induction by AT-specific DNA-ligands and population frequency. *Human Genetics* 74, 67-73.
- Schmid, M., Ott, G., Haaf, T., and Scheres, J. M. (1985). Evolutionary conservation of fragile sites induced by 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine in man, gorilla, and chimpanzee. *Hum Genet* 71, 342-350.
- Schoenlein, P. V., Shen, D. W., Barrett, J. T., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1992). Double minute chromosomes carrying the human multidrug resistance 1 and 2 genes are generated from the dimerization of submicroscopic circular DNAs in colchicine-selected KB carcinoma cells. *Molecular Biology of the Cell* 3, 507-520.
- Schwab, M. (1999). Oncogene amplification in solid tumors. *Semin cancer Biol* 9, 319-325.
- Schweitzer, J. K., and Livingston, D. M. (1998). Expansions of CAG repeat tracts are frequent in a yeast mutant defective in Okazaki fragment maturation. *Hum Mol Genet* 7, 69-74.
- Seeley, T. W., Wang, L., and Zhen, J. Y. (1999). Phosphorylation of human MAD1 by the BUB1 kinase in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 589-595.
- Shannon, K. B., Canman, J. C., and Salmon, E. D. (2002). Mad2 and BubR1 function in a single checkpoint pathway that responds to a loss of tension. *Mol Biol Cell* 13, 3706-3719.
- Shaw, M. A., Chiurazzi, P., Romain, D. R., Neri, G., and Gecz, J. (2002). A novel gene, FAM11A, associated with the FRAXF CpG island is transcriptionally silent in FRAXF full mutation. *Eur J Hum Genet* 10, 767-772.
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.
- Shichiri, M., Yoshinaga, K., Hisatomi, H., Sugihara, K., and Hirata, Y. (2002). Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival. *Cancer Res* 62, 13-17.
- Shin, H. J., Baek, K. H., Jeon, A. H., Park, M. T., Lee, S. J., Kang, C. M., Lee, H. S., Yoo, S. H., Chung, D. H., Sung, Y. C., *et al.* (2003). Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell* 4, 483-497.
- Shiraishi, T., Druck, T., Mimori, K., Flomenberg, J., Berk, L., Alder, H., Miller, W., Huebner, K., and Croce, C. M. (2001). Sequence conservation at human and mouse orthologous common fragile regions, FRA3B/FHIT and Fra14A2/Fhit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5722-5727.
- Shuster, M. I., Han, L., Le Beau, M. M., Davis, E., Sawicki, M., Lese, C. M., Park, N. H., Colicelli, J., and Gollin, S. M. (2000). A consistent pattern of RIN1 rearrangements in oral squamous cell carcinoma cell lines supports a breakage-fusion-bridge cycle model for 11q13 amplification. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 153-163.
- Sieber, O. M., Lamlum, H., Crabtree, M. D., Rowan, A. J., Barclay, E., Lipton, L., Hodgson, S., Thomas, H. J., Neale, K., Phillips, R. K., *et al.* (2002). Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2954-2958.
- Singer, M. J., Mesner, L. D., Friedman, C. L., Trask, B. J., and Hamlin, J. L. (2000). Amplification of the human dihydrofolate reductase gene via double minutes is initiated by chromosome breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7921-7926.

- Siprashvili, Z., Sozzi, G., Barnes, L. D., McCue, P., Robinson, A. K., Eryomin, V., Sard, L., Tagliabue, E., Greco, A., Fusetti, L., *et al.* (1997). Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13771-13776.
- Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., De Antoni, A., Jeang, K. T., and Musacchio, A. (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *Embo J* *21*, 2496-2506.
- Sjogren, C., and Nasmyth, K. (2001). Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* *11*, 991-995.
- Skoufias, D. A., Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Wilson, L., and Margolis, R. L. (2001). Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4492-4497. Epub 2001 Mar 4427.
- Skoufias, D. A., Lacroix, F. B., Andreassen, P. R., Wilson, L., and Margolis, R. L. (2004). Inhibition of DNA decatenation, but not DNA damage, arrests cells at metaphase. *Mol Cell* *15*, 977-990.
- Smeets, D. F., and van de Klundert, F. A. (1990). Common fragile sites in man and three closely related primate species. *Cytogenetics and Cell Genetics* *53*, 8-14.
- Smith, D. I., Huang, H., and Wang, L. (1998). Common fragile sites and cancer (Review). *Int J Oncol* *12*, 187-196.
- Smith, K. A., Gorman, P. A., Stark, M. B., Groves, R. P., and Stark, G. R. (1990). Distinctive chromosomal structures are formed very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Cell* *63*, 1219-1227.
- Smith, K. A., Stark, M. B., Gorman, P. A., and Stark, G. R. (1992a). Fusion near telomeres occur very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *89*, 5427-5431.
- Smith, P. P., Friedman, C. L., Bryant, E. M., and McDougall, J. K. (1992b). Viral integration and fragile sites in human papillomavirus-immortalized human keratinocyte cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* *5*, 150-157.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E. J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* *24*, 181-185.
- Song, M. S., Song, S. J., Ayad, N. G., Chang, J. S., Lee, J. H., Hong, H. K., Lee, H., Choi, N., Kim, J., Kim, H., *et al.* (2004). The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* *6*, 129-137.
- Sozzi, G., Veronese, M. L., Negrini, M., Baffa, R., Cotticelli, M. G., Inoue, H., Tornielli, S., Pilotti, S., De Gregorio, L., Pastorino, U., *et al.* (1996). The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* *85*, 17-26.
- Spriggs, A. I., Boddington, M. M., and Clarke, C. M. (1962). Chromosomes of human cancer cells. *Brit Med J* *ii*, 1431-1435.
- Starr, D. A., Williams, B. C., Li, Z., Etemad-Moghadam, B., Dawe, R. K., and Goldberg, M. L. (1997). Conservation of the centromere/kinetochore protein ZW10. *J Cell Biol* *138*, 1289-1301.
- Stern, B. M., and Murray, A. W. (2001). Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol* *11*, 1462-1467.
- Stewart, Z. A., Tang, L. J., and Pietenpol, J. A. (2001). Increased p53 phosphorylation after microtubule disruption is mediated in a microtubule inhibitor- and cell-specific manner. *Oncogene* *20*, 113-124.
- Stone, D. M., Jacky, P. B., Hancock, D. D., and Prieur, D. J. (1991a). Chromosomal fragile site expression in dogs: I. Breed specific differences. *Am J Med Genet* *40*, 214-222.
- Stone, D. M., Jacky, P. B., and Prieur, D. J. (1991b). Chromosomal fragile site expression in dogs: II. Expression in boxer dogs with mast cell tumors. *Am J Med Genet* *40*, 223-229.
- Stone, D. M., and Stephens, K. E. (1993a). Bromodeoxyuridine induces chromosomal fragile sites in the canine genome. *American Journal of Medical Genetics* *46*, 198-202.
- Stone, D. M., Stephens, K. E., and Doles, J. (1993b). Folate-sensitive and aphidicolin-inducible fragile sites are expressed in the genome of the domestic cat. *Cancer Genetics & Cytogenetics* *65*, 130-134.
- Stubblefield, E. (1964). DNA synthesis and chromosomal morphology of Chinese hamster cells cultured in media containing colcemid. *Symp Intern Soc Cell Biol* *3*, 223-248.
- Stucke, V. M., Baumann, C., and Nigg, E. A. (2004). Kinetochore localization and microtubule interaction of the human spindle checkpoint kinase Mps1. *Chromosoma* *113*, 1-15.

- Stucke, V. M., Sillje, H. H., Arnaud, L., and Nigg, E. A. (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *Embo J* 21, 1723-1732.
- Stukenberg, P. T. (2004). Triggering p53 after cytokinesis failure. *J Cell Biol* 165, 607-608.
- Sudo, T., Nitta, M., Saya, H., and Ueno, N. T. (2004). Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Research* 64, 2502-2508.
- Sullivan, B. A., Blower, M. D., and Karpen, G. H. (2001). Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat Rev Genet* 2, 584-596.
- Sutherland, G. R. (1977a). Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 197, 265-266.
- Sutherland, G. R. (1979a). Heritable fragile sites on human chromosomes. I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* 31, 125-135.
- Sutherland, G. R. (1982). Heritable fragile sites on human chromosomes. IX. Population cytogenetics and segregation analysis of the BrdU-requiring fragile site at 10q25. *American Journal of Human Genetics* 34, 753-756.
- Sutherland, G. R. (1988). The role of nucleotides in human fragile site expression. *Mutat Res* 200, 207-213.
- Sutherland, G. R. (1991). *The Detection of Fragile Sites on Human Chromosomes* (New York, Adolph K.W.).
- Sutherland, G. R., Baker, E., and Richards, R. I. (1998). Fragile sites still breaking. *Trends Genet* 14, 501-506.
- Sutherland, G. R., Baker, E., and Seshadri, R. S. (1980). Heritable fragile sites on human chromosomes. V. A new class of fragile site requiring BrdU for expression. *American Journal of Human Genetics* 32, 542-548.
- Sutherland, G. R., Parslow, M. I., and Baker, E. (1985). New classes of common fragile sites induced by 5-azacytidine and bromodeoxyuridine. *Hum Genet* 69, 233-237.
- Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1995a). Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *PNAS* 92, 3636-3641.
- Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1995b). The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Current Opinion in Genetics and Development* 5, 323-327.
- Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1999). Fragile sites-cytogenetic similarity with molecular diversity. *Am J Hum Genet* 64, 354-359.
- Sy, S. M., Wong, N., Lai, P. B., To, K. F., and Johnson, P. J. (2004). Regional over-representations on chromosomes 1q, 3q and 7q in the progression of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol*.
- Szepietowski, P., Perucca-Lostanlen, D., and Gaudray, P. (1993). Mapping genes according to their amplification status in tumor cells: contribution to the map of 11q13. *Genomics* 16, 745-750.
- Takahashi, E., Hori, T., and Murata, M. (1988a). Population cytogenetics of rare fragile sites in Japan. *Hum Genet* 78, 121-126.
- Takahashi, E., Kaneko, Y., Ishihara, T., Minamihisamatsu, M., Murata, M., and Hori, T. (1988b). A new rare distamycin A-inducible fragile site, fra(11) (p15.1), found in two acute nonlymphocytic leukemia (ANLL) patients with t(7;11)(p15-p13;p15). *Hum Genet* 80, 124-126.
- Takahashi, T., Haruki, N., Nomoto, S., Masuda, A., Saji, S., and Osada, H. (1999). Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers. *Oncogene* 18, 4295-4300.
- Takeda, D. Y., and Dutta, A. (2005). DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* 24, 2827-2843.
- Tanaka, T. U. (2002). Bi-orienting chromosomes on the mitotic spindle. *Curr Opin Cell Biol* 14, 365-371.
- Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B., and Yu, H. (2001). Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell* 1, 227-237.
- Tang, Z., Shu, H., Oncel, D., Chen, S., and Yu, H. (2004a). Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 Provides a Catalytic Mechanism for APC/C Inhibition by the Spindle Checkpoint. *Mol Cell* 16, 387-397.
- Tang, Z., Sun, Y., Harley, S. E., Zou, H., and Yu, H. (2004b). Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis. *PNAS* 101, 18012-18017.

- Tanudji, M., Shoemaker, J., L'Italien, L., Russell, L., Chin, G., and Schebye, X. M. (2004). Gene silencing of CENP-E by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay. *Mol Biol Cell* *15*, 3771-3781.
- Tatarelli, C., Linnenbach, A., Mimori, K., and Croce, C. M. (2000). Characterization of the human TESTIN gene localized in the FRA7G region at 7q31.2. *Genomics* *68*, 1-12.
- Taylor, S. S., Ha, E., and McKeon, F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol* *142*, 1-11.
- Taylor, S. S., Hussein, D., Wang, Y., Elderkin, S., and Morrow, C. J. (2001). Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *J Cell Sci* *114*, 4385-4395.
- Taylor, S. S., and McKeon, F. (1997). Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* *89*, 727-735.
- Tedeschi, B., Vernole, P., Sanna, M. L., and Nicoletti, B. (1992). Population cytogenetics of aphidicolin-induced fragile sites. *Hum Genet* *89*, 543-547.
- Terada, Y., Imoto, I., Nagai, H., Suwa, K., Momoi, M., Tajiri, T., Onda, M., Inazawa, J., and Emi, M. (2001). An 8-cM interstitial deletion on 4q21-q22 in DNA from an infant with hepatoblastoma overlaps with a commonly deleted region in adult liver cancers. *Am J Med Genet* *103*, 176-180.
- Thorland, E. C., Myers, S. L., Gostout, B. S., and Smith, D. I. (2003). Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* *22*, 1225-1237.
- Thorland, E. C., Myers, S. L., Persing, D. H., Sarkar, G., McGovern, R. M., Gostout, B. S., and Smith, D. I. (2000). Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* *60*, 5916-5921.
- Tibbetts, R. S., Cortez, D., Brumbaugh, K. M., Scully, R., Livingston, D., Elledge, S. J., and Abraham, R. T. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* *14*, 2989-3002.
- Toledo, F., Buttin, G., and Debatisse, M. (1993). The origin of chromosome rearrangements at early stages of *AMPD2* gene amplification in Chinese hamster cells. *Current Biol* *3*, 255-264.
- Toledo, F., Le Roscouet, D., Buttin, G., and Debatisse, M. (1992b). Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *Embo J* *11*, 2665-2673.
- Toledo, F., Smith, K. A., Buttin, G., and Debatisse, M. (1992a). The evolution of the amplified adenylate deaminase 2 domains in Chinese hamster cells suggests the sequential operation of different mechanisms of DNA amplification. *Mutat Res* *276*, 261-273.
- Trask, B. J., and Hamlin, J. L. (1989). Early dihydrofolate reductase gene amplification events in CHO cells usually occur on the same chromosome arm as the original locus. *Genes Dev* *3*, 1913-1925.
- Trielli, M. O., Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., and Margolis, R. L. (1996). Differential Taxol-dependent arrest of transformed and nontransformed cells in the G1 phase of the cell cycle, and specific-related mortality of transformed cells. *J Cell Biol* *135*, 689-700.
- Tsuiki, H., Nitta, M., Tada, M., Inagaki, M., Ushio, Y., and Saya, H. (2001). Mechanism of hyperploid cell formation induced by microtubule inhibiting drug in glioma cell lines. *Oncogene* *20*, 420-429.
- Turner, B. C., Ottey, M., Zimonjic, D. B., Potoczek, M., Hauck, W. W., Pequignot, E., Keck-Waggoner, C. L., Seignani, C., Aldaz, C. M., McCue, P. A., *et al.* (2002). The fragile histidine triad/common chromosome fragile site 3B locus and repair-deficient cancers. *Cancer Res* *62*, 4054-4060.
- Uetake, Y., and Sluder, G. (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *J Cell Biol* *165*, 609-615.
- Vagnarelli, P., and Earnshaw, W. C. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*.
- Vagnarelli, P., Morrison, C., Dodson, H., Sonoda, E., Takeda, S., and Earnshaw, W. C. (2004). Analysis of Scc1-deficient cells defines a key metaphase role of vertebrate cohesin in linking sister kinetochores. *EMBO Rep* *5*, 167-171.
- VanDevanter, D. R., and Yirdaw, G. (1993). Recombination between separate *MYC* amplification structures in COLO320 cells. *Genes Chrom Cancer* *6*, 190-197.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F. P., and *et al.* (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a

- CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65, 905-914.
- Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbe, J. C., Castro, A., and Lorca, T. (2004). Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell* 15, 4584-4596.
- Viguera, E., Canceill, D., and Ehrlich, S. D. (2001). Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J* 20, 2587-2595.
- Vogel, C., Kienitz, A., Hofmann, I., Muller, R., and Bastians, H. (2004). Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene* 23, 6845-6853.
- Vogel, C., Kienitz, A., Muller, R., and Bastians, H. (2005). The Mitotic Spindle Checkpoint Is a Critical Determinant for Topoisomerase-based Chemotherapy. *J Biol Chem* 280, 4025-4028.
- Von Hoff, D. D., Forseth, B., Clare, C. N., Hansen, K. L., and VanDevanter, D. (1990). Double minutes arise from circular extrachromosomal DNA intermediates which integrate into chromosomal sites in human HL-60 leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation* 85, 1887-1895.
- Wahl, G. M. (1989). The importance of circular DNA in mammalian gene amplification. *Cancer Res* 49, 1333-1340.
- Wang, F., Denison, S., Lai, J. P., Philips, L. A., Montoya, D., Kock, N., Schule, B., Klein, C., Shridhar, V., Roberts, L. R., and Smith, D. I. (2004a). Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 40, 85-96.
- Wang, L., Darling, J., Zhang, J. S., Huang, H., Liu, W., and Smith, D. I. (1999). Allele-specific late replication and fragility of the most active common fragile site, FRA3B. *Hum Mol Genet* 8, 431-437.
- Wang, L., Paradee, W., Mullins, C., Shridhar, R., Rosati, R., Wilke, C. M., Glover, T. W., and Smith, D. I. (1997). Aphidicolin-induced FRA3B breakpoints cluster in two distinct regions. *Genomics* 41, 485-488.
- Wang, Q., Liu, T., Fang, Y., Xie, S., Huang, X., Mahmood, R., Ramaswamy, G., Sakamoto, K. M., Darzynkiewicz, Z., Xu, M., and Dai, W. (2004b). BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. *Blood* 103, 1278-1285. Epub 2003 Oct 1223.
- Wang, X., Babu, J. R., Harden, J. M., Jablonski, S. A., Gazi, M. H., Lingle, W. L., de Groen, P. C., Yen, T. J., and van Deursen, J. M. (2001). The mitotic checkpoint protein hBUB3 and the mRNA export factor hRAE1 interact with GLE2p-binding sequence (GLEBS)-containing proteins. *J Biol Chem* 276, 26559-26567.
- Wang, X., Jin, D. Y., Ng, R. W., Feng, H., Wong, Y. C., Cheung, A. L., and Tsao, S. W. (2002). Significance of MAD2 expression to mitotic checkpoint control in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 62, 1662-1668.
- Wang, X., Jin, D. Y., Wong, Y. C., Cheung, A. L., Chun, A. C., Lo, A. K., Liu, Y., and Tsao, S. W. (2000). Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 21, 2293-2297.
- Wang, Y., Matsuda, S., Drews, V., Torashima, T., Meisler, M. H., and Yuzaki, M. (2003). A hot spot for hotfoot mutations in the gene encoding the delta2 glutamate receptor. *Eur J Neurosci* 17, 1581-1590.
- Wang, Y. H., Gellibolian, R., Shimizu, M., Wells, R. D., and Griffith, J. (1996). Long CCG triplet repeat blocks exclude nucleosomes: a possible mechanism for the nature of fragile sites in chromosomes. *J Mol Biol* 263, 511-516.
- Wang, Y. H., and Griffith, J. (1996). Methylation of expanded CCG triplet repeat DNA from fragile X syndrome patients enhances nucleosome exclusion. *J Biol Chem* 271, 22937-22940.
- Wang, Z., Cummins, J. M., Shen, D., Cahill, D. P., Jallepalli, P. V., Wang, T. L., Parsons, D. W., Traverso, G., Awad, M., Silliman, N., *et al.* (2004c). Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Res* 64, 2998-3001.
- Wassmann, K., and Benezra, R. (2001). Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11, 83-90.
- Wassmann, K., Liberal, V., and Benezra, R. (2003). Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *Embo J* 22, 797-806.
- Waters, J. C., Chen, R. H., Murray, A. W., and Salmon, E. D. (1998). Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol* 141, 1181-1191.



- Weaver, B. A., Bonday, Z. Q., Putkey, F. R., Kops, G. J., Silk, A. D., and Cleveland, D. W. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol* 162, 551-563.
- Weiss, E., and Winey, M. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene *MPS1* is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol* 132, 111-123.
- Weitzel, D. H., and Vandre, D. D. (2000). Differential spindle assembly checkpoint response in human lung adenocarcinoma cells. *Cell Tissue Res* 300, 57-65.
- Wells, R. D. (1996). Molecular Basis of Genetic Instability of Triplet Repeats. *J Biol Chem* 271, 2875-2878.
- White, P. J., Borts, R. H., and Hirst, M. C. (1999). Stability of the human fragile X (CGG)(n) triplet repeat array in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in aspects of DNA metabolism. *Mol Cell Biol* 19, 5675-5684.
- Wigge, P. A., and Kilmartin, J. V. (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J Cell Biol* 152, 349-360.
- Wilke, C. M., Guo, S. W., Hall, B. K., Boldog, F., Gemmill, R. M., Chandrasekharappa, S. C., Barcroft, C. L., Drabkin, H. A., and Glover, T. W. (1994). Multicolor FISH mapping of YAC clones in 3p14 and identification of a YAC spanning both FRA3B and the t(3; 8) associated with hereditary renal cell carcinoma. *Genomics* 22, 319-326.
- Wilke, C. M., Hall, B. K., Hoge, A., Paradee, W., Smith, D. I., and Glover, T. W. (1996). FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum Mol Genet* 5, 187-195.
- Williams, B. C., and Goldberg, M. L. (1994). Determinants of *Drosophila* zw10 protein localization and function. *J Cell Sci* 107 ( Pt 4), 785-798.
- Williams, B. C., Karr, T. L., Montgomery, J. M., and Goldberg, M. L. (1992). The *Drosophila* l(1)zw10 gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at anaphase onset. *J Cell Biol* 118, 759-773.
- Williams, B. C., Li, Z., Liu, S., Williams, E. V., Leung, G., Yen, T. J., and Goldberg, M. L. (2003). Zwilch, a new component of the ZW10/ROD complex required for kinetochore functions. *Mol Biol Cell* 14, 1379-1391.
- Windle, B., Draper, B. W., Yin, Y., O'Gorman, S., and Wahl, G. M. (1991). A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation and amplicon integration. *Genes Dev* 5, 160-174.
- Winey, M., and Byers, B. (1993). Assembly and functions of the spindle pole body in budding yeast. *Trends Genet* 9, 300-304.
- Winey, M., and Huneycutt, B. J. (2002). Centrosomes and checkpoints: the *MPS1* family of kinases. *Oncogene* 21, 6161-6169.
- Wojcik, E., Basto, R., Serr, M., Scaerou, F., Karess, R., and Hays, T. (2001). Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein. *Nat Cell Biol* 3, 1001-1007.
- Wong, C., and Stearns, T. (2005). Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biol* 6, 6.
- Wong, N., Lai, P., Pang, E., Fung, L. F., Sheng, Z., Wong, V., Wang, W., Hayashi, Y., Perlman, E., Yuna, S., *et al.* (2000). Genomic aberrations in human hepatocellular carcinomas of differing etiologies. *Clin Cancer Res* 6, 4000-4009.
- Wood, K. W., Sakowicz, R., Goldstein, L. S., and Cleveland, D. W. (1997). CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell* 91, 357-366.
- Wordeman, L., Steuer, E. R., Sheetz, M. P., and Mitchison, T. (1991). Chemical subdomains within the kinetochore domain of isolated CHO mitotic chromosomes. *J Cell Biol* 114, 285-294.
- Wu, H., Lan, Z., Li, W., Wu, S., Weinstein, J., Sakamoto, K. M., and Dai, W. (2000). p55CDC/hCDC20 is associated with BUBR1 and may be a downstream target of the spindle checkpoint kinase. *Oncogene* 19, 4557-4562.
- Xia, G., Luo, X., Habu, T., Rizo, J., Matsumoto, T., and Yu, H. (2004). Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *Embo J* 23, 3133-3143.

- Yakicier, M. C., Legoix, P., Vaury, C., Gressin, L., Tubacher, E., Capron, F., Bayer, J., Degott, C., Balabaud, C., and Zucman-Rossi, J. (2001). Identification of homozygous deletions at chromosome 16q23 in aflatoxin B1 exposed hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 20, 5232-5238.
- Yamaguchi, K., Okami, K., Hibi, K., Wehage, S. L., Jen, J., and Sidransky, D. (1999). Mutation analysis of hBUB1 in aneuploid HNSCC and lung cancer cell lines. *Cancer Lett* 139, 183-187.
- Yang, M. Y., and Long, S. E. (1993). Folate sensitive common fragile sites in chromosomes of the domestic pig (*Sus scrofa*). *Res Vet Sci* 55, 231-235.
- Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K. F., and Cleveland, D. W. (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol* 2, 484-491.
- Yazdi, P. T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, E. Y., and Qin, J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev* 16, 571-582.
- Yeh, S. H., Chen, P. J., Lai, M. Y., and Chen, D. S. (1996). Allelic loss on chromosomes 4q and 16q in hepatocellular carcinoma: association with elevated alpha-fetoprotein production. *Gastroenterology* 110, 184-192.
- Yen, T. J., Compton, D. A., Wise, D., Zinkowski, R. P., Brinkley, B. R., Earnshaw, W. C., and Cleveland, D. W. (1991). CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *Embo J* 10, 1245-1254.
- Yoon, Y. M., Baek, K. H., Jeong, S. J., Shin, H. J., Ha, G. H., Jeon, A. H., Hwang, S. G., Chun, J. S., and Lee, C. W. (2004). WD repeat-containing mitotic checkpoint proteins act as transcriptional repressors during interphase. *FEBS Lett* 575, 23-29.
- Yu, H. (2002). Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 14, 706-714.
- Yu, S., Mangelsdorf, M., Hewett, D., Hobson, L., Baker, E., Eyre, H. J., Lapsys, N., Le Paslier, D., Doggett, N. A., Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1997). Human chromosomal fragile site FRA16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat. *Cell* 88, 367-374.
- Yunis, J. J., and Soreng, A. L. (1984). Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226, 1199-1204.
- Yunis, J. J., Soreng, A. L., and Bowe, A. E. (1987). Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogene* 1, 59-69.
- Yuzaki, M. (2004). The delta2 glutamate receptor: a key molecule controlling synaptic plasticity and structure in Purkinje cells. *Cerebellum* 3, 89-93.
- Zanesi, N., Fidanza, V., Fong, L. Y., Mancini, R., Druck, T., Valtieri, M., Rudiger, T., McCue, P. A., Croce, C. M., and Huebner, K. (2001a). The tumor spectrum in FHIT-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10250-10255.
- Zecevic, M., Catling, A. D., Eblen, S. T., Renzi, L., Hittle, J. C., Yen, T. J., Gorbsky, G. J., and Weber, M. J. (1998). Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J Cell Biol* 142, 1547-1558.
- Zenklusen, J. C., Hodges, L. C., LaCava, M., Green, E. D., and Conti, C. J. (2000). Definitive functional evidence for a tumor suppressor gene on human chromosome 7q31.1 neighboring the Fra7G site. *Oncogene* 19, 1729-1733.
- Zhou, J., Panda, D., Landen, J. W., Wilson, L., and Joshi, H. C. (2002a). Minor alteration of microtubule dynamics causes loss of tension across kinetochore pairs and activates the spindle checkpoint. *J Biol Chem* 277, 17200-17208.
- Zhou, J., Yao, J., and Joshi, H. C. (2002b). Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci* 115, 3547-3555.
- Zimonjic, D. B., Druck, T., Ohta, M., Kastury, K., Croce, C. M., Popescu, N. C., and Huebner, K. (1997). Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the FHIT gene. *Cancer Res* 57, 1166-1170.
- Zirkle, R. E. (1970). Ultraviolet-microbeam irradiation of newt-cell cytoplasm: spindle destruction, false anaphase, and delay of true anaphase. *Radiat Res* 41, 516-537.
- Zlotorynski, E., Rahat, A., Skaug, J., Ben-Porat, N., Ozeri, E., Hershberg, R., Levi, A., Scherer, S. W., Margalit, H., and Kerem, B. (2003). Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Mol Cell Biol* 23, 7143-7151.
- Zollino, M., Zampino, G., Torrioli, G., Pomponi, M. G., and Neri, G. (1995). Further contribution to the description of phenotypes associated with partial 4q duplication. *Am J Med Genet* 57, 69-73.

Zuo, J., De Jager, P. L., Takahashi, K. A., Jiang, W., Linden, D. J., and Heintz, N. (1997). Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 388, 769-773.