



Caractérisation fonctionnelle de variations génétiques dans PALB2, un gène de susceptibilité au cancer du sein

Thèse

Mandy Ducey

Doctorat en médecine moléculaire
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Mandy Ducey, 2019

Caractérisation fonctionnelle de variations génétiques dans *PALB2*, un gène de susceptibilité au cancer du sein

Thèse

Mandy Ducy

Sous la direction de :

Jacques Simard, directeur de recherche
Jean-Yves Masson, codirecteur de recherche

Résumé

PALB2 (*Partner And Localizer of BRCA2*) est un gène de prédisposition au cancer du sein à forte pénétrance. En effet, les mutations pathogéniques dans *PALB2* augmentent le risque de développer la maladie de 8 à 9 fois pour les porteuses de moins de 40 ans et de 3 à 4 fois au cours de leur vie. À ce jour, environ 200 variations de type faux sens localisées dans *PALB2* ont été identifiées en clinique, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, mais très peu ont été caractérisées fonctionnellement. De plus, aucune méthode d'analyse fonctionnelle à grande échelle de ces variants de signification incertaine n'a été élaborée pour le moment. Par conséquent, les médecins et conseillers en génétique ne sont pas en mesure d'interpréter l'effet de ces variations en termes de risque et la prise de décision quant au suivi de ces porteuses, la communication de leur risque, la divulgation aux membres de la famille, le recours aux chirurgies préventives ou encore le choix des stratégies de traitement est complexe. La compréhension de l'effet des variations faux sens sur la fonction de *PALB2* est donc indispensable pour leur classification et leur interprétation en clinique.

PALB2 étant un médiateur de la réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue, nous avons proposé d'établir une méthode systématique d'essais biochimiques et cellulaires, centrée sur la fonction de *PALB2* dans la recombinaison homologue. Nous avons émis l'hypothèse que cette méthode de caractérisation fonctionnelle est suffisante pour classer ces variants comme bénins ou délétères pour la fonction de *PALB2* dans la recombinaison homologue.

Ainsi, au cours de mon doctorat, j'ai participé à la caractérisation fonctionnelle d'une centaine de variations faux sens ainsi qu'une mutation tronquante localisées dans *PALB2*. Nos travaux montrent que notre méthode systématique est pertinente pour la caractérisation fonctionnelle des variants de signification incertaine. En effet, nous avons identifié plusieurs variants faux sens qui présentent des défauts importants ou intermédiaires de recombinaison homologue et qui favorisent ainsi l'instabilité génomique et la carcinogénèse. Enfin, nous avons montré que le score de formation de foyers RAD51 est un bon marqueur des tumeurs de cancer du sein avec des défauts de recombinaison homologue sensibles aux traitements basés sur les inhibiteurs de PARP.

Table des matières

Résumé	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xv
Avant-propos	xvii
Introduction	1
1 Le cancer du sein	1
1.1 Le cancer du sein, incidence & mortalité	1
1.2 Développement du cancer du sein	2
1.3 Classification histologique des cancers du sein	4
1.4 Les sous-types moléculaires du cancer du sein	5
2 Facteurs de risque et prédisposition aux cancers du sein	8
2.1 Facteurs de risque du cancer du sein	8
2.2 Prédisposition au cancer du sein	11
2.3 Identification des femmes à risque : enjeux cliniques & outils	14
2.3.1 Les enjeux cliniques	14
2.3.2 Les outils de classification	15
3 <i>PALB2</i> , un gène de susceptibilité au cancer du sein	17
3.1 Maladies associées aux variations génétiques dans <i>PALB2</i>	17
3.1.1 <i>PALB2</i> et le cancer du sein	17
3.1.2 <i>PALB2</i> et les autres cancers	22
3.1.3 <i>PALB2</i> et l'anémie de Fanconi	23
3.2 <i>PALB2</i> , médiateur de la réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue	26
3.2.1 La réponse aux cassures double-brin de l'ADN	26
3.2.2 <i>PALB2</i> et la recombinaison homologue	28
3.3 Structure et régulation de <i>PALB2</i>	31
3.3.1 Restriction de la recombinaison homologue aux phases S/G2 du cycle cellulaire par KEAP1-CRL3 et USP11	31
3.3.2 Stimulation de la recombinaison homologue en phase S/G2 du cycle cellulaire par RFN168 ..	33
3.3.3 Régulation du complexe BRCA1-PALB2 suite aux dommages à l'ADN	34

3.3.4	Rôle de PALB2 dans le contrôle de l'homéostasie	36
3.3.5	Association à la chromatine	38
3.3.6	PALB2 et le stress réplicatif	38
3.3.7	Régulation de la fonction de PALB2 dans la stabilité du génome par son domaine WD40	41
4	Létalité synthétique et stratégie thérapeutique contre le cancer du sein	43
4.1	Principe de létalité synthétique	43
4.2	Défauts de recombinaison homologe et sensibilité aux PARPi	45
4.3	PARP-1	46
4.4	Utilisation des PARPi pour le traitement des tumeurs	47
	Problématique, hypothèses et objectifs de recherche	50
1	CHAPITRE 1 - The tumor suppressor PALB2: inside out	53
1.1	Avant-propos	54
1.2	Résumé	55
1.3	Abstract	56
1.4	The Discovery of PALB2	57
1.5	Functions of PALB2 in DSB Repair	57
1.6	Mechanisms of Regulation of PALB2	58
1.7	PALB2 and Oxidative Stress	59
1.8	PALB2 and its Major Interactor MRG15	59
1.9	PALB2 and Diseases: Fanconi Anemia and Breast Cancer	60
1.10	Functional Validation of Cancer Mutations	63
1.11	Concluding Remarks and Future Perspectives	65
1.12	Outstanding Questions	66
1.13	Figures	67
1.14	References	73
2	CHAPITRE 2 - Functional characterization of 84 PALB2 variants of uncertain significance	79
2.1	Avant-propos	80
2.2	Résumé	81
2.3	Abstract	82
2.4	Introduction	83
2.5	Results	84
2.5.1	Selection of <i>PALB2</i> variants for functional studies	84
2.5.2	Homology directed repair (HDR) assay	84
2.5.3	Mammalian two-hybrid assay of BRCA1 and BRCA2 interactions	85

2.5.4	DNA damage-dependent PALB2 protein complexes	85
2.5.5	PALB2 protein stability	86
2.5.6	Cellular localization of PALB2 and assessment of RAD51 foci formation.....	86
2.5.7	Sensitivity to DNA damaging agents	86
2.6	Discussion.....	87
2.7	Materials and Method	90
2.8	References.....	93
2.9	Figures legends	96
2.10	Supplementary Material	101
3	CHAPITRE 3 – A global functional analysis of missense mutations reveals two major hotspots in the PALB2 tumor suppressor	104
3.1	Avant-propos.....	105
3.2	Résumé.....	106
3.3	Abstract.....	107
3.4	Introduction	108
3.5	Results	110
3.5.1	A systematic approach to identify variants with deleterious effects on PALB2 functions.....	110
3.5.2	Functional validation of <i>PALB2</i> variants by a two-hybrid assay	111
3.5.3	Prioritization of variants and <i>in silico</i> prediction analysis.....	111
3.5.4	PALB2 cellular localization and recruitment kinetics	113
3.5.5	RAD51 foci formation and CRISPR-LMNA HDR assays	113
3.6	Discussion.....	115
3.7	Materials and Methods.....	119
3.8	Figure & Legends.....	124
3.9	References.....	143
3.10	Supplemental figures	148
4	CHAPITRE 4 – Criblage fonctionnel de 10 variations génétiques faux sens dans le gène de susceptibilité au cancer du sein <i>PALB2</i>	157
4.1	Avant-propos.....	158
4.2	Résumé.....	159
4.3	Introduction	160
4.4	Matériel et méthode	162
4.5	Résultats	164
4.5.1	Sélection des variations d'intérêts.....	164

4.5.2	Caractérisation fonctionnelle des variants du ChAM.....	166
4.5.3	Caractérisation fonctionnelle des variants du WD40.....	167
4.6	Discussion.....	169
4.7	Tableau supplémentaire	171
4.8	Références.....	172
5	CHAPITRE 5. A RAD51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation.....	174
5.1	Avant-propos.....	176
5.2	Résumé.....	177
5.3	Abstract.....	178
5.4	Introduction	179
5.5	Results	181
5.5.1	Olaparib antitumor activity in a non- <i>gBRCA</i> BC patient-derived tumor xenograft (PDX) panel distinguishes a subset of tumors highly sensitive to PARPi	181
5.5.2	HRR-related somatic alterations and PARPi sensitivity in PDX.....	181
5.5.3	Lack of RAD51 nuclear foci is associated with PARPi sensitivity	182
5.5.4	RAD51 score predicts PDX's response to PARPi in an independent cohort	183
5.5.5	Scoring RAD51 in clinical samples identifies HRR-deficient tumors among patients with hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome, including <i>PALB2</i> -related tumors.....	184
5.6	Discussion.....	185
5.7	Figures & Legends.....	187
5.8	Materials and Methods.....	196
5.9	References.....	204
5.10	Supplementary figures	212
6	Discussion	214
	Conclusion.....	226
	References.....	227
	Annexes.....	243

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1 – Morphologie et histologie de la glande mammaire adulte d'une femme	3
Figure 2 – Répartition des carcinomes lobulaires et canaux dans les cas de cancer du sein	4
Figure 3 – Classification moléculaire des cancers du sein	7
Figure 4 – Susceptibilité génétique du cancer du sein dans la population générale	11
Figure 5 – Classification des gènes de susceptibilité au cancer du sein	12
Figure 6 – Les variants génétiques qui prédisposent au cancer du sein	13
Figure 7 – Chronologie de l'association de PALB2 au cancer du sein	21
Figure 8 – Les principales voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN	27
Figure 9 – Mécanisme de la recombinaison homologe	30
Figure 10 – Structure et domaines fonctionnels de PALB2	31
Figure 11 – Restriction de la recombinaison homologe aux phases S/G2 du cycle cellulaire par KEAP1-CRL3 et USP11	32
Figure 12 – Recrutement de PALB2 à la chromatine dépendamment de RNF-168	34
Figure 13 – Régulation du complexe BRCA1-PALB2 suite aux dommages à l'ADN	35
Figure 14 – Rôle de PALB2 dans le contrôle de l'homéostasie	37
Figure 15 – PALB2 et le stress réplicatif	40
Figure 16 – Régulation de la localisation cellulaire de PALB2 par une séquence NES	42
Figure 17 – Principe de létalité synthétique dans le contexte de la réparation des cassures double-brin	44

CHAPITRE 1

Figure 1.1 – Partner and Localizer for BRCA2 (PALB2) Is a Mediator in the Homologous Repair (HR) Pathway.	68
Figure 1.2 – Partner and Localizer for BRCA2 (PALB2) Regulation via Cell Cycle and Functional Domains. ...	69
Figure 1.3 – Partner and Localizer for BRCA2 (PALB2) Missense Variations found in Patients with Breast Cancer.	70
Figure 1.4 – Functional assays for the characterization of Partner and Localizer for BRCA2 (PALB2) variants.	71

CHAPITRE 2

Figure 2.1 – Homology Directed Repair assay of <i>PALB2</i> variants	96
Figure 2.2 – Mammalian two-hybrid based protein-protein interaction.	97
Figure 2.3 – Influence of <i>PALB2</i> variants on protein complex formation and protein half-life	98
Figure 2.4 – Influence of <i>PALB2</i> variants on response to DNA damage	99
Figure 2.5 – Sensitivity to DNA damaging agents	100
Figure S2.1 – CRISPR-LMNA HRD assay	101

CHAPITRE 3

Figure 3.1 – Sensitivity of <i>PALB2</i> variants to PARP inhibitor olaparib	125
Figure 3.2 – Impact of <i>PALB2</i> variants on BRCA1 and BRCA2 interaction	127
Figure 3.3 – Subcellular localization and recruitment of <i>PALB2</i> variants to DNA damage	129
Figure 3.4 – RAD51 foci formation in <i>PALB2</i> variants.	131
Figure 3.5 – <i>PALB2</i> variants showing altered RAD51 foci intensity	133

Figure 3.6 – HDR activity of <i>PALB2</i> variants using the CRISPR-LMNA system.....	135
Figure 3.7 – Profile of functionality of prioritized <i>PALB2</i> variants.	137
Figure S3.1 – Survival curves for <i>PALB2</i> variants with moderate sensitivity to PARP inhibitor olaparib (red). 148	
Figure S3.2 – Survival curves for <i>PALB2</i> variants showing resistance to PARP inhibitor olaparib (green) similar to wild-type.	150
Figure S3.3 – Expression levels of <i>PALB2</i> variants in the mammalian two-hybrid analysis.....	151
Figure S3.4 – Structural impact of the prioritized variants using HOPE analysis.....	153
Figure S3.5 – Expression levels of the prioritized <i>PALB2</i> variants in HeLa cells.....	154
Figure S3.6 – Correlations between functional assays.	155
Figure S3.7 – Correlations between <i>in silico</i> predictions and response to olaparib.....	156
 CHAPITRE 4	
Figure 4.1 – Localisation des variants faux sens de <i>PALB2</i> sélectionnés.....	164
Figure 4.2 – Prédiction de la pathogénicité pour les variations sélectionnées.....	165
Figure 4.3 – Caractérisation des variants du ChAM.....	167
Figure 4.4 – Caractérisation des variants du WD40.....	168
 CHAPITRE 5	
Figure 5.1 – The antitumor activity of olaparib in PDXs identifies a subset of PARPi-sensitive tumors.	187
Figure 5.2 – HRR-related alterations in PDX cohort-1 and PARPi response.....	189
Figure 5.3 – Lack of RAD51 nuclear foci identifies PARPi-sensitive PDX tumors.	190
Figure 5.4 – RAD51 score predicts PDX response to PARPi in an independent PDX panel (cohort-2).....	192
Figure 5.5 – RAD51 score in tumors from patients with HBOC syndrome, including germline <i>PALB2</i> -mutation carriers.....	195
Figure S5.1 –	212
 CHAPITRE 6	
Figure 6.1 – Corrélation entre CRISPR-LMNA et foyers RAD51	220
Figure 6.2 – Corrélation entre CRISPR-LMNA et PARPi	220
Figure 6.3 – Corrélation entre PARPi et foyers RAD51	221

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Tableau 1 – Risque relatif de cancer du sein en fonction de l’histoire familiale	10
Tableau 2 – Caractéristiques des inhibiteurs de PARP	49

CHAPITRE 1

Table 1.1 – Compounds Effective against PALB2 and/or HR-Deficient Cells for Synthetic Lethal Studies	72
--	----

CHAPITRE 2

Table S2.1 – Homology directed repair activity and predicted deleterious effects of 84 PALB2 VUSs	103
---	-----

CHAPITRE 3

Table S3.1 – <i>In silico</i> characterization for 44 PALB2 missense VUS	138
Table S3.2 – Pathogenicity prediction of PALB2 VUSs of interest	140
Table S3.3 – List of primers	142

CHAPITRE 4

Tableau S4.1 – Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée	171
---	-----

CHAPITRE 6

Tableau 6.1 – Résumé des informations concernant les VUSs de PALB2 localisés en N-terminal analysés .	218
Tableau 6.2 – Résumé des informations concernant les VUSs de PALB2 localisés en C-terminal analysés .	219

Liste des abréviations

53BP1	“p53-Binding Protein 1”
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Anémie de Fanconi
AKT	“Protein Kinase B”
Alt-NHEJ	“Alternative Non-Homologous End Joining ”
AR	“Androgen Receptor”
ARE	“Antioxidant Response Element”
ARN	Acide Ribonucléique
ATM	“Ataxia-Telangiectasia Mutated”
BER	“Base Excision Repair”
BLM	“Bloom syndrome Mutated protein”
Boucle-D	boucle de déplacement
BRCA1	“Breast Cancer susceptibility gene 1”
BRCA2	“Breast Cancer susceptibility gene 2”
BRCT	“BRCA1 C-Terminus”
cAMP	“cyclic Adenosine Monophosphate”
CDB	Cassure Double-Brin
CDH1	“Cadherin 1”
CDK	“Cyclin-Dependent Kinase”
ChAM	“Chromatine-Association Motif”
CHEK1	“Checkpoint Kinase 1”
CHEK2	“Checkpoint Kinase 2”
CK5	“Cytokeratine 5”
CO	Cancer Ovarien
Coll.	Collaborateurs
CP	Cancer du Pancréas
CPr	Cancer de la Prostate
CPT	“Camptothecin”
CRL3	“CULLIN3(CUL)-RING Ligase”
CRM1	“Chromosome Region Maintenance 1”
CS	Cancer du Sein
CtIP	“C-terminal binding protein 1 Interaction Protein”
CUL4	“CULLIN4”

DDR	<i>"DNA Damage Response"</i>
DNA2	<i>"DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease 2"</i>
DNA PK	<i>"DNA Phosphatidylinositol 3-kinase-related Kinase"</i>
DNA PKcs	<i>"DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit"</i>
DSBR	<i>"Double-Strand Break Repair"</i>
EGFR	<i>"Epidermal Growth Factor Receptor"</i>
ER	<i>"Estrogen Receptor"</i>
ER-alpha	<i>"Estrogen Receptor alpha"</i>
ER-beta	<i>"Estrogen Receptor beta"</i>
ERCC1	<i>"Excision Repair Cross-Complementation group 1"</i>
ERK	<i>"Extracellular signal-Regulated Kinase"</i>
ESR1	<i>"Estrogen Receptor 1"</i>
EXO1	<i>"Exonuclease 1"</i>
FA-N	<i>"Fanconi Anemia complementation group N"</i>
FANCN	<i>"Fanconi Anemia complementation group N gene"</i>
FCI	<i>"Floated Confidence Interval"</i>
FDA	<i>"Food and Drug Administration"</i>
FOXA1	<i>"Hepatocyte Nuclear Factor 3 Alpha"</i>
FRR	<i>"Familial Relative Risk"</i>
GATA	<i>"GATA binding protein 3"</i>
gBRCA1	<i>"germinalBRCA1"</i>
gBRCA2	<i>"germinalBRCA2"</i>
GFP	<i>"Green Fluorescent Protein"</i>
gPALB2	<i>"germinalPALB2"</i>
GPER1	<i>"G Protein-coupled Estrogen Receptor 1"</i>
GWAS	<i>"Genome Wide Association Study"</i>
H2AX	Histone 2A membre X
HAT	<i>"Histone Acetyl Transferase"</i>
HDAC	<i>"Histone Deacetyl transferase"</i>
HER2	<i>"Human Epidermal growth factor Receptor 2"</i>
HR	<i>"Hazard Ratio"</i>
HRD	<i>"Homologous Recombination Deficiency"</i>
IC	Intervalle de Confiance
ICL	<i>"DNA Intercross Link"</i>
IR	<i>"Ionizing Radiation"</i>

kDa	kiloDalton
KEAP1	<i>"Kelch-like ECH-Associated Protein 1"</i>
KO	<i>"Knock-Out"</i>
Ku70/80	Sous-unités 70/80 kDa de l'antigène Ku
LIG4	<i>"ADN Ligase 4"</i>
LOH	<i>"Loss Of Heterozygosity"</i>
MBD	<i>"MRG15 Binding Domain"</i>
MISS	<i>"Membrane Initiated Steroid Signaling"</i>
MMC	<i>"Mitomycin C"</i>
MMEJ	<i>"Microhomology-Mediated End Joining"</i>
MRE11	<i>"Meiotic Recombination 11"</i>
MRG15	<i>"MORF-Related Gene on chromosome 15"</i>
MRN	<i>"Mre11, Rad50 and Nbs1 complex"</i>
MUS81	<i>"MMS and UV Sensitive protein 81"</i>
NAD	<i>"Nicotinamide Adenine Dinucleotide"</i>
NER	<i>"Nucleotide Excision Repair"</i>
NES	<i>"Nuclear Export Signal"</i>
NHEJ	<i>"Non-Homologous End Joining"</i>
NRF2	<i>"Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2"</i>
OR	<i>"Odd Ratio"</i>
PALB2	<i>"Partner And Localizer of BRCA2"</i>
PARP-1	<i>"poly(ADP-ribose) polymerase 1"</i>
PARPi	inhibiteur de PARP
pCR	<i>"pathological Complete Response"</i>
PI3K	<i>"Phosphoinositide 3-Kinase"</i>
PID	<i>"PALB2 Interacting Domain"</i>
POLH	Polymérase éta
PR	<i>"Progesterone Receptor"</i>
PTEN	<i>"Phosphatase and Tensing homolog"</i>
RAD51	<i>"Radiation gene 51"</i>
RH	Recombinaison Homologue
RNA	<i>"Ribonucleic Acid"</i>
RNF8	<i>"Ring Finger protein 8"</i>
RNF168	<i>"Ring Finger protein 168"</i>
ROS	<i>"Reactive Oxygen Species"</i>

RPA	<i>“Replication Protein A”</i>
RR	Risque Relatif
SB	Simple-Brin
SCE	<i>“Sister Chromatid Exchange”</i>
SDSA	<i>“Synthesis-Dependent Strand Annealing”</i>
SETD2	<i>“SET Domain containing 2”</i>
shRNA	<i>“small hairpin RNA”</i>
SSA	<i>“Single Strand Annealing”</i>
STK11	<i>“Serine Threonine Kinase 1”</i>
TFF1	<i>“Trefoil Factor 3”</i>
TNBC	<i>“Triple Negative Breast Cancer”</i>
TOP3	<i>“DNA Topoisomerase I”</i>
TP53	<i>“Tumor Protein 53”</i>
USP11	<i>“Ubiquitin Specific Peptidase 11”</i>
UV	rayonnement Ultra-Violet
V(D)J	<i>“Variable (Diversity) and Joining”</i>
VUS	<i>“Variant of Uncertain Significance”</i>
WD40	<i>“WD repeat of 40 amino acids”</i>
WT	<i>“Wild-Type”</i>
XBP1	<i>“X-box Binding Protein 1”</i>
XPF	<i>“Xeroderma Pigmentosum group F-complementing protein”</i>
XRCC1	<i>“X-ray Repair Cross-Complementing protein 1”</i>
ZFN	<i>“Zinc Finger Nuclease”</i>

*“Shoot for the moon. Even if you miss, you’ll land
among the stars.”* Norman Vincent Peale

Remerciements

Au cours de mes trois années de doctorat, j'ai eu l'immense chance d'être entourée de personnes brillantes et généreuses sans lesquelles je n'aurais pas pu réaliser ce rêve. Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnées dans cette folle aventure !

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Dr Jacques Simard et mon co-directeur Dr Jean-Yves Masson. Jacques, merci de m'avoir donné ma chance et d'avoir cru en moi. Jean-Yves, je te remercie de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire et d'avoir accepté de me co-superviser. Ensemble, vous m'avez fourni le plus complet des environnements de travail. Comme Hannah Montana, je me suis souvent répétée « *You get the best of both worlds, mix it all together and you know that it's the best of both worlds* ». Je me sens très chanceuse d'avoir pu évoluer dans les univers que vous avez créés et d'avoir été le témoin de votre passion pour vos domaines de recherche respectifs. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance pour participer à un si beau projet de recherche et d'avoir contribué à mon développement scientifique. Vos enseignements restent avec moi et je ferai de mon mieux pour en faire le meilleur usage possible durant le reste de ma carrière.

Je souhaiterais aussi remercier nos collaborateurs, Dre Violeta Serra, Dr Fergus Couch, Dr Alvaro Monteiro, Dr Marcelo Carvalho et leurs équipes respectives, pour leur confiance et leur grande contribution à mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier les évaluateurs de ma thèse, Dre Francine Durocher, Dr Guy Poirier, Dr George Zogopoulos, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je voudrais maintenant remercier tous les professionnels de recherche des laboratoires des Dr Simard et Dr Masson, avec une attention particulière pour Penny, Amélie, Marie-Christine, Stéphane et Yan, qui m'ont tant apporté. Gang, vous êtes les meilleurs professionnels du monde de l'univers ! Merci pour le temps que vous avez pris à me former, à répondre à mes questions, à m'épauler dans la réalisation de mes projets, à me raconter des blagues et me soutenir dans les moments les plus difficiles et stressants de mon doctorat. Je n'aurais jamais pu y arriver sans vous. Je suis tellement reconnaissante d'avoir eu la chance de travailler avec vous, vous êtes tout simplement géniaux !

Je tiens aussi à remercier mes camarades de paillasse, Laura, Julia, Daryl, Laure, Nadine, Thibaut, Yuandi et Frannie. Merci d'avoir fait vos armes avec moi, merci pour les fous rires et les discussions en tout genre, merci pour les brunchs à Cacao70. Mon doctorat n'aurait pas été le même sans vous. Je vous souhaite

la meilleure des continuations et un bel épanouissement scientifique ET personnel (parce qu'il n'y a pas que le lab dans la vie). J'aimerais aussi remercier Annabanana et Alissoubidou pour leur soutien dans cette dernière ligne droite. Notre aventure ne fait que commencer ! PS : Vous êtes belles, vous êtes bonnes, vous êtes capables !

Je souhaiterais enfin remercier ma famille pour leur amour inconditionnel et les sacrifices qu'ils ont faits pour me soutenir tout au long de ce chapitre. Maman et Lylou, merci de m'avoir laissé partir à 5 000 km pour réaliser mon rêve, merci pour vos encouragements et votre soutien. Je vous aime jusqu'à l'infini et l'au-delà. Kevin, tu mérites une médaille pour ta patience et ton soutien plus qu'exemplaire durant ma thèse. Merci d'avoir compris à quel point cette thèse était importante pour moi, d'avoir écouté les répétitions de mes présentations orales, d'avoir accepté que mes manip' me prennent toujours plus de temps que ce que je pense et de mes retards conséquents. Merci pour tes discours et encouragements qui m'ont permis de vivre pleinement ce doctorat. Promis, je deviens bientôt une adulte !

Merci encore à tous pour votre aide et votre soutien inestimables. Certains noms manquent à l'appel mais sachez que votre aide et votre joie de vivre ne sont pas passées inaperçues et sont très appréciées.

Je vous souhaite une bonne lecture, sinon je vous souhaite d'apprécier les jolis dessins.

Avant-propos

Au cours de mes 3 années de doctorat au sein des laboratoires des Dr Jaques Simard et Dr Jean-Yves Masson, j'ai eu la chance de participer à la caractérisation fonctionnelle d'une centaine de variants faux sens et tronquants, localisés dans le gène de susceptibilité au cancer du sein *PALB2*.

Mes travaux de recherche ont abouti à l'écriture d'une revue de littérature sur ma protéine d'intérêt *PALB2*. Cette revue a été publiée en Mars 2019 dans le journal *Trends in Biochemical Sciences* et fait l'objet du chapitre 2. J'ai participé à l'écriture et la correction du manuscrit, j'ai aussi réalisé toutes les figures et recensé les variations de *PALB2*, me plaçant ainsi première auteure.

J'ai aussi eu l'opportunité de collaborer avec les Dr Fergus Couch, Dr Alvaro Monteiro, Dr Marcelo Carvalho et Dre Violeta Serra pour la caractérisation fonctionnelle de variations de *PALB2*. Chacune de ces collaborations fait l'objet d'un chapitre dans lequel je présente le manuscrit qui a été soumis (chapitres 3 et 4) ou publié (chapitre 6). Ainsi, j'ai participé aux expériences de caractérisation des variations de *PALB2*, à l'écriture et à la correction des manuscrits et enfin au montage des figures des données que j'ai récoltées. Les travaux effectués dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe du Dre Serra ont été publiés en Novembre 2018 dans le journal *EMBO Molecular Medicine*.

Enfin, j'ai eu la chance de cribler 10 variants faux sens de *PALB2* dont les résultats sont présentés dans le chapitre 5. J'ai effectué la sélection et l'analyse de ces variants seule. Ce travail en cours s'inscrit dans le cadre de notre collaboration avec le Dr Alvaro Monteiro et ne fait pas l'objet d'un article pour le moment

Introduction

1 Le cancer du sein

1.1 Le cancer du sein, incidence & mortalité

Avec 26 300 nouveaux cas et 5 000 décès estimés en 2017 au Canada, le cancer du sein (CS) est le cancer le plus répandu et la deuxième cause de mortalité par cancer chez la femme. On estime ainsi qu'une canadienne sur huit développera cette maladie au cours de sa vie et qu'une sur trente-et-une en mourra. Bien que le CS touche principalement les femmes, 1% des cas sont diagnostiqués chez l'homme. Ainsi il est estimé qu'en 2017, 230 hommes ont reçu un diagnostic et 60 hommes sont décédés d'un CS au Canada. Enfin, la survie moyenne à 5 ans des personnes ayant un CS est de 87% pour les femmes et 79% pour les hommes. Il est important de noter que la survie des patients varie en fonction du grade de la tumeur au moment du diagnostic. En effet, la survie nette à 5 ans des patientes de CS est de 100% pour les femmes diagnostiquées avec une tumeur de grade 0 ou 1, 93% pour le grade 2, 73% pour le grade 3 et enfin 22% pour le grade 4 [1].

Dans les pays occidentaux, une augmentation de l'incidence du CS d'environ 30% a été observée dans les années 80-90. Cette hausse semble refléter l'augmentation du dépistage par mammographie, les changements dans les habitudes de reproduction, ainsi que l'augmentation de l'utilisation de thérapies hormonales de substitution afin de traiter les symptômes de la ménopause. L'incidence du CS a montré un ralentissement au début des années 2000, ce qui coïnciderait avec la publication de plusieurs études sur l'augmentation du risque de CS pour les femmes ménopausées qui utilisent les thérapies hormonales de substitution [2, 3]. La stabilisation du taux d'incidence pourrait aussi refléter le plateau atteint dans la participation aux programmes de dépistage.

D'autre part, les taux de mortalité ont diminué dans les pays à revenu élevé au milieu des années 90 grâce à une détection plus précoce et une amélioration des traitements. L'incidence et le taux de mortalité continuent néanmoins d'augmenter dans les pays pauvres en raison d'un accès limité aux méthodes de détection précoce et traitements ainsi que l'évolution des facteurs de risque [1, 4].

Malgré les grands progrès en recherche biomédicale, tant sur le plan de la stratification de la maladie, que sur le plan du dépistage et des traitements, le CS affecte une partie considérable de la communauté canadienne et la réponse aux thérapies ciblées ou chimiothérapies reste souvent imprévisible [5]. En plus de générer un stress important pour les patientes et leurs familles, le diagnostic du CS est associé à un coût économique conséquent pour les patientes comme pour la société, faisant de cette maladie le fardeau le plus lourd lié à tout cancer chez la femme [6]. Il est donc indispensable de poursuivre l'identification des facteurs responsables de cette pathologie afin de prévenir ou freiner au mieux son développement.

1.2 Développement du cancer du sein

La glande mammaire est un organe sécrétoire complexe, constitué de différents types cellulaires, qui subit de nombreux changements dynamiques au cours de la vie d'une femme. Pendant la puberté, les ovaires augmentent leur production d'hormones stéroïdiennes sexuelles, qui sont l'estrogène et la progestérone. Ce changement hormonal active un réseau de signalisation qui va conduire la morphogenèse du sein, c'est à dire la formation de tissu adipeux, le développement des glandes mammaires et la ramification des canaux lactifères [5, 7] (**Figure 1A**).

En effet, suite à sa production dans les ovaires, l'estrogène circule dans le sang et entre dans les cellules par diffusion simple ou par liaison à un de ses récepteurs à l'estrogène (ER-alpha, ER-beta ou GPER1 (*G Protein-coupled Estrogen Receptor 1*)). Une fois dans le cytoplasme, l'estrogène agit au niveau de différentes voies de signalisation intracellulaires. Dans le cadre de la signalisation non-génomique, l'estrogène localisé proche de la membrane plasmique est impliqué dans la médiation des effets de signalisation rapides (ou MISS pour *Membrane Initiated Steroid Signaling*) comme l'activation de la production d'AMPc (ou cAMP pour *Cyclic Adenosine Monophosphate*), la mobilisation intracellulaire du calcium ou encore l'activation de cascades de phosphorylation des voies de signalisation PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*) /Akt (*Protein Kinase B*) et Ras/ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). Dans le cadre de la signalisation génomique, la liaison de l'estrogène aux récepteurs ER-alpha ou ER-beta, lui permet d'entrer dans le noyau et d'activer la transcription de gènes contenant des éléments de réponse aux estrogènes, comme par exemple le gène encodant les récepteurs à la progestérone. Les mécanismes d'action de l'estrogène permettent in fine d'activer la transcription de gènes cibles qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, l'angiogenèse, la survie cellulaire et l'invasion [8-11].

Ainsi à l'adolescence, les changements architecturaux du tissu mammaire sont conduits par une importante phase de prolifération et différenciation cellulaire en réponse à la production d'hormones sexuelles. En effet, les cellules souches épithéliales mammaires se divisent et génèrent des cellules progénitrices, qui vont se différencier en cellules myoépithéliales ou lumorales, pour former les glandes mammaires et les canaux lactifères (**Figure 1B**). Malgré un taux de mutation par cycle de réplication cellulaire similaire aux autres tissus, les cellules souches mammaires, du fait de leur grand pouvoir de division, sont plus susceptibles d'accumuler des altérations génétiques [12, 13].

Au cours de l'évolution, plusieurs systèmes de surveillance ont été mis en place pour assurer l'intégrité de l'information génétique. Ainsi suite aux lésions de l'ADN, la cellule peut arrêter sa prolifération cellulaire afin de réparer son ADN endommagé ou activer sa mort si les dommages sont trop importants. Dans certains contextes, les cellules échappent à ce système de surveillance et accumulent des mutations leur donnant un avantage de croissance, comme l'augmentation de l'expression des récepteurs hormonaux sexuels dans les cellules. Parce que ces cellules mutées sont capables de se répliquer plus souvent et de manière incontrôlée, le risque qu'elles accumulent d'autres mutations est augmenté. On distingue notamment les mutations passagères des mutations conductrices, qui permettent la

conversion des cellules normales en cellules cancéreuses. De manière générale, on estime qu'il faudra une trentaine d'années à une lésion pour accumuler les changements génétiques nécessaires au détournement des différentes barrières cellulaires protectrices et permettre sa transformation en lésion cancéreuse. Le processus de cancérogenèse est donc long et en continuelle évolution [13-16].

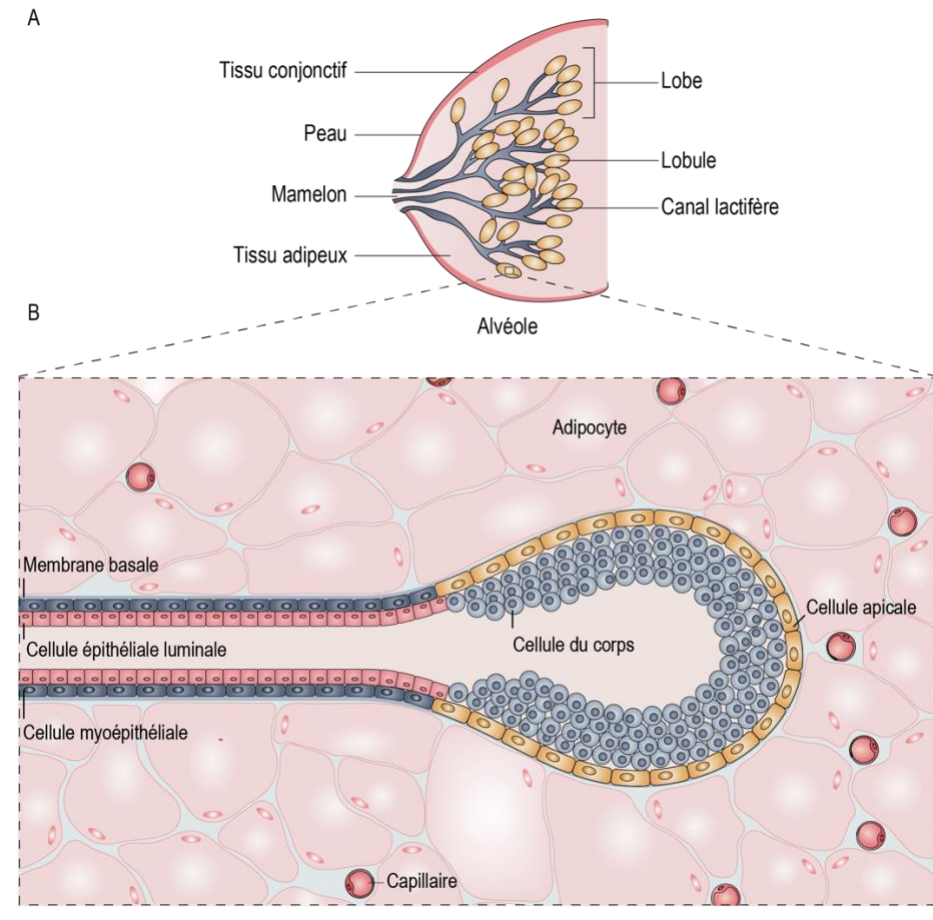


Figure 1 – Morphologie et histologie de la glande mammaire adulte d'une femme

(A) Le sein est constitué d'une glande mammaire qui comprend une vingtaine de lobes. Dans chaque lobe se retrouve environ 20 à 40 lobules qui sont reliés au mamelon par des canaux lactifères. Enfin, chaque lobule comporte environ 10 à 100 alvéoles. **(B)** L'alvéole se caractérise par une cavité arrondie tapissée par les cellules du corps, qui sont à l'origine des cellules épithéliales lumineales et dont la fonction est la production de lait suite à une stimulation par la progestérone. Le lait produit s'écoule dans le canal alvéolaire sous l'effet de la contraction des cellules myoépithéliales. Une fois dans le canal alvéolaire, le lait va rejoindre les canaux lactifères et enfin le mamelon. Le canal alvéolaire est constitué de cellules épithéliales lumineales, qui font face au lumen central et de cellules myoépithéliales qui elles reposent sur la membrane basale. (Modifiée de Caroll et coll. 2016; Gjorevski et Neslon 2011)

1.3 Classification histologique des cancers du sein

Toutes les affections du sein ne sont pas systématiquement cancéreuses. Il n'est pas rare que les femmes développent au cours de leur vie, des hyperplasies atypiques ou kystes bénins ainsi que des papillomes intra-canaliaires, qui n'évolueront jamais vers un phénotype malin [1].

Les hyperplasies malignes ou cancers du sein, apparaissent généralement dans les cellules qui tapissent les canaux lactifères et s'appellent carcinomes canauxaires. Ces lésions peuvent également être originaires des lobules et se nomment alors carcinomes lobulaires. On distingue ensuite les carcinomes qui restent dans leur emplacement d'origine, les carcinomes *in situ*, de ceux qui envahissent les tissus avoisinants, les carcinomes infiltrants (ou invasifs). Il existe des types moins communs de carcinomes comme les cancers inflammatoires du sein ou la maladie de Paget du sein [1, 17] (Figure 2).

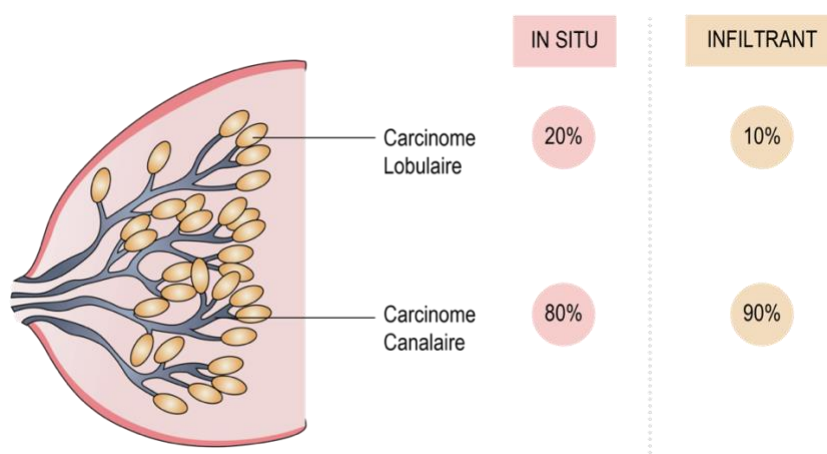


Figure 2 – Répartition des carcinomes lobulaires et canauxaires dans les cas de cancer du sein

Les carcinomes *in situ* lobulaires et canauxaires représentent respectivement environ 20% et 80% des cancers du sein. Les carcinomes infiltrants lobulaires et canauxaires représentent respectivement environ 10% et 90% des cancers du sein. (Modifiée de Carroll et coll. 2016)

1.4 Les sous-types moléculaires du cancer du sein

Le CS est une maladie très hétérogène, tant en matière d'histologie, de biologie de la tumeur que du devenir du patient. La classification plus profonde des différents types de CS, par la caractérisation de sous-types moléculaires, permet d'établir un pronostic plus précis et de personnaliser le traitement en fonction des caractéristiques de la tumeur, afin de donner une meilleure chance de survie aux patientes [18]. C'est dans ce contexte que Dr Charles M. Perou et Dre Thérèse Sorlie entreprennent au début des années 2000, l'identification de marqueurs moléculaires à l'aide de puces à ADN. Cette classification moléculaire est basée sur la différence d'expression des gènes dans les cellules tumorales, comparativement aux cellules saines. Les marqueurs moléculaires identifiés et couramment utilisés pour établir ces classes sont : la présence de récepteurs à l'estrogène (ou ER pour *Estrogen Receptor*), à la progestérone (ou PR pour *Progesterone Receptor*) et à HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*), ainsi que l'expression de l'antigène Ki-67, de la protéine cytokératine CK-5 (*Cytokeratine-5*) et enfin du récepteur de l'EGF (ou EGFR pour *Epidermal Growth Factor Receptor*). D'autres catégories existent comme les récepteurs androgéniques (ou AR pour *Androgen Receptor*) [19] ou *claudin-low like* [20], mais ils sont moins communs.

Chaque sous-type moléculaire reflète un état unique de la cellule épithéliale mammaire au cours de la différenciation de la glande mammaire [21]. On distingue 5 sous-types moléculaires [18, 22-26] (**Figure 3**) :

- **Luminal A** : Représentant ~ 40% des CSs, cette classe se caractérise par une expression des récepteurs ER et PR ainsi qu'une absence de HER2 au niveau des cellules cancéreuses (ER+, PR+, HER2-). Plus précisément, on observe une forte expression des gènes impliqués dans l'action des estrogènes, notamment ER- α (ou ESR1 pour *Estrogen Receptor 1*) ainsi que les protéines GATA3 (*GATA binding protein 3*), XBP1 (*X-box Binding Protein 1*), TFF1 (*Trefoil Factor 3*), FOXA1 (ou HFN3A pour *Hepatocyte Nuclear Factor 3 Alpha*) et LIV-1. L'expression des gènes de prolifération est plus faible (*Ki-67*<15%) comparativement au sous-type moléculaire Luminal B. Le gène *TP53* est muté dans 17% des tumeurs Luminal A. Les tumeurs Luminal A sont généralement de grade plus bas, la progression de la maladie est aussi plus lente. Ce sous-type est associé à un meilleur pronostic, une grande survie à 5 ans et une faible récurrence comparativement aux autres sous-types moléculaires. Les traitements par hormonothérapie, comme le tamoxifène ou les inhibiteurs d'aromatases, sont les plus utilisés et efficaces, la chimio-sensibilité quant à elle est faible.
- **Luminal B** : Représentant ~ 20% des CSs, ces tumeurs expriment systématiquement les récepteurs ER (ER+). On distingue cependant les tumeurs Luminal B HER2+ des Luminal B HER2-. Les tumeurs Luminal B HER2+ n'expriment ni les récepteurs PR ni l'antigène *Ki-67*. Pour les tumeurs Luminal B HER-, on observe au minimum, un fort pourcentage d'expression du marqueur de prolifération cellulaire *Ki-67* (>20%), ou une expression faible ou nulle des récepteurs PR. De plus, ces tumeurs présentent généralement une plus faible expression des marqueurs luminaux et l'expression des récepteurs ER est moins forte, comparativement aux

tumeurs Luminal A. Le gène *TP53* est muté dans 41% des tumeurs. Ces tumeurs présentent une forte prolifération et un pronostic moins bon que les tumeurs Luminal A. Les traitements par hormonothérapie sont toujours utilisés et dans la plupart des cas il y a recours aux thérapies cytotoxiques. Les thérapies anti-HER2 sont utilisées seulement pour les tumeurs Luminal B HER2+ en combinaison avec les thérapies hormonales et cytotoxiques.

- **HER2** : Représentant ~ 10-15% des CSs, ce groupe de tumeurs surexprime les récepteurs HER2 et exprime faiblement les récepteurs ER. On distingue deux sous-classes : les tumeurs HER2+ avec récepteurs hormonaux négatifs, dites non lumorales (ER-, PR-, HER2+) et les tumeurs lumorales HER2+ avec récepteurs hormonaux positifs (ER+, PR+, HER2+). Le gène *TP53* est muté dans 50% des tumeurs HER2+. Ces tumeurs sont plus agressives, présentent une forte prolifération cellulaire et une réponse aux thérapies hormonales variable (elle dépend des niveaux d'expression des récepteurs hormonaux). Les traitements qui ciblent spécifiquement les tumeurs HER2+, comme le trastuzumab ou encore le lapatinib, sont très efficaces et la forte chimio-sensibilité des tumeurs permet l'utilisation des thérapies cytotoxiques.
- **Triple-négatif (TNBC)** : Représentant ~ 10-20% des CSs, ces tumeurs n'expriment aucun récepteur (ER-, PR-, HER2-), comme les cellules épithéliales mammaires normales. Elles sont souvent confondues avec la catégorie Basal, mais il est important de comprendre que toutes les tumeurs TNBC n'expriment pas les marqueurs immunohistochimiques du type Basal, comme les cytokératines (CK5, CK6 et CK17) et l'EGFR. Le recouvrement avec les tumeurs de type Basal est d'environ 80%. Le gène *TP53* est muté dans 69% des tumeurs de type TNBC. Ces tumeurs sont très agressives, associées à un très mauvais pronostic et un fort taux de rechute. De plus, les patientes sont souvent diagnostiquées pour des tumeurs de hauts grades. Les tumeurs TNBC ne présentant pas de réponse endocrine, elles ne peuvent être traitées avec des thérapies hormonales, elles sont donc uniquement traitées avec des thérapies cytotoxiques. Ces tumeurs affectent les femmes plus jeunes et est plus prévalent chez les femmes afro-américaines.
- **Basal** : Représentant ~ 10-15% des CSs, ces tumeurs ne présentent pas non plus d'expression des récepteurs hormonaux (ER-, PR-, HER2-). On observe une haute expression des marqueurs immunohistochimiques du type Basal et une faible expression des marqueurs lumoraux. Le gène *TP53* est muté dans 88% des tumeurs Basal, ce qui est signe d'un mauvais pronostic et d'une faible réponse aux thérapies systémiques.

Les tumeurs qui appartiennent aux sous-types moléculaires TNBC et Basal, du fait de leurs caractéristiques moléculaires, représentent un défi supplémentaire dans le traitement personnalisé et efficace des patientes du CS. De

nouvelles stratégies thérapeutiques ont donc été développées afin de trouver d'autres caractéristiques, comme les mutations génétiques présentes dans les tumeurs, pour tuer spécifiquement ces cellules tumorales. Ce point sera présenté à la section « 4. Létalité synthétique et stratégies thérapeutiques contre le cancer du sein ».

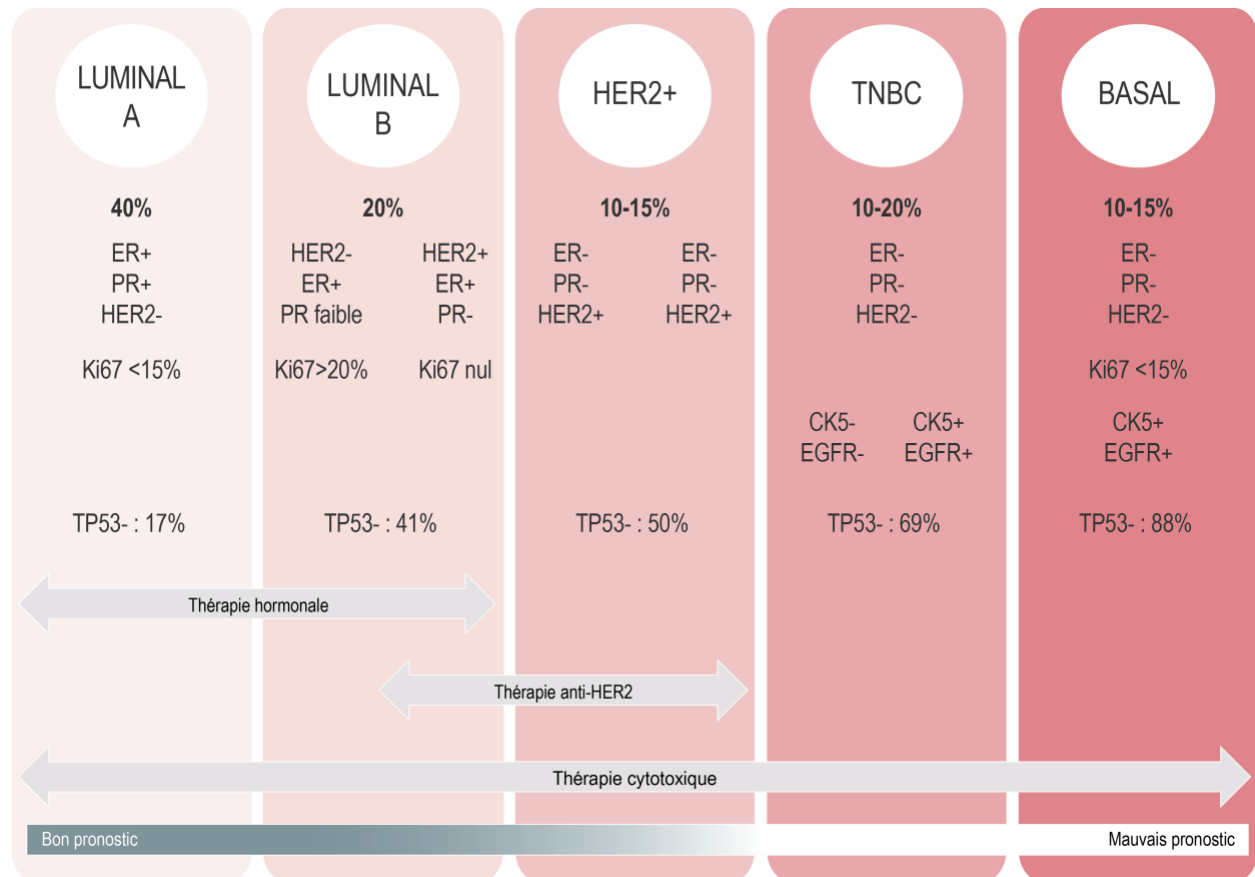


Figure 3 – Classification moléculaire des cancers du sein

Résumé de la classification moléculaire des CSs en fonction des marqueurs moléculaires suivant : la présence ou l'absence de récepteurs à l'estrogène (ER), à la progestérone (PR) et à HER2 (HER2), ainsi que les niveaux d'expression de l'antigène Ki-67, de la protéine cytokératine CK-5 (CK5), du récepteur de l'EGF (EGFR) et de la protéine TP53. La majorité des CSs diagnostiqués appartiennent aux classes Luminal A et Luminal B (respectivement 40% et 20% des cas), suivi par la classe TNBC (10-20% des cas) et enfin les classes HER2+ et Basal (10-15% des cas). Les flèches indiquent les types de thérapies proposées aux patientes en fonction de la classification moléculaire de leurs tumeurs et enfin le pronostic associé.

2 Facteurs de risque et prédisposition aux cancers du sein

Étant une maladie complexe, le CS se différencie d'une maladie monogénique car son mode de transmission ne correspond pas aux grands modes de transmission Mendélien ou mitochondrial [27, 28]. En effet, le CS se caractérise par une étiologie multifactorielle, c'est-à-dire qu'il résulte d'une interaction entre un profil génétique et un environnement particulier. La composante génétique de la maladie est alors considérée comme une susceptibilité génétique.

2.1 Facteurs de risque du cancer du sein

La compréhension et l'estimation de l'impact des facteurs de risque sur le développement du CS est complexe, et les études réalisées ne sont pas toujours en mesure d'apporter des preuves assez robustes de cette association. Néanmoins, il est reconnu que l'exposition aux hormones au cours de la vie influence grandement le risque de CS [29]. Ainsi, un âge précoce des premières règles et une ménopause tardive [30, 31], une forte densité du tissu mammaire [32-34], l'utilisation de contraceptifs oraux [35] et la prise de thérapie hormonales de substitution [36] représentent des facteurs de risque du CS. À l'inverse, la multiparité, l'âge précoce à la première maternité et l'allaitement naturel semblent protéger contre le développement de cette maladie [37-45].

D'autre part, le groupe *Continuous Update Project Panel*, a estimé que la consommation d'alcool, un plus gros poids à la naissance et une grande taille à l'âge adulte sont des facteurs de risque du CS chez les femmes avant la ménopause. Ils ont aussi estimé que l'activité physique et l'obésité procurent un effet protecteur pour les femmes pré-ménopausées. Pour ce qui est du risque de CS, chez les femmes après la ménopause, la consommation d'alcool, une masse grasseuse plus importante, une prise de poids et une grande taille à l'âge adulte augmente le risque de CS, alors que l'activité physique et l'obésité chez les jeunes adultes semblent protéger contre le CS pour ces femmes [46].

Enfin, parmi les facteurs de risque génétiques, qui sont au centre de ma thèse, se retrouvent l'histoire familiale et la présence de mutations génétiques.

- **Histoire familiale** : le risque relatif familial (ou FRR pour *Familial Relative Risk*) pour le parent d'une patiente de CS est de 1.8. Le FRR est plus important si la patiente développe son CS à un âge précoce (avant 50 ans), plus le lien de parenté est étroit et enfin en fonction du nombre de parents atteints. En effet, pour les femmes de <50 ans avec un, deux ou au minimum trois parents du premier degré (père, mère, frères et sœurs, enfants) diagnostiqués, le FRR est respectivement de 2, 4 et 12, alors que pour les femmes de >50

ans le FRR est respectivement de 1.6, 2.6 et 2.6 [47]. D'autre part, on estime qu'environ 5 à 10% de tous les cas de CS impliquent une mutation dans des gènes de susceptibilité à forte pénétrance [48]. En effet, les études menées sur des jumeaux monozygotes et dizygotes indiquent que le risque familial de CS est le reflet d'une composante génétique de la maladie, la susceptibilité génétique [49] (**Tableau 1**).

- **Mutations génétiques** : tous les CSs ont une composante génétique. Celle-ci se traduit par la présence de mutations génétiques pathogéniques qui sont en partie responsables de la transformation des cellules saines en cellules tumorales. Ces mutations peuvent être acquises au cours de la vie ou être héritées. Le CS retrouvé majoritairement dans la population est dit sporadique (70 à 80% de tous les CSs). Les cas sporadiques ne présentent ni histoire familiale, ni mutation germinale dans un gène de susceptibilité connu. La tumeur résulte d'une multitude de mutations qui entraînent au départ l'activation d'un oncogène et/ou l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur et qui se poursuit avec l'apparition d'autres mutations indépendantes [50]. D'autre part, la forme dite héréditaire représente 5 à 10% des CSs. Elle est nommée syndrome héréditaire du CS. On parle alors d'une mutation germinale dans un gène de susceptibilité à forte pénétrance car elle est héritée d'un des deux parents. Cette mutation prédispose la porteuse au CS car le risque de perte d'hétérozygotie est augmenté. Cette inactivation allélique représente ainsi la première étape de la tumorigenèse. Enfin, pour les patientes qui ont plusieurs cas de CS dans leur famille (>1 parent du premier ou deuxième degré atteint d'un CS) mais dont aucune mutation causale n'a été mise en évidence, on parle de CS familial. Cela représente 15 à 20% des CSs [1].

Malgré son intérêt pratique pour la compréhension des différentes origines mutationnelles possibles du CS, il est important de noter que cette hiérarchisation ne témoigne pas de la complexité qu'est réellement la prédisposition au CS. En effet, la compréhension de la transmission des variations génétiques de prédisposition est limitée par nos techniques et ne nous permet pas de décrire de manière absolue les causes génétiques exactes de cette maladie complexe.

Tableau 1 – Risque relatif de cancer du sein en fonction de l'histoire familiale

FACTEUR DE RISQUE	RISQUE RELATIF (99 % FCI)
0 parent du 1 ^{er} degré avec un CS	1.00 (0.97-1.03)
1 parent du 1 ^{er} degré avec un CS	1.80 (1.70-1.91)
2 parents du 1 ^{er} degré avec un CS	2.93 (2.37-3.63)
>3 parents du 1 ^{er} degré avec un CS	3.90 (2.03-7.49)
1 parent avec un CS <50 ans	2.14 (1.92-2.38)
2 parents avec un CS <50 ans	3.84 (2.37-6.22)
>3 parents avec un CS <50 ans	12.05 (1.70-85.16)
1 parent avec un CS >50 ans	1.65 (1.53-1.78)
2 parents avec un CS >50 ans	2.61 (2.03-3.34)
>3 parents avec un CS >50 ans	2.65 (1.29-5.46)

CS : Cancer du sein; FCI : *Floated Condifence Interval*. (Adapté de Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast)

2.2 Prédilection au cancer du sein

Une étude épidémiologique montre que la moitié des cas de CS se développent dans une faible proportion de femmes de la population générale, ayant une forte susceptibilité génétique de développer la maladie au cours de leur vie [51] (**Figure 4**). Ainsi l'identification des femmes ayant une forte prédisposition au CS est un facteur prédominant de l'efficacité de la prévention et de la détection précoce de cette maladie. C'est pourquoi de nombreux laboratoires travaillent activement sur l'identification et la compréhension de ces facteurs génétiques.

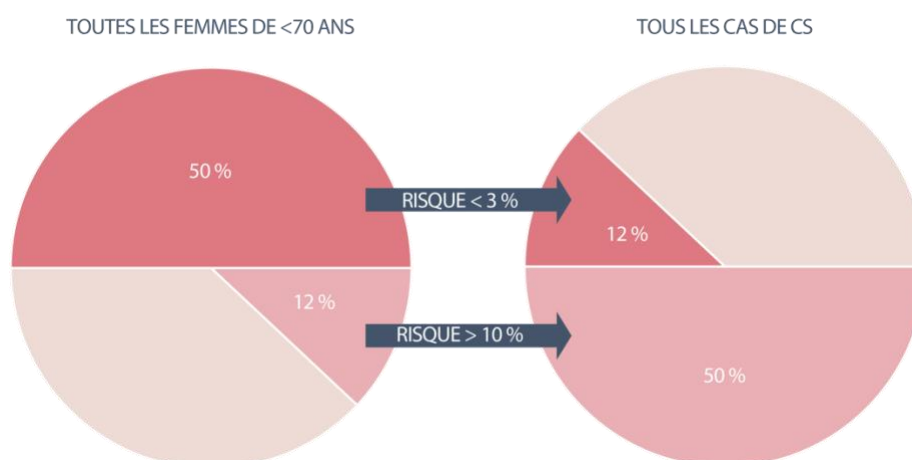


Figure 4 – Susceptibilité génétique du cancer du sein dans la population générale

Dans la population générale de femmes, 12% d'entre elles ont un risque élevé (>10%) de développer le CS avant 70 ans. On estime que la moitié des cas de CS seront diagnostiqués dans cette faible proportion de femmes. (*Adaptée de Pharoah et coll. 2002*)

Les variations génétiques associées au CS sont catégorisées en 3 classes de pénétrance (faible, modérée, forte) en fonction du risque relatif et de la fréquence d'apparition de l'allèle de risque (**Figure 5**).

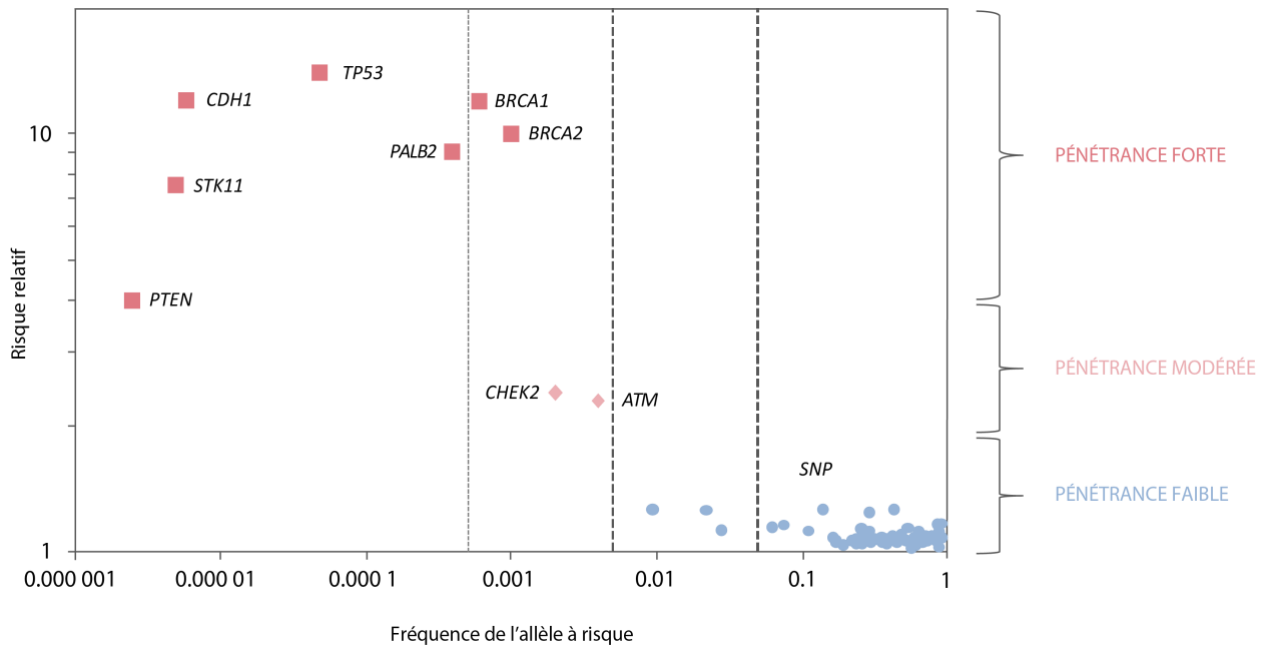


Figure 5 – Classification des gènes de susceptibilité au cancer du sein

Les variations génétiques associées au CS sont catégorisées en 3 classes de pénétrance (faible, modérée, forte) en fonction du risque relatif et de la fréquence d'apparition de l'allèle de risque (*Adaptée de Ghoussaini et coll. 2013*)

La première classe regroupe les gènes de susceptibilité à faible pénétrance. L'allèle délétère est fréquent dans la population (fréquence de l'allèle généralement >5%) et confère un risque relatif (RR) faible (<1.4 fois celui de la population générale). Ces variants sont identifiables par des études d'association pangénomiques (ou GWAS pour *Genome Wide Association Study*) [52-54].

La seconde classe concerne les gènes de susceptibilité à pénétrance modérée. L'allèle de risque a une fréquence faible et son RR est moyen (2 à 4 fois celui de la population générale). Les variants sont identifiables par des criblages de variations dans des études cas-contrôles, car ils sont trop rares pour être mis en évidence par des études d'association pangénomique et leur pénétrance est trop faible pour être identifiés par des études de liaison. Le criblage de variations dans des gènes candidats a laissé place au séquençage d'exomes pour l'identification de cette catégorie de variations. Parmi les gènes à pénétrance modérée se trouvent *ATM* (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) et *CHEK2* (*Checkpoint Kinase 2*).

La troisième classe est constituée des gènes de susceptibilité à forte pénétrance. Bien que rares, ils confèrent un RR de développer la maladie très élevé (>4 fois celui de la population générale), expliquant ainsi qu'une forte proportion des porteurs de variations dans ces gènes développent la maladie. Ils sont identifiables

par des études de liaison dans des familles à haut risque de CS. C'est ainsi que les premiers gènes de susceptibilité *BRCA1* (*Breast Cancer susceptibility gene 1*) et *BRCA2* ont été découverts [55-59]. On compte aussi dans cette classe les gènes *PTEN* (*Phosphatase and Tensing homolog*), *TP53* (*Tumor Protein 53*), *CDH1* (*Cadherin-1*), *STK11* (*Serine Threonine Kinase 1*) et *PALB2* (*Partner and Localizer of BRCA2*) [60-63].

Ensemble, les variations génétiques dans ces gènes de susceptibilité expliquent environ 64% du risque génétique de développer le CS [52, 64, 65] (**Figure 6**).

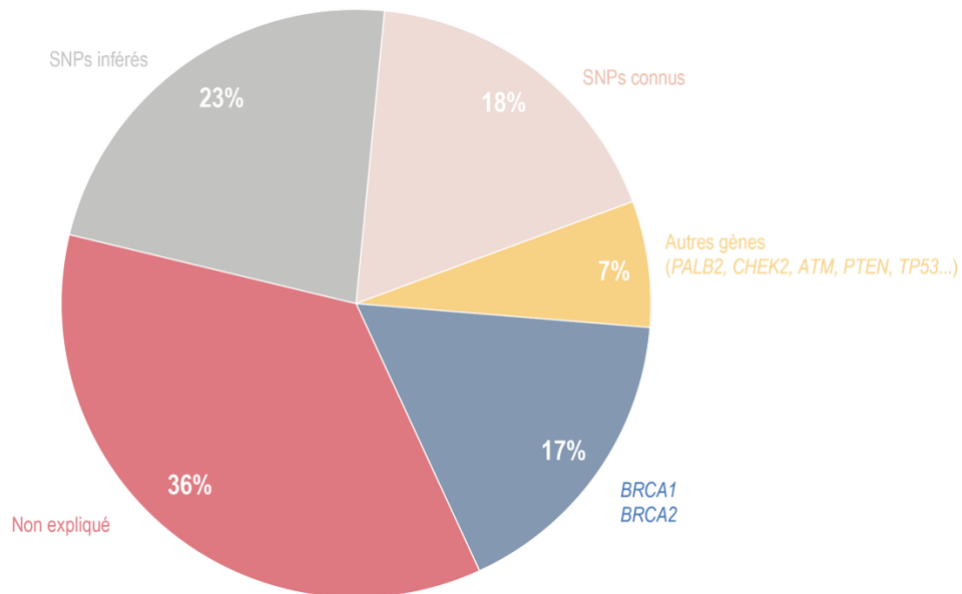


Figure 6 – Les variants génétiques qui prédisposent au cancer du sein
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*. (Adaptée de Couch et coll. 2014)

2.3 Identification des femmes à risque : enjeux cliniques & outils

L'identification des femmes à risque élevé est principalement basée sur les antécédents familiaux et le dépistage de mutations dans les gènes de prédisposition *BRCA1* et *BRCA2*. En effet, 25% des femmes atteintes d'un CS ayant une forte histoire familiale de cancer du sein et de l'ovaire présentent des mutations dans un de ces gènes contre 5 à 10% de tous les cas de CS [66]. Bien que plus rares, des mutations dans d'autres gènes de susceptibilité peuvent expliquer le développement de la maladie et sont ainsi génotypés pour les patientes atteintes de CS avec une histoire familiale de cancer du sein et de l'ovaire, qui ne portent pas de mutations germinales dans *BRCA1* (*gBRCA1*) ou *BRCA2* (*gBRCA2*). L'identification de ces variations et leur interprétation clinique permettent de guider le choix du traitement et aider la prise de décisions pour le médecin et sa patiente. L'ensemble des variations dans ces gènes identifiées en clinique sont recensées dans des bases de données cliniques publiques comme ClinVar [67] ou Lovd Database [68].

2.3.1 Les enjeux cliniques

Les avancées technologiques ont permis l'identification de très nombreuses variations dans des gènes de susceptibilité au CS déjà connus mais aussi l'identification de nouveaux gènes de prédisposition qui sont globalement impliqués dans la protection du génome. Beaucoup de ces gènes ont été intégrés dans les tests génétiques proposés en clinique aux patientes et servent ainsi au dépistage de variations causales. En moyenne, on retrouve près de 30 gènes de susceptibilité dans la plupart des panels diagnostiques. Suite aux dépistages effectués en clinique, les médecins peuvent faire face à deux problèmes concernant les résultats obtenus.

Tout d'abord, à l'exception de quelques gènes (par exemple *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *PALB2*, *ATM* et *CHEK2*), il existe peu d'études d'association robustes entre la majorité des gènes présents dans les tests génétiques et le CS [62]. En effet 25% des personnes testées dans les cliniques d'oncogénétiques possèdent au moins une variation dans l'un de ces gènes [69]. Ceci est particulièrement délicat en conseil génétique car contrairement aux mutations tronquantes il est souvent très difficile d'interpréter en termes de risque les variations de types faux sens ou bien celles affectant un site d'épissage. En effet, la quasi-totalité des variations identifiées en clinique n'ont pas encore été classées par les comités dédiés comme bénignes ou pathogéniques. L'identification des variants se fait plus vite que leur caractérisation et par conséquent très peu d'entre eux ont été classés à ce jour. Les variants dont le risque n'a toujours pas été déterminé et qui n'ont pas reçu de classification sont appelés VUSs (*Variants of Unknown Significance*) [63, 70].

Par conséquent, les médecins ne sont pas en mesure de renseigner les patientes porteuses sur la pertinence des variations dans les gènes de susceptibilité non confirmés ou les VUSs.

Ainsi, seulement 2.5% des patientes *gBRCA1/2*-négatives testées dans l'étude de Maxwell et coll., sont porteuses de mutations pour lesquelles des directives cliniques ont été établies [71]. Il est donc indispensable de corroborer de manière robuste l'association entre les gènes présents dans les panels diagnostiques et le CS ainsi que d'améliorer la classification des nombreuses variations identifiées, afin de faciliter leur interprétation en clinique.

2.3.2 Les outils de classification

La classification des variations comme bénignes ou pathogéniques est effectuée par un comité de médecins et de chercheurs, qui grâce aux informations récoltées à l'aide de différentes approches méthodologiques et statistiques, peuvent se prononcer sur le statut de chaque variation étudiée [72].

Ainsi, les données épidémiologiques recueillies en clinique, permettent de regarder la ségrégation des variations au sein des familles ainsi que le calcul de la pénétrance pour les gènes impliqués dans le développement de la maladie.

L'effet délétère de la variation sur la fonction de la protéine est aussi pris en compte. Les mutations de type non-sens, qui génèrent l'apparition précoce d'un codon stop, sont systématiquement considérées comme pathogéniques, en raison de la perte de fonction possible associée aux protéines tronquées. Pour les autres types de variations, comme celles situées aux niveaux de sites d'épissage ou encore les variations faux sens, l'interprétation de leurs effets sur la fonction de la protéine est plus complexe et nécessite une caractérisation fonctionnelle afin d'être classées.

Dans la mesure où les variants faux sens représentent une partie considérable, environ 18%, des variations identifiées chez les patientes [73], plusieurs algorithmes ont été développés afin de prédire l'effet des variants sur la fonction de la protéine et ainsi prioriser les variants qui devront être caractérisés par des essais fonctionnels. Parmi les outils de prédiction disponibles en ligne, les plus couramment utilisés sont SIFT, PolyPhen2, CADD et Align GVGD. Ils utilisent tous l'alignement de séquences et la recherche d'homologies au sein des familles de protéines pour déterminer les positions en acides aminés importantes qui auront été conservées au cours de l'évolution. Comme ces algorithmes prennent en considération différents critères, ils montrent des divergences dans leur pertinence, spécificité et sensibilité. Néanmoins, Align GVGD semble être le meilleur outil et montre moins de divergence dans sa spécificité et sa sensibilité [74]. Il est toutefois préférable de prendre en considération tous ces outils lors de l'estimation des valeurs prédictives de la pathogénicité des variations. Pour cela, PERCH, une nouvelle plateforme en ligne peut être utilisée. Ce modèle intègre tous les

algorithmes mentionnés ci-dessus sur la base de leur complémentarité et corrélation et donne un seul et unique meta-score [75].

Il est important de noter que les outils de prédiction *in silico* ne peuvent remplacer les essais fonctionnels pour l'interprétation clinique des variations. En 2017, Woods et al ont montré que VarCall, un modèle qui estime la probabilité de pathogénicité en fonction des données fonctionnelles, était un outil de prédiction robuste pour les variants localisés dans le gène *BRCA1* [76]. Cette étude a mis l'emphase sur l'importance des essais fonctionnels dans la classification des VUSs.

*Au cours de ma thèse, je me suis concentrée sur la caractérisation fonctionnelle des VUSs localisés dans le gène de susceptibilité à forte pénétrance *PALB2*, qui ont été identifiées chez des patientes ayant un cancer du sein. C'est pourquoi la partie qui suit est centrée sur cette protéine.*

3 *PALB2*, un gène de susceptibilité au cancer du sein

En 2006, le groupe de Bing Xia a identifié par co-immunoprécipitation un nouvel interacteur de BRCA2 localisé sur le chromosome 16p12.2 [77]. Cette protéine, permettant la localisation et la stabilisation nucléaire de BRCA2, a été nommée Partner And Localizer of BRCA2 (*PALB2*). *PALB2* est un gène de prédisposition à forte pénétrance au CS [78] qui joue un rôle central dans la réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue (RH) [79].

3.1 Maladies associées aux variations génétiques dans *PALB2*

Longtemps considéré comme un gène de susceptibilité à risque intermédiaire, *PALB2* est aujourd'hui reconnu pour avoir un impact comparable à celui de *BRCA2* dans le développement du CS, le plaçant ainsi comme gène de susceptibilité à forte pénétrance. En effet, les mutations dans *PALB2* augmentent le risque de déclarer la maladie de 8 à 9 fois pour les femmes de moins de 40 ans, et de 3 à 4 fois au cours de leur vie [78]. De plus, *PALB2* est associé aux cancers familiaux pancréatiques dans le cadre de mutations hétérozygotes [80]. Enfin, *PALB2* est lié à l'anémie de Fanconi dans le cadre de mutations bi-alléliques, où il est nommé FANCN [81].

3.1.1 *PALB2* et le cancer du sein

L'implication de *PALB2* dans le CS est mise en évidence pour la première fois en 2006, lors de l'identification de son interaction avec *BRCA2* [77]. Le groupe de Xia présente alors trois mutations de type faux sens dans *BRCA2*, identifiées chez des patientes de CS, qui compromettent sa liaison avec *PALB2*, menant ainsi à des défauts de RH. Les auteurs rapportent aussi une délétion germinale dans *BRCA2*, précédemment identifiée dans une famille avec une forte incidence de CS et cancers des ovaires, qui rompt son domaine de liaison à *PALB2*. Ceci suggère l'existence d'un lien entre *PALB2* et la susceptibilité au cancer. Au vu de ces découvertes, l'hypothèse émise à l'époque était que les mutations dans *PALB2* sont susceptibles d'être trouvées dans des tumeurs qui présentent des phénotypes de type *BRCA2* mais qui possèdent un *locus* *BRCA2* WT (*Wild-Type*) [77].

En poursuivant cette hypothèse, Rahman et coll. entreprennent l'année suivante, le premier criblage de variations de *PALB2* par séquençage. À l'époque, les mutations mono-alléliques tronquantes de *PALB2* sont associées avec un risque relatif (RR) de développer le CS de 2.3 (95% intervalle de confiance (IC), 1.4-3.9, P =

0.0025) pour les individus avec une histoire familiale de CS testés négatifs pour des mutations germinales dans les gènes *BRCA* (*gBRCA*), liant les mutations de *PALB2* à une augmentation du risque plus modeste que celle décrite pour les mutations dans *BRCA2* (RR = 10) [82]. En effet dans cette étude, cinq mutations tronquantes dans *PALB2* sont identifiées dans 10/923 individus avec une histoire familiale de CS (1.1%), comparativement à 0/1 084 dans les contrôles (0%). Neuf de ces mutations sont présentes dans le groupe de femmes avec un CS (1%), alors qu'une mutation est présente dans des familles avec des cas de CS déclarés chez les femmes et les hommes (6.7%, P = 0.15) [83]. Ces données suggèrent que les mutations dans *PALB2* confèrent un risque plus grand de CS chez les hommes que chez les femmes, comme c'est le cas pour les mutations dans *BRCA2* [82].

Malgré l'identification de 50 variations non tronquantes dans *PALB2*, cette étude ne montre pas d'évidence que ces mutations de type faux sens confèrent une susceptibilité au CS. En effet, 23% des individus ayant un CS contre 24% des contrôles sont porteurs d'au moins une de ces variations. Le groupe estime aussi que la fraction attribuable de mutations dans *PALB2* chez les patients de CS est de 0.23% (95% IC, 0.072–0.52%) et que le RR familial associé à *PALB2* est de 0.24% (0.02-1.16%). Enfin, les variations de *PALB2* semblent être distribuées tout au long de la séquence codante de la protéine indiquant l'absence de point chaud mutationnel [83].

L'année suivante, le nombre de mutations identifiées dans *PALB2* augmente significativement grâce aux études de population effectuées et accentue l'importance du gène dans la prédisposition au CS. En mars 2007, Erkko et coll. identifient dans la population finnoise une mutation fondatrice, c.1592delT, présente dans plusieurs cas de CS familiaux avec une fréquence significativement plus élevée (3/113 cas de CS) comparativement à la population contrôle de mêmes ancêtres (6/2 501 contrôles, P = 0.005, *odds ratio* (OR) 11.3, 95% IC, 1.8-57.8). Un criblage plus profond de ce variant dans des individus non sélectionnés pour le CS montre un enrichissement de 4 fois des porteurs de la mutation c.1592delT chez les patients comparativement aux contrôles (18/2 059 femmes avec un CS, 0.9% versus 0.2% chez les contrôles, P = 0.003, OR 3.94, 95% IC, 1.5-12.1) [84]. Le groupe entreprend des études plus approfondies de cette mutation l'année suivante et rapporte une augmentation de 40% du risque de CS (HR, 6.1, 95% IC, 2.2-17.2, P = 0.01) à l'âge de 70 ans (95% IC, 17-77), approchant ainsi le risque des porteurs de mutations dans *BRCA2* dans le même pays [85].

En avril 2007, Tischkowitz et coll. soutiennent l'idée de Erkko concernant une plus forte pénétrance des mutations de *PALB2* dans le CS, avec une estimation de la proportion de mutations *PALB2* dans les cas de CS avec une forte histoire familiale de 1.5%. Ils identifient deux mutations dans *PALB2*, c.229delT et c.2521delA, dans 5/68 cas de CS de descendance différentes (Juifs Ashkénazes, Québécois, descendants d'ethnies mixtes) avec une forte histoire familiale de CS. La caractérisation fonctionnelle de ces deux mutations révèle que c.229delT et c.2521delA ne sont pas capables de lier correctement *BRCA2*, entraînant des défauts de RH

et de réparation des ICLs (*DNA Intercross Links*) induits par un traitement à la MMC (*Mitomycin C*), un antibiotique utilisé dans le traitement de certains cancers comme le CS, pour ses propriétés d'agent pontant de l'ADN [86].

Au vu de ces résultats, l'hypothèse selon laquelle il existe une corrélation entre le génotype et le phénotype des mutations de *PALB2* et leur localisation sur la protéine est émise. Elle expliquerait les différences d'association observées pour le CS. En effet, il est proposé que les mutations localisées dans la région 5'-terminale de la protéine sont plus pénétrantes que celles localisées dans la région 3'-terminale. La stabilité de la protéine expliquerait donc la variation de la pénétrance entre les protéines mutantes longues et courtes, révélant un possible phénotype d'haplo-insuffisance des variations dans *PALB2* [85, 86].

En décembre 2007, une mutation fondatrice dans *PALB2*, c.2323C>T est identifiée chez les femmes québécoises avec un CS (2/356 cas de CS (0,56%), 95% IC, 0.06-2% contre 0/6 440 nouveaux nés contrôles (0%), limite supérieure de 95% IC = 0.057%). Ils estiment aussi la contribution des mutations de *PALB2* au CS avec une forte histoire familiale à 1-2% [87].

En 2010, Southey et coll. effectuent un criblage de la mutation c.3113G>A dans la population australienne. Ils observent la mutation tronquante dans 5/1 403 cas de CS (0,4%) mais pas dans les contrôles (0/764). Ils concluent que la mutation W1030X est fortement pénétrante et estime un risque cumulatif de CS de 49% (95% IC, 15-93) à 50 ans et de 91% (95% IC, 44-100) à 70 ans. Par la suite, toutes les cliniques en Australie décident de notifier les familles lorsque des porteurs de la mutations c.3113G>A sont identifiés, dans la mesure où le risque de CS pour cette variation est proche de celui attribué aux mutations pathogéniques dans *BRCA2*. Ces résultats suggèrent aussi que la pénétrance des variations dans *PALB2* peut grandement varier en fonction de la population et de la mutation prise en compte, allant d'une pénétrance faible à forte.

Il faudra attendre 2014, pour que le groupe d'intérêt *PALB2* (*PALB2 Interest Group*) publie que le risque absolu de CS pour les femmes porteuses de mutations dans *PALB2* à l'âge de 70 ans varie de 33% (95% IC, 25-44) pour les femmes sans histoire familiale de CS à 58% (95% IC, 50-66) pour celles avec au moins deux parents du premier degré diagnostiqués pour un CS avant l'âge de 50 ans [78].

Il est important de noter que la perte d'hétérozygotie (ou LOH pour *Loss of Heterozygoty*) dans les tumeurs de patientes porteuses de mutations dans *PALB2* n'a été rapportée que peu de fois [80, 88-91].

Initialement, la contribution des larges réarrangements génomiques à la prédisposition au CS a été réfutée par plusieurs groupes [92, 93], jusqu'à l'identification en 2011 de la première délétion large, c2587-?_3201+? (délétion des exons 7 à 11) chez un frère et une sœur avec une histoire familiale de CS [90]. Par la suite, trois autres patients ont été rapportés comme porteurs de larges réarrangements génétiques [94] [91] [95].

Ces données soulignent le rôle de *PALB2* dans la stabilité du génome et son importance dans le développement du cancer.

Pour résumer, les mutations tronquantes dans *PALB2* sont identifiées dans 0.36% à 2% des CS familiaux ou développés tôt dans une large diversité de population à l'exception des populations irlandaise, islandaise et japonaise, où aucune mutation fréquente de *PALB2* n'a été identifiée [96-98]. Après *BRCA1* et *BRCA2*, *PALB2* est le gène le plus fréquemment mutés chez les patientes de CS avec une histoire familiale de cancer du sein. Presque 10 ans après sa découverte, *PALB2* est reconnu comme un gène de prédisposition à forte pénétrance, à côté de *BRCA2* et est inclus dans les panels diagnostiques proposés en clinique aux patientes. Les mutations tronquantes de *PALB2* confèrent un RR de 9,07 (95% IC 5,72-14,39) quand tous les paramètres sont constants [78, 99-101] (**Figure 7**).

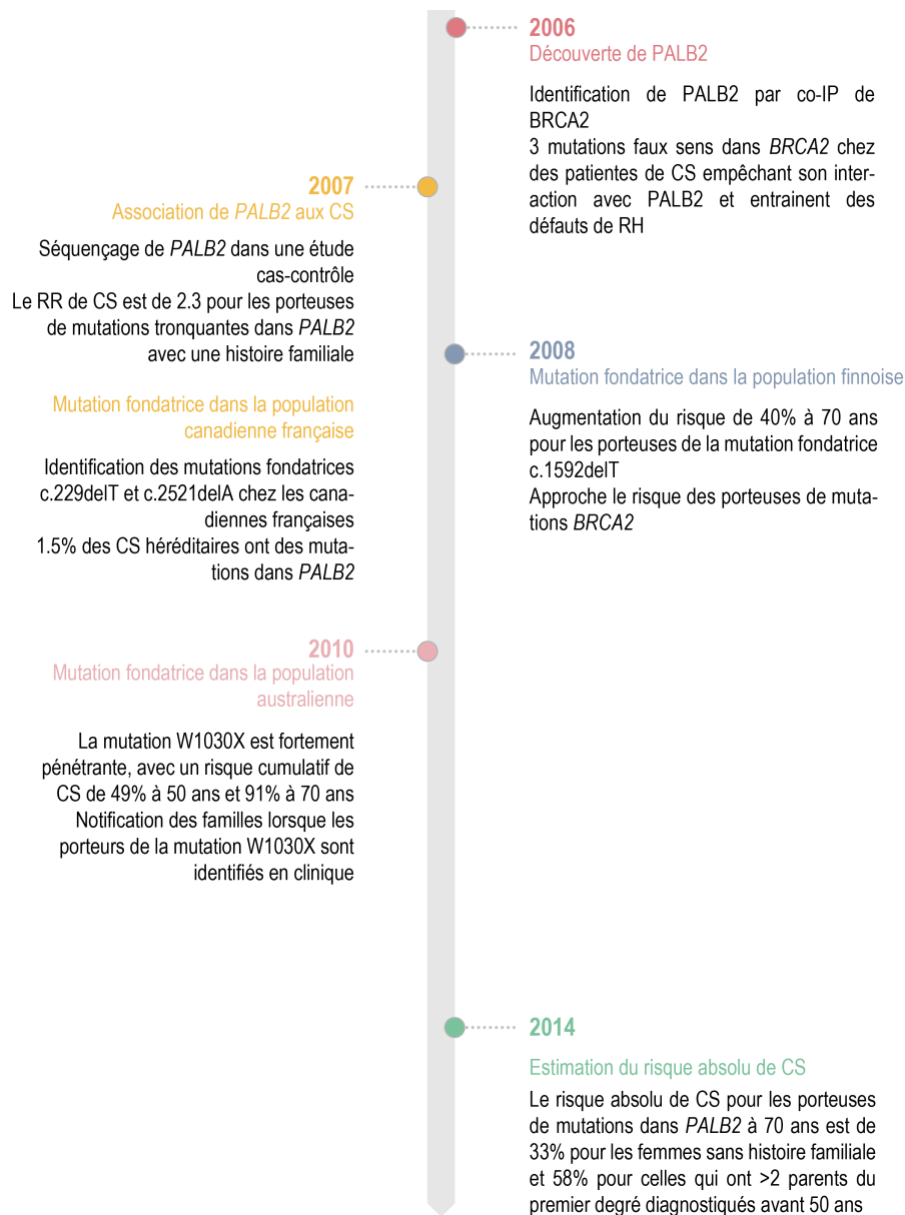


Figure 7 – Chronologie de l’association de PALB2 au cancer du sein

L’étude de Rahman suggère un risque plus important de CS chez l’homme pour les porteurs de mutations de *PALB2*, comme la prévalence des mutations tronquantes dans les familles avec des cas de CS déclarés chez les femmes et les hommes est plus grand (6.7% contre 1% dans les familles avec uniquement des cas CS déclarés chez les femmes, $P=0.15$) [83]. Au vu de ces résultats, plusieurs criblages de mutations dans *PALB2* ont été réalisés dans des cas de CS chez l’homme et les résultats sont discordants. Même si la majorité des études réalisées ne supportent pas un risque plus fort pour les hommes porteurs de mutations tronquantes dans *PALB2* comparativement aux femmes [88, 102-104], certaines équipes identifient des porteurs de mutations dans *PALB2* de manière plus fréquente chez les hommes que chez les femmes. De plus ils

estiment que les femmes porteuses de mutations dans *PALB2* sont 4 fois plus susceptibles d'avoir des membres de leurs familles avec des CS chez l'homme et qu'enfin le RR de CS chez l'homme pour les porteurs de mutations dans *PALB2* est de 8.3 (95% IC, 0.77-88.56, P = 0.08) [80, 105, 106]. Les mutations dans *PALB2* dans la population et le nombre de cas de CS chez l'homme étant rares, il est difficile d'établir des cohortes suffisamment grandes qui permettent d'estimer de manière robuste, l'association entre les variations dans *PALB2* et le CS chez l'homme, expliquant ainsi les différences d'observation rapportées.

3.1.2 *PALB2* et les autres cancers

Comme les profils des cancers familiaux *gPALB2* sont assez similaires aux *gBRCA2*, il est intéressant de se demander si les mutations de *PALB2* augmentent aussi le risque de cancer ovarien et de cancer pancréatique (CP) pour les porteurs.

Les variations tronquantes de *PALB2* sont associées au CP avec une fréquence d'apparition d'environ 4% chez les patients avec une histoire familiale de CP, dépendamment de la population étudiée. De plus, les porteurs de mutations hétérozygotes dans *PALB2* ont une augmentation du risque de CP de 6 fois par rapport à la population générale (P = 0.002) [80]. Aucune mutation pathogénique n'a été trouvée pour les cas de CP testés dans les populations hollandaise, italienne et canadienne française [107-109]. D'autre part, il n'est pas encore certain s'il y a un enrichissement de mutations dans *PALB2* chez les patients avec une histoire familiale de CS et de CP. Plusieurs rapports montrent que la majorité des cas de CP avec des mutations *gPALB2* ont une histoire personnelle ou familiale de CS [89, 110, 111]. De plus, il semble qu'au sein des cas de CS familiaux, ceux avec une histoire familiale de CP seraient enrichis pour des mutations dans *PALB2* [112]. De manière surprenante, l'étude d'Hofstatter ne soutient pas cette observation, puisque les auteurs rapportent une fréquence allélique de 2,1% des mutations tronquantes de *PALB2* chez les patients de CS *gBRCA1/2*-négatifs sélectionnés pour une histoire familiale de CP (2/94 cas (2.1%; 90% IC = 0.40%, 6.5%)) [113], ni les études de Stadler (77 familles de CS et CP incluant 22 cas avec une histoire personnelle de BC et CP) et Harinck (64 patients incluant 28 familles avec une histoire de CP et 28 familles avec une histoire de CS) qui ne trouvent pas de mutations pathogéniques dans *PALB2* chez les familles avec des CS et CP, incluant les cas avec une histoire personnelle de CS et/ou CP testées [107, 114]. Tous les résultats combinés montrent que les mutations pathogéniques dans *PALB2* sont impliquées dans 2.3% (7/306) des familles avec une histoire familiale de CP et 1.6% (5/306) de cas de CP avec une histoire familiale de CS. À l'époque où ces observations ont été faites, il n'y avait pas d'évidence d'association entre les mutations de type faux sens dans *PALB2* et une augmentation du risque de CS ou CP. Ainsi certaines variations faux sens avec un effet causal ont pu être sous estimées dans ces études et pourraient expliquer les différences d'observations faites quant à l'enrichissement des mutations

gPALB2 dans les familles avec une histoire de CS ou de CP. Ceci souligne le besoin de tester les variations non tronquantes pour mieux comprendre leurs implications dans le développement du cancer.

À ce jour, les variations de *PALB2* ne semblent pas associées au cancer ovarien (CO) [78] [99, 115]. Néanmoins, quelques mutations dans *PALB2* ont été identifiées dans 0.2% à 0.7% de cas de CO (incluant les cancers des trompes de Fallope et les carcinomes péritonéaux) [116] [117-120]. De plus, plusieurs équipes ont identifié des mutations de *PALB2* chez des patientes avec une histoire familiale de CS et/ou CO [88], cependant lorsqu'ils regardent uniquement les cas de CO, aucune mutation n'est identifiée [121, 122], ni de différence significative entre les cas et contrôles [115, 123, 124]. Les mutations *gPALB2* dans le CO étant rares, le véritable effet de ces mutations sur le risque de CO nécessite des études plus approfondies avant d'établir la pertinence clinique de ces mutations [124, 125].

Pour ce qui est du cancer de la prostate (CPr), la mutation fondatrice finlandaise c.1592delT a été observée dans une famille avec une histoire familiale de CPr, soulevant une possible association entre ce variant de *PALB2* et la maladie. D'autres études révèlent que chaque homme de cette famille porteur de la variation a développé un CPr avant l'âge de 76 ans [84]. De plus, la variation c.1592delT semble être présente dans des formes plus agressives de CPr qui présentent aussi une hypersensibilité à la Mitomycine C (MMC), révélant un phénotype d'haplo-insuffisance chez les porteurs [126]. De façon surprenante, le groupe COGS (*Collaborative Oncological Gene-environment Study*) a entrepris le génotypage de 3 mutations fréquentes de *PALB2* dans des cas de CPr et n'ont pas trouvé de preuve d'une association au CPr avec ces variations (c.1592delT, OR 2.06, 95% CI, 0.59-7.11, P = 0.24; c.3113G>A, OR 0.49, 95% CI, 0.18-1.36, P = 0.16; c.2816T>G, OR 0.95, 95% CI, 0.69-1.29, P = 0.73) [115].

Enfin, les mutations dans *PALB2* sont présentes dans d'autres types de cancers comme les adénocarcinomes pulmonaire et de l'estomac, ainsi que les carcinomes cellulaires squameux de la tête et du cou. Néanmoins, aucune association entre les mutations de *PALB2* et ces cancers n'a été rapportée à ce jour [119].

3.1.3 *PALB2* et l'anémie de Fanconi

L'anémie de Fanconi (AF) est une maladie génétique récessive rare (1/160 000 naissances) qui se caractérise par un syndrome d'instabilité génomique, plus précisément une hypersensibilité aux agents formant des ICLs (*DNA Interstrand CrossLinks*), ainsi que des phénotypes cliniques très variables. En effet, les patients peuvent présenter des malformations congénitales diverses (squelettiques, cutanées, urogénitales, cardio-pulmonaires et nerveuses centrales), une pigmentation de la peau anormale, une petite taille et un bas poids,

une microphthalmie et enfin une forte prédisposition aux tumeurs solides et leucémies [127]. Cette hétérogénéité clinique peut s'expliquer par une hétérogénéité génétique. En effet, un minimum de 22 gènes impliqués dans l'AF ont été identifiés à ce jour et sont nommés *FancA* à *FancW* [128, 129]. Plusieurs mutations homozygotes dans les gènes de la RH sont impliquées dans le développement de cette maladie comme *BRCA2* (*FANCD1*) [130] ou encore *PALB2* (*FANCN*) [81, 95].

Il est intéressant de noter que les groupes de complémentation FA-D1 et FA-N partagent de nombreux phénotypes communs, comme pour le CS [131]. Les souris homozygotes KO (*knock-out*) pour *PALB2* (*PALB2*^{-/-}), comme pour *BRCA2* (*BRCA2*^{-/-}), présentent une létalité embryonnaire précoce alors que les souris hétérozygotes sont viables [132]. Les cellules *PALB2*^{-/-}, comme les cellules *BRCA2*^{-/-}, présentent une diminution de la RH, une hypersensibilité à la MMC et des défauts du point de contrôle intra-S du cycle cellulaire [95]. De plus, en comparaison aux parents, les cellules montrent de larges cassures chromosomiques et une plus grande sensibilité après traitement à faible concentration d'aldéhyde, un composé chimique qui endommage l'ADN en formant des adduits [133]. Il semblerait que *PALB2* soit impliqué dans l'impact de l'exposition aux aldéhydes et ROS (*Reactive Oxygen Species*) chez les patients AF. De plus, l'exposition aux aldéhydes exogènes ou endogènes induit la dégradation de *PALB2* et *BRCA2* par le protéasome, menant ainsi à un phénotype d'haplo-insuffisance et donc à une instabilité génomique [134].

À ce jour, 13 patients AF porteurs de mutations bi-alléliques dans *PALB2* ont été recensés [81, 95, 135-137]. Plusieurs cas sévères d'AF sont expliqués par la présence de mutations tronquantes dans *PALB2*, empêchant la protéine d'interagir avec ses partenaires de la réparation et menant ainsi à des défauts de RH. Cette instabilité génétique importante explique la sévère prédisposition des patients FA-N aux cancers pédiatriques, comme observé chez la majorité des patients [131]. En 2016, une forme intermédiaire rare d'AF est rapportée [136]. Deux patients touchés par ce phénotype présentent des symptômes communs à l'AF comme le retard de croissance, les anomalies de pigmentation et le développement de lymphomes non-Hodgkiniens. Cependant, ces patients ne développent pas de tumeurs de type embryonnaire ou d'autres phénotypes typiques de l'AF (comme l'anémie aplasique, les malformations aux reins). De plus, ces patients présentent une sensibilité intermédiaire aux agents causant des ICLs, comparativement aux autres patients typiques de l'AF. Les analyses par séquençage de l'ADN de ces patients révèlent qu'ils sont tous deux porteurs de mutations bi-alléliques dans *PALB2* qui n'empêchent pas sa liaison aux protéines *BRCA1* et *BRCA2*. De manière intéressante, les cellules issues de ces patients ne sont pas capables de former des foyers *RAD51*, une étape majeure de la RH, après dommage à l'ADN. Pourtant la surexpression de ces mutants dans des cellules conduit à la formation de foyers *RAD51*. Ces observations suggèrent que ces patients portent des mutations hypo-morphiques de *PALB2*, qui causent des faibles niveaux d'expression de *PALB2* mutée partiellement fonctionnelle [136].

Enfin, la réalisation de modèles de souris KO pour *Palb2* à l'aide de la stratégie de « piégeage de gènes » (ou *gene trapping*) ne permet pas de dépasser la létalité embryonnaire rencontrée même avec une déplétion de *Trp53* [138]. Cette létalité embryonnaire pourrait expliquer la faible proportion de patients FA-N (environ 13/2 000). En 2014, un modèle de souris KO pour *PALB2* est réalisé en mutant l'exon 2 de la protéine. Cette mutation cible le motif superhélice de la protéine, aussi appelé *coiled-coil* et empêche l'interaction de *PALB2* avec *BRCA1* uniquement. Ceci permet de dépasser la létalité embryonnaire rencontrée avec les anciens modèles. Les souris obtenues sont viables et ne présentent pas les défauts développementaux et d'insuffisance médullaire observés chez les patients AF. Le seul phénotype partagé avec eux dans ce modèle de souris, est l'hypersensibilité à la MMC et l'infertilité des mâles [139].

3.2 PALB2, médiateur de la réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue

3.2.1 La réponse aux cassures double-brin de l'ADN

À chaque instant, les cellules de notre organisme subissent des attaques au niveau de leur ADN par des agents endogènes et exogènes, de nature chimique et physique [140]. On estime ainsi que chaque jour, environ 100 000 lésions spontanées touchent l'ADN de chaque cellule de notre organisme [141]. Après chaque dommage, la cellule met en place un large réseau de signalisation, nommée réponse aux dommages à l'ADN (ou DDR pour *DNA Damage Response*) afin d'évaluer le type de lésion et donner une réponse adéquate (mourir, se différencier via la sénescence, activer son système immunitaire ou encore réparer son ADN) [142]. Les cassures double-brin (CDBs) de l'ADN sont particulièrement délétères pour la cellule puisqu'elles peuvent générer une perte d'information sur les 2 brins de l'ADN. Leurs mauvaises réparations peuvent entraîner des mutations, des translocations chromosomiques ou générer des produits qui sont toxiques pour la cellule [143]. La cellule a donc développé au cours de l'évolution différents mécanismes de réparations des CDBs dont les principales voies sont :

- la jonction des extrémités non homologues (ou NHEJ pour *Non-Homologous End Joining*)
- la jonction des extrémités non homologues alternative (ou alt-NHEJ pour *Alternative Non-Homologous End Joining*)
- l'appariement des extrémités protubérantes simple-brin (ou SSA pour *Single Strand Annealing*)
- la recombinaison homologue (ou HR pour *Homologous Recombination*) (**Figure 8**)

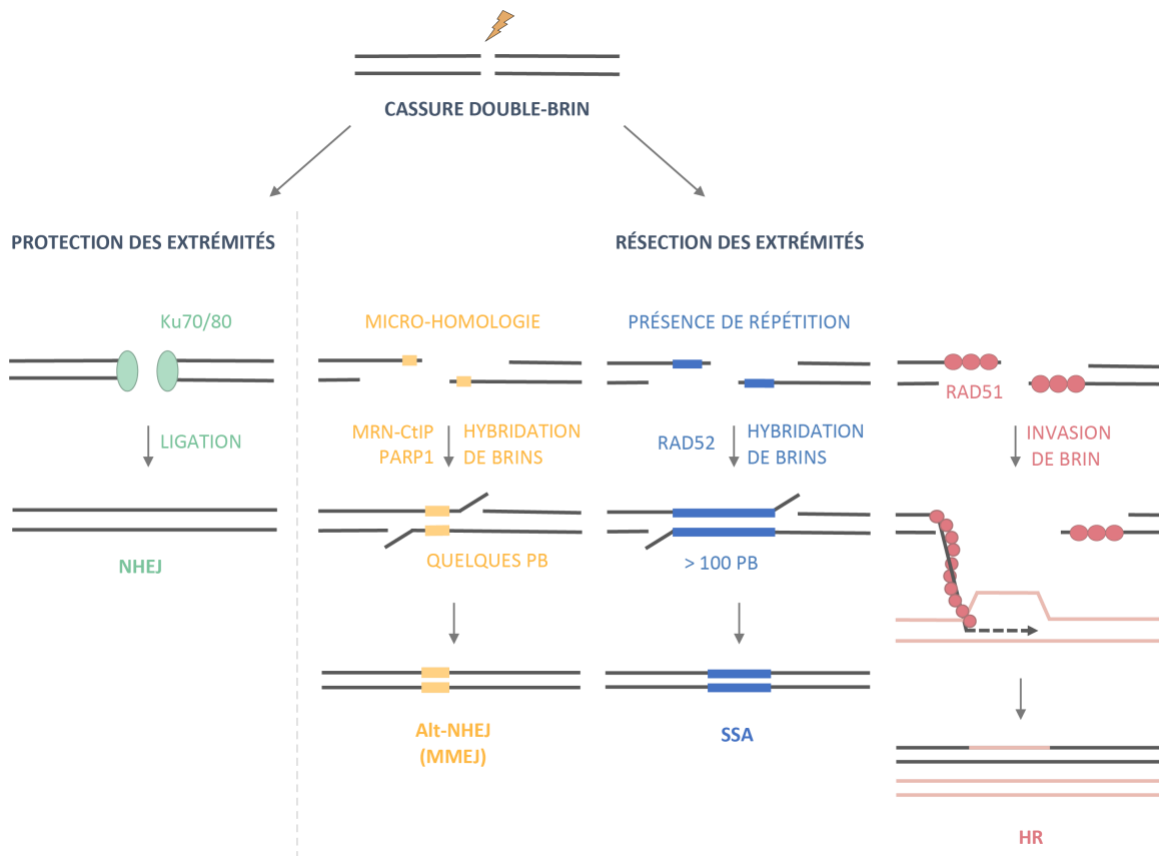


Figure 8 – Les principales voies de réparation des cassures double-brin de l’ADN

(NHEJ) Le NHEJ est la voie de réparation principale des CDBs. Elle est active tout au long du cycle cellulaire mais agit principalement pendant la phase G1. Le NHEJ joue un rôle important dans le développement du système immunitaire comme la recombinaison V(D)J et la commutation isotopique [144]. Cette voie est active seulement sur les extrémités pas ou peu modifiées afin de rattacher directement les extrémités de la CDB. En effet, le complexe hétérodimérique Ku70/80 reconnaît le site de lésion et recrute la DNA PKcs (*DNA-dependant Protein Kinase catalytic subunit*). Cette association va permettre l’activation de la DNA PKcs par autophosphorylation et la formation du complexe DNA PK (*DNA Phosphatidylinositol 3-kinase-related Kinase*). Celui-ci active par phosphorylation différents partenaires qui vont traiter les extrémités et permettre leur rapprochement, comme l’endonucléase Artémis, qui dégrade les nucléotides quand les extrémités sont incompatibles. La polymérase *lambda* ou *mu* ajoute alors les nucléotides manquants, ce qui entraîne souvent des mutations. Le complexe DNA PK recrutent enfin la ligase XLF-XRCC4-LIG4 pour lier les extrémités [145].

(Alt-NHEJ) Le Alt-NHEJ est la voie de secours du NHEJ lorsque Ku70/80 ou LIG4 sont bloquées ou défectueuses. Ici, la jonction des extrémités est guidée par la présence de microhomologie (ou MMEJ pour *Microhomology-Mediated End Joining*). Les protéines MRE11 (*Meiotic Recombination 11*) et PARP-1 (*Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*) sont responsables de la reconnaissance de la cassure, tandis que CtIP (*C-terminal binding protein 1 Interaction Protein*) et le complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1) permettent la

résection des extrémités de l'ADN endommagé. La polymérisation est effectuée par la polymérase *théta*. Enfin les extrémités générées sont liées par les ligases LIG1 ou LIG3 [145]. **(SSA)** Le SSA a lieu durant les phases S/G2 du cycle cellulaire et nécessite une séquence d'homologie de part et d'autre de la CDB. Suite à la résection des extrémités, il y a révélation de l'ADN simple-brin qui va être protégé par les protéines RPA (*Replication Protein A*). La recombinaise RAD52 s'associe aux extrémités pour hybrider les séquences homologues révélées lors de la résection. Si aucune homologie n'est révélée, il y a transformation des extrémités non homologues par l'endonucléase ERCC1/XPF (*Excision Repair Cross-Complementation Group 1*) (*Xeroderma Pigmentosum group F-complementing protein*) puis élongation par les ADN polymérases pour combler l'information manquante, ce qui entraîne la modification de l'information génétique. Enfin il y a ligation des extrémités de la cassure. À ce jour, les acteurs de la polymérisation et ligation impliqués dans cette voie ne sont pas bien compris [146]. **(HR)** Le mécanisme de la recombinaison homologue est développé ci-dessous. (*Adaptée de Jasin et Rothstein 2013*)

3.2.2 PALB2 et la recombinaison homologue

La RH est un système puissant qui permet de corriger de manière fidèle les CDBs. En effet, ce mécanisme se déroule durant les phases S et G2 du cycle cellulaire afin d'utiliser la chromatide sœur comme modèle de réparation [147, 148]. La RH repose sur l'intervention de nombreuses protéines comme BRCA1, BRCA2, PALB2 et RAD51 [79, 149]. Ces protéines forment des foyers de réparation, au niveau du noyau, que l'on appelle foci nucléaires. La co-localisation de ces protéines avec le marqueur de dommages à l'ADN gamma-H2AX est visible par microscopie à immunofluorescence. La RH est organisée en 3 phases (présynaptique, synaptique et postsynaptique) (**Figure 9**).

- **Phase présynaptique** : elle débute avec la détection de la CDB par le complexe MRN. Suite à la détection du dommage, MRN va recruter et activer les protéines de signalisation ATR et ATM. ATM phosphoryle les histones H2AX, qui deviennent alors les histones gamma-H2AX. Une fois la signalisation du dommage enclenchée, différents complexes protéiques vont être recrutés pour étendre les marques de signalisation de la CDB. Parmi ces protéines se trouvent les ubiquitines ligases RNF8 et RNF168, qui vont ubiquitiner les histones gamma-H2AX. Cette nouvelle modification des histones entraîne le relâchement de la chromatine et le recrutement d'autres acteurs de la réparation comme MRE11 et CtIP, qui vont initier la résection limitée des extrémités de la cassure. Le recrutement de BRCA1 au site de dommage permet de stimuler la poursuite de la résection sur une plus grande distance nucléotidique par deux voies MRN-RPA-BLM-EXO1 et MRN-RPA-BLM-DNA2. L'ADN simple-brin (ADN SB) généré est stabilisé et protégé de la dégradation en étant recouvert par les protéines

RPA. BRCA1 recrute alors PALB2 au site de dommage qui recrute à son tour BRCA2. PALB2 joue le rôle central de médiateur dans la RH. C'est à dire qu'elle aide la détection et la signalisation des dommages en interagissant avec d'autres partenaires de la réparation. En effet PALB2 stimule la liaison de BRCA2 à l'ADN endommagé et permet sa stabilisation à la chromatine. Ensemble, PALB2 et BRCA2 déplacent les protéines RPA et recrutent la recombinaise RAD51 sur l'ADN SB.

- **Phase synaptique** : son initiation est marquée par la formation du nucléofilament RAD51 autour de l'ADN SB qui est stimulé par PALB2 et BRCA2. La recombinaise RAD51 va conduire la recherche d'homologie au niveau de la chromatide sœur pour réparer de manière fidèle le dommage à l'ADN. Une fois la séquence homologue identifiée, RAD51 sépare les brins de la chromatide sœur pour permettre à l'ADN endommagé et un des brins de la chromatide sœur de former une structure secondaire hybride nommée boucle-D ou boucle de déplacement.
- **Phase postsynaptique** : elle débute quand l'ADN polymérase delta ou eta initie l'élongation de l'ADN SB en utilisant le brin de la chromatide sœur comme matrice. En parallèle ou consécutivement à l'élongation, les structures secondaires sont défaites par les mécanismes de SDSA (*Synthesis Dependant Strand Annealing*) et DSBR (*Double Strand Break Repair*) respectivement. Au cours du SDSA, RAD51 va exclure la chromatide sœur pendant l'élongation. S'ensuit la ligation des brins d'ADN sans événements de recombinaison génétique. Lors du DSBR, l'élongation va générer la formation des jonctions de Holliday, dont la résolution nécessite un clivage des brins de même polarité par des résolvases comme les endonucléases MUS81 (*MMS and UV Sensitive protein 81*) et XPF. Une fois les jonctions résolues, la ligation pourra générer deux types de produits selon que la ligation se fasse directement à l'aide de TOP3 et BLM, ou qu'elle inclue une étape de recombinaison génétique [140].

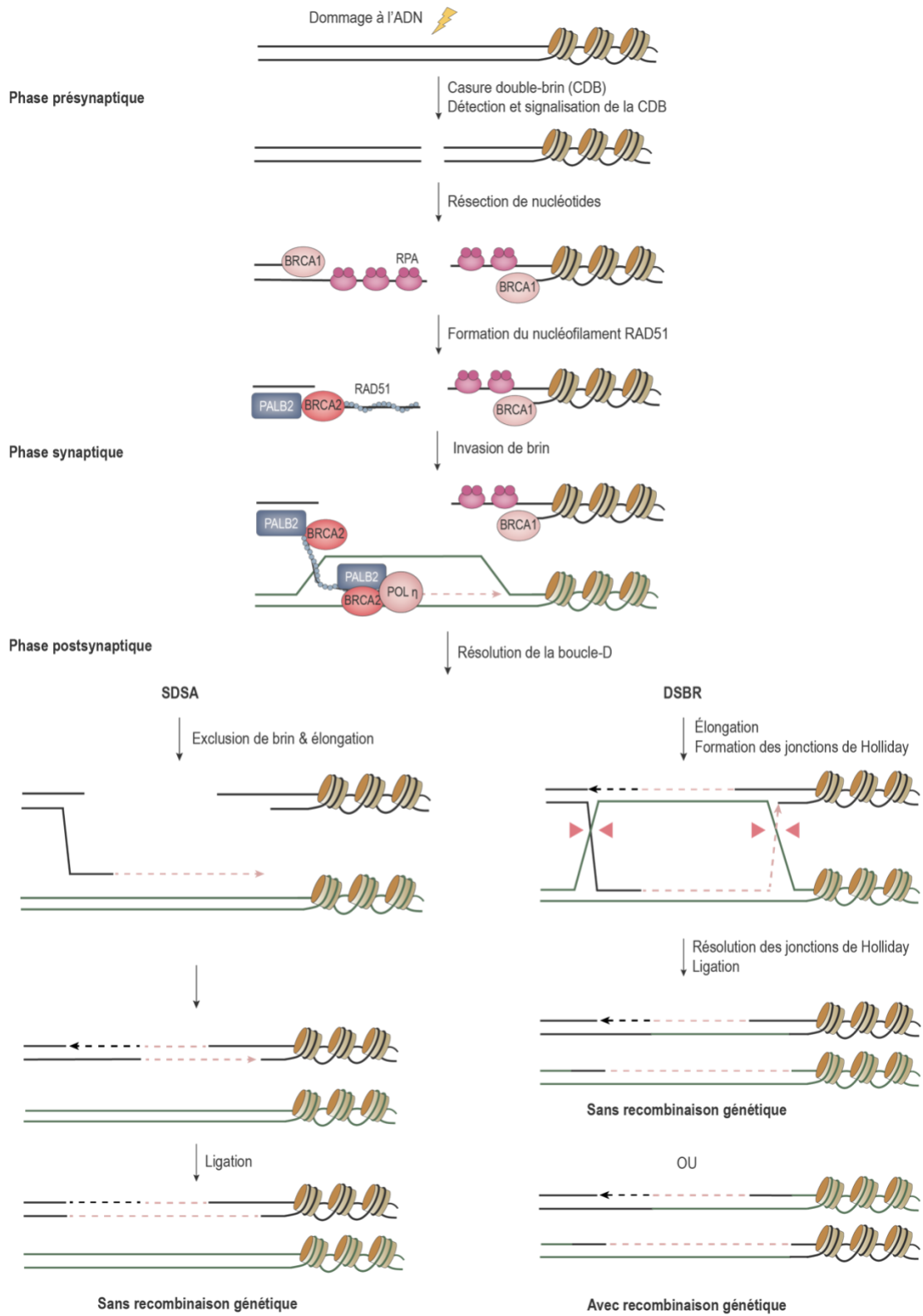


Figure 9 – Mécanisme de la recombinaison homologue

3.3 Structure et régulation de PALB2

D'une longueur de 1186 acides aminés (131 kDa), PALB2 est constituée de 13 exons [81]. Cette protéine comporte de nombreux domaines d'interaction qui ont été identifiés par immunoprécipitation et microscopie à immunofluorescence. Ces domaines permettent la régulation de la fonction de PALB2 dans le maintien de la stabilité du génome (**Figure 10**).

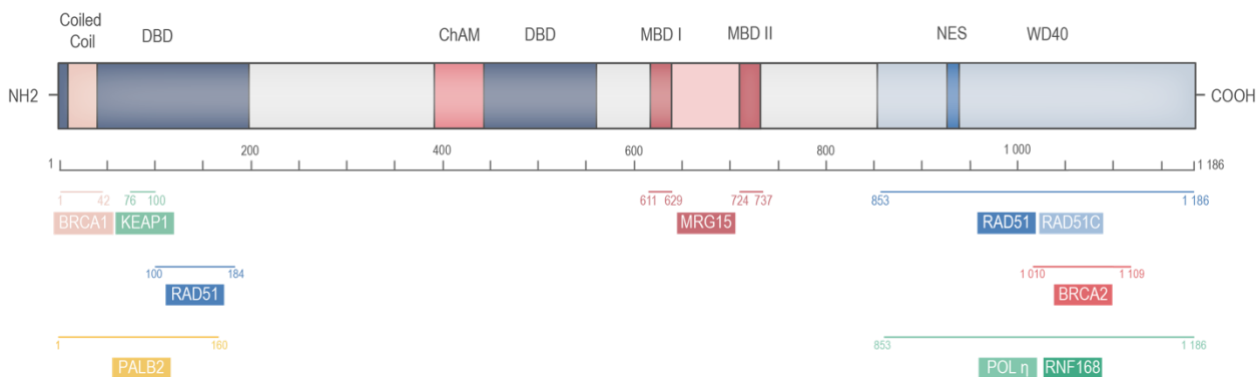


Figure 10 – Structure et domaines fonctionnels de PALB2

PALB2 possède au niveau de son extrémité N-terminale un domaine *coiled-coil* (résidus 1-42) qui permet son interaction avec BRCA1, ainsi qu'un premier domaine de liaison à l'ADN. C'est au niveau de celui-ci que PALB2 pourra interagir avec les protéines KEAP1 (résidus 76-100) et RAD51 (résidus 100-184). Cette région permet aussi la multimérisation de PALB2. Au niveau central de la protéine se trouve un motif d'association à la chromatine ou ChAM (résidus 395-446), un deuxième domaine de liaison à l'ADN et enfin un domaine de liaison à MRG15 (résidus 611-737). Au niveau de son extrémité C-terminale se situe le domaine WD40, une plateforme essentielle pour la fonction de PALB2 dans la RH puisqu'elle permet son interaction avec les protéines BRCA2 (1010-1109), RAD51, RAD51C, POL *eta* et RNF168 (résidus 853-1186) (*Adaptée de Ducy et coll. 2019*).

3.3.1 Restriction de la recombinaison homologue aux phases S/G2 du cycle cellulaire par KEAP1-CRL3 et USP11

Afin d'assurer une recombinaison mitotique exclusivement entre les chromatides sœurs, un mécanisme de suppression de la RH est mis en place pendant la phase G1 du cycle cellulaire. Tel qu'illustré à la **Figure 11.A**, KEAP1 (*Kelch-like ECH-Associated Protein 1*) recrute l'E3 ubiquitine ligase CRL3 (*CULLIN3(CUL)-RING Ligase*) qui va ubiquitiner PALB2 au niveau des résidus lysines K20, K25 et K30, situées dans le domaine d'interaction à BRCA1. Ces ubiquitinations empêchent la formation du complexe PALB2-BRCA1 indispensable au bon déroulement de la RH. Durant les phases S/G2 du cycle cellulaire (**Figure 11.B**), la dé-ubiquitinase USP11 (*Ubiquitin Specific Peptidase 11*) va lever cette restriction imposée par KEAP1-CUL3, permettant ainsi

le recrutement de PALB2 par BRCA1 au site de lésion. Il est important de noter que la régulation cycle-dépendante de la formation du complexe PALB2-BRCA1 est dirigée par USP11. En effet, USP11 possède une demi-vie très courte en G1 et interagit faiblement avec PALB2 pendant cette phase du cycle cellulaire. De plus, USP11 est rapidement dégradée par le protéasome en réponse aux dommages à l'ADN, surtout en G1. La déstabilisation de cette protéine est dépendante de la signalisation par ATM (après traitement aux IR) et ATR (après traitement aux UV) et est orchestrée par la ligase CUL4 (*CULLIN4*) [150] (**Figure 11**).

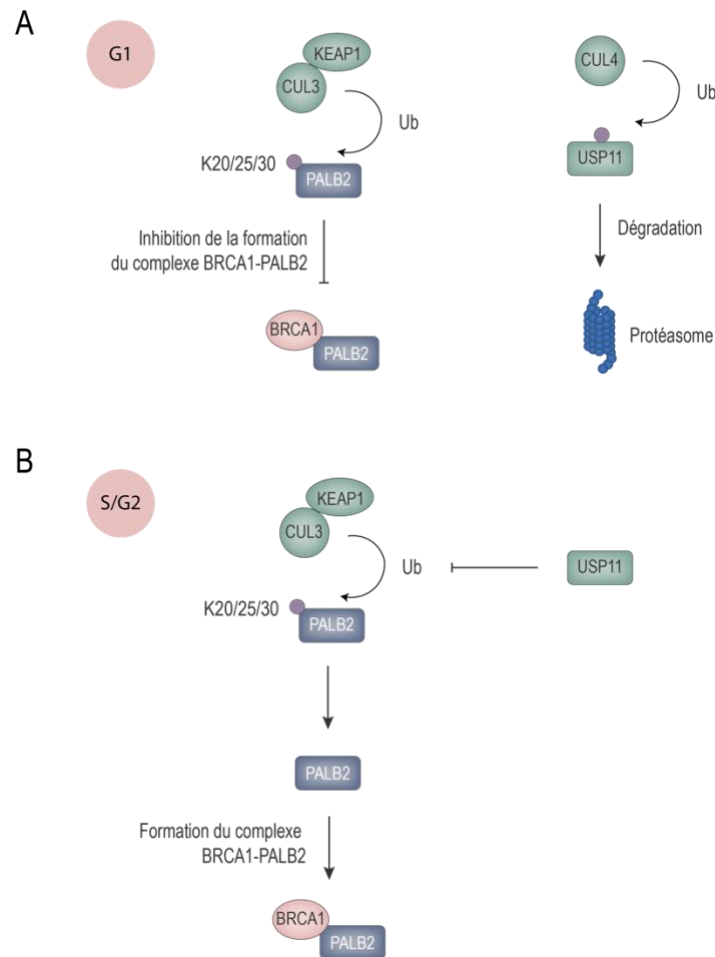


Figure 11 – Restriction de la recombinaison homologue aux phases S/G2 du cycle cellulaire par KEAP1-CRL3 et USP11

(A) Durant la phase G1 du cycle cellulaire, PALB2 est ubiquitinée par KEAP1-CUL3, empêchant ainsi son interaction avec BRCA1. (B) Durant les phases S/G2, USP11 empêche KEAP1-CRL3 d'ubiquitiner PALB2, permettant ainsi la formation du complexe BRCA1-PALB2.

3.3.2 Stimulation de la recombinaison homologue en phase S/G2 du cycle cellulaire par RNF168

Lors de la signalisation de la CDB, l'E3 ubiquitine ligase RNF168 (*RING Finger protein 168*) ubiquitine les résidus lysine K13 et K15 des histones H2A et H2AX qui se trouvent à proximité de la cassure. RNF8 (*RING Finger protein 8*) va ensuite synthétiser sur ces résidus K13 et K15 mono-ubiquitinés, des chaînes d'ubiquitines liées par leurs résidus K63. Cette modification des histones induit le relâchement de la chromatine qui va permettre le recrutement de la machinerie de réparation [151]. Durant les phases S et G2 du cycle cellulaire, PALB2 interagit physiquement avec RNF168 pour être recrutée aux marques de modification des histones. Cette liaison se fait au niveau des domaines WD40 de PALB2 (résidus 853-1 186) et PID (*PALB2-Interacting Domain*) de RNF168 (résidus 525-571). Bien que l'interaction entre RNF168 et PALB2 soit indépendante de BRCA1, le recrutement de PALB2 aux foyers de réparation nucléaires induits par IR est complètement dépendant de BRCA1. Ce modèle suggère donc que la liaison RNF168-PALB2 facilite le recrutement de PALB2 par BRCA1 au niveau du site de dommages à l'ADN et stimule ainsi la RH [152] (**Figure 12**).

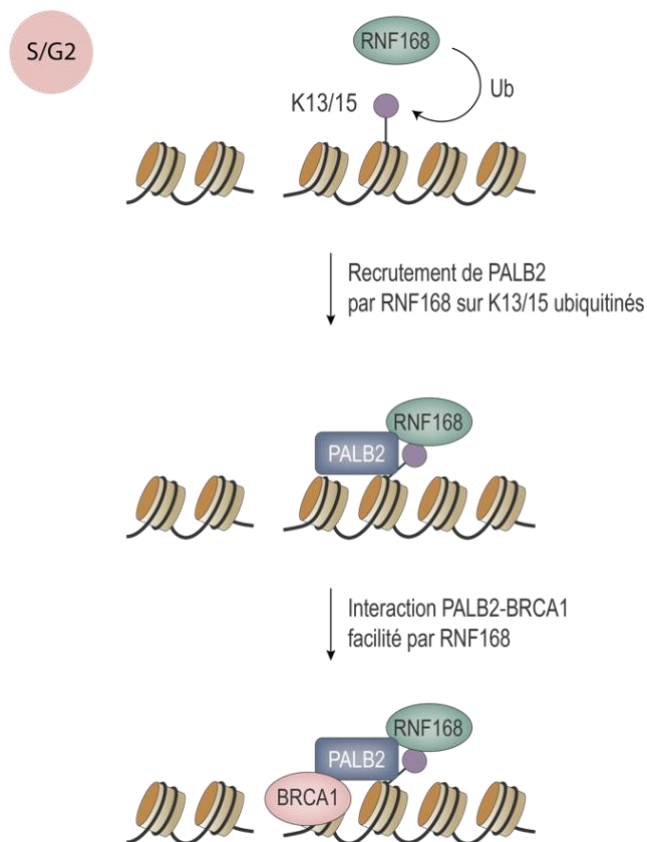


Figure 12 – Recrutement de PALB2 à la chromatine dépendamment de RNF-168

Durant les phases S/G2 du cycle cellulaire, RNF168 ubiquitine les histones H2A et H2AX au niveau des résidus lysine 13 et 15, menant au recrutement de PALB2 au niveau des marques de modifications des histones. Le recrutement de PALB2 au site de dommage à l'ADN facilite ainsi son interaction avec BRCA1.

3.3.3 Régulation du complexe BRCA1-PALB2 suite aux dommages à l'ADN

En absence de dommages à l'ADN, PALB2 se polymérise au niveau de son domaine superhélice ou *coiled-coil* (résidus 1-42), localisé dans la région N-terminale de la protéine. Ainsi les deux superhélices-alpha s'enroulent étroitement de manière anti-parallèle, au niveau de leurs glissières à leucine [153]. Cette forme multimérique de PALB2 possède une affinité réduite pour l'ADN SB ainsi qu'une activité faible de stimulation de la formation du nucléofilament de RAD51 (**Figure 13.A**). En présence de lésions à l'ADN, BRCA1 compétitionne avec les monomères PALB2 pour se fixer au domaine *coiled-coil* [154, 155]. De plus, la phosphorylation de BRCA1 sur son résidu sérine S988 par CHEK2 (*Checkpoint kinase 2*), semblerait augmenter l'affinité de BRCA1 pour PALB2 et lui permettre ainsi de défaire les homo-oligomères de PALB2, afin de former les complexes PALB2-BRCA1. BRCA1 serait donc responsable du changement entre les formes multimériques de faible activité et les monomères actifs de PALB2, qui sont essentiels au recrutement et à la formation du nucléofilament RAD51 [156, 157] (**Figure 13.B**).

D'autre part, la phosphorylation de PALB2 permet de réguler son interaction avec BRCA1. En effet, PALB2 possède sept résidus sérine qui constituent des sites de phosphorylation S/Q spécifiques des protéines de signalisation de la CDB, ATM et ATR [158-160]. Plus particulièrement, les résidus sérine S59 et S64 sont au centre de cette régulation. Pendant la phase G1, les protéines CDKs (*Cycline-Dependant Kinases*) inhibent la kinase ATR, et phosphorylent PALB2 au niveau du résidu S64. Cette phosphorylation empêche son interaction avec BRCA1. Suite aux dommages à l'ADN, ATR est activée pendant les phases S/G2 du cycle cellulaire et va inhiber les CDKs par l'intermédiaire de CHEK1 (*Checkpoint kinase 1*), permettant ainsi à ATR de phosphoryler PALB2 au niveau du résidu S59. Cette phosphorylation permet la formation du complexe BRCA1-PALB2. PALB2 peut donc s'accumuler aux sites de lésions nucléaires si elle est hypophosphorylée en S64 et phosphorylée en S59 via ATR (**Figure 13.B**).

Enfin, PALB2 est phosphorylée par ATM/ATR au niveau des résidus sérine S157 et S376 en réponse aux dommages à l'ADN. La phosphorylation du résidu S157 est dépendante de BRCA1. Ces phosphorylations sont importantes non pas pour la localisation au site de CDB de PALB2, la formation des foyers RAD51 ou encore à son interaction avec ses partenaires de la RH, mais plutôt pour la résolution des lésions. En effet, sans ces phosphorylations, les cellules endommagées restent bloquées en attendant la résolution du dommage [158]. De plus, les sites de phosphorylation S59, S157 et S376 sont impliqués dans la formation des foyers RAD51. Il

semblerait aussi que PALB2-phosphorylée joue un rôle dans la stabilisation du filament RAD51 et le maintien du point de contrôle G2 après dommages à l'ADN [159].

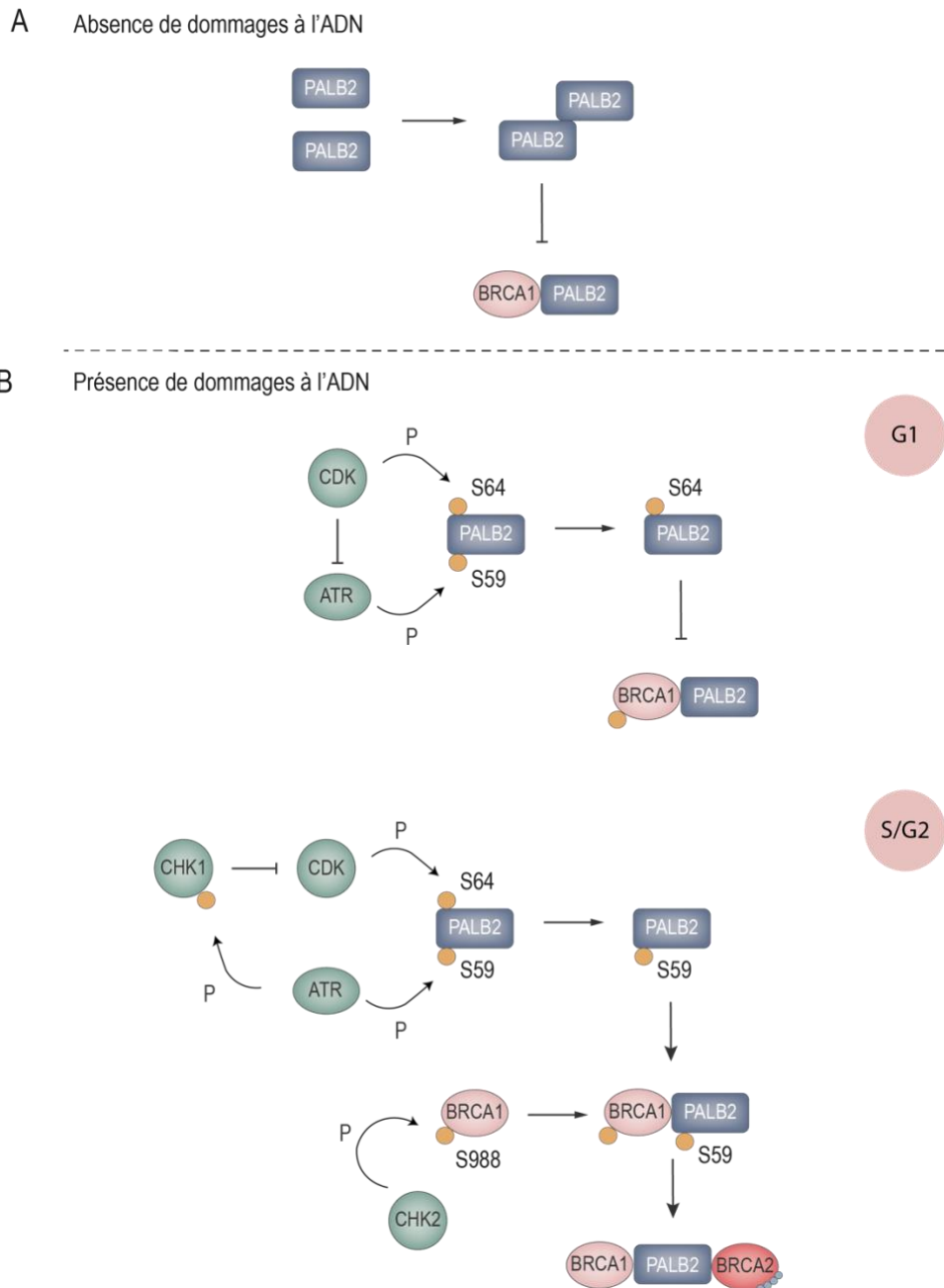


Figure 13 – Régulation du complexe BRCA1-PALB2 suite aux dommages à l'ADN

(A) En absence de dommages à l'ADN, PALB2 se multimérise au niveau du domaine *coiled-coil*, empêchant ainsi son interaction avec BRCA1. (B) En présence de dommages à l'ADN, PALB2 est phosphorylée afin de

réguler son activité au cours du cycle cellulaire. Ainsi, la phosphorylation de PALB2 sur le résidu S59 par CDK durant la phase G1 du cycle cellulaire empêche son interaction avec BRCA1, tandis que la phosphorylation de PALB2 sur son résidu S64 par ATR permet la formation du complexe BRCA1-PALB2. De plus, la phosphorylation de BRCA1 sur son résidu S988 par CHK2 stimule aussi la formation du complexe BRCA1-PALB2.

3.3.4 Rôle de PALB2 dans le contrôle de l'homéostasie

PALB2 interagit avec le censeur de stress oxydatif KEAP1 au niveau de sa région N-terminale (résidus 76-100). Cette interaction permet à PALB2 de diminuer le stress oxydatif dû à la formation de ROS et de protéger ainsi le génome.

Lorsque le niveau cellulaire de ROS est supérieur aux capacités de défense de la cellule, celle-ci se trouve en condition de stress oxydatif. Pour limiter les dommages oxydatifs et maintenir l'homéostasie cellulaire, le facteur de transcription NRF2 (*Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2*) active la transcription de nombreux gènes qui contiennent des éléments de la réponse anti-oxydante (ou ARE pour *Antioxidant Response Element*). En temps normal, NRF2 lie l'E3 ligase KEAP1 au niveau de ses domaines Kelch, ce qui entraîne son ubiquitination suivis par son export au cytoplasme et enfin sa dégradation. KEAP1 réprime donc l'activité de NRF2 en empêchant sa liaison aux gènes contenant des AREs via son export nucléaire. En condition de stress oxydatif, KEAP1 subit une modification au niveau du résidu cystéine C151 qui entraîne le changement de sa conformation et empêche sa liaison correcte à NRF2 au niveau des motifs DLG. Ce mésappariement entraîne la séquestration de KEAP1 par NRF2 au noyau et permet à d'autres protéines NRF2 d'activer la transcription des gènes contenant des AREs.

PALB2 possède aussi un motif LDEETGE qui permet sa liaison à KEAP1 au noyau (résidus 88-94). Ainsi PALB2 empêche la liaison de KEAP1 à NRF2, permettant à cette dernière d'activer la transcription des gènes contenant des AREs au noyau. PALB2 compétitionne avec NRF2 pour se lier à KEAP1 et peut séparer les complexes KEAP1-NRF2 déjà formés grâce à sa plus grande affinité pour KEAP1 [161, 162] (**Figure 14**).

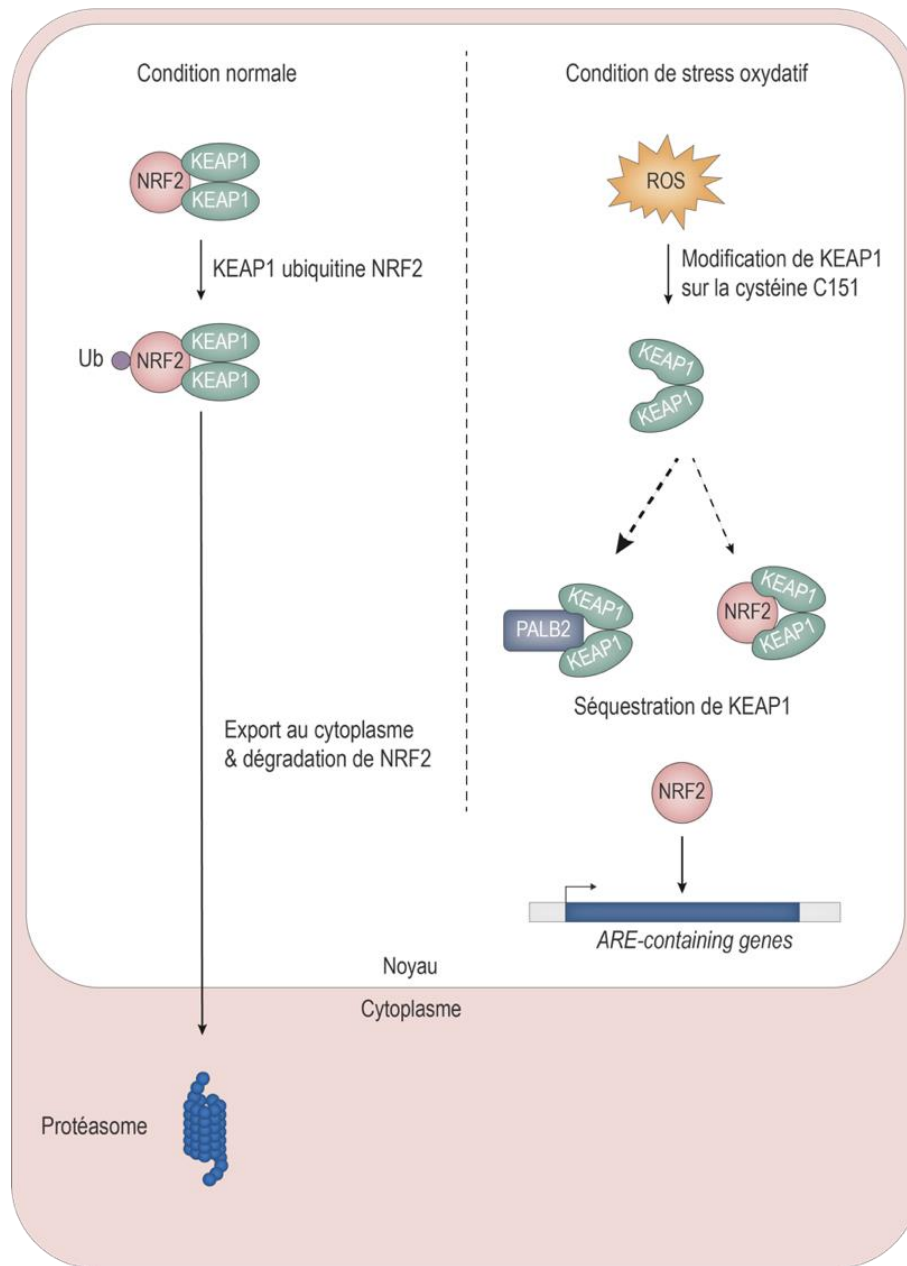


Figure 14 – Rôle de PALB2 dans le contrôle de l’homéostasie

En condition normale, l’interaction de NRF2 avec KEAP1 entraîne son ubiquitination et son export au cytoplasme, suivi par sa dégradation par le protéasome. En condition de stress oxydatif, KEAP1 subit une modification au niveau de son résidu C151, entraînant un changement de sa conformation qui empêchant ainsi sa liaison correcte à NRF2. Ceci entraîne la séquestration de KEAP1 au niveau du noyau et permet aux autres protéines NRF2 d’activer la transcription des gènes contenant des éléments de la réponse anti-oxydante. De plus, PALB2 compétitionne avec NRF2 pour se lier à KEAP1, favorisant ainsi l’activité de transcription de NRF2.

3.3.5 Association à la chromatine

Au centre de la protéine se trouve le motif ChAM (*Chromatine-Association Motif*) (résidus 395-446), permettant le recrutement de PALB2 à la chromatine par interaction directe avec les histones nucléosomales et ce de manière indépendante de l'ADN [79, 163] (**Figure 10**). Ce recrutement a lieu en absence ou en présence de dommages à l'ADN générés par exposition aux IR ou à la MMC. Il est intéressant de noter que le domaine d'interaction à la protéine MRG15, qui sera détaillé au point suivant, est suffisant pour permettre le recrutement de PALB2 à la chromatine en cas de délétion du ChAM. Ces deux domaines seraient donc responsables de la localisation efficace de PALB2 à la chromatine [163, 164]. D'autre part, PALB2 stabilise BRCA2 à la chromatine, via son motif ChAM, permettant ainsi à BRCA2 de jouer son rôle de médiateur dans la RH et de réguler les points de contrôle du cycle cellulaire [77, 155, 163, 165, 166].

3.3.6 PALB2 et le stress réplcatif

En 2009, Sy et coll. effectuent des alignements de séquences de PALB2 et ses homologues et révèlent une région conservée dans la partie centrale de PALB2. Des expériences de co-immunoprécipitation et de spectrométrie de masse ont permis d'une part d'identifier cette séquence comme un domaine d'interaction aux protéines MRG15 (*MORF-Related Gene on Chromosome 15*) et son homologue MRGX, qui est nommé MBD (*MRG15 Binding Domain*). D'autre part les auteurs ont observé que les complexes MRG15-PALB2 et MRGX-PALB2 sont les plus abondants dans la cellule [164, 167]. Ces interactions ont été validées par la suite lors d'un criblage des partenaires de PALB2 par la méthode double hybride chez la levure [168].

La formation du complexe MRG15-PALB2 est médiée par le domaine MRG de MRG15 (résidus 151-323) et le domaine MBD de PALB2 (résidus 611-764). Le domaine MBD de PALB2 est constitué de deux sous-domaines importants pour l'interaction avec MRG15 et se nomment MBDI (résidus 611-629) et MDBII (résidus 724-737).

MRG15 appartient à la famille très conservée des protéines qui possèdent des domaines MRG et chromodomaine en N-terminal. Ces protéines sont responsables de la régulation transcriptionnelle via le remodelage de la chromatine. En effet, MRG15 reconnaît et lie le résidu lysine 36 triméthylé des histones H3 (H3K36me3) ainsi que la lysine 16 des histones H4 (H4K16). MRG15 appartient aux complexes de modification de la chromatine incluant l'histone acétyltransférase (ou HAT pour *Histone Acetyl Transferase*) NuA4/TIP60 (ou KAT5 chez l'Homme) et l'histone désacétylase (ou HDAC pour *Histone Deacetyl Transferase*) Sin3B/Rpd3S. L'interaction entre MRG15 et PALB2 ouvre ainsi la porte sur une nouvelle fonction de PALB2 dans la stabilité du génome, indépendante de la RH [164].

L'implication de MRG15 dans la RH est contradictoire dans les papiers. L'équipe de Sy et coll., rapporte en 2009 un effet de MRG15 sur l'hyper-recombinaison mais pas sur la RH. En effet, les souris KO *MRG15*-générées présentent des défauts de RH ainsi qu'un retard de recrutement à la CDB de 53BP1 (*p53 Binding Protein 1*), un autre acteur de la réparation. Ils observent aussi que MRG15 co-localise avec gamma-H2AX, marqueurs des CDBs. Dans cet article, la délétion du MRG15 n'entraîne ni une diminution des foyers RAD51, ni une sensibilité à la MMC. De plus, l'inhibition de MRG15 par ARN interférent ne semble pas déstabiliser BRCA2. De façon surprenante, la délétion de MRG15 entraîne une augmentation de l'échange de chromatide sœur (ou SCE pour *Sister Chromatid Exchange*) et mène à un phénotype d'hyper-recombinaison et donc d'instabilité génomique. Ceci est en contradiction avec le rôle connu de PALB2 dans la suppression des SCEs lors de la RH [167].

Hayakawa et coll. rapportent la même année des résultats contradictoires, puisqu'ils estiment que MRG15 est essentielle pour la RH et la sensibilité des cellules à la MMC, ainsi qu'à la formation des foyers PALB2, BRCA2 et RAD51 et leur association à la chromatine [164]. En effet, l'équipe montre que l'utilisation d'ARN interférent contre MRG15, comme pour PALB2, entraîne une diminution des niveaux protéiques de BRCA2 malgré une concentration d'ARN messagers BRCA2 normale (ou WT pour *Wild-Type*). De plus, l'inhibition de MRG15 est accompagnée d'une diminution de 50% de la RH (système DR-GFP-HR utilisé), une diminution de 40% des SCEs et enfin une sensibilité intermédiaire à la MMC (comparativement au WT et *siPALB2/siBRCA2*). D'autre part, le fractionnement de la chromatine indique que la délétion de MRG15 induit une diminution de l'association de PALB2 et BRCA2 à la chromatine, avant et après traitements aux IR. On observe aussi une diminution de la formation des foyers PALB2, BRCA2 et RAD51, mais pas BRCA1, indiquant que MRG15 permettrait à PALB2 de recruter ses partenaires BRCA2 et RAD51 à la chromatine, au niveau des marques H3K36me3 [164].

En 2017, Bleuyard et coll. caractérisent en profondeur l'interaction de PALB2 avec MRG15 à l'aide de différents mutants de types faux sens, qui permettent d'invalider les différentes interactions protéine-protéine de PALB2 avec ses partenaires de la RH [169]. Encore une fois, l'inhibition de MRG15, cette fois ci par shRNA (*small hairpin RNA*), montre une diminution de l'association à la chromatine pour PALB2 et BRCA2. De plus, l'inhibition par KO de la lysine méthyltransférase SETD2 (*SET Domain containing 2*), qui catalyse la méthylation de H3K36me3, entraîne une diminution de PALB2 à la chromatine ainsi qu'une diminution des niveaux H3K36me3 méthylés. Ceci indique que la liaison de PALB2-MRG15 à la chromatine se fait bien au niveau de ces marques. De plus, le *ChIP-sequencing* effectué pour PALB2 indique un enrichissement de PALB2 sur les gènes hautement transcrits, qui sont marqués par H3K36me3. L'inhibition de la transcription de ces gènes entraîne une diminution de la localisation de PALB2 au niveau des gènes hautement transcrits. L'hypothèse alors émise est que PALB2 se lie uniquement aux gènes activement et hautement transcrits via sa liaison par

MRG15 au niveau des marques H3K36me3. L'utilisation des différentes protéines mutantes PALB2 permet de mettre en évidence que l'inhibition de l'interaction de PALB2 avec MRG15, génère une sensibilité des cellules à la CPT (Camptothecin), un inhibiteur de la Topoisomérase I, qui se caractérise par une diminution des foyers RAD51 et une augmentation des aberrations chromosomiques. Enfin, il semble que PALB2-MRG15 soit recruté aux niveaux de ces gènes pour les protéger contre les stress génotoxiques lors de la réplication. De manière intéressante, dans leur papier, les auteurs montrent que les mutants ChAM et MBD ont sensiblement les mêmes phénotypes de diminution de l'association à la chromatine et au niveau d'un des gènes hautement transcrits et que le double mutant ChAM/MRG15 présente un phénotype plus sévère [169] (**Figure 15**).

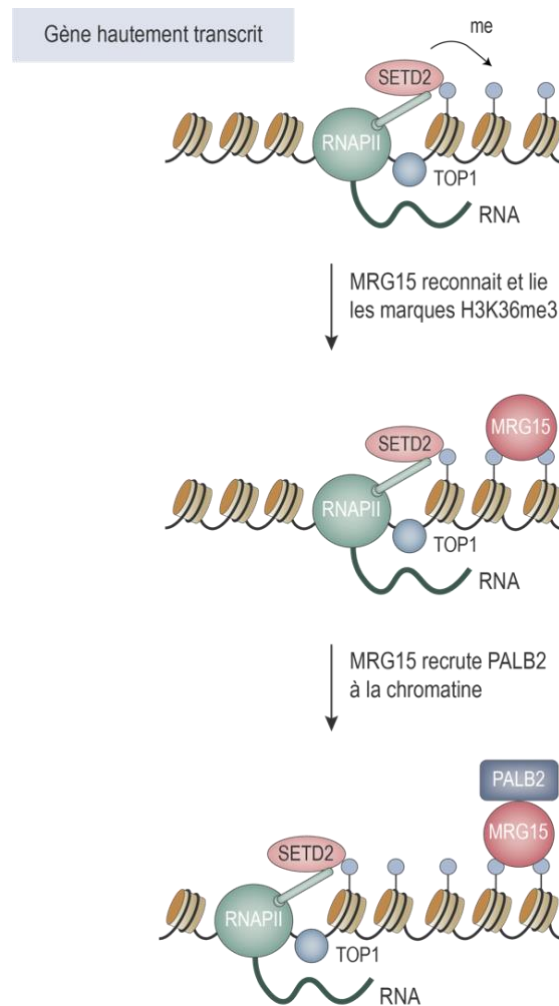


Figure 15 – PALB2 et le stress réplcatif

MRG15 reconnaît et lie les marques H3K36me3, situées au niveau des gènes activement et hautement transcrits. Cette liaison permet à MRG15 de recruter PALB2 au niveau de ces gènes afin de les protéger contre le stress réplcatif.

3.3.7 Régulation de la fonction de PALB2 dans la stabilité du génome par son domaine WD40

Dans la région C-terminale se trouve le domaine WD40 (résidus 853-1186), la seule région de PALB2 à avoir été cristallisée à ce jour [170]. Ce domaine se caractérise par la répétition d'une quarantaine de résidus, souvent terminés par les acides aminés tryptophane (W) et acide aspartique (D), qui forme une structure de type solénoïde. La conformation en tonneau-beta du domaine WD40 est composée de sept répétitions nommées WD1 à WD7. Chaque répétition est une hélice composée de 4 feuillets beta anti-parallèles, arrangés en rotation autour d'un axe (**Figure 16 A**). Ensemble, ces répétitions génèrent trois surfaces d'interaction protéine-protéine, une sur la face supérieure, une sur la face inférieure et enfin une sur la circonférence du domaine WD40 [171].

Ce domaine représente une importante plateforme d'interaction protéine-protéine. En effet, le domaine permet entre autres l'interaction de PALB2 avec les protéines BRCA2, RAD51, RAD51C, RNF169 et POLH (*DNA polymerase eta*) qui sont importants pour le rôle de PALB2 dans la stabilité du génome [152, 170, 172-174]. De plus en 2017, Pauty et coll. ont mis en évidence un modèle de régulation de la localisation cellulaire de PALB2, via une séquence d'export nucléaire (ou NES pour *Nuclear Export Signal*) située au sein du domaine WD40 [175]. En effet, lors de la caractérisation fonctionnelle de mutations tronquantes situées dans le WD40, identifiées chez des patientes de CS, les auteurs ont observé une délocalisation au cytoplasme pour certains variants du WD40. Les alignements de séquences effectués ont permis de mettre en évidence la présence d'une séquence NES putative localisée dans la répétition WD2 (928-VYNLVCVALGNLEIREIR-945). La mutation des résidus conservés de cette séquence (indiqué en gras) et l'inhibition de l'export nucléaire par traitement à la Leptomycine B, ont permis de confirmer l'identité de cette séquence NES. L'hypothèse formulée par les auteurs est que dans la protéine PALB2 WT, cette séquence NES est masquée par la conformation en tonneau-beta du WD40. Par contre, certaines mutations tronquantes localisées en aval du NES, peuvent entraîner un relâchement de la structure en tonneau-beta, permettant le démasquage du signal d'export (**Figure 16.B**). Le NES est ainsi visible par la machinerie d'export au cytoplasme médiée par CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) et entraîne la délocalisation et l'accumulation de PALB2 au cytoplasme. Par conséquent, même si PALB2 est fonctionnelle, elle ne peut jouer son rôle dans la RH car elle est absente du noyau (**Figure 16.C**).

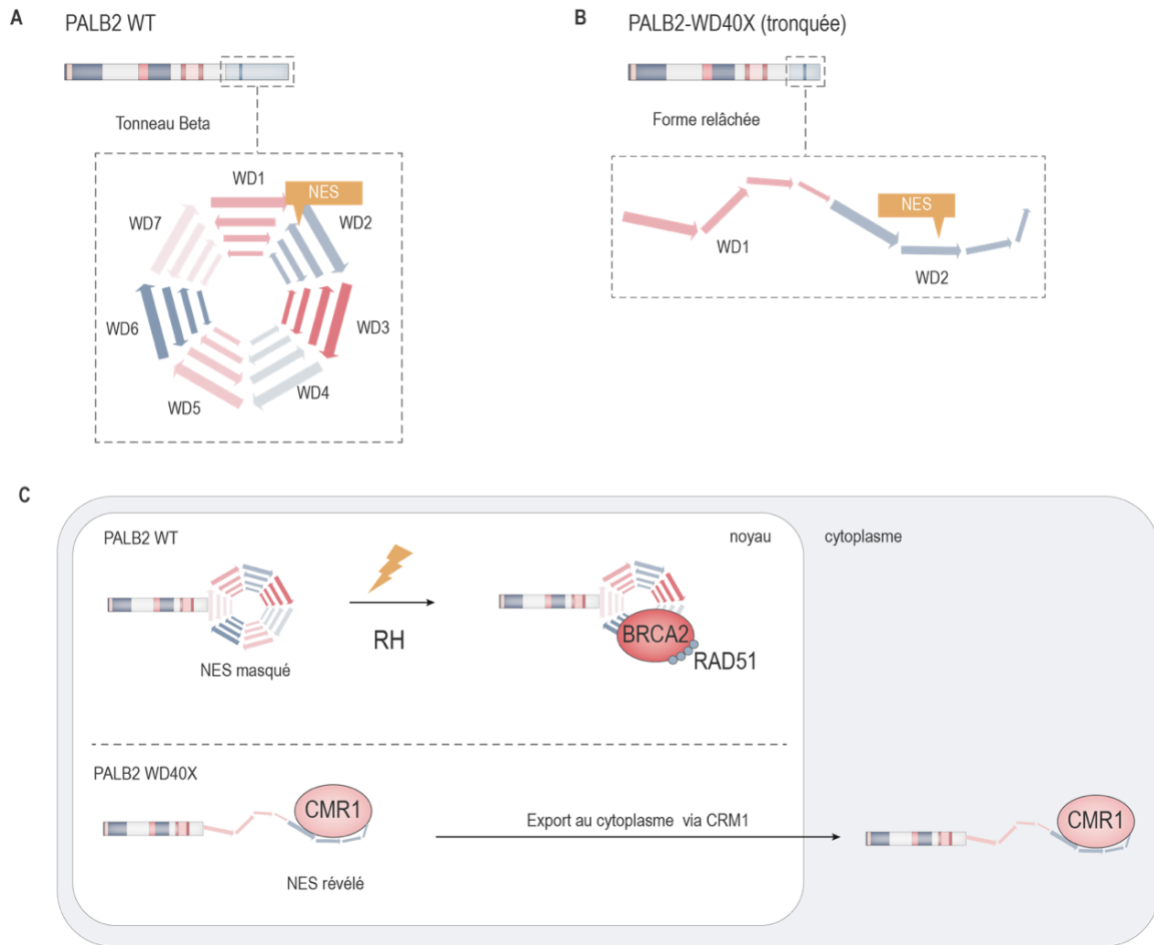


Figure 16 – Régulation de la localisation cellulaire de PALB2 par une séquence NES

(A) Pour la protéine PALB2 WT, la séquence NES est masquée par la conformation en tonneau-beta du domaine WD40, qui est composée de sept répétitions nommées WD1 à WD7. (B) Certaines mutations tronquantes localisées dans le domaine WD40 (PALB2 WD40X), entraînent un relâchement de la conformation tridimensionnelle de ce domaine, révélant ainsi la séquence NES. (C) En présence de dommages à l'ADN, PALB2 WT assure son rôle dans la recombinaison homologue et interagit avec BRCA2 et RAD51 au niveau des foyers de réparation. À l'inverse, la séquence NES de la protéine PALB2 WD40X est reconnue par CRM1, entraînant sa délocalisation au cytoplasme et empêchant ainsi la formation du complexe PALB2-BRCA2-RAD51 au niveau des sites de dommages à l'ADN.

4 Létalité synthétique et stratégie thérapeutique contre le cancer du sein

Comme décrit précédemment à la section 1.1.4 *Les sous-types moléculaires du cancer du sein*, les tumeurs de types TNBC et Basal ne répondent pas très bien aux thérapies cytotoxiques et ne sont pas concernées pour les traitements par hormonothérapie. Le développement de stratégies thérapeutiques qui exploitent les caractéristiques non pas moléculaires mais génétiques de ces tumeurs semblent plus pertinents. Ainsi l'utilisation d'inhibiteurs de PARP (*Poly-(ADP-ribose)-Polymerase*) (PARPi) comme traitement thérapeutique ciblé est une approche de létalité synthétique prometteuse car celle-ci exploite les mutations génétiques des tumeurs qui entraînent des défauts de RH. À ce jour, plusieurs PARPi ont été développés et approuvés afin de traiter certains types de cancers ovariens et TNBC *gBRCA* avancés ou dans d'autres gènes qui provoquent un défaut de RH. Parce que les mutations pathogéniques dans *PALB2* entraînent aussi des défauts de RH dans les cellules de CS, l'utilisation des PARPi dans le traitement personnalisé des tumeurs *gPALB2* est possible.

4.1 Principe de létalité synthétique

Les thérapies dites ciblées reposent sur l'utilisation de médicaments qui tuent spécifiquement ou préférentiellement les cellules tumorales, dans le but d'améliorer l'efficacité du traitement chimiothérapeutique et diminuer sa toxicité. L'une des stratégies de thérapie ciblée est la létalité synthétique. Son principe repose sur le déclenchement de la mort cellulaire par la synergie de deux évènements non létaux individuellement [176].

Dans le contexte de la réparation des lésions de l'ADN, il s'agit de l'inhibition simultanée d'au moins deux voies de réparation complémentaires conduisant à un phénotype de mort cellulaire, alors que l'inhibition alternative de chacune de ces voies conduit à un phénotype de survie cellulaire. En effet, comme plusieurs voies de réparation sont impliquées dans la prise en charge des lésions qui touchent l'ADN, cette redondance peut permettre la compensation de certains défauts qui engagent une voie de réparation par les autres voies. Si on cible simultanément les voies de réparation qui se compensent, on déclenche la mort des cellules [177, 178] (**Figure 17**).

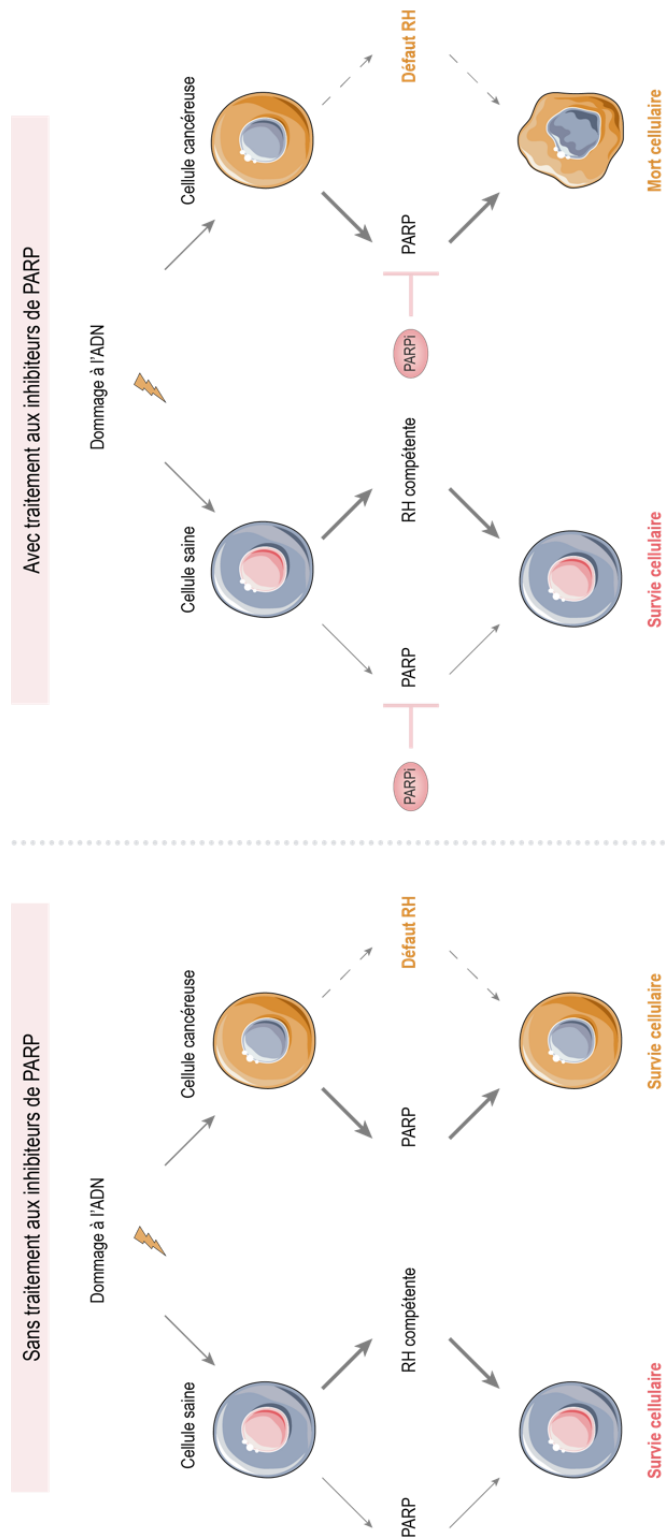


Figure 17 – Principe de létalité synthétique dans le contexte de la réparation des cassures double-brin

4.2 Défauts de recombinaison homologue et sensibilité aux PARPi

Lorsqu'une lésion nucléotidique est détectée dans la cellule, les voies de réparation par excision de base (ou BER pour *Base Excision Repair*) ou encore de réparation par excision de nucléotide (ou NER pour *Nucleotide Excision Repair*) sont engagées et les protéines PARPs sont recrutées. Si on procède à l'inhibition des PARPs par KO dans des souris, celles-ci se développent normalement. Les cellules issues de ces souris présentent néanmoins des phénotypes d'hyper-recombinaison et d'instabilité génomique présents sous forme d'augmentation de l'échange de chromatide sœur, de micronoyaux et de tétraploidie. De manière intéressante, l'inhibition de PARP-1 génère une augmentation des foyers RAD51 spontanés ou induits par un stress répliatif, sans pour autant augmenter le taux de RH. Ceci suggère que PARP-1 n'est pas impliquée en soi dans l'exécution de la RH mais plutôt que la perte de PARP-1 génère une augmentation de la formation de lésions de l'ADN qui sont traitées par la RH [179].

Les protéines BRCA1 et BRCA2 ayant un rôle fondamental dans la RH, il a été proposé que l'inhibition de PARP-1 dans les cellules déficientes pour ces gènes de la RH, cause une accumulation de lésions à l'ADN qui provoque des aberrations chromosomiques et la mort cellulaire. En effet, les essais de survie cellulaire par formation de colonies montrent que les cellules *BRCA1*- ou *BRCA2*- sont extrêmement sensibles à différents inhibiteurs chimiques de PARPs. De plus, les cellules arrêtent leur cycle cellulaire en G2/M avant d'entrer en apoptose [179].

Le mécanisme exact qui explique la sensibilité des cellules *gBRCA* envers les PARPi n'est pas complètement compris. Le modèle initial proposé est que l'absence de réparation des CSBs, par les voies de réparation impliquant les PARPs, peut entraîner la conversion des CSBs persistantes en CDBs lors de la réplication de l'ADN endommagé en phase S du cycle cellulaire. Les CDBs générées sont normalement prises en charge par la RH afin de réparer ces lésions et générer un phénotype de survie cellulaire. En absence de BRCA1 ou BRCA2, les dommages à l'ADN sont pris en charge par les voies de réparation peu fidèles que sont le NHEJ et le SSA. Par conséquent, les lésions de l'ADN ne sont pas correctement réparées et l'instabilité génomique générée entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose des cellules mutées [180, 181].

Quelques années plus tard, d'autres modèles ont été proposés afin de réconcilier différentes observations qui remettent en question la validité du premier modèle. Tout d'abord, dans des cellules *BRCA2*-, l'inhibition de PARP-1 par des inhibiteurs chimiques est plus mortelle que l'inhibition de PARP-1 par interférence ARN [180, 181]. Le fait de piéger et séquestrer PARP-1 sur l'ADN endommagé, notamment au niveau des intermédiaires du BER, représenterait donc un moyen plus efficace de tuer spécifiquement les cellules avec des défauts de RH. De plus, bien que l'inhibition des PARPs entraîne un délai de traitement des CSBs, elle n'entraîne

pas d'augmentation du niveau de CDBs dans les cellules WT ou *BRCA2*-. De la même façon, bien qu'il y ait une augmentation des foyers gamma-H2AX après inhibition des PARPs, il n'y a pas d'augmentation du taux de RH dans les cellules. Ceci suggère que la conversion des CSBs en CDBs n'est pas la raison de l'efficacité des PARPi dans un contexte génétique délétère pour la RH. Pour finir, la déplétion de PARP-1 par siRNA mais pas XRCC1 (*X-ray Repair Cross-Complementing protein 1*), sa protéine cible lors de la réparation par BER ou NER, entraîne une diminution de la survie dans les cellules *BRCA2*-. Ceci indique que la fonction de PARP-1 dans le BER ou le NER, par le recrutement de XRCC1, n'est pas responsable de la sensibilité des cellules RH déficientes envers les PARPi [182].

4.3 PARP-1

Les PARPs sont des glycosyltransférases, capables de transférer une molécule d'ADP-ribose (*Adenosine Diphosphate-ribose*) sur leurs protéines cibles. Ces enzymes constituent une famille d'au moins 18 protéines nucléaires [183]. Elles sont impliquées dans différents processus cellulaires comme la transcription, la structure de la chromatine, la méthylation de l'ADN ou encore la réparation de l'ADN [184].

PARP-1, la protéine PARP la plus caractérisée à ce jour, est impliquée dans la signalisation des dommages à l'ADN, la limitation de la résection de nucléotides ainsi que le choix de la voie de réparation des CDBs [184-186]. Cette protéine possède en N-terminal trois domaines ZFN (*Zinc Finger Nuclease*) qui sont importants pour sa liaison à l'ADN. PARP-1 contient aussi en C-terminal un domaine BRCT (*BRCA1 C-Terminus*) qui permet son interaction avec BRCA1 ainsi que son auto-modification [184, 187].

Suite à la détection du dommage à l'ADN, PARP-1 est recrutée au site de lésion. Sa fixation à l'ADN endommagé empêche l'interaction d'autres protéines sur l'ADN, comme EXO1 (*Exonuclease 1*), empêchant ainsi la résection des nucléotides de part et d'autre de la cassure ou encore en recrutant le complexe MRN et BRCA1 [185]. L'activation de PARP-1 par son co-enzyme NAD⁺ (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) au niveau de son site catalytique entraîne un changement de conformation de PARP-1. Ce changement lui permet de générer par un mécanisme nommé PARylation, des chaînes de poly-PARPs, que PARP-1 ajoute sur elle-même ou sur ses protéines cibles. La PARylation génère une baisse d'affinité de PARP-1 pour l'ADN, menant ainsi à son détachement de l'ADN et à la fixation des autres protéines de la réparation. Les chaînes de PARPs agissent aussi comme signaux de la cassure et permettent le recrutement des acteurs de la réparation [188, 189].

4.4 Utilisation des PARPi pour le traitement des tumeurs

Grâce à son rôle dans la réparation de l'ADN, l'inhibition de PARP conduit à une instabilité génomique et une accumulation de dommages mal ou non réparés, qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules. Plusieurs inhibiteurs ont été développés depuis cette découverte (**Tableau 2**). À ce jour, quatre PARPi (l'olaparib, le rucaparib, le niraparib et le talazoparib) ont été approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) et sont utilisés en clinique pour le traitement de certains cancers ovariens métastatiques avancés présentant des mutations *gBRCA1* et *gBRCA2* ainsi que les tumeurs du sein HER2- métastatiques et TNBC [190-194]. Un autre PARPi (le véliparib) est actuellement en phase I d'essais cliniques [192, 195, 196].

Ces différentes molécules développées pour inhiber les PARPs reposent sur le même principe : l'inactivation du site catalytique de PARP-1, afin d'empêcher sa PARylation et donc le déclenchement de la signalisation des dommages à l'ADN et le recrutement des protéines de la réparation. Néanmoins, elles peuvent présenter des caractéristiques différentes quant à leur spécificité envers PARP-1 et PARP-2 plutôt que les autres membres de la famille PARP ou encore sur leur capacité à séquestrer PARP-1 au niveau de l'ADN. La séquestration de PARP-1 au niveau de l'ADN empêche son auto-PARylation et la libération de PARP-1, ce qui interfère avec le cycle catalytique de l'enzyme. Par exemple, le talazoparib a une capacité 100 fois plus grande que celle de l'olaparib à piéger PARP-1 [197].

L'utilisation des PARPi en clinique peut suivre deux stratégies : **1)** augmenter la sensibilité des tumeurs aux agents chimiothérapeutiques qui causent des dommages à l'ADN ; **2)** induire une létalité synthétique dans des cellules qui sont hautement dépendantes des PARPs, en raison de leurs défauts de RH, comme des mutations *gBRCA1*, *gBRCA2* et *gPALB2*. En effet, l'utilisation des PARPi dans les tumeurs présentant des défauts de RH est particulièrement pertinente dans le cadre du CS puisqu'environ 5% à 10% de tous les cas de CS présentent des mutations *gBRCA1*, *gBRCA2* et *gPALB2* et que 25% des cas sporadiques présentent un phénotype nommé *BRCAness*, c'est à dire des défauts de RH sans mutations dans les gènes de prédisposition *BRCA1* ou *BRCA2* [65, 198]. De manière intéressante, certaines tumeurs avec des défauts de RH présentent des mutations dans le gène *53BP1* qui restaurent la RH et diminue le phénotype d'hypersensibilité aux dommages à l'ADN. Ces mutations sont communes pour les TNBC *gBRCA1*, *gBRCA2*. Le traitement de ces tumeurs aux PARPi permettrait ainsi d'augmenter leur chimio/radio-sensibilité.

D'autres part, certaines tumeurs de type TNBC et certains cancers ovariens présentent des niveaux élevés de PARP-1. L'utilisation de PARPi semble appropriée pour un traitement en monothérapie ou combiné de ces tumeurs [199]. De la même façon, certaines cellules tumorales développent des résistances aux traitements chimiothérapeutiques, comme les platines, à cause d'une augmentation de la réparation des

dommages à l'ADN. Le traitement aux inhibiteurs de PARP permettrait de tuer spécifiquement ces cellules en augmentant leur radio/chimio-sensibilité [188, 189].

De plus, Shimelis et coll. ont montré une association entre les variations pathogéniques de *PALB2* et un risque élevé de développer un CS de type TNBC (OR = 14.41, 95% CI = 9.27-22.60, $P < 2.2 \times 10^{-6}$). Les auteurs rapportent une fréquence de mutations *gPALB2* dans 1.0% à 1.6% des 10 901 tumeurs TNBC analysées, faisant de ce gène le troisième gène le plus fréquemment mutés pour cette catégorie de tumeurs, après *BRCA1* et *BRCA2* [200]. Cette étude montre une fois de plus l'importance de la contribution des mutations *gPALB2* aux tumeurs TNBC et la nécessité de génotyper les patientes pour des variations pathogéniques dans ce gène de susceptibilité à forte pénétrance.

Enfin, deux autres études cliniques portant sur la réponse aux traitements dans le cadre de mutations *gBRCA1* et *gBRCA2*, ont montré que le génotypage des patientes pour des mutations pathogéniques peut être bénéfique pour les stratégies de traitements choisis. En effet, l'essai randomisé de OlympiAD sur la réponse aux PARPi (olaparib) des patientes *gBRCA1* et *gBRCA2*, HER2- métastatiques montre que les patientes TNBC *gBRCA1* et *gBRCA2* ont le meilleur bénéfice des PARPi en combinaison avec des thérapies cytotoxiques (HR = 0.45, 95% CI = 0.29-0.63) [201]. De plus, Hahnen et coll. ont montré en 2017 que les porteuses de *gBRCA1* et *gBRCA2* exposés à l'anthracycline, le taxane et l'inhibiteur de VEGF bvacizumab avec ou sans carboplatine ont une haute réponse pathologique complète (ou pCR pour *pathological Complete Response*) (pCR = 65%-67%) en comparaison avec les patients sans mutations (pCR = 35%-55%) [202].

Tableau 2 – Caractéristiques des inhibiteurs de PARP

REMARQUES	
Olaparib	Approuvé par la FDA en 2014. Utilisé dans le traitement des cancers ovariens avancés gBRCA1/2 -, TNBC, cancers résistants aux platines Létalité synthétique dans les cellules avec des défauts de RH, augmente la chimio/radio-sensibilité (Rottenberg et coll. 2008; FDA study 23)
Talazoparib	Approuvé par la FDA en 2018. Utilisé dans le traitement des cancers du sein avancés HER2- métastatiques gBRCA1/2- Plus puissant que l'Olaparib (« PARP trapping ») Létalité synthétique dans les cellules avec des défauts de RH (Shen et coll. 2013; Litton et coll. 2018)
Rucaparib	Approuvé par la FDA en 2016. Utilisé dans le traitement des cancers ovariens avancés gBRCA1/2 - Létalité synthétique dans les cellules avec des défauts de RH, augmente la chimio/radio-sensibilité (Robillard et coll. 2017; Thorsell et coll. 2017)
Niraparib	Meilleure affinité pour PARP 1 / 2 Approuvé par la FDA en 2017. Utilisé dans le traitement des cancers ovariens avec sensibilité aux platines Létalité synthétique dans les cellules avec des défauts de RH, augmente la chimio/radio-sensibilité (Jones et coll. 2015; Thorsell et coll. 2017)
Veliparib	Meilleure affinité pour PARP 1 / 2 Inhibe la réparation des CSBs et CDBs. Sous investigation. Essais cliniques de phase 1 et 2 (Gupta et coll. 2014; Thorsell et coll. 2017)

Problématique, hypothèses et objectifs de recherche

- **Problématique**

En 2017, on a estimé qu'une femme sur huit aura développé un cancer du sein (CS) au cours de sa vie. Malgré les grandes avancées en médecine, cette maladie représente le fardeau le plus lourd lié à tout cancer chez la femme. L'identification des femmes à risque, c'est-à-dire des femmes avec une forte susceptibilité génétique, est un facteur déterminant de la prévention et de la détection du cancer du sein. Grâce aux avancées technologiques, de nombreux nouveaux *loci* de prédisposition au CS ont été identifiés et sont couramment utilisés en clinique pour l'identification des femmes à risque.

L'identification de variations dans ces gènes se faisant plus rapidement que leur caractérisation et leur classification clinique, les médecins ne sont pas toujours en mesure d'expliquer aux patientes porteuses de variations génétiques, si celles-ci sont bénignes ou pathogéniques. La prise de décision quant à la divulgation aux autres membres de la famille des résultats du génotypage, le suivi médical ou encore le choix du traitement est plus difficile pour le médecin et sa patiente.

Le défi qui se présente ici est donc d'entreprendre la caractérisation exhaustive de VUSs présents dans le gène de susceptibilité *PALB2*, afin d'améliorer leur interprétation et classification clinique.

D'autre part, les tumeurs de CS de type TNBC et Basal sont les plus meurtrières du fait de l'absence de traitement personnalisé aux caractéristiques moléculaires de ces tumeurs. Plusieurs études ont démontré que l'utilisation des inhibiteurs de PARP, dans le cadre des stratégies thérapeutiques de létalité synthétique, était appropriée pour les tumeurs TNBC *gBRCA1* et *gBRCA2*, qui présentent des défauts de RH. *PALB2* étant aussi un gène impliqué dans la RH, l'utilisation des PARPi pourrait aussi permettre de traiter efficacement les tumeurs TNBC et Basal.

- **Hypothèses**

1 – Notre méthode systématique d'essais fonctionnels nous permet de caractériser les variations faux sens de *PALB2* et de les classer comme bénins ou délétères pour la fonction de *PALB2* dans la RH, afin de contribuer à leur interprétation clinique.

2 – Les variations délétères pour la fonction de *PALB2* dans la RH entraînent une sensibilité aux PARPi, permettant ainsi aux patientes de CS porteuses de ces variations délétères, d'être éligibles aux traitements thérapeutiques basés sur les PARPi.

- **Objectifs**

1 – Valider notre méthode systématique d’essais fonctionnels pour la caractérisation de variations génétiques faux sens dans *PALB2*

J’ai participé à la caractérisation fonctionnelle de 4 variations faux sens de *PALB2* classées comme délétères par l’équipe de notre collaborateur, le Dr Fergus Couch. Au cours de cette collaboration, nous avons pu montrer que notre méthode systématique génère des résultats complémentaires à ceux de l’équipe du Dr Fergus Couch et que nos conclusions sur l’effet des variants sur la fonction de *PALB2* dans la RH sont en adéquation.

Cette étude est présentée dans le chapitre 2.

2 – Caractériser de manière exhaustive les variations de *PALB2* identifiées chez des patientes de CS

Dans le but de concentrer tous nos efforts dans la caractérisation exhaustive de variations de *PALB2*, nous avons collaboré avec les équipes de recherche des Dr Marcelo Alex Carvalho et Dr Alvaro Monteiro. Ainsi j’ai pu participer à l’analyse de l’effet des variations d’intérêt sur le rôle de *PALB2* dans la RH.

Cette étude est présentée dans le chapitre 3.

J’ai aussi eu la chance de pouvoir sélectionner 10 variants de *PALB2*, identifiés par séquençage d’exome dans le cadre d’une étude cas-contrôles pour le CS effectué dans le laboratoire du Dr Jacques Simard, ou sélectionnés à partir de la base de données Clinvar par le Dr Alvaro Monteiro. J’ai effectué le criblage de ces variations de manière autonome.

Cette étude est présentée dans le chapitre 4.

3 – Corrélation entre les défauts de RH générés par une mutation tronquante dans *PALB2* et la réponse aux inhibiteurs de PARP

J’ai eu la chance de collaborer avec le Dre Violeta Serra sur son projet de recherche, qui porte sur la corrélation entre les défauts de RH et la réponse des patientes de CS aux PARPi. Au cours de leurs expérimentations, l’équipe du Dre Violeta Serra a identifié une mutation tronquante dans *PALB2*, susceptible d’expliquer les

défauts de RH d'une patiente et sa sensibilité aux PARPi. Mon objectif ici a été de valider que cette mutation tronquante est délétère pour le rôle de PALB2 dans la RH.

Cette étude est présentée dans le chapitre 5.

1 CHAPITRE 1 - The tumor suppressor PALB2: inside out

Mandy Ducey,^{1,2,3} Laura Sesma-Sanz,^{1,3} Laure Guitton-Sert,^{1,3} Anahita Lashgari,^{1,3} Yuandi Gao,^{1,3} Nadine Brahiti,^{1,3} Amélie Rodrigue,^{1,3} Guillaume Margaillan,^{1,2} Marie-Christine Caron,^{1,3} Jacques Côté,^{1,3} Jacques Simard,^{1,2} and Jean-Yves Masson,^{1,3,*}

¹CHU de Québec Research Center, Oncology Division, 9 McMahon, Québec City, QC, G1R 2J6, Canada

²CHU de Québec Research Center, Endocrinology and Nephrology Division, 2705 Bld Laurier, Québec City, QC, G1V 4G2, Canada

³Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Laval University Cancer Research Center, Québec City, QC, G1V 0A6, Canada

1.1 Avant-propos

Au cours de mon doctorat, je me suis intéressée à l'effet des variations faux sens situées dans *PALB2* et leurs effets sur le rôle de *PALB2* dans la recombinaison homologue. Pour être en mesure d'interpréter au mieux la pertinence et la signification de mes résultats, j'ai effectué une revue de littérature de *PALB2*. Mon travail a été intégré pour l'écriture d'une revue sur *PALB2*, publiée en Mars 2019 dans le journal *Trends In Biochemical Sciences*.

J'ai donc pris part à l'écriture de l'article et sa correction ainsi que la réalisation de toutes les figures et le recensement des variations de *PALB2* identifiées en clinique.

1.2 Résumé

PALB2 (*Partner and localizer of BRCA2*) s'est révélé être un acteur important et versatile dans la maintenance de l'intégrité du génome. Les mutations bi-alléliques de *PALB2* sont à l'origine du groupe de complémentation FA-N de l'anémie de Fanconi, tandis que les mutations mono-alléliques de *PALB2* prédisposent aux cancers du sein et du pancréas. Dans cette revue, nous retraçons les développements récents dans notre compréhension des mécanismes de régulation et des domaines fonctionnels du suppresseur de tumeur *PALB2*. La régulation des fonctions de *PALB2* dans la réponse et la réparation aux dommages de l'ADN se déroule à différents niveaux, incluant l'homodimérisation, la phosphorylation et l'ubiquitylation. Nous présentons ici les mutations de *PALB2* associées au cancer et les analyses détaillées par essais fonctionnels, plus particulièrement au niveau moléculaire.

1.3 Abstract

Partner and localizer of BRCA2 (PALB2) has emerged as an important and versatile player in genome integrity maintenance. Biallelic mutations in *PALB2* cause Fanconi anemia (FA) subtype FA-N, whereas monoallelic mutations predispose to breast and pancreatic familial cancers. Herein, we review recent developments in our understanding of the mechanisms of regulation of the tumor suppressor *PALB2* and its functional domains. Regulation of *PALB2* functions in DNA damage response and repair occurs on multiple levels, including homodimerization, phosphorylation, and ubiquitylation. With a molecular emphasis, we present *PALB2*-associated cancer mutations and detailed analysis by functional assays.

1.4 The Discovery of PALB2

Protection of genome integrity is ensured by numerous DNA repair processes. In humans, there are at least five pathways for DNA double-strand break (DSB) repair: nonhomologous end-joining, alternative nonhomologous end-joining, single-strand annealing (SSA), break-induced replication, and homologous recombination (HR) [1–3]. The most faithful of all, HR, operates predominantly during the S/G2 phase of the cell cycle, when an intact sister chromatid is available as template for error-free DSB repair (**Figure 1.1**). Given that HR is paramount to genome integrity preservation, finding its main actors has been a major goal in the DSB repair field. The identification of *BRCA2* as a breast cancer (BC) susceptibility gene [4,5] and its emergence as a key HR gene spurred a hunt for new *BRCA2* partners. In 2006, Xia et al. identified FLJ21816/LOC79728 as a major *BRCA2*-interacting protein [6] and renamed it PALB2. The *PALB2* gene is located on chromosome 16p12.2 and comprises 13 exons, which encode a 1186-amino acid protein [7].

1.5 Functions of PALB2 in DSB Repair

Xia et al. [6] described PALB2 as a nuclear protein capable of forming ionizing radiation (IR)-induced foci that colocalize with *BRCA1*, *BRCA2*, and the DSB marker γ -H2AX. Associated with chromatin, PALB2 was found to license *BRCA2* localization and stability in nuclear structures, promoting HR. This was supported by abrogation of *BRCA2* focus formation and significant decrease in HR efficiency in *PALB2*-depleted cells. Depletion of *PALB2* also caused complete loss of RAD51 foci [8]. Although these data established that PALB2 is a major regulator of HR, the exact mechanism by which it stimulated DNA recombination was unclear. PALB2 purification to homogeneity [9,10] filled a significant gap by allowing *in vitro* assays that reconstitute key HR steps as the formation of a D-loop structure, an intermediate of the RAD51-mediated invasion of a ssDNA substrate into a homologous duplex DNA (**Figure 1.1**). Purified PALB2 stimulated D-loop and strand invasion using short oligonucleotides or resected DNA DSBs. These studies also revealed that PALB2 uses two DNA-binding domains to interact directly with DNA and is a key regulator of RAD51-mediated HR. While PALB2 can stimulate D-loop and strand invasion *in vitro*, it relies *in vivo* on *BRCA2*, which is essential to allow efficient nuclear import of RAD51. Once the *BRCA1*-PALB2-*BRCA2* complex is formed, PALB2 interacts with RAD51 to stimulate RAD51-mediated D-loop formation. With such importance in genome maintenance, PALB2 functions are likely to be under strict regulation.

1.6 Mechanisms of Regulation of PALB2

Regulation of PALB2 functions involves different protein domains and modifications, including homodimerization, phosphorylation, and ubiquitylation. To prevent unscheduled DNA recombination in other cell cycle phases due to the absence of sister chromatids, cells should restrain HR activities to S/G2. In 2017, Luijsterburg et al. demonstrated that PALB2 recruitment to DSBs in S/G2 cells is orchestrated by direct interaction with the RING finger (RNF) E3 ubiquitin ligase RNF168, in a process dependent on the ubiquitin ligase activity of the latter toward histone H2A on K13/K15 [11] (**Figure 1.2A**). Gathered evidence suggested that PALB2 would indirectly recognize ubiquitin marks on histone H2A by physical interaction with RNF168 to prompt the assembly of the HR machinery and drive DSB repair in S/G2 cells. The domains responsible for this interaction were identified as being the C-terminal region of RNF168, which was named PALB2-interacting domain (PID), and the WD40 domain of PALB2. PALB2 can accumulate at DSBs in an RNF168-dependent and BRCA1-independent manner. RNF168 allows the fast recruitment of PALB2 in the proximity of DSBs, therefore facilitating its subsequent loading by BRCA1 to damaged DNA.

The coiled-coil (CC) domain located at the N-terminus of PALB2 regulates both PALB2 self-interaction and the BRCA1–PALB2 interaction required for RAD51 recruitment and filament formation at DSBs. Indeed, it was shown that PALB2 can switch from a low-activity oligomer to a HR-proficient BRCA1-PALB2-BRCA2 complex following DNA damage [12] (**Figure 1.2B**). This molecular switch is thought to be controlled by phosphorylation events. Responsible kinases include ATM/ATR, which can phosphorylate PALB2 in response to genotoxic stresses on at least three S/Q-sites in its N-terminus (S59, S157 and S376) [13–16]. This ATM/ATR-mediated phosphorylation serves to promote RAD51 functions, because the PALB2 triple phosphorylation mutant fails to form RAD51 foci. PALB2 is also phosphorylated at serine 64 (S64), a CDK consensus phosphorylation motif (S/T-P). The most recent model proposes a biphasic process in which PALB2 is initially phosphorylated at S64 by CDK, the activity of which promotes DNA end resection and activation of the ATR-Chk1 pathway. The gradual ATR activation then drives CDK inhibition and phosphorylation of PALB2 at S59, which stimulates PALB2–BRCA1 interactions, thereby promoting PALB2 accumulation at DSBs and function in HR [16] (**Figure 1.2B**).

Recently, it became clear that PALB2 regulation is cell cycle-dependent and critical for the restriction of HR to the S/G2 phase to prevent the potentially deleterious effects of unscheduled DNA recombination. In 2015, Orthwein et al. highlighted a mechanism whereby PALB2 is ubiquitylated during G1 on K20/25/30 residues in the CC by a complex comprising KEAP1, a PALB2-interacting protein, and CUL3, leading to its degradation [17] (**Figure 1.2C**). The resulting modification inhibits PALB2 interaction with BRCA1 and its recruitment to DNA damaged sites but is counteracted in S/G2 by the deubiquitylase USP11, allowing the formation of the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex and repair by HR in this specific phase.

1.7 PALB2 and Oxidative Stress

Besides a critical role in promoting HR, the KEAP1–PALB2 interaction introduced earlier exert a regulatory role on cellular redox homeostasis (**Figure 1.2D**). KEAP1 functions as a cysteine-rich oxidative stress sensor, which, under normal conditions, binds to and targets the antioxidant transcription factor NRF2 for degradation [18]. Since it bears a highly conserved ETGE-type KEAP1-binding motif that is identical to that of NRF2, PALB2 can competitively impede the inhibitory KEAP1–NRF2 interaction. Hence, PALB2 is thought to promote NRF2 accumulation, enhancing antioxidant gene expression and reducing the burden of oxidative stress. Consistent with this, PALB2 depletion leads to increased reactive oxygen species (ROS) levels and downregulation of a subset of NRF2 target genes. These findings drew a new connection between oxidative stress and the development of PALB2-associated FA and cancer.

1.8 PALB2 and its Major Interactor MRG15

Mass spectrometry analysis and co-immunoprecipitation experiments revealed that MORF- related gene on chromosome 15 (MRG15 or MORF4L1), along with its paralog MRGX, are the major binding partners of PALB2 [19–22]. MRG15 belongs to the highly conserved family of MRG domain-containing proteins and contains an N-terminal chromodomain [23,24]. It is a component of chromatin-modifying complexes, including the NuA4/TIP60 histone acetyltransferase (HAT) and the histone deacetylase (HDAC) complexes [19,25–28]. Several studies support a PALB2-dependent role for MRG15 in the repair of DSBs by HR [19,20,23]. In 2009, Sy et al. reported that MRG15 knockdown or deletion of the MRG15-binding domain on PALB2 resulted in increased gene conversion and sister chromatid exchange, indicating hyperrecombination phenotype in these cells [29]. By contrast, a parallel study by Hayakawa et al. reported an opposite effect of MRG15 depletion on HR [19]. Early analysis coarsely mapped the necessary MRG15–PALB2 interaction domain to a segment spanning residues 610–765 in the central region of PALB2 [19–21]. Residues 562–629 of PALB2, which include the MRG-binding FxLP motif typically shared by MRG15 interactors [30], were later found to be sufficient for MRG15 binding and were designated the MRG15-binding domain (MBD) [31]. The PALB2 MBD domain was further refined by protein sequence alignments into two highly conserved regions: MBD-I (611-629) and MBD-II (724-737) [22]. Work by Bleuyard et al. showed that PALB2 MBD-I, which encompasses the FxLP motif, was critical for its binding to MRG15 [22]. Furthermore, these authors showed that missense mutations of MRG15 at residues 245 and 246 within the MRG domain (but outside of the hydrophobic FxLP-binding pocket) blocked binding to PALB2 [32]. Further structural studies are required to fully characterize the interaction between PALB2 and MRG15, which underlines a function outside of histone modifying activity.

In this regard, PALB2 bears an evolutionarily conserved chromatin-association motif (ChAM) that mediates its chromatin association in both unperturbed and damaged cells [33] (**Figure 2.2E**). Although the ChAM domain of PALB2 can interact with nucleosomal histones, deletion of this domain does not completely abrogate interaction with chromatin. Furthermore, overexpression of MRG15 can partially rescue the defect in the chromatin interaction of ChAM-deleted PALB2 [6,19,33]. These observations suggested that MRG15 and ChAM both contribute to the chromatin association of PALB2. The MRG15-dependent chromatin association of PALB2 is of significance since it potentially links chromatin state to the repair of DNA damage involving PALB2. The MRG15 N-terminal chromodomain specifically binds to trimethylated lysine 36 of histone H3 (H3K36me3) and to a lesser extent H3K36me2 [34,35], two chromatin/epigenetic marks enriched within the intragenic regions of actively transcribed genes. Recently, Bleuyard et al. demonstrated that PALB2 is recruited to undamaged chromatin by MRG15. Genome-wide localization analysis provided direct evidence that PALB2 is enriched on the body of highly active genes via a SETD2-H3K36me3-MRG15 axis [22]. Based on these results and the observation that ablation of the MRG15–PALB2 interaction led to increased DNA stress and chromosome instability, the authors proposed a model by which the MRG15-PALB2 complex associates with undamaged chromatin through H3K36me3, making PALB2 readily available to protect active genes from DNA damage that could arise from replication. After DNA damage, PALB2-BRCA2 would relocate to the stressed replication forks to prevent genetic instability (**Figure 1.2F**).

1.9 PALB2 and Diseases: Fanconi Anemia and Breast Cancer

All these regulatory functions culminate in an important role for PALB2 in cell homeostasis and disease prevention. FA is a rare, inherited genome instability-associated syndrome, characterized by variable clinical phenotypes, including congenital malformations, early-onset bone marrow failure, and cancer predisposition, including acute myeloid leukemia. At the cellular and chromosomal level, the signature of FA and FA-like syndromes is a hypersensitivity to DNA interstrand crosslinks, which represents the basis for the diagnosis of the disease [7,36]. This diversity in FA phenotypes might be related to the genetic heterogeneity of the disease, because 22 different FA genes (*FANCA* to *FANCW*) are involved. Biallelic autosomal recessive mutations in *PALB2* cause FA complementation group N (FA-N), a subtype that shares great phenotypical similarities to complementation group D1 caused by biallelic mutations in *BRCA2* [7,36,37]. At least 13 patients with the FA-N subtype have been described worldwide [7,36,37]. Severe cases of FA are associated with biallelic mutations that create a truncated PALB2 protein unable to interact with its BRCA partners, leading to ineffective HR. Such truncating *PALB2* mutations were likely to lead to high genomic instability, explaining the propensity of childhood cancer. Recently, an unusually mild form of FA-N was reported [38]. The only two patients described shared some symptoms with other patients with FA, such as growth retardation, pigmentation abnormalities, and

development of non-Hodgkin lymphomas. However, they did not develop embryonic-type tumors nor present typical FA phenotypes, such as aplastic anemia or kidney malformations. Genetic analysis revealed that both patients carried *PALB2* biallelic mutations, one truncating and the other inducing the deletion of *PALB2* exon 6 without impairing BRCA1/2 interactions. Interestingly, although patient cells failed to induce detectable RAD51 foci after DNA damage, ectopic overexpression of the *PALB2* mutant in U2OS cells depleted for endogenous *PALB2* led to RAD51 foci formation. These observations suggested that the patients bore a hypomorphic mutation in *PALB2*, which caused a low expression level and partial function of the mutant protein, explaining their mild clinical phenotypes.

The low number of patients with the FA-N subtype may be explained by mouse model studies. In fact, attempts to generate systemic *Palb2* knock-out (KO) mice via gene trap approach or exon deletion have failed, leading to embryonic lethality through apoptosis, even in a p53-depleted context, suggesting that *PALB2* is an essential gene [39]. In 2014, a knock-in (KI) strategy was used to generate a mouse strain with a mutation that targeted the CC motif of *PALB2* specifically (²⁴LKK²⁶ to AAA). This mutation impaired its interaction with BRCA1, but not with BRCA2, MRG15, or KEAP1, and bypassed the embryonic lethality of *PALB2* KO, because homozygous mutant mice were viable but failed to fully recapitulate FA disease [40]. While HR was clearly affected by the ²⁴LKK²⁶ to AAA mutation, the bypass of embryonic lethality suggests that the remaining HR activity or alternative pathways promote survival. For instance, while the BRCA1–*PALB2* interaction is important for proficient *PALB2* function, BRCA1 has an important role in modulating the extent of resection at DSBs, which is not dependent on *PALB2*. Therefore, it is likely that ablating the BRCA1–*PALB2* interaction will not affect the upstream functions of BRCA1 in DNA resection, providing a template for alternative DNA repair pathways such as SSA. In the future, CRISPR-Cas9 gene-editing technologies will offer more refined routes for the generation of novel KO and KI mouse models compared with conventional methods.

The specific signature of *PALB2/FANCN* in FA may arise from naturally occurring DNA damage by ROS or aldehydes. Growing evidence suggest that aldehydes impact FA development and severity [41]. Furthermore, similar to *BRCA2*, *PALB2*-deficient cells show higher sensitivity and wide-range chromosomal breaks at low acetaldehyde concentrations compared with parental or *FANCC* and *FANCG*-deficient cells [41]. Recently, a mechanism of aldehyde toxicity affecting *PALB2* was brought to light in an attempt to decipher the cause of carcinogenesis in carriers of heterozygous *BRCA2* mutations. It was shown that exposure to aldehyde induced both *PALB2* and *BRCA2* proteosomal degradation, leading to haploinsufficiency and increased genomic instability [42].

The possible involvement of *PALB2* in BC was first reported in 2006. The authors presented three *BRCA2* missense mutations in patients with BC that compromised *PALB2* binding, thereby leading to homologous recombination defects [6]. It was also proposed that a germline deletion in *BRCA2* exon 3 previously

identified in a family with a high incidence of BC and ovarian cancer (OC), disrupted its interaction with PALB2, which hinted at a link between *PALB2* and cancer predisposition [6]. It was further hypothesized that PALB2 mutations would likely be found in tumors with a BRCA2-like phenotype but wild-type *BRCA2 loci*. Pursuing this lead, the first targeted sequencing of *PALB2* was reported [43]. At the time, *PALB2* monoallelic truncating mutations were thought to confer a 2.3-fold elevation in the relative risk (RR) of BC [confidence interval (CI), 1.4–3.9; $P = 0.0025$] for individuals with familial BC testing negative for mutations in the *BRCA* genes, linking *PALB2* mutations to more modestly increased risk of BC than had been described for *BRCA2* mutations (~tenfold increase in risk) [43]. Indeed, the authors identified five *PALB2* truncating mutations in 10/923 individuals with familial BC (1.1%), compared with 0/1084 in controls (0%). Nine of these mutations were found in the female BC group only (1%), whereas one mutation occurred in families with cases of both female and male BC (6.7%; $P = 0.15$). This suggested that *PALB2* mutations confer a higher RR of male than female BC, similar to *BRCA2* mutations [44].

The year that followed witnessed the number of mutations in *PALB2* growing significantly throughout several population studies and changed the importance of the gene in BC predisposition. In March 2007, Erkkö et al. identified in the Finnish population a founder frameshift mutation, c.1592delT, in familial BC cases with a significantly elevated frequency (3/113 BC cases) compared with ancestry-matched population controls (6/2501 controls; $P = 0.005$; odds ratio (OR) 11.3; 95% CI, 1.8–57.8) [45]. Further screening of this variation in unselected BC individuals showed a fourfold enrichment of c.1592delT in carrier patients compared with controls (18/2059 female BC cases, 0.9% versus 0.2% in controls, $P = 0.003$; OR 3.94; 95% CI, 1.5–12.1). The group led further investigations on c.1592delT and reported a 40% increased risk of BC (hazard ratio 6.1; 95% CI, 2.2–17.2; $P = 0.01$) by age 70 years (95% CI, 17–77) approaching that for *BRCA2* mutation carriers in the same country. The hazard ratio for BC was estimated to decrease with age by 4.2% per year (95% CI, 0.2–8.1; $P = 0.06$) from 7.5-fold at 30 years old to 2.0-fold at 60 years old [46].

In April 2007, Tischkowitz et al. supported Erkkö's idea of a stronger penetrance for *PALB2* mutations in BC, with an estimated proportion of *PALB2* mutations in hereditary BC cases of 1.5%. They identified two *PALB2* mutations (c.229delT and c.2521delA) in 5/68 affected probands from different population descents with a strong family history of BC. Functional characterization revealed that c.229delT and c.2521delA were unable to bind properly to BRCA2 and were also deficient in HR / DSB and mitomycin C-induced interstrand crosslink repair [47]. Almost 10 years later, *PALB2* is known to be a confirmed high-intermediate BC predisposition gene, next to *BRCA2*. Indeed, depending on the mutation and the population, *PALB2* truncating variations confer a RR of 2–30-fold [48–53]. An analysis of *PALB2* pathogenic variants in 9639 patients with BC revealed an OR of 5.53 (95% CI) [54].

1.10 Functional Validation of Cancer Mutations

Despite extensive databases of *PALB2* variations (ClinVar and LOVD), what remains a challenge is the interpretation of the pathogenicity of *PALB2* variants of unknown significance (VUSs), which is crucial in genetic counselling and for clinical variant classification (**Figure 1.3** and **Table S1.1** in the supplementary information online). Several algorithms, such as SIFT, Polyphen2, CADD, and Align GVGD, have been developed to help to predict the impact of these VUSs on the *PALB2* protein to prioritize which variant should undergo functional assays. Align-GVGD was shown to be the more accurate, being less divergent in both its specificity and sensitivity [55]. VarCall, a model that estimates the likelihood of pathogenicity given the functional data, was a robust prediction tool for *BRCA1* variants [56]. Although these analysis tools have proven useful to help to predict the pathogenicity of *PALB2* variants, rigorous and calibrated experimental characterization methods are needed to complement *in silico* prediction data. In the following sections, we summarize current assays used for *in vivo* functional validation.

One of the main features of *PALB2* is that it accumulates into discernable foci at DNA damage sites, a prerequisite for efficient HR [6,57,58]. The quantification of *PALB2* foci formation is relevant for the characterization of variations occurring in all regions of the protein, including *PALB2* coiled-coil (CC) and the MRG15-binding domain, which both promote *PALB2* assembly into foci [58–60]. A *PALB2* antibody was recently generated for immunofluorescence, because of the lack of specific commercially available antibodies that can be used for precise *PALB2* foci quantification. Anti-*PALB2* antibodies could be helpful for the characterization of *PALB2* mutations through the assessment of *PALB2* functions in BC tumor biopsies. Indeed, it can be used to predict the response of patients with BC to therapies based on poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi) and guide proper clinical intervention. Alternatively, time-lapse microscopy methods can be used to monitor live recruitment of YFP-*PALB2* to laser-induced DNA damage and portray its kinetics of assembly into foci [11,16,61] (**Figure 1.4A**). Drawbacks include complications of comparing findings from different laser systems and cell lines. Nevertheless, this method could be a valuable tool for comparing *PALB2* variants and wild-type assembly kinetics and pinpoint recruitment defects under the same experimental conditions. As mentioned earlier, nuclear *PALB2* crucially promotes the recruitment of *BRCA2* and *RAD51* to DSBs [6,57] and, thus, functional assays based on the *PALB2*-dependent assembly of *BRCA2* and *RAD51* foci are well suited for variant assessment. It was reported that the *PALB2* C-terminal WD40 domain hides a nuclear export signal that can be exposed by cancer-causing mutations (e.g., W1038X) and lead to translocation of the protein from the nucleus into the cytoplasm, establishing a link between *PALB2* mislocalization and cancer formation [62] (**Figure 2.2H**). Given that *PALB2* localization can be rapidly monitored by microscopy using YFP/GFP-tagged proteins, such an assay appears particularly relevant for the assessment of variants located in the WD40 domain.

The most direct method for evaluating the impact of *PALB2* variants on HR efficiency relies on the DR-GFP system, a fluorescence-based assay quantifiable by flow cytometry, which uses the rare cutting endonuclease I-SceI to introduce a site-specific DSB. Successful HR leads to GFP expression [63], with GFP percentages obtained by FACS close to 5% in different cell lines [45,47,64,65]. The advent of rapid and precise genome engineering using the CRISPR-Cas9 system has allowed the development of targeted DSBs and HR assessment. One such system is based on the insertion of mRuby, a bright-red fluorescent protein (or the eGFP-derivative gene Clover), into the Lamin A/C *locus* (LMNA) by CRISPR-mediated HR [66] (**Figure 1.4B**). This approach was adapted to fluorescence microscopy to analyze the impact of *PALB2* variations on HR, with ~25–30% of HR-positive cells for wild-type *PALB2* in U2OS and 293T cell lines [16,62]. Beyond *PALB2* analyses, this approach may be a robust method to evaluate how other proteins potentially impact on the HR mechanism.

Several cancer-associated mutations are in *PALB2* functional domains. As described earlier, when DNA damage occurs, CC-mediated *PALB2* oligomers dissociate to form a protein complex with BRCA1 [12]. Therefore, *PALB2* activity in HR is dependent on fine-tuned competition between *PALB2*-*PALB2* and *PALB2*-BRCA1 complexes. Variations in the CC motif could impair this mode of regulation and lead to HR defects by preventing *PALB2* recruitment to DNA damage sites. This can be investigated by co-immunoprecipitation assays. Indeed, missense mutations (Y28C and L35P), both present on the *PALB2*-BRCA1 hydrophobic interaction interface, have been previously reported to weaken *PALB2* self-interaction and abrogated *PALB2*-BRCA1 interactions, disabling partially or completely the ability of *PALB2* to promote HR and form RAD51 foci [65]. The mammalian double-hybrid system is another assay that has been developed to assess the effect of BRCA1 variants on its binding to *PALB2* [56]. In the center of *PALB2* lies the ChAM domain, which allows *PALB2* to recruit BRCA2 to DSBs independently of the DNA-binding domain. Inactivation of the ChAM motif can lead to increased sensitivity towards MMC and diminution of *PALB2* and RAD51 accumulation at the site of DSBs. A cellular fractionation can be undertaken to assess whether the variation of interest impairs the association of *PALB2* with chromatin [33].

The WD40 domain of *PALB2* is an important regulatory platform for protein–protein interactions. This region folds as a seven-bladed beta-propeller and binds RNF168, BRCA2, RAD51, DNA polymerase eta, and RAD51C. Consequently, *PALB2* truncations leading to loss of the WD40 domain also result in a profound deficiency in HR. The missense variants (L939W, T1030I, and L1143P) found in patients with BC were analyzed for RAD51C binding. Although binding was not completely disrupted, the L1143P mutant decreased binding to RAD51C and BRCA2, both *in vitro* and in human cells [64]. Through the assembly of polymerase eta to DNA DSBs, *PALB2* variants can lead to recombination-associated DNA synthesis defects during later stages of HR [67] (**Figure 1.2G**). Variations that occur in the WD40 domain can interfere with the structure or the biochemical characteristics of the beta-propeller. Fortunately, the WD40 domain has been previously crystallized [68]; hence,

it is possible to visualize any putative changes in its structure via PyMOL software. Furthermore, truncating mutations in the scaffold domain can induce its collapse, which would further lead to its degradation by nonsense-mediated RNA decay, as shown with protein stability kinetics after cycloheximide treatment [68,69]. It can also be responsible for the delocalization of PALB2 to cytoplasm, as explained earlier [62]. Clearly, the WD40 domain of PALB2 is a hotspot for deleterious mutations, and protein–protein interactions as well as cytoplasmic accumulation should be monitored as a consequence of these mutations. We anticipate that many future insights into the biology of PALB2 will arise from studying the functional consequences of VUSs.

1.11 Concluding Remarks and Future Perspectives

Over the years, we have gained an understanding of the function of the tumor suppressor PALB2 in genomic stability. One of the many outstanding challenges will be to kill selectively *PALB2*-mutated malignant cells. Targeting synthetic lethal vulnerabilities in cancer cells has provided an alternative approach for exploiting the genetic and epigenetic changes acquired during tumorigenesis. Synthetic lethality occurs when the combination of two gene deficiencies results in a lethal phenotype, whereas alteration of each gene individually does not affect cellular fitness or cell death. This is exemplified by the successful use of a PARPi as monotherapy for the treatment of advanced BC or OC carrying *BRCA1* or *BRCA2* germline mutations Appendix Aⁱ [70–72] (**Table 1.1**). Independent studies have evidenced the sensitivity of *PALB2*-deficient cells to PARPis including olaparib [9] or talazoparib [73] alone, or combined with temozolomide [74], suggesting the use of PARPi in *PALB2*-associated cancer treatment. However, the variable levels of PARP proteins in different *BRCA1*-, *PALB2*-, or *BRCA2*-mutated tumors, as well as inherited or acquired PARPi resistance, might be an obstacle. In fact, a partial restoration of HR has been witnessed in some cases and needs further investigation. Cells that lack PALB2 activity and, therefore, present HR defects, must rely on the backup single-strand annealing pathway mediated by RAD52. Hence, it was found that inactivation of RAD52 was synthetically lethal with *BRCA2*-deficient cells [75], revealing RAD52 inhibition as a promising target for *PALB2*-dependent synthetic lethality strategies. So far, several studies have screened multiple drug libraries in the search for RAD52 activity inhibitors, identifying some promising candidates by using *in vitro* assays and structure-based selection. Of those, four compounds stand out: 6-hydroxy-DL-dopa [76], D-103 [77], AICAR [78], and (-)-epigallocatechin [79] (**Table 1.1**). First isolated based on the inhibition of RAD52-ssDNA interaction or its *oligomerization*, these small-molecule inhibitors have been proven to selectively inhibit the growth of different *BRCA1* and/or *BRCA2*-deficient human cell lines. However, it will be interesting to check whether the effect of these molecules is reproducible in *PALB2*-deficient cells. Clearly, tailored therapies against PALB2 are starting to emerge and it will be exciting to follow their development for future clinical use.

1.12 Outstanding Questions

- What are the functions of the two PALB2 DNA-binding domains *in vivo*?
- The MRG15-assisted recruitment of PALB2 and PALB2-associated proteins to chromatin in the absence of DNA damage and around DSBs appears critical for genome stability. What is the precise molecular mechanism by which this chromodomain-containing protein regulates PALB2 function in HR?
- Which type of DNA damage causes *PALB2* to be mutated during FA?
- At which level do HR functional assays predict whether missense *PALB2* variations are pathogenic and, therefore, that the patient harboring these mutations can be treated with PARP1?

Acknowledgments

We thank Isabelle Brodeur for comments on the manuscript. We also thank Graham Delleire for ongoing collaborative work on the development of *in vivo* CRISPR-Cas9 DNA repair assays. This work was supported by the Quebec Breast Cancer Foundation (J-Y.M and J.C.); the Government of Canada through Genome Canada and the Canadian Institutes of Health Research, the Ministère de l'Économie, de la Science et de l'Innovation du Québec through Genome Québec, and the Quebec Breast Cancer Foundation (J-Y.M. and J.S.). The project was also supported by a grant from the Ministère de l'Économie, de la Science et de l'Innovation du Québec through the PSR-SIIRI-949 program (J-Y.M./J.S) and the CIHR (Foundation grants to J.C. and J-Y.M). Laure Guitton is a FRQS fellow; J.C. is a Canada Research Chair in chromatin biology and molecular epigenetics; J.S. is a Canada Research Chair in Oncogenetics; and J-Y.M. is a FRQS Chair in genome stability.

Resources

<http://Clinicaltrials.gov>

Supplemental information

Supplemental information associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.tibs.3502018.10.008>.

1.13 Figures

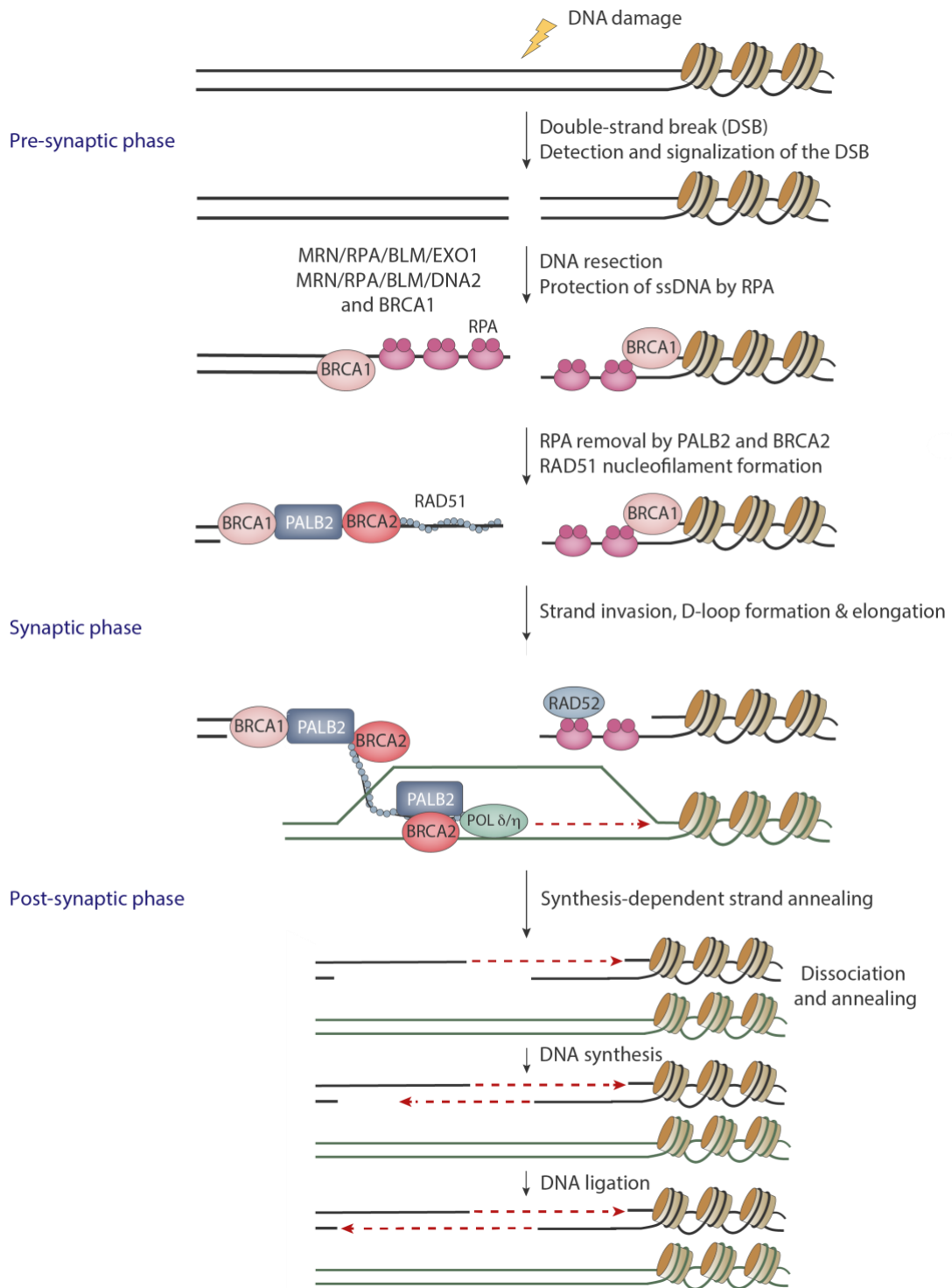


Figure 1.1 – Partner and Localizer for BRCA2 (PALB2) Is a Mediator in the Homologous Repair (HR) Pathway.

Double-strand break (DSB) repair by HR occurs in three successive phases (presynaptic, synaptic, and postsynaptic). The presynaptic phase is marked by detection and signalization of the DSBs, which involves the action of the ATM/ATR kinases, the MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex, or the ring finger-8 (RNF8) and RNF168 E3-ubiquitin ligases. This is followed by limited resection of DNA ends from 5' to 3' leading to the formation of single-strand (ss)DNA at the extremity of the DSB. This limited resection is orchestrated by MRE11-RAD50-NBS1 and CtIP. Further resection is promoted by BRCA1 and involves MRN-RPA-BLM-EXO1 and MRN-RPA-BLM-DNA2. The ssDNA generated is then protected from degradation by the single-strand binding protein RPA. BRCA1 also recruits PALB2 to the DSB, which in turn promotes the recruitment of BRCA2. Being HR mediators, PALB2 and BRCA2 catalyze the removal of RPA and facilitate the assembly of the RAD51 nucleoprotein filament. During the synaptic phase, the RAD51 nucleoprotein filament conducts a homology search and invasion of ssDNA into the intact sister chromatid, providing a homologous template for DNA synthesis and faithful repair of DNA. The invading strand hybridizes with the template sister chromatid strand, displacing its complement and forming a hybrid structure named the displacement (D)-loop. Polymerase delta or eta promotes DNA synthesis within the D-loop. In mitotic cells, the postsynaptic phase leads generally to D-loop resolution by synthesis-dependent strand annealing (SDSA). This process is characterized by the annealing of the extended single-strand end to the ssDNA on the other break end, followed by gap-filling DNA synthesis and ligation. The repair product from SDSA is non-crossover.

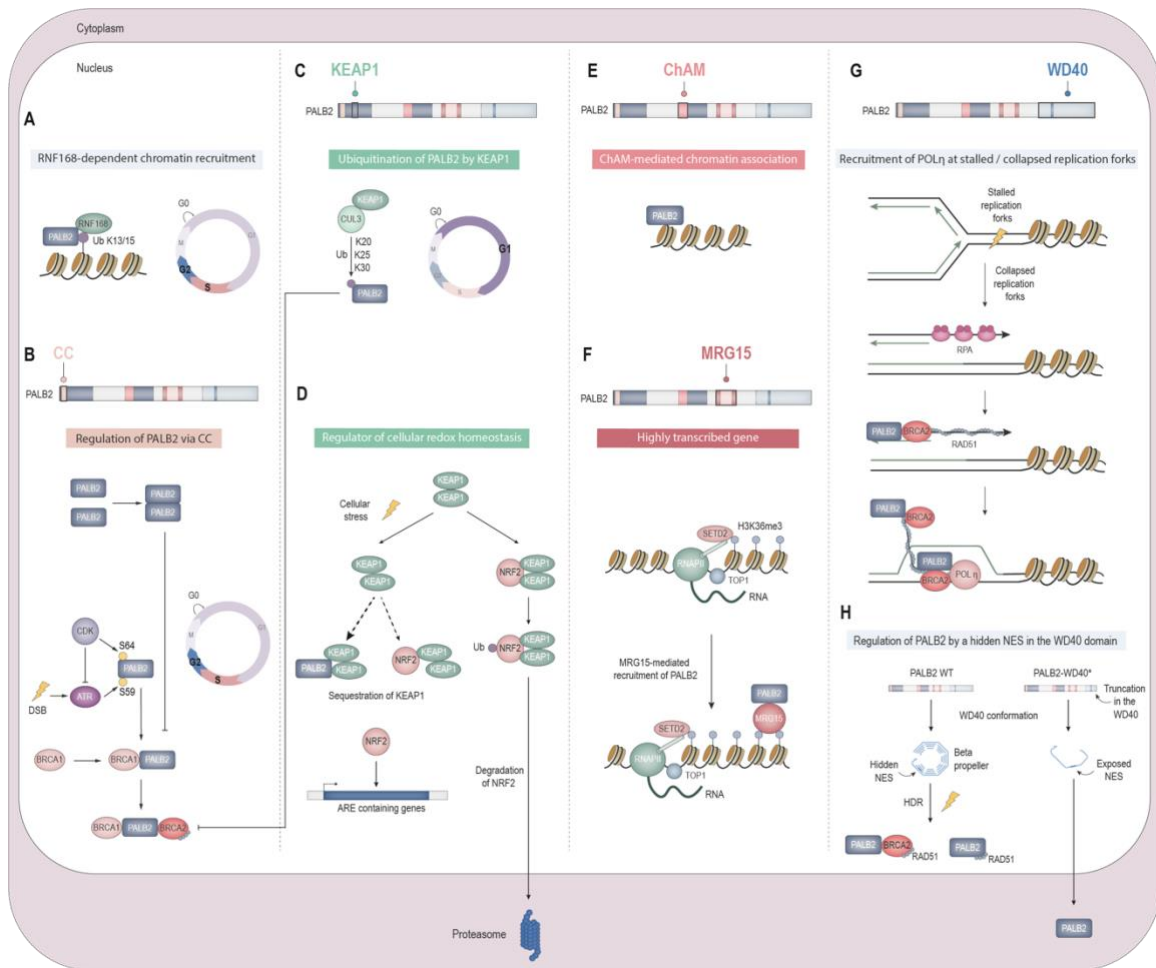


Figure 1.2 – Partner and Localizer for BRCA2 (PALB2) Regulation via Cell Cycle and Functional Domains.

(A) PALB2 is recruited to double-strand breaks (DSBs) in S/G₂-phase cells by physical interaction with RNF168. **(B)** In the absence of DSBs, PALB2 forms a low-activity oligomer that disassembles into monomers to form a complex with BRCA1 after DNA damage signaling. This interaction is regulated by a phosphorylation switch from S64 to S59 by CDK and ATR, respectively. **(C)** PALB2 is ubiquitinated in G₁ by the KEAP1-CUL3 complex, leading to its degradation. **(D)** During oxidative stress, PALB2 binds to KEAP1 to enhance the transcriptional activation of antioxidant response element (ARE)-containing genes by NRF2. **(E)** PALB2 bears a chromatin-association motif (ChAM) motif that allows its chromatin association in both unperturbed and damaged cells. **(F)** PALB2 is recruited by MORF-related gene on chromosome 15 (MRG15) on H3K36me₃ marks of highly transcribed genes to relieve replication stress. **(G)** The WD40 domain is an important interaction scaffold for PALB2 activity in DSB repair. PALB2 is responsible for the efficient recruitment of BRCA2 to DSBs. Together, these proteins stimulate RAD51 filament formation. In later stage of homologous repair (HR), PALB2 recruits and stimulates DNA polymerase eta for DNA synthesis and subsequent repair to occur. **(H)** Truncating variants

in the WD40 domain can lead to PALB2 delocalization to the cytoplasm by revealing a masked nuclear export signal (NES), hence preventing the protein from carrying out its role in HR.

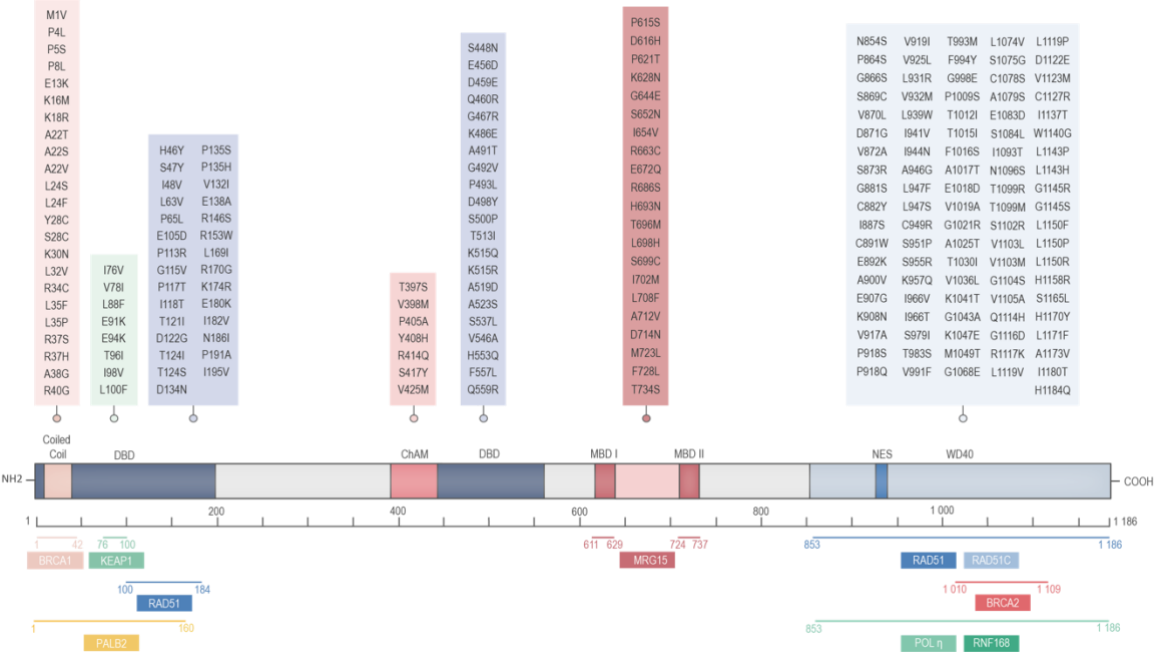


Figure 1.3 – Partner and Localizer for BRCA2 (PALB2) Missense Variations found in Patients with Breast Cancer.

Protein interactions are also indicated.

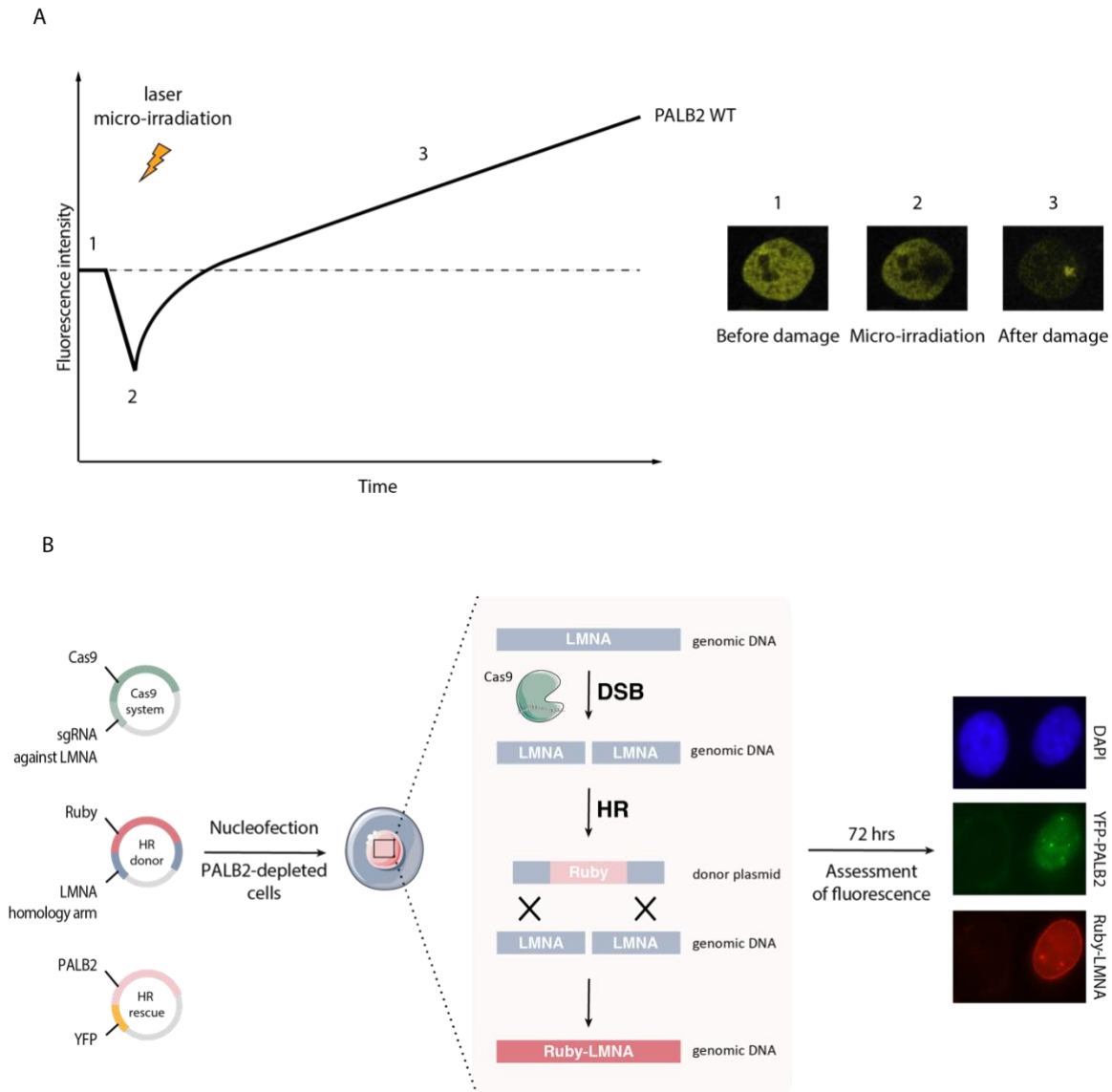


Figure 1.4 – Functional assays for the characterization of Partner and Localizer for BRCA2 (PALB2) variants.

(A) Ultraviolet (UV) laser microirradiation allows the induction of localized damage in a restricted area of the nucleus, where accumulation of fluorescently tagged repair factors, such as PALB2, can be quantified over time and graphically represented to obtain their recruitment kinetics. **(B)** Schematic representation of the CRISPR-LMNA HR assay for the assessment of cellular homologous repair (HR) efficiency.

Compound	6-Hydroxy-DL-dopa	D-103	(-)-Epigallocatechin	AICAR	Olaparib (Astra Zeneca, Lynparza)	Talazoparib (Pfizer, BMN-673)	Rucaparib (Pfizer)	Niraparib (Tesaro)	Veliparib (Abbvie)
Mechanism	Disrupts RAD52 oligomeric ring structures	Inhibits RAD52-sDNA annealing	Inhibits RAD52-sDNA interaction	Inhibits RAD52-sDNA interaction	Inhibits PARP1 and PARP2 (preferentially to other PARPs) by binding to their catalytic site (nicotinamide pocket of ADP-riboseyl transferase site)	Inhibits PARP1 and PARP2 by binding to their catalytic site - more potent at trapping PARP at the damage site	Inhibits PARP1 and PARP2 (preferentially to other PARPs) by binding to their catalytic site (nicotinamide pocket of ADP-riboseyl transferase site)	Inhibits PARP1 and PARP2 with higher affinity compared to other PARPs by binding to their catalytic site (nicotinamide pocket of ADP-riboseyl transferase site)	Inhibits PARP1 and PARP2 with higher affinity compared to other PARPs by binding to their catalytic site (nicotinamide pocket of ADP-riboseyl transferase site)
Effective concentration	5-75 μ M in cellular tests depending on cell type and test	2.5 μ M for MDA-MB-436 cells, up to 10 μ M for CML patient cells, up to 20 μ M for CAPAN-1 cells and up to 40 μ M for UWB1.289 cells	1 μ M	2 μ M for HCC1937 cells, 20 μ M for CAPAN-1 cells and 10 μ M for BCR-ABL1 32Dc13 murine cells	50 mg of olaparib per kg intraperitoneally for 28 or 100 days on mice carrying orthotopically transplanted BRC1-/- (p53-/-) tumors Study 23: tumor regression of TNBC HBCK-10 with 50 and 100 mg/kg	Inhibition of tumor growth in subcutaneous MX-1 tumor xenografts BRC1-deficient breast carcinoma treated with BMN 673 for 28 days (daily dose of 0.33 mg/kg)	15, 50 and 150 mg/kg twice daily rucaparib inhibited tumor growth in MDA-MB-436 and HBCK-17 TNBC models and OC BKRas model	50 to 80 mg/kg for 2, 3 or 4 weeks in MDA-MB-436 cells; inhibited tumor growth in CAPAN-1 pancreatic cancer cell xenograft model	In vivo sensitivity of GBM-12 xenografts to TMZ (50 mg/kg/d) with or without veliparib (25 mg/kg/d, delivered in two divided doses) for 5 days every 28 days for three cycles
Cellular effects	Reduces viability and proliferation of MDA-MB-436, HCC1937 (BRCA1-deficient), and CAPAN-1 (BRCA2-deficient) human cell lines, YC8 (BRCA2-deficient) hamster cell line and BRCA-deficient acute (AML) and chronic (CML) myeloid leukemia and patient cells	Reduces growth of UWB1.289, MDA-MB-436 (BRCA1-deficient) and CAPAN-1 (BRCA2-deficient) cell lines, and BRCA1-deficient CML patient cells	Selective death induction of sBRCA2 GM01604 cells	Selective growth inhibition of HCC1937 (BRCA1-deficient) and CAPAN-1 (BRCA2-deficient) human cell lines and BCR-ABL1-32Dc13 (BRCA1-deficient) murine cells	2014 US Food and Drug Administration (FDA) approval: used in advanced OC with BRCA germline mutation. Synthetically lethal in HR-deficient cells; with increased chemo- and radiosensitization	Creates DSBs by trapping PARP at damage sites; synthetically lethal when used in HR-deficient cells; under investigation in Phase I/II trials	2016 FDA approval: used in advanced OC with BRCA germline mutation; synthetically lethal in HR-deficient cells, making them more sensitive to other chemotherapeutics and radiation	2017 FDA approval: synthetically in HR-deficient cells, making them more sensitive to other chemotherapeutics and radiation; FDA approved for fallopian tube cancer, primary peritoneal cancer, and OC with platinum sensitivity	Known to inhibit SSB and DSB repair; under investigation in Phase I/II trials
Refs	[76]	[77]	[79]	[78]	[80]	[81]	[82,83]	[83,84]	[83,85]

Table 1.1 – Compounds Effective against PALB2 and/or HR-Deficient Cells for Synthetic Lethal Studies

1.14 References

2. Cicia, A. and Elledge, S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204
3. Chapman, J.R. et al. (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell* 47, 497–510
4. Ceccaldi, R. et al. (2016) The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 337–349
5. Wooster, R. et al. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789–792
6. Tavtigian, S.V. et al. (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat. Genet.* 12, 333–337
7. Xia, B. et al. (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol. Cell* 22, 719–729
8. Tischkowitz, M. and Xia, B. (2010) PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia. *Cancer Res.* 70, 7353–7359
9. Xia, B. et al. (2007) Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat. Genet.* 39, 159–161
10. Buisson, R. et al. (2010) Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1247–1254
11. Dray, E. et al. (2010) Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1255–1259
12. Luijsterburg, M.S. et al. (2017) A PALB2-interacting domain in RNF168 couples homologous recombination to DNA break-induced chromatin ubiquitylation. *Elife* 6, e20922
13. Buisson, R. and Masson, J.Y. (2012) PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* 40, 10312–10323
14. Matsuoka, S. et al. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160–1166
15. Guo, Y. et al. (2015) ATM-dependent phosphorylation of the Fanconi anemia protein PALB2 promotes the DNA damage response. *J. Biol. Chem.* 290, 27545–27556
16. Ahlskog, J.K. et al. (2016) ATM/ATR-mediated phosphorylation of PALB2 promotes RAD51 function. *EMBO Rep.* 17, 671–681
17. Buisson, R. et al. (2017) Coupling of homologous recombination and the checkpoint by ATR. *Mol. Cell* 65, 336–346

18. Orthwein, A. et al. (2015) A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature* 528, 422–426
19. Ma, J. et al. (2012) PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. *Mol. Cell Biol.* 32, 1506–1517
20. Hayakawa, T. et al. (2010) MRG15 binds directly to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks. *J. Cell Sci.* 123, 1124–1130
21. Sy, S.M. et al. (2009) MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination. *J. Biol. Chem.* 284, 21127–21131
22. Martrat, G. et al. (2011) Exploring the link between MORF4L1 and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 13, R40
23. Bleuyard, J.Y. et al. (2017) MRG15-mediated tethering of PALB2 to unperturbed chromatin protects active genes from genotoxic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 7671–7676
24. Chen, M. et al. (2011) Loss of the chromatin regulator MRG15 limits neural stem/progenitor cell proliferation via increased expression of the p21 Cdk inhibitor. *Stem Cell Res.* 7, 75–88
25. Chen, M. et al. (2009) MRG15, a component of HAT and HDAC complexes, is essential for proliferation and differentiation of neural precursor cells. *J. Neurosci. Res.* 87, 1522–1531
26. Hayakawa, T. et al. (2007) RBP2 is an MRG15 complex component and down-regulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation. *Genes Cells* 12, 811–826
27. Cai, Y. et al. (2003) Identification of new subunits of the multi-protein mammalian TRRAP/TIP60-containing histone acetyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* 278, 42733–42736
28. Doyon, Y. et al. (2004) Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol. Cell Biol.* 24, 1884–1896
29. Jelinic, P. et al. (2011) A novel mammalian complex containing Sin3B mitigates histone acetylation and RNA polymerase II progression within transcribed loci. *Mol. Cell Biol.* 31, 54–62
30. Sy, S.M. et al. (2009) MRG15 is a novel PALB2 interacting factor involved in homologous recombination. *J. Biol. Chem.* 284, 21127–21131
31. Xie, T. et al. (2015) Structural basis for multi-specificity of MRG domains. *Structure* 23, 1049–1057
32. Xie, T. et al. (2012) Structural basis for molecular interactions involving MRG domains: implications in chromatin biology. *Structure* 20, 151–160
33. Bleuyard, J.Y. et al. (2017) Perturbation of PALB2 function by the T413S mutation found in small cell lung cancer. *Wellcome Open Res.* 2, 110
34. Bleuyard, J.Y. et al. (2012) ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair. *EMBO Rep.* 13, 135–141
35. Zhang, P. et al. (2006) Structure of human MRG15 chromodomain and its binding to Lys36-methylated histone H3. *Nucleic Acids Res.* 34, 6621–6628-442

36. Kumar, G.S. et al. (2012) Sequence requirements for combinatorial recognition of histone H3 by the MRG15 and Pf1 subunits of the Rpd3S/Sin3S corepressor complex. *J. Mol. Biol.* 422, 519–531
37. Gueiderikh, A. et al. (2017) A never-ending story: the steadily growing family of the FA and FA-like genes. *Genet. Mol. Biol.* 40, 398–407
38. Pauty, J. et al. (2014) Exploring the roles of PALB2 at the cross-roads of DNA repair and cancer. *Biochem J.* 460, 331–342
39. Byrd, P.J. et al. (2016) A hypomorphic PALB2 allele gives rise to an unusual form of FA-N associated with lymphoid tumour development. *PLoS Genet.* 12, e1005945
40. Bouwman, P. et al. (2011) Loss of p53 partially rescues embryonic development of Palb2 knockout mice but does not foster haploinsufficiency of Palb2 in tumour suppression. *J. Pathol.* 224, 10–21
41. Simhadri, S. et al. (2014) Male fertility defect associated with disrupted BRCA1-PALB2 interaction in mice. *J. Biol. Chem.* 289, 24617–24629
42. Ghosh, S. et al. (2014) Hypersensitivities for acetaldehyde and other agents among cancer cells null for clinically relevant Fanconi anemia genes. *Am. J. Pathol.* 184, 260–270
43. Tan, S.L.W. et al. (2017) A class of environmental and endogenous toxins induces BRCA2 haploinsufficiency and genome instability. *Cell* 169, 1105–1118
44. Rahman, N. et al. (2007) PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat. Genet.* 39, 165–167
45. Antoniou, A. et al. (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1117–1130
46. Erkkö, H. et al. (2007) A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 446, 316–319
47. Erkkö, H. et al. (2008) Penetrance analysis of the PALB2 c.1592delT founder mutation. *Clin. Cancer Res.* 14, 4667–4671
48. Tischkowitz, M. et al. (2007) Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6788–6793
49. Southey, M.C. et al. (2010) A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, R109
50. Antoniou, A.C. et al. (2014) Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N. Engl. J. Med.* 371, 497–506
51. Southey, M.C. et al. (2016) PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS. *J. Med. Genet.* 53, 800–811
52. Slavin, T.P. et al. (2017) The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *NPJ Breast Cancer* 3, 22

53. Easton, D.F. et al. (2015) Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N. Engl. J. Med.* 372, 2243–2257
54. Couch, F.J. et al. (2017) Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. *JAMA Oncol.* 3, 1190–1196
55. Lu, H.M. et al. (2018) Association of breast and ovarian cancers with predisposition genes identified by large-scale sequencing. *JAMA Oncol.*
56. Kerr, I.D. et al. (2017) Assessment of in silico protein sequence analysis in the clinical classification of variants in cancer risk genes. *J. Community Genet.* 8, 87–95
57. Woods, N.T. et al. (2016) Functional assays provide a robust tool for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance. *NPJ Genom. Med.* 1, 16001
58. Sy, S.M. et al. (2009) PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization. *J. Biol. Chem.* 284, 18302–18310
59. Sy, S.M. et al. (2009) PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7155–7160
60. Zhang, F. et al. (2009) PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol. Cancer Res.* 7, 1110–1118
61. Zhang, F. et al. (2012) MDC1 and RNF8 function in a pathway that directs BRCA1-dependent localization of PALB2 required for homologous recombination. *J. Cell Sci.* 125, 6049–6057
62. Couturier, A.M. et al. (2016) Roles for APRIN (PDS5B) in homologous recombination and in ovarian cancer prediction. *Nucleic Acids Res.* 44, 10879–10897
63. Pauty, J. et al. (2017) Cancer-causing mutations in the tumor suppressor PALB2 reveal a novel cancer mechanism using a hidden nuclear export signal in the WD40 repeat motif. *Nucleic Acids Res.* 45, 2644–2657
64. Nakanishi, K. et al. (2005) Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1110–1115
65. Park, J.Y. et al. (2014) Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene* 33, 4803–4812
66. Foo, T.K. et al. (2017) Compromised BRCA1-PALB2 interaction is associated with breast cancer risk. *Oncogene* 36, 4161–4170
67. Pinder, J. et al. (2015) Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res.* 43, 9379–9392
68. Buisson, R. et al. (2014) Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase η in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks. *Cell Res.* 6, 553–68.
69. Oliver, A.W. et al. (2009) Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep.* 10, 990–996

70. Reid, S. et al. (2007) Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat. Genet.* 39, 162–164
71. Ledermann, J.A. (2016) PARP inhibitors in ovarian cancer. *Ann. Oncol.* 27, i40–i44
72. Bryant, H.E. et al. (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913–917
73. Farmer, H. et al. (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917–921
74. Smith, M.A. et al. (2015) Initial testing (stage 1) of the PARP inhibitor BMN 673 by the pediatric preclinical testing program: PALB2 mutation predicts exceptional in vivo response to BMN 673. *Pediatr. Blood Cancer* 62, 91–98
75. Smith, M.A. et al. (2015) Synergistic activity of PARP inhibition by talazoparib (BMN 673) with temozolomide in pediatric cancer models in the pediatric preclinical testing program. *Clin. Cancer Res.* 21, 819–832
76. Feng, Z. et al. (2011) Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 686–691
77. Chandramouly, G. et al. (2015) Small-molecule disruption of RAD52 rings as a mechanism for precision medicine in BRCA-deficient cancers. *Chem. Biol.* 22, 1491–1504
78. Huang, F. et al. (2016) Targeting BRCA1- and BRCA2-deficient cells with RAD52 small molecule inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 44, 4189–4199
79. Sullivan, K. et al. (2016) Identification of a small molecule inhibitor of RAD52 by structure-based selection. *PLoS One* 11, e0147230
80. Hengel, S.R. et al. (2016) Small-molecule inhibitors identify the RAD52–ssDNA interaction as critical for recovery from replication stress and for survival of BRCA2 deficient cells. *Elife* 5, e14740
81. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (44), 17079-84.
82. Shen, Y. et al. (2013) BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clin Cancer Res* 19 (18), 5003-15.
83. Liliane Robillard, M.N., Thomas C. Harding, Andrew D. Simmons. In vitro and in vivo assessment of the mechanism of action of the PARP inhibitor rucaparib [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017; 2017 Apr 1-5; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2017;77(13Suppl):Abstractnr2475. doi:10.1158/1538-7445.AM2017-2475.
84. Thorsell, A.G. et al. (2017) Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors. *J Med Chem* 60 (4), 1262-1271.
85. Jones, P. et al. (2015) Niraparib: A Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor for the Treatment of Tumors with Defective Homologous Recombination. *J Med Chem* 58 (8), 3302-14.

86. Gupta, S.K. et al. (2014) Discordant in vitro and in vivo chemopotentiating effects of the PARP inhibitor veliparib in temozolomide-sensitive versus -resistant glioblastoma multiforme xenografts. *Clin Cancer Res* 20 (14), 3730-41.

2 CHAPITRE 2 - Functional characterization of 84 PALB2 variants of uncertain significance

Timothy Wiltshire,¹ Mandy Ducey,^{2,3,4} Tzeh Keong Foo,⁵ Kun Y. Lee¹, Anil Belur Nagaraj,¹ Amélie Rodrigue,^{2,3} Jacques Simard,³ Alvaro N.A. Monteiro,⁶ Bing Xia,⁵ Marcelo A. Carvalho,⁷ Jean-Yves Masson,^{2,3} Fergus J. Couch¹

¹Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA.

²CHU de Québec-Université Laval, Oncology Division, 9 McMahon, Québec City, QC, G1R 3S3, Canada.

³CHU de Québec-Université Laval, Endocrinology and Nephrology Division, 2705 Bld Laurier, Québec City, QC, G1V 4G2, Canada

⁴Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Laval University Cancer Research Center, Laval University, Quebec City, QC G1V 0A6, Canada

⁵Department of Radiation Oncology, Rutgers Cancer Institute of New Jersey 195 Little Albany Street, New Brunswick, NJ 08901, USA

⁶Department of Cancer Epidemiology, H. Lee Moffitt Cancer Center, 12902 USF Magnolia Drive, Tampa, FL 33612, USA

⁷Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

2.1 Avant-propos

Au cours de mon doctorat, nous avons mis au point une méthode systématique d'essais fonctionnels afin de caractériser l'effet de variations faux sens de *PALB2*, sur la fonction de la protéine. Notre collaboration avec le Dr Couch nous a permis de valider la pertinence de notre méthode dans la classification des variations de signification indéterminée. Les résultats obtenus lors de cette collaboration font l'objet d'un manuscrit qui a été soumis en Mars 2019.

J'ai ainsi participé aux expériences de caractérisation de 4 variants prioritaires de *PALB2* à l'écriture de l'article et au montage des figures pour les données que j'ai récoltées (**Figures 2.4** et **S2.1**), me plaçant ainsi comme deuxième auteure. J'ai enfin participé à la correction du papier.

2.2 Résumé

Les mutations tronquantes de *PALB2* sont associées à un risque élevé de cancer du sein et du pancréas. Cependant, la pertinence fonctionnelle et clinique de nombreuses variations de type faux sens de *PALB2* identifiées en clinique reste largement incomprise. Nous avons évalué l'influence de 84 variations faux sens de *PALB2*, identifiées chez des patientes et non-classées, sur la fonction de *PALB2*, en utilisant un système rapporteur cellulaire pour la réparation médiée par la recombinaison homologue (RH). Seuls 4/84 variants testés (p.L24S, p.L35P, p.I944N et p.L1070P) rompent l'activité de RH médiée par *PALB2*. Ensemble, nos résultats démontrent que notre méthode est efficace pour cribler des variants délétères et a permis l'identification de 4 variants faux sens de *PALB2* avec un impact fonctionnel pouvant influencer le risque de cancer et la réponse aux thérapies et suggère que peu de variations faux sens de *PALB2* sont délétères pour sa fonction dans la RH.

2.3 Abstract

Inherited truncated variants in *PALB2* have been associated with high risks of breast and pancreatic cancers. However, the functional and clinical relevance of many missense variants in *PALB2* that have been identified through clinical genetic testing is unclear. In this study, the influence of 84 patient-derived germline missense variants of uncertain significance (VUS) on *PALB2* function was evaluated using a cellular reporter assay for homology directed repair (HDR) of DNA double strand breaks in an effort to identify variants with potential clinical relevance. Only 4/84 variants tested (p.L24S, p.L35P, p.I944N and p.L1070P) variants disrupted *PALB2*-mediated HR repair activity. Taken together these findings show that our method is effective for screening the influence of inherited variants on *PALB2* function, identifies four *PALB2* missense variants with a functional impact that may influence cancer risk and response to therapy, and suggests that few inherited *PALB2* missense variants disrupt *PALB2* function in DNA repair.

2.4 Introduction

The repair of double-strand breaks (DSBs) by homologous recombination (HR) has been established as an important barrier to the development of cancer. The two most prominent members of this family of tumor suppressor genes, *BRCA1* and *BRCA2*, encode proteins that have been linked to breast, ovarian and pancreatic cancer through inherited loss of function variants. Inherited pathogenic variants in the *PALB2* gene that inactivate the PALB2 protein have also been associated with high risk of breast and pancreatic cancers [124, 203-205]. PALB2 loss of function variants are associated with lifetime risk of breast cancer of 24% to 54%, depending on the extent of family history of breast cancer [206]. In addition, bi-allelic loss of function variants in *PALB2* result in Fanconi anemia [81]. A number of studies have also analyzed the occurrence of germline *PALB2* loss of function variants in breast cancer and estimated frequencies ranging from 0.6% to 3.9% in population-based breast cancer cases and high-risk breast cancer families, respectively [80, 203].

PALB2 encodes an 1186 amino acid protein with an amino terminal coiled-coil domain, central chromatin-associated motif and C-terminal WD40 repeat [207]. PALB2 is an important interaction partner of both BRCA1 and BRCA2 that is also required for HR repair of DSBs. BRCA1 interacts with the coiled-coil motif at the N-terminus of PALB2 [208], whereas binding of BRCA2 has been mapped to WD40 repeats at the C-terminus of PALB2 [77]. Through interactions with RAD51 [79, 173, 174], PALB2 stimulates RAD51-mediated HR. Disruption of the PALB2-RAD51 interaction through deletion mutations leads to functional defects in HR repair [174, 209, 210].

While protein truncating mutations clearly abrogate PALB2 function and lead to increased cancer risk, much less is known about the contribution of missense variants of uncertain significance (VUS) to cancer development. Many unique *PALB2* VUS have been identified by germline and somatic clinical and research testing of cancer patients and tumors. Many of these are reported in the PALB2 LOVD database (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/PALB2/unique>) and in ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Currently, only missense variants in the PALB2 start codon have been classified as pathogenic or likely pathogenic by clinical testing laboratories (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). In addition, the p.L35P variant has been shown to disrupt the HR activity of PALB2, confer sensitivity to platinum agents and PARP inhibitors, and to segregate with breast cancer in a family with a history of the disease [209]. The rest of the identified *PALB2* missense variants remain unclassified. In this study, we evaluated the influence of 84 patient-derived missense variants on PALB2 function using a cellular reporter assay for HR repair of DSBs. We identified three new missense variants that disrupted HR repair, conferred sensitivity to DNA damaging agents, inhibited formation of RAD51 foci in response to DNA damage and displayed altered cellular localization.

2.5 Results

2.5.1 Selection of *PALB2* variants for functional studies

Missense variants throughout *PALB2* have been identified in individuals with breast and other cancers. Here we took a systematic approach to understand the influence of patient-derived *PALB2* missense variants on its function. A total of 84 *PALB2* patient-derived missense variants reported in ClinVar, COSMIC, and the *PALB2* LOVD database were selected based on the probability of pathogenicity score predicted using the VEST3.0 *in silico* prediction model (<http://jhu.technologypublisher.com/technology/24805>) (**Table 2.1**). Of the 84 selected variants, 40 had probabilities >0.70 of being pathogenic due to the variant having a deleterious effect predicted (**Table 2.1**). In contrast, the M-CAP [211] *in silico* prediction model, which has recently been recommended for variant prioritization [212], identified 14 variants with probabilities >0.70, whereas the REVEL [213] predictor identified 21 variants with probabilities >0.70 (**Table 2.1**). Only 10 variants had probabilities >0.70 for all three models. In addition, seven pathogenic variants that truncate the *PALB2* protein at various positions were selected as a series of loss of function (negative) controls.

2.5.2 Homology directed repair (HDR) assay

The DR-GFP HR DNA repair reporter assay was used to assess the influence of 84 missense and seven protein-truncating variants on reconstitution of homology directed repair in *PALB2* deficient B400 mouse mammary tumor cells [214]. Full-length wild type (WT) or variant *PALB2* constructs were co-transfected with plasmid expressing I-SceI into B400 cells containing a stably integrated DR-GFP reporter construct that contains a green fluorescent protein (GFP) gene interrupted by the I-SceI endonuclease site, along with an adjacent inactive GFP gene. Expression of all variants was verified by western blotting. Repair of I-SceI induced DSBs by *PALB2* dependent HDR yielded GFP-positive cells that were quantified by flow cytometry. Results for individual *PALB2* variants were normalized relative to WT-*PALB2* (fold-change GFP positive cells of 5.0) and the p.Tyr551ter (p.Y551X) truncating variant (fold-change GFP positive cells of 1.0). p.L24S (c.71T>C), p.L35P (c.104T>C), p.I944N (c.2831T>A), and p.L1070P (c.3209T>C) and all protein truncating frameshift and deletion variants tested were deficient in HDR activity, with normalized fold-change <2.0 (**Figure 2.1A**). In addition, the p.Y1182del variant that truncates the last three residues of the C-terminal β -propeller domain of *PALB2* displayed a normalized fold-change in the HR assay of 2.36. All other variants displayed normalized fold-change >3.3. To confirm the influence of the *PALB2* variants on HR activity, all four variants defective in HDR in B400 cells were also evaluated using a CRISPR-LMNA HDR assay [215]. Endogenous *PALB2* in U2OS cells was silenced with siRNA and complemented with siRNA resistant mutant constructs. WT-*PALB2* restored 50% of

HDR activity while none of the four missense variants restored more than 5% activity (**Figure S2.1**). The p.L24S, p.L35P, p.I944N, and p.L1070P variants consistently disrupted PALB2 HDR activity and, therefore, further analysis was focused on these variants

2.5.3 Mammalian two-hybrid assay of BRCA1 and BRCA2 interactions

Variants p.L21A and p.L35P are known to disrupt the interaction between the N-terminus of PALB2 and BRCA1 (Sy et al, 2009 and Foo et al, 2017), whereas p.A1025R is known to disrupt the interaction between the C-terminus of PALB2 and BRCA2 (Oliver et al., 2009). These findings provide a possible mechanistic explanation for the HR deficiency associated with PALB2 missense variants located in protein-protein interaction surfaces. On this basis the influence of p.L24S, p.I944N, and p.L1070P on interactions between PALB2 and the BRCA1 and BRCA2 proteins were evaluated using a Dual-Luciferase Reporter mammalian two-hybrid assay in HEK293FT cells. *PALB2* p.L21A and p.A1025R variants were used as loss of function (negative) controls [170, 210]. p.L24S, p.L35P and p.L21A controls significantly reduced interaction to BRCA1 relative to WT-PALB2 ($p < 0.01$) (**Figure 3.2**). Similarly, p.I944N, p.L1070P, and the p.A1025R control significantly disrupted the mammalian two-hybrid interactions ($p < 0.0001$) between the C-terminus of PALB2 and BRCA2 (**Figure 2.2**).

2.5.4 DNA damage-dependent PALB2 protein complexes

Because, similar to p.L35P, the p.L24S, p.I944N, and p.L1070P missense variants influenced HR activity and mammalian two-hybrid assays, co-immunoprecipitation experiments were performed to determine whether these variants also disrupted interactions between full-length PALB2 and the BRCA1 and BRCA2 proteins. HEK293T cells expressing FLAG-HA-PALB2 constructs were exposed to 5 Gy ionizing radiation (IR) and PALB2 proteins were immunoprecipitated from cellular lysates with anti-FLAG beads. Western blotting showed that the p.A1025R negative control had reduced ability to form DNA damage induced complexes with BRCA2 and RAD51, the p.L35P negative control significantly diminished complex formation with BRCA1, and the p.L939W non-pathogenic control had no effect on BRCA1, BRCA2 and RAD51 complex formation (**Figure 2.3A**). The p.L24S variant partially reduced PALB2 complex formation with BRCA1 but not with BRCA2 or RAD51 (**Figure 2.3A**). However, the p.L1070P mutant did not influence PALB2 complex formation with BRCA1, BRCA2, or RAD51 (**Figure 2.3A**). Similarly, after adjustment for low expression levels, the p.I944N variant did not reduce any complex formation.

2.5.5 PALB2 protein stability

Because the p.I944N mutant exhibited low levels of expression in HEK293T cells, the influence of each variant on protein stability was assessed. HEK293T cells expressing wild type or variant *PALB2* constructs were treated with 40 µg/ml cycloheximide to halt protein synthesis and PALB2 levels were measured over time by western blotting. The protein half-life of WT-PALB2 and the p.A1025R negative control was estimated at 114 minutes and 116 minutes, respectively (**Figure 2.3B**). In contrast, p.I944N exhibited a half-life of 54 minutes in 293T cells (**Figure 2.3B**). Interestingly, the effect appeared to be cell-type specific because p.I944N was expressed at similar levels as WT-PALB2 in the B400 cells used for the HDR assay. In contrast to the p.I944N, the p.L24S (t_{1/2}=167 minutes), p.L35P (t_{1/2}=172 minutes), and p.L1070P (t_{1/2}=167 minutes) mutants displayed increased stability relative to WT-PALB2 or p.A1025R (**Figure 2.3C**).

2.5.6 Cellular localization of PALB2 and assessment of RAD51 foci formation

Next the influence of the variants on cellular localization of PALB2 was assessed. Yellow fluorescent protein (YFP) intensities at sites of laser-induced DSBs were measured at multiple time points in cells expressing WT and variants forms of YFP-tagged PALB2 to assess rates of PALB2 recruitment to sites of DNA damage. These time course measurements demonstrated rapid recruitment of all variants and WT-PALB2 to the sites of DNA damage (**Figure 2.4A**). However, the proportion of cells showing recruitment of p.I944N (35%) and p.L1070P (61%) to DSBs was considerably lower than the approximately 80% of cells expressing WT, p.L24S and p.L35P (**Figure 2.4B**). In addition, WT-PALB2, p.L24S and p.L35P primarily localized in the nuclei of cells, whereas p.I944N localized primarily in the cytoplasm, and p.L1070P was found in equal proportions in the nucleus and cytoplasm (**Figure 2.4C**). As an inability to form RAD51 foci at the sites of DSBs is a hallmark of HR-deficiency, we also evaluated the influence of the PALB2 variants on localization of RAD51 to DNA damage repair foci. Cells expressing YFP-tagged PALB2 constructs were exposed to 2 Gy gamma-IR and subjected to immunofluorescence staining for RAD51 and cyclin A to identify G₂-phase cells with RAD51 foci. WT-PALB2 was associated with robust formation of damage-induced RAD51 foci, whereas the four variants were associated with defective foci formation (**Figure 2.4D** and **2.4E**). The reduced number of RAD51 foci for each variant was consistent with the results from the HR DR-GFP reporter assays.

2.5.7 Sensitivity to DNA damaging agents

HR defects have been associated with sensitivity to platinum agents and PARP inhibitors. Thus, the influence of the *PALB2* mutants on response to cisplatin and the PARP inhibitor olaparib was evaluated. PALB2

deficient B400 cells expressing WT-PALB2 and the four variants were treated with a range of concentrations of cisplatin or olaparib and cell viability was measured after 5 days using a fluorescence resazurin-based assay. Cells reconstituted with WT-PALB2 showed substantially less sensitivity to olaparib than cells expressing p.A1025R and p.I944N (**Figure 2.5A**). Similar results were observed for cisplatin treatment, although the difference in sensitivity was less pronounced (**Figure 2.5B**). p.L24S, p.L1070P and p.L35P were also associated with greater sensitivity to olaparib (**Figure 2.5C**) and cisplatin (**Figure 2.5D**) than WT-PALB2. Taken together, all of the selected mutants with HR defects exhibited greater sensitivity to DNA damaging agents than WT-PALB2.

2.6 Discussion

In this study, we described the effects of *PALB2* missense variants on DNA repair activity using a cell-based assay that measures HR activity. We showed that *Palb2* (and *Trp53*) deficient mouse mammary tumor B400 cells can be complemented with wild type human PALB2 to rescue HR repair and then utilized this approach to conduct a systematic screen of 84 missense variants in all regions of PALB2. We identified three missense variants (p.L24S, p.L1070P and p.I944N), along with the previously reported p.L35P variant, that disrupted PALB2 HDR activity in B400 cells and verified these findings with an CRISPR-LMNA HDR assay in human HeLa cells and a RAD51 foci formation assay. In addition, we used a series of cell-based and biochemical assays to show that each of the three variants disrupted HDR via a distinct mechanism. Specifically, p.L24S had reduced BRCA1 binding and protein complex formation, p.I944N had reduced protein stability and mislocalized to the cytoplasm, and L1070P had altered cellular localization. Finally, we showed that these three variants conferred increased sensitivity to cisplatin and olaparib.

Clinical genetic testing has identified a large number of *PALB2* missense variants of uncertain clinical significance, many of which are listed in the ClinVar database. These VUS create significant uncertainty for patients in terms of risks of developing breast and other cancers. No methods currently exist for classifying the clinical relevance of VUS in *PALB2*. While the functional assays reported here provide strong evidence that these variants disrupt PALB2 function and cellular HR responses to DNA damage, these assays have not been validated relative to known pathogenic and non-pathogenic missense variants, and the sensitivity and specificity of each assay are not known. Thus, it is not certain that the p.L24S, p.I944N, and p.L1070P missense variants confer increased risks of breast and other cancers. As such, the results of the functional assays should be used with caution when attempting to interpret the pathogenicity of these variants. In contrast, functional assays have been used for characterization of *BRCA1* and *BRCA2* missense variants. Because of the availability of

substantial numbers of *BRCA1* and *BRCA2* variants that have been defined as non-pathogenic or pathogenic using family studies, it has been possible to calibrate these assays to cancer risk, define the sensitivity and specificity of the assays, and to classify large numbers of variants [76, 216, 217]. Perhaps as more family-based data are collected and variant classification guidelines proposed by the American College of Medical Genetics (ACMG) [72] are applied, it will be possible to establish non-pathogenic and pathogenic standards and to use functional assays in combination with other data sources to establish the clinical significance of *PALB2* VUS.

Co-immunoprecipitation assays showed that the p.I944N and p.L1070P variants had no influence on the interaction with *BRCA1*, *BRCA2* and *RAD51* in contrast to p.L24S and p.L35P, which has been reported to disrupt the interaction with *BRCA1* and p.A1025R that disrupts the interaction with *BRCA2* [209]. However, direct mammalian two-hybrid assays suggested that all of these variants disrupted interactions between *PALB2* N- and C-terminal domains and the *BRCA1* and *BRCA2* proteins. It is possible that mammalian two-hybrid interactions using partial proteins are more sensitive to changes in interactions surfaces that could be stabilized by other protein-protein interactions in the *in vivo* complex. It is also possible that interactions with other binding partners may be influenced by these variants. A recent study reports the association of *PALB2* with unperturbed chromatin through binding to *MRG15* [169]. In this manner, *PALB2* protects actively replicating genes from genotoxic stress by rapidly localizing to sites of stalled replication forks that require DSB repair. Another recent study describes the regulation of the *PALB2*-*BRCA1* interaction by *KEAP1*-*CUL3*-*RBX1* ligase complex-dependent ubiquitylation of *PALB2* [150]. *PALB2* ubiquitylation suppresses the interaction with *BRCA1*, whereas deubiquitylation by *USP11* promotes the interaction. The specific ubiquitylation sites on *PALB2* are mapped around the p.L24S mutant at K20, K25 and K30 residues within the *BRCA1* interacting domain. As the *PALB2*-*BRCA1* interaction is cell cycle regulated and reported to suppress HR during G1 phase, it remains possible that p.L24S, and the recently reported W31G variant [218], influence ubiquitylation sites and the *BRCA1* interaction in a cell cycle phase-specific manner, while not altering the broader activity of *PALB2*.

The influence of the p.I944N variant on protein half-life may account in part for the impact of this variant on HR activity. However, the impact of the increased stability of the p.L24S and p.L1070P variants on protein function is less clear. It is possible that increased stability of *PALB2* due to these variants results in prolonged retention of *PALB2* at sites of DNA damage and stalled replication forks, delayed clearance of DNA repair intermediates, and subsequent defects in HR repair. While interesting from a mechanistic perspective, studies focused on understanding the possible impact of increased stability on *PALB2* activity and HR repair are beyond the scope of this study. Mis-localization of *PALB2* is likely to have a direct effect on HR repair. Both the p.I944N

and p.L1070P variants cause retention of PALB2 in the cytoplasm, reduced recruitment of PALB2 to laser-induced sites of DNA damage in the nucleus, and reduced formation of DNA damage-induced RAD51 foci. Interestingly, each of the *PALB2* variants failed to rescue sensitivity to olaparib and cisplatin in Palb2 and Trp53 deficient mouse tumor cells. Thus, at least for this small set of *PALB2* variants, defective HR repair is consistent with cisplatin and PARP inhibitor sensitivity. This finding suggests that human tumors containing these variants may also exhibit hypersensitivity to these agents.

In summary, we report on the identification of three new *PALB2* missense variants that are deficient in HR activity. It remains to be determined whether HR deficiency as measured by *in vitro* assays and hypersensitivity to DNA damaging therapeutic agents is predictive of the clinical significance and cancer risks associated with germline versions of these variants. Models linking functional activity to clinical disease will be developed in the future as more functionally defective variants in *PALB2* and additional family-based data showing segregation of variants with cancer are identified.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministère de l'Économie, de la Science et de l'Innovation du Québec through Genome Québec and the Quebec Breast Cancer Foundation (J.-Y.M./J.S.). The project was also supported by a grant from the Ministère de l'Économie, de la Science et de l'Innovation du Québec through the PSR-SIIRI-949 program (J.-Y.M./J.S) and the CIHR (Foundation grant to J.-Y.M). J.S. is a Canada Research Chair in Oncogenetics and J.-Y.M. is a FRQS Chair in genome stability.

2.7 Materials and Method

Cell lines and culture

The U2OS cell line was purchased from ATCC and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and antibiotics. The mouse mammary tumor cell line B400 (Palb2^{-/-};Trp53^{-/-}) was described before (add ref: Huo et al., Cancer Discov, 2013). Cells were grown in DMEM/F-12 media supplemented with 5µg/ml insulin, 5ng/ml EGF, 5ng/ml cholera toxin, 10% FBS and antibiotics. Cell lines were grown at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂.

HR assay

Each variant was introduced into a HA-FLAG-tagged full-length PALB2 cDNA expression in the pOZC plasmid by site-directed mutagenesis using pfu turbo. Variants were verified by Sanger sequencing. Co-transfection of PALB2 expression constructs and the I-SceI expression plasmid into B400/DR-GFP reporter cells was performed at a 5:1 molar ratio using Xtremegene 9 transfection reagent (Roche). At least two independent clones containing each variant were analyzed in duplicate. PALB2 expression and transfection efficiency was verified by western blotting. GFP expressing cells were quantified by fluorescence-activated cell sorting. Fold increases in GFP⁺ cells, which are equivalent to HDR-fold change, were normalized and rescaled relative to a 1:5 ratio derived from the p.Y551X pathogenic variant control and the wild-type PALB2 control.

CRISPR-LMNA HDR assay

U2OS cells were seeded and transfected with siCtrl or PALB2 siRNA using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Twenty-four hours post-transfection, cells were re-transfected with 1 mg of pCR2.1-CloverLMNA donor, 1 mg pX330-LMNAgRNA1, 1 mg of the indicated PALB2 construct, 0.1 g of piRFP670-N1 (used as transfection control) and 200 pmol of siRNA using the 4D-Nucleofector X (Lonza) [215]. After 48 hours, cells were replated on glass coverslips and Clover expression was assayed by fluorescence microscopy. Data represent the mean percentages (\pm SEM) of Clover-positive cells over the iRFP670-positive population from independent experiments performed in triplicates (n > 800 cells per condition).

Mammalian two-hybrid assay

A Gal4 DNA-binding domain (DBD) and BRCA1 wild-type (residues 1315-1863) fusion construct (GAL4DBD-BRCA1) was previously generated [76], whereas a GAL4DBD-BRCA2 wild-type (residues 1-60) [77]. VP16 AD-PALB2 N-terminal wild-type (residues 1-319) and VP16 AD-PALB2 C-terminal wild-type (residues 859-1186) constructs were generated by amplification of the PALB2 coding sequence [76] and cloning into the pVP16 vector (Clontech, Mountain View, CA, USA) downstream of the VP16 activation domain (AD) cassette. PALB2 variants were introduced into the VP16 AD-PALB2 N- or C-terminal wild-type constructs using the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA). All generated constructs were confirmed by sequencing. Mammalian two-hybrid assays were conducted using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA). PALB2 N- or C-terminal constructs (wild-type or variants) were co-transfected into HEK293FT cells with GAL4DBD-BRCA1 or BRCA2 wild-type constructs, the pG5Luc reporter vector, and a pGR-TK internal control and luciferase activity was measured. PALB2-L21A and A1025R variants were used as negative controls [170, 210]. The statistical significance of effects on binding relative to WT-PALB2 was determined using a one-way ANOVA test.

Protein co-immunoprecipitation

Each variant was expressed in HEK293T cells using the HA-FLAG-tagged full-length PALB2 pOZC plasmid. After 48 hours the cells were exposed to 5 Gy ionizing radiation. Cells were lysed in NETN buffer containing 50 mM Tris-HCl, 0.5% NP-40, 5 mM EDTA and 300 mM NaCl after 5 hours. Lysates were incubated overnight at 4°C with anti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma). Beads were washed with NETN buffer and boiled in Lamelli sample and supernatants were separated by SDS-PAGE. Western blotting was performed with antibodies against human BRCA1 (EMD-Millipore), BRCA2 (Couch Lab), HA (Covance), PALB2 (Bethyl) and RAD51 (Cell Signaling).

Protein half-life

HEK293T cells transfected with PALB2 constructs were treated with 40 µg/mL cycloheximide for 0 to 180 minutes. Cells were snap frozen and lysed with NETN buffer containing 50 mM Tris-HCl, 0.5% NP-40, 5 mM EDTA and 300 mM NaCl. Lysates were separated by SDS-PAGE and western blotted using anti-HA (Covance) and tubulin (Sigma) (loading control) antibodies. Images were visualized on an Odyssey Fc system (LiCOR) and quantitated using Image Studio software to determine rates of protein degradation relative to control.

Immunofluorescence

Cyclin A positive HeLa cells treated with siCtrl and siRNA against PALB2 were complemented with wildtype and mutant FLAG-tagged PALB2 expression constructs, exposed to 2 Gy of gamma-IR, incubated for 6 hours, and subjected to immunofluorescence for RAD51 foci. HeLa cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature, washed with TBS, and fixed again with ice-cold methanol for 5 minutes at -20°C. Cells were incubated for 2 hours at room temperature with the 14B4 anti-RAD51 monoclonal antibody (Novus), washed with TBS and incubated for 45 minutes at room temperature with the Alexa Fluor 568 Goat anti-mouse (Life Technologies) secondary antibody. HeLa cells transfected with PALB2 expression constructs were also subjected to immunofluorescence for PALB2 using the monoclonal anti-FLAG M2 antibody (Sigma) and the Alexa Fluor 568 Goat anti-mouse (Life Technologies) secondary antibody.

Viability assay

PALB2 variants were introduced into B400 cells using mCherry-pOZC expression vector and flow cytometry for Cherry-red was performed to select for cells expressing PALB2. Sorted cells were plated in 96-well plates and exposed to increasing amounts of olaparib or cisplatin and incubated for a period of 5 days. Presto Blue (Invitrogen) was added and incubated for 1-2 hours before measuring fluorescence intensity on a Cytation 3 microplate reader (BioTek).

2.8 References

1. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, Hallberg E, Moore R, Thomas A, Lilyquist J, Feng B, McFarland R, Pesaran T, Huether R, LaDuca H, Chao EC, Goldgar DE and Dolinsky JS. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 3(9):1190-1196, 2017. PMC5599323.
2. Lilyquist J, LaDuca H, Polley E, Davis BT, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Dolinsky JS, Couch FJ and Goldgar DE. Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls. *Gynecol Oncol.* 147(2):375-380, 2017. PMC5801741.
3. Hu C, Hart SN, Polley EC, Gnanaolivu R, Shimelis H, Lee KY, Lilyquist J, Na J, Moore R, Antwi SO, Bamlet WR, Chaffee KG, DiCarlo J, Wu Z, Samara R, Kasi PM, McWilliams RR, Petersen GM and Couch FJ. Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. *JAMA.* 319(23):2401-2409, 2018. PMC6092184.
4. Hu C, LaDuca H, Shimelis H, Polley EC, Lilyquist J, Hart SN, Na J, Thomas A, Lee KY, Davis BT, Black MH, Pesaran T, Goldgar DE, Dolinsky JS and Couch FJ. Multigene Hereditary Cancer Panels Reveal High-Risk Pancreatic Cancer Susceptibility Genes. *JCO Precision Oncology.* 2(2):1-28, 2018.
5. Antoniou AC, Foulkes WD, Tischkowitz M and Group PI. Breast cancer risk in women with PALB2 mutations in different populations. *Lancet Oncol.* 16(8):e375-6, 2015.
6. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, Wurm M, Batish SD, Lach FP, Yetgin S, Neitzel H, Ariffin H, Tischkowitz M, Mathew CG, Auerbach AD and Rahman N. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet.* 39(2):162-4, 2007.
7. Casadei S, Norquist BM, Walsh T, Stray S, Mandell JB, Lee MK, Stamatoyannopoulos JA and King MC. Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer. *Cancer Res.* 71(6):2222-9, 2011. PMC3059378.
8. Zhang F, Fan Q, Ren K and Andreassen PR. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res.* 7(7):1110-8, 2009. PMC4928587.
9. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ and Livingston DM. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell.* 22(6):719-29, 2006.

10. Park JY, Singh TR, Nassar N, Zhang F, Freund M, Hanenberg H, Meetei AR and Andreassen PR. Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*. 33(40):4803-12, 2014. PMC3994186.
11. Foo TK, Tischkowitz M, Simhadri S, Boshari T, Zayed N, Burke KA, Berman SH, Blecula P, Riaz N, Huo Y, Ding YC, Neuhausen SL, Weigelt B, Reis-Filho JS, Foulkes WD and Xia B. Compromised BRCA1-PALB2 interaction is associated with breast cancer risk. *Oncogene*. 36(29):4161-4170, 2017. PMC5519427.
12. Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, Guturu H, Stenson PD, Cooper DN, Bernstein JA and Bejerano G. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet*. 48(12):1581-1586, 2016.
13. Anderson D and Lassmann T. A phenotype centric benchmark of variant prioritisation tools. *NPJ Genom Med*. 3:5, 2018. PMC5799157.
14. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, Stanford JL, Isaacs WB, Xu J, Cooney KA, Lange EM, Schleutker J, Carpten JD, Powell IJ, Cussenot O, Cancel-Tassin G, Giles GG, MacInnis RJ, Maier C, Hsieh CL, Wiklund F, Catalona WJ, Foulkes WD, Mandal D, Eeles RA, Kote-Jarai Z, Bustamante CD, Schaid DJ, Hastie T, Ostrander EA, Bailey-Wilson JE, Radivojac P, Thibodeau SN, Whittemore AS and Sieh W. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*. 99(4):877-885, 2016. PMC5065685.
15. Pauty J, Usuba R, Cheng IG, Hespel L, Takahashi H, Kato K, Kobayashi M, Nakajima H, Lee E, Yger F, Soncin F and Matsunaga YT. A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs. *EBioMedicine*. 27:225-236, 2018. PMC5828365.
16. Sy SM, Huen MS and Chen J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(17):7155-60, 2009. PMC2678481.
17. Oliver AW, Swift S, Lord CJ, Ashworth A and Pearl LH. Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep*. 10(9):990-6, 2009. PMC2750052.
18. Guidugli L, Shimelis H, Masica DL, Pankratz VS, Lipton GB, Singh N, Hu C, Monteiro ANA, Lindor NM, Goldgar DE, Karchin R, Iversen ES and Couch FJ. Assessment of the Clinical Relevance of BRCA2 Missense Variants by Functional and Computational Approaches. *Am J Hum Genet*. 2018. PMC5985401.

19. Hart SN, Hoskin T, Shimelis H, Moore RM, Feng B, Thomas A, Lindor NM, Polley EC, Goldgar DE, Iversen E, Monteiro ANA, Suman VJ and Couch FJ. Comprehensive annotation of BRCA1 and BRCA2 missense variants by functionally validated sequence-based computational prediction models. *Genet Med.* 2018.
20. Woods NT, Baskin R, Golubeva V, Jhuraney A, De-Gregoriis G, Vaclova T, Goldgar DE, Couch FJ, Carvalho MA, Iversen ES and Monteiro AN. Functional assays provide a robust tool for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance. *NPJ Genom Med.* 12016. PMC5539989.
21. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL and Committee ALQA. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 17(5):405-24, 2015. PMC4544753.
22. Bleuyard JY, Fournier M, Nakato R, Couturier AM, Katou Y, Ralf C, Hester SS, Dominguez D, Rhodes D, Humphrey TC, Shirahige K and Esashi F. MRG15-mediated tethering of PALB2 to unperturbed chromatin protects active genes from genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(29):7671-7676, 2017. PMC5530651.
23. Orthwein A, Noordermeer SM, Wilson MD, Landry S, Enchev RI, Sherker A, Munro M, Pinder J, Salsman J, Dellaire G, Xia B, Peter M and Durocher D. A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature.* 528(7582):422-6, 2015. PMC4880051.
24. Caleca L, Catucci I, Figlioli G, De Cecco L, Pesaran T, Ward M, Volorio S, Falanga A, Marchetti M, Iascone M, Tondini C, Zambelli A, Azzollini J, Manoukian S, Radice P and Peterlongo P. Two Missense Variants Detected in Breast Cancer Probands Preventing BRCA2-PALB2 Protein Interaction. *Front Oncol.* 8:480, 2018. PMC6210650.

2.9 Figures legends

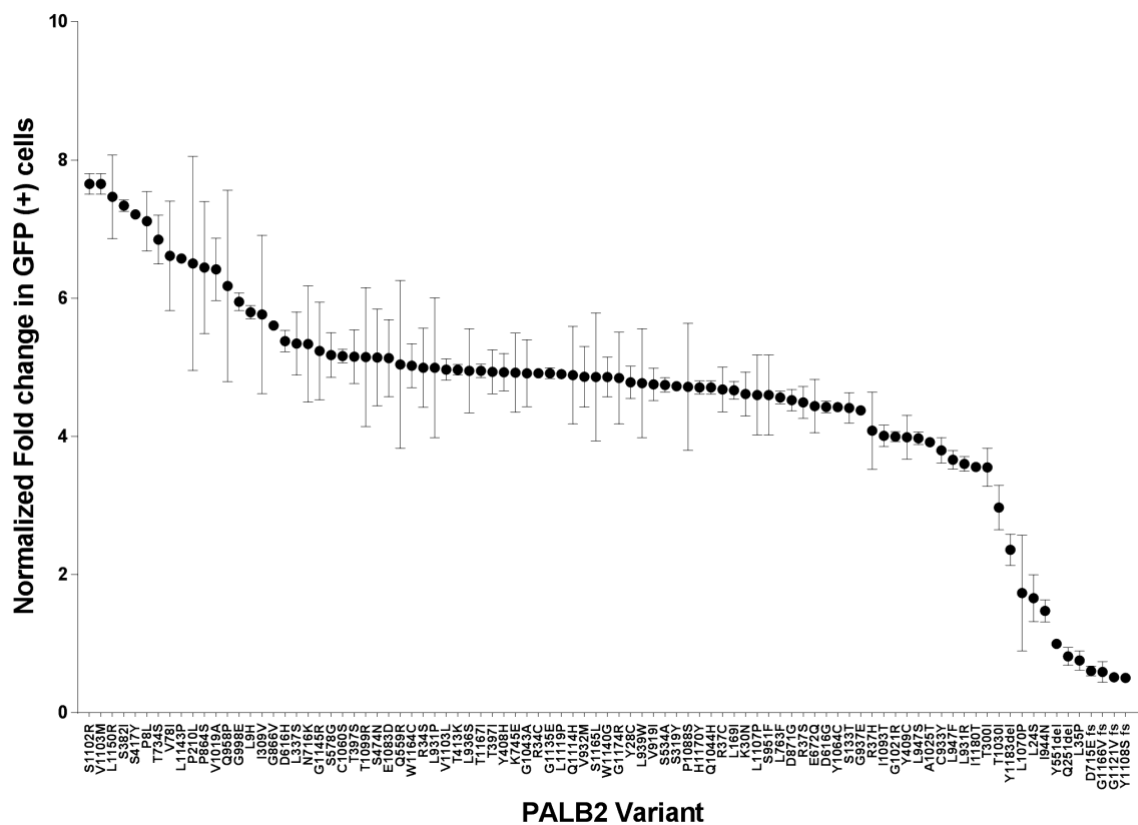


Figure 2.1 – Homology Directed Repair assay of *PALB2* variants.

Plot of all variants assayed in HR repair assay. Results for each independent assay are scaled 1-5 relative to the Y551X negative control and wild-type *PALB2* positive control. Error bars represent the standard error of the mean (SE) of independent replicates.

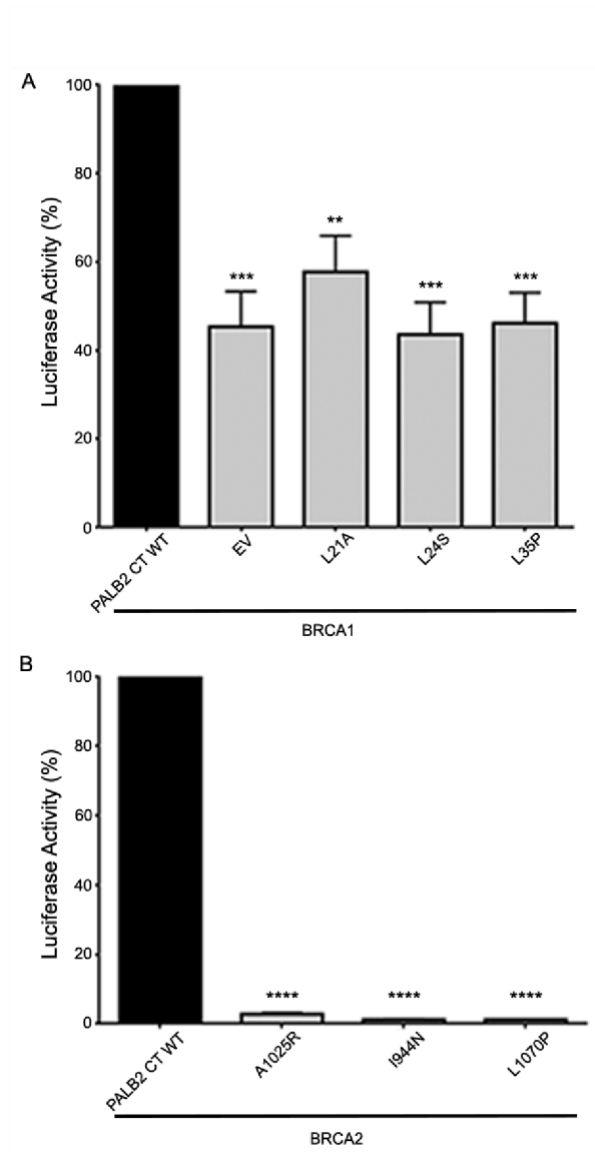


Figure 2.2 – Mammalian two-hybrid based protein-protein interaction.

Interactions of wildtype (WT) and mutated PALB2 N- and C-termini with **(A)** BRCA1 and **(B)** BRCA2. EV (empty vector); error bars represent standard error of the mean (SE); significance was determined applying one-way ANOVA (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ and (****) $p < 0,0001$.

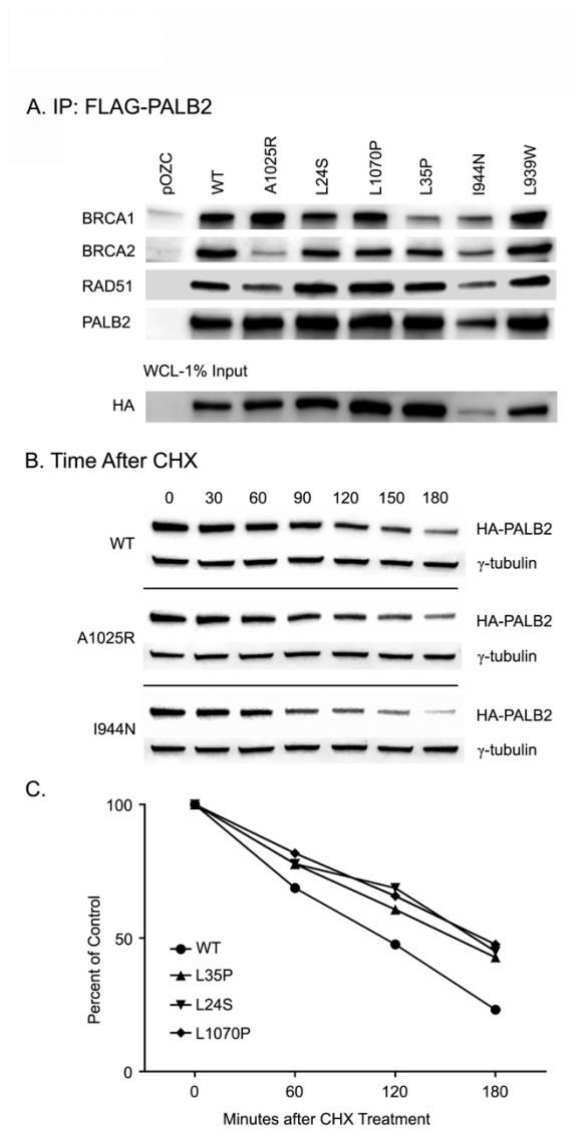


Figure 2.3 – Influence of PALB2 variants on protein complex formation and protein half-life

(A) Western blot analysis of PALB2-interacting proteins after co-immunoprecipitation of FLAG-tagged PALB2 from 293T cells transiently transfected with PALB2 wildtype (WT) and variants. Whole cell lysate (WCL) shows levels of PALB2 expression; **(B)** Western blot analysis of PALB2 protein after indicated periods of incubation in the presence of cyclohexamide to define protein half-life; **(C)** Quantitation of PALB2 protein half-life using Image J at indicated timepoints.

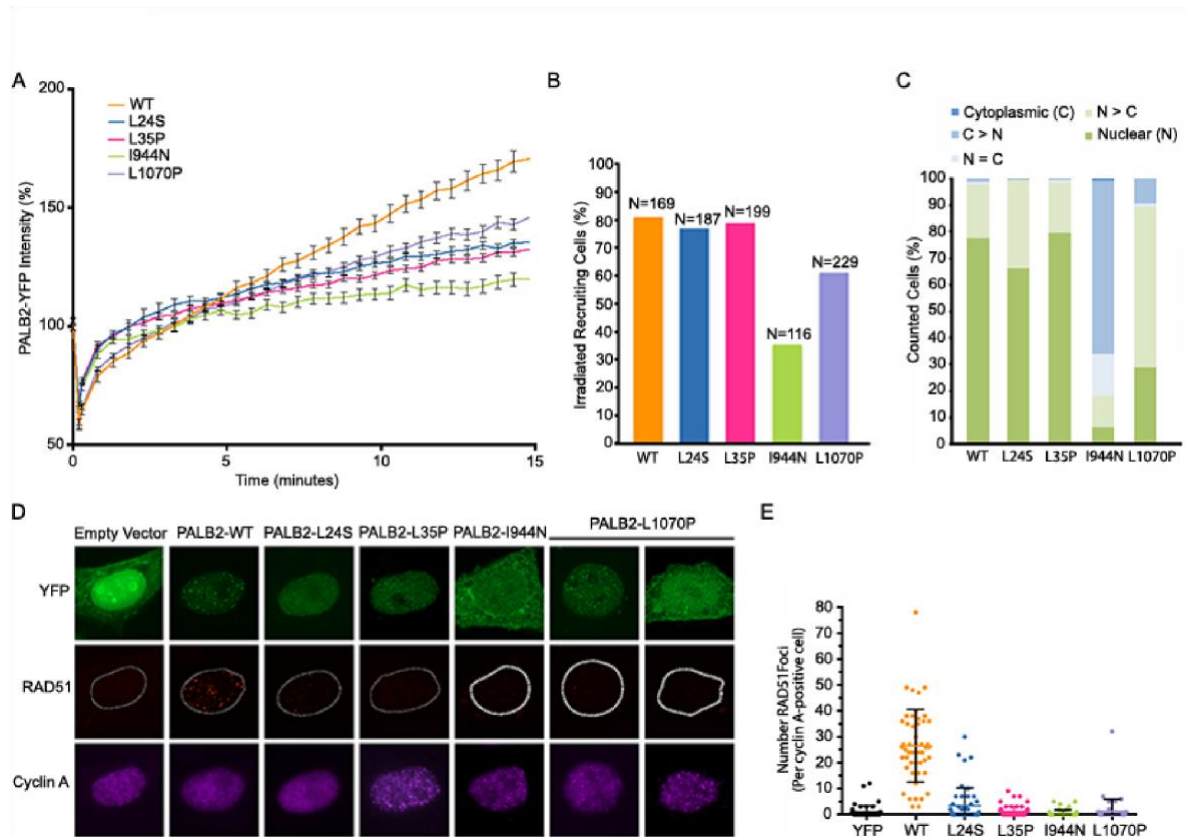


Figure 2.4 – Influence of PALB2 variants on response to DNA damage

(A) Recruitment of full-length YFP-tagged PALB2 (PALB2-YFP) wildtype (WT) and variants to sites of laser-induced double strand breaks (DSBs) at indicated timepoints; (B) Proportion of cells expressing PALB2 WT and variants with localization of PALB2-YFP to DSBs; (C) Nucleo-cytoplasmic distribution of wild-type PALB2-YFP and variants as indicated; (D) Immunofluorescence analysis of PALB2-YFP and RAD51 foci formation in cyclin A positive HeLa cells after exposure to after IR (2 Gy). Cells were treated with PALB2 siRNA cells to deplete endogenous PALB2; (E) Quantitation of RAD51 foci in cyclin A positive cells expressing PALB2-YFP WT and variants. Results are from three independent experiments.

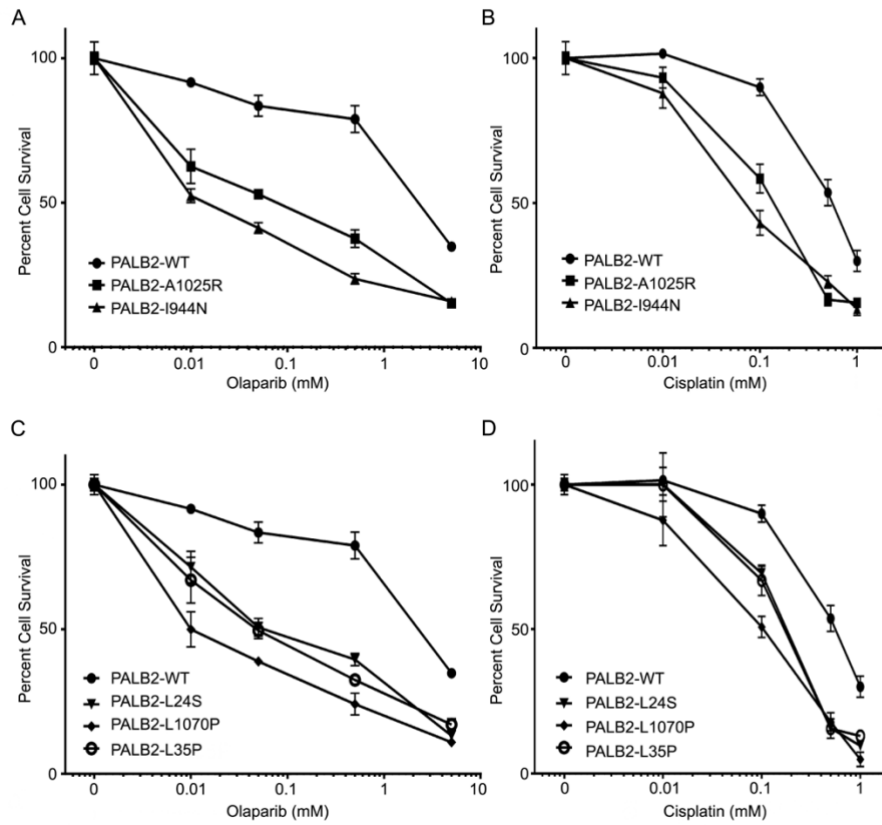


Figure 2.5 – Sensitivity to DNA damaging agents

Survival of B400 cells reconstituted with PALB2 WT and variants following exposure to varying doses of olaparib (A and C), and cisplatin (B and D).

2.10 Supplementary Material

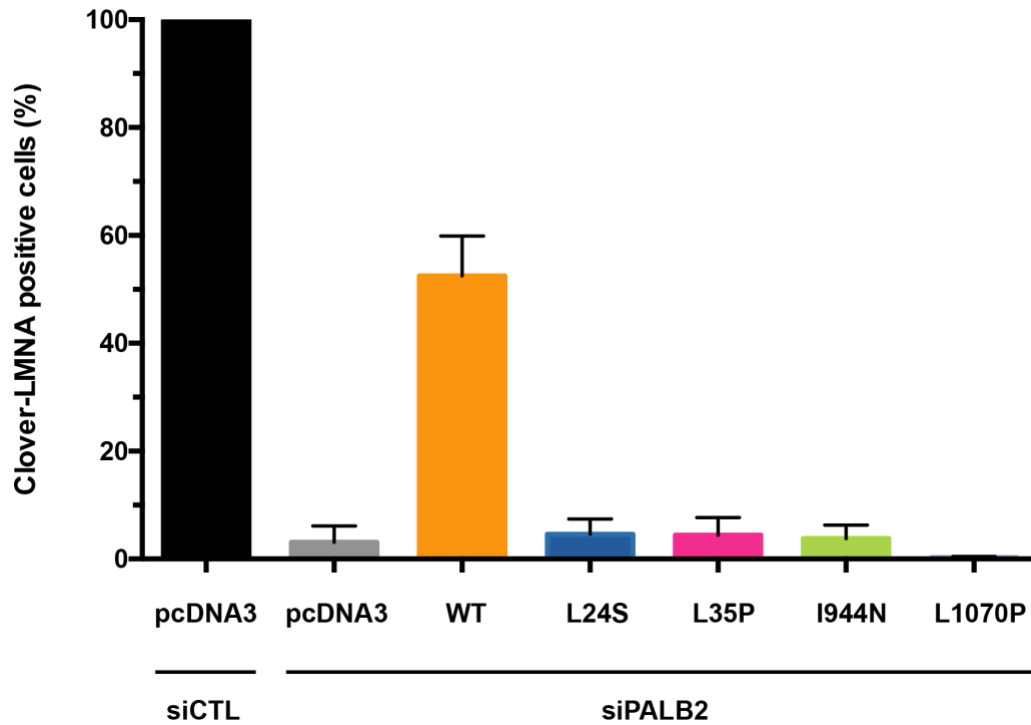


Figure S2.1 – CRISPR-LMNA HRD assay.

Proportion of U2OS cells reconstituted with PALB2 WT and variants displaying clover-LMNA positive signals. Endogenous *PALB2* in U2OS cells was silenced with siRNA (*siPALB2*) and complemented with siRNA resistant mutant constructs.

HGVS cDNA	HGVS protein	1 letter code	HDR fold-change	SE	VEST3*	M-CAP*	REVEL*
c.3306C>G	p.Ser1102Arg	S1102R	7.7	0.15	0.58	0.40	0.45
c.3307G>A	p.Val1103Met	V1103M	7.7	0.15	0.27	0.18	0.19
c.3449T>G	p.Leu1150Arg	L1150R	7.5	0.61	0.71	0.57	0.62
c.1145G>T	p.Ser382Ile	S382I	7.3	0.08	0.39	0.31	0.07
c.1250C>A	p.Ser417Tyr	S417Y	7.2	0.01	0.94	0.57	0.65
c.23C>T	p.Pro8Leu	P8L	7.1	0.43	0.05	0.31	0.16
c.2200A>T	p.Thr734Ser	T734S	6.9	0.35	0.53	0.54	0.46
c.232G>A	p.Val78Ile	V78I	6.6	0.80	0.29	0.35	0.00
c.3428T>C	p.Leu1143Pro	L1143P	6.6	0.05	0.83	0.39	0.56
c.629C>T	p.Pro210Leu	P210L	6.5	1.55	0.21	.	0.28
c.2590C>T	p.Pro864Ser	P864S	6.4	0.96	0.32	0.21	0.18
c.3056T>C	p.Val1019Ala	V1019A	6.4	0.45	0.65	0.58	0.57
c.2873A>C	p.Gln958Pro	Q958P	6.2	1.39	0.84	0.69	0.56
c.2993G>A	p.Gly998Glu	G998E	6.0	0.13	0.44	.	0.61
c.26T>A	p.Leu9His	L9H	5.8	0.10	0.70	0.70	0.45
c.925A>G	p.Ile309Val	I309V	5.8	1.15	0.01	.	0.08
c.2597G>T	p.Gly866Val	G866V	5.6	0.16	0.42	0.65	0.37
c.1846G>C	p.Asp616His	D616H	5.4	0.13	0.62	0.34	0.68
c.1010T>C	p.Leu337Ser	L337S	5.3	0.46	0.50	.	0.11
c.2148T>A	p.Asn716Lys	N716K	5.3	0.84	0.07	0.30	0.06
c.3433G>C	p.Gly1145Arg	G1145R	5.2	0.70	0.86	0.69	0.58
c.1732A>G	p.Ser578Gly	S578G	5.2	0.33	0.03	0.17	0.10
c.3179G>C	p.Cys1060Ser	C1060S	5.2	0.10	0.90	0.51	0.77
c.1189A>T	p.Thr397Ser	T397S	5.2	0.39	0.67	0.55	0.63
c.3296C>G	p.Thr1099Arg	T1099R	5.1	1.00	0.82	0.36	0.51
c.1421G>A	p.Ser474Asn	S474N	5.1	0.70	0.04	0.20	0.03
c.3249G>C	p.Glu1083Asp	E1083D	5.1	0.56	0.35	0.27	0.24
c.1676A>G	p.Gln559Arg	Q559R	5.0	1.21	0.00	.	0.05
c.3492G>T	p.Trp1164Cys	W1164C	5.0	0.32	0.87	0.77	0.74
c.101G>A	p.Arg34His	R34H	5.0	0.58	0.55	0.50	0.38
c.2792T>C	p.Leu931Pro	L931P	5.0	1.01	0.93	0.80	0.77
c.3307G>C	p.Val1103Leu	V1103L	5.0	0.15	0.35	0.22	0.08
c.1238C>A	p.Thr413Lys	T413K	5.0	0.08	0.84	0.62	0.74
c.2807T>C	p.Leu936Ser	L936S	5.0	0.60	0.83	0.62	0.76
c.3500C>T	p.Thr1167Ile	T1167I	4.9	0.10	0.54	0.44	0.37
c.1190C>T	p.Thr397Ile	T397I	4.9	0.32	0.86	0.61	0.73
c.1222T>C	p.Tyr408His	Y408H	4.9	0.27	0.81	0.63	0.68
c.2234A>G	p.Lys745Glu	K745E	4.9	0.57	0.13	0.19	0.02
c.3128G>C	p.Gly1043Ala	G1043A	4.9	0.49	0.73	0.37	0.59
c.100C>T	p.Arg34Cys	R34C	4.9	0.04	0.63	0.49	0.48
c.3404G>A	p.Gly1135Glu	G1135E	4.9	0.08	0.93	0.79	0.76
c.3356T>C	p.Leu1119Pro	L1119P	4.9	0.01	0.88	0.81	0.76
c.3342G>C	p.Glu1114His	Q1114H	4.9	0.71	0.25	0.16	0.20
c.2794G>A	p.Val932Met	V932M	4.9	0.44	0.57	.	0.36
c.3494C>T	p.Ser1165Leu	S1165L	4.9	0.93	0.84	0.74	0.69
c.3418T>G	p.Trp1140Gly	W1140G	4.9	0.29	0.86	0.82	0.82
c.3520G>A	p.Gly1174Arg	G1174R	4.8	0.67	0.92	0.71	0.74
c.83A>G	p.Tyr28Cys	Y28C	4.8	0.24	.	.	.

c.2816T>G	p.Leu939Trp	L939W	4.8	0.79	0.91	0.68	0.68
c.2755G>A	p.Val919Ile	V919I	4.8	0.23	0.23	0.29	0.19
c.1600T>G	p.Ser534Ala	S534A	4.7	0.11	0.11	0.36	0.04
c.956C>A	p.Ser319Tyr	S319Y	4.7	0.06	0.22	0.41	0.11
c.3262C>T	p.Pro1088Ser	P1088S	4.7	0.92	0.69	0.25	0.55
c.3508C>T	p.His1170Tyr	H1170Y	4.7	0.10	0.41	0.16	0.36
c.3132A>C	p.Gln1044His	Q1044H	4.7	0.10	0.68	0.54	0.53
c.109C>T	p.Arg37Cys	R37C	4.7	0.32	0.72	.	0.60
c.505C>A	p.Leu169Ile	L169I	4.7	0.13	0.28	0.44	0.19
c.90G>T	p.Lys30Asn	K30N	4.6	0.32	0.29	0.43	0.26
c.3320T>C	p.Leu1107Pro	L1107P	4.6	0.57	0.52	0.22	0.24
c.2852C>T	p.Ser951Phe	S951F	4.6	0.57	0.38	0.61	0.25
c.2289G>C	p.Leu763Phe	L763F	4.6	0.09	0.19	0.52	0.22
c.2612A>G	p.Asp871Gly	D871G	4.5	0.16	0.76	0.64	0.80
c.109C>A	p.Arg37Ser	R37S	4.5	0.23	0.84	.	0.48
c.2014G>C	p.Glu672Gln	E672Q	4.4	0.39	0.04	.	0.07
c.1847A>G	p.Asp616Gly	D616G	4.4	0.09	0.55	0.56	0.61
c.3191A>G	p.Tyr1064Cys	Y1064C	4.4	0.02	0.81	0.67	0.75
c.398C>G	p.Ser133Thr	S133T	4.4	0.21	0.02	0.39	0.24
c.2810G>A	p.Gly937Glu	G937E	4.4	0.02	0.82	0.63	0.73
c.110G>A	p.Arg37His	R37H	4.1	0.56	0.66	0.59	0.42
c.3278T>C	p.Ile1093Thr	I1093T	4.0	0.16	0.78	0.48	0.52
c.3061G>A	p.Gly1021Arg	G1021R	4.0	0.07	0.83	0.68	0.76
c.1226A>G	p.Tyr409Cys	Y409C	4.0	0.32	0.89	0.61	0.75
c.2840T>C	p.Leu947Ser	L947S	4.0	0.10	0.84	0.75	0.70
c.3073G>A	p.Ala1025Thr	A1025T	3.9	0.04	0.50	0.43	0.36
c.2798G>A	p.Cys933Tyr	C933Y	3.8	0.18	0.91	0.69	0.77
c.2841G>T	p.Leu947Phe	L947F	3.7	0.13	0.72	0.70	0.66
c.2792T>G	p.Leu931Arg	L931R	3.6	0.11	0.90	0.69	0.83
c.3539T>C	p.Ile1180Thr	I1180T	3.6	0.01	0.84	0.60	0.66
c.899C>T	p.Thr300Ile	T300I	3.6	0.28	0.08	0.29	0.15
c.3089C>T	p.Thr1030Ile	T1030I	3.0	0.32	0.80	0.68	0.74
c.3549C>A	p.Tyr1183Ter	Y1183X	2.4	0.22	.	.	.
c.3209T>C	p.Leu1070Pro	L1070P	1.7	0.84	0.95	0.81	0.76
c.71T>C	p.Leu24Ser	L24S	1.7	0.34	0.78	0.75	0.43
c.2831T>A	p.Ile944Asn	I944N	1.5	0.16	0.74	0.75	0.75
c.1653T>A	p.Tyr551ter	Y551X	1.0	0.00	.	.	.
c.751C>T	p.Gln251Ter	Q251X	0.8	0.13	.	.	.
c.104T>C	p.Leu35Pro	L35P	0.8	0.14	0.88	0.77	0.68
c.2145_2146delT	p.Asp715Glu fs*2	D715E fs	0.6	0.07	.	.	.
c.3497delG	p.Gly1166Val fs*25	G1166V fs	0.6	0.15	.	.	.
c.3362delG	p.Gly1121Val fs*3	G1121V fs	0.5	0.05	.	.	.
c.3323delA	p.Tyr1108Ser fs*16	Y1108S fs	0.5	0.03	.	.	.

Table S2.1 – Homology directed repair activity and predicted deleterious effects of 84 PALB2 VUSs
HGVS: human genome variation society; HDR: homology directed repair; SE: standard error of the mean; * rank score predicted probability of deleterious effects on protein activity; HDR fold change scaled 1 to 5 relative to Y551X and wild type PALB2.

3 CHAPITRE 3 – A global functional analysis of missense mutations reveals two major hotspots in the PALB2 tumor suppressor

Amélie Rodrigue,^{1,2} Guillaume Margailan,³ Thiago Torres Gomes,⁴ Yan Coulombe,^{1,2} Mandy Ducy,^{1,2,3} Simone da Costa e Silva Carvalho,^{1,4,6} Giuliana De-Gregoriis,^{4,5} Larissa Milano de Souza,^{1,2} Graham Delleire,⁷ Wilson Araújo da Silva Junior,⁶ Alvaro Monteiro,⁸ Marcelo Carvalho,^{4,5,*} Jacques Simard,^{3,*} and Jean-Yves Masson^{1,2,*}.

¹CHU de Québec-Université Laval, Oncology Division, 9 McMahon, Québec City, QC, G1R 3S3, Canada.

²Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology; Laval University Cancer Research Center, Québec City, QC, G1V 0A6, Canada.

³CHU de Québec-Université Laval, Endocrinology and Nephrology Division, 2705 Bld Laurier, Québec City, QC, G1V 4G2, Canada.

⁴Instituto Nacional de Câncer, Centro de Pesquisa, Programa de Pesquisa Clínica, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Instituto Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Genética Molecular, Maracanã, Rio de Janeiro, Brazil.

⁶Department of Genetics of the Ribeirão Preto Medical School and Center for Medical Genomics - HCFMRP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

⁷Department of Pathology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada.

⁸H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, Tampa, Florida, USA.

*To whom correspondence should be addressed: marcelo.carvalho@ifrj.edu.br, jacques.simard@crchudequebec.ulaval.ca; tel. +1-418-652-2264, or Jean-Yves.Masson@crchudequebec.ulaval.ca; tel. +1-418-525-4444 ext 15154.

3.1 Avant-propos

Au cours de mon doctorat, nous avons collaboré avec les Dr Monteiro et Dr Carvalho, afin de réunir nos expertises complémentaires pour la caractérisation exhaustive des variations faux sens de signification indéterminée localisées dans *PALB2*.

Les résultats obtenus lors de cette collaboration font l'objet d'un manuscrit soumis en Mars 2019. J'ai réalisé les expériences de localisation cellulaire et de recrutement des variants de *PALB2* ainsi que les figures et l'interprétation des résultats correspondants (**Figure 3.3**). Enfin, j'ai participé à la correction du manuscrit.

3.2 Résumé

PALB2 stimule la réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue (RH). Les mutations bi-alléliques de *PALB2* causent l'anémie de Fanconi, alors que les mutations mono-alléliques prédisposent aux cancers du sein et du pancréas. La pertinence fonctionnelle et clinique de nombreuses variations faux sens de *PALB2* restent néanmoins incomprises. Nous avons donc étudié l'effet de 46 variants de signification incertaine de *PALB2* sur sa fonction. Notre étude révèle 2 points chauds mutationnels en C- et N-terminal de la protéine. Les variants p.P8L, p.Y28C et p.R37H compromettent la RH médiée par PALB2. Les variants p.T1030I et p.W1140G génèrent entre autres une sensibilité aux inhibiteurs de PARP, une accumulation cytoplasmique, ainsi que des défauts de RH. Ensemble, nos résultats montrent que la caractérisation fonctionnelle est nécessaire pour évaluer l'impact des variants faux sens sur la fonction de PALB2 et guider ainsi la prise de décision adéquate quant à leur pathogénicité.

3.3 Abstract

While biallelic mutations in the *PALB2* tumor suppressor cause Fanconi anemia subtype FA-N, monoallelic mutations predispose to breast and familial pancreatic cancer. Although hundreds of missense variants in *PALB2* have been identified in patients to date, only a few have clear functional and clinical relevance. Herein, we investigate the effects of 44 *PALB2* variants of uncertain significance found in breast cancer patients and provide detailed analysis by systematic functional assays. Our comprehensive functional analysis reveals two hotspots for potentially deleterious variations within *PALB2*, one at each terminus. *PALB2* N-terminus variants p.P8L [c.23C>T], p.Y28C [c.83A>G], and p.R37H [c.110G>A], compromised *PALB2*-mediated homologous recombination. At the C-terminus, *PALB2* variants p.L947F [c.2841G>C], p.L947S [c.2840T>C], and most strikingly p.T1030I [c.3089C>T] and p.W1140G [c.3418T>C], stood out with pronounced PARP inhibitor sensitivity and cytoplasmic accumulation in addition to marked defects in recruitment to DNA damage sites, interaction with BRCA2 and homologous recombination. Altogether, our findings show that a combination of functional assays is necessary to assess the impact of germline missense variants on *PALB2* function, in order to guide proper classification of their deleteriousness.

3.4 Introduction

PALB2 (partner and localizer of BRCA2) is a crucial and versatile contributor to genome integrity maintenance and tumorigenesis suppression. While germline biallelic mutations in *PALB2* give rise to Fanconi anemia subtype FA-N [81, 95], monoallelic mutations predispose to breast and familial pancreatic cancer [89, 116, 219, 220]. First identified as a binding partner and localizer of the breast cancer protein BRCA2 [77], PALB2 came to be known commonly as an essential player in the repair of DNA double-strand breaks (DSBs) by homologous recombination (HR). HR is a high-fidelity pathway that prevails in the S/G2 phase of the cell cycle, when an intact sister chromatid is available as template for error-free DSB repair. HR deficiency forces cells to rely on mutagenic DSB repair pathways for survival, leading to genomic instability and tumorigenesis [221-223]. During HR, PALB2 acts as an essential bridge between BRCA1 and BRCA2 [208, 210, 224] that promotes the recruitment of the RAD51 recombinase to DNA damage sites and its assembly into nucleofilaments to initiate DSB repair [79, 173]. Similar to what has been described for BRCA2, loss of functional PALB2 is synthetic lethal with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors, an innovative class of anti-cancer drugs [79, 180, 181, 225-227]. Although its entire spectrum of activities has yet to be discovered, PALB2 has been also linked to recombination-dependent DNA synthesis at blocked replication forks [228], cellular redox homeostasis regulation [161] and protection of active genes during DNA replication [169] via interaction with polymerase (Pol η), KEAP1 and MRG15, respectively.

Structurally, PALB2 is a 1186-amino acid protein (130 kDa), encoded by a gene located on chromosome 16p12 and consisting of 13 exons [77], that presents various protein domains. Regulation of PALB2 functions in HR has been shown to involve several of these protein domains as well as modifications, including self-interaction, phosphorylation, and ubiquitylation, and is cell cycle-dependent [220, 229]. In its amino-terminal region, PALB2 bears a coiled-coil domain (aa 9–44), which mediates its oligomerization [154, 155] and interaction with BRCA1 [208, 210, 224]. Upon damage, PALB2 is thought to switch from a low activity oligomer to a complex composed of BRCA1 and BRCA2 [154]. The interaction with BRCA1 is regulated by phosphorylation events involving ATM/ATR and CDKs [230] and promotes the accumulation of PALB2 to DNA damage sites, which in turn facilitates the recruitment of BRCA2 and RAD51 to promote HR [208, 224] in S/G2 phases. The PALB2-BRCA1 interaction is disrupted by KEAP1-dependent ubiquitylation of PALB2 in G1 to avoid the deleterious outcomes of untimely HR [150]. PALB2 N-terminal region also provides a site for interaction with KEAP1 [161] and the RAD51 recombinase [79, 173].

PALB2 C-terminal presents a WD40 domain (aa 859-1186) that folds into a seven-bladed β -propeller structure and supports binding to BRCA2 [77, 170], RAD51 [79, 173], RAD51C [231], RNF168 [152], and Pol η [228]. This structure is of great importance for PALB2 stability, as loss of the last four codons by the

Y1183X mutation is sufficient to leave the protein incompletely folded and vulnerable to degradation [81, 170]. Furthermore, PALB2 WD40 domain hides a nuclear export signal (NES), buried within the propeller structure (aa 928-947), that can be exposed by cancer-associated truncations, as W1038X, resulting in protein mislocalization to the cytoplasm and faulty functions that could drive to genetic instability [175]. In the center of the protein lies an evolutionarily conserved chromatin-association motif (ChAM) (aa 395-446) shown to mediate PALB2 chromatin association and DNA repair function [163] and a MRG15-binding domain (aa 611-737) involved in tethering PALB2 to damage and undamaged chromatin [164, 169, 232].

To date, most pathogenic *PALB2* mutations reported in breast cancer (BC) patients are truncating mutations distributed throughout its coding region [233] [234]. Loss of the entire WD40 domain or only part of it leads to particularly severe HR deficiency [84, 86, 95, 175]. Unsurprisingly, *PALB2* truncating mutations have been tied to increased risks of developing the disease with lifetime risks of breast cancer of 24% to 54%, depending on family history of breast cancer [206]. With the advent of genetic testing in clinical settings, a large number of sequence alterations in *PALB2*, mostly missense variations, have been uncovered. Among these missense variants, only a few have been fully or even partially characterized. Whether or not these missense variants are associated with increased BC risks and HR deficit remains, however, unknown for the most part, posing a challenge for genetic counselling. Recently, coiled-coil domain variants p.Y28C and p.L35P have been shown to weaken PALB2 self-interaction and abrogate PALB2-BRCA1 interaction [209]. While p.L35P demonstrates complete HR impairment, loss of RAD51 foci formation and sensitivity to PARP inhibitor (PARPi) olaparib, p.Y28C shows an intermediate phenotype, with a 65% reduction in HR activity. HR activity was decreased ~20% for p.K18R and p.R37H variants while being unaffected for p.K30N [209]. The p.L939W, p.T1030I, and p.L1143P missense variants of PALB2 WD40 domain have been associated with altered binding patterns to RAD51C, RAD51 and BRCA2 [231]. While p.T1030I was found unstable and most likely to be degraded, the p.L939W and p.L1143P mutants displayed a slight decrease in HR. This latter result regarding p.L939W was, however, not corroborated in a more recent study [235]. More recently, two missense variants in either *BRCA2* (p.W31G) or *PALB2* (p.P1088S) were suggested to be pathogenic based on the abrogation of BRCA2-PALB2 interaction [218]. Nevertheless, p.L35P remains the sole missense variant in *PALB2* truly considered deleterious so far.

Here, we sought to establish the landscape of HR functionality and vulnerabilities to PARP inhibitors of a list of selected missense variants in *PALB2* found in BC patients. Our results demonstrate that there are two major hotspots for missense mutations affecting PALB2; one in the N-terminus and the other in the C-terminus. Moreover, the systematic functional assays presented will aid in variant assessment and its associated clinical and therapeutic management.

3.5 Results

3.5.1 A systematic approach to identify variants with deleterious effects on PALB2 functions

In order to gain a better understanding regarding the pathogenicity of variants of uncertain significance (VUS) in the *PALB2* tumor suppressor gene, a global functional analysis of variants was undertaken. To this end, 44 missense variants found in breast cancer patients were identified in the ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) and/or selected by literature curation based on their frequency of description or amino acid substitution position in the protein (**Table S3.1**). The list was comprised mostly of variants listed as either conflicting or of unknown significance in the Clinvar database and additionally included the p.L35P variant, for which pathogenicity has been demonstrated recently [209]. When submitted to *in silico* analysis using classical prediction tools (PolyPhen-2 [236] and Align GVGD [237]), 75% of the variants presented at least one score that predicted a potentially damaging effect on the protein function (**Table S3.1**), which reinforced the need for the functional characterization of all 44 *PALB2* missense variants. Three additional and more recent *in silico* prediction algorithms, VEST 3.0 [238] and the meta-predictors M-CAP [211] and REVEL [213], were used for further correlation with the functional assays (**Table S3.2**).

To gain further functionality insights, we applied the complete set of *PALB2* missense variants to a PARP inhibitor sensitivity assay in human cells, taking advantage the synthetic lethal relationship between loss of *PALB2* function and PARP inhibition. In this assay, HeLa cells depleted in *PALB2* by siRNA-mediated RNA interference were complemented with exogenous expression of YFP-*PALB2* wild-type (WT) or variants (**Fig 3.1A**) and assayed for olaparib sensitivity as depicted in **Fig 3.1B**. Consistent with previous findings, HR-deficient *PALB2*-knockdown cells showed marked vulnerability to olaparib due to synthetic lethality and complementation with *PALB2*-WT restored sensitivity to endogenous level (**Fig 3.1C**). Failure to do so by the *PALB2* p.L35P [c.104T>C] pathogenic missense variant corroborated previous observations [209] (**Fig 3.1C**). Although the vast majority of variants were nearly equivalent to the WT condition, in terms of ability to rescue the viability of *PALB2*-knockdown cells, the p.T1030I [c.3089C>T] and p.W1140G [c.3418T>C] variants stood out with the highest olaparib sensitivity (**Fig 3.1C**), with a percent survival of 58% and 64% relative to the WT at a dose of 2.5 μ M, respectively (**Fig 3.1D**). Under these conditions, the relative survival for the empty vector or p.L35P control was just below 50%. Moderate but statistically significant PARPi sensitivity was observed for 7 other variants, i.e. p.H46Y [c.136C>T], p.P8L [c.23C>T], p.L947F [c.2841G>C], p.K18R [c.53A>G], p.L947S [c.2840T>C], p.L1119P [c.3356T>C], and p.R37H [c.110G>A], providing evidence in favor of a possible functional defect (**Fig 3.1D** and Supplemental **Fig S3.1**). Survival curves for variants showing near WT-level resistance are depicted in Supplemental **Fig S3.2**).

3.5.2 Functional validation of *PALB2* variants by a two-hybrid assay

Interestingly, the variations associated with the highest sensitivity to olaparib fell either in/near the N-terminal coiled-coil domain or the C-terminal WD40 domain of *PALB2* (**Fig 3.2A**), while variants outside these regions showed near WT levels of resistance to PARPi. The N-terminus of *PALB2* interacts with BRCA1 while the WD40 domain has been shown to contain the BRCA2 binding site [220]. Based on this, we tested the ability of *PALB2* VUS to interact with BRCA1 or BRCA2 in a mammalian two-hybrid assay. HEK293FT cells were co-transfected with VP16 AD-*PALB2* N-terminal (WT or variants) and GAL4 DBD-BRCA1 or VP16 AD-*PALB2* C-terminal (WT or variants) and GAL4 DBD-BRCA2 (**Fig 3.2B**). Specifically, 21 *PALB2* variants located in its N-terminus were tested for interaction with BRCA1 and 24 variants in *PALB2* C-terminus were analyzed for BRCA2 binding (**Fig 3.2A, C-D**). The BRCA1-binding mutant p.L21A and the BRCA2-binding mutant p.A1025R were added in the analysis as negative controls [170, 210]. As shown in **Fig 3C**, the interaction between *PALB2* WT and BRCA1 increases the luciferase-reporter activity by two-fold when compared with BRCA1 intrinsic activity alone. In the coiled-coil region, the p.L35P variant showed a reduction in BRCA1 interaction similar to the negative control (p.L21A). The p.Y28C [c.83A>G] variant also presented impaired BRCA1 binding capacity, corroborating Foo et al previous data [209]. Interestingly, two variants (p.L169I [c.505C>A] and p.S319Y [c.956C>A]) located outside the coiled-coil domain (BRCA1 minimal interaction region (Sy et al., 2009; Zhang et al., 2009) also showed reduced activity. Other variants in the N-terminal behaved similar to the WT control or presented a lesser, statistically nonsignificant reduction.

Regarding BRCA2 interaction analysis, the p.L947S, p.L947F, p.T1030I, p.G1043A [c.3128G>C], p.L1119P and p.W1140G variants located in the WD40 domain (C-terminal) showed a substantial reduction when compared with WT control activity (**Fig 3.2D**). Whereas p.G1043A sustains almost 50% of BRCA2 interaction activity, p.L947S, p.L947F, p.L1119P, and p.W1140G exhibit approximately 25% of WT behavior. Likewise, the p.T1030I variant, which was previously reported to be an unstable variant [231], also displayed a non-interaction phenotype. The remaining variants in the C-terminal presented a WT-like behavior or a moderate reduction in activity, but not statistically significant. Immunoblotting analysis confirmed the ectopic protein production of all 44 *PALB2* missense variants (Supplemental **Fig S3.3**).

3.5.3 Prioritization of variants and *in silico* prediction analysis

Based on PARPi sensitivity and *PALB2*-BRCA1/2 interaction data, we prioritized a smaller set of *PALB2* variants, i.e p.P8L, p.K18R, p.Y28C, p.R37H, p.H46Y, p.L947S, p.L947F, p.T1030I, p.G1043A, p.L1119P, and p.W1140G (**Fig 3.2A**), for further functional assessment. All these selected missenses variants were also predicted to be damaging by at least one *in silico* algorithm, except for p.P8L, which was scored as benign or neutral but had shown a significant PARPi sensitivity in our assay. Variants p.K18R, p.Y28C, p.R37H, p.H46Y,

p.L947F, p.L947S, and p.G1043A received divergent pathogenicity predictions, whereas p.L1119P and p.W1140G were assigned the highest probability of being pathogenic (**Table S3.1** and **S3.2**). With a profile of olaparib sensitivity similar to PALB2 WT, p.I1093T [c.3278T>C], was carried along as a WD40-domain representative with likely intact HR functions, even though PolyPhen-2 and VEST 3.0 predicted this variant to be probably damaging. The p.L35P variant, whose interaction with BRCA1 is impaired, was included as a positive control for HR deficiency. The p.T1030I variant, previously known to be unstable and to abrogate PALB2 association with RAD51 and RAD51C, was expected to behave as another control for HR impairment [231].

At the molecular level, some of these variants introduced a considerable change in amino acid size (Supplemental **Fig S3.4**). For an overview of the predicted structural impact of the prioritized VUS, we took advantage of the online HOPE server (<http://www.cmbi.umcn.nl/hope/>), designed for automatic mutant analysis and which collects data from multiple sources including the protein 3D-structure and the UniProt database of well-annotated protein sequences. In addition to a change in size, some variants were found to induce a change in hydrophobicity or charge. Namely, the p.Y28C and p.H46Y variants introduce a more hydrophobic residue that can cause loss of hydrogen bonds, disturb correct folding and/or loss of interactions. The arginine to histidine substitution seen with the p.R37H variant changes the residue charge from positive to neutral, which can also cause loss of interactions with other molecules or residues. In the case of the L35P variant, the replacement of a leucine by a proline is predicted to act as α -helix breaker that severely impacts on the protein structure. Of particular use, HOPE provided images of the 3D structure of PALB2 WD40 domain. At position 947, replacing a leucine with a smaller serine residue can cause an empty space in the core of the protein with loss of hydrophobic interactions while a bulky phenylalanine risks not to fit in the protein core. The G1043A variants causes the loss of the flexibility conferred by the glycine residue, a property important to allow torsion angles and maintain the proper protein local structure. Replacement of isoleucine by threonine at residue 1093 can cause an empty space in the core of the protein with loss of hydrophobic interactions. The p.L1119P is associated to potential loss of external interactions due to the smaller size of the introduced proline compared to leucine. Finally, major structural changes that could significantly impact on PALB2 interaction and function are reported for the p.T1030I and W1140G variants. The p.T1030I variant introduces a residue that is bigger and more hydrophobic than the wild type, which is susceptible to disrupt the native hydrogen bond formed with the glutamic acid at position 1011. In line with previous reports on p.T1030I stability, HOPE predicts the threonine to isoleucine substitution to cause an overall destabilization of the protein as a result of incorrect folding. For its part, the mutation of a tryptophan into a smaller and more hydrophobic glycine at position 1140 is predicted to create an empty space in the core of the protein, provide unwanted flexibility and disrupt the native hydrogen bond formed with a cysteine at position 1109.

3.5.4 PALB2 cellular localization and recruitment kinetics

The correlation between the above results and HR functionality for the variants of interest was next explored using complementary functional characterization assays. To begin, the cellular localization of ectopically expressed YFP-PALB2, WT or variants, was assessed in HeLa cells. While p.P8L, p.K18R, p.Y28C, p.L35P, p.R37H, p.H46Y, p.G1043A and p.I1093T appeared almost strictly nuclear, as the WT, we observed moderate cytoplasmic accumulation of p.L947F, p.L947S, p.L1119P, p.W1140G, and a very substantial one for p.T1030I (**Fig 3.3A**). It is likely that this mislocalization of PALB2 occurs as a result of an unmasking of the NES caused by the latter variations, as suggested for other WD40-domain mutants [175].

We next proceeded to monitor the recruitment of YFP-PALB2 to laser-induced DNA damage sites by live cell imaging (**Fig 3.3B**). To do this, we microirradiated populations of nuclei with YFP-PALB2 expression and quantified fluorescence accumulation at the damage sites with respect to time. Recruitment kinetics analysis of the N-terminus variants, all strictly nuclear, revealed recruitment defects for variant p.Y28C and p.L35P (**Fig 3.3C**). At 15 minutes post-irradiation (900 seconds time-point), p.Y28C accumulation at the microirradiated site reached 75% of that of WT, which was intermediate compared to the 40% accumulation seen for p.L35P. For the p.P8L and p.R37H variants, recruitment was quite comparable to WT, whereas p.K18R and p.H46Y showed enhanced assembly. In C-terminus, p.T1030I, the variant exhibiting the most striking mislocalization, had also the most severe recruitment defect. Its accumulation had only reached 47% of WT level at 15 min, while that of p.L947S, p.L947F, p.G1043A, p.L1119P and p.W1140G attained between 60-65% approximately. While the recruitments defects seen in PALB2 C-terminus variants could be attributed to nuclear exclusion, defects observed for the nuclear, N-terminus variants p.Y28C and p.L35P might result from a loss of interaction, most likely with BRCA1 or PALB2 itself.

3.5.5 RAD51 foci formation and CRISPR-LMNA HDR assays

For a more direct readout of HR competency, we pursued our functional analysis using RAD51 foci formation and CRISPR-LMNA (Lamin A/C) HDR (homology-directed repair) assays. As for PARPi sensitivity assays, these were carried out by exogenous expression of WT or variant YFP-PALB2, in a background of endogenous *PALB2* depletion by siRNA-mediated RNA interference (**Fig 3.1A** and **3.4.6A**). Ectopic protein production of *PALB2* missense variants was confirmed by immunoblotting analysis (Supplemental **Fig S3.5**). RAD51 foci formation was quantified following treatment with 2 Gy of ionizing radiation in S/G2-synchronized cells (cyclin A-positive cells). As expected, a dramatic decrease of over 95% in the mean number of RAD51 foci was observed for the YFP-empty vector and p.L35P. Except for the p.K18R, p.H46Y, and p.I1093T variants, whose number of RAD51 foci was close to WT, the other variants tested showed varying levels of reduction, ranging from 59% for p.T1030I to 12% for p.L1119P (**Fig 3.4**). For most of these latter variants, the RAD51 foci

that remained were also weaker in intensity (**Fig 3.5A and 3.B**). Unlike the others, however, p.L1119P exhibited larger and brighter RAD51 foci compared to the WT, pointing to a possible defect in RAD51 foci disassembly. Importantly, our results showed a positive correlation between the mean number of RAD51 foci per cell and resistance to olaparib. This correlation appeared stronger in the case of the variants located in the region of the WD40 domain ($R^2=0.86$) than the coiled-coil domain ($R^2=0.71$) (**Fig 3.5C** and Supplemental **Fig S3.6**).

Lastly, HR functionality was investigated in U2OS cells, using a modified version of the previously described CRISPR-LMNA HDR assay [239] that generates a red fluorescent mRuby2-Lamin A/C fusion upon successful HR (**Fig 3.6A and 3B**). Under these settings, the YFP-empty vector and p.L35P negative controls reduced HR activity ~95% relative to the WT condition (**Fig 3.6C**). Again, p.T1030I and p.W1140G showed substantial incapacity to promote HR, retaining only 23.6% and 34.0% of HR activity respectively, followed by p.Y28C and p.R37H whose activities were under 40% as well. Other variants showed more intermediate phenotypes, ranging from 41.0% to 69.6% of HR activity while p.I1093T was HR proficient. Consistent with RAD51 foci being a marker of functional homologous recombination, we found a robust correlation between HDR activity and RAD51 foci formation ($R^2=0.79$ and 0.91 for variants of the WD40 and coiled-coil domain, respectively), no matter the domain involved (**Fig 3.6D** and Supplemental **Fig S3.6**). These data also underscored the importance of the coiled-coil and the WD40 domains for PALB2 function in DSB repair. Regarding the relationship between HDR functionality and olaparib resistance, a much stronger correlation was observed for the variants of the WD40 domain than those located in the coiled-coil region ($R^2=0.87$ vs 0.56).

3.6 Discussion

In absence of a universal functional assay for the classification of *PALB2* variants of uncertain significance, we have investigated the biological consequences of 44 missense variants using a combination of techniques, including PARP inhibitor sensitivity, *in silico* prediction tools, protein-interaction and HDR assays. The collection of methods described here provides a framework for exon-wide *PALB2* deleteriousness assignment.

Several considerations were taken while designing the choice of functional assays. For the PARPi sensitivity assays, olaparib (Lynparza) was selected knowing that as the FDA had approved the compound for the treatment of patients with germline BRCA-positive mutations, HER2-negative metastatic breast cancer who have previously received chemotherapy. Mouse ES-cell-based functional assay have been frequently used to evaluate VUS. However, human and mouse *PALB2* are only 58% identical at the amino acid level. Instead, we relied on a homologous complementation system where human *PALB2* was expressed in human cancer cell lines depleted for *PALB2*. We have also used a CRISPR-LMNA HDR assay that is very sensitive to monitor HR at the LMNA *locus*, as HR rates detected with this system routinely attain 15-25 % [240]. This provides a strong signal to noise ratio that is needed when comparing several variants, and especially those with intermediate phenotypes.

Our study uncovered two hotspots for *PALB2* missense variants leading to defects in homologous recombination. At the N-terminus of *PALB2*, our analysis identified p.P8L, p.Y28C, and p.R37H as missense variations with compromised HR activity. These variants are located near/within the coiled-coil motif of *PALB2*, which is involved in the heterodimerization of the protein with BRCA1. In the case of p.Y28C, the partial loss of interaction with BRCA1 observed in our two-hybrid analysis could provide an explanation for the HR deficit as well as the intermediate reduction in *PALB2* recruitment to DNA damage sites. A variation in the coiled-coil motif may also target *PALB2* self-oligomerization activity. Recent work by Song et al. demonstrated that the *PALB2* homodimer is mediated by an anti-parallel coiled-coil structure and identified p.L17, p.L21, p.L24, p.Y28, p.T31, and p.L35 as key hydrophobic residues at the dimer interface [241]. Mutation of p.L24 significantly reduces the homodimer stability and impacts on *PALB2* DNA repair activity. Since p.P8L and p.R37H variants show weak to null impact on BRCA1 binding, normal recruitment to DNA breaks, and are not key interface residues of the *PALB2* coiled-coil homodimer interaction, a downstream mechanism could be responsible for their effect on HR. Close to the coiled-coil motif of *PALB2* is the RAD51-binding site [79, 173]. It is possible that the *PALB2*-RAD51 interaction might be compromised with these missense mutations. Aspects of the N-terminus and coiled-coil motif need to be further explored, as analyses also indicate that p.K18R and p.H46Y were sensitive to PARPi, but recruited more efficiently to laser-induced DSBs than wild-type *PALB2*, and were HR proficient.

In C-terminal, *PALB2* missense variants p.L947F, p.L947S, p.T1030I, and p.W1140G were found to interfere with HR and every activity we tested. These all fall in the WD40 domain. In a previous study, we have reported that a truncating mutation in the WD40 domain of *PALB2*, known as p.W1038X, causes defective nuclear localization of the protein. More specifically, we have uncovered that the *PALB2* WD40 domain hides a Nuclear Export Sequence (NES) that can be exposed when a truncation within this domain occurs [175], leading to the cytoplasmic accumulation of *PALB2*. Interestingly, this model is also recapitulated in some of the *PALB2* variants analyzed in the current study, although they bear a simple point mutation. Indeed, a proportion of *PALB2* p.L947S, p.L947F, p.T1030I, and p.W1140G accumulated into the cytoplasm, a phenotype accompanied by a significant reduction in homologous recombination activity. These observations suggest that targeting *PALB2* nuclear export with inhibitors of the nuclear export receptor CRM1, such as Selinexor (KPT-330), could be of interest to evaluate as a potential therapeutic avenue for patients harbouring these missense mutations. Selinexor is an orally bioavailable selective inhibitor of nuclear export that is currently in Phase I and II clinical trials for advanced cancers. Furthermore, it has shown anti-tumor efficacy in preclinical models of triple-negative breast cancer [242].

Importantly, the WD40 domain acts as a critical protein interaction scaffold for *PALB2* activity in DSB repair. It is the site of interaction for several DNA repair factors, including, BRCA2 [170], RAD51 and RAD51AP1 [79] [173], RAD51C [231], Pol η [228], and RNF168 [152]. Hence, missense mutations in the WD40 might impair interactions with these factors. For instance, the p.G1043A variant displayed a recombination defect despite normal nuclear localization. This variant maps in the BRCA2-interaction region and therefore might affect BRCA2 loading on chromatin, as supported by our two-hybrid analysis.

Of note, some discordance could be observed between *in silico* predictions and our functional analysis. Out of the 44 studied variants, 33 were predicted to have potential damaging effect on *PALB2* by at least one of the five *in silico* tools used (**Table S3.1** and **S3.2**), while our systematic approach highlighted less than a dozen with weakly to strongly compromised functions. This discrepancy was mainly attributable to PolyPhen-2, which seemingly, largely overestimated the number of variants with functional impact (**Fig S3.1**), suggesting this tool may lead to false-positive predictions and is perhaps not indicated to guide the clinical decision alone. Conversely, the more restrictive algorithm REVEL classified all but 2 variants (p.L1119P and p.W1140G) as neutral, implying a propensity for false-negative predictions (**Table S3.2**). In line with this, all tools appeared as poor predictors of olaparib responsiveness, as judged by the R-squared values (≤ 0.3) from the correlation analysis (Supplemental **Fig S3.7**). Taking into account only the 13 prioritized variants, whose profiles of functionality are summarized as a heat map in **Fig 3.7**, the highest discrepancies were observed with the p.P8L variant. This variant was shown to be functionally compromised in all except the *PALB2* recruitment assay, but was classified as benign/neutral by all five predictive tools. In addition, p.R37H and p.L947F exhibited

compromised function for at least 3 out of 5 assays but were scored as neutral by Align GVGD and REVEL. On the contrary, the p.I1093T variant, which conserved intact function according to all assays, was qualified as probably pathogenic/disease-causing by Polyphen-2 and VEST 3.0. Nevertheless, Align GVGD and M-CAP, followed by VEST 3.0, appeared the most consistent with our findings (**Fig 3.7**) and thus more reliable for prediction of functional deleteriousness of *PALB2* VUS. In terms of relationships among functional assays, appreciable correlations were observed, the most stringent one being between HDR activity and RAD51 foci-forming ability ($R^2= 0.83$ for all prioritized variants, 0.91 for the coiled-coil region, and 0.79 for the WD40 domain). These correlations are recapitulated in the functionality heat map of and correlation graphs (**Fig 3.7** and Supplementary **Fig S3.5**). Of particular relevance is the robust correlation seen between PARPi responsiveness and HDR status for variants in the WD40 domain ($R^2= 0.87$), which suggests that PARPi sensitivity can predict functional deleteriousness in the WD40 domain and vice versa.

Our results provide robust evidence for the role of several variants on the cellular function of *PALB2*. It should be noted however, that the functional assays used in this study have not been validated with regard to the pathogenicity of missense variants in *PALB2* and therefore caution is warranted when interpreting the clinical significance of these variants of unknown significance. Also, most variants we analyzed showed partially compromised *PALB2* function leading to intermediate phenotypes and it is not known at this stage whether or not these defects translate into increased cancer risk and therapeutic response. In contrast to *BRCA1* and *BRCA2*, for which functional assays calibrated to breast cancer risk in terms of specificity and sensitivity are available, no such assays currently exist for the classification of *PALB2* variants, mainly due to the lack of family-based data of truly pathogenic missense variants. Once more data is available, such as segregation of the variant with the disease in the family, co-occurrence of the variant with known pathogenic mutations and robust population-based case-control analysis, the use of functional assays in combination with these other data sources will then greatly help expert committees in establishing the clinical relevance of *PALB2* VUS.

Furthermore, the large amount of functional data presented here, can now be used in combination with computational predictive tools to aid determining more accurately the deleteriousness for *PALB2* missense variants. For instance, VarCall was designed as a computational tool that incorporated functional data from the C-terminal domain of *BRCA1* to determine the likelihood of pathogenicity for over 200 missense variants. A similar predictive computational tool could now be generated. Not only would be a major step in predicting pathogenicity, but also it would help establishing a correlation between PARPi treatment and HR in patients. Recently, RAD51 was shown to be a good marker to predict PARPi sensitivity [243]. Our results suggest that *PALB2* mediated-HR could be also a good predictive marker for PARPi response.

Funding

This work was supported by the Government of Canada through Genome Canada and the Canadian Institutes of Health Research, the Ministère de l'Économie, et de l'Innovation du Québec through Génome Québec, as well as the Quebec Breast Cancer Foundation (J-YM and JS). The project was also supported by a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro / FAPERJ (M.C.), Fundação do Câncer /Programa de Oncobiologia (M.C.), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / CNPq (M.C.) (S.C.S.C Project 141974/2015-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (W.A.S-J grant #2013/08135-2), Ministère de l'Économie, de la Science et de l'Innovation du Québec through the PSR-SIIIRI-949 program (J-YM/JS) and the CIHR (Project grant (PJT-156017) to GD; Foundation grant to J-YM). GD is a senior scientist of the Beatrice Hunter Cancer Research Institute. JS holds a Canada Research Chair in Oncogenetics and J-YM is a FRQS Chair in genome stability.

Acknowledgments

We thank Guy Poirier for advice and Isabelle Brodeur for comments on the manuscript.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

3.7 Materials and Methods

Constructs and siRNA

GAL4DBD-BRCA1 wild-type (aa 1315-1863) fusion construct was previously generated (Woods et al., 2016) and GAL4DBD-BRCA2 wild-type (aa 1-60) was kindly provided by Dr. Bing Xia (Xia et al., 2006). The VP16 AD-PALB2 N-terminal wild-type (aa 1-319) construct was generated by amplification of the coding sequence by using a previously generated PALB2 construct as template (Woods et al., 2016), as well as the VP16 AD-PALB2 C-terminal wild-type construct (aa 859-1186) by using a normal human leukocyte cDNA as template; both products were cloned into pVP16 vector (Clontech) in EcoRI/BamHI sites, downstream of VP16 AD cassette. PALB2 variants were generated using the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) or by overlap extension site-directed mutagenesis as described by Ho et al. (Ho et al., 1989) followed by cloning into pVP16 vector using EcoRI/BamHI restriction sites. All constructs were confirmed by sequencing. Primers are listed in Supplemental **Table S1**. For *in cellulo* experiments with HeLa and U2OS cells, the variants were obtained via site-directed mutagenesis on a pEYFP-c1-PALB2 vector, prealably modified to be resistant to PALB2 siRNA using the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit with gatCTTATTGTTCTACCAGGAAAATC (forward) and ttccTCTAAGTCCTCCATTCTG (reverse) as primers. The siRNA target sequence used to silence PALB2 was CUUAGAAGAGGACCUUAUU and the control siRNA was UUCGAACGUGUCACGUCAA. The constructs used for the CRISPR-LMNA HDR assay were described previously [230].

Cell lines

U2OS osteosarcoma cells (HTB-96) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in McCoy's 5A supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S). HEK293FT were purchased from Invitrogen and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. HeLa cells were authenticated using Short Tandem Repeat (STR) analysis by ATCC and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S. All cell lines were grown at 37°C, 5% CO₂, and routinely tested to be mycoplasma free.

Mammalian two-hybrid assay

Mammalian two-hybrid assay was conducted using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). In brief, PALB2 N- or C-terminal construct (wild-type or variants) was co-transfected using Polyethylenimine

(Polysciences Inc.) into HEK293FT cells, together with GAL4DBD-BRCA1 or GAL4DBD-BRCA2, pG5Luc reporter vector and the pGR-TK internal control. The VP16 AD–PALB2 fusion protein acts as the prey protein in this system. When the BRCA1–PALB2 protein–protein interaction occurs, the transcriptional activity is enhanced above the levels observed for the BRCA1 or BRCA2 construct alone due to transcriptional activation mediated by the VP16 AD fused to the PALB2 protein. PALB2-L21A and A1025R variants were used as negative controls as previously reported (Sy et al., 2009; Oliver et al., 2009). Results were reported in bar graphs depicting the mean percentage luciferase activity \pm SEM of 3 independent experiments.

Olaparib sensitivity

For each condition, 240 000 cells HeLa cells were seeded into one well of a 6-well plate before being transfected 6-8 h later with 50 nM control or PALB2 siRNA using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). The next morning, cells were complemented with 800 ng of the indicated YFP construct using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) for 24 h and then seeded in triplicates into a Corning 3603 black-sided clear bottom 96-well microplate at a density of 3000 cells per well. The remaining cells were kept and stored at -80°C until processed for protein extraction and immunoblotting as described below. Once cells attached to the plate, increasing concentration of olaparib (Selleckchem, #S1060) was added to the medium in order to get final concentrations ranging from 0 (DMSO) to 2.5 μM . After 3 days of treatment, nuclei were stained with Hoechst 33342 (Invitrogen) at 10 $\mu\text{g/ml}$ in media for 45 min at 37°C . Images of entire wells were acquired at 4x with a Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader followed by quantification of Hoechst-stained nuclei with the Gen5 Data Analysis Software v3.03 (BioTek Instruments). Cell viability was expressed as percentage of survival in olaparib-treated cells relative to vehicle (DMSO)-treated cells. Results represent the mean \pm SD of at least 3 independent experiments, each performed in triplicate.

Live-cell microscopy and laser-irradiation

Live cell imaging and micro-irradiation experiments were carried out with a Leica TCS SP5 II confocal microscope driven by Leica LAS AF software using a 63x/1.4 oil immersion objective. The microscope was equipped with an environmental chamber set to 37°C and 5% CO_2 . Briefly, HeLa cells seeded onto 35-mm fluorodishes (World Precision Instruments, Inc.) were transfected with 800 ng peYFP-c1-PALB2 WT or variant constructs using Effectene transfection reagent (Qiagen). The next day, cells were micro-irradiated in the nucleus for 200 ms using a 405 nm UV-laser at the following settings: format 512 X 512 pixels, scan speed 100 Hz, mode bidirectional, zoom 2X. To monitor the recruitment of YFP-PALB2 to laser-induced DNA damage sites,

cells were micro-irradiated and imaged every 30 seconds for 15 min, after which fluorescence intensity of YFP-PALB2 at DNA damage sites relative to an unirradiated nuclear area was quantified and plotted over time. Kinetic curves were obtained by averaging the relative fluorescence intensity of cells displaying positive recruitment ($n > 60$ cells) and error bars show the S.E.M. We considered positive only cells whose relative fluorescence intensity increased over the basal 100% after irradiation. Quantification of YFP-PALB2 sub-cellular localization was determined from live-cell microscopy images captured prior to microirradiation ($n > 120$ cells). All results are from at least 3 independent experiments.

RAD51 foci assay

HeLa cells were seeded on glass coverslips in 6-well plates at 225 000 cells per well. Knockdown of PALB2 was performed 18 h later with 50 nM PALB2 siRNA using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). After 5 h, cells were subjected to double thymidine block. Briefly, cells were treated with 2 mM thymidine for 18 h and release into fresh media for 9 h. Complementation using 800 ng of the indicated YFP construct was carried out with Lipofectamine 2000 during that release time. Then, cells were treated with 2 mM thymidine for 17 h and protected from light from this point on. After 2 h of release from the second block, cells were irradiated with 2 Gy and processed for immunofluorescence 4 h post-irradiation. Unless otherwise stated, all immunofluorescence dilutions were prepared in PBS and incubations performed at room temperature with intervening washes in PBS. Cell fixation was carried out by incubation with 4% paraformaldehyde for 10 min followed by 100% ice-cold methanol for 5 min at -20°C . This was succeeded by permeabilization in 0.2% Triton X-100 for 5 min and a quenching step using 0.1% sodium borohydride for 5 min. After blocking for 1 h in a solution containing 10% goat serum and 1% BSA, cells were incubated for 1 h with primary antibodies anti-RAD51 (1 :7000, B-bridge International, #70-001) and anti-cyclin A (1:400, BD Biosciences, #611268) diluted in 1% BSA. Secondary antibodies Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit (Invitrogen, #A-11011) and Alexa Fluor 647 goat anti-mouse (Invitrogen, #A-21235) were diluted 1 :1000 in 1% BSA and applied for 1 h. Nuclei were stained for 10 min with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) prior to mounting onto slides with 90% glycerol containing 1 mg/ml paraphenylenediamine anti-fade reagent. Z-stack images were acquired at 63X magnification on a Leica CTR 6000 microscope, then deconvolved and analysed for RAD51 foci formation with Volocity software v6.0.1 (Perkin-Elmer Improvision). The number of RAD51 foci per cyclin A-positive cells, among the transfected (YFP-positive) population, was scored using automatic spot counting by Volocity software and validated manually. Results from 3 independent trials were reported in a scatter dot plot ($n=225$ cells per condition). Intensity values, also provided by Volocity, of 500 RAD51 foci from a representative trial were normalized to the WT mean and reported in a scatter dot plot. Horizontal lines on the plots designate the mean values.

CRISPR-LMNA HDR assay

U2OS were seeded in 6-well plates at 200 000 cells per well. Knockdown of PALB2 was performed 6-8 h later with 50 nM siRNA using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Twenty-four hours post-transfection, 1.5×10^6 cells were pelleted for each condition and resuspended in 100 μ L complete nucleofector solution (SE Cell Line 4D-Nucleofector™ X Kit, Lonza) to which 1 μ g of pCR2.1-mRuby2LMNA donor, 1 μ g pX330-LMNA gRNA, 1 μ g pYFP-C1 or the indicated YFP-PALB2 construct, and 150 μ mol siRNA was added. Once transferred to a 100 μ L Lonza certified cuvette, cells were transfected using the 4D-Nucleofector X-unit, program CM-104 and transferred to a 10 cm dish. After 48 h, 500 000 cells per condition were plated onto glass coverslips while the remaining was kept and stored at -80°C until processed for protein extraction and immunoblotting as described below. Expression of mRuby2 was assayed the next day by fluorescence microscopy (63X), that is 72h post-nucleofection. Data are represented as mean relative percentages \pm SD of mRuby2-positive cells over the YFP-positive population from 3 independent experiments (total $n > 300$ YFP-positive cells).

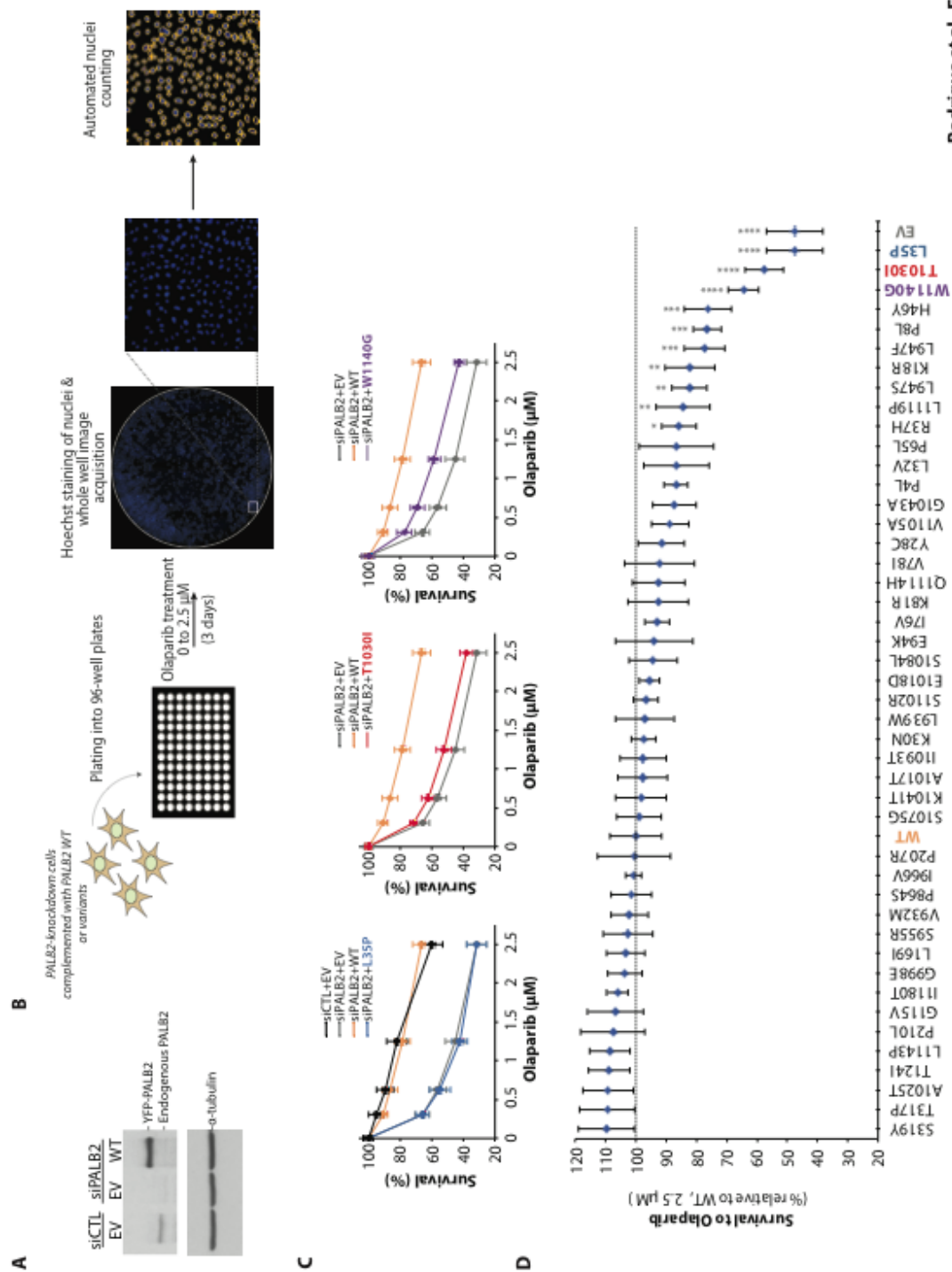
Protein extraction and Immunoblotting

HEK293FT cells transfected with the indicated plasmid constructs were lysed in mild-RIPA buffer supplemented with Protease and Phosphatase Inhibitors Cocktails (Merck). Immunoblotting analysis was performed 24 h post-transfection using anti-VP16 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, #sc-7545) or anti-GAL4 (DBD) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, #sc-510) antibodies. Total soluble protein extracts from HeLa and U2OS cells and immunoblotting were performed as described in Castroviejo-Bermejo et al, 2018. For PALB2 detection, a polyclonal antibody was raised in rabbit and used at a 1:5000 dilution. Mouse monoclonal anti-alpha tubulin (1:200,000; Abcam, #ab7291) served as the loading control. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG or anti-mouse (1:10,000; Jackson ImmunoResearch) were used as secondary antibodies.

Statistical analysis

For the mammalian two-hybrid assay and in the other *in cellulo* experiments, statistical analysis was performed using Prism 6 GraphPad and significance was determined applying one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc or, when applicable, Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post-test, as specified in each figure legend. All experiments were replicated in at least 3 independent experiments. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$ and (****) $p < 0.0001$.

3.8 Figure & Legends



Rodrigue et al. Figure 1

Figure 3.1 – Sensitivity of *PALB2* variants to PARP inhibitor olaparib

PALB2-knockdown HeLa cells, previously transfected with the empty vector or the indicated *PALB2* construct, were seeded into 96-well plates and exposed to olaparib concentrations ranging from 0 to 2.5 μ M. Cell viabilities were obtained 72h post-treatment by quantification of surviving Hoechst-stained nuclei and represented as percent survival relative to the control (DMSO-treated) condition. **(A)** Typical levels of *PALB2* after knockdown and re-expression in HeLa cells, with tubulin as loading control. **(B)** Schematic representation of the strategy employed for testing sensitivity to olaparib. **(C)** Survival curves contrasting the abilities of *PALB2* WT and the p.L35P, p.T1030I and p.W1140G variants to rescue olaparib resistance in *PALB2*-knockdown cells. **(D)** Olaparib sensitivity profiles for the complete set of variants at a concentration of 2.5 μ M, with the WT condition set at 100%. *PALB2* variants are classified in descending order of olaparib sensitivity and survival data are presented as the mean (\pm SD) from at least 3 independent experiments, each performed in triplicate. Statistical significance was determined by Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post-test. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$ and (****) $p < 0.0001$.

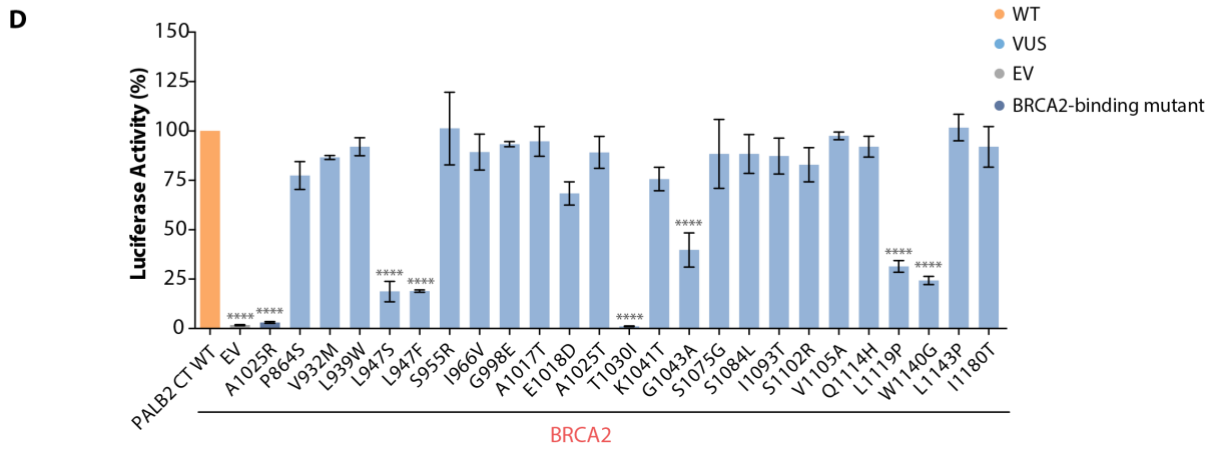
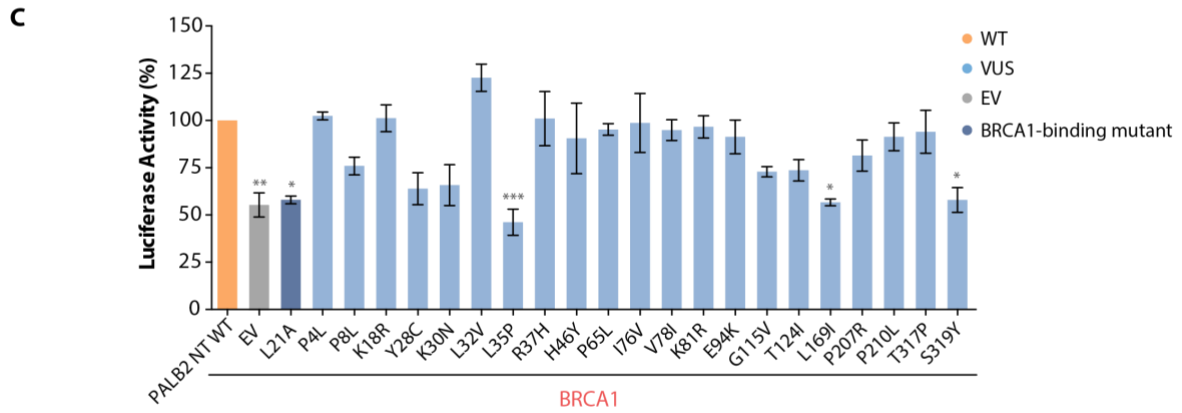
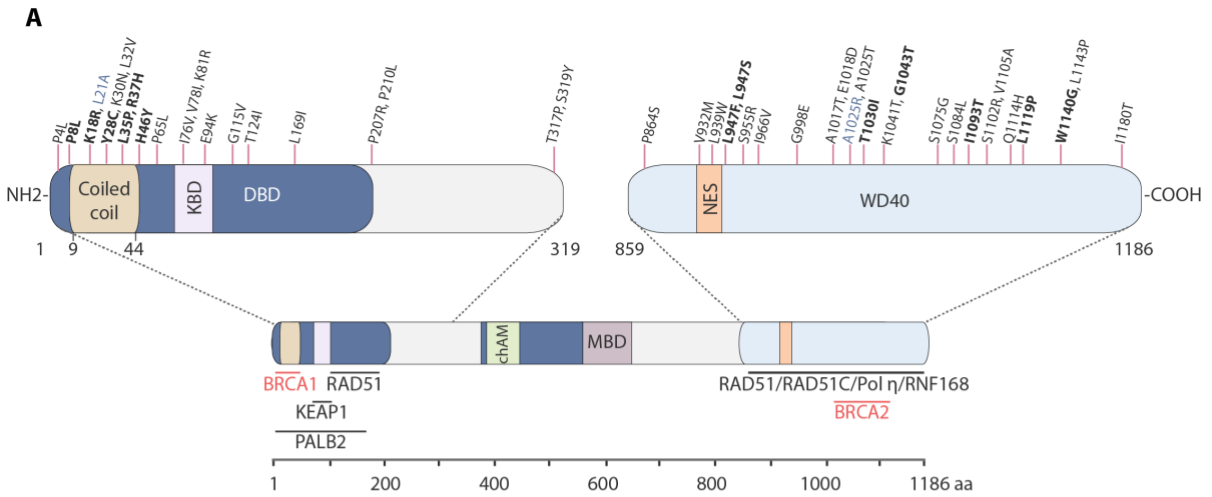
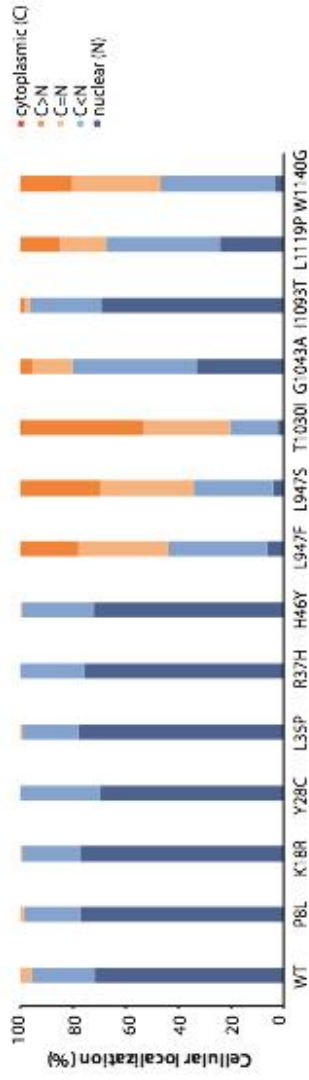


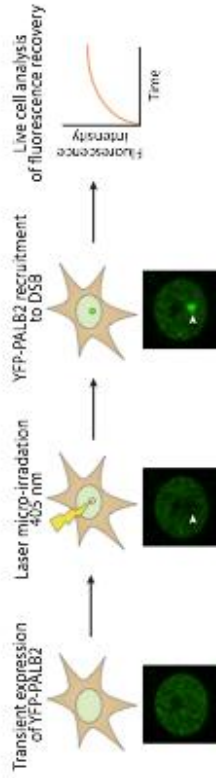
Figure 3.2 – Impact of *PALB2* variants on BRCA1 and BRCA2 interaction.

(A) Schematic representation of the PALB2 protein and its domains together with the position of the N- and C-terminal missense variants selected in this study. Negative controls for BRCA1 and BRCA2 binding are in blue and the final prioritized variants in bold. PALB2 N- and C-terminal interactors are also represented. KBD, KEAP1-binding domain; DBD, DNA-binding domain; NES, nuclear export signal; MBD, MRG15-binding domain. (B) Mammalian two-hybrid assay representation. (C) BRCA1 and (D) BRCA2 interaction data; HEK293FT cells were co-transfected with BRCA1/2 and PALB2 N/C-terminal constructs and the reporter assay was performed 24h post-transfection. Statistical significance was accessed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post *hoc* analysis (mean \pm SEM of 3 independent experiments. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$ and (****) $p < 0.0001$.

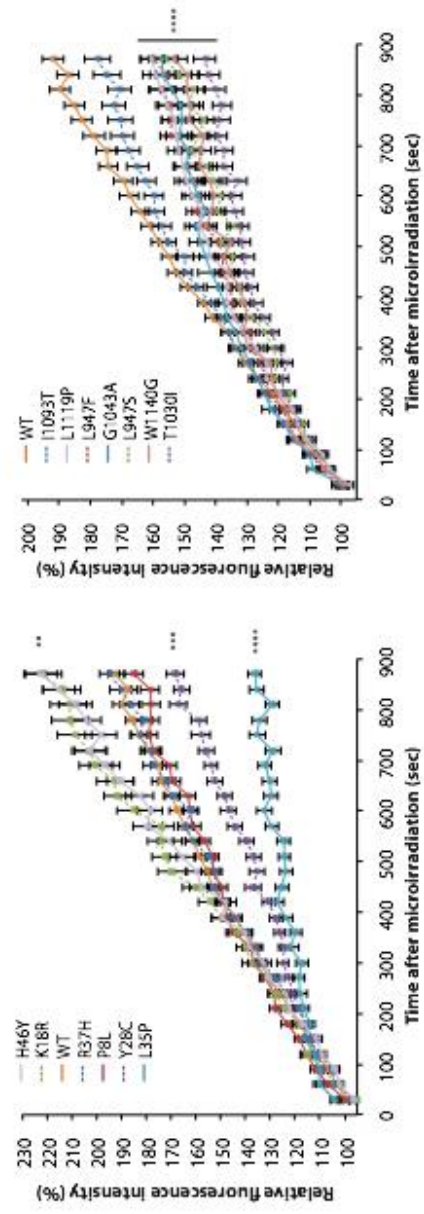
A



B



C



Rodrigue et al. Figure 3

Figure 3.3 – Subcellular localization and recruitment of *PALB2* variants to DNA damage.

(A) Subcellular localization of YFP-PALB2 missense variants compared to the WT protein (n>120 cells per condition). (B) Schematic representation of the laser micro-radiation experiment used for analyzing the recruitment kinetics of PALB2. (C) Quantitative evaluation of recruitment kinetics for YFP-PALB2 WT or missense variants to laser-induced DSBs. Mean curves \pm S.E.M are shown (n>60 cells per condition). Statistics were performed on the last time point (900 sec time point) using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison post-test. Data from A and C are from at least 3 independent experiments in HeLa cells. (**) p<0.01; (***) p<0.001 and (****) p<0.0001.

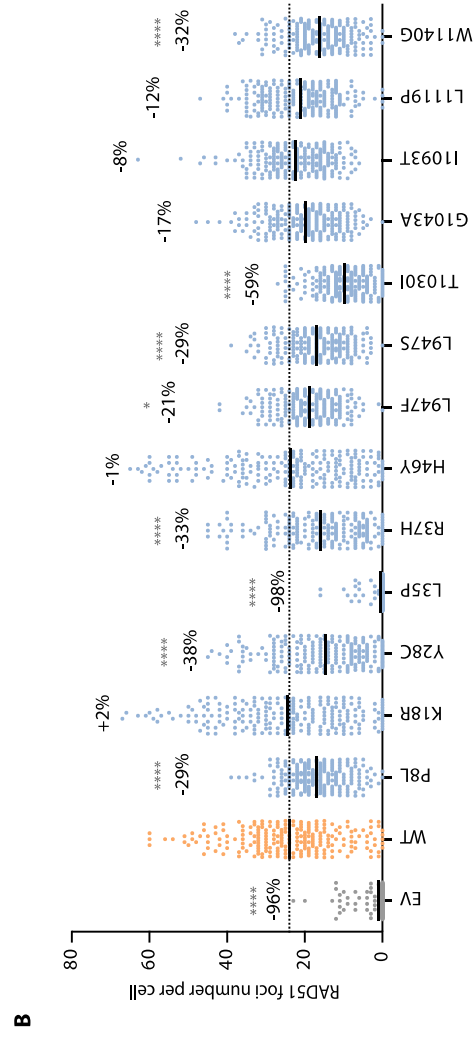
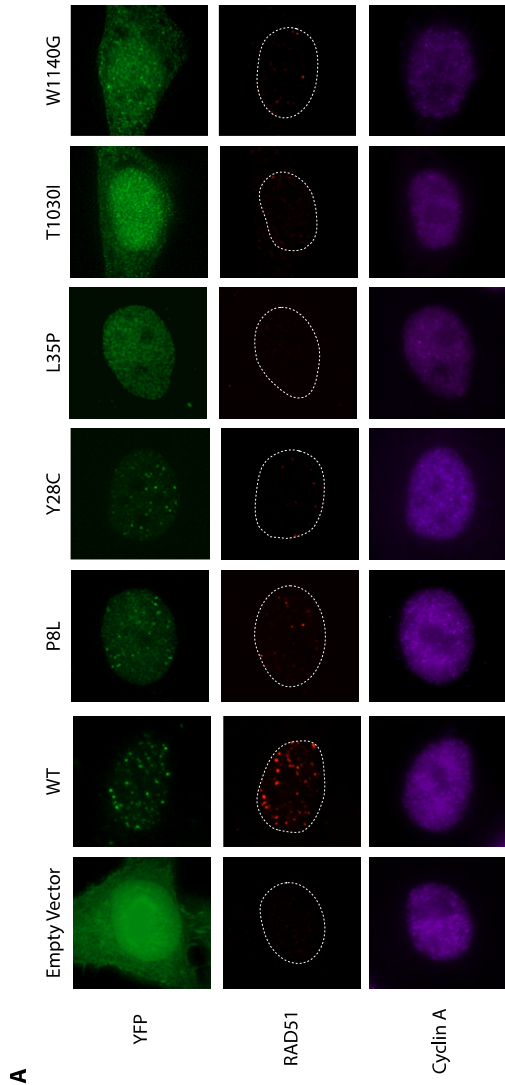


Figure 3.4 – RAD51 foci formation in *PALB2* variants.

(A) Representative immunofluorescence images of RAD51 foci (red) in *PALB2* knockdown HeLa cells complemented with the indicated YFP construct (green) and synchronized in S/G2 by double thymidine block, as determined by cyclin A co-staining (purple). Images were acquired from cells fixed 4h post-ionizing radiation (2 Gy). Variants leading to the strongest phenotypes are shown. **(B)** RAD51 foci quantification from images in (A) using Volocity software. The scatter dot plot shows the number of RAD51 foci in cyclin A-positive cells expressing the indicated YFP construct, with the horizontal lines designating the mean values of at least 3 independent trials (n=225 cells per condition). The percentage change relative to the WT mean is also indicated for each variant. Statistical significance was determined by Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post-test. (*) $p < 0.05$; (****) $p < 0.0001$.

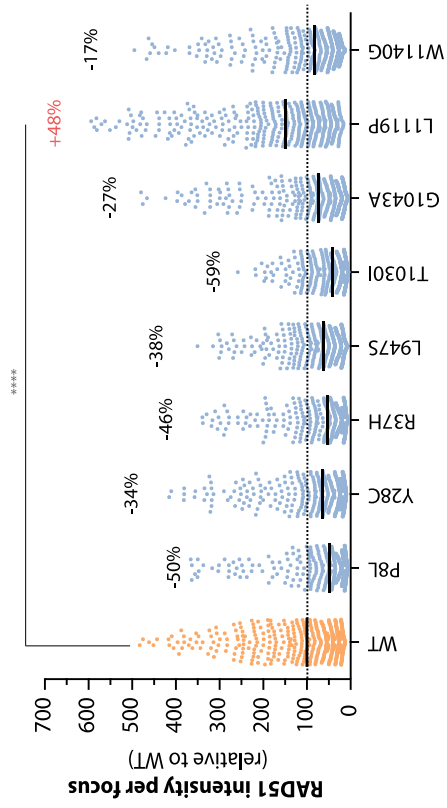
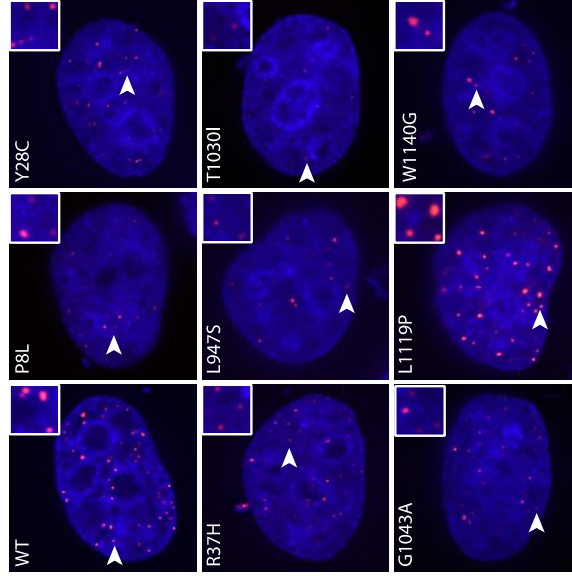
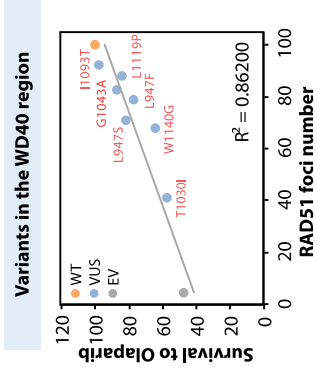
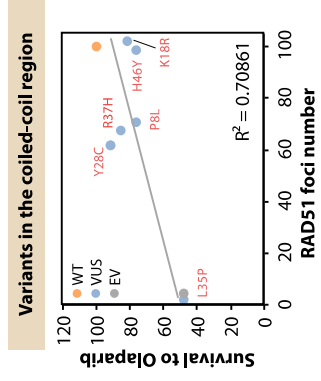
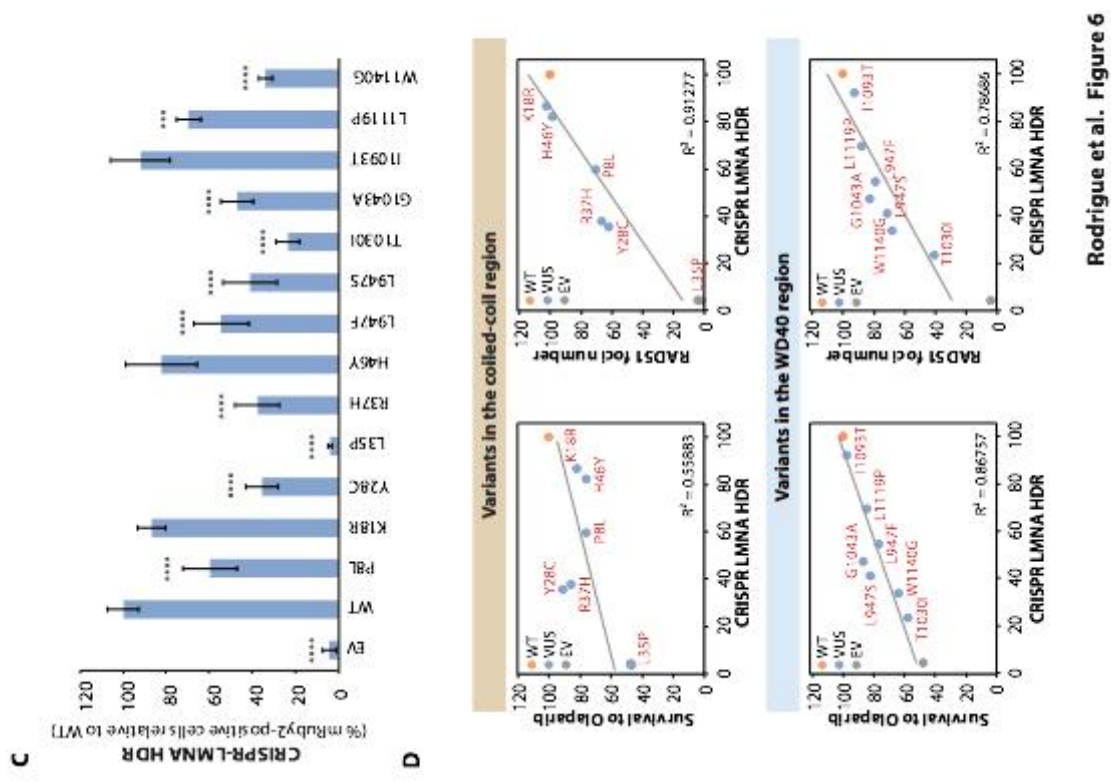
A**B****C**

Figure 3.5 – PALB2 variants showing altered RAD51 foci intensity.

(A) Distribution of fluorescent intensities of RAD51 foci as determined using Volocity software. The scatter dot plot shows the intensity values (relative to the WT mean) of 500 RAD51 foci from a representative trial, with the horizontal lines designating the mean values. The percentage change relative to the WT mean is also indicated for each variant. Statistics were performed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison post-test. (****) $p < 0.0001$. **(B)** Representative images with enlarged insets of altered RAD51 foci intensity. Merge images of DAPI (blue) and RAD51 (red) staining are shown. **(C)** Scatter graphs showing the correlation between the mean number of RAD51 foci per cell and cell survival to olaparib per domain. Values are expressed in percentage relative to WT (set to 100%).



Rodrigue et al. Figure 6

Figure 3.6 – HDR activity of *PALB2* variants using the CRISPR-LMNA system.

(A) Schematic representation of the system. Also shown are the typical levels of PALB2 after knockdown and re-expression in U2OS cells, with tubulin as loading control. **(B)** Representative fluorescence microscopy image of a cell expressing mRuby2-LMNA after successful homology directed repair, as seen in *PALB2*-depleted cell complemented with YFP-PALB2-WT (top). Cell negative for mRuby2-LMNA expression as typically found after complementation with the p.T1030I variant (bottom). **(C)** Quantification of HDR activity after complementation of *PALB2* knockdown U2OS cells with PALB2 WT or the indicated missense variant. Data represents mean relative percentages (\pm SD) of mRuby2-positive cells over the transfected (YFP-positive) population from 3 independent experiments ($n > 300$ YFP-positive cells per condition). Statistical significance was accessed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc analysis. (***) $p < 0.001$ and (****) $p < 0.0001$. **(D)** Scatter graphs correlating HDR activity with cell survival to olaparib or the mean number of RAD51 foci per cell. Values are expressed in percentage relative to WT (set to 100%).

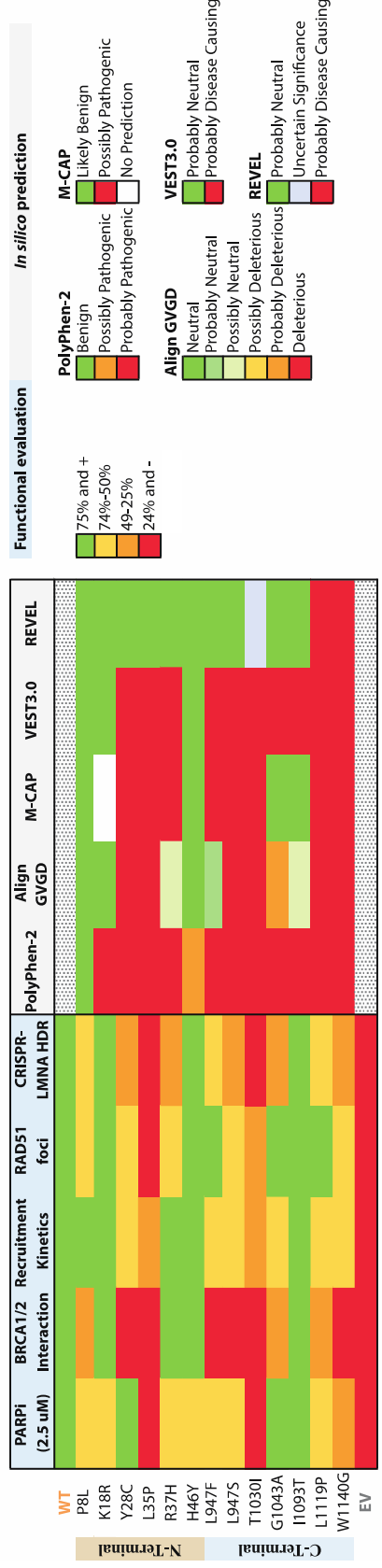


Figure 3.7 – Profile of functionality of prioritized *PALB2* variants.

Heat map showing the percentage of residual activity for each *PALB2* VUS and its predicted pathogenicity profile. In order to facilitate interpretation of the functional data, values were rescaled to a scale of 0-100, with the empty vector (EV) set to 0% and the wild-type (WT) to 100% for each assay.

Table S3.1 – *In silico* characterization for 44 PALB2 missense VUS

PALB2 region	Mutation		<i>In silico</i> pathogenicity prediction		ClinVar designation	References
	DNA change	Protein Change	PolyPhen-2	Align GVGD ¹		
N-terminal	c.11C>T	p.P4L	Benign (0.090)	Neutral (C0)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[1-5]
N-terminal	c.23C>T	p.P8L	Benign (0.008)	Neutral (C0)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[2, 6, 7]
N-terminal	c.53A>G	p.K18R	Probably Damaging (1.000)	Neutral (C0)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[2, 3, 7-10]
N-terminal	c.83A>G	p.Y28C	Probably Damaging (1.000)	Deleterious (C65)	Uncertain significance	[11]
N-terminal	c.90G>T	p.K30N	Probably Damaging (0.999)	Neutral (C0)	Uncertain significance	[12]
N-terminal	c.94C>G	p.L32V	Probably Damaging (1.000)	Neutral (C0)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[4, 12]
N-terminal	c.104T>C	p.L35P	Probably Damaging (1.000)	Deleterious (C65)	—	[13]
N-terminal	c.110G>A	p.R37H	Probably Damaging (0.968)	Possibly Neutral (C25)	Uncertain significance	[14]
N-terminal	c.136C>T	p.H46Y	Possibly Damaging (0.838)	Neutral (C0)	—	[15]
N-terminal	c.194C>T	p.P65L	Benign (0.007)	Neutral (C0)	Uncertain significance	[2-4, 16]
N-terminal	c.226A>G	p.I76V	Benign (0.000)	Neutral (C0)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[2, 17]
N-terminal	c.232G>A	p.V78I	Benign (0.009)	Neutral (C0)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[2-4, 14, 16]
N-terminal	c.242A>G	p.K81R	Benign (0.037)	Neutral (C0)	Uncertain significance	—
N-terminal	c.279G>A	p.E94K	Possibly Damaging (0.732)	Neutral (C0)	—	[1]
N-terminal	c.344G>T	p.G115V	Benign (0.002)	Neutral (C0)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[3-5, 17]
N-terminal	c.371C>T	p.T124I	Benign (0.001)	Neutral (C0)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[1]
N-terminal	c.505C>A	p.L169I	Probably Damaging (0.972)	Neutral (C0)	Uncertain significance	[18]
N-terminal	c.620C>G	p.P207R	Possibly Damaging (0.879)	Neutral (C0)	Uncertain significance	[19]
N-terminal	c.629C>T	p.P210L	Benign (0.021)	Neutral (C0)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[1, 2, 4, 7, 20, 21]
N-terminal	c.949A>C	p.T317P	Possibly Damaging (0.630)	Possibly Deleterious (C35)	Uncertain significance	—
N-terminal	c.956C>A	p.S319Y	Possibly Damaging (0.589)	Neutral (C0)	Uncertain significance	[12]
C-terminal	c.2590C>T	p.F864S	Possibly Damaging (0.578)	Neutral (C0)	Benign/Likely benign	[1-5, 10, 12, 14-16, 20-33]
C-terminal	c.2794G>A	p.V932M	Probably Damaging (1.000)	Neutral (C0)	Benign/Likely benign	[1-5, 8, 10, 11, 14-16, 20, 21, 23-29, 32-37]
C-terminal	c.2816T>G	p.L939W	Probably Damaging (1.000)	Probably Deleterious (C55)	Conflicting interpretations of pathogenicity	[1-5, 8-10, 14-16, 20, 21, 23-29, 33, 38-40]
C-terminal	c.2840T>C	p.L947S	Probably Damaging (1.000)	Deleterious (C65)	Uncertain significance	[1, 41]
C-terminal	c.2841G>C	p.L947F	Probably Damaging (1.000)	Probably Neutral (C15)	—	[1]
C-terminal	c.2865T>A	p.S955R	Benign (0.051)	Neutral (C0)	Uncertain significance	[19]

¹ Align GVGD scores range from C0 to C65, with C0 being the less likely and C65 the most likely to interfere with protein function; The scores were classified as Neutral, Probably Neutral, Possibly Neutral, Possibly

Deleterious, Probably Deleterious and Deleterious by the authors, according to the predicted scores and to the tool's terminology. The variants without reference were selected only based on the ClinVar data.

Table S3.2 – Pathogenicity prediction of *PALB2* VUSs of interest

Genomic position	Protein Change	<i>In silico</i> pathogenicity prediction		
		M-CAP ¹	VEST3.0 ²	REVEL ³
Chr16:23652468	p.P4L	Likely Benign (0.011)	Probably Neutral (0.279)	Probably Neutral (0.044)
Chr16:23652456	p.P8L	Likely Benign (0.012)	Probably Neutral (0.703)	Probably Neutral (0.056)
Chr16:23649446	p.K18R	□	Probably Neutral (0.368)	Probably Neutral (0.181)
Chr16:23649416	p.Y28C	Possibly Pathogenic (0.062)	Probably Disease Causing (0.015)	Probably Neutral (0.224)
Chr16:23649409	p.K30N	Likely Benign (0.022)	Probably Neutral (0.115)	Probably Neutral (0.089)
Chr16:23649405	p.L32V	Likely Benign (0.022)	Probably Neutral (0.082)	Probably Neutral (0.150)
Chr16:23649395	p.L35P	Possibly Pathogenic (0.101)	Probably Disease Causing (0.009)	Probably Neutral (0.350)
Chr16:23649272	p.R37H	Possibly Pathogenic (0.039)	Probably Disease Causing (0.035)	Probably Neutral (0.158)
Chr16:23649246	p.H46Y	Likely Benign (0.004)	Probably Neutral (0.364)	Probably Neutral (0.050)
Chr16:23649188	p.P65L	Likely Benign (0.010)	Probably Neutral (0.183)	Probably Neutral (0.029)
Chr16:23647641	p.I76V	Likely Benign (0.009)	Probably Neutral (0.407)	Probably Neutral (0.042)
Chr16:23647635	p.V78I	Likely Benign (0.014)	Probably Neutral (0.286)	Probably Neutral (0.004)
Chr16:23647625	p.K81R	Likely Benign (0.020)	Probably Neutral (0.355)	Probably Neutral (0.025)
Chr16:23647587	p.E94K	Likely Benign (0.010)	Probably Neutral (0.225)	Probably Neutral (0.062)
Chr16:23647523	p.G115V	Likely Benign (0.012)	Probably Neutral (0.549)	Probably Neutral (0.042)
Chr16:23647496	p.T124I	Likely Benign (0.006)	Probably Neutral (0.773)	Probably Neutral (0.014)
Chr16:23647362	p.L169I	Likely Benign (0.021)	Probably Neutral (0.3)	Probably Neutral (0.065)
Chr16:23647247	p.P207R	Likely Benign (0.023)	Probably Neutral (0.292)	Probably Neutral (0.032)
Chr16:23647238	p.P210L	□	Probably Neutral (0.407)	Probably Neutral (0.096)
Chr16:23646918	p.T317P	Likely Benign (0.022)	Probably Neutral (0.462)	Probably Neutral (0.028)
Chr16:23646911	p.S319Y	Likely Benign (0.018)	Probably Neutral (0.388)	Probably Neutral (0.041)
Chr16:23637715	p.P864S	Likely Benign (0.008)	Probably Neutral (0.251)	Probably Neutral (0.062)
Chr16:23635370	p.V932M	□	Probably Neutral (0.063)	Probably Neutral (0.128)
Chr16:23635348	p.L939W	Possibly Pathogenic (0.060)	Probably Disease Causing (0.008)	Probably Neutral (0.359)
Chr16:23634446	p.L947S	Possibly Pathogenic (0.086)	Probably Disease Causing (0.011)	Probably Neutral (0.376)
Chr16:23634445	p.L947F	Possibly Pathogenic (0.062)	Probably Disease Causing (0.023)	Probably Neutral (0.330)
Chr16:23634421	p.S955R	Likely Benign (0.008)	Probably Neutral (0.429)	Probably Neutral (0.009)
Chr16:23634390	p.I966V	Likely Benign (0.014)	Probably Neutral (0.129)	Probably Neutral (0.073)
Chr16:23634293	p.G998E	□	Probably Neutral (0.139)	Probably Neutral (0.290)
Chr16:23632747	p.A1017T	Possibly Pathogenic (0.026)	Probably Neutral (0.087)	Probably Neutral (0.202)
Chr16:23632742	p.E1018D	Possibly Pathogenic (0.030)	Probably Neutral (0.091)	Probably Neutral (0.118)

Chr16:23632723	p.A1025T	Likely Benign (0.020)	Probably Neutral (0.096)	Probably Neutral (0.128)
Chr16:23632707	p.T1030I	Possibly Pathogenic (0.059)	Probably Disease Causing (0.014)	Uncertain Significance (0.434)
Chr16:23625404	p.K1041T	Likely Benign (0.015)	Probably Neutral (0.072)	Probably Neutral (0.113)
Chr16:23625398	p.G1043A	Likely Benign (0.016)	Probably Disease Causing (0.022)	Probably Neutral (0.273)
Chr16:23619312	p.S1075G	Likely Benign (0.019)	Probably Neutral (0.09)	Probably Neutral (0.136)
Chr16:23619284	p.S1084L	Likely Benign (0.010)	Probably Neutral (0.745)	Probably Neutral (0.050)
Chr16:23619257	p.I1093T	Likely Benign (0.025)	Probably Disease Causing (0.016)	Probably Neutral (0.220)
Chr16:23619229	p.S1102R	Likely Benign (0.016)	Probably Neutral (0.058)	Probably Neutral (0.102)
Chr16:23619221	p.V1105A	Likely Benign (0.012)	Probably Disease Causing (0.029)	Probably Neutral (0.253)
Chr16:23619193	p.Q1114H	Likely Benign (0.006)	Probably Neutral (0.346)	Probably Neutral (0.068)
Chr16:23614985	p.L1119P	Possibly Pathogenic (0.129)	Probably Disease Causing (0.009)	Probably Disease Causing (0.465)
Chr16:23614923	p.W1140G	Possibly Pathogenic (0.140)	Probably Disease Causing (0.01)	Probably Disease Causing (0.563)
Chr16:23614913	p.L1143P	Likely Benign (0.017)	Probably Disease Causing (0.012)	Probably Neutral (0.245)
Chr16:23614802	p.I1180T	Possibly Pathogenic (0.041)	Probably Disease Causing (0.011)	Probably Neutral (0.337)

¹ M-CAP prediction is possible only for variants with allele frequency ≥ 0.01 (Jagadeesh *et al.* 2016). ² VEST scores range from 0 to 1, with 1 indicating a confident prediction of a functional mutation. VEST scores indicated in parenthesis are the predicted p-values for pathogenicity. We classified the variants as Probably Disease Causing when $p \leq 0.05$ and as Probably Neutral when $p > 0.05$ (Carter *et al.* 2013). ³ REVEL scores range from 0 to 1, with higher scores reflecting greater likelihood that the variant is disease-causing. When the scores are >0.450 the variants can be predicted more accurately as Probably Disease Causing. When the scores are <0.450 the variants can be predicted more accurately as Probably Neutral. Uncertain significance refers to when scores are not able to differentiate between Probably Neutral and Probably Disease Causing (0.400-0.450) (Ioannidis *et al.* 2016). The scores for VEST and REVEL tools were classified as Probably Neutral, Probably Disease Causing and Uncertain significance by the authors, according to the predicted scores.

Carter H, Douville C, Stenson PD, Cooper DN & Karchin R (2013) Identifying Mendelian disease genes with the Variant Effect Scoring Tool. *BMC Genomics*

Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, Stanford JL, Isaacs WB, Xu J, Cooney KA, Lange EM, Schleutker J, Carpten JD, Powell JJ, et al (2016) REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *American Journal of Human Genetics*

Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, Guturu H, Stenson PD, Cooper DN, Bernstein JA & Bejerano G (2016) M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nature Genetics*

Table S3.3 – List of primers

PALB2 aa 1-319 primers		
PALB2 aa 1 FW <i>Eco</i> RI	sense	CGGAATTCATGGACGAGCCTCCCGGG
PALB2 aa 319 RV <i>Bam</i> HI	anti-sense	GCGGATCCTAGAAGTTGTGGGCAGTTGGC

PALB2 aa 1-319 mutagenesis primers				
Variant	mutation	sense primer (5' - 3')	anti-sense primer (5' - 3')	Mutagenesis method
P4L	c.11C>T	CGGAATTCACGAGCTTCCCGGG	GCGGATCCTAGAAGTTGTGGGCAGTTGGC	Cloning
P8L	c.23C>T	TGGACGAGCCTCCCGGGAAGCTCTCAGCTGTG	CTTCCCGGGAGGCTCGTCCATGAATTCCCC	QuickChange II
K18R	c.53A>G	GCTAATTTCTCCCTTAACTTTTC	GGAAAAGTTAAGGGAGAAATTAG	Cloning
L21A	c.62_63TT>GC	GGAGAAAGCAGCATCTTTG	CAAGAATGCTGCTTTCTCC	Cloning
Y28C	c.83A>G	TAGCATTTCTGAAAAGGGAATGCAGCAAGACAC	TTCCCTTTTCAAGAATGCTAATTTCTCCTT	QuickChange II
K30N	c.90G>T	TCTTGAAAGGGAAATACAGCAATACACTAGCCC	GCTGTATTCCCTTTCAAGAATGCTAATTT	QuickChange II
L32V	c.94C>G	AAAGGGAATACAGCAAGACAGTAGCCCGCTTC	TGTC TTGGTGATTTCCCTTTTCAAGAAATGC	QuickChange II
L35P	c.104T>C	ACAGCAAGACACTAGCCCGCCCTCAGCGTGCCC	CTAGTGTCTTGTCTGATTTCCCTTTT	QuickChange II
R37H	c.110G>A	AGACACTAGCCCGCCTTCAGCATGCCAAGAG	CTGAAGCGGGCTAGTGTCTTGTGTATTC	QuickChange II
H46Y	c.136C>T	AAAGAGCTGAAAAGATTAAGTATTCTATTAAGA	CTTAATCTTTTCAGCTCTTTGGGCACGCTG	QuickChange II
P65L	c.194C>T	GGATCTCTCACTGCAGCTAAAACAC	GTGTTTAGCTGCAGTGAGAGATCC	Cloning
I76V	c.226A>G	ACTCAGAACCTAAAATAAAGTATGTGTTTATG	TTTATTTTAGGTTCTGAGTGTTTTAGCTG	QuickChange II
V78I	c.232G>A	AACCTAAAATAAAAATATGTTATTTATGACAAGT	ACATATTTTATTTTAGGTTCTGAGTGTTC	QuickChange II
K81R	c.242A>G	ATAAAAATATGTGTTTATGACAGGTTACACATCA	GTCATAAACACATATTTTATTTTAGGTTCT	QuickChange II
E94K	c.279G>A	ATCTTGATGAAGAACTGGAAAAAAGACATCTA	TCCAGTTTCTCATCAAGATGGGTTTGAT	QuickChange II
G115V	c.344G>T	ACCCTGGAGATGGCCGAGAGTATTACCTATAC	TCTGGGCCATCTCCAGGGTTAAAGGACTC	QuickChange II
T124I	c.371C>T	CTATACAAAAGACAGATGACATCCAAGAACATT	GTCATCTGTTCTTTGTATAGGTAATCTCC	QuickChange II
L169I	c.505C>A	GTGTCTTTGGCACTGATTCAACTCAGATTGTCTG	TGAATCAGTGCCAAAGACACAGTCTCTC	QuickChange II
P207R	c.620C>G	TAAGTCTTAAATCTGAACTTCGAGATTCTCCAG	AAGTTCAGATTTAAGACTTAAAGGTGAGT	QuickChange II
P210L	c.629C>T	AATCTGAACTTCCAGATTCTCTAGAACAGTTA	AGAATCTGGAAGTTCAGATTTAAGACTTAA	QuickChange II
S319Y	c.956C>A	GTGGCCAACTGCCACAAGTTATAATTTAGAGG	ACTTGTGGGCAGTTGGCCACTTTTACTTAT	QuickChange II

PALB2 aa 859-1186 primers		
PALB2 aa 859 FW <i>Eco</i> RI	sense	TTGAATTCCTCAGAGTTAAAGAATCCTTCAGGTTCC
PALB2 aa 1186 RV <i>Bam</i> HI	anti-sense	TTGGATCCTGAATAGTGGTATACAAAATATATTTCC

PALB2 aa 859-1186 mutagenesis primers				
Variant	mutation	sense primer (5' - 3')	anti-sense primer (5' - 3')	Mutagenesis method
P864S	c.2590C>T	AATTCTCAGAGTTAAAGAAATCTTCAGGTTCCCT	ATTCCTTAACTCTGAGAAATTCGCCACCGTA	QuickChange II
V932M	c.2794G>A	GTATAATCTCATGTGTGTAGC	GCTACACACATGAGATATATAC	Cloning
L939W	c.2816T>G	GGGAAATTTGGGAAATCAGAG	CTCTGATTTCCCAATTTCCC	Cloning
L947S	c.2840T>C	GATCAGGGCATCGTTTTGTTC	GGAACAAAACGATGCCCTGATC	Cloning
L947F	c.2841C>G	AAATCAGAGAGATCAGGGCACTCTTTTGTTCCT	TGCCCTGATCTCTCTGATTTCCAAATTTCC	QuickChange II
S955R	c.2865T>A	TTTGTTCCTCTGATGATGAAAGAGAAAAGCAAG	TTCATCATCAGAGGAACAAAACAATGCCCT	QuickChange II
I966V	c.2896A>G	TACTACTGAAGTCTGGAAATGTAAGAAGCTGTGC	ATTTCCAGACTTCAGTAGTACTTGTCTTTTC	QuickChange II
G998E	c.2993G>A	GCAGAAGATGAAGGAGGCAAG	CTTTGCCCTCTCATCTTCTGC	Cloning
A1017T	c.3049G>A	AGGAGACTATACTAATTTTACTGAGGTCCAAG	AAAAGTTAGTATAGTCTCTCAGGGGGCAT	QuickChange II
E1018D	c.3054G>C	AGACTATACTAATTTTGTGACGTCCAAGGGA	AGCAAAAGTTAGTATAGTCTCTCAGGGGG	QuickChange II
A1025R	c.3073_3074GC>CG	GGATGCAAGAAGCTCTGCTTGG	CCAAGCAGAGCTTCTTGATCC	Cloning
A1025T	c.3073G>A	AGGTCCAAGGATGCAAGAACTCTGCTTGGTA	TTCTTGCAATCCTTGAGACTCAGCAAAAAGT	QuickChange II
T1030I	c.3089C>T	AAGAAGCTCTGCTTGGTACTATTATTATGAACA	AGTACCAAGCAGAGCTTCTTGATCCCTTG	QuickChange II
K1041T	c.3122A>C	ACATTGTTATTTGGAATTTAACAACCTGGTCAAC	TAAATTCCAAATAACAATGTTGTTCAATAAT	QuickChange II
G1043A	c.3128G>C	TTATTTGGAATTTAAAAACTGCTCAACTCTGA	AGTTTTTAAATTCCAAATAACAATGTTGTT	QuickChange II
S1075G	c.3223A>G	GGCTTCTCTTTATTGTCTGGGTCATCCCTGTG	CAGGACAATAAAGAGAAGCCCAATTCAGA	QuickChange II
S1084L	c.3251C>T	CCTGTGCCAAGAGAGTGTGTTGTCGGAAGCC	CTCACTCTCTTTGGCACAGGGATGACTCAG	QuickChange II
I1093T	c.3278T>C	GAAGCCCTGTGTTTTCAGCTCACTGTGATTAACC	GAGCTGAAACACAGGGCTTCGCAACGACTC	QuickChange II
S1102R	c.3306C>G	TTAACCCCTAAGACGACTCTCAGGGTGGGTGTA	GAGAGTCGTCTTAGGGTTAATCACAATGAG	QuickChange II
V1105A	c.3314T>C	AGACGACTCTCAGCGTGGGTGCGATGCTGACT	ACCCACGCTGAGAGTCGCTTAGGGTTAAT	QuickChange II
Q1114H	c.3342G>C	TGTACTGTCTTCCCTCAGGGCACGCTGGCAGGT	CCCTGGAGGAAGACAGTACAGCATCACACC	QuickChange II
L1119P	c.3356T>C	CAGGGCAGGCTGGCAGGTTCCCGGAAGGTGACG	GAACCTGCCAGCTGCCCTGGAGGAAGACA	QuickChange II
W1140G	c.3418T>G	CAATTGCCATTTGGGGACTTACTTC	GAAGTAAGTCCCAATGGCAATTG	Cloning
L1143P	c.3428T>C	GGGACTTACTCTCTCGGTCAG	CTGACCGAGAGGTAAGTCCC	Cloning
I1180T	c.3539T>C	CTGGACAAAAGATGAAATACATTTGTATACC	ATTTCCATCTTTTGTCCAGCCAGCAATG	QuickChange II

3.9 References

1. Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M. et al. (2007) Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nature genetics*, 39, 162-164.
2. Xia, B., Dorsman, J.C., Ameziane, N., de Vries, Y., Rooimans, M.A., Sheng, Q., Pals, G., Errami, A., Gluckman, E., Llera, J. et al. (2007) Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature genetics*, 39, 159-161.
3. Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T. et al. (2007) PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature genetics*, 39, 165-167.
4. Jones, S., Hruban, R.H., Kamiyama, M., Borges, M., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Palmisano, E., Brune, K., Jaffee, E.M. et al. (2009) Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science*, 324, 217.
5. Dansonka-Mieszkowska, A., Kluska, A., Moes, J., Dabrowska, M., Nowakowska, D., Niwinska, A., Derlatka, P., Cendrowski, K. and Kupryjanczyk, J. (2010) A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. *BMC Med Genet*, 11, 20.
6. Ducey, M., Sesma-Sanz, L., Guittou-Sert, L., Lashgari, A., Gao, Y., Brahiti, N., Rodrigue, A., Margailan, G., Caron, M.C., Cote, J. et al. (2019) The Tumor Suppressor PALB2: Inside Out. *Trends Biochem Sci*.
7. Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J. and Livingston, D.M. (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular cell*, 22, 719-729.
8. Ceccaldi, R., Liu, J.C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M.I., O'Connor, K.W., Konstantinopoulos, P.A., Elledge, S.J., Boulton, S.J. et al. (2015) Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Poltheta-mediated repair. *Nature*, 518, 258-262.
9. Mateos-Gomez, P.A., Gong, F., Nair, N., Miller, K.M., Lazzarini-Denchi, E. and Sfeir, A. (2015) Mammalian polymerase theta promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature*, 518, 254-257.
10. Lok, B.H., Carley, A.C., Tchang, B. and Powell, S.N. (2013) RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination. *Oncogene*, 32, 3552-3558.
11. Zhang, F., Fan, Q., Ren, K. and Andreassen, P.R. (2009) PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res*, 7, 1110-1118.
12. Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B. and Yu, X. (2009) PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Current biology : CB*, 19, 524-529.

13. Sy, S.M., Huen, M.S. and Chen, J. (2009) PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 7155-7160.
14. Buisson, R., Dion-Cote, A.M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Xia, B. and Masson, J.Y. (2010) Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nature structural & molecular biology*, 17, 1247-1254.
15. Dray, E., Etchin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G.J., Hammel, M., Yu, X., Galkin, V.E., Liu, D., Tsai, M.S. et al. (2010) Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nature structural & molecular biology*, 17, 1255-1259.
16. Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C. et al. (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434, 917-921.
17. Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J. and Helleday, T. (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434, 913-917.
18. Shen, Y., Rehman, F.L., Feng, Y., Boshuizen, J., Bajrami, I., Elliott, R., Wang, B., Lord, C.J., Post, L.E. and Ashworth, A. (2013) BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clin Cancer Res*.
19. Smith, M.A., Hampton, O.A., Reynolds, C.P., Kang, M.H., Maris, J.M., Gorlick, R., Kolb, E.A., Lock, R., Carol, H., Keir, S.T. et al. (2015) Initial testing (stage 1) of the PARP inhibitor BMN 673 by the pediatric preclinical testing program: PALB2 mutation predicts exceptional in vivo response to BMN 673. *Pediatr Blood Cancer*, 62, 91-98.
20. Smith, M.A., Reynolds, C.P., Kang, M.H., Kolb, E.A., Gorlick, R., Carol, H., Lock, R.B., Keir, S.T., Maris, J.M., Billups, C.A. et al. (2015) Synergistic activity of PARP inhibition by talazoparib (BMN 673) with temozolomide in pediatric cancer models in the pediatric preclinical testing program. *Clin Cancer Res*, 21, 819-832.
21. Buisson, R., Niraj, J., Pauty, J., Maity, R., Zhao, W., Coulombe, Y., Sung, P. and Masson, J.Y. (2014) Breast Cancer Proteins PALB2 and BRCA2 Stimulate Polymerase η in Recombination-Associated DNA Synthesis at Blocked Replication Forks. *Cell Rep*, 6, 553.
22. Ma, J., Cai, H., Wu, T., Sobhian, B., Huo, Y., Alcivar, A., Mehta, M., Cheung, K.L., Ganesan, S., Kong, A.N. et al. (2012) PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. *Molecular and cellular biology*, 32, 1506-1517.
23. Bleuyard, J.Y., Fournier, M., Nakato, R., Couturier, A.M., Katou, Y., Ralf, C., Hester, S.S., Dominguez, D., Rhodes, D., Humphrey, T.C. et al. (2017) MRG15-mediated tethering of PALB2 to unperturbed chromatin

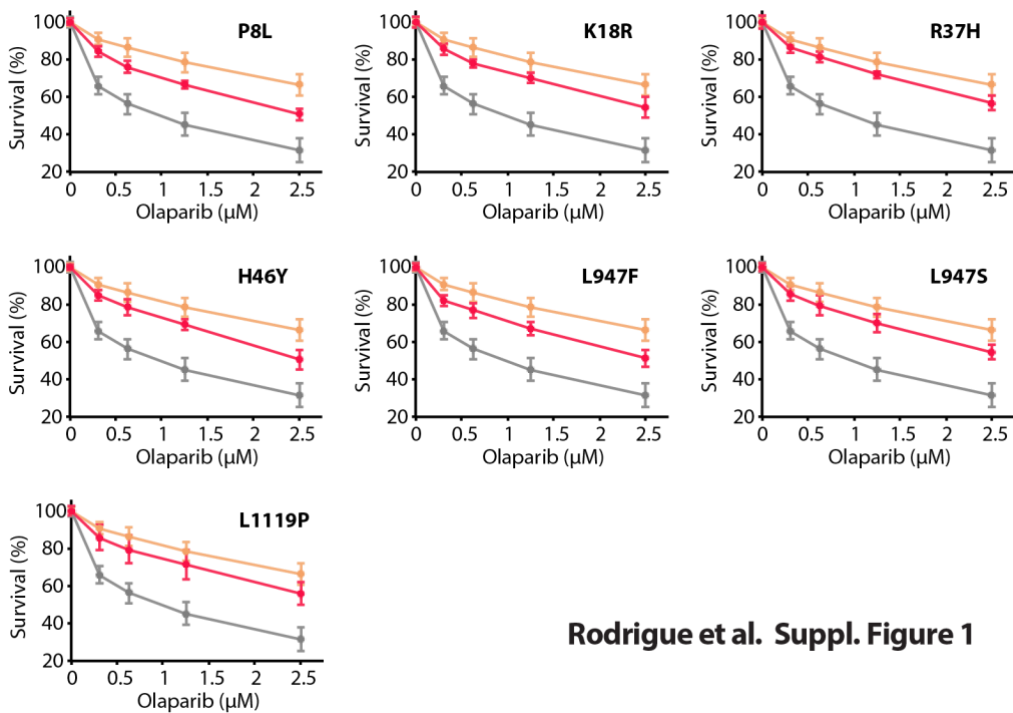
protects active genes from genotoxic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, 7671-7676.

24. Nepomuceno, T.C., De Gregoriis, G., de Oliveira, F.M.B., Suarez-Kurtz, G., Monteiro, A.N. and Carvalho, M.A. (2017) The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition. *Int J Mol Sci*, 18.
25. Buisson, R. and Masson, J.Y. (2012) PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic acids research*, 40, 10312-10323.
26. Sy, S.M., Huen, M.S., Zhu, Y. and Chen, J. (2009) PALB2 Regulates Recombinational Repair through Chromatin Association and Oligomerization. *The Journal of biological chemistry*, 284, 18302-18310.
27. Buisson, R., Ho, C.K., Joshi, N., Rodrigue, A., Foo, T.K., Hardy, E.J.-L., Haas, W., Xia, B., Dellaire, G., Masson, J.-Y. et al. (2017) Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR. *Molecular cell*, 65, 336-346.
28. Orthwein, A., Noordermeer, S.M., Wilson, M.D., Landry, S., Enchev, R.I., Sherker, A., Munro, M., Pinder, J., Salsman, J., Dellaire, G. et al. (2015) A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature*, 528, 422-426.
29. Oliver, A.W., Swift, S., Lord, C.J., Ashworth, A. and Pearl, L.H. (2009) Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep*, 10, 990-996.
30. Park, J.Y., Singh, T.R., Nassar, N., Zhang, F., Freund, M., Hanenberg, H., Meetei, A.R. and Andreassen, P.R. (2014) Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*, 33, 4803-4812.
31. Luijsterburg, M.S., Typas, D., Caron, M.C., Wiegant, W.W., van den Heuvel, D., Boonen, R.A., Couturier, A.M., Mullenders, L.H., Masson, J.Y. and van Attikum, H. (2017) A PALB2-interacting domain in RNF168 couples homologous recombination to DNA break-induced chromatin ubiquitylation. *Elife*, 6.
32. Pauty, J., Couturier, A.M., Rodrigue, A., Caron, M.C., Coulombe, Y., Dellaire, G. and Masson, J.Y. (2017) Cancer-causing mutations in the tumor suppressor PALB2 reveal a novel cancer mechanism using a hidden nuclear export signal in the WD40 repeat motif. *Nucleic acids research*, 45, 2644-2657.
33. Bleuyard, J.Y., Buisson, R., Masson, J.Y. and Esashi, F. (2012) ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair. *EMBO Rep*, 13, 135-141.
34. Sy, S.M., Huen, M.S. and Chen, J. (2009) MRG15 is a novel PALB2 interacting factor involved in homologous recombination. *The Journal of biological chemistry*.
35. Hayakawa, T., Zhang, F., Hayakawa, N., Ohtani, Y., Shinmyozu, K., Nakayama, J. and Andreassen, P.R. (2010) MRG15 binds directly to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks. *Journal of cell science*, 123, 1124-1130.

36. Antoniou, A.C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkas, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leeneer, K., Fostira, F. et al. (2014) Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *The New England journal of medicine*, 371, 497-506.
37. Pauty, J., Rodrigue, A., Couturier, A., Buisson, R. and Masson, J.Y. (2014) Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer. *Biochem J*, 460, 331-342.
38. Erkko, H., Xia, B., Nikkila, J., Schleutker, J., Syrjakoski, K., Mannermaa, A., Kallioniemi, A., Pylkas, K., Karppinen, S.M., Rapakko, K. et al. (2007) A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature*, 446, 316-319.
39. Tischkowitz, M., Xia, B., Sabbaghian, N., Reis-Filho, J.S., Hamel, N., Li, G., van Beers, E.H., Li, L., Khalil, T., Quenneville, L.A. et al. (2007) Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 6788-6793.
40. Antoniou, A.C., Foulkes, W.D., Tischkowitz, M. and Group, P.I. (2015) Breast cancer risk in women with PALB2 mutations in different populations. *Lancet Oncol*, 16, e375-376.
41. Foo, T.K., Tischkowitz, M., Simhadri, S., Boshari, T., Zayed, N., Burke, K.A., Berman, S.H., Blecua, P., Riaz, N., Huo, Y. et al. (2017) Compromised BRCA1-PALB2 interaction is associated with breast cancer risk. *Oncogene*, 36, 4161-4170.
42. Catucci, I., Radice, P., Milne, R.L., Couch, F.J., Southey, M.C. and Peterlongo, P. (2016) The PALB2 p.Leu939Trp mutation is not associated with breast cancer risk. *Breast Cancer Res*, 18, 111.
43. Caleca, L., Catucci, I., Figlioli, G., De Cecco, L., Pesaran, T., Ward, M., Volorio, S., Falanga, A., Marchetti, M., Iacone, M. et al. (2018) Two Missense Variants Detected in Breast Cancer Probands Preventing BRCA2-PALB2 Protein Interaction. *Frontiers in oncology*, 8, 480.
44. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. and Sunyaev, S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7, 248-249.
45. Mathe, E., Olivier, M., Kato, S., Ishioka, C., Hainaut, P. and Tavtigian, S.V. (2006) Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic acids research*, 34, 1317-1325.
46. Carter, H., Douville, C., Stenson, P.D., Cooper, D.N. and Karchin, R. (2013) Identifying Mendelian disease genes with the variant effect scoring tool. *BMC Genomics*, 14 Suppl 3, S3.
47. Jagadeesh, K.A., Wenger, A.M., Berger, M.J., Guturu, H., Stenson, P.D., Cooper, D.N., Bernstein, J.A. and Bejerano, G. (2016) M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nature genetics*, 48, 1581-1586.
48. Ioannidis, N.M., Rothstein, J.H., Pejaver, V., Middha, S., McDonnell, S.K., Baheti, S., Musolf, A., Li, Q., Holzinger, E., Karyadi, D. et al. (2016) REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*, 99, 877-885.

49. Pinder, J., Salsman, J. and Dellaire, G. (2015) Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic acids research*, 43, 9379-9392.
50. Ducey, M., Sesma-Sanz, L., Guitton-Sert, L., Lashgari, A., Gao, Y., Brahiti, N., Rodrigue, A., Margailan, G., Caron, M.C., Côté, J. et al. (2018) The tumor suppressor PALB2: inside out TIBS In press.
51. Song, F., Li, M., Liu, G., Swapna, G.V.T., Daigham, N.S., Xia, B., Montelione, G.T. and Bunting, S.F. (2018) Antiparallel Coiled-Coil Interactions Mediate the Homodimerization of the DNA Damage-Repair Protein PALB2. *Biochemistry*, 57, 6581-6591.
52. Arango, N.P., Yuca, E., Zhao, M., Evans, K.W., Scott, S., Kim, C., Gonzalez-Angulo, A.M., Janku, F., Ueno, N.T., Tripathy, D. et al. (2017) Selinexor (KPT-330) demonstrates anti-tumor efficacy in preclinical models of triple-negative breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 19, 93.
53. Castroviejo-Bermejo, M., Cruz, C., Llop-Guevara, A., Gutierrez-Enriquez, S., Ducey, M., Ibrahim, Y.H., Gris-Oliver, A., Pellegrino, B., Bruna, A., Guzman, M. et al. (2018) A RAD51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation. *EMBO Mol Med*.

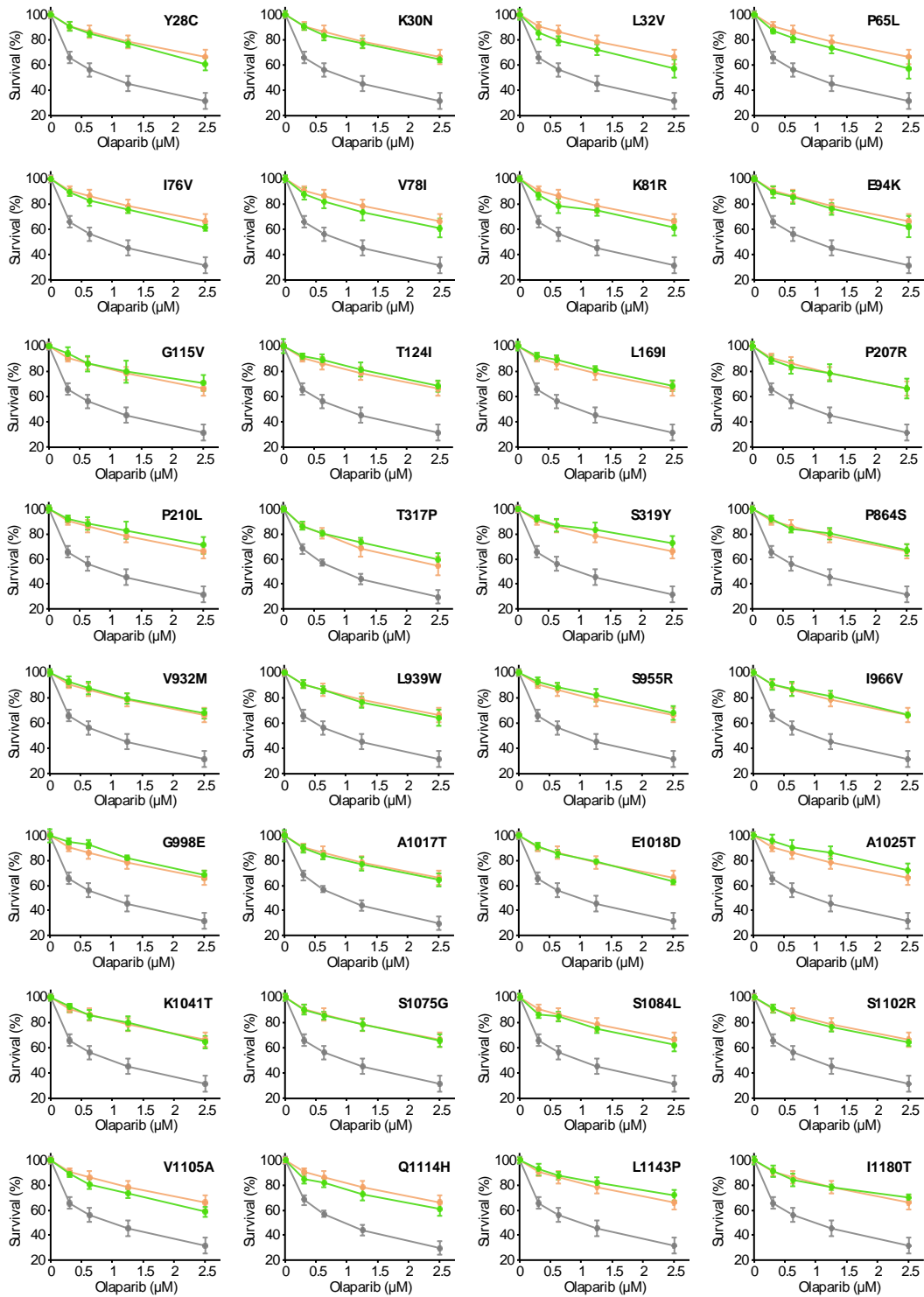
3.10 Supplemental figures



Rodrigue et al. Suppl. Figure 1

Figure S3.1 – Survival curves for *PALB2* variants with moderate sensitivity to PARP inhibitor olaparib (red).

The curves for the wild-type and empty vector are shown in orange and grey, respectively.



Rodrigue et al. Suppl. Figure 2

Figure S3.2 – Survival curves for *PALB2* variants showing resistance to PARP inhibitor olaparib (green) similar to wild-type.

The wild-type and empty vector curves are shown in orange and grey, respectively.

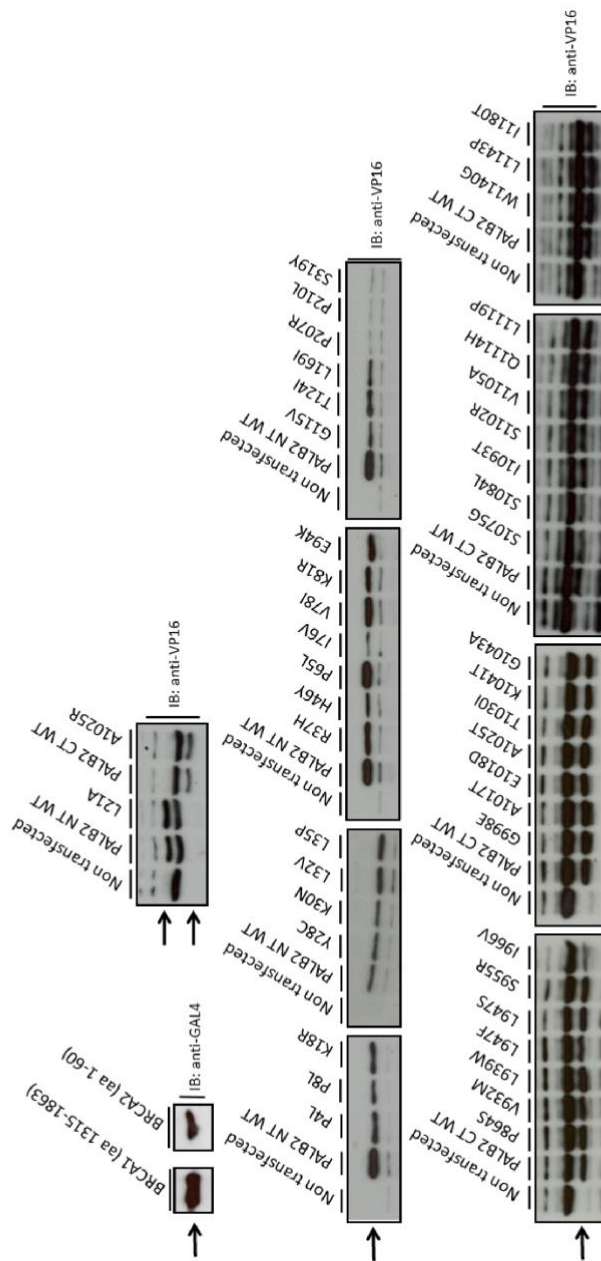


Figure S3.3 – Expression levels of *PALB2* variants in the mammalian two-hybrid analysis.

HEK293FT cells transfected with the indicated constructs were analyzed for protein expression by immunoblotting, 24h post-transfection using anti-VP16 and anti-GAL4 antibodies.

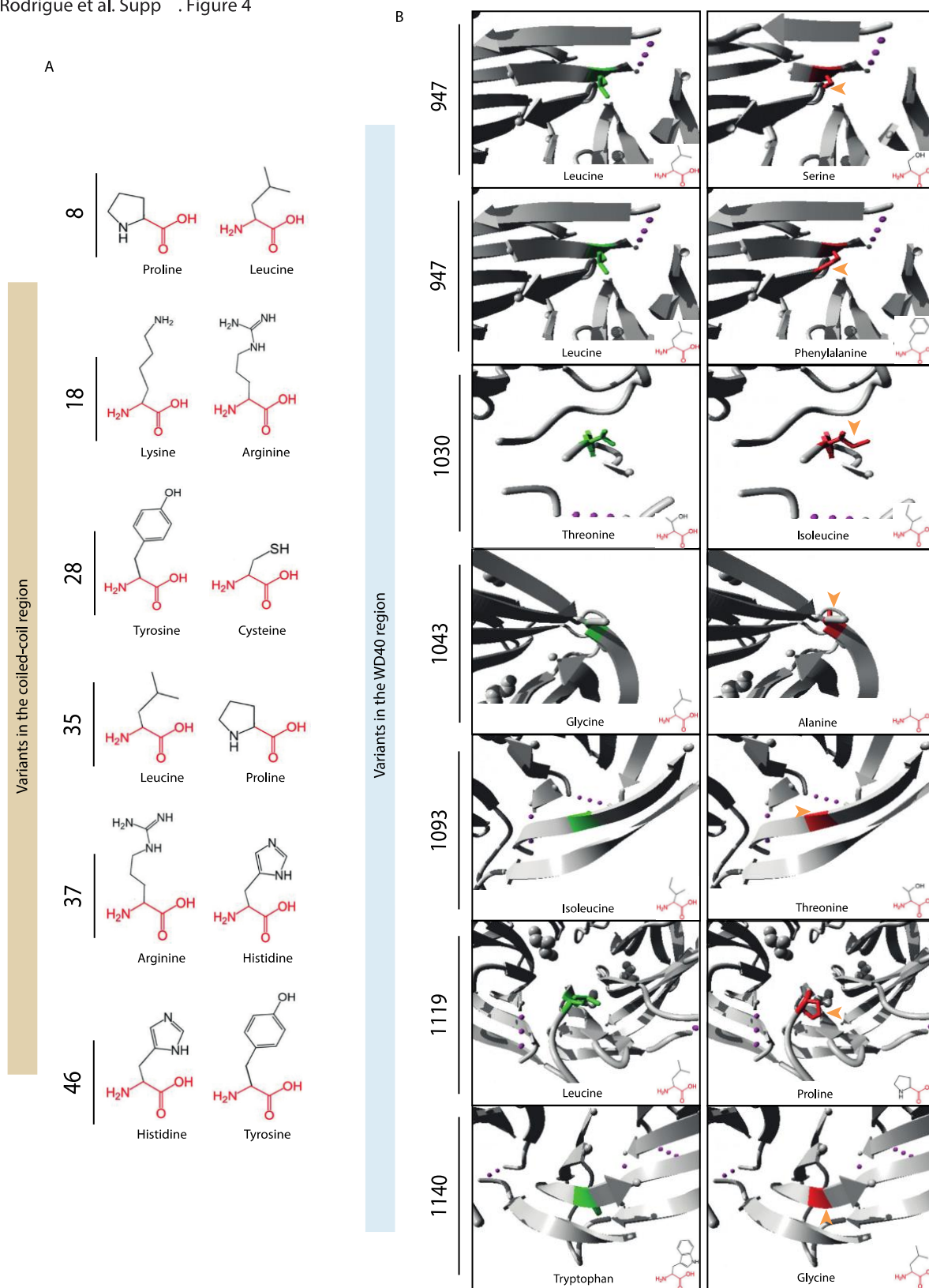


Figure S3.4 – Structural impact of the prioritized variants using HOPE analysis.

(A) Schematic structures of the mutated and corresponding wild-type residues for each variant in the coiled-coil region, with their common backbone (red) and unique side chain (black). **(B)** Close-up images of the WD40 domain obtained from HOPE analysis showing the structural impact of the variations studied in this region. The protein is in grey, the wild-type and variant side chains are in green and red, respectively. In the bottom right corner is the schematic structure of each residue, with their common backbone (red) and unique side chain (black).

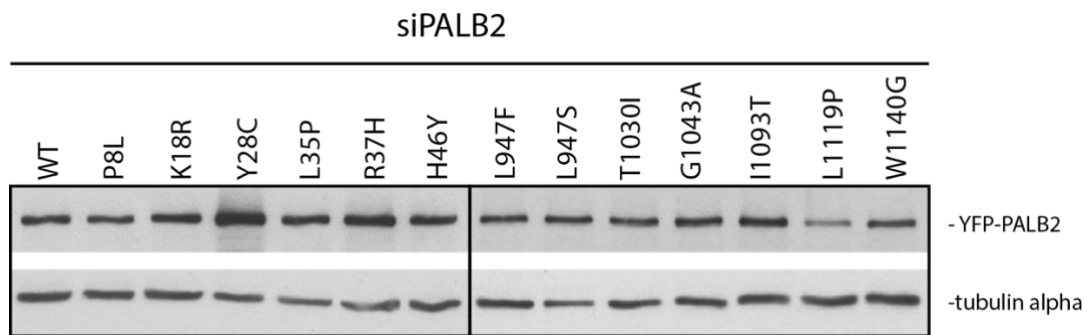
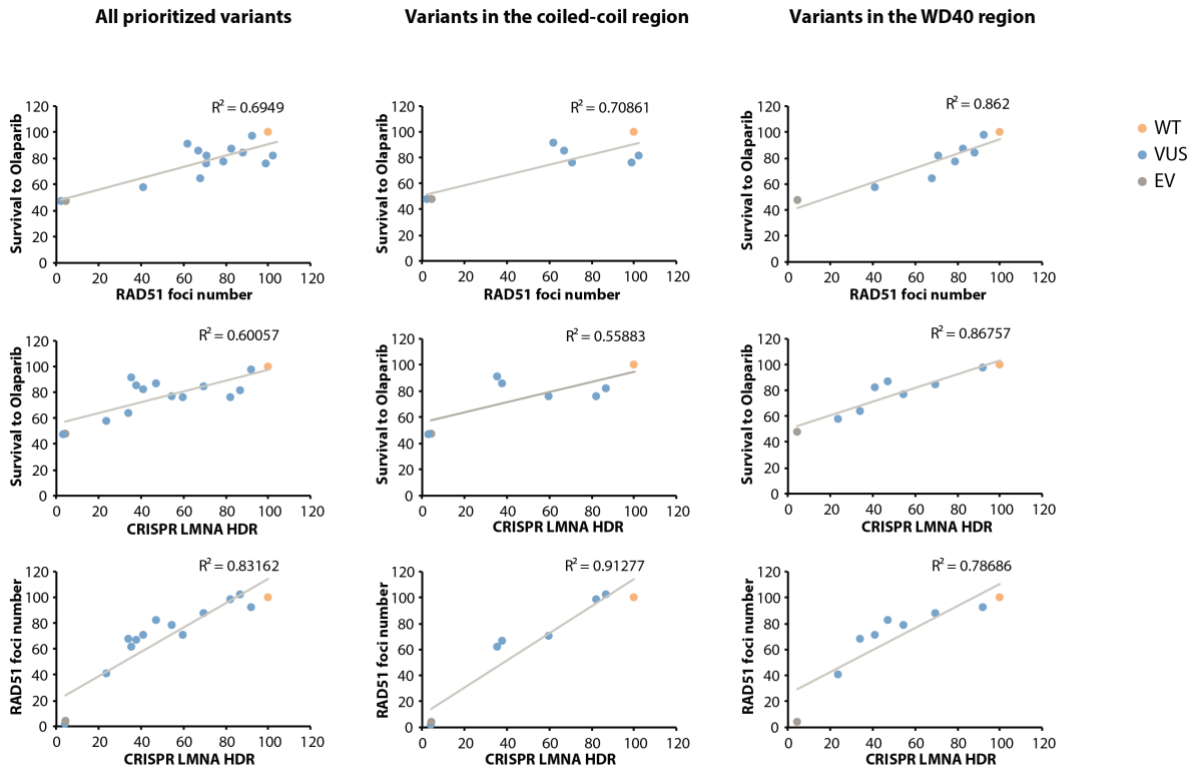


Figure S3.5 – Expression levels of the prioritized *PALB2* variants in HeLa cells.

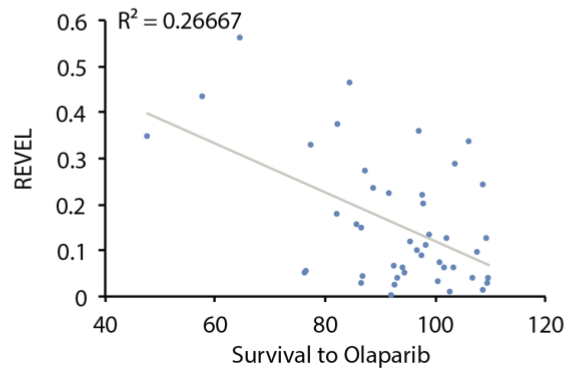
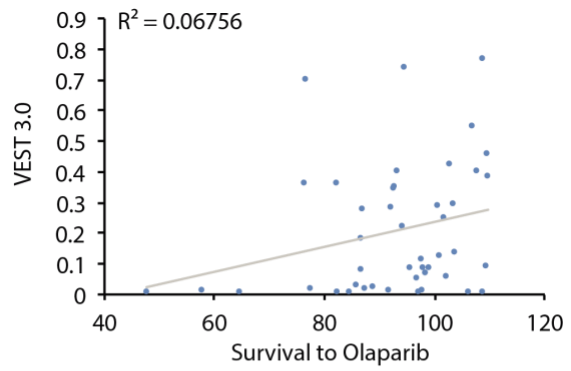
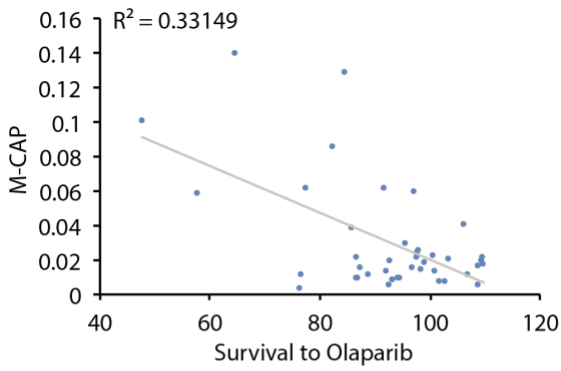
Immunoblotting analysis of *PALB2* missense variants in siPALB2-depleted HeLa cells, 24h post-complementation with the indicated YFP-PALB2 constructs, using PALB2 antiserum and monoclonal anti- α -tubulin antibody as loading control.



Rodrigue et al. Suppl. Figure 6

Figure S3.6 – Correlations between functional assays.

Scatter graphs showing the correlations between the outcomes of functional assays for all the prioritized variants or categorized by domain. Values are expressed in percentage relative to WT (set to 100%).



Rodrigue et al. Supp Figure 7

Figure S3.7 – Correlations between *in silico* predictions and response to olaparib.

Scatter graphs showing the correlations between *in silico* predictions (by M-CAP, VEST 3.0 and REVEL) and survival to olaparib for all 44 *PALB2* VUS. Survival data are expressed in percentage relative to WT (set to 100%).

4 CHAPITRE 4 – Criblage fonctionnel de 10 variations génétiques faux sens dans le gène de susceptibilité au cancer du sein *PALB2*.

4.1 Avant-propos

Au cours de notre collaboration avec le Dr Monteiro, j'ai eu la chance de sélectionner 10 variants faux sens localisés dans *PALB2*, afin de les cribler fonctionnellement. Ce projet étant toujours en cours, les résultats obtenus pour le moment ne font pas l'objet d'un article. J'ai sélectionné et caractérisé les variants décrit dans ce chapitre de manière autonome.

4.2 Résumé

PALB2 est un gène de susceptibilité associé au cancer du sein (CS) et du pancréas. Les variations de *PALB2* identifiées en cliniques chez des patientes de CS sont recensées sur des bases de données publiques comme ClinVar. Cependant, la compréhension et l'interprétation clinique des variations faux sens reste un défi à ce jour, particulièrement dans le contexte de la prise en charge des patientes et leurs familles. Nous avons donc entrepris le criblage de 10 variations faux sens de *PALB2*, localisées dans le motif ChAM et le domaine WD40, identifiées par séquençage d'exome dans le laboratoire du Dr Simard ou recensées sur ClinVar, avec notre méthode systématique d'essais fonctionnels. Nos résultats préliminaires ne nous permettent pas encore la classification de ces variations et notre étude doit donc être poursuivie afin de classer rigoureusement ces variations comme bénignes ou délétères pour la fonction de *PALB2* dans la réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologue.

4.3 Introduction

Identifié en 2006 par co-immunoprécipitation de BRCA2, PALB2 (*Partner and Localizer of BRCA2*) est un médiateur de la réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue (RH) [77, 210]. En plus de permettre la localisation et la stabilisation de BRCA2 sur l'ADN endommagé, PALB2 permet de lier fonctionnellement les deux gènes de susceptibilité au cancer du sein (CS) *BRCA1* et *BRCA2* [208, 224]. Suite à son recrutement par BRCA1 au site de dommage, PALB2 recrute BRCA2 et stimule la formation du nucléofilament RAD51, une étape clef de la réparation fidèle par RH [173].

La découverte de PALB2 et son rôle dans la RH s'est accompagnée de l'identification de variations de *BRCA2* chez des patientes de CS, qui empêchent la formation du complexe BRCA2-PALB2 [77]. Ceci a permis de mettre en lumière le possible rôle de PALB2, comme nouveau gène de susceptibilité au CS. De nombreux criblages génétiques ont été effectués par la suite et ont permis de confirmer une association des variations génétiques hétérozygotes de *PALB2* aux cancers du sein [78] et du pancréas [89, 204]. De plus, les mutations homozygotes de *PALB2* sont responsables de l'anémie de Fanconi et constituent le groupe de complémentation FA-N [81, 95].

La présence de mutations hétérozygotes dans *PALB2* augmente le risque de développer le CS de 8 à 9 fois pour les femmes de moins de 40 ans et de 3 à 4 fois au cours de la vie des porteuses [78]. Le criblage génétique de variations dans *PALB2* est donc effectué en routine en clinique d'oncogénétique pour les patientes *gBRCA1/2*-négatives avec une histoire familiale de CS. Afin de permettre leur interprétation clinique, les variations de *PALB2* identifiées doivent être classées comme bénignes ou pathogéniques par des comités d'experts comme l'*American College of Medical Genetics (ACMG)*. Cependant la majorité des variants identifiés correspondent à des variations de type faux sens pour lesquelles, une caractérisation fonctionnelle est indispensable afin de comprendre leurs effets sur la fonction de PALB2. Au vu de la quantité de variations faux sens identifiées dans *PALB2* (environ 200) et le temps nécessaire à la caractérisation fonctionnelle de ces variants, la quasi-totalité d'entre eux est considérée comme des VUSs (*Variants of Uncertain Significance*). À ce jour, 8 variants faux sens de *PALB2* ont été caractérisés et seuls p.L35P est considéré comme un variant pathogénique [174, 209, 235]. Faute de classification de ces VUSs comme bénins ou pathogéniques, les médecins ne sont pas en mesure d'interpréter l'effet de ces variants sur le risque des porteuses de développer la maladie. Par conséquent, la prise de décision concernant le suivi médical des patientes, les mesures chirurgicales préventives et le choix des stratégies thérapeutiques est compliqué.

Afin d'améliorer la classification des VUSs, nous avons entrepris le criblage fonctionnel des variants de *PALB2* grâce à notre méthode systématique d'essais fonctionnels. Ces expériences sont centrées sur le rôle de PALB2 dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN par RH.

En effet, nous estimons que l'étude de la cinétique de recrutement de PALB2 et la formation des foyers RAD51 aux sites de dommages à l'ADN, ainsi que l'évaluation de la RH par le système CRISPR-LMNA dans les cellules humaines, nous permettra d'estimer l'effet des variants d'intérêts sur la fonction de PALB2 dans la RH. Enfin, nous avons entrepris l'évaluation de la survie cellulaire après traitement à l'olaparib, un inhibiteur de poly(ADP-ribose) polymérase (PARP). En effet, nous avons récemment démontré que l'évaluation de la formation des foyers RAD51 aux sites de dommages à l'ADN est un biomarqueur spécifique et sensible, qui permet de corrélérer les défauts de RH avec la réponse aux inhibiteurs de PARP dans des tumeurs de patientes de CS *gPALB2*-positives [244]. Cette information nous permettra de prédire la réponse des patientes porteuses de variations de PALB2 caractérisées, aux traitements thérapeutiques basés sur les inhibiteurs de PARP comme l'Olaparib.

À travers nos collaborations avec les Dr Couch, Dr Monteiro et Dr Carvalho, nous avons pu évaluer l'effet d'une quarantaine de variants sur la fonction de PALB2 dans la RH. Dans la continuité de ce travail collaboratif, j'ai eu la chance de sélectionner 10 VUSs faux sens de *PALB2*, préalablement identifiés par séquençage d'exomes dans une étude cas-contrôle réalisée dans le laboratoire du Dr Simard ou recensés dans la base de données clinique publique Clinvar. Dans ce chapitre, je vous présente comment j'ai sélectionné ces variants et les résultats préliminaires que j'ai obtenus pour ces 10 VUSs.

4.4 Matériel et méthode

Lignées cellulaires

Les cellules HeLa (CCL-2) proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) et ont été maintenues dans un milieu DMEM (Corning) supplémenté avec 10% de FBS et 1% de P/S.

Construction des plasmides

Les variants d'intérêts ont été générés par mutagenèse dirigée avec le kit Q5 Site-Directed Mutagenesis kit (New England Biolabs) dans le vecteur PALB2-YFP. Les amorces utilisées pour l'amplification ont été conçues à l'aide de la plateforme NEBbasechanger et synthétisées par Integrated DNA Technologies (**Table S4.1**). Les plasmides ont été vérifiés par séquençage Sanger.

Formation des foyers PALB2 aux sites de dommages à l'ADN induits par micro-irradiation

Les expériences de micro-irradiation ont été réalisées par imagerie sur des cellules vivantes à l'aide du microscope confocal Leica TCS SP5 II, avec l'objectif à immersion réglé sur le grossissement 63x/1. Les données ont été analysées par le logiciel Leica LAS AF. Le microscope était équipé d'une chambre réglée à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules HeLa ont étéensemencées sur des pétris de 35-mm (World Precision Instruments, Inc.), où elles ont été transfectées avec 800 ng du plasmide YFP-PALB2 WT ou muté, à l'aide de l'agent de transfection Effectene (Qiagen). Le lendemain, les cellules ont été micro-irradiées au niveau du noyau, à l'aide d'un laser UV (405 nm) pendant 200 ms avec les réglages suivants : format 512 X 512 pixels, vitesse de balayage 100 Hz, mode bidirectionnel, zoom 1.5X. Afin de monitorer le recrutement de YFP-PALB2 aux sites de dommages à l'ADN induits par micro-irradiation, un total de >100 cellules sur un minimum de 3 expériences indépendantes, ont été micro-irradiées et imagées à chaque 30 secondes, sur une période de 15 minutes. L'intensité de la fluorescence de YFP-PALB2 aux sites de dommages à l'ADN a été normalisée par rapport à une zone nucléaire non irradiée dans la même cellule, et quantifiée au cours du temps. Pour chaque condition, le nombre de cellules pour laquelle l'intensité relative de la fluorescence augmente par rapport au niveau basal de 100% après irradiation, a été évalué et répertorié sur les graphiques comme des pourcentages (\pm SEM) de cellules positives pour le recrutement de PALB2. Les courbes de cinétique de recrutement ont été obtenues par la moyenne de l'intensité relative de la fluorescence pour les cellules positives pour le recrutement (>70 cellules)

et les barres d'erreur représentent la SEM. La quantification de la localisation cellulaire a été déterminée par microscopie sur des cellules vivantes, avant micro-irradiation (n>100).

Survie cellulaire après traitements à l'olaparib

Pour chaque condition, 240 000 cellules HeLa ont étéensemencées sur des plaques de 6 puits puis transfectées 6-8 heures plus tard avec 50 nM de siARN contrôle ou PALB2, à l'aide de l'agent Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Le lendemain matin, les cellules ont été complémentées avec 800 ng de plasmide YFP-PALB2 WT ou muté à l'aide de l'agent Lipofectamine 2000 (Invitrogen), puis incubées pendant 24 heures. Ensuite les cellules ont étéensemencées en triplicata dans des plaques de 96 puits avec fond transparent et rebord noir Corning 3603, à une densité de 3 000 cellules par puit. Une fois adhérentes, des concentrations croissantes d'olaparib ont été ajoutées au milieu à une concentration finale allant de 0 μ M (DMSO) à 2.5 μ M. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 3 jours puis les noyaux ont été teints au Hoechst 33342 (Invitrogen) à une concentration de 10 μ g/ml dans le milieu pendant 45 minutes, à 37°C. Des images des puits entiers ont été acquises au grossissement 4x à l'aide du lecteur de plaque Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader, suivi par une quantification des noyaux teints au Hoechst avec le logiciel Gen5 Data Analysis Software v3.03 (BioTek Instruments). La survie cellulaire a été exprimée en pourcentage de survie relative dans les cellules traitées à l'olaparib comparativement aux cellules traitées avec du DMSO seul. Les résultats représentent les moyennes \pm SD d'un minimum de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 6 GraphPad, et la significativité a été déterminée en appliquant un t-test avec une correction de Welch (moyenne \pm SEM de >3 expériences indépendantes). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001 et (****) p<0,0001.

4.5 Résultats

4.5.1 Sélection des variations d'intérêts

L'équipe du Dr Simard s'est spécialisée dans le séquençage d'exomes, afin d'identifier de nouveaux gènes de susceptibilité au CS ainsi que de nouvelles variations génétiques dans des gènes de prédisposition déjà connus, comme *PALB2*. Au cours du séquençage d'exomes, impliquant l'analyse de données d'exomes provenant d'environ 1 500 cas de CS et 3 700 contrôles suivi d'une validation des gènes candidats dans une étude de séquençage ciblé d'environ 13 000 cas et contrôles, les variants p.S417Y et p.L931R ont été identifiés chez 2 femmes atteintes d'un CS. J'ai donc inclus ces 2 variants à ma liste d'intérêt. Il est intéressant de noter que le variant S417Y identifié lors du séquençage d'exome dans l'étude cas-contrôle du Dr Simard est aussi présent dans la liste réalisée par le Dr Monteiro à partir de la base de données ClinVar. Cette variation est donc présente dans au moins 2 femmes différentes atteintes d'un CS.

Le Dr Monteiro a établi une liste de variants localisés dans *PALB2* identifiés en clinique chez des patientes *gBRCA1/2*-négatives, à partir de la base de données clinique ClinVar. J'ai eu l'opportunité de choisir parmi cette liste d'une centaine de variants, 9 VUSs de *PALB2*, pour effectuer leur criblage fonctionnel de manière autonome (**Figure 4.1**).

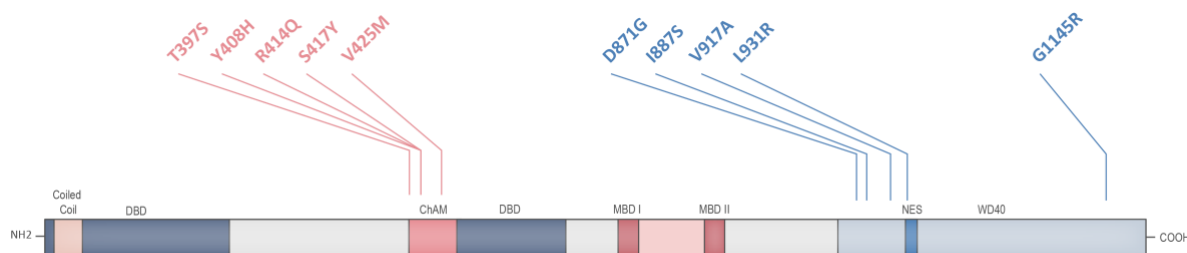


Figure 4.1 – Localisation des variants faux sens de *PALB2* sélectionnés

Les variants p.S417Y et p.L931R ont été identifiées par séquençage d'exome dans une étude cas-contrôle réalisée par l'équipe du Dr Simard. Les autres variants ont été sélectionnés à partir de la base de données cliniques publique ClinVar. À noter que le variant p.S417Y fait aussi parti de cette liste. Cinq variants sont localisés dans le motif ChAM et cinq variants sont localisés dans le domaine WD40 de PALB2.

PALB2 est constitué de nombreux domaines d'interaction, qui ensemble, lui permettent de jouer son rôle de gardien de l'intégrité du génome. Le domaine WD40 est particulièrement étudié puisqu'il permet l'interaction de PALB2 aux protéines de la RH BRCA2, RAD51 et RAD51C [79, 173, 174]. De plus, l'activité de PALB2 dans la RH est régulée au cours du cycle cellulaire via son interaction avec l'ubiquitine ligase RNF168 [152]. Enfin, c'est par le domaine WD40 que PALB2 lie l'ADN polymérase *éta* (POLH) au niveau des fourches de réplifications effondrées [172]. D'autre part, certaines mutations tronquantes de PALB2 localisées dans le domaine WD40 de la protéine et identifiées en clinique chez des patientes de CS sont responsables de la délocalisation au cytoplasme de PALB2. Cet export nucléaire serait causé par le mauvais repliement de ce domaine en tonneau beta tronqué, révélant ainsi une séquence NES (*Nuclear Export Signal*). La protéine CRM1 serait alors impliquée dans la reconnaissance et la prise en charge de PALB2 mutée pour son export nucléaire [175]. J'ai donc choisi 4 VUSs du WD40, pour lesquelles un effet dommageable est prédit par les différents logiciels d'analyses *in silico* utilisés (Align GVGD, SIFT et PolyPhen2), afin d'évaluer l'effet de ces variants sur le rôle de PALB2 dans la RH et sa localisation cellulaire (**Figure 4.2**).

ChAM	Nucléotide	Allèle	Align GVGD			SIFT		PP2	
			GV	GD	Prédiction	Score SIFT	Prédiction	Score PP2	Prédiction
T397S	c.1189	A>T	0.00	57.75	Classe C55	0.03	DOMMAGEABLE	1	PROBABLEMENT DOMMAGEABLE
Y408H	c.1222	T>C	0.00	83.33	Classe C65	0	DOMMAGEABLE	1	PROBABLEMENT DOMMAGEABLE
R414Q	c.1241	G>A	0.00	42.81	Classe C35	0.01	DOMMAGEABLE	0.998	PROBABLEMENT DOMMAGEABLE
S417Y	c.1250	C>A	99.13	109.77	Classe C15	0	DOMMAGEABLE	1	PROBABLEMENT DOMMAGEABLE
V425M	c.1273	G>A	31.78	0.00	Classe C0	0.01	DOMMAGEABLE	0.023	BÉNIGNE

WD40	Nucléotide	Allèle	Align GVGD			SIFT		PP2	
			GV	GD	Prédiction	Score SIFT	Prédiction	Score PP2	Prédiction
D871G	c.2612	A>G	23.01	77.99	Classe C35	0	DOMMAGEABLE	1	PROBABLEMENT DOMMAGEABLE
I887S	c.2660	T>G	97.04	78.12	Classe C15	0	DOMMAGEABLE	1	PROBABLEMENT DOMMAGEABLE
V917A	c.2750	T>C	49.94	64.43	Classe C15	0.01	DOMMAGEABLE	0.98	PROBABLEMENT DOMMAGEABLE
L931R	c.2792	T>G	4.86	97.59	Classe C65	0.001	DOMMAGEABLE	1	PROBABLEMENT DOMMAGEABLE
G1145R	c.3433	G>C	55.27	95.76	Classe C25	0.07	TOLÉRÉ	1	PROBABLEMENT DOMMAGEABLE

Figure 4.2 – Prédiction de la pathogénicité pour les variations sélectionnées

Les analyses *in silico* ont été réalisées via les plateformes Align GVGD, SIFT et PolyPhen2, pour chacun des variants d'intérêt.

D'autre part, au moment où j'ai effectué mon choix, aucun VUS dans le motif ChAM n'avait encore été caractérisé. Au vu du rôle de ce motif dans le recrutement de PALB2 à la chromatine, j'étais intéressée de voir si des variations de type faux sens pouvaient avoir un effet sur la RH médiée par PALB2. J'ai donc sélectionné toutes les variations situées dans cette région d'interaction, à partir de la liste du Dr Monteiro, soit 5 variants (incluant le variant p.S417Y identifié par séquençage d'exomes dans le laboratoire du Dr Simard). J'ai ensuite procédé aux analyses *in silico* qui m'ont indiqué que globalement les variants du ChAM sont prédits pour être dommageables (**Figure 4.2**).

4.5.2 Caractérisation fonctionnelle des variants du ChAM

Nous avons tout d'abord procédé à l'étude de la localisation cellulaire des variants localisés au niveau du motif ChAM. Nous avons ainsi pu observer que les VUSs du ChAM YFP-PALB2-ChAM* exprimés dans les cellules HeLa sont situés majoritairement au noyau, comme le contrôle YFP-PALB2 WT (*wild-type*) (**Figure 4.3.A**). Suite à la micro-irradiation des cellules avec un laser provoquant des dommages à l'ADN, les protéines exprimées YFP-PALB2-ChAM* et YFP-PALB2 WT, à l'exception du variant p.Y408H, sont en mesure de former des foyers de réparation PALB2 au niveau du site de lésion. Le variant p.Y408H présente des défauts de formation de foyers PALB2 avec environ 20% des cellules irradiées qui sont en mesure de former des foyers contre environ 70% pour YFP-PALB2 WT (**Figure 4.3.B**). L'analyse de la cinétique de recrutement des protéines YFP-PALB2 confirme un défaut de recrutement de p.Y408H, avec une diminution du recrutement relative au YFP-PALB2 WT de 80%. De plus, le variant p.S417Y, semble présenter un phénotype intermédiaire avec une légère diminution, néanmoins significative, d'environ 30% par rapport au contrôle YFP-PALB2 WT (**Figure 4.3.C**).

Nous avons d'autre part mesuré la survie cellulaire dans des cellules HeLa déficientes pour PALB2, suite à un traitement d'interférence ARN spécifique anti-PALB2, qui expriment nos plasmides YFP-PALB2-ChAM* d'intérêts. De manière surprenante le variant p.Y408H ne semble pas affecter de manière importante la réponse au traitement à l'olaparib. De plus, le variant p.S417Y ne semble pas générer une sensibilité à l'olaparib. De manière intéressante, le variant p.T397S entraîne une diminution de la survie après traitement à l'olaparib (**Figure 4.3.D**).

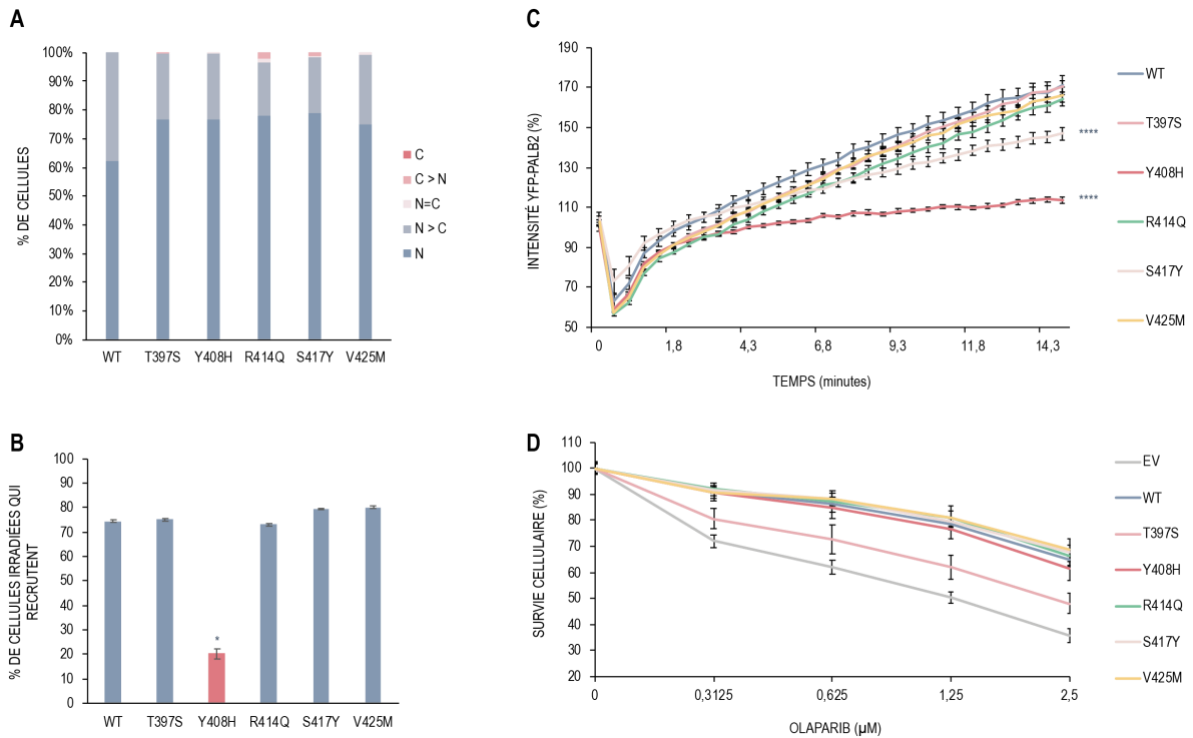


Figure 4.3 – Caractérisation des variants du ChAM

(A) Localisation cellulaire des variants YFP-PALB2-ChAM comparativement au WT. (B) Formation des foyers PALB2 aux sites de dommages à l'ADN induits par laser, dans les cellules irradiées exprimant les variants YFP-PALB2-ChAM comparativement au WT. (C) Cinétique de recrutement aux sites de dommages à l'ADN induits par laser, des variants YFP-PALB2-ChAM comparativement au WT. (D) Effet des variants YFP-PALB2-ChAM sur la survie cellulaire après traitement à l'olaparib, comparativement au WT.

4.5.3 Caractérisation fonctionnelle des variants du WD40

La localisation cellulaire des protéines YFP-PALB2-MRG15* nous a permis d'observer que les variants p.D871G, p.L931R et p.G1145R sont majoritairement nucléaires, comme le contrôle YFP-PALB2 WT. Les variants p.I887S et p.V917A néanmoins présentent une importante délocalisation au cytoplasme (**Figure 4.4.A**). De manière intéressante, alors que les variants nucléaires p.D871G, p.L931R et p.G1145R permettent la formation de foyers YFP-PALB2 dans environ 70%-80% des cellules irradiées qui les expriment, de manière semblable au contrôle YFP-PALB2 WT, les variants cytoplasmiques p.I887S et p.V917A permettent la formation de foyers YFP-PALB2-WD40* dans seulement 30%-40% des cellules irradiées qui les expriment (**Figure 4.4.B**). Ces défauts de formation de foyers PALB2 aux sites de dommages sont confirmés par leurs cinétiques de recrutement respectives après induction de dommages à l'ADN par micro-irradiation. En effet, alors que les cinétiques de recrutement des variants p.D871G, p.L931R et p.G1145R sont semblables à celle du contrôle

YFP-PALB2 WT, les cinétiques de recrutement des variants p.I887S et p.V917A présentent une diminution d'environ 80% comparativement au contrôle YFP-PALB2 WT (**Figure 4.4.C**).

Les analyses de survie cellulaire après traitement à l'olaparib indiquent que les variants p.I887S et p.V917A génèrent une sensibilité à l'olaparib semblable à celle du contrôle négatif (vecteur vide EV). Le variant p.G1145R lui ne semble pas influencer la survie cellulaire après traitement comparativement au contrôle WT. De manière surprenante, les variants nucléaires p.D871G et L931R, qui ne présentent pas de défaut de recrutement et de formation de foyers PALB2 aux sites de dommages, induisent une sensibilité à l'olaparib semblable au contrôle négatif (vecteur vide EV) (**Figure 4.4.D**).

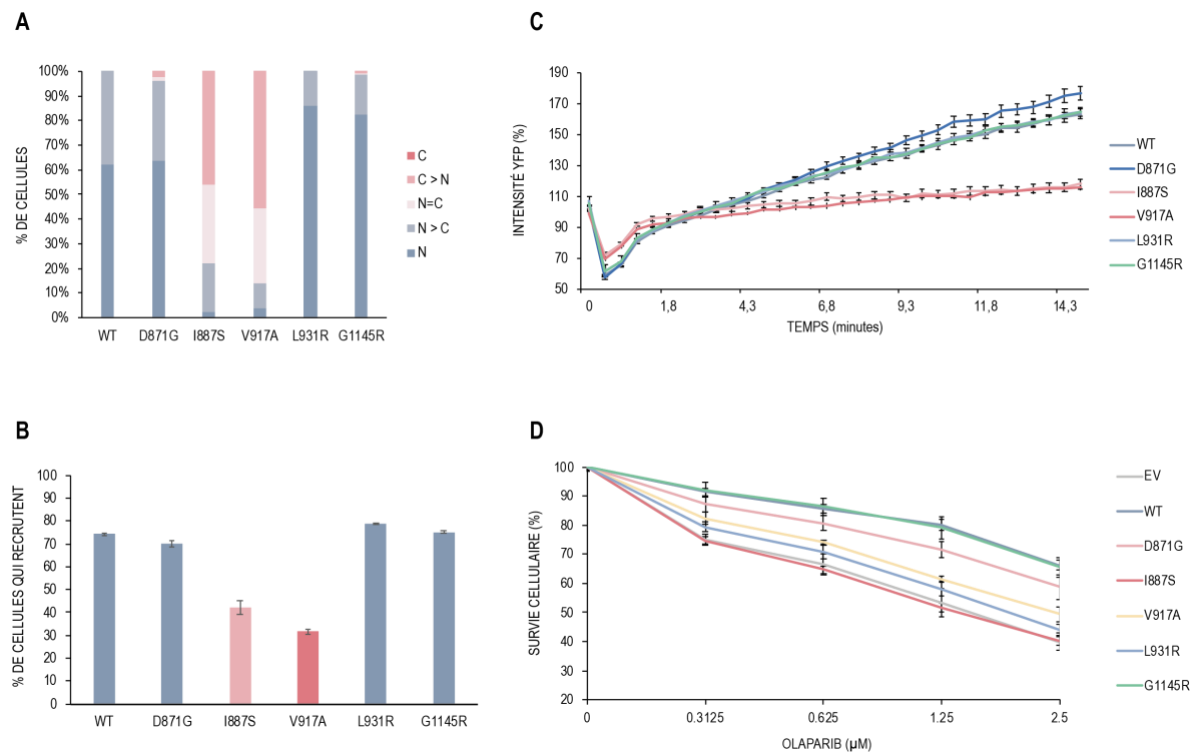


Figure 4.4 – Caractérisation des variants du WD40

(A) Localisation cellulaire des variants YFP-PALB2-WD40 comparativement au WT. **(B)** Formation des foyers PALB2 aux sites de dommages à l'ADN induits par laser, dans les cellules irradiées exprimant les variants YFP-PALB2- WD40 comparativement au WT. **(C)** Cinétique de recrutement aux sites de dommages à l'ADN induits par laser, des variants YFP-PALB2- WD40 comparativement au WT. **(D)** Effet des variants YFP-PALB2-WD40 sur la survie cellulaire après traitement à l'olaparib, comparativement au WT.

4.6 Discussion

Au cours de ce projet, j'ai procédé au criblage de 10 variations faux sens de P *PALB2* ALB2 localisées dans le motif ChAM et le domaine WD40, dont la signification est incertaine. Pour cela, j'ai étudié la localisation cellulaire des variants d'intérêts, ainsi que leurs effets sur le recrutement de PALB2 aux sites de dommages à l'ADN et la survie cellulaire après traitement à l'olaparib, un inhibiteur de PARP. Ces travaux s'inscrivent dans notre objectif de caractérisation exhaustive des VUSs de *PALB2* afin d'améliorer leur interprétation clinique. Les techniques utilisées ici m'ont permis d'identifier 4 variants potentiellement délétères, pour lesquels une caractérisation plus profonde, nous permettra de conclure sur leurs scores d'effet délétère pour la fonction de PALB2 dans la RH.

Ainsi, le variant p.Y408H présente une diminution importante de l'efficacité et de la cinétique de recrutement de PALB2 aux sites de dommage à l'ADN induits par microirradiation. De manière surprenante, ce variant ne semble pas générer des défauts de RH assez importants pour induire une sensibilité à l'olaparib. De plus, le variant p.S417Y présente un phénotype intermédiaire pour la cinétique de recrutement de PALB2 aux sites de lésions mais ne semble pas être sensible à l'olaparib. Enfin, le variant p.T397S lui présente une réponse au traitement à l'olaparib comparable à celle du vecteur vide (EV), malgré un bon recrutement de PALB2 aux lésions de l'ADN. Nos résultats préliminaires ne nous permettent pas de statuer sur l'effet des 5 VUSs du ChAM analysés, cependant elles nous permettent d'identifier des VUSs potentiellement délétères pour la fonction de PALB2 dans la RH. Des expériences de formation de foyers RAD51 et de RH médiée par le système CRISPR-LMNA seront indispensables pour classer ces variants comme délétères ou non. Le ChAM étant impliqué dans la localisation de PALB2 à la chromatine, il serait important d'analyser par fractionnement cellulaire, la quantité de protéine PALB2 mutée localisée à la chromatine comparativement à la fraction nucléaire. Par ailleurs, il est intéressant de noter que notre collaborateur Dr Fergus Couch a analysé l'effet des variants p. Y408H, p.S427Y et p.T397S sur la RH à l'aide de son système rapporteur DR-GFP. Les résultats obtenus montrent une capacité de RH équivalente au WT avec une augmentation relative respective de 4.9, 7.2, 5.2 et 5 pour le WT (*référence Figure 2.1 Chapitre 2*).

Les variants p.I887S et p.V917A présentent tous deux les mêmes phénotypes de délocalisation au cytoplasme, de diminution de l'efficacité de recrutement ainsi que de la baisse importante de la cinétique de recrutement de PALB2 aux sites de dommages. Les variants p.I887S et p.V917A montrent aussi une sensibilité importante et intermédiaire respectivement, à l'olaparib. Seules les expériences de formation de foyers RAD51 et de RH médiée par le système CRISPR-LMNA nous permettront de confirmer une présence ou absence de défauts de RH pour ces variants. De manière intéressante, le variant p.L931R présente une sensibilité à l'olaparib similaire à p.I887S et au contrôle négatif (EV), malgré une localisation nucléaire et un recrutement

efficace de PALB2 aux sites de dommages à l'ADN. Ceci pourrait indiquer un effet de ce variant sur la capacité de PALB2 à interagir avec ses partenaires de la RH BRCA2 et RAD51. Les expériences de formation de foyers RAD51, de RH médiée par le système CRISPR-LMNA ainsi que des expériences de co-immunoprécipitation, nous permettront de valider cette hypothèse. Il est intéressant de noter ici aussi que les résultats de RH obtenus par l'équipe du Dr Fergus Couch indiquent une faible diminution de l'efficacité de la RH pour le variant p.L931R (3.6 vs 5 pour le WT).

4.7 Tableau supplémentaire

Tableau S4.1 – Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée

Variant	Allèle	Nom	Séquence	Longueur (nt)	% GC	T _m	T _a
T397S	c.1189 A>T	Q5SDM_2/16/2017_F	ACATTCTTGCcCAGTGCCTGAAG	23	48	63°C	59°C
		Q5SDM_2/16/2017_R	TTTCTGCAGAAAGAGGAG	19	42	58°C	
Y408H	c.1222 T>C	Q5SDM_2/16/2017_F	TCCTGCAGAAcATTATGTTAGAACAAC	27	37	61°C	63°C
		Q5SDM_2/16/2017_R	AACAGAAGGCCTTCAGGC	18	56	65°C	
R414Q	c.1241 G>A	Q5SDM_2/16/2017_F	AGAACAACACaAAGCATGTCC	21	43	58°C	59°C
		Q5SDM_2/16/2017_R	AACATAATATTCTGCAGGAAAC	22	32	58°C	
S417Y	c.1250 C>A	Q5SDM_2/16/2017_F	CGAAGCATGtCAATTGCCAG	21	48	63°C	60°C
		Q5SDM_2/16/2017_R	TGTTGTTCTAACATAATATTCTGC	24	29	59°C	
V425M	c.1273 G>A	Q5SDM_2/17/2017_F	GAAAGTAGCCaTGGAGGCTGT	21	52	64°C	61°C
		Q5SDM_2/17/2017_R	CTCTGGCAATTGGACATG	18	50	60°C	
D871G	c.2612A>G	Q5SDM_7/14/2017_F	TGTTCCGTAGgTGTGAGTGCC	21	57	66°C	64°C
		Q5SDM_7/14/2017_R	GGAACCTGAAGGATTCTTAACTC	24	42	63°C	
I887S	c.2660T>G	Q5SDM_7/21/2017_F	GAGCCATGTAgCATAACTGCTTG	23	48	63°C	61°C
		Q5SDM_7/21/2017_R	TTTACAACCGGCTCTTTC	18	44	59°C	
V917A	c.2750T>C	Q5SDM_7/14/2017_F	TTCGCAGAGGcTCCAGTATTAC	22	50	64°C	60°C
		Q5SDM_7/14/2017_R	GTGCCAGGTATAAAGTTTTTC	21	38	59°C	
G1145R	c.3433G>C	Q5SDM_7/14/2017_F	CTTACTTCTcGTCAGTGTACTG	23	48	56°C	57°C
		Q5SDM_7/14/2017_R	TCCCAATGGCAATTGTTC	19	42	60°C	

4.8 Références

1. Xia, B., et al., Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell*, 2006. 22(6): p. 719-29.
2. Sy, S.M., M.S. Huen, and J. Chen, PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(17): p. 7155-60.
3. Zhang, F., et al., PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res*, 2009. 7(7): p. 1110-8.
4. Zhang, F., et al., PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol*, 2009. 19(6): p. 524-9.
5. Dray, E., et al., Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. 17(10): p. 1255-9.
6. Antoniou, A.C., W.D. Foulkes, and M. Tischkowitz, Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med*, 2014. 371(17): p. 1651-2.
7. Jones, S., et al., Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science*, 2009. 324(5924): p. 217.
8. Hu, C., et al., Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. *JAMA*, 2018. 319(23): p. 2401-2409.
9. Reid, S., et al., Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet*, 2007. 39(2): p. 162-4.
10. Xia, B., et al., Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet*, 2007. 39(2): p. 159-61.
11. Park, J.Y., et al., Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*, 2014. 33(40): p. 4803-12.
12. Foo, T.K., et al., Compromised BRCA1-PALB2 interaction is associated with breast cancer risk. *Oncogene*, 2017. 36(29): p. 4161-4170.
13. Catucci, I., et al., The PALB2 p.Leu939Trp mutation is not associated with breast cancer risk. *Breast Cancer Res*, 2016. 18(1): p. 111.

14. Buisson, R., et al., Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. 17(10): p. 1247-54.
15. Luijsterburg, M.S., et al., A PALB2-interacting domain in RNF168 couples homologous recombination to DNA break-induced chromatin ubiquitylation. *Elife*, 2017. 6.
16. Buisson, R., et al., Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase eta in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks. *Cell Rep*, 2014. 6(3): p. 553-64.
17. Pauty, J., et al., Cancer-causing mutations in the tumor suppressor PALB2 reveal a novel cancer mechanism using a hidden nuclear export signal in the WD40 repeat motif. *Nucleic Acids Res*, 2017. 45(5): p. 2644-2657.

5 CHAPITRE 5. A RAD51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation

Marta Castroviejo-Bermejo,¹ Cristina Cruz,^{1,2,3} Alba Llop-Guevara,¹ Sara Gutiérrez-Enríquez,⁴ Mandy Ducey,^{5,6,7} Yasir Hussein Ibrahim,¹ Albert Gris-Oliver,¹ Benedetta Pellegrino,^{1,8} Alejandra Bruna,⁹ Marta Guzmán,¹ Olga Rodríguez,¹ Judit Grueso,¹ Sandra Bonache,⁴ Alejandro Moles-Fernández,⁴ Guillermo Villacampa,¹⁰ Cristina Viaplana,¹⁰ Patricia Gómez,^{3,11} Marc Vidal,^{3,11} Vicente Peg,^{12,13} Xavier Serres-Créixams,¹⁴ Graham Dellaire,¹⁵ Jacques Simard,⁷ Paolo Nuciforo,^{13,16} Isabel T Rubio,^{13,17} Rodrigo Dientsmann,¹⁰ J Carl Barrett,¹⁸ Carlos Caldas,^{9,19} José Baselga,^{20,21} Cristina Saura,^{3,11} Javier Cortés,^{13,22,23} Olivier Déas,²⁴ Jos Jonkers,²⁵ Jean-Yves Masson,^{5,6} Stefano Cairo,²⁴ Jean-Gabriel Judde,²⁴ Mark J O'Connor,²⁶ Orland Díez,^{4,27} Judith Balmaña,^{2,3*} & Violeta Serra,^{1,13**}

¹Experimental Therapeutics Group, Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain

²High Risk and Familial Cancer Group, Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain

³Department of Medical Oncology, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Oncogenetics Group, Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain

⁵Genome Stability Laboratory, CHU de Québec Research Center, Québec City, QC, Canada

⁶Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Laval University Cancer Research Center, Québec City, QC, Canada

⁷CHU de Quebec - Université Laval Research Center, Genomics Center CHUL, Québec City, QC, Canada

⁸Department of Medical Oncology, University Hospital of Parma, Parma, Italy

⁹Cancer Research UK Cambridge Institute and Department of Oncology, University of Cambridge, Cambridge, UK

¹⁰Oncology Data Science (OdysSey Group), Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain

- ¹¹Breast Cancer and Melanoma Group, Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain
- ¹²Pathology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain
- ¹³CIBERONC, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
- ¹⁴Department of Radiology, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁵Department of Pathology, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada
- ¹⁶Molecular Oncology Group, Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain
- ¹⁷Breast Surgical Unit, Breast Cancer Center, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹⁸AstraZeneca, Waltham, MA, USA
- ¹⁹Breast Cancer Programme, Cancer Research UK (CRUK) Cambridge Cancer Centre, Cambridge, UK
- ²⁰Human Oncology and Pathogenesis Program (HOPP), Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA
- ²¹Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA
- ²²Department of Oncology, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain
- ²³Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain
- ²⁴XenTech, Evry, France
- ²⁵Division of Molecular Pathology and Cancer Genomics, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands
- ²⁶Oncology Innovative Medicines and Early Clinical Development Biotech Unit, AstraZeneca, Cambridge, UK
- ²⁷Clinical and Molecular Genetics Area, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

5.1 Avant-propos

Au cours de mon doctorat, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec l'équipe du Dre Serra et ses collaborateurs. L'objectif de leur étude était de montrer que le score de foyers RAD51 est un biomarqueur pertinent pour corrélérer les défauts de recombinaison homologue à la sensibilité aux PARPi chez les patientes de BC. J'ai eu pour mission de confirmer que la mutation tronquante M296Nfs*6 de *PALB2*, identifiée par séquençage d'exome d'une tumeur de BC sensible aux PARPi, était responsable des défauts de recombinaison et ainsi de la sensibilité à l'olaparib.

Ces travaux ont été publiés dans le journal EMBO Molecular Medicine en Novembre 2018. J'ai réalisé les expériences de caractérisation du variant M296Nfs*6 de *PALB2* et les figures correspondantes (**Figures 2B, 2C, 2D et 2E**), me plaçant ainsi comme 5^{ème} auteure. J'ai aussi participé à la correction du manuscrit.

5.2 Résumé

Les inhibiteurs de poly(ADP-ribose) polymérase (PARPi) sont efficaces dans le traitement des cancers avec des défauts de recombinaison homologue (RH), incluant les cancers associés à *BRCA1/2*. Un test permettant l'identification d'autres types de tumeurs avec des défauts de RH aiderait à étendre leur utilisation pour de nouvelles indications. Nous avons évalué l'activité de l'olaparib, un PARPi, dans des xénogreffes dérivées de tumeurs de patientes (PDX) avec un cancer du sein (CS). Nous avons comparé la capacité prédictive des scores de formation de foyers RAD51 et des scores de défauts de RH. Le score de RAD51 s'est montré hautement discriminatif de la sensibilité aux PARPi dans les PDXs de CS et a surpassé le test génomique. Nos résultats démontrent que RAD51 est un biomarqueur fonctionnel qui permet l'identification des CS sensibles aux PARPi et élargit ainsi la population qui pourrait bénéficier de cette thérapie, au-delà des cancers associés à *BRCA1/2*.

5.3 Abstract

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors (PARPi) are effective in cancers with defective homologous recombination DNA repair (HRR), including *BRCA1/2*-related cancers. A test to identify additional HRR-deficient tumors will help to extend their use in new indications. We evaluated the activity of the PARPi olaparib in patient-derived tumor xenografts (PDXs) from breast cancer (BC) patients and investigated mechanisms of sensitivity through different technics, including RAD51 nuclear foci. The predictive capacity of the RAD51 score and the homologous recombination deficiency (HRD) score were compared. We scored archival breast tumor samples, including *PALB2*-related hereditary cancers. The RAD51 score was highly discriminative of PARPi sensitivity versus PARPi resistance in BC PDXs and outperformed the genomic test. In clinical samples, all *PALB2*-related tumors were classified as HRR-deficient by the RAD51 score. The functional biomarker RAD51 enables the identification of PARPi-sensitive BC and broadens the population who may benefit from this therapy beyond *BRCA1/2*-related cancers.

5.4 Introduction

Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) are enzymes with diverse functions, including repair of DNA single-strand breaks (SSBs). PARP inhibition not only impairs SSB repair but also results in PARP trapping onto DNA with subsequent stalling of replication forks (Plummer, 2006; Helleday, 2011; Murai et al, 2012; Lord & Ashworth, 2017). Both effects contribute to the formation of DNA double-strand breaks (DSBs) that, in replicated areas of the genome, are repaired by homologous recombination repair (HRR), a conservative mechanism for error-free repair of DNA damage (Saredi et al, 2016; Pellegrino et al, 2017). Cells with defects in HRR including those with deleterious variants in *BRCA1* or *BRCA2* (*BRCA1/2*) genes are particularly sensitive to PARP inhibitors (PARPi; Bryant et al, 2005; Farmer et al, 2005; Rottenberg et al, 2008), which prompted the clinical development of PARPi as anticancer therapies (Fong et al, 2009; Audeh et al, 2010; Tutt et al, 2010). In breast cancer (BC), the efficacy results of the PARPi olaparib (Lynparza) in metastatic patients carrying a germline *BRCA1/2* (*gBRCA*) pathogenic variant have led to its recent approval by the Food and Drug Administration (Robson et al, 2017). PARPi have also shown preclinical and clinical activity beyond *gBRCA* in ovarian and prostate cancer (McCabe et al, 2006; Kaufman et al, 2014; Mateo et al, 2015; Mirza et al, 2016; Coleman et al, 2017; Pujade-Lauraine et al, 2017). Similarly, the use of PARPi could be extended beyond *gBRCA* to a wider group of BC patients harboring dysfunctional HRR. For example, the clinical and molecular similarities between *BRCA1*-associated tumors and a subset of triple negative BCs (TNBC) led to postulate that the latter may also have defects in HRR (Turner et al, 2004). In such cases, HRR deficiency can be explained by epigenetic silencing of *BRCA1/2* or the genetic inactivation of several other HRR-related genes such as *ATM*, *ATR*, *CHEK1*, *CHEK2*, *PALB2*, and the *FANC* family genes (Konstantinopoulos et al, 2015; Shakeri et al, 2016). Specifically, *PALB2* is essential for *BRCA2* anchorage to nuclear structures and recruitment to DSBs, acting as the link between *BRCA1* and *BRCA2* (Buisson & Masson, 2012; Pauty et al, 2014). Despite the success of PARPi monotherapy in *gBRCA* BC, appropriate biomarkers are still needed for selection of non-*gBRCA* patients for PARPi therapy (Gelmon et al, 2011; Mutter et al, 2017). Some proposed approaches include the use of mRNA expression signatures, the analysis of genomic scars derived from defective HRR, or the individual analysis of genetic alterations in HRR-related genes (Konstantinopoulos et al, 2010; Abkevich et al, 2012; Wagle et al, 2012; Watkins et al, 2014; Davies et al, 2017; Polak et al, 2017). A potential limitation of these approaches is the lack of specificity in HRR-altered tumors that have restored the HRR function (Watkins et al, 2014; Konstantinopoulos et al, 2015). Other approaches entail the quantification of *BRCA1* promoter hypermethylation, *BRCA1* mRNA expression, or the detection of the HRR protein *RAD51* forming nuclear foci after DNA damage, as surrogate of HRR functionality (Graeser et al, 2010; Naipal et al, 2014; ter Brugge et al, 2016). In this sense, we showed that, in *gBRCA* tumors, *RAD51* foci could be detected in untreated samples and correlated with PARPi resistance regardless of the underlying mechanism restoring HRR function (Cruz et al, 2018). In this work, we analyzed five HRR biomarkers (genetic alterations in HRR-related genes, *BRCA1* promoter

methylation, BRCA1 expression, BRCA1 foci formation, and RAD51 foci formation) and tested which one performed better to predict PARPi response. Importantly, we further show that the RAD51 assay is feasible in routine formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples without prior induction of DNA damage. Scoring RAD51 allowed the identification of non-*gBRCA* HRR-deficient BCs with high accuracy, which may help identify a wider BC population with intrinsic sensitivity to PARPi therapy.

5.5 Results

5.5.1 Olaparib antitumor activity in a non-*gBRCA* BC patient-derived tumor xenograft (PDX) panel distinguishes a subset of tumors highly sensitive to PARPi

We assessed the antitumor activity of the PARPi olaparib in 18 PDX models derived from non-*gBRCA* BC patients (PDX cohort-1, **Table EV1**). Treatment with olaparib revealed antitumor activity in four PDX models as assessed by mRECIST (see Materials and Methods): complete response (CR, n = 2: PDX093 and PDX197) or partial response (PR, n = 2: PDX302 and STG201). The remaining eleven PDX models were olaparib-resistant (PD, progressive disease; **Fig 1A** and Appendix **Table S1**). Additional resistant models were generated from three of the four olaparib-sensitive PDXs after prolonged exposure and steep progression to olaparib (STG201OR, PDX093OR, and PDX302OR; **Fig 1B**). The fourth olaparib-sensitive model PDX197 did not grow after prolonged treatment (> 120 days). This PDX collection of 18 BC models was used to study clinically relevant mechanisms of PARPi sensitivity and acquired resistance *in vivo*.

5.5.2 HRR-related somatic alterations and PARPi sensitivity in PDX

We next investigated the presence of alterations in HRR-related genes that could explain olaparib sensitivity. As aberrant *BRCA1* promoter methylation is found in approximately 10% of sporadic breast cancers (Shakeri et al, 2016), we first measured the levels of epigenetic silencing of *BRCA1* and analyzed *BRCA1* expression and nuclear foci formation in PDX samples. Our approach validated previously reported *BRCA1* promoter methylation and expression results from the STG139 and STG201 models (Bruna et al, 2016). Results showed that three out of four olaparib-sensitive models (PDX302, STG201, and PDX197) and one olaparib-resistant model (PDX270) presented *BRCA1* promoter hypermethylation, while the remaining PDX models showed low levels of methylation (**Fig 2A**). In agreement, absence of *BRCA1* mRNA expression and lack of *BRCA1* nuclear foci were restricted to the four models that showed *BRCA1* promoter hypermethylation (**Fig 2A**, larger views in Appendix **Fig S1**). Of note, the olaparib acquired-resistant models STG201OR and PDX302OR exhibited lower levels of *BRCA1* promoter hypermethylation in comparison with the olaparib-sensitive counterparts, and displayed *BRCA1* mRNA expression and *BRCA1* nuclear foci formation (**Fig 2A**). We then performed exome sequencing to detect genetic alterations in other genes related to HRR (**Table EV2**). We identified frameshift mutations in HRR-related genes in three models: *PALB2* and *FANCD2* in two PARPi-sensitive models (PDX093 and STG201, respectively) and *RAD54L* in one PARPi-resistant model (PDX270). In summary, neither epigenetic silencing of *BRCA1* nor the presence of HRR gene alterations fully associated with PARPi sensitivity. We characterized the *PALB2* deleterious variant in the PARPi-sensitive PDX093, as it was heterozygous in the tumor. The specific *PALB2* mutation in PDX093 (c.886dupA, **Fig EV1A**) predicts a protein

truncation in PALB2 lacking the C-terminus region (p.M296Nfs), as the known germline pathogenic variant c.886del in *PALB2* (Antoniou et al, 2014). By Western blot, the PALB2 wildtype protein was not detected in PDX093 (**Fig 2B**). We then examined the recruitment of PALB2 p.M296Nfs to DSB sites after laser-induced DNA damage. HeLa cells were transfected with YFP-PALB2-WT or YFP-PALB2-p.M296Nfs and microirradiated.

The recruitment of YFP-PALB2 to laser-induced DNA damage sites was monitored for 16 min. This assay allowed us to observe that PALB2 p.M296Nfs mutant protein was not properly recruited (**Fig 2C** and Movies **EV1** and **EV2**). We next studied the effect of PALB2 p.M296Nfs mutant protein on HRR capacity using a Cas9/mClover-LMNA HRR assay in U2OS cells. The Cas9/mClover-LMNA assay measures the HRR-dependent insertion of a mClovercontaining cassette into Cas9-generated DSBs in the *LMNA* gene, resulting in a mClover-LMNA fusion gene encoding green lamin A/C. HRR can be monitored by looking at mClover-positive cells. While wildtype PALB2 partly complemented PALB2 siRNA-treated cells, PALB2 p.M296Nfs mutant did not rescue HRR capacity (**Fig 2D**). Furthermore, overexpression of PALB2 p.M296Nfs mutant led to a two-fold reduction in mClover-positive cells, demonstrating that PALB2 p.M296Nfs leads to HRR deficiency despite the presence of endogenous wildtype PALB2, in favor of a dominant negative effect (**Fig 2E**; Lee et al, 2018). Collectively, both sequencing and functional assays indicate that HRR deficiency in PDX093 is due to the *PALB2* c.886dupA mutation.

5.5.3 Lack of RAD51 nuclear foci is associated with PARPi sensitivity

We further investigated the functional status of HRR in FFPE tumors from PDX cohort-1, scoring the percentage of RAD51-positive tumor cells in S/G2-phase of the cell cycle (geminin-positive) following the protocol shown in **Fig EV1B** (Graeser et al, 2010; Naipal et al, 2014). In olaparib-treated tumors, the four PARPi-sensitive models showed significantly lower percentage of RAD51-positive cells than the fourteen PARPi-resistant models (1.25 \pm 0.25% versus 66.54 \pm 2.70%; $P < 0.0001$; **Fig 3A**, larger views in Appendix **Fig S2**, and **Fig EV1C**). In agreement with BRCA1 foci formation, the acquired-resistant models STG201OR and PDX302OR showed RAD51 nuclear foci (**Fig 3B**, larger views in Appendix **Figs S3** and **S4**). While previous studies had reported low levels of baseline DNA damage as a potential limitation to evaluate HRR functionality (Graeser et al, 2010; Naipal et al, 2014), RAD51 could be scored in vehicle-treated tumors (0.75 \pm 0.48% versus 47.08 \pm 3.37%; $P = 0.0007$) and correlated with the antitumor activity of olaparib ($P = 0.0044$; **Figs 3A** and **EV1C** and **D**). We then analyzed the Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve showing that the RAD51 score displays complete discriminative capacity in predicting PARPi response (Area Under the ROC Curve (AUC) = 1, $P = 0.0030$, specificity = 100%, sensibility = 100%). An in-depth analysis of absolute RAD51 foci quantification demonstrated that the 5 foci-per-nucleus cutoff proved to be accurate for discrimination purposes (Appendix **Fig**

S5). We further ruled out that lack of RAD51 foci in PARPi-sensitive PDXs was due to lack of endogenous DNA damage, by quantifying the levels of phosphorylated H2AX (c-H2AX), a marker of DSBs (Raderschall et al, 1999; Petermann et al, 2010; **Fig 3C**); or by low number of cells in S/G2 phase of the cell cycle (geminin-positive; **Fig EV1E**). The RAD51 assay was validated using a monoclonal antibody (**Fig EV1F**). Altogether, these data show that the RAD51 score is highly discriminative of PARPi sensitivity versus PARPi resistance in the PDX cohort-1.

5.5.4 RAD51 score predicts PDX's response to PARPi in an independent cohort

We proceeded to validate the RAD51 score as a biomarker to predict PARPi sensitivity in an independent PDX cohort (PDX cohort-2). The independent PDX panel consisted of 28 TNBC models, including eight tumors with pathogenic variants in *BRCA1* (n = 5), *BRCA2* (n = 2), or *PALB2* (n = 1). All these variants were classified as pathogenic by the ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), and their variant allele frequencies (VAFs) were consistent with loss of heterozygosity (LOH; **Table EV3**). The antitumor activity of three PARPi (olaparib, niraparib, and/or veliparib) was analyzed in this cohort (**Fig 4A**). HRR capacity was quantified using the HRD score and the RAD51 score (including quantification of RAD51 and c-H2AX). Based on PDX cohort-1 results and previous studies (Graeser et al, 2010), a 10%-RAD51 score cutoff was used to differentiate PARPi-sensitive from PARPi-resistant PDXs in the PDX cohort-2. Seven models (25%) showed a RAD51 score \leq 10% and 21 models (75%) showed a RAD51 score above the cutoff, with 100% sensitivity and 100% specificity for PARPi response prediction (**Fig 4A**). Therefore, as in PDX cohort-1, the RAD51 score showed complete discriminative capacity in predicting PARPi response (ROC AUC = 1), while the HRD score had lower predictive power (ROC AUC = 0.735). These differences in AUC between the scores were statistically significant (difference between AUC = 0.27; Confidence Interval 95% (CI 95%) 0.08–0.46; P = 0.005; **Fig 4B**). Mechanistically, loss of 53BP1 did not explain PARPi resistance in the three *BRCA1*-mutated PDXs that exhibited RAD51 foci. Instead, two of them exhibited BRCA1 foci by immunofluorescence, indicative of potentially functional HRR restoration by *BRCA1* hypomorphic variants (**Fig 4C**; Drost et al, 2016; Wang et al, 2016; Cruz et al, 2018). Altogether, these results support the use of the RAD51 assay as a predictive biomarker of PARPi response independent of the *BRCA* status and further demonstrate that this assay captures BRCA-related tumors that restore HRR capacity regardless of the resistance mechanism.

5.5.5 Scoring RAD51 in clinical samples identifies HRR-deficient tumors among patients with hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome, including *PALB2*-related tumors

To assess the ability of the RAD51 assay to identify HRR-deficient tumors beyond *gBRCA* mutations, we scored for RAD51 in 23 FFPE tumor samples from a cohort of patients with clinical suspicion of hereditary breast cancer and without *gBRCA* mutations (**Fig 5A**). Six tumors derived from young patients (≤ 35 years), and the remaining 17 were obtained from 14 patients with family history of BC. We enriched our patient cohort with 11 tumors from patients harboring germline mutations in *PALB2* (*gPALB2*; **Fig 5B, Table EV4**). We analyzed c-H2AX, BRCA1, and RAD51 nuclear foci in these tumors (**Fig 5B and C**). Fourteen out of 23 tumor samples showed low RAD51 score ($\leq 10\%$ cutoff), including all the eleven *gPALB2* tumor samples. The three tumors with low RAD51 score that lacked *gPALB2* mutations showed lack of BRCA1 nuclear foci, raising the possibility of BRCA1 promoter hypermethylation as being the cause of HRR deficiency (Pt02, Pt07, Pt11; **Fig 5B and C**). These data showed that carrying a *PALB2* mutation is associated with higher odds of displaying low RAD51 score [odds ratio (OR) = 62.4; CI 95% 2.852–1367; P = 0.0003]. Altogether, our results demonstrate that the RAD51 assay identifies HRR-deficient tumors that are sensitive to PARPi therapy beyond the *gBRCA* condition.

5.6 Discussion

Our results show that RAD51 foci in PDX tumor samples correlated with PARPi response, while *BRCA1* promoter hypermethylation, *BRCA1* expression, *BRCA1* foci, or HRR gene mutations did not fully correlate with PARPi response. Interestingly, the RAD51 assay was able to capture the HRR functionality in untreated tumors due to their high levels of endogenous DNA damage. A RAD51 score cutoff of 10% predicted the response to PARPi with high specificity and sensitivity, outperforming the HRD score. In clinical samples, the RAD51 assay classified as HRR-deficient all the tumors from patients with deleterious *gPALB2* mutations, and three tumors from young onset BC patients with no germline mutations in DNA repair genes. Our results support that HRR deficiency provides the basis of PARP inhibition sensitivity *in vivo* and is frequent among tumors without germline mutations in *BRCA1/2* genes, in line with the frequency of HRD genomic signature among breast cancer patients (Davies et al, 2017). PARP inhibitors have become the paradigm of drug-mediated synthetic lethality in HRR-deficient tumors and have shown clinical efficacy in patients with *BRCA1/2*-related breast and ovarian cancers (Fong et al, 2009; Audeh et al, 2010; Tutt et al, 2010; Robson et al, 2017). In addition, PARPi are beneficial as maintenance treatment in ovarian cancer patients with platinum-sensitive relapse (Mirza et al, 2016; Coleman et al, 2017; Pujade-Lauraine et al, 2017). Overall, these results have encouraged the medical community to explore the activity of PARPi beyond *BRCA1/2*-related malignancies toward other tumor types showing deficiency in HRR (Mateo et al, 2015). In this sense, there is a clear need to develop robust and clinically feasible biomarkers of HRR functionality correlating with treatment response. Recent advances toward the development of biomarkers of response and resistance to PARPi have been based on targeted sequencing of DNA repair genes, genomic scars, or gene and protein expression (Konstantinopoulos et al, 2015). Nevertheless, some of these biomarkers have pitfalls. For example, genomic signatures have a limited capacity to capture restoration of HRR functionality that may occur during tumor evolution or after drug pressure. Instead, functional assays of HRR status provide a more comprehensive and dynamic readout of tumor HRR capacity throughout disease evolution and at the specific moment of treatment decision (Watkins et al, 2014; Konstantinopoulos et al, 2015). RAD51 foci formation had been proposed as a predictive biomarker of PARPi response; however, the assay required tumor biopsies either collected after patient exposure to DNA damaging agents or irradiated *ex vivo* (Graeser et al, 2010; Naipal et al, 2014). Here, we report on the performance of the RAD51 assay in FFPE cancer samples without prior patient treatment or exogenous DNA damage induction and show its correlation with PARPi sensitivity. This functional assay provides an accurate measurement of HRR status and PARPi sensitivity at the time of treatment decision-making. Furthermore, it surpasses the common limitations of previous functional assays and facilitates its transferability from the research setting to the clinical diagnosis. The RAD51 assay has some limitations: firstly, when PARPi sensitivity occurs via mechanisms that do not directly impact on the ability of cells to perform HRR, e.g., alterations in ATM (Chen et al, 2017; Davies et al, 2017; preprint: Balmus et al, 2018) or in the RNASEH2 complex (Zimmermann et al, 2018); secondly, when

PARPi sensitivity occurs via mechanisms that preserve RAD51 foci formation, e.g., alterations in the MRN complex, RAD51AP1, polymerase eta, or ERCC1 (Kawamoto et al, 2005; Wiese et al, 2007; Oplustilova et al, 2012; Postel-Vinay et al, 2013); thirdly, when HRR-deficient tumors have acquired PARPi resistance via RAD51-independent mechanisms such as loss of PARG, mutations in PARP1, or those that involve replication fork stabilization (Guillemette et al, 2015; Chaudhuri et al, 2016; Kais et al, 2016; Yazinski et al, 2017; Gogola et al, 2018; Michelena et al, 2018; Pettitt et al, 2018); fourthly, when a tumor has low proliferation index or low endogenous DNA damage, in which cases the assay would not be feasible. In summary, we demonstrate the feasibility of the RAD51 assay in routine FFPE tumor samples and its utility to identify several populations that might be sensitive to PARPi. First, the germline population with HRR alterations, including *BRCA1/2*, *PALB2* and probably other genes, such as *RAD51C* or *RAD51D*. In these patients, the RAD51 assay could be used as an enrichment biomarker to better predict sensitivity to PARPi, since restoration of the HRR pathway might have occurred and result in PARPi resistance (Konstantinopoulos et al, 2015; Cruz et al, 2018). Second, tumors with somatic alterations in HRR-related genes, such as the *PALB2* mutations described in 4% of metastatic BC (Lefebvre et al, 2016; Lee et al, 2018). And third, tumors with epigenetic HRR silencing, such as *BRCA1* promoter hypermethylation. Our data from PDXs strongly support the clinical development of PARPi in non-gBRCA BC patients, as other studies have shown PDXs to effectively capture clinical responses (Izumchenko et al, 2017). Interestingly, there is a clinical trial recruiting patients with advanced BC with *BRCA1/2* promoter hypermethylation to analyze the response to olaparib monotherapy, which includes tumor sample collection for biomarker analysis (NCT03205761). Additional work is needed to define the sensitivity and specificity of the RAD51 assay to predict PARPi benefit in the clinic and lead to better selection of patients for PARP inhibition treatment.

5.7 Figures & Legends

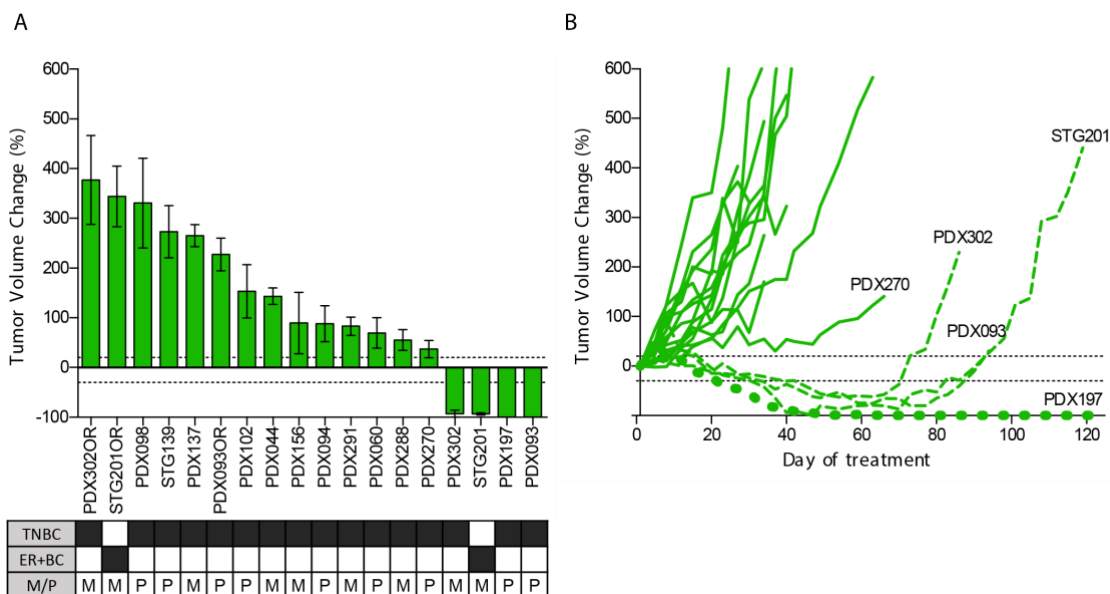


Figure 5.1 – The antitumor activity of olaparib in PDXs identifies a subset of PARPi-sensitive tumors.

(A) Waterfall plot showing the percentage of tumor volume change in olaparib-treated tumors compared to the tumor volume on day 1. +20% and -30% are marked by dotted lines to indicate the range of PR, SD and PD. The box underneath summarizes different characteristics of each model and the clinical context at the moment of PDX implantation. TNBC, Triple Negative Breast Cancer; ER+BC, Estrogen Receptor positive Breast Cancer; P, primary; M, metastasis. Error bars indicate SEM from independent tumors ($n \geq 3$). **(B)** Graph showing the percentage of tumor volume change during olaparib treatment in PDXs from cohort-1. Olaparib-sensitive models are represented with discontinuous lines. Acquisition of PARPi-resistance in PDX302, STG201 and PDX093 after prolonged exposure to olaparib is shown.

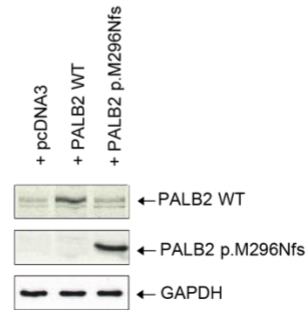
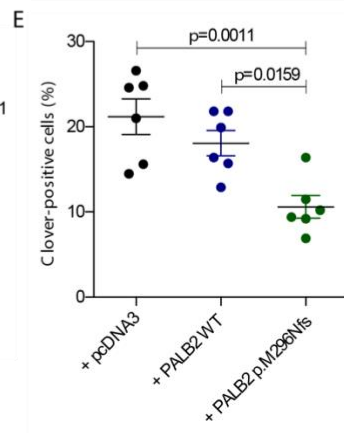
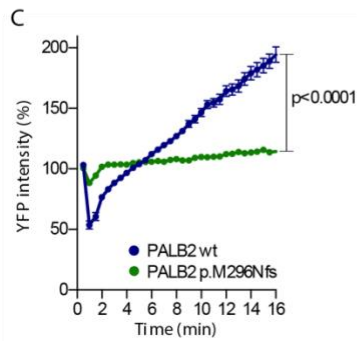
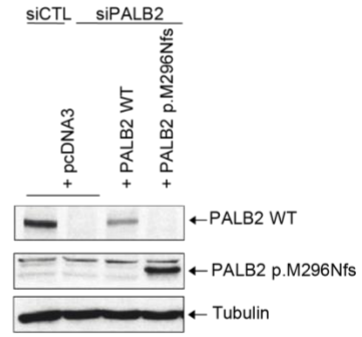
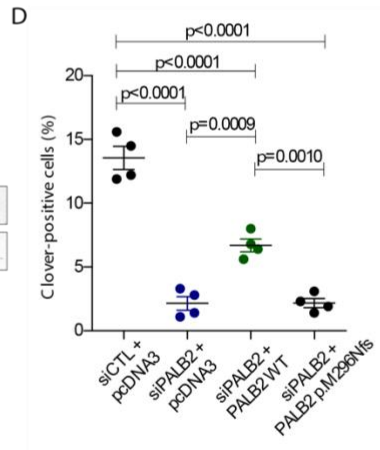
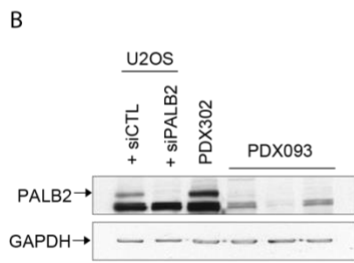
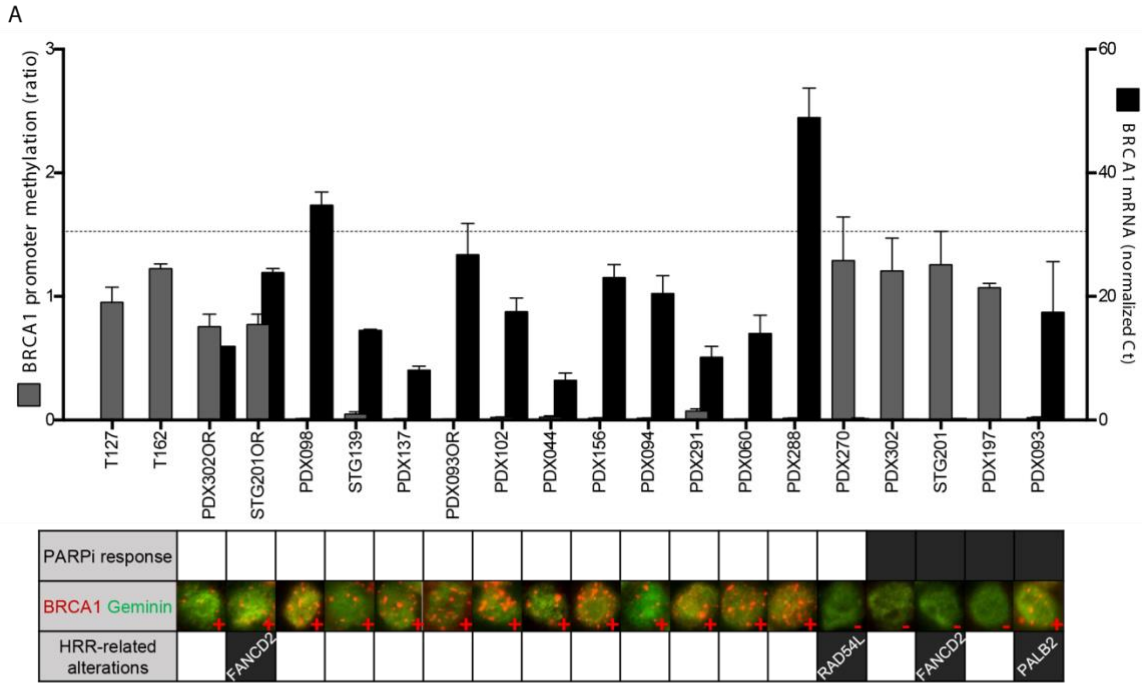


Figure 5.2 – HRR-related alterations in PDX cohort-1 and PARPi response.

(A) Levels of BRCA1 promoter hypermethylation, levels BRCA1 mRNA and the presence of BRCA1 nuclear foci by immunofluorescence are shown (larger views and separate channels are shown in Appendix **Fig S1**). T127 and T162 were used as positive controls for hypermethylated BRCA1 promoter. Error bars indicate SEM from independent tumors ($n \geq 2$). Dashed line indicates mean of BRCA1 mRNA levels in normal breast. PARPi-response is shown in the summary underneath: white box: PD; black box: PR/CR. Alterations in HRR-related genes in PDX are also indicated. **(B)** Western blot of PALB2 detected in U2OS cells and PDXs. Three biological replicates of PDX093 are shown; PDX302 is used as PALB2 wild type PDX control. **(C)** YFP-PALB2 recruitment to laser-induced DSBs is impaired in HeLa cells expressing PALB2 p.M296Nfs ($n=4$, unpaired t-test at 16min). Gene-targeting efficiency using Cas9/mClover-LMNA1 homologous recombination assay of **(D)** siRNA PALB2 cells ($n=4$, one-way ANOVA) or **(E)** cells with no PALB2 depletion complemented with wild type and p.M296Nfs siRNA-resistant constructs ($n=7$, one-way ANOVA). Western blots of PALB2 wild type and PALB2 p.M296Nfs for each condition are shown. Error bars indicate SEM from independent experiments. Source data are available online for this figure.

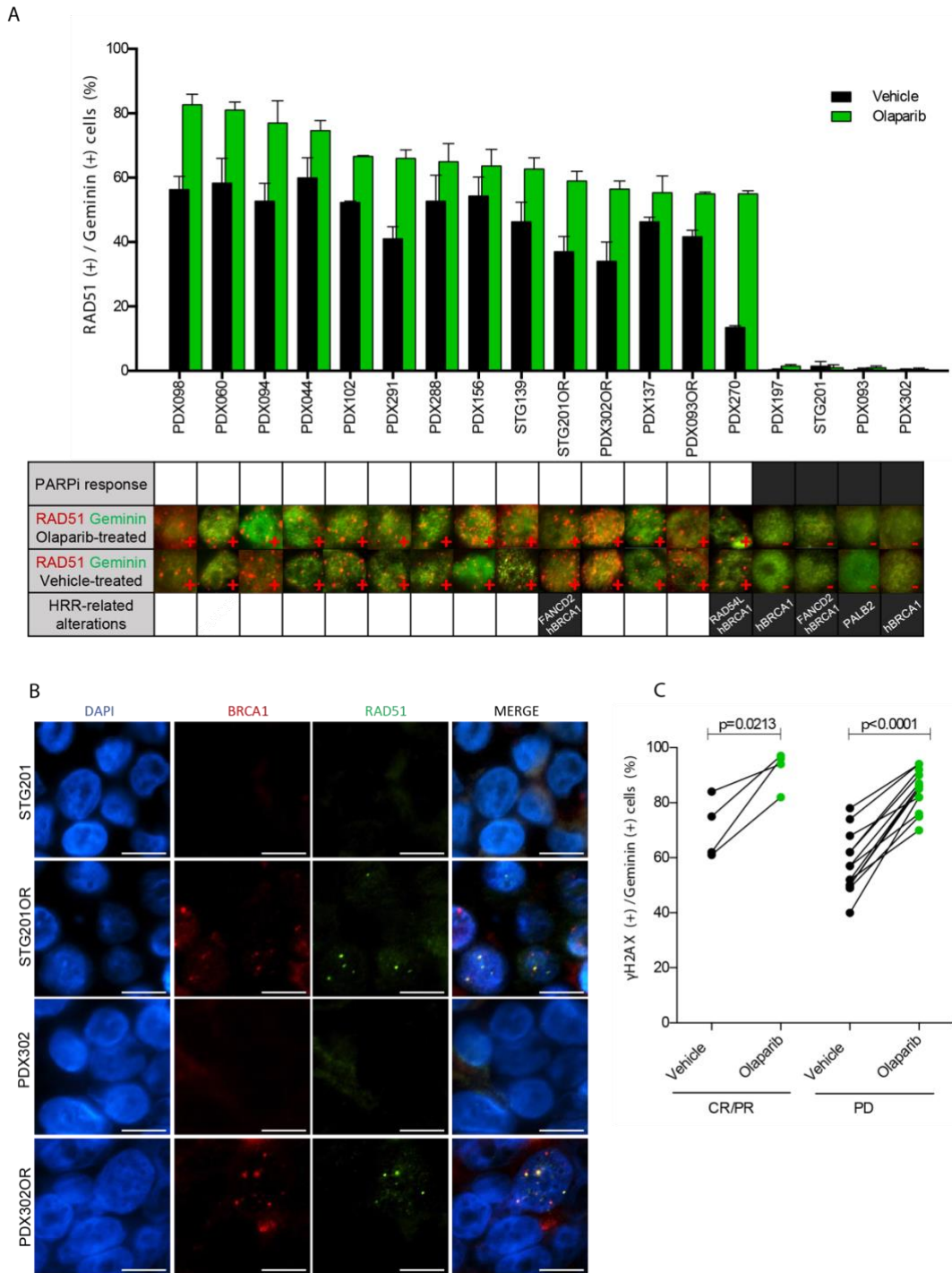


Figure 5.3 – Lack of RAD51 nuclear foci identifies PARPi-sensitive PDX tumors.

(A) Percentage of geminin-positive, RAD51 nuclear foci-containing cells detected by immunofluorescence in FFPE samples from PDX tumors treated with vehicle or PARPi (larger views and separate channels are shown in Appendix Fig S2). Error bars indicate SEM from independent tumors ($n \geq 2$). PARPi-response is shown in the summary underneath: white box: PD; black box: PR/CR. Immunofluorescence staining of RAD51 foci in PARPi-

and vehicle- treated PDX tumors is shown. Alterations in HRR-related genes are also summarized: hBRCA1: BRCA1 promoter hypermethylation and lack of BRCA1 expression and BRCA1 nuclear foci formation. **(B)** Restoration of RAD51 foci formation in PARPi acquired-resistant PDXs. Immunofluorescence staining of BRCA1 and RAD51 foci in PARPi-treated tumors from STG201, PDX302 and the corresponding PARPi acquired-resistant models (STG201OR and PDX302OR). Scale bars: 10 μ m. **(C)** Quantification of geminin-positive cells that exhibit γ H2AX nuclear foci following treatment with vehicle and olaparib. Paired t test in PARPi-sensitive (CR/PR) vs. PARPi-resistant (PD) PDXs.

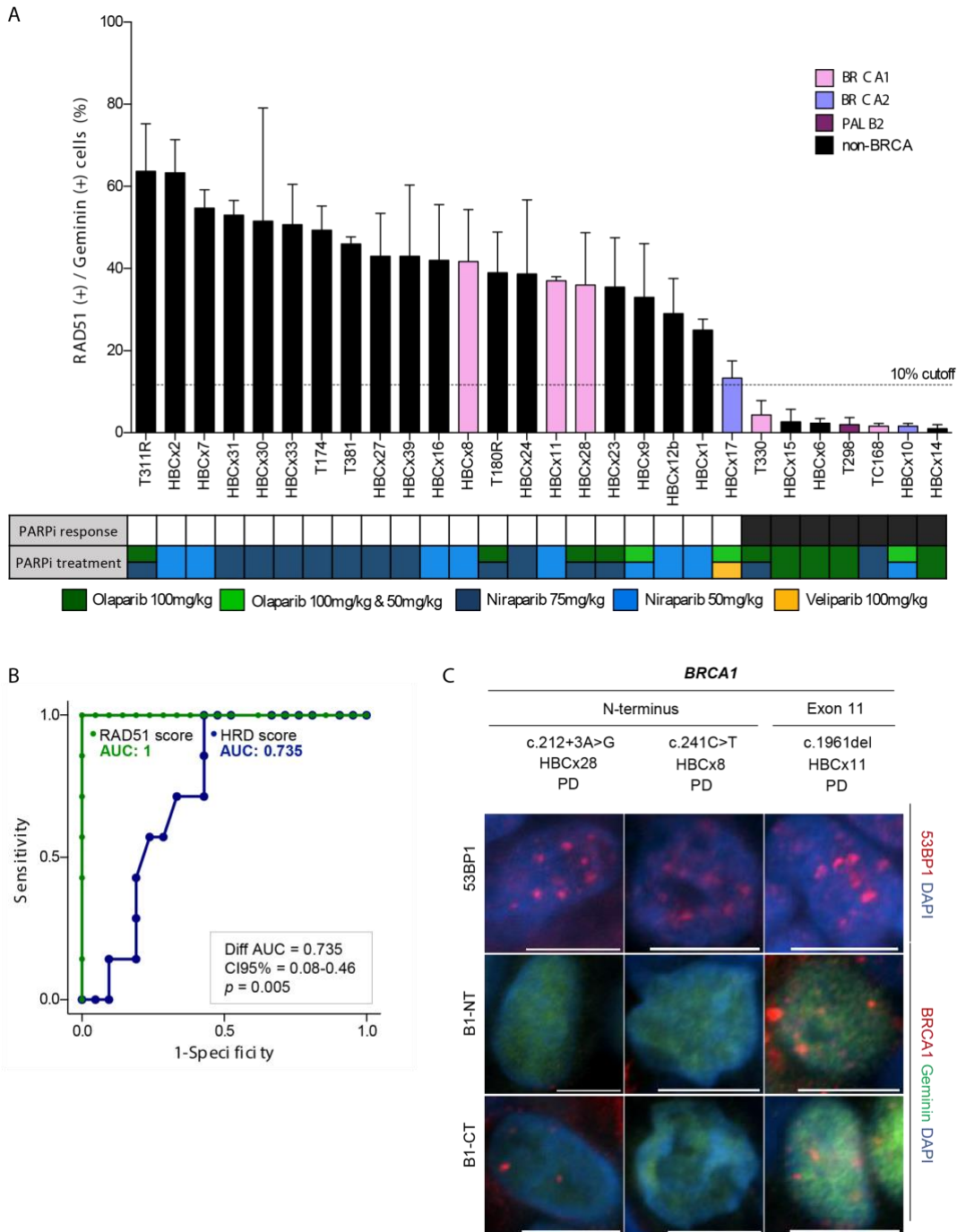
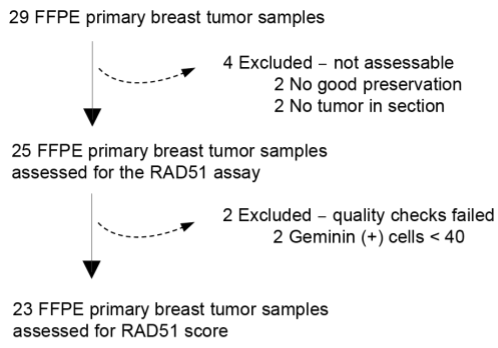


Figure 5.4 – RAD51 score predicts PDX response to PARPi in an independent PDX panel (cohort-2).

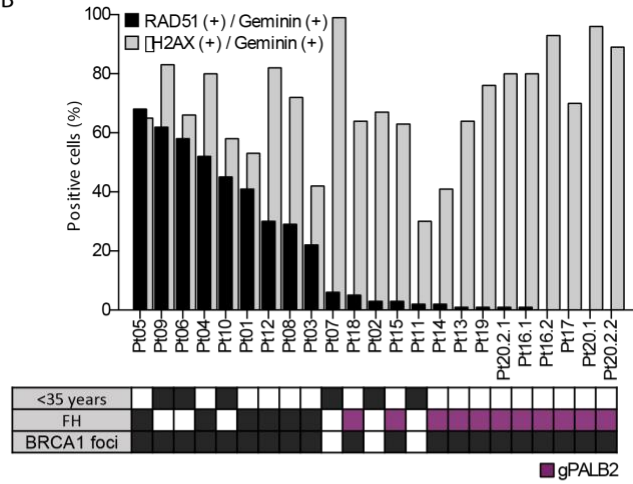
(A) Percentage of geminin-positive, RAD51 nuclear foci-containing cells in FFPE samples from untreated PDX tumors. Color bars indicate the presence of pathogenic variants in the indicated genes. Error bars indicate SEM from independent tumors ($n \geq 2$). PARPi-response is shown in the summary underneath: black box: PR/CR; white box: PD. Box colors indicate the PARP inhibitor treatment. Boxes with two colors indicate the same response to both treatments. Olaparib 100mg/kg & 50mg/kg indicates that both doses were tested and resulted

in the same response categorization. **(B)** ROC curves of the RAD51 score and HRD score, for PARPi response prediction capacity in the PDX cohort-2. Bootstrap statistical test. **(C)** Immunofluorescence staining of 53BP1 and BRCA1 nuclear foci [with an antibody towards the N-terminus (B1-NT) or C-terminus (B1-CT) of BRCA1] in three BRCA1-mutant, PARPi-resistant models from PDX cohort-2. The location of the mutation within the gene is indicated. Scale bars: 10 μ m.

A



B



C

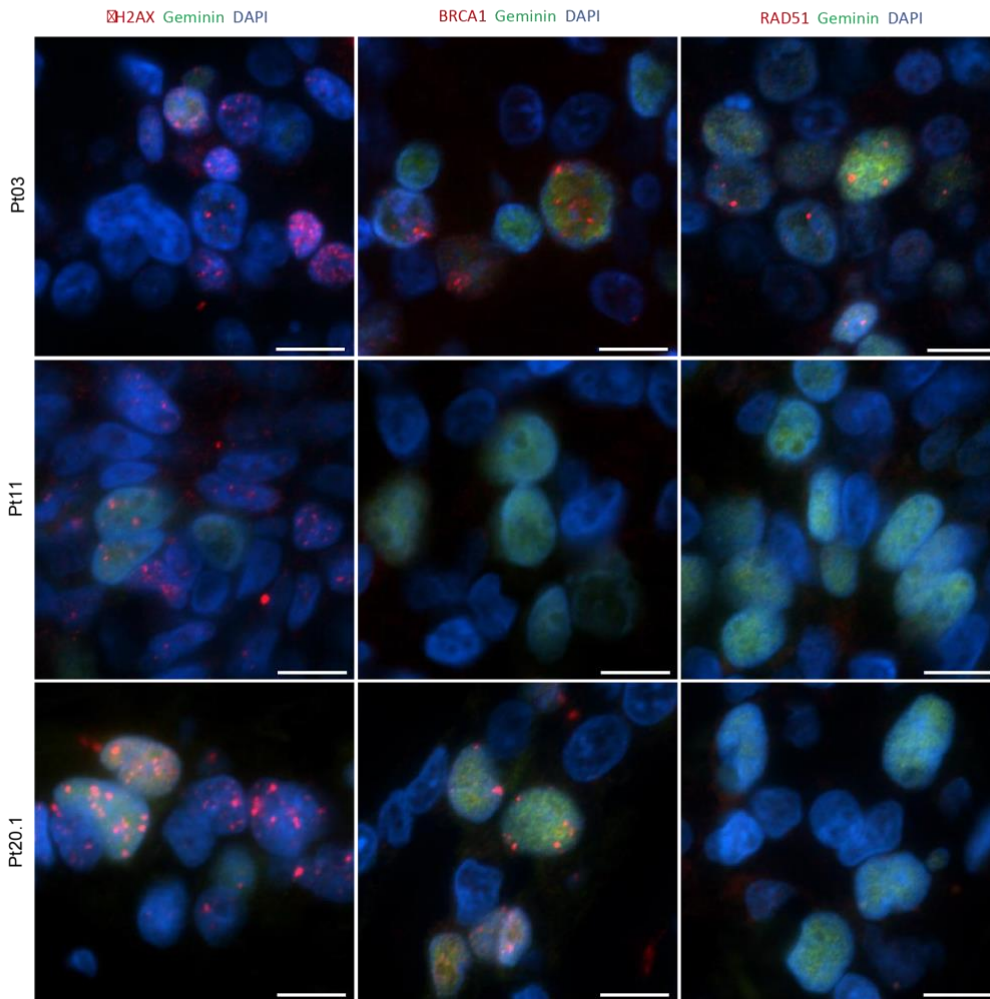


Figure 5.5 – RAD51 score in tumors from patients with HBOC syndrome, including germline PALB2-mutation carriers.

(A) Consort diagram of the collected and analyzed FFPE tumor samples from patients with HBOC syndrome following the scoring criteria for the RAD51 assay. **(B)** Percentage of geminin-positive, RAD51 or γ H2AX nuclear foci-containing cells in FFPE tumor samples from patients with HBOC syndrome. The box underneath summarizes the patient's young onset (<35y: <35 years), her family history (FH, purple box for PALB2-related tumors) and the presence of BRCA1 nuclear foci in the analyzed tumor samples. **(C)** Immunofluorescence staining of γ H2AX, BRCA1 and RAD51 foci in three representative FFPE tumors from patients: one RAD51- and BRCA1-positive tumor (Pt03), one RAD51- and BRCA1-negative tumor (Pt11) and one PALB2-related tumor, with BRCA1 but not RAD51 nuclear foci (Pt20.1). Scale bars: 10 μ m.

5.8 Materials and Methods

Patient-derived xenograft (PDX) models in cohort-1

Fresh tumor samples from 13 breast cancer patients without known gBRCA mutation were collected prospectively for implantation into nude mice at VHIO under an institutional review board (IRB)-approved protocol and the associated informed consent. The experiments conformed to the principles of the WMA Declaration of Helsinki and the Department of Health and Human Services Belmont Report were conducted following the European Union's animal care directive (2010/63/EU) and were approved by the Ethical Committee of Animal Experimentation of the Vall d'Hebron Research Institute. Fresh primary or metastatic human breast tumors were obtained from patients at time of surgery or biopsy and immediately implanted into the mammary fat pad (surgery samples) or the lower flank (metastatic samples) of 6-week-old female athymic HsdCpb:NMRI-Foxn1nu (Harlan Laboratories) or NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJ (Charles River) mice. Animals were continuously supplemented with 1 IM 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich) in their drinking water. Upon growth of the engrafted tumors, the model was perpetuated by serial transplantation onto the lower flank. In each passage, flash-frozen and formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) samples were taken for genotyping and histological studies. Two models (1 TNBC, STG139 and 1 ER-positive BC, STG201) were generated in CRUK/UCAM, a member of the EurOPDX consortium (<http://www.europdx.eu>), as previously reported (Bruna et al, 2016). Three models with acquired PARPi resistance were generated in the laboratory (see below).

In vivo experiments of PDX sensitivity to PARPi

To evaluate the sensitivity to PARP inhibition, at least three tumorbearing mice were equally distributed into treatment groups with tumors ranging 50–350 mm³. When allocating animals to treatment arms, we ensured that the mean starting volume between arm was not statistically different by t-test (see Appendix **Table S1**). Olaparib 50 mg/kg oral (p.o.) was administered 6 days per week (in 10%v/v DMSO/10%w/v Kleptose [HP-b-CD]; ter Brugge et al, 2016). To generate PDX models with acquired resistance to PARPi, olaparib treatment was maintained in olaparib-sensitive tumors until individual tumors regrew. Tumor growth was measured blinded to the treatment effect with caliper bi-weekly from first day of treatment to day 21 and every 7–10 days in the acquired resistance setting. Mouse weight was recorded twice weekly. The tumor volume was calculated as $V = \frac{4\pi}{3} \frac{L \times l^2}{2}$, "L" being the largest diameter and "l" the smallest. Mice were euthanized when tumors reached 1,500 mm³, in accordance with institutional guidelines. The antitumor activity was determined by comparing tumor volume at 21 days to its baseline: % tumor volume change = $(V_{day21} - V_{day1}) / V_{day1} \times 100$. For olaparib-sensitive PDXs, the best response was defined as the minimum value of % tumor volume change sustained for

at least 10 days. To classify the antitumor response, the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) on the % tumor volume change was modified and labeled as mRECIST: CR (complete response), best response \leq -95%; PR (partial response), -95% < best response \leq -30%; SD (stable disease), -30% < best response \leq +20%, PD (progressive disease), % tumor volume change at day 21 $>$ +20% (Therasse et al, 2000; Gao et al, 2015).

PDX cohort-2 for RAD51 assay validation

To validate the RAD51 assay, we used an independent PDX cohort whose response to PARPi was tested at XenTech. These PDXs were generated at Curie Institute (Paris, France) and Paoli Calmette Institute (Marseille, France) under approved informed consent. The majority of these PDXs were previously published (Marangoni et al, 2007; Charafe-Jauffret et al, 2013). For *in vivo* experiments, when tumors reached a size of 70–250 mm³, mice were randomly assigned to homogeneous groups of 5–10 animals and were treated p.o. with niraparib (50 or 75 mg/kg), olaparib (50 or 100 mg/kg), or veliparib (100 mg/kg) daily for 28 days. Tumor volume was evaluated by measuring bi-weekly tumor diameters with a caliper.

HRD score

Myriad's myChoice_{HRD} test was performed at Myriad Genetics on DNA extracted from PDXs of cohort-2. DNA extraction was performed by using the NucleoBond AXG100 kit (Macherey-Nagel).

Exome sequencing

All laboratory methods were performed using the manufacturer's protocols. Genomic DNA was isolated from fresh-frozen PDX tissue using the Promega Maxwell 16_{Tissue} SEV DNA Purification Kit (catalog #AS1030) and the Maxwell₁₆ MDx Instrument (Promega Corp., Madison, WI, USA). Specifically, samples were loaded into well #1 of the Maxwell cartridge, run using the "DNA/tissue" protocol, and genomic DNA was eluted with 300 μ l Elution Buffer. All samples were quantified using the Qubit_{dsDNA} HS Assay Kit (catalog #Q32851) and Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Exome libraries were constructed using the KAPA Hyper Prep Library Preparation Kit (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA), and genes were captured using the xGen_{Exome} Research Panel v1.0 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA).

Paired-end 150 bp sequencing was performed on an Illumina HiSeq 4000 using TruSeq SBS reagents (Illumina) with approximately 10 Gbp per sample for ~200-fold average sequence depth. Data analysis followed standard methodologies. Briefly, sequencing reads were aligned to both human hg19 and mouse mm10 genomes using Burrows-Wheeler Alignment (BWA), and then, mouse-derived sequences in the human.bam file were removed using Disambiguate (Ahdesmäki et al, 2016). Variants were called in the human.bam files using VarDirect (Lai et al, 2016). Copy number analysis was performed using Seq2C (Reznik et al, 2016). 73-gene profiling of XenTech's PDX samples Mutation profiling of 73 genes among the most frequently mutated in cancer according to the COSMIC database was performed at BGI (Beijing, China) on genomic DNA by exon trapping with NimbleGen microarray followed by deep sequencing by using Illumina's HiSeq technology, with at least 50Å~ effective mean depth for each sample.

BRCA1 promoter methylation

BRCA1 promoter methylation was measured using methylationspecific multiplex ligation-dependent probe amplification (MSMLPA; MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands) according to manufacturer's instructions. The two xenografts generated in CRUK/UCAM (STG139 and STG201) had been previously tested using reduced-representation bisulfite sequencing (RRBS; Bruna et al, 2016) and further validated using MS-MLPA. Positive controls of BRCA1 promoter hypermethylated were used (T127 and/162; ter Brugge et al, 2016).

BRCA1 mRNA expression

RNA was extracted from PDX samples (15–30 mg) by using the PerfectPure RNA Tissue kit (five Prime). The purity and integrity were assessed by the Agilent 2100 Bioanalyzer system, and cDNA was obtained using the PrimeScript RT Reagent kit (Takara). Quantitative RT–PCR was performed in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems) and predesigned human specific primers and TaqMan probes (Hs99999908_m1 for GUSB, Hs99999903_m1 for ACTB, and Hs01556193_m1 for BRCA1). The comparative CT method was used for data analysis, in which geNorm algorithms were applied to select the most stably expressed housekeeping genes (GUSB and ACTB) and geometric means were calculated to obtain normalized CT values (Vandesompele et al, 2002).

Immunofluorescence

The following primary antibodies were used for immunofluorescence: rabbit anti-RAD51 (Santa Cruz Biotechnology sc-8349 1:250), rabbit anti-RAD51 (Abcam ab133534, 1:1000), mouse anti-geminin (NovoCastra NCL-L, 1:100 in PDX samples, 1:60 in patient samples), rabbit anti-geminin (ProteinTech 10802-1-AP, 1:400), mouse anti-BRCA1 (Santa Cruz Biotechnology sc-6954, 1:50), mouse anti-BRCA1 (Abcam ab16780, 1:200), mouse anti-c-H2AX (Millipore #05-636, 1:200), rabbit anti-53BP1 (Cell Signalling #4937, 1:100). Goat anti-rabbit Alexa fluor 568 (Invitrogen; 1:500), goat anti-mouse Alexa fluor 488 (Invitrogen; 1:500), donkey anti-mouse Alexa fluor 568 (Invitrogen; 1:500), and goat anti-rabbit Alexa fluor 488 (Invitrogen; 1:500) were used as secondary antibodies. For target antigen retrieval, sections were microwaved for 4 min at 110°C in DAKO Antigen Retrieval Buffer pH 9.0 in a T/T MEGA multifunctional Microwave Histoprocessor (Milestone). Sections were cooled down in distilled water for 5 min, then permeabilized with DAKO Wash Buffer (contains Tween-20) for 5 min, followed by incubation in blocking buffer (DAKO Wash Buffer with 1% bovine serum albumin) for 5 min. Primary antibodies were diluted in DAKO Antibody Diluent and incubated at room temperature for 1 h. Sections were washed for 5 min in DAKO Wash Buffer followed by 5 min in blocking buffer. Secondary antibodies were diluted in blocking buffer and incubated for 30 min at room temperature. The 2-step washing was repeated followed by 5-min incubation in distilled water. Dehydration was performed with increasing concentrations of ethanol. Sections were mounted with DAPI ProLong Gold antifading reagent and stored at -20°C. Immunofluorescence images were acquired using Olympus DP72 microscope and generated using CellSens Entry software. RAD51 foci of 0.42–1.15 μm diameter were quantified on FFPE PDX or patient tumor samples, by scoring the percentage of geminin-positive cells with 5 or more RAD51 nuclear foci. Geminin is a master regulator of cell-cycle progression that ensures the timely onset of DNA replication and prevents its replication and used as counterstaining to mark for S/G2-cell cycle phase (Ballabeni et al, 2013). Scoring was performed blindly onto life images using a 60 \times -immersion oil lens. One hundred geminin-positive cells from at least three representative areas of each sample were analyzed. At least two biological replicates of each PDX model (both vehicle and olaparib-treated) were analyzed. The amount of DNA damage was quantified on FFPE PDX tumor samples by scoring the percentage of geminin-positive cells with c-H2AX foci, as described for RAD51 scoring. Samples with low c-H2AX (< 25% of positive cells) or with < 40 geminin-positive cells were not evaluated (**Fig EV1B**).

Cell lines

U2OS osteosarcoma cells (HTB-96) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in McCoy's 5A (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S). HeLa cells were maintained in DMEM medium (Corning) supplemented with 10% FBS and 1% P/S. All cell lines were routinely tested to be mycoplasma free.

Cas9/mClover-LMNA homologous recombination assay

The mClover-LMNA homologous recombination assay was adapted from Pinder et al (2015) and Pauty et al (2017). In brief, U2OS cells were seeded at 175,000 cells per well in 6-well plates to be transfected 6 h later with control or PALB2 siRNA at a final concentration of 50 nM using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Twenty-four hours post-transfection, 1×10^6 cells per condition were pelleted and resuspended in 100 μ l complete nucleofector solution (SE Cell Line 4D-NucleofectorTM X Kit, Lonza) to which 1 μ g of pCR2.1-CloverLMNA donor, 1 μ g pX330-LMNAgRNA, 1 μ g of the indicated PALB2 construct, 0.1 μ g of piRFP670-N1 (used as transfection control), and 200 qmol of siRNA were added. Once transferred to a 100 μ l Lonza certified cuvette, cells were transfected using the 4D-Nucleofector X-unit, program CM-104, immediately resuspended in culture media, and transferred to a 100 mm dish for 64 h. Then, 500,000 cells were plated onto glass coverslips, while the remaining was lysed for Western blotting as described below. Coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde and analyzed for Clover expression by fluorescence microscopy a total of 72 h post-nucleofection.

Protein extraction and Western blotting

U2OS cells were resuspended in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.5% NP-40) containing protease and phosphatase inhibitors (PMSF (1 mM), aprotinin (4 μ g/ml), leupeptin (1 μ g/ml), NaF (5 mM), and Na₃VO₄ (1 mM)). Frozen tumors of each PDX (n = 1–3 replicates) were lysed in 500 μ l of ice-cold lysis buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 40 mM Beta-glycero phosphate, 5% Glycerol, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, and protease and phosphatase inhibitors as above) per 100 mg and then crushed using a sterile pestle (Axygen). U2OS and PDX lysates were incubated for 30 min on ice and sonicated 30 s ON/OFF for 10 cycles with a Bioruptor (Diagenode). Insoluble material was removed by high-speed centrifugation at 4°C, and protein concentration was determined by the Bradford assay. Total soluble protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were blocked for an hour at room temperature with 5% non-fat dry milk in PBST and probed overnight, 4°C, with rabbit polyclonal PALB2 antibody (Bethyl, A301-246A) at 1:2,000 and mouse monoclonal GAPDH antibody (Fitzgerald, 10R-G109a) at 1:160,000 in the blocking solution. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used at 1:10,000 in PBST for 1 h at room temperature followed by detection using the Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer).

Localization of PALB2 to laser-induced DSBs

The experiments were performed as described in Couturier et al (2016). Briefly, HeLa cells were transfected with YFP-PALB2-WT or YFP-PALB2-p.M296Nfs and microirradiated. The recruitment of YFP-PALB2 to laser-induced DNA damage sites was monitored overtime.

HBOC patient cohort

The cohort consisted of breast cancer patients from the Vall d'Hebron University Hospital, with FFPE material representative of the disease and signed IRB-approved informed consent form. Due to personal or family history, and after ruling out BRCA1/2 mutations, patients were tested for germline mutations linked to breast cancer susceptibility within a research protocol. Immunofluorescence analysis and RAD51 quantification was performed as described for FFPE PDX tumor samples.

Statistical analysis

Regarding the sample size calculation, this exploratory study involved as many samples as possible during the study timeframe. Data were analyzed with GraphPad Prism version 7.0. Error bars represent the Standard Error of the Mean (SEM) of at least two biological replicates, unless otherwise stated. Shapiro–Wilk test was used to assess normality of data distributions. Statistical tests were performed using paired or unpaired two-tailed t-test (for two groups comparison of YFP intensity (%) in the FRAP assay and of c-H2AX/geminin- and geminin-positive cells in PDX cohort-1), Mann–Whitney U-test (for two groups comparison of RAD51/geminin-positive cells in PDX cohort-1), or one-way ANOVA (for three or more groups in gene targeting efficiency comparisons using Cas9/mClover LMNA1 homologous recombination assay). Pearson correlation was used for analyze the correlation between the RAD51 score and the tumor volume change upon olaparib treatment. For the validation of the two anti-RAD51 antibodies, Spearman correlation was used. The ROC AUC was calculated to estimate the prediction capacity of HRD and RAD51 scores to PARPi response. For ROC curve comparison, a two-sided bootstrap test was used by means of statistical package pROC in R software version 3.4.1. To calculate the association between PALB2 mutation and RAD51 score, a logistic regression model was fitted to estimate the odds ratio (OR) with CI 95%. Levene's test is used to test whether groups of comparison have equal variances (homoscedasticity). No evidence has been found to reject the hypothesis of homoscedasticity in our data. Consequently, the statistical comparison has been carried out under the hypothesis of similar variance between groups.

Data availability

The datasets produced in this study are available in the following database: Exome sequencing cohort 1: Sequence data has been deposited at the European Genome-phenome Archive (EGA), which is hosted by the EBI and the CRG, under accession number EGAS00001003267 (<https://ega-archive.org/studies/EGAS00001003267>). 73-gene profiling cohort 2: Sequence data has been deposited at the European Nucleotide Archive (ENA), under accession number PRJEB28816 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB28816>). Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Geoffrey Shapiro, Dr. Peter Bouwman, Dr. Neil Johnson, Dr. Josep V. Forment, the Molecular Pathology Group at VHIO, the Breast Cancer and Melanoma Group at VHIO, Dr. Felip Vilardell Villellas, and Laura Duran-Lozano for helpful discussions. The Breast Surgical Unit from Vall d'Hebron Hospital; Pilar Antón, Maite Calvo, Patricia Cozar from the Experimental Therapeutics Group at VHIO; Brian Dougherty, Zhongwu Lai, and Ambar Ahmed from AstraZeneca and Amélie Rodrigue and Yan Coulombe from Masson laboratory have provided technical support. The authors acknowledge the Cellex Foundation for providing research facilities and equipment. This Research Project was also supported by ESMO with the aid of a grant from Roche. Any views, opinions, findings, conclusions, or recommendations expressed in this material are those solely of the authors and do not necessarily reflect those of ESMO or Roche. This research was supported by Spanish Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) funding, an initiative of the Spanish Ministry of Economy and Innovation partially supported by European Regional Development FEDER Funds [FIS PI17/01080 to V. Serra, FIS PI12-02606 to J. Balmaña, FIS PI12/02585 and PI15-00355 to O. Diez, FIS PI13/01711 and PI16/01218 to S. Gutiérrez-Enríquez], by a TRANSCAN-2 [AC15/00063 to V. Serra], the Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) [LABAE16020PORTT to V. Serra], the Catalan Agency AGAUR [2017 SGR 540 coordinator V. Serra], the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) [Foundation grant to J.-Y. Masson], and the Programme de soutien à des initiatives internationales de recherche et d'innovation (SIIRI) du Ministère de l'Économie, de l'Innovation et des Exportations du Québec [to J.-Y. Masson and J. Simard, PSR-SIIRI-949]. We acknowledge the "Tumor Biomarkers Collaboration" supported by the Banco Bilbao Vizcaya Argentaria (BBVA) Foundation, the GHD-Pink program, the FERRO Foundation, and the Orozco Family for supporting this study [to V. Serra and J. Baselga]. M. Castroviejo-Bermejo is awarded with a Junta Provincial de Barcelona, Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) fellowship. C. Cruz [AIOC15152806CRUZ] and S. Bonache are recipients of AECC

fellowships. A. Llop-Guevara is awarded with a PERIS fellowship from the Departament de Salut, Generalitat de Catalunya [SLT002/16/00477]. V. Serra [CP14/00228] and S. Gutiérrez-Enríquez [CP10/00617] are supported by the Miguel Servet Program (ISCIII). J.-Y. Masson is a FRQS chair in genome stability, and J. Simard is a Canada Research Chair in Oncogenetics. The xenograft program in the Caldas laboratory is supported by Cancer Research UK and also received funding from an EU H2020 Network of Excellence (EuroCAN)

Author contributions

MC-B, CCr, MJO, JBI, and VS designed the study. MC-B, CCr, AL-G, MD, YHI, AG-O, BP, MG, OR, JG, SB, and AM-F performed experiments or procedures. MC-B, CCr, AL-G, SG-E, and AB analyzed the data. GV, CV, RD, CCr, and SG-E provided and analyzed patients' data. PG, MV, VP, XS-C, GD, JS, and OD provided study materials. PN, ITR, JCB, CCa, CS, JC, JJ, J-YM, SC, J-GJ, MJO, OD, JBI, and VS supervised experiments. MC-B, CC, JBI, and VS wrote the manuscript, with input and scientific advice from AL-G, SG-E, CCa, JBas, J-YM, SC, MJO, and OD.

Conflict of interest

V.S. declares a non-commercial research agreement with AstraZeneca and Tesaro. J.B.I. is an advisory board member for Clovis, Tesaro, and Medivation and has received speaker bureau honoraria by AstraZeneca. J.C.B. and M.J.O. are employees of AstraZeneca. S.C. and J.-G.J. are employees of XenTech. CCa is on the External Science Panel of AstraZeneca. JBas is on the Board of Directors of Foghorn and is a past board member of Varian Medical Systems, Bristol-Myers Squibb, Grail, Aura Biosciences and Infinity Pharmaceuticals. He has performed consulting and/or advisory work for Grail, PMV Pharma, ApoGen, Juno, Lilly, Seragon, Novartis and Northern Biologics. He has stock or other ownership interests in PMV Pharma, Grail, Juno, Varian, Foghorn, Aura, Infinity, ApoGen, as well as Tango and Venthera, for which is a co-founder. He has previously received Honoraria or Travel Expenses from Roche, Novartis, and Lilly. No potential conflict of interests were disclosed by the other authors.

5.9 References

Abkevich V, Timms KM, Hennessy BT, Potter J, Carey MS, Meyer LA, Smith-McCune K, Broaddus R, Lu KH, Chen J et al (2012) Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 107: 1776 – 1782

Ahdesmäki MJ, Gray SR, Johnson JH, Lai Z (2016) Disambiguate: an opensource application for disambiguating two species in next generation sequencing data from grafted samples. *F1000Res* 5: 2741

Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pykäs K, Roberts J, Lee A, Subramanian D, De Leeneer K, Fostira F et al (2014) Breastcancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med* 371:497 – 506

Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, Scott C, Weitzel JN, Oaknin A, Loman N et al (2010) Oral poly(ADPribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 376: 245 – 251

Ballabeni A, Zamponi R, Moore JK, Helin K, Kirschner MW (2013) Geminin deploys multiple mechanisms to regulate Cdt1 before cell division thus ensuring the proper execution of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: E2848 – E2853

Balmus G, Pilger D, Coates J, Demir M, Sczaniecka-Clift M, Barros A, Woods M, Fu B, Yang F, Chen E et al (2018) ATM orchestrates the DNA-damage response to counter toxic non-homologous end-joining at broken replication forks. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/330043> [PREPRINT]

Ter Brugge P, Kristel P, van der Burg E, Boon U, de Maaker M, Lips E, Mulder L, de Ruiter J, Moutinho C, Gevensleben H et al (2016) Mechanisms of therapy resistance in patient-derived xenograft models of BRCA1-deficient breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 108: djw148

Bruna A, Rueda OM, Greenwood W, Batra AS, Callari M, Batra RN, Pogrebniak K, Sandoval J, Cassidy JW, Tufegdzcic-Vidakovic A et al (2016) A biobank of breast cancer explants with preserved intra-tumor heterogeneity to screen anticancer compounds. *Cell* 167:260 – 274.e22

Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434:913 – 917

Buisson R, Masson JY (2012) PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 40: 10312 – 10323

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Bertucci F, Cabaud O, Wicinski J, Finetti P, Josselin E, Adelaide J, Nguyen T-T, Monville F et al (2013) ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program. *Cancer Res* 73:7290 – 7300

Chaudhuri RA, Callen E, Ding X, Gogola E, Duarte AA, Lee J-E, Wong N, Lafarga V, Calvo JA, Panzarino NJ et al (2016) Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* 535:382 – 387

Chen C-C, Kass EM, Yen W-F, Ludwig T, Moynahan ME, Chaudhuri J, Jasin M (2017) ATM loss leads to synthetic lethality in BRCA1 BRCT mutant mice associated with exacerbated defects in homology-directed repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 7665 – 7670

Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, Aghajanian C, Oaknin A, Dean A, Colombo N, Weberpals JI, Clamp A, Scambia G et al (2017) Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 390: 1949 – 1961

Couturier AM, Fleury H, Patenaude A-M, Bentley VL, Rodrigue A, Coulombe Y, Niraj J, Pauty J, Berman JN, Dellaire G et al (2016) Roles for APRIN (PDS5B) in homologous recombination and in ovarian cancer prediction. *Nucleic Acids Res* 44:10879 – 10897

Cruz C, Castroviejo-Bermejo M, Gutiérrez-Enríquez S, Llop-Guevara A, Ibrahim YH, Gris-Oliver A, Bonache S, Morancho B, Bruna A, Rueda OM et al (2018) RAD51 foci as a functional biomarker of homologous recombination repair and PARP inhibitor resistance in germline BRCA-mutated breast cancer. *Ann Oncol* 29: 1203 – 1210

Davies H, Glodzik D, Morganello S, Yates LR, Staaf J, Zou X, Ramakrishna M, Martin S, Boyault S, Sieuwerts AM et al (2017) HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. *Nat Med* 23: 517 – 525

Drost R, Dhillon KK, van der Gulden H, van der Heijden I, Brandsma I, Cruz C, Chondronasiou D, Castroviejo-Bermejo M, Boon U, Schut E et al (2016) BRCA1185delAG tumors may acquire therapy resistance through expression of RING-less BRCA1. *J Clin Invest* 126:2903 – 2918

Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C et al (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434:917 – 921

Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ et al (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361: 123 – 134

Gao H, Korn JM, Ferretti S, Monahan JE, Wang Y, Singh M, Zhang C, Schnell C, Yang G, Zhang Y et al (2015) High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat Med* 21: 1318 – 1325

Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, Hirte H, Huntsman D, Clemons M, Gilks B et al (2011) Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* 12:852 – 861

Gogola E, Duarte AA, de Ruiter JR, Wiegant WW, Schmid JA, de Bruijn R, James DI, Guerrero I, Vis DJ, Annunziato S et al (2018) Selective loss of PARG restores poly(ADP-ribose) and counteracts PARP inhibitor-mediated synthetic lethality. *Cancer Cell* 33: 1078 – 1093.e12

Graeser M, McCarthy A, Lord CJ, Savage K, Hills M, Salter J, Orr N, Parton M, Smith IE, Reis-Filho JS et al (2010) A marker of homologous recombination predicts pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 16:6159 – 6168

Guillemette S, Serra RW, Peng M, Hayes JA, Konstantinopoulos PA, Green MR, Cantor SB (2015) Resistance to therapy in BRCA2 mutant cells due to loss of the nucleosome remodeling factor CHD4. *Genes Dev* 29:489 – 494

Helleday T (2011) The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol* 5:387 – 393

Izumchenko E, Paz K, Ciznadija D, Sloma I, Katz A, Vasquez-Dunddel D, Ben-Zvi I, Stebbing J, McGuire W, Harris W et al (2017) Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors. *Ann Oncol* 28: 2595 – 2605

Kais Z, Rondinelli B, Holmes A, O'Leary C, Kozono D, D'Andrea AD, Ceccaldi R (2016) FANCD2 maintains fork stability in BRCA1/2-deficient tumors and promotes alternative end-joining DNA repair. *Cell Rep* 15:2488 – 2499

Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmana J, Mitchell G, Fried G, Stemmer SM, Hubert A et al (2014) Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol* 33:244 – 250

Kawamoto T, Araki K, Sonoda E, Yamashita YM, Harada K, Kikuchi K, Masutani C, Hanaoka F, Nozaki K, Hashimoto N et al (2005) Dual roles for DNA polymerase η in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. *Mol Cell* 20: 793 – 799

Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Karlan BY, Taniguchi T, Fountzilas E, Francoeur N, Levine DA, Cannistra SA (2010) Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 28:3555 – 3561

Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD (2015) Homologous recombination deficiency: exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discov* 5: 1137 – 1154

Lai Z, Markovets A, Ahdesmaki M, Chapman B, Hofmann O, McEwen R, Johnson J, Dougherty B, Barrett JC, Dry JR (2016) VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res* 44: e108

Lee JEA, Li N, Rowley SM, Cheasley D, Zethoven M, McInerney S, Goringe KL, James PA, Campbell IG (2018) Molecular analysis of PALB2 -associated breast cancers. *J Pathol* 245: 53 – 60

Lefebvre C, Bachelot T, Filleron T, Pedrero M, Campone M, Soria JC, Massard C, Lévy C, Arnedos M, Lacroix-Triki M et al (2016) Mutational profile of metastatic breast cancers: a retrospective analysis. *PLoS Med* 13: 1 – 18

Lord CJ, Ashworth A (2017) PARP inhibitors: synthetic lethality in the clinic. *Science* 355: 1152 – 1158

Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, de Plater L, Guyader C, De Pinieux G, Judde J-G et al (2007) A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 13: 3989 – 3998

Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, Nava Rodrigues D, Robinson D, Omlin A, Tunariu N et al (2015) DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 373:1697 – 1708

McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Biłkowska A, Swift S, Giavara S, O'Connor MJ, Tutt AN, Zdzienicka MZ et al (2006) Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 66: 8109 – 8115

Michelena J, Lezaja A, Teloni F, Schmid T, Imhof R, Altmeyer M (2018) Analysis of PARP inhibitor toxicity by multidimensional fluorescence microscopy reveals mechanisms of sensitivity and resistance. *Nat Commun* 9: 2678

Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, Fabbro M, Ledermann JA, Lorusso D, Vergote I et al (2016) Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *N Engl J Med* 375:2154 – 2164

Murai J, Huang SN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, Ji J, Takeda S, Pommier Y (2012) Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res* 72:5588 – 5599

Mutter RW, Riaz N, Ng CKY, Delsite R, Piscuoglio S, Edelweiss M, Martelotto LG, Sakr RA, King TA, Giri DD et al (2017) Bi-allelic alterations in DNA repair genes underpin homologous recombination DNA repair defects in breast cancer. *J Pathol* 242:165 – 177

Naipal KAT, Verkaik NS, Ameziane N, van Deurzen CHM, ter Brugge P, Meijers M, Sieuwerts AM, Martens JW, O'Connor MJ, Vrieling H et al (2014) Functional ex vivo assay to select homologous recombination-deficient breast tumors for PARP inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* 20:4816 – 4826

Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, Korinkova G, Simkova D, Bouchal J, Lenobel R, Bartkova J, Lau A, O'Connor MJ et al (2012) Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell Cycle* 11:3837 – 3850

Pauty J, Rodrigue A, Couturier A, Buisson R, Masson J-Y (2014) Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer. *Biochem J* 460:331 – 342

Pauty J, Couturier AM, Rodrigue A, Caron M-C, Coulombe Y, Dellaire G, Masson J-Y (2017) Cancer-causing mutations in the tumor suppressor PALB2 reveal a novel cancer mechanism using a hidden nuclear export signal in the WD40 repeat motif. *Nucleic Acids Res* 45:2644 – 2657

Pellegrino S, Michelena J, Teloni F, Imhof R, Altmeyer M (2017) Replication-coupled dilution of H4K20me2 guides 53BP1 to pre-replicative chromatin. *Cell Rep* 19: 1819 – 1831

Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T (2010) Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell* 37: 492 – 502

Pettitt SJ, Krastev DB, Brandsma I, Dréan A, Song F, Aleksandrov R, Harrell MI, Menon M, Brough R, Campbell J et al (2018) Genome-wide and highdensity CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nat Commun* 9:1849

Pinder J, Salsman J, Dellaire G (2015) Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPRbased genome editing. *Nucleic Acids Res* 43:9379 – 9392

Plummer E (2006) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 6:364 – 368

Polak P, Kim J, Braunstein LZ, Karlic R, Haradhavala NJ, Tiao G, Rosebrock D, Livitz D, Kübler K, Mouw KW et al (2017) A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. *Nat Genet* 49:1476 – 1486

Postel-Vinay S, Bajrami I, Friboulet L, Elliott R, Fontebasso Y, Dorvault N, Olaussen KA, André F, Soria J-C, Lord CJ et al (2013) A highthroughput screen identifies PARP1/2 inhibitors as a potential therapy for ERCC1-deficient non-small cell lung cancer. *Oncogene* 32:5377 – 5387

Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, GebSKI V, Penson RT, Oza AM, Korach J, Huzarski T, Poveda A, Pignata S et al (2017) Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a doubleblind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18:1274 – 1284

Raderschall E, Golub EI, Haaf T (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1921 – 1926

Reznik E, Miller ML, S_{enbabao_glu} Y, Riaz N, Sarungbam J, Tickoo SK, Al-Ahmadie HA, Lee W, Seshan VE, Hakimi AA et al (2016) Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife* 5: e10769

Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N, Armstrong A et al (2017) Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N Engl J Med* 377: 523 – 533

Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AOH, Zander SAL, Derksen PWB, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A et al (2008) High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 17079 – 17084

Saredi G, Huang H, Hammond CM, Alabert C, Bekker-Jensen S, Forne I, Reverón-Gómez N, Foster BM, Mlejnkova L, Bartke T et al (2016) H4K20me0 marks post-replicative chromatin and recruits the TONSL–MMS22L DNA repair complex. *Nature* 534: 714 – 718

Shakeri H, Fakhrijou A, Nikanfar A, Mohaddes-Ardebili SM (2016) Methylation analysis of BRCA1 and APC in breast cancer and it's relationship to clinicopathological features. *Clin Lab* 62: 2333 – 2337

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC et al (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92: 205 – 216

Turner N, Tutt A, Ashworth A (2004) Opinion: hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 4: 814 – 819

Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK et al (2010) Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 376: 235 – 244

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RTPCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034

Wagle N, Berger MF, Davis MJ, Blumenstiel B, DeFelice M, Pochanard P, Ducar M, Van Hummelen P, MacConaill LE, Hahn WC et al (2012) Highthroughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. *Cancer Discov* 2: 82 – 93

Wang Y, Bernhardt AJ, Cruz C, Kraiss JJ, Nacson J, Nicolas E, Peri S, van der Gulden H, van der Heijden I, O'Brien SW et al (2016) The BRCA1-11q alternative splice isoform bypasses germline mutations and promotes therapeutic resistance to PARP inhibition and cisplatin. *Cancer Res* 76: 2778 – 2790

Watkins JA, Irshad S, Grigoriadis A, Tutt ANJ (2014) Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. *Breast Cancer Res* 16: 211

Wiese C, Dray E, Groesser T, San Filippo J, Shi I, Collins DW, Tsai M-S, Williams GJ, Rydberg B, Sung P et al (2007) Promotion of homologous recombination and genomic stability by RAD51AP1 via RAD51 recombinase enhancement. *Mol Cell* 28: 482 – 490

Yazinski SA, Comaills V, Buisson R, Genois M-M, Nguyen HD, Ho CK, Todorova Kwan T, Morris R, Lauffer S, Nussenzweig A et al (2017) ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells. *Genes Dev* 31: 318 – 332

Zimmermann M, Murina O, Reijns MAM, Agathangelou A, Challis R, Tarnauskaite Z, Muir M, Fluteau A, Aregger M, McEwan A et al (2018) CRISPR screens identify genomic ribonucleotides as a source of PARP trapping lesions. *Nature* 559: 285 – 289

5.10 Supplementary figures

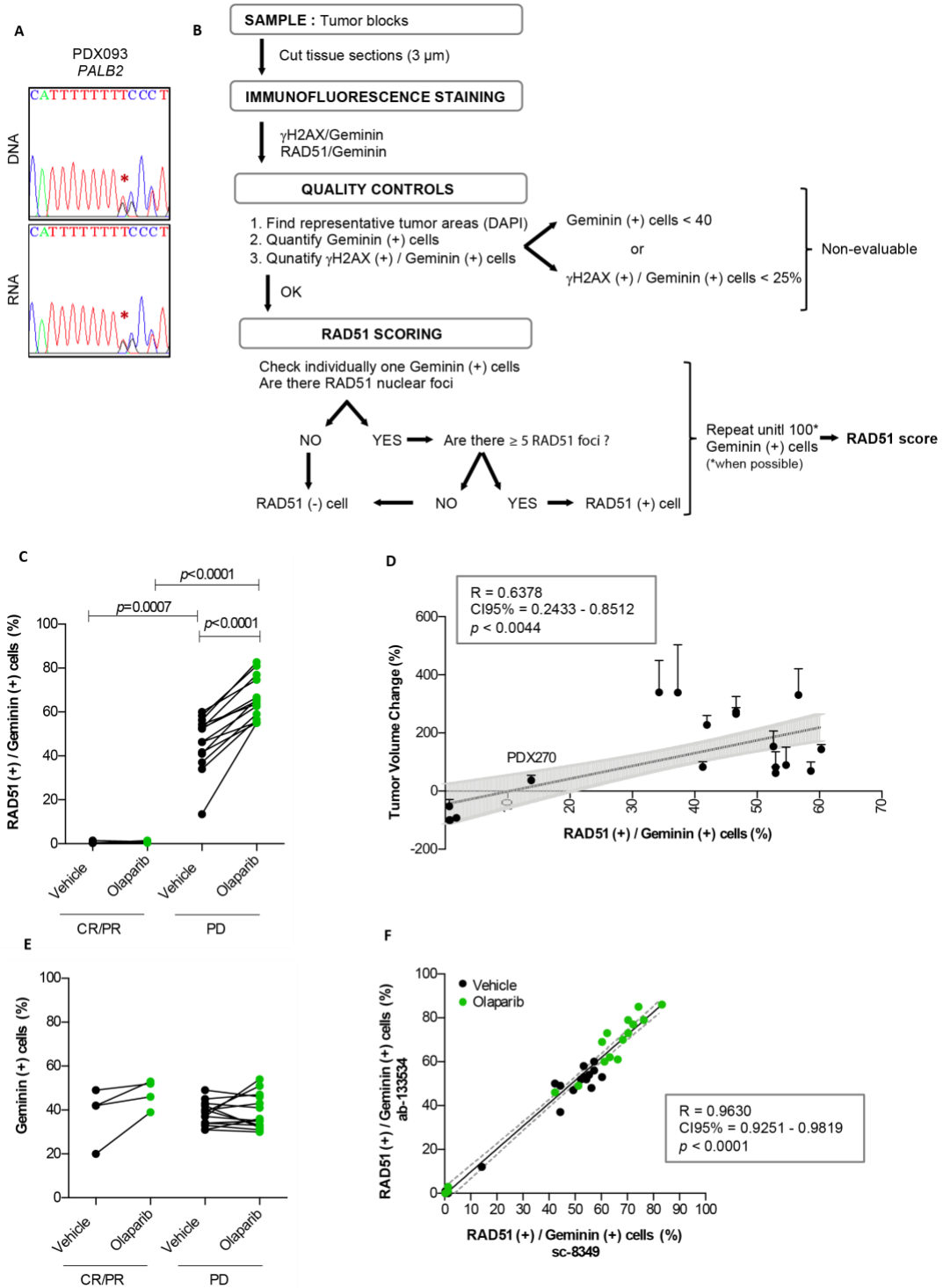


Figure S5.1 –

(A) Sanger sequencing reverse plots of DNA and RNA from PDX093 showing 1 nt (T) insertion in one PALB2 allele (PALB2 c.886dupA). **(B)** Flow diagram of the RAD51 scoring criteria and quality controls. **(C)** Quantification of geminin-positive cells with RAD51 foci (Mann-Whitney test) following treatment with vehicle and olaparib in PARPi-sensitive (CR/PR) vs. PARPi-resistant (PD) PDXs. **(D)** Pearson correlation between the RAD51 score (percentage of RAD51 (+) / Geminin (+) cells, assessed in untreated FFPE tumor samples) and the percentage of Tumor Volume Change in olaparib-treated tumors from PDX cohort-1. Each dot represents one PDX model. Error bars indicate SEM from independent tumors ($n \geq 3$) treated with olaparib. **(E)** Quantification of geminin-positive cells (paired t test in vehicle- vs. olaparib- treated tumors; unpaired t test in CR/PR vs. PD tumors) following treatment with vehicle and olaparib in PARPi-sensitive (CR/PR) vs. PARPi-resistant (PD) PDXs. **(F)** Spearman correlation of the percentage of RAD51 (+) / Geminin (+) cells in PDX cohort-1 assessed with two different antibodies against RAD51 both in vehicle- and olaparib-treated PDX samples.

6 Discussion

PALB2 est le troisième gène de susceptibilité le plus fréquemment muté, après *BRCA1* et *BRCA2*, chez les patientes de cancer du sein (CS) avec une histoire familiale. Au vu de son importance dans la susceptibilité génétique au CS, le criblage de variations dans *PALB2* est effectué couramment en clinique chez les patientes de CS *gBRCA1*-négatives et *gBRCA2*-négatives avec une histoire familiale. Bien que la majorité des variants de *PALB2* identifiés soient impliqués dans la troncation de la protéine, un nombre conséquent de variations faux sens (environ 200) dont la signification est incertaine (VUSs), ont été identifiées en clinique chez des patientes de CS. À ce jour, aucune recommandation clinique n'est établie pour les VUSs, puisque leurs effets sur la fonction protéique de *PALB2* et leurs implications dans le développement du CS ne sont pas connus. Il est donc nécessaire d'entreprendre une caractérisation exhaustive des VUSs de *PALB2* afin d'améliorer leur interprétation clinique et la gestion des porteuses de VUSs de *PALB2*.

Au début de notre projet de caractérisation fonctionnelle des variants de *PALB2*, nous avons émis l'hypothèse que notre méthode systématique d'essais fonctionnels nous permettrait de classer les variants de signification incertaine de *PALB2* comme bénins ou délétères pour sa fonction protéique. Pour ce faire, nous avons sélectionné différents tests qui nous permettent d'évaluer l'effet des VUSs sur le rôle de *PALB2* dans la recombinaison homologue (RH). Tout d'abord, nous avons analysé l'effet des variants sur la localisation cellulaire de *PALB2*, ainsi que la cinétique de recrutement de *PALB2* aux sites de dommages à l'ADN. Ensuite, *PALB2* étant un médiateur de la RH, nous avons mesuré l'efficacité de la RH à l'aide d'un système rapporteur CRISPR-LMNA, ainsi que par la formation des foyers RAD51 dans des cellules irradiées. Enfin, nous avons mesuré la survie cellulaire après traitement à l'olaparib, un inhibiteur de PARP approuvé par la FDA depuis 2014 et utilisé en clinique pour le traitement des cancers ovariens avancés *gBRCA1/2*-positifs, afin d'évaluer la corrélation entre la réponse aux inhibiteurs de PARP et les défauts de RH associés aux variations de *PALB2*.

Avantages et limites de notre méthode systématique d'essais fonctionnels

L'analyse de la localisation cellulaire et de la cinétique de recrutement de PALB2 aux sites de dommages à l'ADN s'est avérée très intéressante d'un point de vue mécanistique. En effet, nos observations soutiennent le modèle de régulation de la localisation cellulaire de PALB2 via une séquence NES située dans le domaine WD40 et les défauts de RH associés à une délocalisation cytoplasmique [175]. Ainsi, les variants faux sens du WD40 p.I887S, p.V9127A, p.I944N, p.L947S, p.L947F, p.T1030I et p.W1140G, sont délocalisés au cytoplasme (**Tableau 6.2**). De plus, on peut observer pour les variants dont la délocalisation est très importante (p.I944N et p.T1030I) que les défauts de RH semblent plus graves, en comparaison avec les variants dont la délocalisation est moindre (p.L947S et p.L947F) (**Tableau 6.2**). Ce qui reste moins évident, dans l'interprétation de l'effet des VUSs du WD40 sur la localisation cellulaire de PALB2, est la prédiction des variants impliqués dans l'export nucléaire de PALB2. Alors que certains variants du WD40 vont entraîner un relâchement de la conformation en tonneau-beta du domaine WD40 suffisant pour induire une exclusion nucléaire de PALB2, d'autres variants du WD40 n'ont pas cet effet. L'analyse systématique de la substitution de chaque résidu du WD40 serait très utile pour prédire quelle position est impliquée dans la régulation de la localisation cellulaire de PALB2, et anticiper ainsi les acides aminés pouvant affecter le statut de la RH. Nous avons testé cette approche avec le logiciel de visualisation de structures protéiques en 3D PyMOL, malheureusement nous n'avons pas été en mesure d'analyser clairement et précisément l'implication des variants dans la conformation du domaine WD40. En effet, la déstructuration du tonneau-beta du WD40 par un seul variant faux sens n'est pas flagrante et ne nous permet pas de conclure sur l'impact de celui-ci sur le repliement correct de la protéine. Il serait donc intéressant de développer une méthode prédictive de l'effet des variants du WD40 sur la conformation 3D de PALB2.

De plus, pour une variation donnée de *PALB2*, la délocalisation au cytoplasme n'est pas systématique pour les cellules qui expriment ce variant. En effet, si on prend comme exemple le variant p.I944N, 65.6% des cellules transfectées expriment YFP-PALB2 majoritairement dans le cytoplasme, contre 18.4% dans le noyau. Ce résultat soulève plusieurs questions quant au mécanisme de régulation des protéines PALB2 mutées dans le WD40 (PALB2-WD40*). Est-ce que les protéines PALB2-WD40* ne sont pas systématiquement reconnues par les mécanismes de régulation des protéines mutées et mal repliées ? S'agit-il d'une intervention des chaperonnes pour permettre le bon repliement des protéines PALB2-WD40* malgré la présence de la mutation faux sens dans le WD40 ? Est-ce que le mauvais repliement de PALB2-WD40* empêche la reconnaissance du signal NES ou la prise en charge de la protéine par la machinerie d'export au cytoplasme médiée par CRM1 ? Il serait donc intéressant d'étudier plus en profondeur la régulation de la localisation cellulaire de PALB2 afin de comprendre quel mécanisme est responsable de cet effet pléiotropique.

D'autre part, une diminution importante de la cinétique de recrutement des protéines PALB2 nucléaires semble indiquer un problème de formation des foyers de réparation et donc des défauts de RH pour les variants localisés dans le *coiled-coil* (voir **Tableau 6.1** pour les variants p.L24S et p.L35P) et le domaine WD40 (voir **Tableau 6.2** pour les variants p.I944N, p.L947S, p.L947F, p.T1030I, p.L1119P, p.L1070P et p.W1140G) analysés. Malgré une localisation nucléaire partielle ou totale, les taux de RH et de formation de foyers RAD51 restent bas et semblent indiquer un problème d'interaction avec les partenaires de la RH BRCA1, BRCA2 et RAD51 (**Tableau 6.1**). Les résultats obtenus avec le système double-hybride, indiquent que le variant p.L35P affecte l'interaction de PALB2 avec BRCA1 et que les variants p.L947S p.L947F, p.T1030I, p.G1043A, p.L1119P et p.W1140G affectent la formation du complexe PALB2-BRCA2 (**Tableau 6.1**). Le système double-hybride étant réalisé à l'aide de vecteurs plasmidiques contenant les séquences partielles des protéines BRCA1, BRCA2 et PALB2, il serait intéressant d'effectuer des expériences de co-immunoprécipitation afin de valider ces hypothèses dans un modèle qui comprend les protéines d'intérêt complètes. Enfin, nous avons essayé d'adapter le système double-hybride pour analyser les interactions de PALB2 avec RAD51 sans succès. Nous n'avons pas été en mesure de trouver la séquence minimale de RAD51 qui permettrait d'exprimer correctement la protéine et d'analyser sa liaison à PALB2. Il serait donc intéressant de poursuivre la mise au point de ce vecteur plasmidique afin d'avoir une gamme d'essais fonctionnels double-hybride complète pour PALB2, qui permettrait d'interroger les interactions avec ses partenaires de la RH BRCA1, BRCA2 et RAD51.

Ces expériences sont cependant moins pertinentes au regard de la classification des VUSs de *PALB2* comme bénins ou pathogéniques. En effet, ces analyses ne nous permettent pas de statuer sur l'état de la RH ni la sensibilité aux inhibiteurs de PARP. De plus, ces expériences ne peuvent se réaliser à haut débit, et l'acquisition et l'analyse des données prennent beaucoup de temps.

L'évaluation de l'efficacité de la RH par le système CRISPR-LMNA et la formation des foyers RAD51, ainsi que la mesure de la survie cellulaire après traitement à l'olaparib, sont des expériences très prometteuses pour la classification des VUSs de *PALB2*.

Le système CRISPR-LMNA nous permet d'évaluer la capacité des cellules à effectuer une RH complète dans un modèle cellulaire humain. Les résultats obtenus sont sans équivoque et très faciles à interpréter grâce à la présence ou l'absence du marquage fluorescent de la membrane nucléaire. De plus, les taux de RH dans le contrôle WT étant de 15%-25%, cet intervalle permet de mieux apprécier les variations de l'effet des variants de *PALB2* sur la RH. Pour ce qui est des foyers RAD51, l'expertise et la qualité des expériences réalisées peuvent grandement influencer l'interprétation des résultats. Un foyer RAD51 se caractérise par un point de fluorescence d'une taille et intensité particulières. Les bruits de fonds peuvent rendre difficile la reconnaissance des foyers RAD51. De plus, il faut rester vigilant quant à l'utilisation de logiciels qui sont offerts pour le comptage automatisé, puisqu'ils induisent des biais dans l'interprétation des foyers, dans la mesure où les réglages sont

déterminés en fonction de la taille et de l'intensité moyenne des foyers et sont fixes. Il faudra donc prendre en considération ce point dans l'éventualité d'une mise en place de ce test en clinique pour déterminer l'éligibilité des patientes *gPALB2*-positives aux PARPi.

D'autre part, nos résultats montrent une bonne corrélation entre les défauts de RH observés par le système CRISPR-LMNA et la formation des foyers RAD51, soit un coefficient de détermination de $R^2 = 0.87$ (**Figure 6.1**). Ainsi, pour 87% des variants avec des défauts de RH estimés par le système CRISPR-LMNA, il est possible de prédire correctement le statut de la formation des foyers RAD51.

Les tests de survie cellulaire réalisés après traitement à l'inhibiteur de PARP olaparib, nous ont permis d'identifier les variations de *PALB2* qui génèrent une sensibilité aux PARPi et donc des défauts de RH. Nos résultats présentent une meilleure corrélation entre la survie cellulaire avec traitement à l'olaparib et les défauts de RH mesurés par la formation des foyers RAD51 que le système CRISPR-LMNA, avec un coefficient de détermination respectivement de $R^2 = 0.76$ et $R^2 = 0.69$ (**Figures 6.2 et 6.3**).

Notre collaboration avec l'équipe du Dre Serra nous a aussi permis de montrer que dans le contexte de la réponse aux PARPi, le critère des foyers RAD51 est meilleur que le score HRD (*Homologous Recombination Deficiency*), qui se base sur la perte d'hétérozygotie, le déséquilibre allélique des télomères (ou TAI pour *Telomeric Allelic Imbalance*) et les coupures chromosomiques (ou LST pour *Large-Scale state Transition*).

Ainsi, l'utilisation des scores de RAD51, le système CRISPR-LMNA et la survie cellulaire après traitement à l'olaparib, représentent une méthode rigoureuse et complète pour la classification des VUSs de *PALB2*.

Tableau 6.1 – Résumé des informations concernant les VUSs de *PALB2* localisés en N-terminal analysés

Variant	BRCA1 / BRCA2		PARPI		HR			PALB2		
	Double-hybride	Olaparib (2,5 uM)	CRISPR-LMNA	Foyers RAD51	DR-GFP	Localisation	Recrutement	Cinétique		
WT-NTER	100,0	66,2	100,0	24,0	5,0	N	81,0	100,0		
EV-NTER	55,3	31,5	4,3	1,1	-	-	-	-		
P4L	102,4	57,4	-	-	-	-	-	-		
P8L	75,9	50,6	59,6	17,0	7,1	N	69,0	92,0		
K18R	101,2	54,3	86,7	24,5	-	-	-	-		
L24S	40,0	36,4	0,7	3,4	1,7	N	77,0	50,7		
Y28C	63,9	60,6	35,6	14,8	4,8	N	-	73,0		
K30N	65,8	64,5	-	-	4,6	-	-	-		
L32V	122,6	57,3	-	-	-	-	-	-		
L35P	46,1	31,5	4,2	1,1	0,8	N	78,9	38,9		
R37H	101,0	56,8	37,8	16,1	4,1	N	-	105,0		
H46Y	90,5	50,5	82,2	23,7	-	-	-	-		
P65L	95,2	57,3	-	-	-	-	-	-		
I76V	98,7	61,6	-	-	-	-	-	-		
V78I	94,9	60,9	-	-	6,6	-	-	-		
K81R	96,6	61,4	-	-	-	-	-	-		
E94K	91,3	62,3	-	-	-	-	-	-		
G115V	72,9	70,7	-	-	-	-	-	-		
T124I	73,6	72,0	-	-	-	-	-	-		
L169I	56,7	68,4	-	-	4,7	-	-	-		
P207R	81,5	66,6	-	-	-	-	-	-		
P210L	91,3	71,2	-	-	6,5	-	-	-		
S319Y	57,9	72,6	-	-	4,7	-	-	-		
T397S	-	49,1	-	-	5,2	N	76,1	110,7		
Y408H	-	65,1	-	-	4,9	N	23,3	21,4		
R414Q	-	69,5	-	-	-	N	73,8	100,7		
S417Y	-	71,8	-	-	7,2	N	79,4	73,7		
V425M	-	70,3	-	-	-	N	80,1	104,4		

Classification préliminaire : toléré (bleu), intermédiaire (jaune) et délétère (rose).

Tableau 6.2 – Résumé des informations concernant les VUSs de *PALB2* localisés en C-terminal analysés

Variant	BRCA1 / BRCA2	PARPI	HR			PALB2		
	Double-hybride	Olaparib (2,5 uM)	CRISPR-LMNA	Foyers RAD51	DR-GFP	Localisation	Recrutement	Cinétique
WT-CTER	100,0	66,2	100,0	24,0	-	N	81,0	100,0
EV-CTER	1,8	31,5	4,3	1,1	-	-	-	-
P864S	77,4	67,3	-	-	6,4	-	-	-
D871G	-	58,8	-	-	4,5	N	64,5	121,1
I887S	-	40,1	-	-	-	C>N	36,8	28,3
V917A	-	49,5	-	-	-	C>N	34,9	25,5
L931R	-	44,0	-	-	3,6	N	78,9	102,2
V932M	86,6	67,6	-	-	4,9	-	-	-
L939W	92,0	64,2	-	-	4,8	-	-	-
I944N	-	35,7	10,7	0,5	1,5	C>N	35,3	25,2
L947S	18,7	54,4	41,0	17,0	4,0	C>N	61,4	60,0
L947F	18,9	51,2	54,4	18,9	3,7	C>N	55,2	65,0
S955R	101,3	67,9	-	-	-	-	-	-
I966V	89,3	66,7	-	-	-	-	-	-
G998E	93,3	68,6	-	-	6,0	-	-	-
A1017T	94,7	64,7	-	-	-	-	-	-
E1018D	68,4	63,2	-	-	-	-	-	-
A1025T	89,2	72,3	-	-	3,9	-	-	-
T1030I	1,1	38,1	23,6	9,8	3,0	C>N	50,0	47,0
K1041T	75,6	65,1	-	-	-	-	-	-
G1043A	39,8	57,7	47,1	19,8	4,9	N>C	59,1	84,0
L1070P	-	37,1	3,4	1,3	1,7	N>C	61,1	65,1
S1075G	88,4	65,5	-	-	-	-	-	-
S1084L	88,4	62,5	-	-	-	-	-	-
I1093T	87,3	64,6	92,0	22,2	4,0	N	67,8	62,0
S1102R	82,9	64,0	-	-	7,7	-	-	-
V1105A	97,5	58,7	-	-	-	-	-	-
Q1114H	92,1	61,2	-	-	4,9	-	-	-
L1119P	31,5	56,0	69,6	21,1	4,9	N>C	53,9	67,0
W1140G	24,3	42,7	34,0	16,3	4,9	N=C	65,5	59,0
L1143P	101,7	71,9	-	-	6,6	-	-	-
G1145R	-	65,5	-	-	5,2	N	75,0	101,8
I1180T	92,0	70,2	-	-	3,6	-	-	-

RAD51, RAD51C

BRCA2

POL H, RNF168

Classification préliminaire : toléré (bleu), intermédiaire (jaune) et délétère (rose).

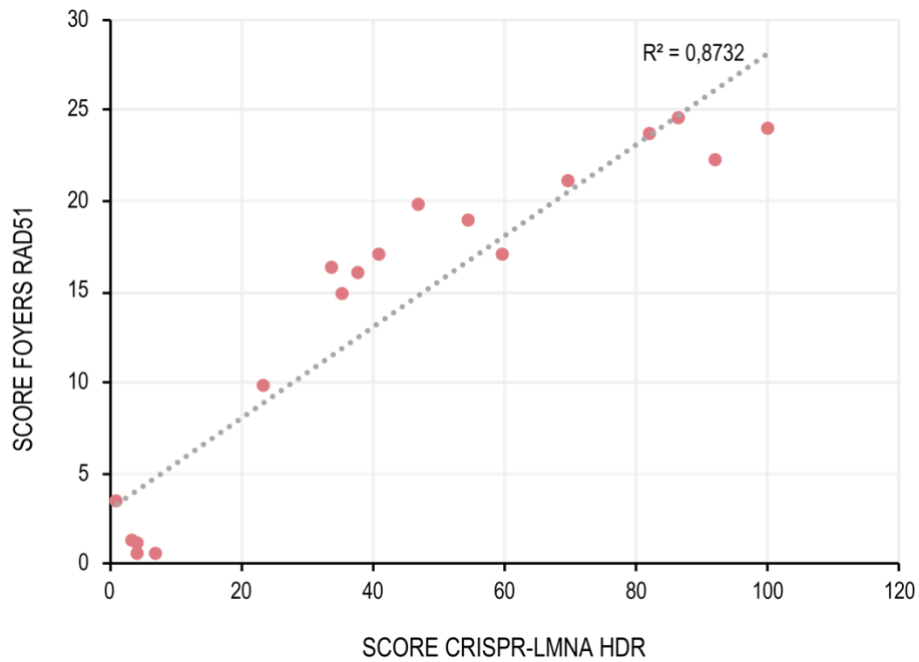


Figure 6.1 – Corrélation entre CRISPR-LMNA et foyers RAD51

Le coefficient de détermination est de 0.8732.

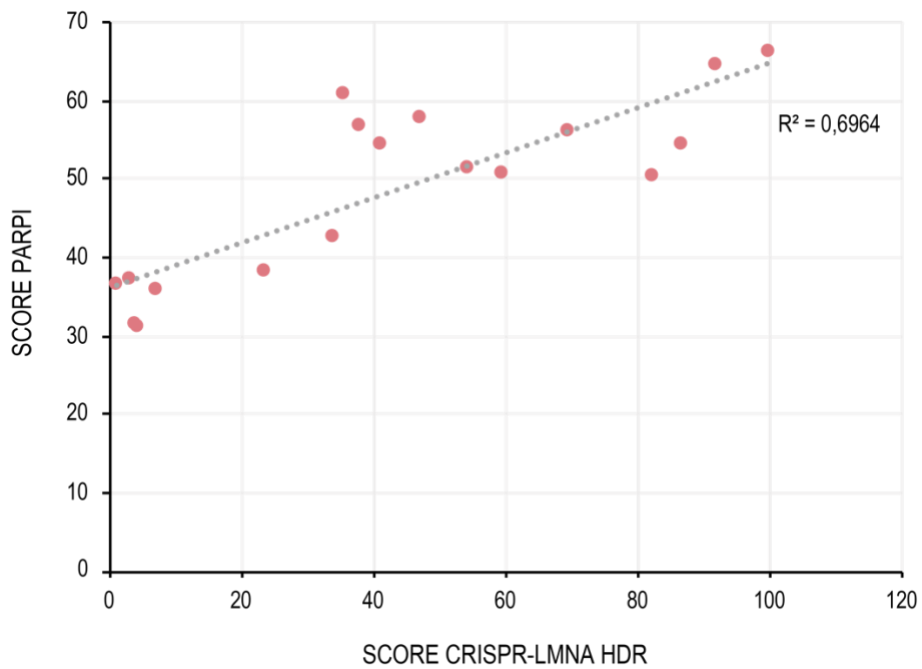


Figure 6.2 – Corrélation entre CRISPR-LMNA et PARPi

Le coefficient de détermination est de 0.6964.

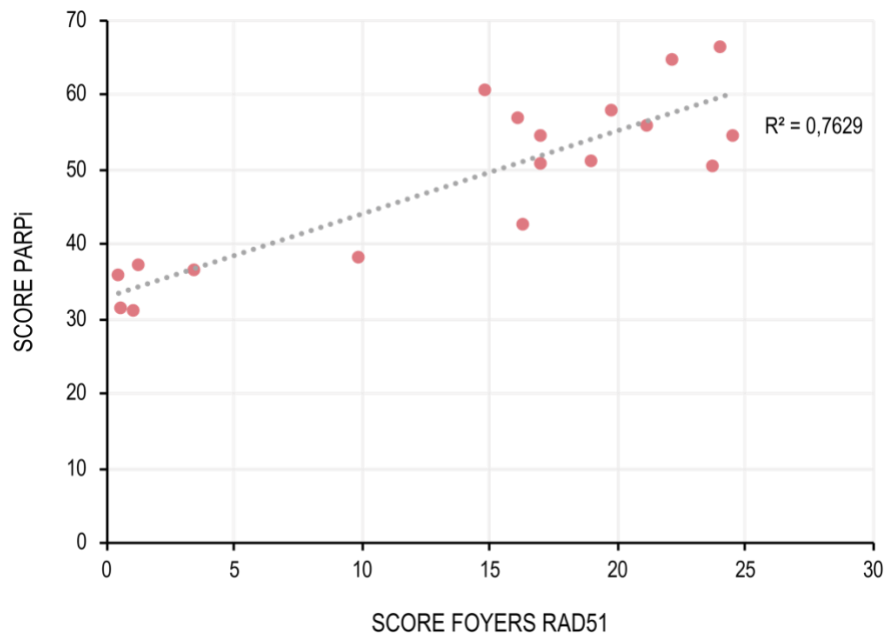


Figure 6.3 – Corrélation entre PARPi et foyers RAD51
 Le coefficient de détermination est de 0.7629.

Validation de notre méthode systématique d'essais fonctionnels & intégration de nos résultats de caractérisation fonctionnelle des VUSs de *PALB2* en clinique

À ce jour, aucune méthode n'existe pour classer les VUSs localisés dans *PALB2*. Par conséquent, quand des VUSs sont identifiés en clinique, les médecins ne sont pas en mesure d'interpréter le risque des porteuses de développer un cancer du sein ou du pancréas. De plus, les décisions concernant le suivi médical des porteurs, le recours aux chirurgies préventives ou encore la stratégie de traitement ne peuvent se prendre de manière éclairée et pertinente. Ici nous avons montré que notre technique nous permet de caractériser de manière robuste, l'effet des variants sur la fonction de *PALB2* dans la RH. Si on se base sur les critères pris en compte pour la classification des VUSs de *BRCA1* et *BRCA2*, les informations récoltées ici quant à l'effet délétère des VUSs de *PALB2* sont indispensables à la classification rigoureuse de ces derniers par les comités désignés comme l'*American College of Medical Genetics (ACMG)* [72].

Il est donc indispensable d'effectuer la validation de notre méthode avec une liste de variations tronquantes de *PALB2* classées comme pathogéniques ainsi que des variations bénignes non associées avec le CS, afin de démontrer si cette méthode est un bon marqueur de la pathogénicité. Cette analyse nous permettrait de définir rigoureusement la spécificité et la sensibilité de chacun de nos essais, ainsi que de pondérer chaque expérience dans l'évaluation de l'effet délétère des variants et d'établir des scores d'effet délétère pertinents. En effet, nos études nous ont permis de mettre en évidence que certains variants semblent présenter un phénotype intermédiaire (**Tableau 6.1**). À défaut d'avoir établi des seuils précis concernant les scores d'effet délétère pour chacun des tests effectués, nous n'avons pas été en mesure de classer ces variants comme bénins ou délétères pour le moment. Dans la mesure où certains VUSs de *BRCA1* ont été classés comme variants pathogéniques de phénotype intermédiaire [245], il est possible qu'une telle classe existe aussi pour les VUSs de *PALB2*. Il est donc primordial de faire une étude de partitionnement pour statuer sur l'existence d'une catégorie de variations délétères intermédiaires pour les VUSs de *PALB2*. Ensuite, il serait intéressant de comparer les critères des variants intermédiaires pour *BRCA1* à nos données fonctionnelles pour les variants possiblement intermédiaires de *PALB2*.

Enfin, les perspectives de notre approche de caractérisation fonctionnelle exhaustive des variations génétiques dans *PALB2*, devraient inclure l'intégration des données fonctionnelles que nous avons obtenues pour aider la classification clinique des variations par les instances appropriées. D'une part, les résultats obtenus à l'aide de ces essais pourraient être intégrés aux analyses *in silico* afin d'améliorer la prédiction de la pathogénicité des VUSs de *PALB2*. En 2017, Woods et coll. ont montré que l'intégration des données fonctionnelles des VUSs localisés en C-terminal de *BRCA1*, aux analyses *in silico* de la prédiction de la pathogénicité, était une méthode très robuste pour l'annotation clinique de ces variants [76]. Ce modèle hiérarchique bayésien, nommé VarCall, a aussi été adapté pour la prédiction des variations faux sens localisées

dans le domaine de liaison à l'ADN de BRCA2 [246]. D'autre part, les organisations comme l'ACMG ou encore le consortium ENIGMA (*Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles*), dont font partie les Dr Simard, Dr Couch et Dr Monteiro pourraient bénéficier de nos résultats. En effet nos données fonctionnelles s'intègrent très bien au modèle quantitatif multifactoriel utilisé lors de l'évaluation des VUSs comme bénins ou pathogéniques, et qui inclut les données concernant l'histoire personnelle et/ou familiale de cancer des porteurs, la ségrégation des variants dans les familles avec des cas de cancers, les données computationnelles et prédictives, les analyses d'association dans des études cas-contrôles et enfin les caractéristiques pathologiques des tumeurs du sein. De plus, le consortium international ENIGMA a pour mission de déterminer la significativité clinique des VUSs dans les gènes de susceptibilité au CS confirmés ou suspectés. Le groupe fournit aussi leur expertise aux initiatives de base de données globale et de classification des variants génétiques. Ils seront donc en mesure d'utiliser nos données fonctionnelles et d'améliorer l'interprétation clinique des variations que nous avons étudiées. Enfin, le groupe s'intéresse aussi à l'exploration des meilleurs procédés de communication de ces informations aux médecins, conseillers en génétiques et patients. Cette étape d'intégration est donc indispensable pour une exploitation clinique optimale des données que nous avons générées.

Au-delà de notre méthode de caractérisation fonctionnelle des variants faux sens de *PALB2*

Bien que notre méthode systématique d'essais fonctionnels soit très pertinente pour caractériser les variants de *PALB2* et leurs impacts sur la recombinaison homologe, elle n'est pas adaptée pour le criblage à haut débit des variants délétères de *PALB2* et ne peut être utilisée pour l'interprétation de l'effet de variants situés dans d'autres gènes de prédisposition comme *ATM* ou encore *CHEK2*.

En effet, l'intégration d'*ATM* et *CHEK2* dans le criblage de variations chez les patientes de CS en clinique d'oncogénétique a aussi permis l'identification de centaines de variants localisés dans ces gènes de susceptibilité. Le problème est d'autant plus important pour ces gènes, que les variations de type faux sens sont probablement égales ou plus importantes que les variations tronquantes, en termes de fréquence et de risque attribuable [63]. La caractérisation des variants faux sens localisés dans ces deux gènes pourrait donc contribuer grandement à la compréhension de l'impact de ces gènes sur le développement du CS et faciliter l'identification des femmes à risque.

D'autre part ces dernières années, les groupes des Dre Lea Starita, Dr Douglas M. Fowler et Dr Jay Shendure ont publié plusieurs articles pour présenter les MAVEs (*Multiplexed functional Assays for Variant Effects*), de nouvelles méthodes multiplexées d'analyse des VUSs [247, 248]. Parmi les MAVEs, on retrouve l'essai VAMP-seq (*Variant Abundance by Massively Parallel sequencing*), qui est basé sur le séquençage parallèle à haut débit et qui permet d'étudier les différences d'expression de milliers de protéines mutées à la fois [249]. Les auteurs rapportent aussi une méthode multiplexée de réparation de l'ADN médiée par homologie (*Homology-Directed DNA Repair Assay*), qui leur a permis d'analyser simultanément des centaines de résidus mutés dans *BRCA1* et leur effet sur la réparation de l'ADN [250]. Enfin, une autre étude rapporte la mise au point d'une méthode de saturation de l'édition de génome pour classer de manière pertinente et rigoureuse les variants de *BRCA1*. Cette technique repose aussi sur l'intégration d'une librairie de variants de *BRCA1*, afin de muter systématiquement tous les acides aminés de la protéine [251]. Ces méthodes à haut débit permettent ainsi d'anticiper toutes les mutations possibles sur les gènes d'intérêts et l'évaluation de leur effet sur la fonction et la stabilité protéique avant même qu'elles soient identifiées en clinique. La création d'une banque de données regroupant ces informations aiderait de manière spectaculaire l'interprétation clinique de ces variants et la prise en charge des porteurs.

Il serait donc intéressant de cribler les variants de *PALB2*, mais aussi *ATM* et *CHEK2* avec ces méthodes.

Éligibilité des femmes *gPALB2* pour les thérapies PARPi

Les patientes diagnostiquées pour des tumeurs de type TNBC sont testées en routine en clinique d'oncogénétique pour des mutations *gBRCA1* et *gBRCA2*. Néanmoins présentement, le *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) ne recommande pas de dépistage pour les mutations qui sont situées dans les autres gènes de susceptibilité comme *PALB2*, puisqu'aucune association entre ces gènes et le risque élevé de développer un TNBC n'avait encore été faite.

Récemment, Shimelis et coll. ont montré une association entre les variations pathogéniques de *PALB2* et un risque élevé de développer un BC de type TNBC (OR = 14.41, 95% CI = 9.27-22.60, $P < 2.2 \cdot 10^{-6}$). De plus, les auteurs rapportent une fréquence de mutations *gPALB2* dans 1.0% à 1.6% des 10 901 tumeurs TNBC analysées, faisant de ce gène le troisième gène le plus fréquemment muté pour cette catégorie de tumeurs, après *BRCA1* et *BRCA2* [200]. Cette étude montre une fois de plus l'importance de la contribution des mutations *gPALB2* aux tumeurs TNBC et la nécessité de génotyper les patientes pour des variations pathogéniques dans ce gène de susceptibilité à forte pénétrance.

D'autre part, deux autres études cliniques portant sur la réponse aux traitements dans le cadre de mutations *gBRCA1* et *gBRCA2*, ont montré que le génotypage des patientes pour des mutations pathogéniques peut être bénéfique pour les stratégies de traitements choisis. En effet, l'essai randomisé de OlympiAD sur la réponse aux PARPi (Olaparib) des patientes *gBRCA1*-positives, *gBRCA2*-positives et HER2- métastatiques, montre que les patientes TNBC *gBRCA1* et *gBRCA2* tirent le meilleur bénéfice des traitements thérapeutiques basés sur les PARPi en combinaison avec des thérapies cytotoxiques (HR = 0.45, 95% CI = 0.29-0.63) [201]. De plus, Hahnen et coll. ont montré en 2017 que les porteuses de *gBRCA1* et *gBRCA2* exposées à l'anthracycline, le taxane et la bavacizumab avec ou sans carboplatine ont une haute réponse pathologique complète (ou pCR pour pathological Complete Response) (pCR = 65%-67%) en comparaison avec les patientes *gBRCA1*-négatives et *gBRCA2*-négatives (pCR = 35%-55%) [202].

Au vu de la corrélation entre la réponse aux inhibiteurs de PARP et les variations pathogéniques de *PALB2*, il est indispensable d'ouvrir la conversation sur l'éligibilité des patientes de TNBC porteuses de mutations *gPALB2* aux traitements thérapeutiques basés sur les PARPi.

Conclusion

Au cours de mon doctorat, nous avons entrepris la caractérisation fonctionnelle exhaustive de variations génétiques localisées dans le gène de susceptibilité au cancer du sein *PALB2*, afin d'améliorer leur classification et interprétation en clinique.

Notre première hypothèse de recherche était que l'utilisation d'une méthode systématique d'essais fonctionnels, centrée sur le rôle de *PALB2* dans la RH, nous permettrait d'analyser l'effet des variants étudiés et ainsi de les classer comme bénins ou délétères. Nos collaborations avec les équipes des Dr Couch, Dr Monteiro et Dr Carvalho nous ont permis de valider la pertinence de notre méthode systématique d'essais fonctionnels et de procéder à la caractérisation exhaustive de variations faux sens de *PALB2* identifiées chez des patientes de BC. Ces études nous ont aussi permis de mettre en avant la nécessité d'établir des scores d'effet délétère pour chacun des essais effectués avec notre méthode systématique pour permettre la classification rigoureuse de ces variations. D'autre part, nos travaux nous ont permis de soulever plusieurs questions sur le rôle de la protéine dans la stabilité du génome et sa régulation. Par exemple, l'étude de la localisation cellulaire des variants du WD40 nous a permis d'observer que la délocalisation au cytoplasme de *PALB2* n'est pas systématique ou totale pour certains variants. Il serait donc intéressant d'étudier plus en profondeur la régulation de la localisation cellulaire de *PALB2* par sa séquence NES. Enfin, nos études nous ont permis de participer activement à l'amélioration de la compréhension et de l'interprétation de ces variants et permettre ainsi aux médecins une meilleure gestion des patientes porteuses de ces variations.

Notre deuxième hypothèse de recherche était que les variations pathogéniques de *PALB2*, entraînent des défauts de RH suffisant pour induire une sensibilité aux traitements par PARPi. Ainsi, notre collaboration avec le Dre Serra, nous a permis de corréler les défauts de formation de foyers RAD51 et la sensibilité aux PARPi avec la présence d'une mutation tronquante dans *PALB2*. Ces résultats ouvrent la discussion sur l'éligibilité des patientes de BC porteuses de mutations pathogéniques dans *PALB2*, aux traitements thérapeutiques basés sur les PARPi.

References

1. Canadian Cancer Society. *Canadian Cancer Statistics 2017*. 2017.
2. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **288**(3): p. 321-33.
3. Bergkvist, L., et al., *The risk of breast cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement*. N Engl J Med, 1989. **321**(5): p. 293-7.
4. Torre, L.A., et al., *Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016. **25**(1): p. 16-27.
5. Visvader, J.E. and J. Stingl, *Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives*. Genes Dev, 2014. **28**(11): p. 1143-58.
6. Jayatilleke, N., N. Pashayan, and J.W. Powles, *Burden of disease due to cancer in England and Wales*. J Public Health (Oxf), 2012. **34**(2): p. 287-95.
7. Macias, H. and L. Hinck, *Mammary gland development*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2012. **1**(4): p. 533-57.
8. Vrtacnik, P., et al., *The many faces of estrogen signaling*. Biochem Med (Zagreb), 2014. **24**(3): p. 329-42.
9. Lange, C.A. and D. Yee, *Progesterone and breast cancer*. Womens Health (Lond), 2008. **4**(2): p. 151-62.
10. Petz, L.N. and A.M. Nardulli, *Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(7): p. 972-85.
11. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(6): p. 320-8.
12. Tomasetti, C. and B. Vogelstein, *Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions*. Science, 2015. **347**(6217): p. 78-81.
13. Wren, B.G., *The origin of breast cancer*. Menopause, 2007. **14**(6): p. 1060-8.
14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
15. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *The Path to Cancer --Three Strikes and You're Out*. N Engl J Med, 2015. **373**(20): p. 1895-8.
16. Fouad, Y.A. and C. Aanei, *Revisiting the hallmarks of cancer*. Am J Cancer Res, 2017. **7**(5): p. 1016-1036.
17. Sinn, H.P. and H. Kreipe, *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition*. Breast Care (Basel), 2013. **8**(2): p. 149-54.

18. Blows, F.M., et al., *Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies*. PLoS Med, 2010. **7**(5): p. e1000279.
19. Kraby, M.R., et al., *The prognostic value of androgen receptors in breast cancer subtypes*. Breast Cancer Res Treat, 2018. **172**(2): p. 283-296.
20. Dias, K., et al., *Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0168669.
21. Puisieux, A., et al., *The cell-of-origin dictates the genomic landscape of breast cancers*. Mol Cell Oncol, 2017. **4**(4): p. e1338931.
22. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
23. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
24. Engstrom, M.J., et al., *Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **140**(3): p. 463-73.
25. Goldhirsch, A., et al., *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013*. Ann Oncol, 2013. **24**(9): p. 2206-23.
26. Bertheau, P., et al., *p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy*. Breast, 2013. **22 Suppl 2**: p. S27-9.
27. Feingold, J., *[Multifactorial diseases: a nightmare for the geneticist]*. Med Sci (Paris), 2005. **21**(11): p. 927-33.
28. Monteiro, A.N. and M.L. Freedman, *Lessons from postgenome-wide association studies: functional analysis of cancer predisposition loci*. J Intern Med, 2013. **274**(5): p. 414-24.
29. Africander, D. and K.H. Storbeck, *Steroid metabolism in breast cancer: Where are we and what are we missing?* Mol Cell Endocrinol, 2018. **466**: p. 86-97.
30. Day, F.R., et al., *Large-scale genomic analyses link reproductive aging to hypothalamic signaling, breast cancer susceptibility and BRCA1-mediated DNA repair*. Nat Genet, 2015. **47**(11): p. 1294-1303.
31. Britt, K., *Menarche, menopause, and breast cancer risk*. Lancet Oncol, 2012. **13**(11): p. 1071-2.
32. Carney, P.A., et al., *Individual and combined effects of age, breast density, and hormone replacement therapy use on the accuracy of screening mammography*. Ann Intern Med, 2003. **138**(3): p. 168-75.
33. McCormack, V.A. and I. dos Santos Silva, *Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(6): p. 1159-69.
34. Boyd, N.F., et al., *Quantitative classification of mammographic densities and breast cancer risk: results from the Canadian National Breast Screening Study*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(9): p. 670-5.

35. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C., *Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies*. Lancet, 1996. **347**(9017): p. 1713-27.
36. *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer*. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Lancet, 1997. **350**(9084): p. 1047-59.
37. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C., *Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 187-95.
38. Kelsey, J.L., M.D. Gammon, and E.M. John, *Reproductive factors and breast cancer*. Epidemiol Rev, 1993. **15**(1): p. 36-47.
39. Beral, V., et al., *Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 832000 women with breast cancer from 16 countries*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1007-16.
40. Palmer, J.R., et al., *A prospective study of induced abortion and breast cancer in African-American women*. Cancer Causes Control, 2004. **15**(2): p. 105-11.
41. Lambe, M., et al., *Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth*. N Engl J Med, 1994. **331**(1): p. 5-9.
42. Mahue-Giangreco, M., et al., *Induced abortion, miscarriage, and breast cancer risk of young women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(3): p. 209-14.
43. Albrektsen, G., et al., *Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects*. Br J Cancer, 2005. **92**(1): p. 167-75.
44. Sun, X., et al., *Association of Parity and Time since Last Birth with Breast Cancer Prognosis by Intrinsic Subtype*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016. **25**(1): p. 60-7.
45. Work, M.E., et al., *Reproductive risk factors and oestrogen/progesterone receptor-negative breast cancer in the Breast Cancer Family Registry*. Br J Cancer, 2014. **110**(5): p. 1367-77.
46. World Cancer Research Fund, A.I.f.C.R., *Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, nutrition, physical activity and breast cancer survivors*. 2018.
47. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast, C., *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease*. Lancet, 2001. **358**(9291): p. 1389-99.
48. Radford, D.M. and B.A. Zehnbaauer, *Inherited breast cancer*. Surg Clin North Am, 1996. **76**(2): p. 205-20.
49. Peto, J. and T.M. Mack, *High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 411-4.

50. Kenemans, P., R.A. Verstraeten, and R.H. Verheijen, *Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer*. *Maturitas*, 2004. **49**(1): p. 34-43.
51. Pharoah, P.D., et al., *Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention*. *Nat Genet*, 2002. **31**(1): p. 33-6.
52. Michailidou, K., et al., *Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci*. *Nature*, 2017. **551**(7678): p. 92-94.
53. Milne, R.L., et al., *Identification of ten variants associated with risk of estrogen-receptor-negative breast cancer*. *Nat Genet*, 2017. **49**(12): p. 1767-1778.
54. Lilyquist, J., et al., *Common Genetic Variation and Breast Cancer Risk-Past, Present, and Future*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018. **27**(4): p. 380-394.
55. Tavtigian, S.V., et al., *The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds*. *Nat Genet*, 1996. **12**(3): p. 333-7.
56. Hall, J.M., et al., *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. *Science*, 1990. **250**(4988): p. 1684-9.
57. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. *Science*, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
58. Wooster, R., et al., *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. *Science*, 1994. **265**(5181): p. 2088-90.
59. Wooster, R., et al., *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. *Nature*, 1995. **378**(6559): p. 789-92.
60. Rousset-Jablonski, C. and A. Gompel, *Screening for familial cancer risk: Focus on breast cancer*. *Maturitas*, 2017. **105**: p. 69-77.
61. Ghousaini, M., P.D.P. Pharoah, and D.F. Easton, *Inherited genetic susceptibility to breast cancer: the beginning of the end or the end of the beginning?* *Am J Pathol*, 2013. **183**(4): p. 1038-1051.
62. Easton, D.F., et al., *Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(23): p. 2243-57.
63. Tavtigian, S.V. and G. Chenevix-Trench, *Growing recognition of the role for rare missense substitutions in breast cancer susceptibility*. *Biomark Med*, 2014. **8**(4): p. 589-603.
64. Kuchenbaecker, K.B., et al., *Evaluation of Polygenic Risk Scores for Breast and Ovarian Cancer Risk Prediction in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers*. *J Natl Cancer Inst*, 2017. **109**(7).
65. Couch, F.J., K.L. Nathanson, and K. Offit, *Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention*. *Science*, 2014. **343**(6178): p. 1466-70.
66. Petrucelli, N., M.B. Daly, and G.L. Feldman, *Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2*. *Genet Med*, 2010. **12**(5): p. 245-59.

67. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D980-5.
68. Fokkema, I.F., et al., *LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases*. Hum Mutat, 2011. **32**(5): p. 557-63.
69. Kurian, A.W., et al., *Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment*. J Clin Oncol, 2014. **32**(19): p. 2001-9.
70. Zhou, X., E.S. Iversen, Jr., and G. Parmigiani, *Classification of Missense Mutations of Disease Genes*. J Am Stat Assoc, 2005. **100**: p. 51-60.
71. Maxwell, K.N., et al., *Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer*. Genet Med, 2015. **17**(8): p. 630-8.
72. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
73. Susswein, L.R., et al., *Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing*. Genet Med, 2016. **18**(8): p. 823-32.
74. Kerr, I.D., et al., *Assessment of in silico protein sequence analysis in the clinical classification of variants in cancer risk genes*. J Community Genet, 2017. **8**(2): p. 87-95.
75. Feng, B.J., *PERCH: A Unified Framework for Disease Gene Prioritization*. Hum Mutat, 2017. **38**(3): p. 243-251.
76. Woods, N.T., et al., *Functional assays provide a robust tool for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance*. NPJ Genom Med, 2016. **1**.
77. Xia, B., et al., *Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 719-29.
78. Antoniou, A.C., W.D. Foulkes, and M. Tischkowitz, *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. N Engl J Med, 2014. **371**(17): p. 1651-2.
79. Buisson, R., et al., *Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(10): p. 1247-54.
80. Casadei, S., et al., *Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(6): p. 2222-9.
81. Reid, S., et al., *Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 162-4.
82. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(5): p. 1117-30.

83. Rahman, N., et al., *PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 165-7.
84. Erkko, H., et al., *A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families*. Nature, 2007. **446**(7133): p. 316-9.
85. Erkko, H., et al., *Penetrance analysis of the PALB2 c.1592delT founder mutation*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(14): p. 4667-71.
86. Tischkowitz, M., et al., *Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6788-93.
87. Foulkes, W.D., et al., *Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(6): p. R83.
88. Garcia, M.J., et al., *Analysis of FANCB and FANCN/PALB2 fanconi anemia genes in BRCA1/2-negative Spanish breast cancer families*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **113**(3): p. 545-51.
89. Jones, S., et al., *Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene*. Science, 2009. **324**(5924): p. 217.
90. Blanco, A., et al., *Detection of a large rearrangement in PALB2 in Spanish breast cancer families with male breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **132**(1): p. 307-15.
91. Schrader, K.A., et al., *Genome Sequencing of Multiple Primary Tumors Reveals a Novel PALB2 Variant*. J Clin Oncol, 2016. **34**(8): p. e61-7.
92. Pylkas, K., et al., *Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 146.
93. Ameziane, N., et al., *Lack of large genomic deletions in BRIP1, PALB2, and FANCD2 genes in BRCA1/2 negative familial breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **118**(3): p. 651-3.
94. Ronowicz, A., et al., *Concurrent DNA Copy-Number Alterations and Mutations in Genes Related to Maintenance of Genome Stability in Uninvolved Mammary Glandular Tissue from Breast Cancer Patients*. Hum Mutat, 2015. **36**(11): p. 1088-99.
95. Xia, B., et al., *Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 159-61.
96. Gunnarsson, H., et al., *Evidence against PALB2 involvement in Icelandic breast cancer susceptibility*. J Negat Results Biomed, 2008. **7**: p. 5.
97. McInerney, N.M., et al., *Evaluation of variants in the CHEK2, BRIP1 and PALB2 genes in an Irish breast cancer cohort*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **121**(1): p. 203-10.
98. Nakagomi, H., et al., *Analysis of PALB2 mutations in 155 Japanese patients with breast and/or ovarian cancer*. Int J Clin Oncol, 2016. **21**(2): p. 270-275.

99. Southey, M.C., I. Winship, and T. Nguyen-Dumont, *PALB2: research reaching to clinical outcomes for women with breast cancer*. *Hered Cancer Clin Pract*, 2016. **14**: p. 9.
100. Lee, A.J., et al., *Incorporating truncating variants in PALB2, CHEK2, and ATM into the BOADICEA breast cancer risk model*. *Genet Med*, 2016. **18**(12): p. 1190-1198.
101. Slavin, T.P., et al., *The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk*. *NPJ Breast Cancer*, 2017. **3**: p. 22.
102. Sauty de Chalon, A., et al., *Are PALB2 mutations associated with increased risk of male breast cancer?* *Breast Cancer Res Treat*, 2010. **121**(1): p. 253-5.
103. Ding, Y.C., et al., *Germline mutations in PALB2 in African-American breast cancer cases*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **126**(1): p. 227-30.
104. Silvestri, V., et al., *PALB2 mutations in male breast cancer: a population-based study in Central Italy*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. **122**(1): p. 299-301.
105. Vietri, M.T., et al., *A novel PALB2 truncating mutation in an Italian family with male breast cancer*. *Oncol Rep*, 2015. **33**(3): p. 1243-7.
106. Silvestri, V., et al., *Whole-exome sequencing and targeted gene sequencing provide insights into the role of PALB2 as a male breast cancer susceptibility gene*. *Cancer*, 2017. **123**(2): p. 210-218.
107. Harinck, F., et al., *Routine testing for PALB2 mutations in familial pancreatic cancer families and breast cancer families with pancreatic cancer is not indicated*. *Eur J Hum Genet*, 2012. **20**(5): p. 577-9.
108. Ghorzo, P., et al., *Contribution of germline mutations in the BRCA and PALB2 genes to pancreatic cancer in Italy*. *Fam Cancer*, 2012. **11**(1): p. 41-7.
109. Grant, R.C., et al., *Prevalence of germline mutations in cancer predisposition genes in patients with pancreatic cancer*. *Gastroenterology*, 2015. **148**(3): p. 556-64.
110. Tischkowitz, M.D., et al., *Analysis of the gene coding for the BRCA2-interacting protein PALB2 in familial and sporadic pancreatic cancer*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(3): p. 1183-6.
111. Slater, E.P., et al., *PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families*. *Clin Genet*, 2010. **78**(5): p. 490-4.
112. Peterlongo, P., et al., *PALB2 germline mutations in familial breast cancer cases with personal and family history of pancreatic cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **126**(3): p. 825-8.
113. Hofstatter, E.W., et al., *PALB2 mutations in familial breast and pancreatic cancer*. *Fam Cancer*, 2011. **10**(2): p. 225-31.
114. Stadler, Z.K., et al., *Germline PALB2 mutation analysis in breast-pancreas cancer families*. *J Med Genet*, 2011. **48**(8): p. 523-5.
115. Southey, M.C., et al., *PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS*. *J Med Genet*, 2016. **53**(12): p. 800-811.

116. Dansonka-Mieszkowska, A., et al., *A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients*. BMC Med Genet, 2010. **11**: p. 20.
117. Walsh, T., et al., *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(44): p. 18032-7.
118. Pennington, K.P., et al., *Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(3): p. 764-75.
119. Lu, C., et al., *Patterns and functional implications of rare germline variants across 12 cancer types*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 10086.
120. Norquist, B.M., et al., *Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma*. JAMA Oncol, 2016. **2**(4): p. 482-90.
121. Bogdanova, N., et al., *PALB2 mutations in German and Russian patients with bilateral breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **126**(2): p. 545-50.
122. Wong-Brown, M.W., et al., *Low prevalence of germline PALB2 mutations in Australian triple-negative breast cancer*. Int J Cancer, 2014. **134**(2): p. 301-5.
123. Ramus, S.J., et al., *Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(11).
124. Lilyquist, J., et al., *Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls*. Gynecol Oncol, 2017. **147**(2): p. 375-380.
125. Kotsopoulos, J., et al., *Frequency of germline PALB2 mutations among women with epithelial ovarian cancer*. Fam Cancer, 2017. **16**(1): p. 29-34.
126. Pakkanen, S., et al., *PALB2 variants in hereditary and unselected Finnish prostate cancer cases*. J Negat Results Biomed, 2009. **8**: p. 12.
127. Auerbach, A.D., *Fanconi anemia and its diagnosis*. Mutat Res, 2009. **668**(1-2): p. 4-10.
128. Knies, K., et al., *Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFW3 cause Fanconi anemia*. J Clin Invest, 2017. **127**(8): p. 3013-3027.
129. Gueiderikh, A., F. Rosselli, and J.B.C. Neto, *A never-ending story: the steadily growing family of the FA and FA-like genes*. Genet Mol Biol, 2017. **40**(2): p. 398-407.
130. Howlett, N.G., et al., *Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia*. Science, 2002. **297**(5581): p. 606-9.
131. Tischkowitz, M. and B. Xia, *PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia*. Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7353-9.
132. Rantakari, P., et al., *Inactivation of Palb2 gene leads to mesoderm differentiation defect and early embryonic lethality in mice*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(15): p. 3021-9.

133. Ghosh, S., et al., *Hypersensitivities for acetaldehyde and other agents among cancer cells null for clinically relevant Fanconi anemia genes*. Am J Pathol, 2014. **184**(1): p. 260-70.
134. Tan, S.L.W., et al., *A Class of Environmental and Endogenous Toxins Induces BRCA2 Haploinsufficiency and Genome Instability*. Cell, 2017. **169**(6): p. 1105-1118 e15.
135. Serra, A., et al., *Shared Copy Number Variation in Simultaneous Nephroblastoma and Neuroblastoma due to Fanconi Anemia*. Mol Syndromol, 2012. **3**(3): p. 120-130.
136. Byrd, P.J., et al., *A Hypomorphic PALB2 Allele Gives Rise to an Unusual Form of FA-N Associated with Lymphoid Tumour Development*. PLoS Genet, 2016. **12**(3): p. e1005945.
137. Ghazwani, Y., et al., *Clinical characteristics and genetic subtypes of Fanconi anemia in Saudi patients*. Cancer Genet, 2016. **209**(4): p. 171-6.
138. Bouwman, P., et al., *Loss of p53 partially rescues embryonic development of Palb2 knockout mice but does not foster haploinsufficiency of Palb2 in tumour suppression*. J Pathol, 2011. **224**(1): p. 10-21.
139. Simhadri, S., et al., *Male fertility defect associated with disrupted BRCA1-PALB2 interaction in mice*. J Biol Chem, 2014. **289**(35): p. 24617-29.
140. Ciccia, A. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 179-204.
141. Hoeijmakers, J.H., *DNA damage, aging, and cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(15): p. 1475-85.
142. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
143. Chapman, J.R., M.R. Taylor, and S.J. Boulton, *Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice*. Mol Cell, 2012. **47**(4): p. 497-510.
144. Soulas-Sprauel, P., et al., *V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining*. Oncogene, 2007. **26**(56): p. 7780-91.
145. Shamanna, R.A., et al., *WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13785.
146. Bhargava, R., D.O. Onyango, and J.M. Stark, *Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance*. Trends Genet, 2016. **32**(9): p. 566-575.
147. Rothkamm, K., et al., *Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(16): p. 5706-15.
148. Moynahan, M.E. and M. Jasin, *Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 196-207.
149. San Filippo, J., P. Sung, and H. Klein, *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 229-57.

150. Orthwein, A., et al., *A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells*. Nature, 2015. **528**(7582): p. 422-6.
151. Mattioli, F., et al., *RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1182-95.
152. Luijsterburg, M.S., et al., *A PALB2-interacting domain in RNF168 couples homologous recombination to DNA break-induced chromatin ubiquitylation*. Elife, 2017. **6**.
153. Song, F., et al., *Antiparallel Coiled-Coil Interactions Mediate the Homodimerization of the DNA Damage-Repair Protein PALB2*. Biochemistry, 2018.
154. Buisson, R. and J.Y. Masson, *PALB2 self-interaction controls homologous recombination*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(20): p. 10312-23.
155. Sy, S.M., et al., *PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization*. J Biol Chem, 2009. **284**(27): p. 18302-10.
156. Roy, R., J. Chun, and S.N. Powell, *BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection*. Nat Rev Cancer, 2011. **12**(1): p. 68-78.
157. Zhuang, J., et al., *Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1401-8.
158. Guo, Y., et al., *ATM-dependent Phosphorylation of the Fanconi Anemia Protein PALB2 Promotes the DNA Damage Response*. J Biol Chem, 2015. **290**(46): p. 27545-56.
159. Ahlskog, J.K., et al., *ATM/ATR-mediated phosphorylation of PALB2 promotes RAD51 function*. EMBO Rep, 2016. **17**(5): p. 671-81.
160. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
161. Ma, J., et al., *PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(8): p. 1506-17.
162. Zhang, D.D. and M. Hannink, *Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(22): p. 8137-51.
163. Bleuyard, J.Y., et al., *ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair*. EMBO Rep, 2012. **13**(2): p. 135-41.
164. Hayakawa, T., et al., *MRG15 binds directly to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 7): p. 1124-30.
165. Yoshida, K. and Y. Miki, *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage*. Cancer Sci, 2004. **95**(11): p. 866-71.

166. Menzel, T., et al., *A genetic screen identifies BRCA2 and PALB2 as key regulators of G2 checkpoint maintenance*. EMBO Rep, 2011. **12**(7): p. 705-12.
167. Sy, S.M., M.S. Huen, and J. Chen, *MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination*. J Biol Chem, 2009. **284**(32): p. 21127-31.
168. Martrat, G., et al., *Exploring the link between MORF4L1 and risk of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(2): p. R40.
169. Bleuyard, J.Y., et al., *MRG15-mediated tethering of PALB2 to unperturbed chromatin protects active genes from genotoxic stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(29): p. 7671-7676.
170. Oliver, A.W., et al., *Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2*. EMBO Rep, 2009. **10**(9): p. 990-6.
171. Stirnimann, C.U., et al., *WD40 proteins propel cellular networks*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(10): p. 565-74.
172. Buisson, R., et al., *Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase eta in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks*. Cell Rep, 2014. **6**(3): p. 553-64.
173. Dray, E., et al., *Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(10): p. 1255-9.
174. Park, J.Y., et al., *Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair*. Oncogene, 2014. **33**(40): p. 4803-12.
175. Pauty, J., et al., *Cancer-causing mutations in the tumor suppressor PALB2 reveal a novel cancer mechanism using a hidden nuclear export signal in the WD40 repeat motif*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(5): p. 2644-2657.
176. Hajeri, V.A. and J.F. Amatruda, *Studying synthetic lethal interactions in the zebrafish system: insight into disease genes and mechanisms*. Dis Model Mech, 2012. **5**(1): p. 33-7.
177. Hosoya, N. and K. Miyagawa, *Targeting DNA damage response in cancer therapy*. Cancer Sci, 2014. **105**(4): p. 370-88.
178. Ashworth, A., *A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair*. J Clin Oncol, 2008. **26**(22): p. 3785-90.
179. Schultz, N., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(17): p. 4959-64.
180. Bryant, H.E., et al., *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 913-7.
181. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 917-21.

182. Helleday, T., *The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings*. Mol Oncol, 2011. **5**(4): p. 387-93.
183. Ame, J.C., C. Spenlehauer, and G. de Murcia, *The PARP superfamily*. Bioessays, 2004. **26**(8): p. 882-93.
184. D'Amours, D., et al., *Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions*. Biochem J, 1999. **342** (Pt 2): p. 249-68.
185. Haince, J.F., et al., *PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1197-208.
186. Frit, P., et al., *Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks*. DNA Repair (Amst), 2014. **17**: p. 81-97.
187. Tao, Z., et al., *Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif*. Biochemistry, 2008. **47**(21): p. 5804-13.
188. Morales, J., et al., *Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2014. **24**(1): p. 15-28.
189. Rouleau, M., et al., *PARP inhibition: PARP1 and beyond*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(4): p. 293-301.
190. Rottenberg, S., et al., *High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 17079-84.
191. Robillard, L.N., M; Loehr, A; Orsulic, S; Kristeleit, RS; Lin, K; Raponi, M; Harding, TC; Simmons, AD;, *Preclinical evaluation of the PARP inhibitor rucaparib in combination with PD-1 and PD-L1 inhibition in a syngeneic BRCA1 mutant ovarian cancer model*. 2017.
192. Thorsell, A.G., et al., *Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors*. J Med Chem, 2017. **60**(4): p. 1262-1271.
193. Jones, P., et al., *Niraparib: A Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor for the Treatment of Tumors with Defective Homologous Recombination*. J Med Chem, 2015. **58**(8): p. 3302-14.
194. Litton, J.K., et al., *Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation*. N Engl J Med, 2018. **379**(8): p. 753-763.
195. Gupta, S.K., et al., *Discordant in vitro and in vivo chemopotentiating effects of the PARP inhibitor veliparib in temozolomide-sensitive versus -resistant glioblastoma multiforme xenografts*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(14): p. 3730-41.
196. Shen, Y., et al., *BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(18): p. 5003-15.
197. Murai, J., et al., *Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(2): p. 433-43.

198. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
199. Ossovskaya, V., et al., *Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types*. Genes Cancer, 2010. **1**(8): p. 812-21.
200. Shimelis, H., et al., *Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing*. J Natl Cancer Inst, 2018.
201. Robson, M., et al., *Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation*. N Engl J Med, 2017. **377**(6): p. 523-533.
202. Hahnen, E., et al., *Germline Mutation Status, Pathological Complete Response, and Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer: Secondary Analysis of the GeparSixto Randomized Clinical Trial*. JAMA Oncol, 2017. **3**(10): p. 1378-1385.
203. Couch, F.J., et al., *Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer*. JAMA Oncol, 2017. **3**(9): p. 1190-1196.
204. Hu, C., et al., *Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer*. JAMA, 2018. **319**(23): p. 2401-2409.
205. Hu, C., et al., *Multigene Hereditary Cancer Panels Reveal High-Risk Pancreatic Cancer Susceptibility Genes*. JCO Precision Oncology, 2018. **2**(2): p. 1-28.
206. Antoniou, A.C., et al., *Breast cancer risk in women with PALB2 mutations in different populations*. Lancet Oncol, 2015. **16**(8): p. e375-6.
207. J.; Simard J.; Masson J-Y.; D.M.S.-S.L.G.-S.L.L.A.G.Y.B.N.R.A.M.G.C.M.C., *The tumor suppressor PALB2: inside out* Trends Biochem Sci In press, 2018.
208. Zhang, F., et al., *PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(7): p. 1110-8.
209. Foo, T.K., et al., *Compromised BRCA1-PALB2 interaction is associated with breast cancer risk*. Oncogene, 2017. **36**(29): p. 4161-4170.
210. Sy, S.M., M.S. Huen, and J. Chen, *PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 7155-60.
211. Jagadeesh, K.A., et al., *M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity*. Nat Genet, 2016. **48**(12): p. 1581-1586.
212. Anderson, D. and T. Lassmann, *A phenotype centric benchmark of variant prioritisation tools*. NPJ Genom Med, 2018. **3**: p. 5.
213. Ioannidis, N.M., et al., *REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants*. Am J Hum Genet, 2016. **99**(4): p. 877-885.
214. Huo, Y., et al., *Autophagy opposes p53-mediated tumor barrier to facilitate tumorigenesis in a model of PALB2-associated hereditary breast cancer*. Cancer Discov, 2013. **3**(8): p. 894-907.

215. Pauty, J., et al., *A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs*. *EBioMedicine*, 2018. **27**: p. 225-236.
216. Guidugli, L., et al., *Assessment of the Clinical Relevance of BRCA2 Missense Variants by Functional and Computational Approaches*. *Am J Hum Genet*, 2018.
217. Hart, S.N., et al., *Comprehensive annotation of BRCA1 and BRCA2 missense variants by functionally validated sequence-based computational prediction models*. *Genet Med*, 2018.
218. Caleca, L., et al., *Two Missense Variants Detected in Breast Cancer Probands Preventing BRCA2-PALB2 Protein Interaction*. *Front Oncol*, 2018. **8**: p. 480.
219. Rahman, N., et al., *PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene*. *Nat Genet*, 2007. **39**(2): p. 165-7.
220. Ducey, M., et al., *The Tumor Suppressor PALB2: Inside Out*. *Trends Biochem Sci*, 2019.
221. Ceccaldi, R., et al., *Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Poltheta-mediated repair*. *Nature*, 2015. **518**(7538): p. 258-62.
222. Mateos-Gomez, P.A., et al., *Mammalian polymerase theta promotes alternative NHEJ and suppresses recombination*. *Nature*, 2015. **518**(7538): p. 254-7.
223. Lok, B.H., et al., *RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination*. *Oncogene*, 2013. **32**(30): p. 3552-8.
224. Zhang, F., et al., *PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response*. *Curr Biol*, 2009. **19**(6): p. 524-9.
225. Shen, Y., et al., *BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency*. *Clin Cancer Res*, 2013.
226. Smith, M.A., et al., *Initial testing (stage 1) of the PARP inhibitor BMN 673 by the pediatric preclinical testing program: PALB2 mutation predicts exceptional in vivo response to BMN 673*. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. **62**(1): p. 91-8.
227. Smith, M.A., et al., *Synergistic activity of PARP inhibition by talazoparib (BMN 673) with temozolomide in pediatric cancer models in the pediatric preclinical testing program*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(4): p. 819-32.
228. Buisson, R., et al., *Breast Cancer Proteins PALB2 and BRCA2 Stimulate Polymerase eta in Recombination-Associated DNA Synthesis at Blocked Replication Forks*. *Cell Rep*, 2014. **6**: p. 553.
229. Nepomuceno, T.C., et al., *The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(9).
230. Buisson, R., et al., *Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR*. *Molecular cell* 2017. **65**: p. 336-346.

231. Park, J.Y., et al., *Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair*. *Oncogene*, 2014. **33**: p. 4803-12.
232. Sy, S.M., M.S. Huen, and J. Chen, *MRG15 is a novel PALB2 interacting factor involved in homologous recombination*. *J Biol Chem*, 2009.
233. Antoniou, A.C., et al., *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(6): p. 497-506.
234. Pauty, J., et al., *Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer*. *Biochem J*, 2014. **460**(3): p. 331-42.
235. Catucci, I., et al., *The PALB2 p.Leu939Trp mutation is not associated with breast cancer risk*. *Breast Cancer Res*, 2016. **18**(1): p. 111.
236. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. *Nat Methods*, 2010. **7**(4): p. 248-9.
237. Mathe, E., et al., *Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(5): p. 1317-25.
238. Carter, H., et al., *Identifying Mendelian disease genes with the variant effect scoring tool*. *BMC Genomics*, 2013. **14 Suppl 3**: p. S3.
239. Pinder, J., J. Salsman, and G. Dellaire, *Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(19): p. 9379-92.
240. Ducey, M., et al., *The tumor suppressor PALB2: inside out* TIBS 2018. **In press**.
241. Song, F., et al., *Antiparallel Coiled-Coil Interactions Mediate the Homodimerization of the DNA Damage-Repair Protein PALB2*. *Biochemistry*, 2018. **57**(47): p. 6581-6591.
242. Arango, N.P., et al., *Selinexor (KPT-330) demonstrates anti-tumor efficacy in preclinical models of triple-negative breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2017. **19**(1): p. 93.
243. Castroviejo-Bermejo, M., et al., *A RAD51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation*. *EMBO Mol Med*, 2018.
244. Castroviejo-Bermejo, M., et al., *A RAD51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation*. *EMBO Mol Med*, 2018. **10**(12).
245. Cusin, I., et al., *A new bioinformatics tool to help assess the significance of BRCA1 variants*. *Hum Genomics*, 2018. **12**(1): p. 36.
246. Guidugli, L., et al., *Assessment of the Clinical Relevance of BRCA2 Missense Variants by Functional and Computational Approaches*. *Am J Hum Genet*, 2018. **102**(2): p. 233-248.

247. Gasperini, M., L. Starita, and J. Shendure, *The power of multiplexed functional analysis of genetic variants*. Nat Protoc, 2016. **11**(10): p. 1782-7.
248. Starita, L.M., et al., *Variant Interpretation: Functional Assays to the Rescue*. Am J Hum Genet, 2017. **101**(3): p. 315-325.
249. Matreyek, K.A., et al., *Multiplex assessment of protein variant abundance by massively parallel sequencing*. Nat Genet, 2018. **50**(6): p. 874-882.
250. Starita, L.M., et al., *A Multiplex Homology-Directed DNA Repair Assay Reveals the Impact of More Than 1,000 BRCA1 Missense Substitution Variants on Protein Function*. Am J Hum Genet, 2018. **103**(4): p. 498-508.
251. Findlay, G.M., et al., *Accurate classification of BRCA1 variants with saturation genome editing*. Nature, 2018. **562**(7726): p. 217-222.

Annexes

Annexe 1 – *The Tumor Suppressor PALB2 : Inside Out*, Trends in Biochemical Sciences (2019)

Hyperlien : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30638972>

Annexe 2 – *A RAD51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation*, EMBO Molecular Medicine (2018)

Hyperlien : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30377213>