

SIMON BÉLANGER

Analyse des variants d'épissage du gène *FANCC* et leur impact sur la voie de réparation de l'ADN FANC-BRCA

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DE MÉDECINE MOLÉCULAIRE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC, Canada

2012

RÉSUMÉ

L'intégrité des gènes de la famille *FANC* est essentielle au bon fonctionnement de la réparation des dommages à l'ADN. Récemment, différents variants d'épissage du gène *FANCC* ont été identifiés. Nous avons donc étudié l'impact du transcrit alternatif sur le processus de réparation des bris de l'ADN. Le transcrit *FANCC Δ 7* est présent dans toutes les lignées de cancer du sein analysées. L'analyse des fractions ribosomales confirma la traduction de *FANCC Δ 7* en protéine fonctionnelle. La protéine *FANCC Δ 7* semble séquestrée dans le cytoplasme des cellules HEK293T transfectées suite à un traitement à la MMC comparé à *FANCC* qui migre majoritairement au noyau. Nous avons démontré que les cellules déficientes infectées avec *FANCC Δ 7* sont bloquées en G2/M en présence de MMC. Finalement, *FANCC Δ 7* est incapable de mener à la monoubiquitination de *FANCD2*. Cette étude a permis de déterminer que le variant d'épissage *FANCC Δ 7* ne permet pas la réparation des pontages interbrins induits par la MMC.

REMERCIEMENTS

Avant tout, j'aimerais adresser mes plus sincères remerciements à Dre Francine Durocher qui, suite à ma graduation au premier cycle, m'a accueilli dans son équipe de recherche pour un stage d'une session après quoi l'aventure s'est continuée en une maîtrise extrêmement stimulante et enrichissante. Dès mes premiers moments dans l'équipe Durocher j'ai senti une appartenance s'installer en moi et une superbe chimie d'équipe a perduré tout au long de mes travaux (et se perpétue encore !). Avant mon entrée dans le laboratoire j'étais de ceux qui croyaient que le travail de labo était solitaire et monotone. L'ambiance au laboratoire m'a prouvé le contraire dès ma première semaine de stage.

J'ai donc été choyé d'avoir pu travailler avec des gens aussi fantastiques durant ma maîtrise. Je tiens à les remercier personnellement puisque sans eux, je n'aurais pas accompli le centième de mes réalisations. Merci d'abord à Christopher St-Laurent Pedneault, connaissance de longue date qui est devenu un ami très cher et qui a été le catalyseur de mon entrée dans le laboratoire puisque c'est suite à de bonnes conversations avec lui qu'il m'a fortement incité à aller rencontrer Dre Durocher. De part sa technique, Christopher avait déjà de bonnes aptitudes en laboratoire qu'il n'a pas manqué de m'inculquer et m'ont servi tout au long de mon projet de recherche. En plus d'être un bon collègue, il est aussi un ami fidèle et de confiance. La complicité que nous avons développée au laboratoire a fait en sorte que la platitude et la monotonie sont deux choses qui ne sont jamais survenues au laboratoire. Merci aussi à Dr Frédéric Guénard, Frédéric a été mon mentor lors de mon arrivée au laboratoire et m'a inculqué toutes les bonnes pratiques de laboratoire en plus de son éthique de travail rigoureuse dont j'ai tenté de reproduire tout au long de mon projet. Merci à Charles Joly-Beauparlant, Charles a gradué à la maîtrise peu après mon arrivée et c'est en quelque sorte son projet que je me suis trouvé à continuer. Charles était comme une encyclopédie vivante, aucune question ne lui résistait. Charles m'a inspiré à lire et relire et lire encore la littérature scientifique afin d'élargir mes horizons de connaissances et de parfaire celles concernant mon projet. Merci à Geneviève Ouellette, professionnelle de recherche au sein de l'équipe, Geneviève a été pour moi un modèle de constance et d'organisation. Je n'avais jamais vu quelqu'un auparavant à ce point organisée et précise dans ses occupations. Merci à Nadhir Litim, présent comme stagiaire pour ensuite se joindre à nos rangs pour un doctorat, Nadhir a ajouté une touche européenne à l'équipe en plus

de l'agrémenter par son indestructible bonne humeur. Merci à Dre Karine Plourde, stagiaire postdoctorale durant la deuxième moitié de ma maîtrise. Merci pour les innombrables discussions et raisonnements tous plus critiques les uns que les autres. Karine est une personne ressource formidable en plus d'être une travailleuse acharnée dont la patience et l'implication à son travail surpasse l'imaginaire. Je la remercie pour ces nombreuses soirées/nuits/fin de semaines où elle était au laboratoire pour le maintien des cellules (indispensables à mon projet) et toutes ses idées et points de vue à l'égard de mon projet qui l'ont enrichi par beaucoup. Merci à Dr. Yvan Labrie, du jour 1 jusqu'à aujourd'hui a été une personne ressource indispensable et chez qui la porte est toujours ouverte. Merci pour ta disponibilité sans limite, ta franchise et ton franc-parler. Yvan a toujours été là pour remettre les pendules à l'heure et m'a beaucoup aidé lors de ma rédaction. Je tiens aussi à remercier les stagiaires qui ont été de passage au laboratoire : Jean-Guillaume Emond-Rheault, Geneviève St-Pierre, Yan Moreau, Frédéric Bouffard, Nadeige Giguère, Charles-Étienne Bénard. Beaucoup d'autres personnes ont été impliquées tant de façon directe ou indirecte à mon projet tels que les gens de la plateforme de séquençage du CHUL, nos collaborateurs de l'équipe du Dr Jean-Yves Masson au centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec, les membres des équipes du Dre Di Paolo (Marc Morisset), Dre Kriz (Pierre Cordeau) et Dr Rivest (Paul Préfontaine).

J'aimerais aussi prendre le temps de remercier les organismes subventionnaires, eux qui sont les moteurs faisant avancer la recherche académique. C'est notamment grâce à la fondation René Bussièrès que j'ai été en mesure de poursuivre mes études au 2^{ième} cycle, je leur en suis très reconnaissant et je me considère très privilégié d'avoir pu bénéficier de leur appui.

Finalement, je tiens à remercier de tout mon cœur ma copine Janik, ma famille et amis sans qui un équilibre sain dans ma vie ne serait pas possible ! Merci pour votre appui et tendre attention.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire est présenté avec insertion d'article. L'introduction précédant celui-ci est une revue de la littérature courante en lien avec mon projet de recherche qui se veut la plus complète possible. Puisque le sujet traité dans ce projet est d'actualité, de nouvelles avancées et découvertes en lien avec ce dernier sont courantes et donc, cette revue a nécessité des retouches jusqu'à la toute fin de la rédaction afin qu'elle soit le plus à jour possible. Cette introduction sert également à définir l'hypothèse de départ ainsi que les objectifs spécifiques qui ont dirigé mon projet. Le chapitre 1 contient principalement les résultats de laboratoire obtenus dans le cadre de ma maîtrise, sous forme d'article scientifique rédigé en anglais pour des fins de publications.

CONTRIBUTION

La totalité du travail de laboratoire qui a permis l'accomplissement de ce projet s'est effectuée au laboratoire du CHUL sous la supervision du Dre Francine Durocher. Le volet cellulaire du projet soit la culture cellulaire fut principalement effectuée par la professionnelle de recherche Geneviève Ouellette et la Dre Karine Plourde. Outre ces manipulations cellulaires, j'ai réalisé la totalité des travaux présentés dans le chapitre 1. Je tiens cependant à souligner l'aide que nous a apportée le Dr Jean-Yves Masson du centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec ainsi que certains membres de son équipe dont la Dre Amélie Rodrigue. Le séquençage lors du sous-clonage ainsi que dans les étapes de mutagenèse a été réalisé à la plateforme de séquençage du CHUL. Les qRT-PCRs furent réalisés par Nathalie Paquet de la plateforme de qRT-PCR du CHUL. Les images d'immunobuvardages ont été prises avec l'appareil du Dre Thérèse Di Paolo sous la supervision du Dr Marc Morissette. Les imageries microscopiques ont été rendues possible grâce à l'utilisation du microscope du Dre Yasna Kriz ainsi que le microscope confocal du Dr Serge Rivest sous la supervision du professionnel de recherche Paul Préfontaine. Bien que nous avons travaillé sur des projets différents, je tiens à souligner en terminant le soutien technique de Christopher St-Laurent Pedneault, autre étudiant finissant à la maîtrise dans l'équipe du Dre Francine Durocher.

*À ma famille, à Janik,
ceux qui me permettent de continuer à avancer...*

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS	iii
AVANT-PROPOS	v
CONTRIBUTION	v
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES	xv
INTRODUCTION	1
1. Le cancer du sein	1
1.2 Cancer du sein et Susceptibilité	2
1.3 Cancer du sein et Anémie de Fanconi	4
2. L'Anémie de Fanconi	5
2.1 Optique moléculaire de l'AF et la voie FANC-BRCA	7
2.1.1 Agents pontants et pontages interbrins	10
2.2.1 Activation de la voie FANC-BRCA	11
2.2.2 Formation du complexe I («Core complex»)	12
2.2.3 Complexe ID et monoubiquitination	13
2.2.4 Complexe III et réparation de l'ADN	15
2.2.5 Démantèlement du complexe I et déubiquitination	19
3. Le gène <i>FANCC</i>	20
3.1 Description du gène et polymorphismes	20
3.2 <i>FANCC</i> et épissage alternatif	24
3.2.1 L'épissage alternatif	24
3.2.2 Les épissages alternatifs du gène <i>FANCC</i>	28
3.2.3 Technique minigène	31
3.2.4. <i>FANCCΔ7</i> et fractions polyribosomales	33
3.3 <i>FANCC</i> et la cellule	35
3.3.1 <i>FANCC</i> et la voie FANC-BRCA	35
3.3.2 <i>FANCC</i> , l'apoptose et le stress oxydatif	35
3.3.3 <i>FANCC</i> , autres implications	39
4. Problématique de l'étude présentée : Analyse du variant d'épissage <i>FANCCΔ7</i>	42
CHAPITRE 1	44
Résumé	46
Introduction	47
Materials and Methods	50
Results	58
Discussion	64
Acknowledgements	71
References	72
DISCUSSION	102

PERSPECTIVES	107
BIBLIOGRAPHIE	109

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1 - Groupes de complémentation de l'anémie de Fanconi.	9
--	---

CHAPITRE 1

Table 1 - Observed sequence variations in <i>FANCC</i> gene and genotype frequencies in familial breast cancer cases and controls.	82
Table 2A - Non-synonymous sequence variants detected in human FANCC and residues found in orthologues.	83
Table 2B - Prediction of the amino acid change Glu273Lys on FANCC protein function.	83
Table 3 - Estimated haplotype frequencies observed in FC breast cancer cases and controls.	84
Supplemental Table 1A - List of oligonucleotides used for <i>FANCC</i> exonic amplification.	90
Supplemental Table 1B - List of oligonucleotides used for directed mutagenesis on <i>FANCC</i> minigene.	91
Supplemental Table 1C - List of oligonucleotides used for the construction of the <i>FANCC</i> minigene.	91
Supplemental Table 2 - Conservation of the c.896+81G>A variants in other species.	92
Supplemental Table 3 - Significativity of PHASE analysis between FC breast cancer cases and controls using sliding windows of SNPs	93

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 - Gènes et loci associés à la susceptibilité au cancer du sein.	3
Figure 2 - Porteurs <i>BRCA2</i> et gènes modificateurs.	4
Figure 3 - Pontage interbrin (PIB).	11
Figure 4 - Voie FANC-BRCA.	18
Figure 5 - <i>FANCC</i> .	21
Figure 6 - Polymorphismes de <i>FANCC</i> .	22
Figure 7 - Éléments régulateurs de l'épissage.	25
Figure 8 - Mécanisme de base de l'épissage.	26
Figure 9 - PCR <i>FANCC</i> et <i>FANCCΔ 7</i> .	28
Figure 10 - Protéine prédite du variant d'épissage <i>FANCCΔ 7</i> .	29
Figure 11 - Minigène <i>FANCC</i> .	31
Figure 12 - Analyses de polysomes.	33
Figure 13 - Schématisation du rôle de <i>FANCC</i> et de <i>HPS70</i> dans la régulation de <i>PKR</i> dans les cellules hématopoïétiques.	37
Figure 14 - Pont d'ADN ultra fin.	40
CHAPITRE 1	
Figure 1 - Minigene assay.	85
Figure 2 - Ribosomal fractions.	86
Figure 3 - Monoubiquitination assay.	87
Figure 4 - Cell cycle profile and survival assay.	88
Figure 5 - Cellular localization.	89
Supplemental Figure 1 - <i>FANCC</i> interaction domains, <i>FANCC</i> splicing and their tissue expression.	94
Supplemental Figure 2 - LD block analysis.	95
Supplemental Figure 3 - Cell cycle analysis.	96
Supplemental Figure 4 - Survival assay.	97

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

-AA	Acide aminé / <i>Amino acid</i>
-AB	Alamare Blue
-Ac / Ab	Anticorps / <i>Antibody</i>
-ADN	Acide déoxyribonucléique
-ADNc	Acide déoxyribonucléique complémentaire
-ADNg	Acide déoxyribonucléique génomique
-AF / FA	Anémie de Fanconi / <i>Fanconi Anemia</i>
-ARN	Acide ribonucléique
-ARNm	ARN messenger
-ARNi	ARN interférant
-ASE	<i>Alternative splicing event</i>
-ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
-ATR	<i>Ataxia-telangiectasia and RAD3-related</i>
-bp	<i>Base pairs</i>
-BRCA1	<i>Breast cancer susceptibility gene 1</i>
-BRCA2/FANCD1	<i>Breast cancer susceptibility gene 2/Fanconi anemia group D1</i>
-BRIP1/FANCI	<i>BRCA1-interacting protein 1 / Fanconi anemia group J</i>
-CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
-CANX	Calnexine
-DBS	<i>Double Strand Break</i>
-EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
-FAAP24/100	<i>Fanconi anemia associated protein 24/100</i>
-FAC	<i>FANCC</i> (acronyme souvent utilisé dans la littérature)
-FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
-FAN1	Fanconi-associated nuclease 1
-FANC	Fanconi anemia group *
-FANCC	Fanconi anemia group C
-FANCE	Fanconi anemia group E
-FAD2	FANCD2
-GWAS	<i>Genome-wide association study</i> / Étude d'association pangénomique
-GRP94	<i>Glucose regulated protein 94</i>
-GSTP1	<i>Glucose s-transferase P1-1</i>
-HEK293T	<i>Human embryonic kidney 293T cells</i>
-HSC536	<i>Human stem cell 536 (FANCC deficient lymphocytes)</i>
-HR	<i>Homologous recombination</i>

-ICL	<i>Interstrand crosslink</i>
-LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
-LMA	Leucémie myéloïde aiguë (<i>acute myeloid leukemia, AML</i>)
-MHF1,MHF2	<i>FANCM-interacting Histone Fold protein 1 and 2</i>
-MMC	Mitomycine C
-m/v	Unité de masse par unité de volume (1g/1000ml)
-NER	Nucleotide excision repair
-NMD	<i>Nonsense mediated mRNA decay</i> , dégradation des ARNm non-sens
-PALB2/FANCN	Partner and localizer of BRCA2/Fanconi anemia group N
-PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
-PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
-PIB	Pontage interbrins
-PKR	<i>Protein Kinase RNA-activated</i>
-RAD51C/FANCO	<i>Radiation sensitivity abnormal 51C/Fanconi anemia group O</i>
-ROS	Espèces réactives de l'oxygène, <i>Reactive Oxygen Species</i>
-RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
-TLS	<i>Translesion synthesis</i>
-UBE2T	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2T</i>
-Ub	Ubiquitine
-UAF1	<i>USP1 associated factor 1</i>
-UFB	<i>Ultra fine DNA bridge</i> , pont d'ADN ultra fin
-USP1/14	<i>Ubiquitin-specific protease 1 / 14</i>
-SLX4/FANCP <i>anemia group</i>	<i>Structure-specific endonuclease subunit homolog / Fanconi P</i>
-SMD	Syndrome myélodysplasique
-SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
-Wt	<i>Wild type</i> / sauvage

INTRODUCTION

1. LE CANCER DU SEIN

En 2011, il est estimé que 177 800 nouveaux cas de cancer seront diagnostiqués au Canada et que 75 000 personnes mourront de cette maladie. De ces nouveaux cas de cancer, 23 400 femmes seront diagnostiquées d'un cancer du sein. Seulement en 2011, 5 100 femmes à travers le Canada perdront leur combat contre cette maladie¹. Considérant l'ensemble des cancers du sein, entre 10 et 20% de ceux-ci sont dits familiaux. De ces cancers, à peine 25% sont causés par des gènes connus signifiant donc que 75% des cancers familiaux sont causés par des gènes inconnus². Vu la complexité moléculaire qu'est le cancer, de multiples approches sont empruntées par diverses équipes à travers le monde afin d'améliorer les connaissances actuelles permettant d'identifier des gènes ou régions associés avec cette maladie. Certaines équipes adoptent une approche par études d'associations réalisant ainsi des études à grande échelle via des cohortes comptant des milliers d'individus. Un exemple de ce genre d'étude sont les études d'association pangénomique ou «Genome wide association studies (GWAS)» qui permettent entre autres l'identification de variants génétiques communs. D'autres approches sont adoptées telle que l'approche par gènes candidats. Cette méthode consiste à sélectionner certains gènes qui, de par leurs implications dans diverses voies métaboliques clefs, pourraient masquer un rôle direct ou de modification du risque de développer un cancer. Ce type d'approche est souvent conjointement réalisée avec le re-séquençage des gènes d'intérêt identifiés et permettent de mettre en lumière des variants plus rares, souvent associés avec une prédisposition plus prononcée que ceux associés avec les variants communs, chose que les «GWAS» ne peuvent identifier^{3,4}. L'intérêt associé à améliorer la méthode d'identification de sous-groupes d'individus susceptibles de développer un cancer du sein vient en partie du fait que chez la totalité des cas de cancer du sein, pas moins de 50% de ceux-ci se retrouvent dans une petite portion de la population que l'on distingue comme celle ayant un risque élevé de développer un cancer du sein (12% de la population féminine)⁵. C'est donc en prenant avantage de toutes ces techniques que la communauté scientifique sera en mesure d'améliorer ses outils et connaissances à l'égard du cancer du sein en plus de peaufiner l'approche professionnelle sous un volet plus personnel grâce aux grandes avancées génétiques de la recherche actuelle.

1.2 CANCER DU SEIN ET SUSCEPTIBILITE

Il existe plusieurs facteurs de risques associés au risque de développer un cancer du sein. L'un des plus importants est l'histoire familiale. Il est estimé que l'incidence de cancer est augmentée par 2 fois chez des proches de premier degré dans des familles atteintes⁶. Ces données furent tirées d'une grande étude portée sur plus de 58 000 femmes atteintes d'un cancer du sein et plus de 100 000 femmes non atteintes. Ces chiffres démontrent bien l'impact des facteurs génétiques dans la susceptibilité ou le risque de développer un cancer du sein. Sous la même optique, l'âge au diagnostic est aussi un facteur déterminant. Le risque associé à un proche qui développe un cancer à un jeune âge est beaucoup plus élevé versus un proche développant un cancer passé 50 ans⁷. Au niveau génétique, afin de classer les différents types de gènes pouvant moduler le risque de développer un cancer, 3 principaux groupes ont été nommés : gènes à forte, moyenne et faible pénétrance (Figure 1). La pénétrance peut être définie comme étant la probabilité qu'un phénotype/trait soit exprimé selon le génotype donné d'un individu. Toujours dans le cadre du cancer du sein, trois des principaux gènes à forte pénétrance ont été rapportés et sont *BRCA1*, *BRCA2* et *TP53*. Étant de forte pénétrance, ils multiplieraient de 10 à 20 le risque relatif de développer un cancer du sein^{8,9}. Ceux dits de pénétrance moyenne, lorsque mutés, confèreraient un risque relatif de 2 à 4 fois plus élevé tandis que ceux dits communs (à faible pénétrance), seraient associés à un risque relatif inférieur à 1.5 fois plus élevé que la normale^{8,9}. Il est important de ne pas considérer ce classement par pénétrance de ces gènes comme un ordre qualificatif. Il est vrai que les gènes à forte pénétrance ont un impact fort et direct sur le risque de développer un cancer chez un individu, mais les variants communs peuvent aussi mener à une modification notable de ce risque. En effet, considérés seuls, les variants génétiques communs comptent pour une augmentation minimale du risque, mais en les évaluant conjointement, ce risque peut être modifié (par des gènes dits modificateurs) et ce, de façon significative. En effet, des travaux de Antonious *et al.* ont démontré que lorsque mis en communs, certains variants communs modificateurs peuvent moduler le risque de développer un cancer chez des individus porteurs de mutations *BRCA1/2*⁴ (Figure 2). Effectivement, cette figure démontre les effets qu'apportent 7 gènes et régions reconnus comme « modificateurs » au niveau du risque cumulatif de cancer du sein. On peut y observer une grande variabilité du risque et cette dernière est autant plus notable passée la barrière des 50 ans. Comme il a été mentionné plus haut, la prédisposition

au cancer du sein est un ensemble très complexe de plusieurs éléments génétiques, environnementaux et reliés au style de vie qui modulent et définissent ce que veut réellement dire «le risque» de développer un cancer du sein

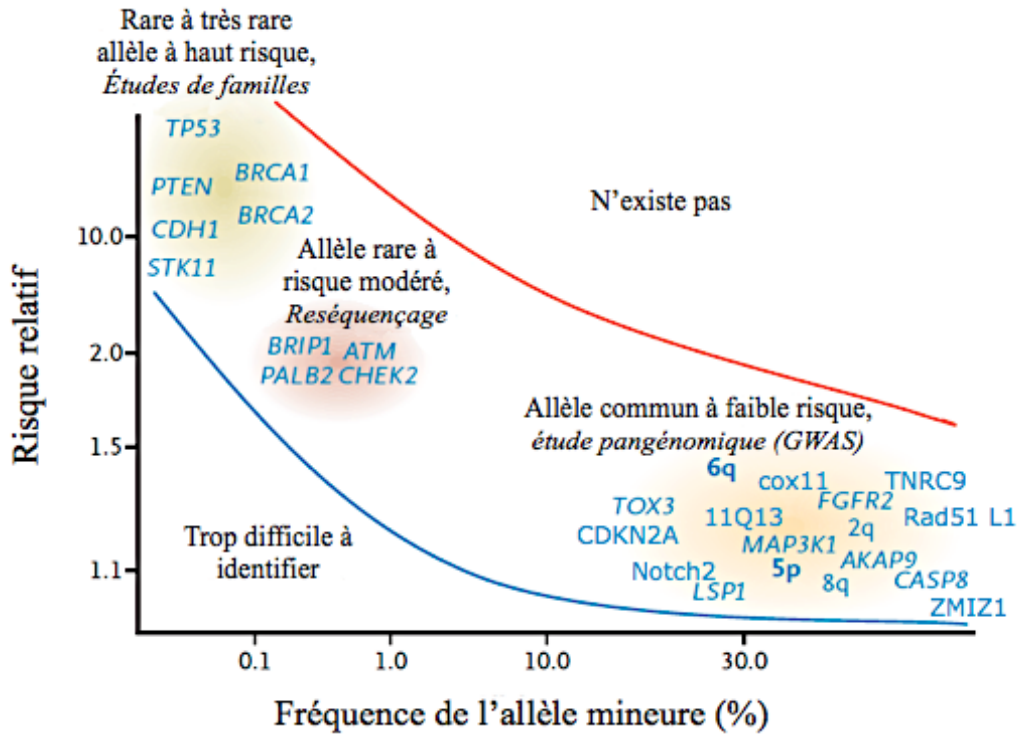


Figure 1. Gènes et loci associés à la susceptibilité au cancer du sein: Graphique où sont catégorisés les gènes et régions chromosomiques connus et qui ont été associés avec un risque de développer un cancer du sein (gène et loci de susceptibilité). Il est estimé qu'aucun gène ou région ne serait présent au-delà de la courbe rouge et aucun n'a été identifié en dessous de la courbe bleue. Les gènes et régions sont catégorisés selon leur pénétrance, risque relatif et fréquence à laquelle ils sont retrouvés dans la population. La méthode de prédilection utilisée pour leur identification est indiquée au-dessus de chaque groupe. © Adapté et traduit de Foulks *et al.* 2008¹.

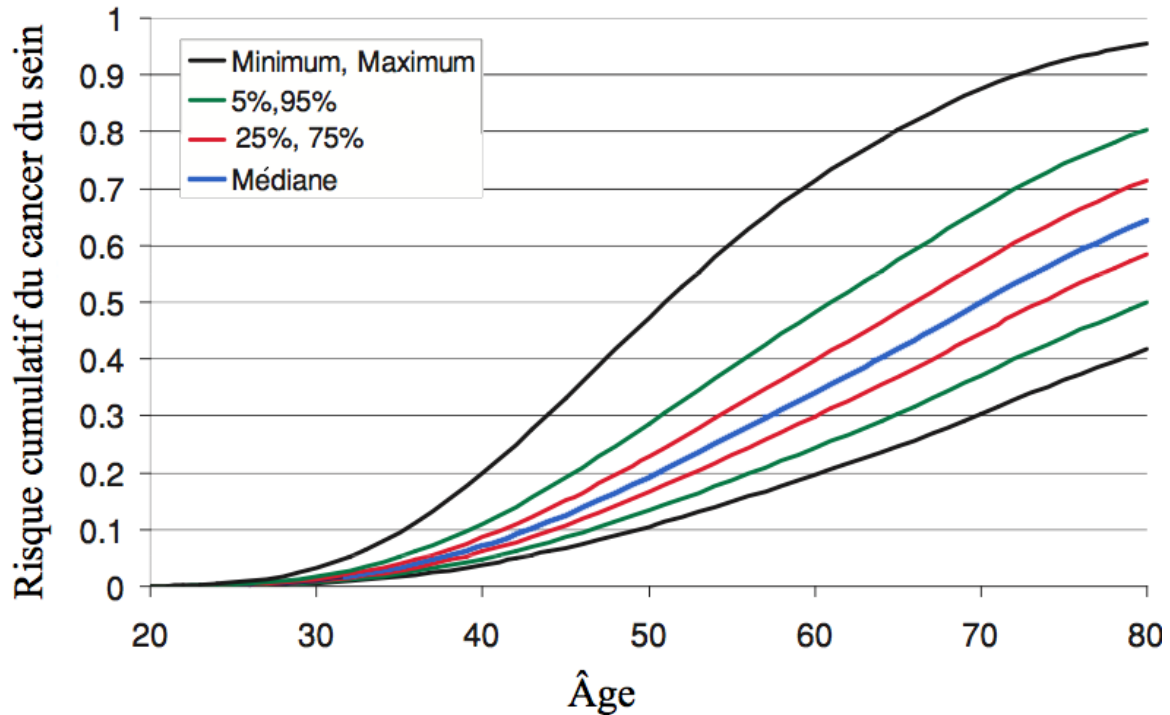


Figure 2. Porteurs *BRCA2* et gènes modificateurs: Risque cumulatif du cancer du sein selon l'âge des porteurs de mutations *BRCA2* classé par percentiles de la distribution des génotypes de 5 gènes et 2 loci considérés de faible pénétrance. Les SNPs sont les suivants : rs2981582 dans *FGFR2*, rs3803662 dans *TOX3/TNRC9*, rs889312 dans *MAP3K1*, rs3817198 dans *LSPI*, rs4973768 dans *SLC4A7/NEK10*, rs13387042 dans la région 2q35 et rs10941679 dans la région 5p12. Les individus porteurs faisant partie du 5% dits à faible risque auraient un risque cumulatif d'environ 10 à 13% tandis que ceux faisant partie du 5% à haut risque au même âge auraient un risque cumulatif entre 29 à 49%. Tiré de Antonious *et al.* 2010².

1.3 CANCER DU SEIN ET ANEMIE DE FANCONI

Grâce à l'important effort de recherche porté à l'égard de la prédisposition au cancer du sein depuis les dernières décennies, plusieurs gènes y ont été associés. Ces gènes peuvent être regroupés dans les 3 classes mentionnées précédemment et permettent d'évaluer les probabilités qu'a un individu de développer un cancer. Compté parmi ces gènes, *BRCA2*, *BRIPI*, *PALB2* et récemment *RAD51C* ont tous un point en commun, ils font tous partie de la famille de gènes Fanconi en plus d'être des gènes de prédisposition au cancer du sein. Renommés *FANCD1*¹⁰, *FANCI*^{1,12}, *FANCN*^{3,14} et *FANCO*^{5,16} respectivement, ces gènes sont tous impliqués dans une

voie métabolique nommée voie FANC-BRCA impliquée entre autres dans la réparation de l'ADN¹⁷. La voie FANC-BRCA sera expliquée plus en détails dans la section 2.1. Puisque 4 gènes de cette famille sont associés à une prédisposition au cancer du sein (dont *FANCD1* comptant parmi les gènes à forte pénétrance), il semble d'intérêt de pousser plus loin l'étude de ces gènes, c'est donc sous cette optique que l'approche par gène candidat prend tout son sens. Les 4 gènes listés plus haut sont tous membres du complexe III de la voie FANC-BRCA, impliqués directement dans la réparation de l'ADN. Le gène d'intérêt *FANCC* qui est le sujet principal de ce projet fait quant à lui partie du complexe I, impliqué dans les étapes précédant la réparation. Jusqu'à ce jour, aucun FANC du complexe I n'a été associé avec un risque de développer un cancer du sein. Toutefois, dans une étude de Berwick *et al.* où une cohorte de grands-parents d'individus affectés par l'anémie de Fanconi a été assemblée (784 grands-parents et 160 proches), une portion significativement plus grande de grands-mères porteuses de mutations AF démontraient un plus haut taux de cancer du sein que la normale¹⁸. Parmi ces porteuses, celles qui étaient porteuses hétérozygotes de mutations du gène *FANCC* étaient parmi celles associées avec le risque le plus élevé. Même si cette étude n'a pas démontré une association directe entre les porteurs hétérozygotes AF et le risque de cancer, elle a tout de même orienté certaines évidences possibles de l'implication du gène *FANCC* dans la prédisposition au cancer du sein¹⁸.

2. L'ANEMIE DE FANCONI

D'abord, qu'est-ce que l'anémie de Fanconi ? Ce désordre génétique a été formellement identifié dans les années 1920s par le pédiatre suisse Guido Fanconi « G. Fanconi, Familiäre infantile perniziosartige anämie (pernizioses blutbild und konstitution), Jahrb, Kinderh. 117 (1927) 257-280 ». À première vue, cette découverte pointait vers un désordre au niveau médullaire induisant notamment une anémie aplasique, pancytopenie ainsi que des anomalies physiques congénitales, malformations squelettiques, petite stature et des anomalies urogénitales¹⁹. Cependant, il est maintenant reconnu que les malformations congénitales associées avec l'AF peuvent être d'inexistantes à omniprésentes et ce, au niveau d'un ou plusieurs organes majeurs du corps²⁰. Depuis le diagnostic de Fanconi, la liste des démonstrations cliniques s'est allongée avec l'ajout d'anomalies associées aux systèmes nerveux, rénal, gastro-intestinal, squelettique

et reproducteur¹⁹⁻²¹. En raison de ces multiples démonstrations cliniques, l'anémie de Fanconi peut se présenter sous l'insigne de différents syndromes déjà connus tels que les syndromes de Holt-Oram et Townes-Brocks^{22,23} chez qui des anomalies squelettiques au niveau des bras et mains, spécialement au niveau des pouces, peuvent ressembler aux démonstrations cliniques observées chez des patients AF. Pour n'en nommer que quelques autres, la petite stature, les désordres hématopoïétiques associés aux patients AF peuvent se confondre avec les démonstrations cliniques du syndrome de Seckel²⁴ et de Nimègue^{25,26} tandis que l'anémie (insuffisance de globules rouges) et les anomalies congénitales de l'anémie de Blackfan-Diamond²⁷ peuvent aussi ressembler aux cas d'AF. Cette complexité et hétérogénéité des phénotypes s'expliquent en partie par le fait que l'AF est un désordre affectant la stabilité génétique. Cette grande variabilité s'est aussi observée chez 2 paires de jumeaux monozygotes AF¹⁹¹. Dans un cas, leurs phénotypes différaient au point où l'un avait un pouce bifide en plus d'une atrésie duodénale tandis que son jumeau n'avait aucune démonstration physique de l'AF ni de malformation congénitale. L'autre paire de jumeaux était des sœurs toutes deux affectées par l'AF où l'une démontrait l'absence du radius gauche, des deux pouces et de la clavicule droite alors que sa jumelle démontrait un pouce droit bifide, une hypoplasie du pouce gauche et l'absence de la clavicule gauche. Il est intéressant de noter que les 2 jumelles étaient affectées par la même mutation dans le gène *FANCA*¹⁹ (délétion des exons 30 et 31). Ces exemples démontrent bien la complexité associée à l'AF et la difficulté de son diagnostic. Que les mêmes mutations peuvent mener à plusieurs démonstrations cliniques distinctes semblent indiquer qu'elles ne sont pas des conséquences directes des défauts de la voie FANC-BRCA mais plutôt indirectes du mauvais fonctionnement de cette dernière. Il est important de noter qu'une autre caractéristique propre aux individus Fanconi est la grande prévalence de cancer chez ces personnes. Il est maintenant démontré et confirmé dans la littérature que lorsqu'un individu est homozygote pour une ou des mutations dans un ou plusieurs gènes Fanconi, ce dernier développera l'anémie de Fanconi. Toutefois, si l'individu est hétérozygote de cette ou ces mutations, il ne développera pas la maladie mais dans certains cas pourrait être plus susceptible que la population générale à développer certains cancers^{19,28-31}. Les individus FA sont associés à un risque très élevé estimé à 52 % de développer une leucémie myéloïde aiguë ou des syndromes myélodysplasiques avant l'âge de 40 ans¹⁹. En comparaison avec la population générale, il est estimé que les personnes atteintes de l'AF sont jusqu'à 700 fois plus à risque de développer des

syndromes myélodysplasiques (SMD) ou leucémies myéloïdes aiguës (LMS)³². La susceptibilité des gens atteints de l'AF ne se résume pas à ces 2 maladies, ils ont aussi un risque élevé de développer des tumeurs solides. Une étude a estimé ce risque à 50 fois plus élevé que la population générale³². Il est donc clair que ce désordre génétique masque une maligne complexité qui, lorsque connue et maîtrisée, pourra grandement informer la communauté scientifique sur les divers principes moléculaires qui régissent cette voie qui promeut la stabilité chromosomique et l'intégrité du matériel génétique.

2.1 OPTIQUE MOLECULAIRE DE L'AF ET LA VOIE FANC-BRCA

Jusqu'à aujourd'hui, 15 gènes sont associés à cette maladie et sont dénommés *FANCA*, *B*, *C*, *DI* (*BRCA2*), *D2*, *E*, *F*, *G*, *I*, *J* (*BRIP1*), *L*, *M*, *N* (*PALB2*), *O* (*RAD51C*), *P* (*SLX4*). Les protéines produites par ces gènes forment le complexe de réparation de l'ADN FANC-BRCA (Figure 4). Lorsqu'un individu est diagnostiqué AF, il est attribué à l'un des groupes selon le gène auquel il est muté, ceux-ci sont dénommés «groupes de complémentation» (Tableau 1). La section précédente a bien démontré l'hétérogénéité des phénotypes et les démonstrations cliniques associées à L'AF. Cependant, d'un point de vue cellulaire, les divergences ne sont pas aussi vastes. En fait, toutes les cellules dites AF (tous les groupes de complémentation confondus) partagent certaines caractéristiques bien distinctes. Elles sont toutes sensibles aux agents pontants induisant des pontages interbrins (PIB) dans l'ADN. Cette sensibilité se traduit par une réduction de la survie de manière dose dépendante, d'une augmentation du taux de brisures chromosomiques et l'arrêt du cycle cellulaire²⁰. Une autre caractéristique partagée par toutes les cellules AF est leur hypersensibilité au stress oxydatif^{33,34}. Parmi les FANCs du «Core complex», trois d'entre eux soient *FANCA*, *FANCC* et *FANCG* ont été identifiés comme protéines impliquées dans la protection contre le stress oxydatif dans la cellule³³. L'implication de *FANCC* dans ces voies de réduction sera abordée dans la section 3.3.2. La formation du complexe FANC-BRCA est reconnue pour être induite lors de dommages à l'ADN tels que les PIB pouvant être causés par la peroxydation des lipides, les stress de réplifications de l'ADN, l'exposition à la formaline ou d'autres agents chimiques tels que la mitomycine C et le cisplatine^{35,36}. Ces lésions seront expliquées plus en détails à la sous-section suivante. Si de tels dommages ne sont pas efficacement réparés, des anomalies chromosomiques comme des formes radiales ou des cassures chromosomiques³⁷ peuvent subvenir et causer l'instabilité

génétique en plus de pouvoir engendrer la mort cellulaire^{21,38}. L'une des caractéristiques principales de ce désordre génétique est le développement d'insuffisance médullaire (dénommé «Bone marrow failure» en anglais). Il est estimé que l'incidence cumulative d'insuffisance médullaire atteint 90% des patients à l'âge de 40 ans et que la médiane d'âge des anomalies hématopoïétiques est de 7 ans^{19,39}. Il est important de mentionner cependant que l'âge du développement des troubles hématopoïétiques est très variable³⁹. Cette insuffisance médullaire serait majoritairement responsable des morbidités associées avec l'AF, entre autres parce qu'elle se manifeste à un très jeune âge. Les autres troubles hématopoïétiques peuvent affecter tous les éléments cellulaires du sang. L'un des plus précoces est la thrombocytopénie (diminution du nombre de plaquettes sanguines), toutefois les autres éléments du sang peuvent être aussi affectés: les globules rouges par l'anémie ou les globules blancs avec la leucopénie^{39,40}. Il est estimé que les individus qui développent une thrombocytopénie développeront une pancytopénie dans les 20 années suivantes à 80%³⁹. Une autre caractéristique moléculaire de l'AF est l'émergence d'aberrations chromosomiques dans les cellules de la moelle osseuse^{19,20}. Les aberrations les plus fréquentes sont la perte du bras long ou du chromosome 7 en entier (monosomie du chromosome 7), le gain du bras long du chromosome 1 et du chromosome 3. De ces aberrations, la monosomie du chromosome 7 et le gain de la région 3q seraient associés avec l'augmentation du risque de développement de syndromes myélodysplasiques (SMD) et de leucémies myéloïdes aiguës⁴¹. Il a même été avancé comme hypothèse que les gains du bras long du chromosome 3 pourraient augmenter le risque de développement de la monosomie du chromosome 7⁴¹.

Tableau 1

Groupes de complémentation de l'anémie de Fanconi			
Groupes de complémentation	Localisation chromosomique	Fonction moléculaire	Références
<i>FANCA</i>	16q24.3	Complexe I	Meetei AR, Sechi S et al. 2003, Lo Ten Foe JR et al. 1996.
<i>FANCB</i>	Xp22.2	Complexe I	Meetei AR, Levitus M, et al. 2004.
<i>FANCC</i>	9q22.32	Complexe I	Meetei AR, Sechi S, et al. 2003, Strathdee CA et al. 1992.
<i>FANCD1/BRCA2</i>	13q13.1	HR	Howlett NG et al. 2002, Yang H, Jeffrey PD, et al. 2002.
<i>FANCD2</i>	3p25.3	Complexe ID, Substrat, Activité exonuclease	Garcia-Higuera I, Taniguchi T, et al. 2001, Pace P, Mosedale G, et al. 2010.
<i>FANCE</i>	6p21.31	Interagit avec FANCD2	Pace P, Johnson M, et al. 2002.
<i>FANCF</i>	11p14.3	Complexe I	de Winter JP et al. 2000.
<i>FANCG</i>	9p13.3	Complexe I	Garcia-Higuera I, Kuang Y, et al. 1999.
<i>FANCI</i>	15q26.1	Complexe ID	Smogorzewska A et al. 2007.
<i>FANCI / BRIP1</i>	17q23.2	«G-Quadrex Resolution»	Bridge WL et al. 2005.
<i>FANCL</i>	2p16.2	E3 Ubiquitin ligase Complexe I	Meetei AR, de Winter JP, et al. 2003
<i>FANCM</i>	16p12.2	HR, recrutement complexe I	Xia B, Dorsman JC, et al. 2007, Xia B, Sheng Q, et al. 2006.
<i>FANCN / PALB2</i>	14q21.2	Hélicase/Translocase	Mosedale G et al. 2005.
<i>FANCO / RAD51C</i>	17q22	HR, paralogue de RAD51	Vaz F, Hanenberg H, et al. 2010.
<i>FANCP / SLX4</i>	16p13.3	« Jonction Holliday resolvase »	Crossan GP et al. 2011, Stoepker C et al. 2011, Kim Y et al. 2011

Adapté et traduit de Crossan *et al.* 2011.

2.1.1 AGENTS PONTANTS ET PONTAGES INTERBRINS

Les débuts de l'utilisation d'agents pontants remontent aux années 1940s pendant la Deuxième Guerre Mondiale. Suite aux observations faites par les médecins de l'époque sur les victimes exposées aux composés chimiques de moutardes azotées, ces derniers ont remarqué les effets marqués sur les globules blancs des victimes. S'en est ensuite suivi leur utilisation dans les traitements de la leucémie. Depuis ces années, plusieurs autres agents pontants ont vu le jour dont la mitomycine C (MMC), le cisplatine (CPDD) et le diepoxybutane (DEB). Leurs utilisations cliniques sont variées tout comme leurs cibles thérapeutiques³⁵. Malgré leurs différences, ces agents ont un mécanisme d'action plutôt similaire. Ils mènent tous à la formation de pontages dans l'ADN qui se traduisent par la formation de liens covalents entre les bases azotées de l'ADN. Ces liaisons covalentes peuvent survenir sur le même brin d'ADN, ce phénomène est nommé pontage intrabrin tandis qu'une liaison covalente entre les brins opposés de la double hélice est nommée pontage interbrin. Un pontage intrabrin peut être contourné par certaines polymérases, diminuant ainsi la toxicité de cette lésion durant la réplication de l'ADN³⁵. Au niveau du pontage interbrin cependant, ce contournement n'est pas possible. C'est en partie pourquoi les PIB sont considérés comme les pires lésions de l'ADN puisque le lien covalent qui lie les 2 brins d'ADN rend impossible la séparation des deux brins rendant ainsi impraticable la réplication et la transcription de l'ADN²¹. Fait intéressant à savoir à l'égard des agents pontants cisplatine, MMC et moutardes azotées est qu'il est estimé qu'ils causeraient majoritairement (90%) des pontages intrabrins et n'induiraient qu'approximativement 5% à 10% de pontages interbrins⁴². Il est à noter que les dommages qui surviennent dans l'ADN ne sont pas toujours d'origines externes. En effet, le métabolisme de certaines cellules peut être à la source d'agents pouvant mener à la formation de lésions dans l'ADN. Par exemple, il a été démontré que le métabolisme des lipides au niveau du foie serait à l'origine de la production de composés pouvant causer des PIB et pourraient expliquer l'augmentation de tumeurs dans cette région chez les individus AF⁴³. Sous la même optique, une étude démontra que certaines cellules AF (déficientes *FANCC* et *FANCG*) seraient hypersensibles aux concentrations plasmatiques retrouvées dans les cellules humaines^{44,45}. Dans le cadre du projet présenté au chapitre 1, l'agent pontant utilisé est la mitomycine C. L'usage principal de ce dernier est pour l'activation de la voie FANC-BRCA par la formation de pontage interbrin dans l'ADN. Il est intéressant de noter

que la MMC induit une grande production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et que ces derniers peuvent aussi bien induire la formation de PIB³³.

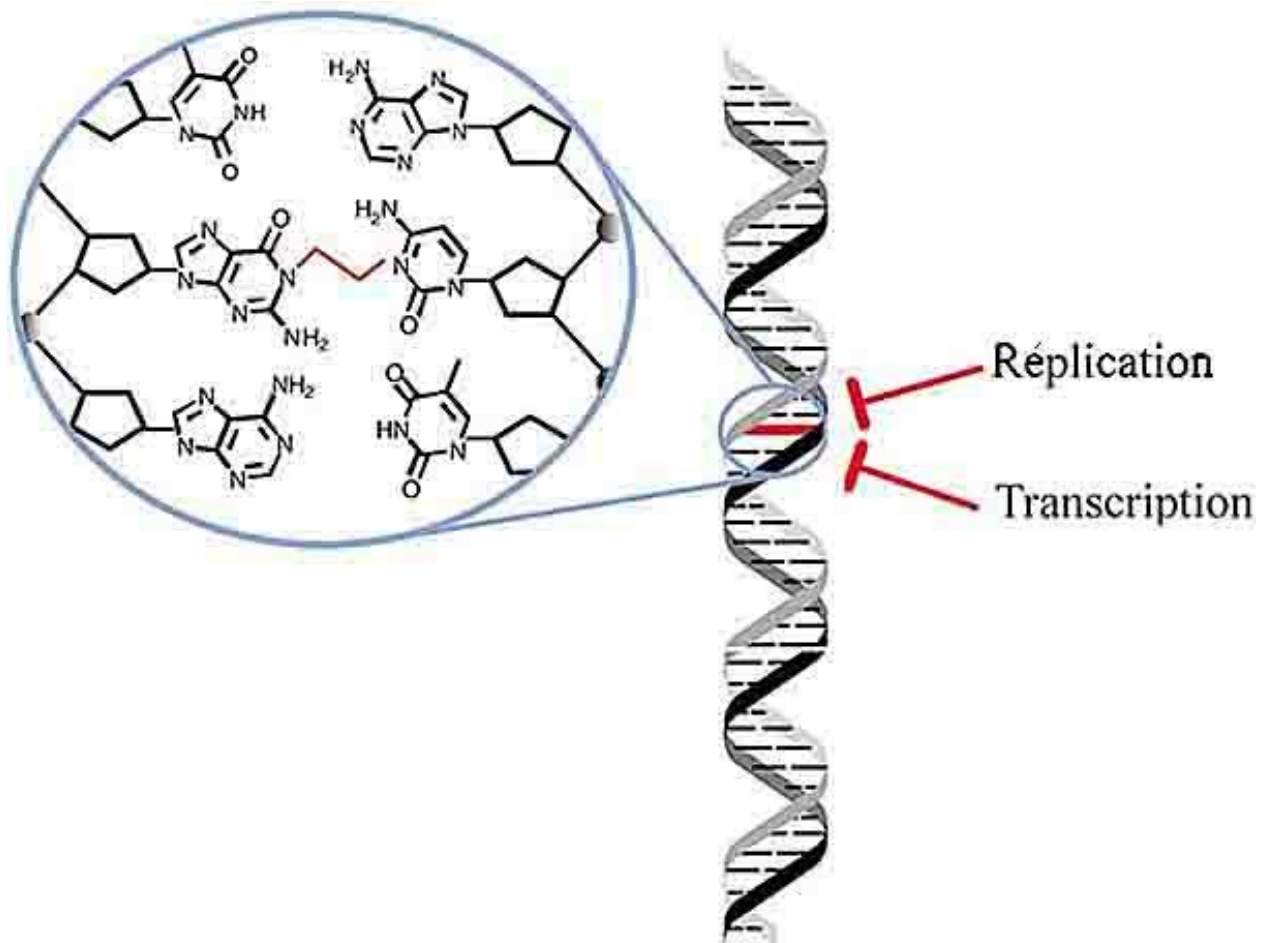


Figure 3. Pontage interbrin (PIB): Représentation d'un PIB dans l'ADN, lien covalent entre les paires de bases azotées de brins homologues de l'ADN. De telles lésions sont très toxiques pour la cellule puisqu'elles empêchent la bonne séparation des brins d'ADN et de même manière inhibent la réplication et transcription du matériel génétique. *Tiré de David M et al. 2004. © Frontiers in Biosciences 1995.*

2.2.1 ACTIVATION DE LA VOIE FANCA-BRCA

Pour remédier à ces «loquets» dans l'ADN, la machinerie cellulaire doit d'abord être en mesure de reconnaître le pontage interbrin. C'est aux protéines FANCM et FAAP24 que revient cette responsabilité. FANCM est l'une des deux protéines du génome humain à posséder un domaine hélicase/ATPase en plus d'un domaine endonucléase⁴⁶. Il est toutefois intéressant de noter que le domaine endonucléase de FANCM ainsi que celui de FAAP24 sont inactifs^{21,47}. FAAP24, pour «Fanconi Anemia Associated Protein 24», forme un dimère avec FANCM et tient son affinité

avec cette dernière au niveau de la région C-terminale où elles partagent une forte similitude. C'est grâce au domaine hélicase SF2 («Superfamily 2») que FANCM peut scruter l'ADN par son activité translocase. FAAP24, grâce à son affinité pour les simples brins d'ADN, fait que ce dimère FANCM-FAAP24 permet de reconnaître les fourches de réplication bloquées ou d'autres dommages dans l'ADN^{46,47}. Il a été montré que le dimère FANCM/FAAP24 fonctionnerait indépendamment du complexe I ou «core complex» puisqu'il n'est pas nécessaire à sa formation⁴⁸. Toutefois, il est nécessaire à sa bonne localisation sur la chromatine en phase S^{21,46,48}. Plus récemment, 2 nouveaux partenaires d'interaction de FANCM ont été identifiés soient les histones MHF1 et MHF2 («FANCM-interacting Histone Fold protein» 1 et 2) qui serviraient à stabiliser FANCM aux sites de lésion lors de PIB^{49,50}. Lorsqu'une lésion dans l'ADN est reconnue, FANCM et FAAP24 activent le complexe de signalisation ATR/CHK1⁴⁶. À vrai dire, FANCM/FAAP24 sont les seuls FANCs à pouvoir s'associer directement avec ATR et HCLK (stabilisateur et médiateur de signalisation d'ATR) afin de permettre la bonne activation des points de contrôles de la phase S en réponse à des stress durant la réplication de l'ADN^{51,52}. ATR joue donc un rôle de brigadier dans le cycle cellulaire permettant à la voie FANC-BRCA d'opérer la réparation sans que la cellule se divise avec des erreurs dans son bagage génétique⁴⁶. Une fois activé, ATR et sa kinase CHK1 phosphorylent plusieurs FANCs dont FANCA, FANCE, FANCG, FANCM, FANCI et FANCD2. Cette phosphorylation a comme effet d'activer le complexe I composé de 8 protéines (FANCA,B,C,E,F,G,L et FAAP100) et lui permet d'être recruté à l'ADN par FANCM (grâce à une interaction directe entre ce dernier et FANCF⁴⁶). Finalement, FANCM est stabilisé au niveau de la chromatine grâce à son association avec le dimère MHF1/MHF2, sans lequel une diminution de l'efficacité de monoubiquitination est observée en plus d'une augmentation de l'instabilité génétique⁵³.

2.2.2 FORMATION DU COMPLEXE I («CORE COMPLEX»)

Avant l'assemblage des 7 FANCs (FANCA-B-C-E-F-G-L) et FAAP100 en un grand complexe nommé complexe I ou «core complex» en anglais, il semble y avoir plusieurs sous-complexes de formés *a priori*. En effet, il a été démontré dans la littérature que ce complexe I serait d'abord formé de 3 sous-complexes : FANCA-FANCG⁵⁴, FANCL-FANCB-FAAP100⁵⁵ et FANCC-FANCE-FANCF⁵⁶. L'association de FANCL et FANCB permettrait le lien entre ce sous-complexe et celui de FANCA-FANCG, une association qui serait nécessaire à la bonne

localisation de ce complexe au niveau du noyau de la cellule⁵⁵. Cet assemblage de ces deux sous-complexes se ferait indépendamment du sous complexe FANCC-FANCE-FANCF. Le dimère FANCC-FANCE permettrait l'interaction avec FANCF⁵⁶. FANCF ferait ensuite la liaison entre ce sous-complexe de FANCC et FANCE et celui composé de FANCA et FANCG⁵⁶. FANCF serait donc un partenaire indispensable pour la cohésion de tous ces sous-complexes⁵⁵ en plus d'être un partenaire d'interaction directe de FANCM suite au recrutement du complexe I au dimère FANCM/FAAP24 suite à l'activation du complexe par ATR/CHK1⁵⁷. Tel que mentionné précédemment, ATR et la kinase CHK1 jouent un rôle déterminant dans l'activation de la voie FANC-BRCA. Une première étude démontra que l'inhibition par ARNi d'ATR inhibait la phosphorylation de CHK1, mais aussi la monoubiquitination de FANCD2, étape critique de la voie FANC-BRCA⁵⁸. Cette étude a permis de mettre en lumière le rôle central qu'occupe ATR dans cette voie. FANCD2 est phosphorylé à plusieurs endroits mais 2 sites sont essentiels pour la résistance aux agents pontants, soient T691 et S717⁵⁹. Parmi les protéines du complexe I, plusieurs sont phosphorylées tel que mentionné précédemment. FANCA serait phosphorylé à la sérine 1449⁶⁰, FANCG à la sérine 7^{61,62} et FANCE à la thréonine 346 et à la sérine 374 mais dans ce cas-ci, ce serait CHK1 et non ATR qui opérerait la phosphorylation⁶³. Tous ces sites de phosphorylation seraient nécessaires au bon déroulement de la voie FANC-BRCA en réponse à un stress par un agent pontant. Une fois assemblé et localisé à proximité de la lésion du PIB avec l'hétérodimère FANCM/FAAP24, l'étape suivante est la monoubiquitination du complexe ID formé de FANCD2 et FANCI. À noter que ce dimère est aussi phosphorylé par ATR, il a été démontré que FANCD2 est potentiellement phosphorylé à plusieurs endroits mais que 2 d'entre eux sont particulièrement importants pour la progression de la voie FANC-BRCA, soient la thréonine 691 et la sérine 717⁵⁹. FANCI est aussi phosphorylé et est indispensable à FANCD2 et vice-versa pour leur bonne monoubiquitination⁶⁴.

2.2.3 COMPLEXE ID ET MONOUBIQUITINATION

Une fois le complexe I associé avec FANCM/FAAP24, le complexe ID formé de FANCI et FANCD2 est à son tour recruté au niveau du complexe I pour une réaction clef dans la voie FANC-BRCA, celle de la monoubiquitination²¹. Les régions monoubiquitinées ont été identifiées et sont la lysine 561 chez FANCD2 et la lysine 523 chez FANCI^{53,64}. Pour qu'une réaction d'ubiquitination soit possible, cela nécessite l'intervention successive de trois enzymes appelées

E1, E2 et E3. Dans le cas de la voie FANC-BRCA, deux enzymes de conjugaisons (E2) ont été identifiées soient UBE2T et UBE2W⁶⁵. Dans le cadre de la monoubiquitination de FANCD2, c'est l'enzyme UBE2T qui semble être d'importance, le rôle d'UBE2W n'a pas encore été précisément identifié⁶⁵. L'enzyme de conjugaison UBE2T interagit avec le domaine PHD de FANCL, membre du complexe I possédant un motif RING finger, lui conférant une activité ubiquitine ligase⁶⁶. Ce domaine est hautement conservé à l'échelle évolutive et se situe en région C-terminale de la protéine FANCL⁶⁷. Comme il a été mentionné précédemment, l'intégrité du complexe I et ID ne doit pas être compromise de quelque façon pour que l'ajout d'une ubiquitine sur FANCD2 et FANCI se produise. Un seul partenaire manquant et la réaction est fortement réduite, voir inhibée¹⁹. Bien que les deux membres du complexe ID soient monoubiquitinés, il est démontré que FANCD2 est indispensable pour le bon déroulement du processus de réparation contrairement à l'ubiquitination de FANCI⁶⁸. Cependant, FANCI n'en est pas moins un membre important du complexe puisque ce dernier conférerait la spécificité nécessaire à la réaction pour que l'ubiquitine soit ajoutée à la lysine 561 de FANCD2^{53,65}. Le processus exact de ce phénomène n'est pas encore clair, FANCI pourrait diriger la lysine 561 correctement vers le complexe I ou encore masquer alternativement les autres lysines de surface pour ainsi augmenter la spécificité de celle en position 561 de FANCD2⁶⁵. De plus, des études ont démontré que la phosphorylation de FANCI était une étape critique dans l'induction de la monoubiquitination de FANCD2⁶⁸. FANCI serait aussi essentielle à la bonne localisation du complexe ID-ubiquitines au niveau de la chromatine suite à l'ajout des ubiquitines^{21,68}. Fait intéressant, cette localisation du complexe ID monoubiquitiné se fait indépendamment du complexe I, ce serait suite à la phosphorylation de FANCI par ATR que ce dernier serait en mesure d'être recruté à la chromatine⁶⁹. Il a été démontré tout récemment que suite à la phosphorylation de FANCI, événement qui coïncide avec la monoubiquitination de FANCD2, le complexe ID (en dimère lorsqu'inactif) se sépare pour se localiser à des endroits différents au niveau de la chromatine⁷⁰. Fait intéressant, Sareen et *al* ont démontré que FANCD2 était recruté plus tôt que FANCI au niveau de la chromatine et que FANCD2 pouvait se lier à la chromatine indépendamment de sa monoubiquitination et de FANCI. FANCI, toutefois, serait dépendant de FANCD2 pour son recrutement à l'ADN⁷⁰. Une fois localisés sur la chromatine aux sites de dommages, FANCI et FANCD2 recrutent à leur tour différentes protéines de réparation de

l'ADN, dont le complexe III composé des FANCs principalement impliqués dans l'orchestration de la réparation du matériel génétique^{21,71}.

2.2.4 COMPLEXE III ET REPARATION DE L'ADN

Les membres du complexe III ne sont pas impliqués dans la monoubiquitination du complexe ID, mais plutôt associés au processus de réparation de l'ADN. Ces derniers sont FANCD1 (BRCA2), FANCI (BACH1/BRIP1), FANCF (PALB2), FANCG (RAD51C) et FANCD2 (SLX4)⁷². Une protéine associée à ce complexe fut récemment identifiée et a été nommée FAN1 pour «Fanconi Associated Nuclease 1»^{73,74}. Son rôle exact au sein de la voie FANC-BRCA n'a pas encore été entièrement découvert mais des études ont révélé sa structure et ont permis d'identifier son activité endonucléase⁷³⁻⁷⁶. Ainsi, FAN1 serait impliqué dans le décrochage de PIB de concert avec les nucléases MUS81-EME1 et XPF-ERCC1, toutes des enzymes impliquées dans le processus NER «Nucleotide Excision Repair» ou processus d'excision de nucléotide^{77,78}. Comme le rôle de FAN1 n'est pas totalement élucidé, il est possible que FAN1 soit aussi impliqué dans d'autres mécanismes subséquents tels que l'excision des PIB ou bien dans les étapes précédant la recombinaison homologue⁵³. Son recrutement a cependant été démontré par des tests d'immunoprécipitation et c'est par FANCD2-ubiquitiné que FAN1 est recruté au niveau de la lésion de l'ADN⁷³⁻⁷⁶. FANCD2-Ub agit comme une plateforme pour FAN1 qui, grâce à son domaine UBZ en N-terminal, reconnaît la région ubiquitinée de FANCD2⁷³⁻⁷⁶. Malgré ces nouvelles découvertes, les mécanismes expliquant comment toutes ces nucléases sont recrutées et organisées ne sont pas encore clairs mais l'identification du plus récent FANC, *FANP* ou *SLX4*, a permis de faire un pas dans une direction intéressante⁷⁹. En effet, *FANCP* serait une protéine d'échafaudage et interagirait avec plusieurs protéines, notamment les nucléases XPF-ERCC1, MUS81-EME1 et SLX1^{79,80}. *FANCP* possède deux domaines UBZ, possiblement essentiels aux interactions et recrutement de ces nucléases, mais aussi pour leur recrutement au niveau du complexe ID lorsque ce dernier est ubiquitiné et localisé au niveau de la lésion de l'ADN⁸¹.

Pour en revenir à une certaine chronologie d'événements, un pontage interbrin est détecté, la voie FANC-BRCA s'active et le complexe I est formé. Ensuite, une fois assemblé et localisé convenablement dans le noyau au niveau de FANCM/FAAP24 près de la lésion, ce dernier est en mesure d'ubiquitiner le complexe ID. Une fois ubiquitinés, FANCD2 et FANCI sont relocalisés

au niveau du pontage interbrins afin de permettre l'entrée en scène des protéines qui opéreront la réparation de l'ADN. Suite au recrutement de FAN1 et des autres nucléases, le pontage interbrins est décroché ou «unhooked» par le processus où une incision est faite de chaque côté du lien covalent sur un des deux brins d'ADN (mécanisme du NER). Ceci crée alors une cassure double brin («Double Strand Break» ou DSB en anglais) sur un des deux brins d'ADN et ce trou est pris en charge par les polymérase de translesion («TLS» en anglais) telles que REV1, POL ζ ou POL η ^{21,53,82,83}. Le recrutement de ces polymérase de translesion se ferait suite à la monoubiquitination de PCNA qui permettrait leur recrutement via leurs domaines UBZ⁸⁴. Ce serait REV1 qui comblerait cette cassure double brin pour être ensuite remplacée par la POL ζ pour le prolongement du brin de réplication^{21,53,82,83}. Ces polymérase permettent l'insertion de nucléotides à des sites de cassures de l'ADN, endroits où les polymérase à haute fidélité ne peuvent fonctionner convenablement⁸³. Si ces régions endommagées de l'ADN ne sont pas prises en charge, la fourche de réplication bloque et peut s'effondrer, pouvant mener à des bris chromosomiques et même la mort de la cellule. C'est donc grâce à ces polymérase de faible fidélité que la fourche de réplication peut poursuivre son élan (mécanisme du TLS). Cependant, comme elles sont dites de faible fidélité, elles sont responsables de la majorité des insertions de mutations dans l'ADN⁸⁵, ce mécanisme est donc étroitement régulé, notamment dans cette voie de réparation (FANC-BRCA). Une fois la cassure double brin induite par le décrochage du PIB, celle-ci est réparée par les «TLS» et le mécanisme de recombinaison homologue est pris en charge. Ainsi, une fois qu'un premier brin de réplication est réparé, ce dernier permet d'être le nouveau brin parental et il se produit l'invasion du deuxième brin de réplication formant alors une structure en D («D-loop» en anglais). Pour ce faire, la recombinaison homologue nécessite entre autres l'action de FANCD1 (BRCA2), FANCI (BRIP1), FANCF (PALB2) et FANCG (RAD51C)^{21,53}. FANCF (PALB2) a été identifié comme un partenaire d'importance pour BRCA2 (FANCD1)⁸⁶. En effet, il est démontré dans la littérature que des cellules déficientes en FANCF démontrent une diminution de la recombinaison homologue, une sensibilité à l'agent pontant MMC et un dysfonctionnement des points de contrôle en phase S. Il a aussi été démontré que lorsque FANCF est absent, la cellule n'est pas en mesure de former des foci de réparation RAD51^{13,87}. D'autres études ont aussi révélé que FANCF interagit aussi avec BRCA1, rendant ainsi possible le recrutement de BRCA2 et RAD51C aux sites de réparation afin d'effectuer la recombinaison homologue⁸⁶⁻⁸⁸. Un autre composant important du complexe III est FANCI

(BRIP1 ou BACH1). Ce dernier possède une activité hélicase lui permettant de remanier l'ADN⁸⁹. Grâce à cette action hélicase, FANCD2 est impliqué entre autre suite à la recombinaison homologue afin de défaire les structures de boucle en D formées suite à l'invasion d'un brin parent d'ADN^{89,90}. Il a été démontré que FANCD2 interagit avec BRCA1 et que c'était grâce à ce dernier que FANCD2 pouvait être correctement recruté au niveau des foci de réparations⁹⁰. Dans cette même étude, il est stipulé et démontré que l'activité hélicase de FANCD2 serait nécessaire au bon recrutement de FANCD2-ub sur la chromatine. À noter cependant qu'aucune étude n'a permis de mettre en lumière une interaction directe entre FANCD2 et FANCD2-ub, cependant, il est proposé que par son activité hélicase, FANCD2 pourrait remodeler l'ADN afin de démasquer des sites de liaison pour FANCD2-ub ou promouvoir la liaison de FANCD2-ub sur certains sites spécifiques de l'ADN, rendant ainsi l'interaction directe entre FANCD2 et FANCD2-ub non nécessaire pour son recrutement sur la chromatine^{90,91}. En somme, tous ces acteurs du complexe III de la voie FANCD2-BRCA et plusieurs autres protéines identifiées et d'autres qui restent à découvrir orchestrent la réparation de l'ADN par le biais des 3 mécanismes mentionnés dans cette section : le NER, le TLS et la HR. Voir la figure suivante pour un résumé de la voie FANCD2-BRCA.

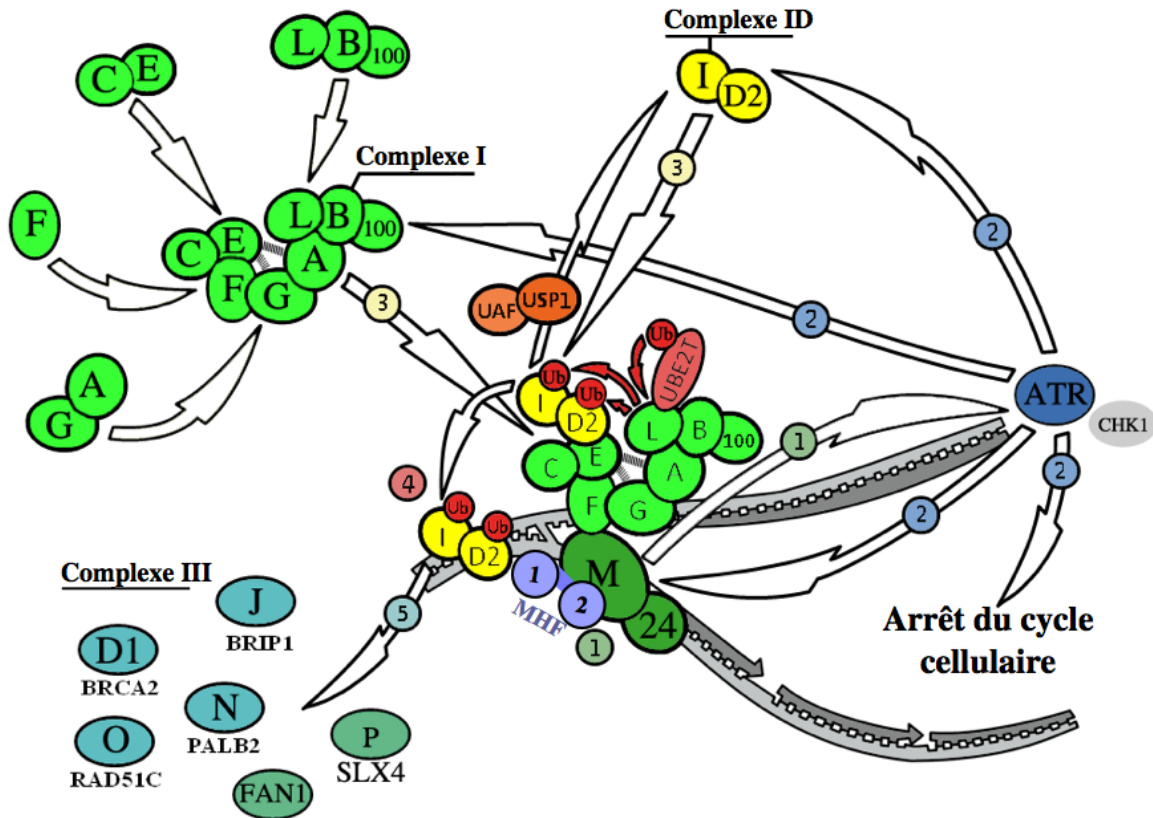


Figure 4. Voie FANC-BRCA : Schématisation de la voie FANC-BRCA de réparation de l'ADN. 1) FANCM et sa protéine associée FAAP24, stabilisés par les histones MHF1 et MHF2, reconnaissent la lésion dans l'ADN (pontage inter-brins en exemple) et activent ATR et sa kinase effectrice CHK1. 2) ATR-CHK1 phosphorylent FANCA, FANCE, FANCM et le complexe ID. 3) Une fois assemblé, le complexe I est recruté par FANCM à proximité du site endommagé de l'ADN, permettant le recrutement du complexe ID. 4) Il s'en suit la monoubiquitination du complexe ID par l'activité ubiquitine ligase de FANCL et à l'enzyme de conjugaison UBE2T, permettant au complexe ID monoubiquitiné de se localiser sur la chromatine au site de la lésion. 5) Vient ensuite le recrutement par le complexe ID du complexe III formé de protéines qui organiseront la réparation du pontage inter-brin. On note la présence de USP1 et UAF1, complexe qui opère la déubiquitination notamment de FANCD2, un des moyens de régulation négative de la voie FANC-BRCA. © Charles Joly Beauparlant, 2011.

2.2.5 DEMANTELEMENT DU COMPLEXE I ET DEUBIQUITINATION

Il existe deux mécanismes majeurs pour la régulation négative de la voie FANC-BRCA. Le premier est la déubiquitination de FANCD2 par le complexe USP1/UAF1⁹²⁻⁹⁴ et le deuxième l'hyperphosphorylation de FANCM^{48,95}. Il est maintenant reconnu que la déubiquitination de FANCD2 est une étape tout aussi critique que sa monoubiquitination lors de la réparation d'un PIB^{92,94}. Il est important de mentionner que USP1 n'agit pas seul. Cette enzyme est stabilisée et fortement stimulée par son interaction avec UAF1⁹⁴. Pour faire une synthèse de ce phénomène, il est important de retenir que lorsqu'il y a dommage à l'ADN, la transcription du gène *USP1* est inhibée et les protéines USP1 présentes seraient rapidement dégradées par le protéasome de manière «auto-clivage» ou clivage endo-protéolytique⁹³. Toutefois, une fois que FANCD2-Ub a joué son rôle dans le processus de réparation d'un PIB, ce dernier est déubiquitiné par USP1/UAF1. À l'opposé, une déplétion en USP1 ou UAF1 mène à une augmentation du niveau de FANCD2-Ub sur la chromatine⁹⁶ et cette omniprésence de FANCD2-ub sensibilise les cellules de la moelle épinière aux agents pontants⁹⁶. Cela indiquerait donc que des niveaux non régulés de FANCD2-Ub pourraient être toxiques pour la cellule et que FANCD2-Ub devrait être déplacé des complexes de réparation afin de permettre la progression des mécanismes de restauration de l'ADN suite à un PIB^{92,97}.

Un autre élément régulateur important de la voie FANC-BRCA est le démantèlement du complexe I de FANCM/FAAP24 avant la mitose. Comme il a été discuté précédemment, le complexe I est recruté au niveau du complexe FANCM/FAAP24 seulement durant la phase S lorsque ce dernier est faiblement phosphorylé par ATR suite à un dommage à l'ADN. Toutefois, une fois que la réparation a eu lieu et que la réplication s'est effectuée, FANCM est hyperphosphorylé menant au relâchement du complexe I du complexe FANCM/FAAP24²¹. À noter que ce relâchement du complexe I est corrélé avec la perte de la monoubiquitine de FANCD2⁹⁵. FANCM serait donc dégradé de façon «cycle cellulaire» dépendant. Des tests ont démontré que FANCM serait majoritairement dégradé dans les phases G2/M et M pour ensuite retrouver un niveau normal en phase G1/S. Des tests supplémentaires avec l'inhibiteur de protéasome MG132 ont prouvé que FANCM était dégradé par le protéasome en mitose⁹⁵. C'est donc par cette hyperphosphorylation que le complexe I se dissocierait de FANCM/FAAP24 avant que la cellule se divise^{48,95}. L'échec de l'inactivation de FANCM en phase M ferait que le

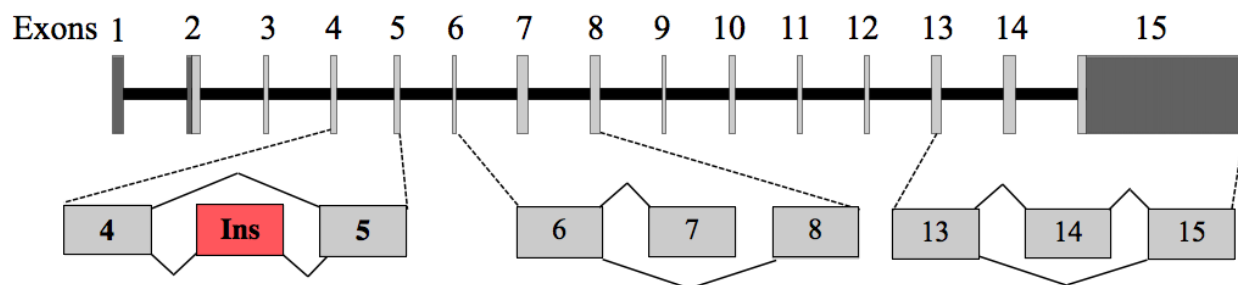
complexe I maintiendrait sa liaison à la chromatine et mènerait à la formation de chromosomes radiaux^{21,95}.

3. LE GENE *FANCC*

3.1 DESCRIPTION DU GENE ET POLYMORPHISMES

En premier lieu, le gène *FANCC* est localisé sur le bras long du chromosome 9, dans la région 22.3 ou 9q22.3. Plus précisément, *FANCC* se retrouve entre les bases 97 861 335 et 98 079 990 du chromosome 9 (UCSC genome browser, NM_000136). L'ADN génomique (ADNg) de *FANCC* est composé de 218 656 nucléotides tandis que les régions codantes comptent pour 1677 nucléotides, soit à peine 0.75% de la séquence totale du gène. Le gène *FANCC* présente donc de grandes séquences introniques et des séquences exoniques codantes variant entre 53 et 204 paires de bases. Cet ADNc (ADN complémentaire) encode une protéine composée de 558 acides aminés résultant en un peptide avec un poids moléculaire d'environ 63 kDa (numéro de référence NCBI NP_001230672.1). *FANCC* est composé de 15 exons dont le premier est entièrement non codant, de même qu'une partie au début de l'exon 2 et la dernière portion de l'exon 15. Le cadre de lecture qui encode la protéine débute donc dans l'exon 2 et se termine au commencement de l'exon 15. Le premier exon non codant fut découvert après la caractérisation du gène causant un décalage dans la nomenclature du gène dans la littérature. Dans certains articles, des mutations sont répertoriées à l'exon 6 et 13 par exemple, mais appartiennent en vérité à l'exon 7 et 14 respectivement.

FANCC - ADNc (1 677 nt)



FANCC - Protéine (558 aa)

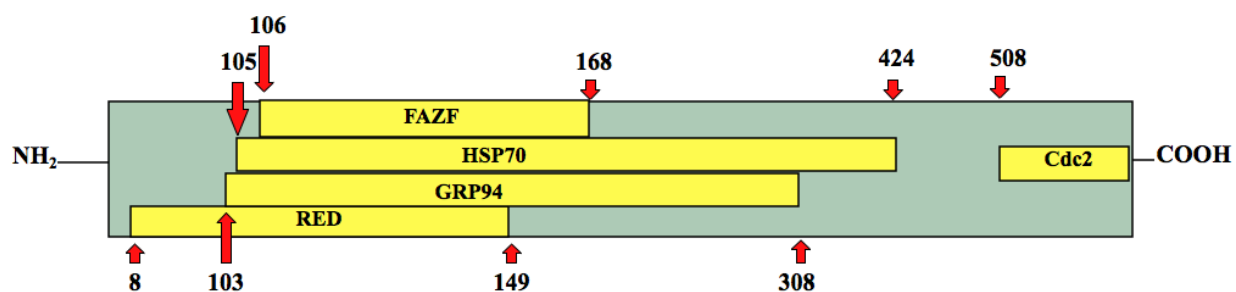


Figure 5. *FANCC*: Représentation schématique de l'ADNc de *FANCC* (haut) et les trois principaux épissages alternatifs. Les régions ombragées représentent les sections non codantes. Protéine *FANCC* (bas) et certains des domaines d'interaction connus avec leur localisation par les numéros d'acides aminés.

Depuis que *FANCC* a été cloné en 1992 par Strathdee et al.⁹⁸, plusieurs polymorphismes y ont été identifiés (Figure 6). Parmi ces polymorphismes, certains retiennent plus l'attention en raison de leur association avec des phénotypes délétères chez les patients porteurs. D'abord, les mutations les plus fréquentes chez les patients AF sont c.465+4A>T (IVS4+4A>T) et c.67del(322delG) qui à elles seules représentent environ 90% des mutations retrouvées chez les patients AF du groupe de complémentation C⁹⁹. La mutation intronique c.465+4A>T provoque la perte de l'exon 5 tandis que la mutation 332delG cause un changement du cadre de lecture résultant en un codon stop prématuré dans l'exon 2^{99,100}. Il est important de noter que certaines mutations varient énormément selon le groupe ethnique étudié. Comme il a déjà été rapporté maintes fois dans la littérature, la population juive ashkénaze est un groupe ethnique aux prises

avec le plus haut taux de mutations dans les gènes FANCs et du groupe de complémentation C¹⁰⁰. Il est estimé que 80% des patients AF de cette population sont assignés au groupe de complémentation C et que la mutation la plus fréquente dans cette population est c.465+4A>T¹⁰¹. Cette dernière a longtemps été considérée exclusive à la population de juifs ashkénazes et est associée avec un phénotype sévère¹⁰¹. Une étude a cependant révélé que cette même mutation est présente dans la population japonaise mais associée avec un phénotype moins sévère¹⁰⁰. Cette disparité entre groupes ethniques rappelle la complexité de ce désordre génétique et la difficulté d'associer les génotypes à des phénotypes précis.

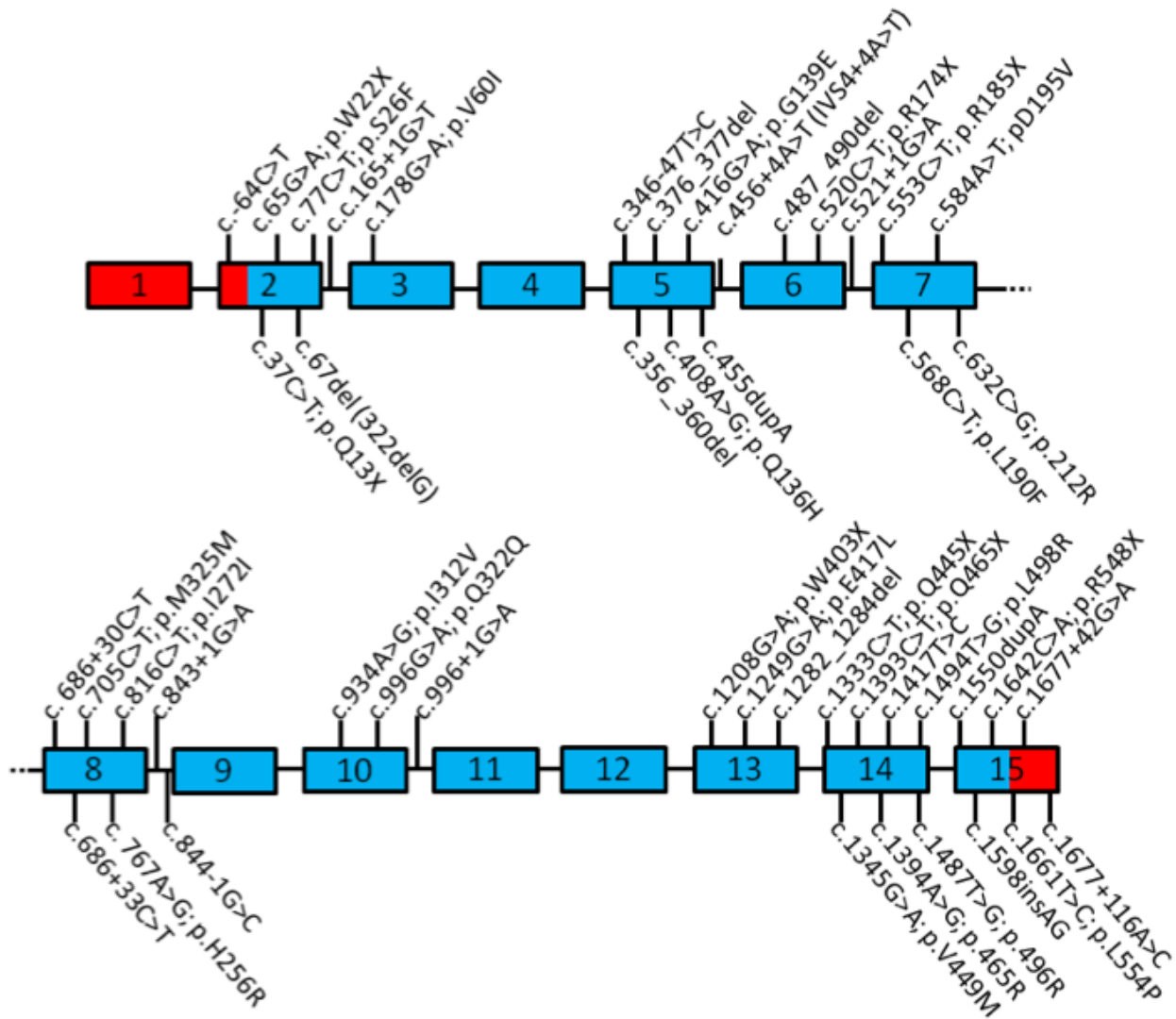


Figure 6. Polymorphismes de *FANCC*: Représentation des exons et introns du gène *FANCC* et les mutations rapportées. Les régions codantes (exons) sont représentées par les rectangles et les régions introniques (non codantes) sont représentées par les lignes. L'exon 1 et le début de

l'exon 2 ainsi que la dernière portion de l'exon 15 ne sont pas codants.© Charles Joly
Beauparlant, 2011.

3.2 *FANCC* ET EPISSAGE ALTERNATIF

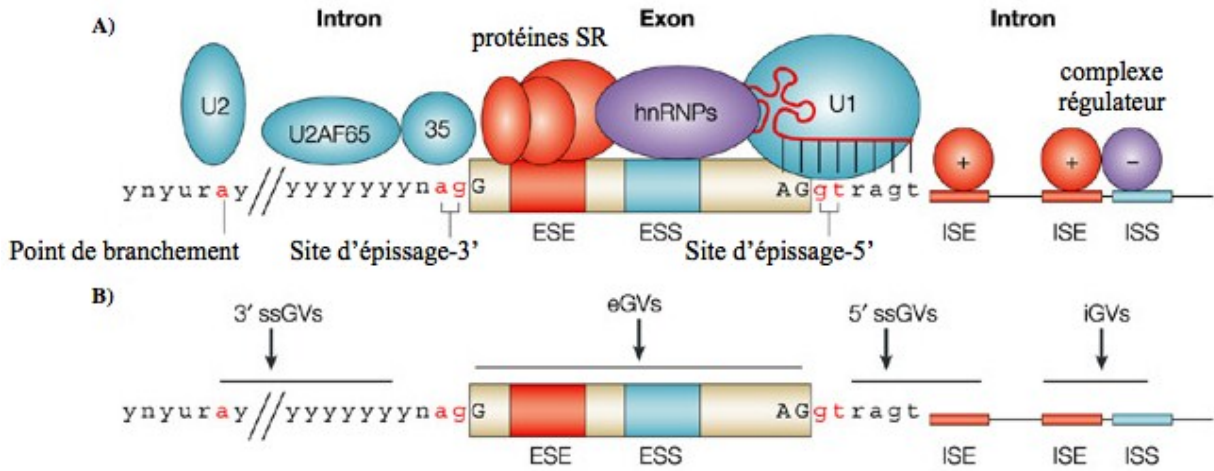
3.2.1 L'ÉPISSAGE ALTERNATIF

L'une des principales sources de la diversité protéique, de régulation des gènes et des mutations responsables de maladies chez l'Homme sont étroitement liées au mécanisme de l'épissage alternatif. Suite à la complétion du projet du Génome Humain, le nombre préalablement estimé de gènes codant pour des protéines était trop élevé, ce dernier se situerait plutôt entre 20 000 et 25 000 gènes¹⁰². Parmi ceux-ci, il semblerait qu'une grande proportion produirait plusieurs transcrits par épissage alternatif. En effet, grâce aux progrès des techniques de séquençage, il a été démontré il y a quelques années que la quasi totalité des gènes dit «multi exons» auraient des transcrits alternatifs (approximativement 95% de ces gènes)^{103,104}. L'omniprésence de ce phénomène indiquerait qu'il serait la source principale de la diversité protéique chez la plupart des gènes en plus de jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie de la cellule. Ce mécanisme s'observe à la grandeur de l'organisme, dans tous les tissus¹⁰⁵, mais certaines formes d'ARNm peuvent être spécifiques à certains tissus ou encore varier selon divers stimuli cellulaires^{106,107}. À noter aussi que les régions non transcrites de part et d'autre des gènes (5' et 3') sont aussi des éléments pouvant réguler la production d'ARNm¹⁰⁸⁻¹¹⁰. En raison de la prépondérance de l'épissage alternatif dans l'expression des gènes et dans la régulation générale de la cellule, de grands efforts de recherche se sont rivaillés sur ce mécanisme et ont fait en sorte que de nombreuses mutations responsables de maladies ont été identifiées. Ces dernières affecteraient le bon épissage des gènes, signifiant alors que la modification de l'épissage pourrait causer directement certaines maladies soit en modifiant leur sévérité ou en modulant la susceptibilité envers celles-ci¹¹¹⁻¹¹⁶.

Effectivement, des aberrations dans le processus d'épissage alternatif ont été démontrées dans plusieurs maladies dont le cancer, où jusqu'à 50% des mutations identifiées affecteraient le bon fonctionnement de l'épissage en modifiant les séquences nécessaires au traitement des ARN pré-messagers^{117,118}. Des gènes candidats influençant la susceptibilité à des maladies complexes connues telles que l'asthme, l'Alzheimer et les maladies auto-immunes ont été identifiés et produiraient différentes isoformes de différents gènes. Les ratios d'isoformes alternatives versus isoformes sauvages seraient différents entre les individus normaux et ceux malades¹¹⁹. La notion de ratio ici est importante considérant que dans certains cas de cancers ou de maladies, le ratio de

variants d'épissage est significativement altéré et serait corrélé avec la sévérité de la maladie^{120,121}.

D'un point de vue plus mécanique, l'épissage d'un gène nécessite un ensemble de séquences consensus bien précises aux abords des exons, en d'autres mots aux jonctions exons-introns. L'épissage nécessite aussi des régions régulatrices présentes dans les introns, régions qui permettront le bon épissage des régions non codantes et le bon appariement des régions codantes dans l'ARNm¹²². En moyenne, l'exon chez l'Homme compterait 145 nt et l'intron plus de 3 000 nt¹¹⁷. Il a longtemps été pensé que les éléments régulant l'épissage étaient dans les régions codantes ou exclusivement aux jonctions avec les introns. Il est maintenant bien démontré que les motifs jouant un rôle dans le mécanisme d'épissage se retrouvent aussi bien dans les introns¹⁰⁴, notamment le «branch motif» ou point de branchement étant une séquence conservée depuis la levure où la région flanquante intronique d'un exon en 5' est estérifiée et se recourbe, formant un lasso («lariat» en anglais), permettant l'épissage de la région non-codante et la ligation des exons¹²³ (Figure 8). Tous ces motifs sont entre autres reconnus par un groupe de protéines essentiel à l'épissage, des ribonucléoprotéines («Small Nuclear Ribonucleoprotein, snRNP» en anglais), qui reconnaissent ces régions et coordonnent l'épissage. Plus précisément, les régions 5' (donneur) flanquantes de l'intron, le point de branchement et le site 3' (accepteur) de l'autre jonction de l'intron flanquant sont reconnus par U1 snRNP, U2 snRNP et U2AF respectivement¹¹³ (Figure 7). D'avantages de protéines sont impliquées dans ce complexe mécanisme : U4, U6 et U5 snRNPs et plus d'une centaine d'autres forment le «spliceosome»¹²³. Les sites accepteurs et donneurs sont aussi modulés par de courtes séquences (autour de 10 nucléotides) qui peuvent promouvoir l'exclusion d'un exon ou encore en promouvoir l'inclusion. Ces dernières peuvent se localiser autant sur les exons, ESE et ESS pour «Exonic Splicing Enhancer» et «Exonic Splicing Silencer», ou encore dans les introns où elles se nomment ISE et ISS pour «Intronic Splicing Enhancer» et «Intronic Splicing Silencer» respectivement^{107,113,122}. Ces motifs prennent toute leur importance lorsque les sites 5' donneurs et 3' accepteurs diffèrent des séquences consensus et deviennent des sites faibles. Dans ces situations, ce sont entre autres les motifs «enhancers» et «silencers» qui modulent les actions de la machinerie d'épissage^{113,122}.



Nature Reviews | Genetics

Figure 7. Éléments régulateurs de l'épissage: A) Principales protéines formant le «spliceosome» et les motifs avec lesquels elles interagissent. Les régions en rouge sont les régions flanquantes intron/exon et le point de branchement, toutes des régions hautement conservées (nucléotides rouges). Des éléments de régulation additionnels sont démontrés : «Exonic Splicing Enhancer» (ESE), «Exonic Sequence Silencer» (ESS), «Intronic Splicing Enhancer» (ISE) et «Intronic Splicing Silencer» (ISS). Des protéines de la famille des protéines Sérine Arginine «SR» reconnaissent les ESE et ISE et facilitent l'exclusion d'exons tandis que des «heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles» (hnRNPs) se lient aux motifs ESS et ISS et inhibent l'exclusion. B) Endroits où des variants génomiques «GV» peuvent survenir et affecter les différents motifs régulateurs de l'épissage. Ils peuvent se produire dans les séquences exoniques (eGVs) notamment dans des ESEs ou ESSs, au niveau des sites d'épissage «splice sites» accepteurs ou donneurs (ssGVs) ou encore dans des régions introniques plus profondes au niveau des ISEs et ISSs (iGVs). *Tiré et traduit de Pagani et al. 2004³.*

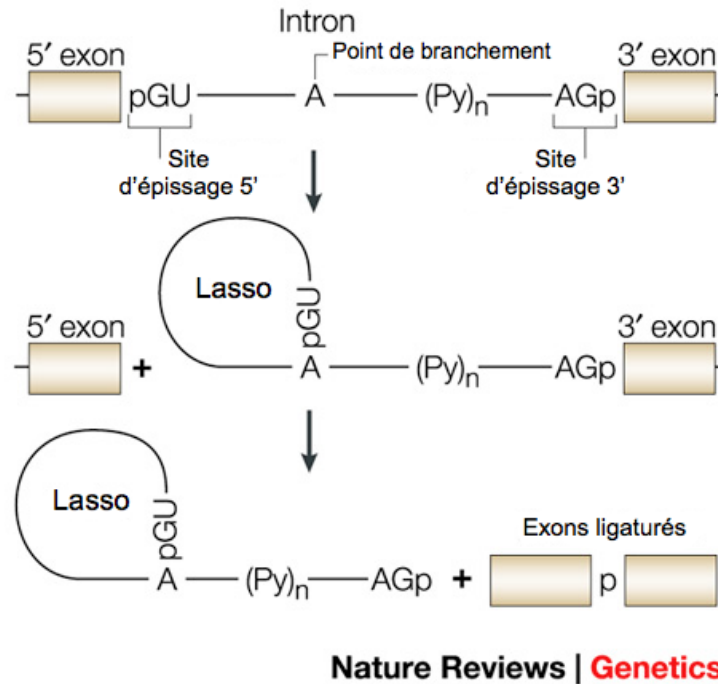


Figure 8. Mécanisme de base de l'épissage: Schématisation des motifs conservés essentiels à l'épissage et comment s'opère l'épissage d'un intron. Principalement, deux réactions d'estérification surviennent. La première survient à l'extrémité 5' de l'intron où le groupement 2'-hydroxyle de l'adénine du site de branchement «attaque» le phosphate du site d'épissage 5' (GU). Suite à cette réaction, un lasso se forme. La deuxième réaction d'estérification survient entre le phosphate (p) de l'extrémité 3' de l'intron et le groupe 3'-hydroxyle de l'exon nouvellement détaché qui permet ensuite la ligation des deux exons et libère l'intron qui est toujours en forme de lasso. *Tiré et traduit de Pagani et al. 2004*³.

Il est donc clair que des altérations de séquences impliquées dans la régulation de l'épissage, qu'elles soient dans des régions codantes ou bien introniques, se doivent d'être analysées avec soin puisqu'elles peuvent avoir un impact biologique majeur sur la formation de l'ARNm. Malheureusement, ces altérations dites parfois bénignes, ont trop souvent été ignorées dans le passé et il est maintenant évident que l'épissage alternatif nécessiterait d'avantage d'attention et de recherche afin d'en découvrir toutes les implications dans la sévérité de maladies dont les cancers. Son rôle potentiel dans des maladies et cancers n'est pas inconnu dans la littérature, il est bien documenté qu'il peut mener à des changements dans des gènes associés à des mécanismes cellulaires majeurs tels que la migration, la régulation de croissance cellulaire, l'apoptose, la réponse aux hormones et à la chimiothérapie^{115,124,125}. Fait intéressant, les gènes impliqués dans la voie FANC-BRCA semblent être enclins à l'épissage alternatif. Effectivement,

plusieurs transcrits alternatifs ont été observés chez plusieurs de ces gènes parmi d'autres d'intérêt dont *ATR*¹²⁶, *BRCA1*¹²⁷, *NBS1/NBN*¹²⁸, *FANCA*¹⁸⁹, *FANCC*¹⁹⁰, *FANCL*^{129,130}, *FANCD1/BRCA2*¹³¹, *FANCI*^{11,12,132}, *FANCN*¹⁴ et *ATM*^{133,134}.

3.2.2 LES EPISSAGES ALTERNATIFS DU GENE *FANCC*

Parmi les mutations listées dans la Figure 6, certaines modifient l'épissage du gène *FANCC*. Deux épissages alternatifs sont fréquemment rapportés dans la littérature soient l'épissage de l'exon 7 et de l'exon 14^{135,136}. Au niveau de l'exclusion constitutive de l'exon 7, deux mutations ont été associées avec ce phénomène soient p.R174X¹³⁷ à la fin de l'exon 6 et p.R185X dans l'exon 7¹³⁵. La mutation p.R174X (c.520C>T) survient à l'avant-dernier nucléotide de l'exon 6 et si l'exon 7 est inclus ou conservé dans l'ARNm, ceci fait qu'un codon stop «TGA» prématuré est formé. Toutefois, si l'exon 7 est exclu, la séquence obtenue «TGG» forme l'acide aminé tryptophane (Trp) et conserve le cadre de lecture sans former de codon stop prématuré. Malgré le fait que ces deux épissages semblent être constitutifs dans l'organisme (Figure 9), ces mutations moduleraient l'exclusion de l'exon 7. Ce phénomène serait sans doute le même utilisé à l'égard des mutations présentes dans l'exon 14, p.Q445X (c.1333C>T) et p.Q465X (c.1393C>T) qui formeraient toutes deux un codon stop prématuré. D'autres événements d'épissage ont été rapportés notamment la perte des deux premiers exons codants (exon 2 et 3) chez un individu, sans néanmoins identifier la cause de cet épissage¹³⁸. L'exclusion de l'exon 5 a aussi été bien documentée dans la littérature, la mutation intronique c.456+4A>T a été identifiée et associée avec ce phénomène causant un phénotype sévère chez la population juive ashkénaze¹³⁹ mais répertoriée moins dommageable chez la population japonaise¹⁰⁰. Un autre épissage a été identifié chez *FANCC*, celui de l'exon 9 (Ameziane et al. 2008), et a démontré que l'exclusion de cet exon causait la cessation de la production de la protéine *FANCC*¹⁴⁰.

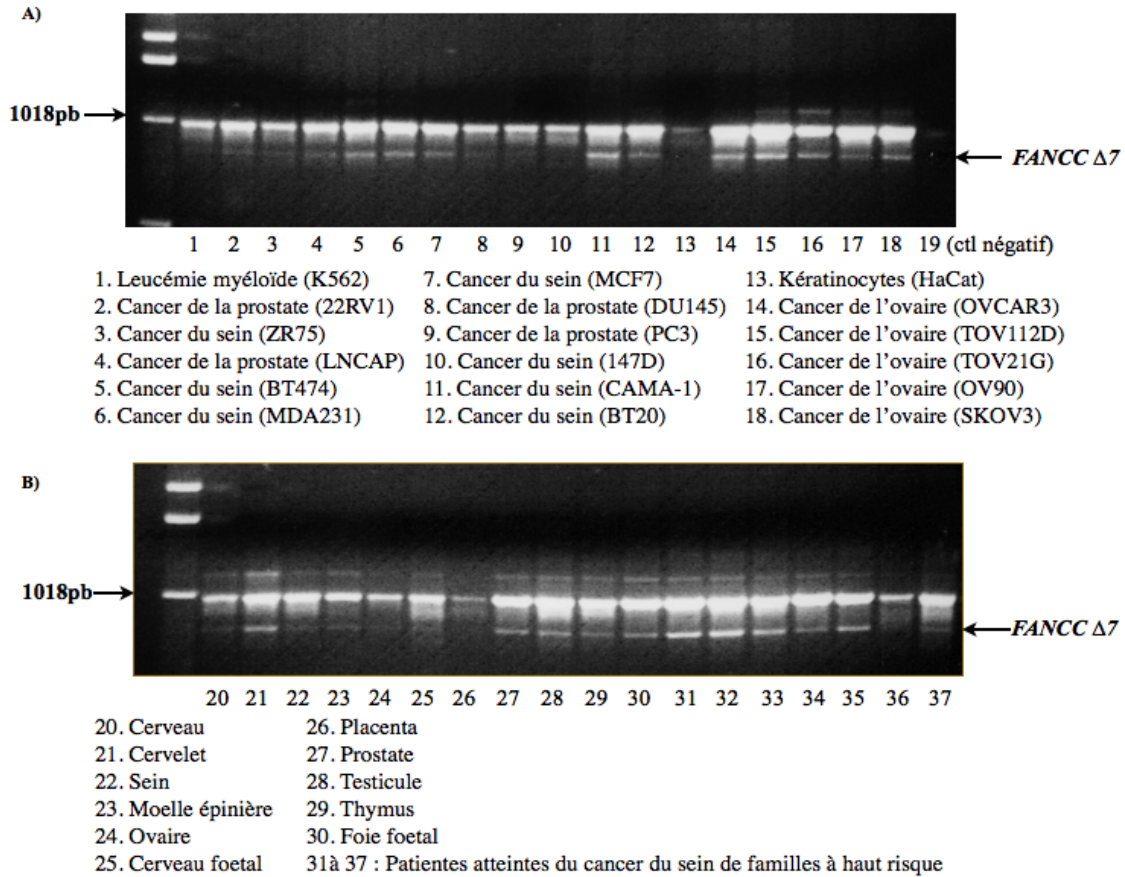


Figure 9. PCR *FANCC* et *FANCCΔ7*: Réactions PCR sur plusieurs lignées cellulaires (1 à 18 et 31 à 37) où 2 à 18 sont cancéreuses, 1 provient d'une leucémie myéloïde et 31 à 38 sont des lignées issues de patientes atteintes du cancer du sein de familles à risque élevé. 20 à 30 sont les PCRs faits à partir de tissus sains. 19 est un contrôle négatif. © Charles Joly Beauparlant, 2011.

Le chapitre 1 se concentre exclusivement à l'étude du transcrit alternatif de *FANCC* avec l'exclusion de l'exon 7 (*FANCCΔ7*) et son implication dans la voie FANC-BRCA. Tel que mentionné précédemment, cet épissage alternatif conserve le cadre de lecture, ne brimant pas la synthèse protéique. Bien que certains domaines d'interaction sont touchés par l'exclusion de l'exon 7, la perte des ces 55 aa peut aussi avoir des conséquences sur les autres interactions protéines-protéines dans la cellule (Figure 10). Il sera alors intéressant de voir comment ce changement au niveau de la protéine affectera ses interactions et dans le même sens son rôle dans la cellule. Les sections suivantes permettront d'en apprendre un peu plus sur ce qui est connu de *FANCC* au niveau de son rôle dans la cellule ainsi que de ses principaux partenaires d'interaction.

FANCCdelta7 - Protéine (503 aa)

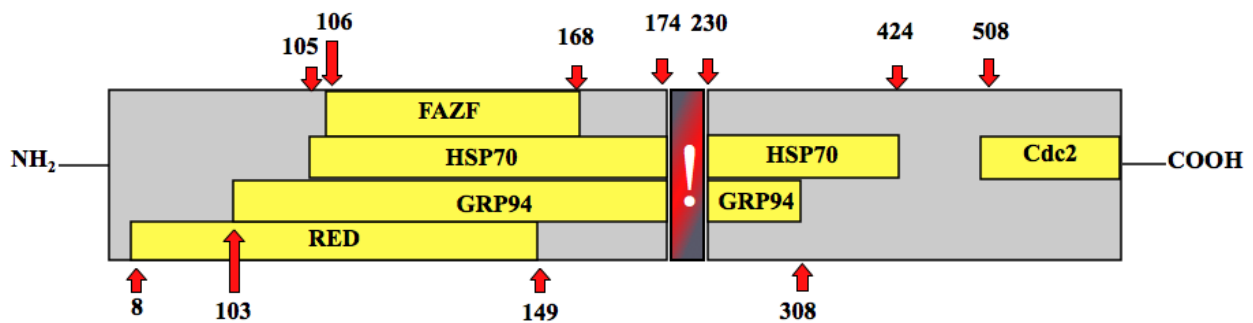


Figure 10. Protéine prédite du variant d'épissage *FANCCΔ7*: Schématisation de la protéine produite suite à l'exclusion de l'exon 7 du gène *FANCC*. Les chiffres représentent les acides aminés. La région rayée gris et rouge représente la section où se retrouvait la portion encodée par l'exon 7 (de l'aa 174 à 230). Par les quelques domaines affichés sur le schéma, l'exclusion de l'exon 7 vient scinder une portion de ces domaines d'interaction.

3.2.3 TECHNIQUE MINIGENE

Dans le cadre de ce projet, l'impact de différents polymorphismes de *FANCC* au niveau de l'exclusion de l'exon 7 a été analysé. Pour ce faire, la technique du minigène a été utilisée. Cette expérience consiste à sous-cloner les régions d'ADN génomique d'intérêts dans un vecteur d'expression eukaryote. Ces régions sont l'exon d'intérêt, les régions introniques flanquantes, l'exon précédant l'exon exclu ainsi que l'exon qui le suit (Figure 11). Il est ensuite possible d'opérer des mutagenèses dirigées sur le vecteur afin de reproduire les polymorphismes d'intérêt. Lorsque complété, le vecteur ou minigène est transfecté dans des cellules afin de promouvoir son expression. Ensuite, les cellules sont récoltées et l'ARN est extrait et analysé par qRT-PCR afin de quantifier les différents transcrits provenant du minigène. En comparant les résultats obtenus des vecteurs mutés avec un minigène «sauvage», l'impact des différents polymorphismes peut donc être quantifié^{141,142}. De cette façon, il est possible de savoir si certains font la promotion de l'exclusion en augmentant le nombre de transcrits sans l'exon d'intérêt ou bien au contraire s'ils privilégient l'inclusion de l'exon. Afin de s'assurer que l'effet observé est bel et bien modulé par le polymorphisme et non les manipulations associées à l'expérience, il est possible de procéder à une mutagenèse dirigée sur le même polymorphisme afin de renverser la mutation et ainsi retrouver le génotype «sauvage» sur ce même vecteur et voir au niveau de l'ARN si le ratio de la forme épissée vs non épissée revient au niveau de celui observé chez le minigène sauvage. Suite à l'expérience, il est possible de confirmer les observations obtenues par des sites d'analyses *in silico* qui permettent d'identifier les régions ou motifs impliqués dans l'épissage comme il a été mentionné dans la section 3.2.1.

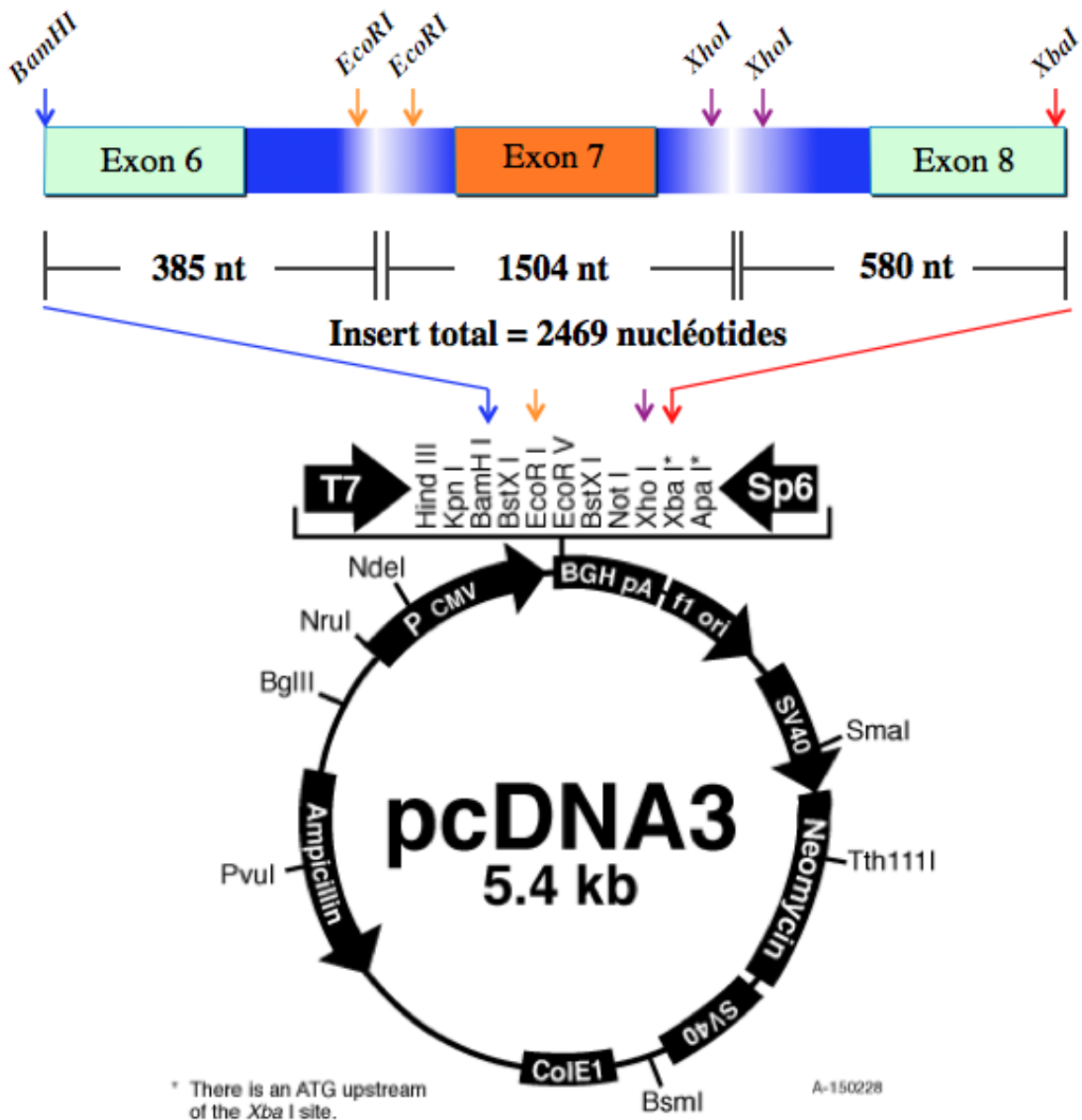


Figure 11. Minigène *FANCC*: Schématisation de la construction du minigène *FANCC*. Sous-clonage des 3 exons (exon épissé au centre) ainsi que les régions introniques flanquantes à partir de l'ADN génomique. Les flèches indiquent les sites de restrictions utilisés lors du sous-clonage et l'insertion des différentes parties dans le vecteur pcDNA3 (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON). Le minigène qui pourra ensuite être transfecté dans des cellules et l'ARN de celles-ci pourra être analysé pour quantifier les différents transcrits d'ARNm.

3.2.4. *FANCCΔ 7* ET FRACTIONS POLYRIBOSOMALES

Lorsqu'un ARNm n'est pas sujet à la dégradation des ARNm non-sens (NMD ou «nonsense mediated decay»), ceci est signe que ce dernier sera fort probablement traduit en protéine. Toutefois, encore faut-il le prouver. Lorsque l'expression protéique d'un ARNm de la sorte est trop faible ou pour toutes autres raisons rendant l'utilisation de la méthode d'immunobuvardage impossible, une alternative est envisageable. Cette méthode se nomme l'analyse des fractions polyribosomales. Durant le processus de traduction, de petites unités (40s) et larges unités (60s) s'associent pour former le complexe 80s (monosome). Ce complexe progresse le long de l'ARNm durant la phase d'élongation et se dissocie en sous unités 40s et 60s à la terminaison de la traduction¹⁴³. Pendant la phase d'élongation d'un ribosome, d'autres ribosomes peuvent se lier sur le même ARNm et initier la traduction formant alors des polysomes. Ces complexes peuvent compter de 2 à plus de 20 ribosomes sur le même ARNm¹⁴³. Il est alors possible de quantifier ces complexes en les analysant par gradients de sucrose^{143,144}. Grâce à ces fractions, il est possible de discriminer les différents complexes 40s, 60s, 80s et polysomes. Seulement les fractions des polysomes sont considérées comme actives à l'égard de la traduction car le pic de 80s contiendrait une proportion inconnue d'ARNm 80s libres¹⁴³. Une étude de Evans et al. 2009 démontre l'utilisation de cette technique pour confirmer la traduction d'un variant d'épissage du gène codant pour le récepteur CRH-R2 α (sCRH-R2 α) (Figure 12). À titre comparatif, ils ont parallèlement analysé un variant d'épissage du gène RPL3 (RLP3a) sachant qu'il n'était pas traduit en protéine (contrôle négatif) et le gène Cypa comme contrôle positif puisque l'ARNm de ce dernier est bel et bien traduit en protéine¹⁴⁴. Dans cette méthode, l'EDTA est utilisé comme contrôle car il dissocie tous les ribosomes, permettant de confirmer que les résultats obtenus proviennent bien des ARNm présents sur les complexes ribosomiaux et non de contaminants présents dans les échantillons.

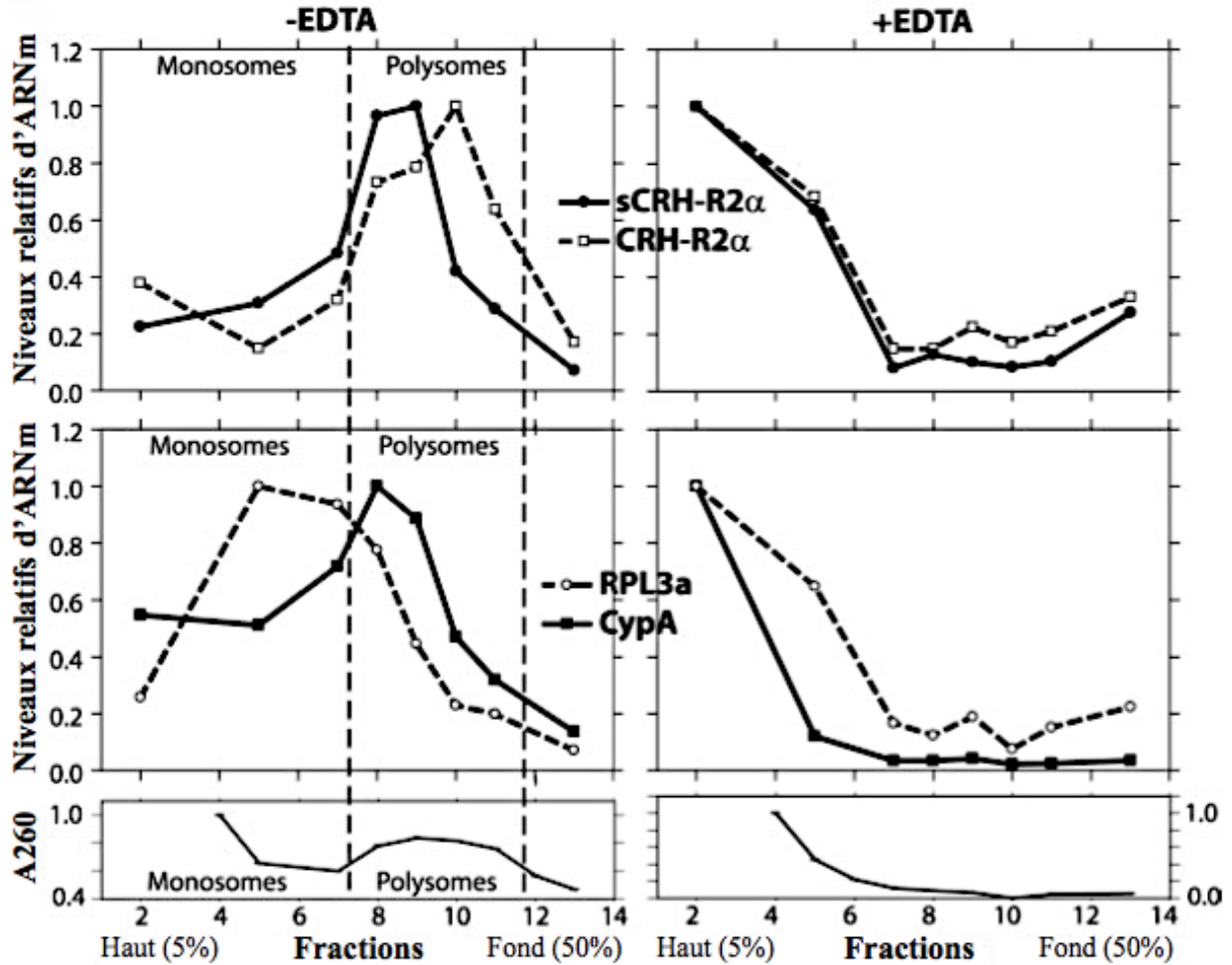


Figure 12. Analyses de polysomes: Exemple de résultats obtenus suite à une analyse de fractions ribosomales. Les lysats cellulaires furent séparés en fractions allant de 5% à 50% de sucrose avec (+) ou sans (-) EDTA. Les pics prononcés sont les fractions de polysomes (délimités par les lignes verticales pointillées) analysées à A260 (graphiques du bas). Les fractions furent analysées par qRT-PCR, celles de sCRH-R2 α (ligne pleine, cercle plein), CRH-R2 α (ligne pointillée carré vide), RPL3a (ligne pointillée, cercle vide) et CypA (ligne pleine, carré plein). Le traitement par l'EDTA démontre que les données proviennent des ARNm associés aux ribosomes. *Tiré et traduit de Evans et al. 2009. © The Endocrine Society, 2009.*

3.3 *FANCC* ET LA CELLULE

3.3.1 *FANCC* ET LA VOIE FANC-BRCA

Comme il a été mentionné à maintes reprises dans les sections précédentes, *FANCC* est un membre essentiel du complexe I, pour sa formation et son fonctionnement permettant la monoubiquitination de *FANCD2*. Comme *FANCC* est une protéine qui est majoritairement localisée dans le cytoplasme de la cellule, cette dernière a besoin d'assistance pour être localisée au noyau puisqu'elle ne possède pas de signal de localisation cellulaire^{145,146}. Au cours des premières années après que *FANCC* ait été cloné⁹⁸, il était difficile de concevoir qu'il pouvait avoir un quelconque rôle dans le noyau justement en raison de sa forte localisation dans le cytoplasme de la cellule. Plusieurs ont émis l'hypothèse que *FANCC* devait interagir avec d'autres protéines pour se localiser dans le noyau de la cellule. En effet, *FANCC* interagit directement avec *FANCE* pour être recruté au noyau, bien que la région spécifique sur *FANCC* n'ait pas encore été identifiée^{147,148}. En fait, *FANCC* et *FANCE* seraient mutuellement essentiels l'un à l'autre pour leur localisation et stabilité dans le noyau¹⁴⁸. Effectivement, cette étude a mis en lumière le fait que la localisation nucléaire de *FANCE* n'était pas entièrement dépendante de ses motifs de localisation cellulaire. Cependant, cette réciprocity entre *FANCE* et *FANCC* n'est pas suffisante pour l'adhésion au complexe I de la voie FANC-BRCA. C'est à *FANCF* que revient le rôle d'adaptateur comme il a été mentionné à la section 2.2.2. *FANCF* interagit directement avec *FANCG* via sa région C-terminale et la région N-terminale (plus précisément les 15 premiers acides aminés de *FANCF*) est essentielle à son interaction avec le sous-complexe *FANCC-FANCE*⁵⁶. C'est aussi lui qui se lie directement à *FANCM* pour l'encrage du complexe I⁵⁷ au niveau de la chromatine, l'étape cruciale précédant la monoubiquitination de *FANCD2/FANCI*.

3.3.2 *FANCC*, L' APOPTOSE ET LE STRESS OXYDATIF

Dans le cadre de ce projet, la réparation de l'ADN est au premier plan. Toutefois, *FANCC* est reconnu pour être impliqué dans d'autres voies métaboliques importantes de la cellule telles que la régulation de l'apoptose ainsi que la défense contre les dommages oxydatifs^{149,150}. Le rôle de *FANCC* dans la défense contre les dommages oxydatifs se fait par plusieurs mécanismes. D'abord, il a été démontré que *FANCC* interagissait avec le NADPH cytochrome P450 réductase

(RED) au niveau de ses acides aminés 8 et 149 avec le domaine cytosolique de RED, une protéine membranaire microsomale impliquée dans le transfert d'électron¹⁵¹ (Figure 5). L'interaction de FANCC avec RED a comme effet d'atténuer son activité. Il la diminue mais ne l'inhibe pas complètement, il y aurait donc une fraction du NADPH cytochrome P450 réductase qui ne serait pas sujet à la régulation faite par FANCC¹⁵¹. Lorsque non régulé, RED peut causer des stress oxydatifs excessifs en raison d'une trop importante formation de composés réactifs de l'oxygène pouvant mener à des mutations dans l'ADN ou endommager des macromolécules¹⁵¹. FANCC agirait donc comme un antioxydant intracellulaire de part son interaction avec RED. Il n'est toutefois pas le seul FANC impliqué dans ces mécanismes puisque des études ont démontré le rôle de FANCG avec un autre membre de la superfamille P450 qui serait associé avec la production de radicaux libre (ROS), CYP2E1^{152,153}.

Il a été rapporté que FANCC était aussi impliqué dans le fonctionnement de GSTP1 («Glutathione S-transférase P1-1») dans le cytoplasme. GSTP1 joue un rôle de détoxification notamment par le métabolisme de xénobiotiques et est aussi une protéine importante dans la protection de l'apoptose durant des stress oxydatifs¹⁵⁴. Cependant, lors de ces stress oxydatifs, GSTP1 peut être rapidement inactivé par oxydation par des agents tels que H₂O₂ et le dioxyde de soufre. Lorsque traité avec du peroxyde d'hydrogène par exemple, GSTP1 forme des ponts disulfures intramoléculaires¹⁵⁵. Cet état désactive GSTP1 mais est réversible par l'ajout d'antioxydants, de GSH (tripeptide impliqué dans plusieurs réactions de détoxification et élimination d'espèces réactives de l'oxygène) ou d'agents réducteurs tel que le DTT (dithiothréitol)^{155,156}. FANCC agirait en tant qu'agent réducteur de GSTP1 durant les stress oxydatifs. Même si FANCC ne possède pas les motifs actifs (C-X-X-C) présents chez les «disulfides reductases», nécessaires pour les échanges thiol-ponts disulfures, il compte 8 résidus cystéines hautement conservés qui pourraient expliquer une certaine activité d'échanges thiol-ponts disulfures. L'hypothèse est plausible puisqu'il a déjà été démontré qu'une protéine sans motifs C-X-X-C peut être impliquée dans la réduction de ponts disulfures comme c'est le cas chez PGK (phosphoglycerate kinase) et de son action réductase sur l'enzyme protéolique plasmine¹⁵⁷. En plus de son rôle dans la réparation de pontage interbrin, FANCC aurait aussi comme rôle d'empêcher l'oxydation de protéines cytoplasmiques protectrices durant les stress oxydatifs. À noter que ces épisodes de stress oxydatifs chez des cellules hématopoïétiques déficientes *FANCC* peuvent rendre ces dernières plus susceptibles à l'apoptose³⁴. De cette façon,

FANCC agit comme agent réducteur et aide à contrôler les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène de par son interaction avec GSTP1^{21,154}.

L'étude des cellules déficientes *FANCC* démontra qu'elles étaient hypersensibles aux signaux de l'apoptose, notamment ceux véhiculés par les cytokines inhibitrices de croissance TNF- α et IFN- γ ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. De plus, chez ces cellules, la kinase pro-apoptotique PKR («Protein kinase RNA-activated») est activée de manière constitutive^{158,159}. Cet état d'activation soutenue est problématique pour la cellule. En effet, l'autophosphorylation de PKR mène à l'arrêt de la traduction protéique via la phosphorylation de eIF-2 α (facteur eukaryote d'initiation 2 alpha) et ultimement à la mort cellulaire¹⁶⁰. FANCC a été démontré comme un acteur important dans le contrôle de cette kinase. Pour ce faire, FANCC se trouve à interagir directement avec la chaperonne HSP70 aux acides aminés 105 à 424¹⁵⁸ (Figure 5). De par leur interaction, HSP70 et FANCC formeraient un complexe ternaire avec PKR et le démantèlement de FANCC de ce complexe permettrait l'inhibition de PKR¹⁵⁹. Cette dissociation a été étudiée plus en profondeur et il a été démontré que FANCA et FANCG seraient nécessaires à l'expulsion de FANCC du complexe PKR-HSP70-FANCC¹⁶⁰. Des essais ont démontré qu'une déficience de FANCA ou FANCG menait à l'accumulation de PKR associé à FANCC et à une hypersensibilité des cellules progénitrices de la moelle épinière aux cytokines TNF- α et IFN- γ ¹⁶⁰. L'exclusion de FANCC notamment grâce à FANCA et FANCG suite à l'adhésion de HSP70 permettrait d'exposer PKR à un domaine inhibiteur de la chaperonne. Ceci préviendrait la phosphorylation de la kinase et par le même fait celle de eIF2 α . Cette inhibition permettrait alors la continuité de la traduction protéique et la survie cellulaire¹⁶⁰ (Figure 13). Tout indiquerait que le manque de contrôle au niveau de l'activation de la kinase PKR contribuerait à la mort excessive des cellules, une caractéristique étroitement liée à l'insuffisance médullaire chez les individus FA au niveau des cellules progénitrices de la moelle épinière.

En lien avec l'hypersensibilité aux TNF- α et IFN- γ , FANCC aurait aussi un rôle d'antagoniste tant qu'à l'activation du récepteur TLR8¹⁶¹. Chez les cellules déficientes FANCC, le TLR8 serait constamment activé et expliquerait en partie la surproduction de TNF- α ¹⁶¹. Ce rôle supplémentaire de FANCC vient renforcer la conception de la versatilité du rôle de FANCC dans le cytoplasme de la cellule.

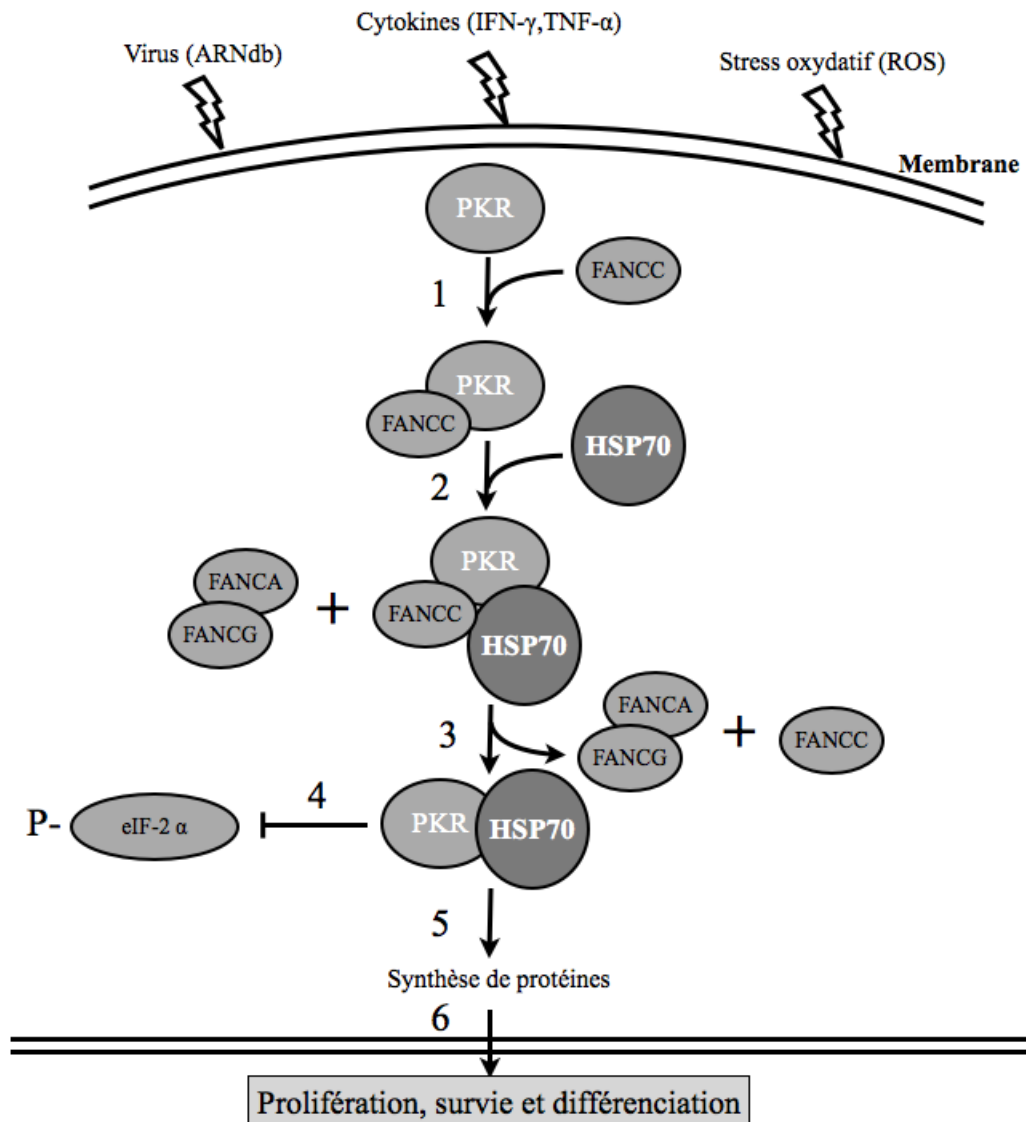


Figure 13. Schématisation du rôle de FANCC et de HPS70 dans la régulation de PKR dans les cellules hématopoïétiques: Suite à différents stress, FANCC se lie à PKR (1), ensuite recrute HSP70 pour former le complexe ternaire (2). FANCC est relâché du complexe (3) avec l'implication de FANCA et FANCG. HSP70 prévient la phosphorylation de PKR et eIF-2α (4) permettant la poursuite de la synthèse protéique (5) et la survie cellulaire (6). *Adapté et traduit de Pang et al. 2002⁴.*

3.3.3 FANCC, AUTRES IMPLICATIONS

Sans détailler toutes les interactions de FANCC dans la cellule, ce membre de la voie FANCC-BRCA est définitivement un acteur multi-fonctionnel. Il a été mentionné dans la section précédente de l'implication de FANCC dans la protection contre l'apoptose en réponse aux cytokines TNF- α et IFN- γ . Une autre activité de FANCC qui vient renforcer ce rôle est son interaction directe avec la chaperonne moléculaire GRP94¹⁶². La section protéique de FANCC située entre les acides aminés 103 à 308 s'associe directement avec GRP94 et cette interaction stabiliserait FANCC puisque la déplétion de GRP94 corrèle avec la diminution du niveau de FANCC dans la cellule^{162,163}. Puisqu'il a été prouvé dans la littérature que GRP94 est impliquée dans le trafic de protéines cytoplasmiques, l'hypothèse que FANCC pourrait agir comme co-chaperonne de concert avec GRP94 pour transporter STAT1 au récepteur de l'IFN- γ est plausible¹⁶⁴. En effet, FANCC est connu pour activer STAT1 et promouvoir son appariement au récepteur de l'IFN- γ ¹⁶³. FANCC favoriserait donc la survie cellulaire en participant aux voies de signalisation de la voie JAK/STAT en réponse aux cytokines et facteurs de croissance. Un lien direct avec la défaillance médullaire est encore possible par cette implication de FANCC puisque des problèmes dans la voie de signalisation par STAT1 en réponse à des facteurs de croissance hématopoïétiques pourraient promouvoir cette défaillance.

Les derniers acides aminés de FANCC (500 à 558) permettent une interaction directe avec Cdc2 («Cyclin-dependent kinase», aussi nommée CKD1), une cycline qui intervient dans la préparation à la mitose dans le cycle cellulaire^{165,166}. Cette dernière intervient aussi au niveau de FANCG en le phosphorylant, étape impliquée dans la dissociation du complexe I de la chromatine qui précède l'entrée en phase M¹⁶⁷. FANCC jouerait ainsi un rôle d'activateur de la cycline et pourrait être impliqué dans la levée du blocage en G2/M suite à la réparation d'un pontage interbrin¹⁶⁶. Un blocage prolongé en G2/M et l'arrêt du cycle cellulaire sont des caractéristiques partagées par les cellules déficientes FANCCs. Il y a donc un lien direct entre les points de contrôle et les gènes de cette famille. FANCC en est une preuve par son interaction directe avec l'une des cyclines impliquées dans la maintenance du cycle cellulaire. De plus, les niveaux de FANCC au cours du cycle cellulaire concordent avec ceux de Cdc2¹⁶⁵.

La section 2.2.5 démontre bien comment le complexe I est démantelé et l'importance de cette étape avant l'entrée en mitose. Toutefois, les FANCCs auraient des implications importantes durant cette phase du cycle cellulaire. Il a récemment été démontré que les FANCCs seraient

impliqués dans la bonne ségrégation des chromosomes durant la mitose de concert avec BLM¹⁶⁸. Durant cette phase, un défaut dans la bonne ségrégation des chromatides soeurs peut se manifester en des ponts d'anaphase¹⁶⁸. Ces structures peuvent être observées au niveau de cellules en mitose par la coloration au DAPI et peuvent mener à la formation de micro-noyaux ou de chromosomes traînants («lagging chromatin» en anglais), une conséquence de la rupture de ponts chromosomiques par la force des microtubules ou de la cytokinèse^{168,169}. Ces micro-noyaux («micronucleus» ou MN) ne démontreraient pas d'activité transcriptionnelle détectable. Ainsi, le matériel génétique présent dans ces structures serait fonctionnellement perdu et inaccessible pour la maintenance de la cellule¹⁶⁹. Ils seraient donc des indices d'instabilité génétique. Ces ponts seraient étroitement corrélés avec la présence de BLM («Bloom syndrome protein»), reflétant son rôle dans ces structures¹⁷⁰. Des ponts d'ADN ultra fins (UFBs) ont aussi été détectés non pas dans les régions des centromères mais au niveau de sites fragiles communs de l'ADN (endroit spécifique de l'ADN qui, sous certaines conditions, peuvent avoir tendance à briser). Cette «nouvelle» catégorie de ponts serait toutefois non détectable par coloration DAPI¹⁷¹ (Figure 14). Cette présence aux sites fragiles semblerait conférer un aspect pathologique plutôt que physiologique à ces structures (contrairement aux ponts originaires des centromères)¹⁷¹. FANCD2 a été localisé aux extrémités de ces UFBs^{168,171}. Des immunofluorescences ont démontré que FANCD2 ainsi que FANCI formaient des paires de foci aux niveaux des chromatides soeurs, aux mêmes loci sur les 2 chromatides¹⁷¹. Ces foci ont été nommés «foci soeurs» et seraient formés en phase S et persisteraient jusqu'en mitose. À noter que ces foci sont dépendants de l'intégrité du complexe I et de la monoubiquitination. Ils seraient toutefois indépendants des facteurs suivant la monoubiquitination tels que FANCN, FANCI, FANCD1¹⁷¹. Des tests ont rapporté que des perturbations dans la réplication induiraient des UFBs et donc des foci soeurs FANCD2, et ce nombre augmenterait suite à des traitements avec des agents tel que la MMC. Ces foci FANCD2 seraient localisés à forte majorité aux sites fragiles communs dans l'ADN¹⁷¹. En somme, les protéines FANCS seraient donc nécessaires à la prévention des complications associées à la réplication qui précèdent les cassures aux sites fragiles. Ces complications peuvent être l'incapacité de rétablir la fourche de réplication ou son effondrement. BLM, par ses fonctions hélicases, serait ensuite impliqué pour corriger l'emmêlement de l'ADN sans quoi cela pourrait induire la formation de UFBs en anaphase¹⁷¹.

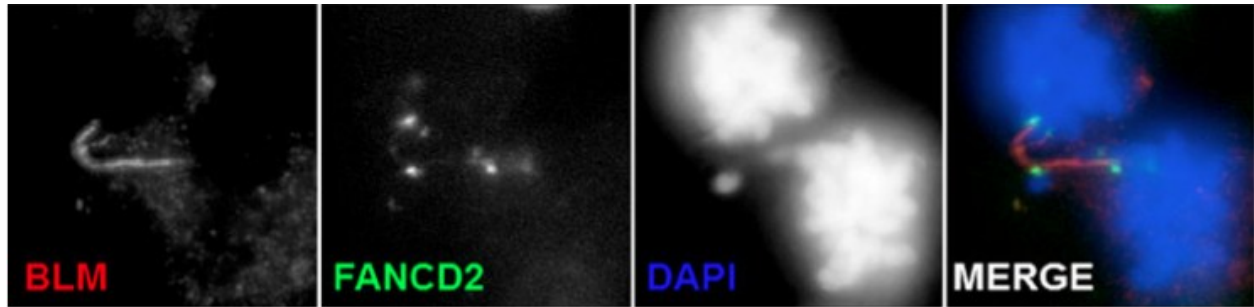


Figure 14. Pont d'ADN ultra fin : Connexion d'un micro noyau (MN) aux chromatides soeurs par des ponts d'ADN ultra fins (UFBs). Cellule en anaphase, micro-noyau et noyaux colorés au DAPI en bleu, reliés par des UFBs identifiés par BLM en rouge avec des foci FANCD2 localisés aux extrémités des UFBs en vert. *Tiré de Ying, Hickson et al. International Journal of Hematology, 2011.* © The Japanese Society of Hematology 2011.

4. PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE PRESENTEE : ANALYSE DU VARIANT

D'EPISSAGE *FANCC*Δ7

Dans le cadre d'une étude par gène candidat, il est primordial d'aborder tous les aspects du gène d'intérêt afin d'en dévoiler toutes les implications possibles. Une caractéristique importante des gènes à multi-exons est sans aucun doute l'épissage alternatif qui survient, comme mentionné dans les sections précédentes, chez jusqu'à 95% d'entre eux¹⁰⁴. Ce phénomène est souvent ignoré dans la littérature et il semblerait que l'on commence seulement à en comprendre les fondements et multiples implications, autant au niveau physiologique que pathologique. L'épissage alternatif est encore aujourd'hui un sujet en pleine émergence. L'équipe du Dre Durocher s'attardait majoritairement au séquençage de gènes de susceptibilité au cancer du sein et c'est en étudiant différents membres de la famille des FANCs qu'ils ont remarqué l'importante présence d'épissages alternatifs au sein de ces gènes, notamment chez *FANCA* et *FANCC*^{189,190}.

Une étude par *Zhang et al.* en 2010 démontra l'impact négatif d'un variant d'épissage de *FANCL*, celui de l'exclusion de l'exon 10 et 11¹³⁰. Ce transcrit alternatif renommé *FAVL*, lorsqu'en présence considérable, séquestre la protéine *FANCL* sauvage dans le cytoplasme, confère un avantage de croissance dans les lignées cancéreuses étudiées, cause de l'instabilité génétique *in vitro* en plus de promouvoir le développement de tumeurs chez un modèle murin de xénogreffe¹³⁰. Cet exemple démontre tout l'impact que peut avoir un seul événement d'épissage. Toutefois, pour être en mesure de qualifier ces deniers, d'abord faut-il 1) les identifier et 2) les caractériser. C'est pourquoi des études fondamentales sont nécessaires afin d'analyser les implications des variants puisque ces derniers ne sont pas que délétères pour la cellule.

FANCC fait partie des 8 protéines qui forment le complexe I, indispensable pour l'étape de monoubiquitination de *FANCD2/FANCI* (voir les sections 2.2.2 et 2.2.3). Il est donc d'intérêt de vérifier si les variants d'épissage de *FANCC* sont en mesure de compléter l'absence du gène sauvage dans son rôle d'acteur dans la voie FANC-BRCA au niveau de la réparation de l'ADN. Il est intéressant de se rappeler que parmi tous les gènes impliqués dans la voie FANC-BRCA, *FANCC* est le seul ayant été suggéré comme pouvant augmenter le risquer associé au

développement d'un cancer du sein¹⁸. De par ses multiples implications dans plusieurs voies métaboliques de la cellule dont celle de la réparation de l'ADN^{21,33,53,71,72,172-174}, *FANCC* se présente comme étant un acteur important de la maintenance de la cellule.

Grâce aux travaux de Charles Joly Beauparlant (étudiant ayant gradué à la maîtrise au sein de l'équipe du Dre Durocher), le labour du séquençage du gène *FANCC* était chose faite à mon arrivée dans l'équipe. Les variants d'épissage de *FANCC* ainsi que plusieurs polymorphismes étaient identifiés, le volet fonctionnel de ces recherches était donc prêt à être entamé. Donc, j'ai concentré mes efforts sur la caractérisation du variant d'épissage *FANCCΔ 7*, celui menant à l'exclusion de l'exon 7. Ce dernier a déjà été rapporté dans la littérature mais outre son observation, aucune étude n'est allée plus loin dans sa caractérisation^{135,136}. L'objectif principal de mon projet était donc de caractériser ce variant d'épissage de *FANCC* afin d'en étudier l'implication dans la voie de réparation de l'ADN FANC-BRCA. L'hypothèse de départ veut que le variant d'épissage *FANCCΔ 7* s'implique de façon différente vis à vis *FANCC* sauvage dans la réparation de l'ADN par la voie FANC-BRCA. Pour confirmer ou rejeter cette hypothèse, des tests fonctionnels précis ont été effectués de façon comparative au gène sauvage afin d'observer des ressemblances ou différences au niveau des deux isoformes («sauvage» wt et Δ7). L'objectif principal peut se diviser en 3 objectifs spécifiques :

1. Vérifier l'implication de SNPs identifiés comme étant responsables de la forme épissée obtenue.
2. Établir que la forme épissée est traduite.
3. Étudier l'impact de la forme *FANCC^Δ 7* dans la voie de réparation de l'ADN par des tests fonctionnels (monoubiquitination, tests de survies, etc.)

CHAPITRE 1

Characterization of sequence variations and splice variants of the FANCC gene and their impact on the FANC-BRCA DNA repair pathway

Simon Bélanger¹, Karine Plourde¹, Charles Joly Beauparlant¹, Christopher Pedneault St-Laurent¹, Yvan Labrie¹, Geneviève Ouellette¹ and Francine Durocher^{1**}

¹Cancer Genomics Laboratory, Oncology and Molecular Endocrinology Research Centre, Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Laval University, Québec, G1V 4G2, Canada;

²Canada Research Chair in Oncogenetics

****Corresponding author:**

Dr Francine Durocher

Cancer Genomics Laboratory, Oncology and Molecular Endocrinology Research Centre, Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Laval University

2705 Laurier Boulevard, T2-53

Québec City, Québec,

Canada, G1V 4G2

Tel: (418)-654-2296

Fax: (418)-654-2278

e.mail: francine.durocher@crchul.ulaval.ca

Keywords: Breast cancer susceptibility, *FANCC* variants, haplotypes, alternative splicing event, FANC-BRCA DNA repair pathway.

To be submitted to the Journal of Clinical Investigation (JCI),

RESUME

OBJECTIF: Différents variants d'épissage alternatif du gène *FANCC* ont été identifiés lors d'une étude de gènes candidats associés à un risque accru au cancer du sein. L'intégrité des gènes de la famille *FANC* est essentielle au bon fonctionnement de la réparation des dommages à l'ADN. Nous avons étudié l'impact du transcrite alternatif *FANCCΔ7* sur le processus de réparation des bris de l'ADN et sa localisation cellulaire. **MÉTHODES:** Le séquençage de l'ADN complémentaire d'individus non-*BRCA1/2* a permis d'identifier des variants d'épissage dont *FANCCΔ7*. La technique minigène a permis d'étudier l'impact de variants génomiques sur l'épissage de l'exon 7 et l'expression de ce variant a été analysée par qRT-PCR dans des lignées de cancer du sein. La cytométrie de flux a été utilisée pour évaluer la survie cellulaire alors que la localisation cellulaire et le test de monoubiquitination ont été effectués dans des cellules déficientes. **RÉSULTATS:** Le séquençage a permis d'identifier 4 événements d'épissage alternatif dont un mène à l'exclusion de l'exon 7. Ce transcrite correspondant à *FANCCΔ7* est moins présent que *FANCC* dans toutes les lignées de cancer du sein analysées. L'analyse des fractions ribosomales nous a permis de confirmer la traduction de *FANCCΔ7* en une protéine fonctionnelle. La protéine *FANCCΔ7* semble plus séquestrée dans le cytoplasme des cellules HEK293T transfectées suite à un traitement à la mitomycine C (MMC) comparé à *FANCC* qui migre majoritairement au noyau. Par cytométrie de flux, il a été démontré que les cellules déficientes infectées avec *FANCCΔ7* sont bloquées en G2/M en présence de MMC alors que les *FANCC* sont ralenties dans la phase S. Finalement, *FANCCΔ7* est incapable de mener à la monoubiquitination de *FANCD2* contrairement à *FANCC*. **CONCLUSION:** Cette étude a permis de déterminer que le variant d'épissage *FANCCΔ7* présent dans toutes les lignées analysées ne permettrait pas à lui seul la monoubiquitination de *FANCD2* et de permettre la réparation des pontages interbrins induit par la MMC. Il reste à déterminer si cette perte de fonction est le résultat de la séquestration de la protéine variante dans le cytoplasme ou d'une diminution de l'interaction avec les autres protéines du complexe fonctionnel.

INTRODUCTION

Pathogenic mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1* and *PALB2* have been associated with an increased breast cancer risk and, together, are found in less than 25% of breast cancer families showing a clear pattern of inheritance⁵. It is thus clear that other susceptibility alleles remain to be identified to explain the increase in risk in the remnant high-risk families. As the number and characteristics of such alleles are undetermined, a focused candidate gene approach based on genes closely interacting with the known susceptibility genes (in particular *BRCA1* and *BRCA2*) constitutes a study design of choice to identify rare moderate-penetrance susceptibility alleles.

Fanconi anemia (FA) gene family comprises 15 distinct complementation groups which have been described by cell fusion, cell transduction studies or protein complex purification (FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M, -N, -O, -P)⁵⁻²⁸, the complementation group of FANCO is however still under debate since there is, to date, only one family associated to this group in which no hematological abnormalities or cancer were diagnosed^{26,29}. Each FA cell group presents a defect in a distinct gene which can be characterized by their sensitivity to interstrand cross-linking (ICL) agents to determine if two distinct cell lines belong to the same group. It is noteworthy that of the genes recently associated with an increased susceptibility to breast cancer, four are FA genes: *FANCD1/BRCA2*, *FANCI/BACH1/BRIP1*, *FANCN/PALB2* and *FANCO/RAD51C*^{26,30-34}. Moreover, a recent study conducted with 944 family members being part of the International Fanconi Anemia Registry revealed an increased risk of breast cancer among grandmothers carriers of *FANCC* mutations³⁵.

FA proteins not only interact with each other but also work in a network of processes implicated in the maintenance of genome integrity during DNA replication and following some types of DNA damage. Following DNA damage by ionizing radiations (IR) or ICL agents, FANCC protein in association with FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L, -M, FAAP24, and FAAP100 forms a complex that acts as a signaling part to target and regulate FANCD2 accumulation to nuclear foci by monoubiquitination on Lys561³⁶⁻³⁹. Therefore activated FANCD2 associates with chromatin and co-localizes in DNA damage-induced S-phase foci with DNA repair response proteins such as BRCA1, FANCD1/BRCA2, FANCI, RAD51, PCNA and NBS1²⁵. In response to ICL damage, this FA/BRCA network activates and coordinates the needed DNA repair

mechanisms namely, homologous recombination (HR), nucleotide excision repair (NER) and translesion DNA synthesis (TLS) repair pathways²⁵.

FANCC is a crucial component in the upstream FA nuclear core complex. FANCC-deficient cells show a disabled S-phase checkpoint response specific to cross-link damage, and also likely have a defect in an ATR-dependent checkpoint, as demonstrated using HSC536N cells⁴⁰. FANCC (localized in both the cytoplasm and nucleus) is implicated in several other cytoplasmic functions such as JAK/STAT and apoptotic signaling^{4,41-44}. Although FANCC does not show interactions with FANCD1/BRCA2, many proteins have been shown to interact with FANCC. These include transcription regulators (e.g. HOXA10), heat shock proteins (e.g. HSP90), chromatin-related proteins (e.g. Zint-1), the cell cycle protein Cdc2, the structural protein Alpha spectrin, cytokin-related proteins (e.g. Stat1), proteins involved in oxidative metabolism (e.g. GSTP1) as well as transporters such as SNX3 and Delta adaptin⁴⁵. Moreover FA-C cells display selective inhibition of long replicons which represent replication fork elongation and joining in contrast to short replicons arising from late-firing origins, a feature specific to ICL lesions⁴⁶. Moreover, FANCC has been demonstrated to regulate the expression of the DNA Damage Checkpoint protein 1 (MDC1), which is considered as a key checkpoint mediator with BRCA1, 53BP1, CHK2, and NBS1⁴⁷.

Cytogenetic, comparative genomic hybridization and flow-cytometric analyses have revealed a variety of chromosomal aberrations or losses at chr.9q22 in different malignancies including breast cancer⁴⁸⁻⁵¹. This relatively broad region (8.71 Mb) includes several putative tumor suppressor genes such as *XPA*, *PHF2*, *FANCC* and *PTCH1*. A significant correlation between losses of chr.9q22.3 with lymph node metastasis in breast cancer is also reported⁵². Particularly for *FANCC* gene, both deletion and methylation showed a significant association in two subgroups of breast cancer ($P < 0.002$) and Q-PCR analysis revealed also a reduced *FANCC* mRNA expression⁵³. The association noted between *FANCC* alterations and adverse patient survival in either age group suggests it as a prognostic marker⁵³.

Thus, based on the close relation of *FANCC* with known breast cancer susceptibility genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1/FANCI*, *PALB2/FANCD1* and *FANCD2/RAD51C*) in DNA repair pathways and studies suggesting a possible involvement of *FANCC* alterations in cancer susceptibility, we undertook the analysis of *FANCC* entire coding sequence, intron/exon junctions as well as the proximal promoter region by re-sequencing a series of 96 breast cancer

cases selected from high-risk families from the French Canadian population and 96 unrelated healthy controls of the same origin for sequence variations that could possibly modulate breast cancer risk.

In addition, alternative splicing was also evaluated in the *FANCC* gene. In fact, the FANC gene family seems to be prone to alternative splicing for many of its members have alternative transcripts (ex: *FANCA*¹¹², *FANCC*^{54,55,113}, *FANCL*⁵⁶, *FANCD1/BRCA2*⁵⁷, *FANCF*⁵⁸⁻⁶⁰, *FANCN*⁶¹). In this study, we focused on *FANCC*Δ7, which involves the exclusion of exon 7 of the *FANCC* gene. Interestingly, our work reveals the inefficiency of this isoform to complement the absence of *FANCC* wildtype in the protection against ICL in the FANC-BRCA pathway. Its different localization pattern in the cell may suggest other implications than the ones in the nucleus where DNA repair occurs. Immunofluorescences reveal the co-localization of *FANCC*wildtype but also *FANCC*Δ7 with BRCA1 in the centrosomes of cells.

MATERIALS AND METHODS

Ascertainment of families and genomic DNA extraction

All 96 non-*BRCA1/2* (BRCAX) individuals from high-risk French Canadian breast and ovarian cancer families participating in this study were originally part of a larger interdisciplinary program termed INHERIT BRCA^{62,63}. All participants were at least 18 years of age, mentally capable and had to sign an informed consent. Ethics committees reviewed the research project at the 7 participating institutions from which the patients were referred. The details regarding selection criteria of the breast cancer cases as well as the experimental and clinical procedures have been described previously⁶⁴⁻⁶⁶. Lymphocytes from breast cancer individuals were isolated and immortalized as previously described^{65,66} and genomic DNA from BRCAX individuals was isolated using the QIAamp DNA Blood kit (Qiagen, Santa Clara, CA). Genomic DNA from peripheral blood of control individuals was isolated by conventional methods, either phenol-chloroform or using Genra kits (Minneapolis, MN, USA).

PCR amplification and direct sequencing

The *FANCC* gene (NM_000136.2) is composed of 15 exons that cover 210 kb of genomic DNA. PCR amplification of the coding sequences (the exon 1 is non-coding and has not been analyzed), as well as the flanking intronic regions, was performed in breast cancer cases (primers listed in Supplemental Table 1A). The PCR products were then sequenced with an ABI3730XL automated sequencer using the Big Dye 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) following the manufacturer's instructions. Sequence analyses were performed using Staden preGAP4 and GAP4 programs (<http://staden.sourceforge.net/>). The presence and frequency of variants identified in the case dataset was confirmed in the healthy individuals control group. Spliced isoform amplification of *FANCCins4A* and *FANCCΔ7* was performed on cDNA from BRCAX individuals and human cell lines using the following primers: *FANCCins4A*, Forward primer: 5'-ccacccgatttaatgtgtgcc-3' and specific Reverse primer: 5'-aggagacttgtgtggctgct-3'; *FANCCΔ7*, Forward primer: 5'-ccacccgatttaatgtgtgcc-3' and specific Reverse primer: 5'-ggagagaaatcttctccgcc-3'.

Variant characterization

Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), allelic frequency difference between both series, and test for breast cancer association (Odds Ratio with 95% confidence interval) were evaluated by two-sided Chi Square test with 1 degree of freedom using a web-based software program located at: <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>. Protein and nucleotide sequence alignments with other species were performed using data extracted from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and UCSC databases.

LD block and haplotype estimation analysis

The Haploview software was used to determine linkage disequilibrium (LD) block using all HAPMAP genotyping data covering the *FANCC* gene. Global haplotype estimations were determined using the PHASE 2.1.1 software (41), which estimates haplotype and their frequencies with a Bayesian-based algorithm and then uses a permutation test to determine a global value of significance. The program was initially run 5 times with 1000 permutations for both datasets combined. The p-value for case-control comparisons demonstrating a potential significant difference in allelic distribution between breast cancer cases and unaffected individuals was further reduced by running the program with 100 000 permutations in order to verify the accuracy of haplotype estimations.

RNA isolation from cell lines and normal tissue samples

Total RNA was extracted using TRI Reagent[®] (Molecular Research Center inc, Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions as previously described⁶⁷ from 1) EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines from the 96 cases used for our mutation screening; 2) nine cancer cell lines obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) including, two estrogen receptor (ER)-negative breast cancer cell lines (BT-20 and MDA-MB-231), four ER+ breast cancer cell lines (BT-474, CAMA-1, MCF-7 and ZR75-1) and three prostate cancer cell lines (22RV1, LNCaP, PC3); and 3) the HaCat human skin keratinocyte cell line which was generously supplied by Dr. N.E. Fusenig (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany)^{68,69}. Total RNA samples from normal tissues were purchased directly either from Stratagene (breast and ovary) (La Jolla, CA, USA), BioChain Institute Inc. (leukocyte) (Hayward, CA, USA), or Clontech (all other normal tissue samples) (Palo Alto, CA, USA). RNA

samples were then processed as previously described⁶⁷. Thereafter, reverse transcription of 2.5 µg of standardized RNA samples was performed using 250 ng random hexamers and 200 U of SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the supplier's protocol.

Cell culture

All cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide. HEK293T cells were grown in Wisent-DMEM with 4.5g/L glucose, supplemented with L-glutamine and sodium pyruvate, 10% fetal bovin serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. The HSC536 cells were grown in Wisent-RPMI 1640, with L-glutamine, bicarbonate and phenol red. Medium was supplemented with 15% FBS and 1% penicillin/streptomycin. PD331 cells were grown in Wisent-MEM (Eagle) Alpha Modification (AMEM) with earl salt, L-glutamine, deoxyribonucleic acid, phenol red and supplemented with 15% FBS and 1% penicillin/streptomycin. T47D cells were grown in Wisent-RPMI without phenol red supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, Hepes, sodium bicarbonate and E2. HSC536 and PD331 cell lines were purchased from Coriell Institute. All other cell lines are routinely cultured in our laboratory and the conditions have been optimized as recommended by the American Type Culture Collection (ATCC).

Retroviral production: HEK293T G/P cells (5×10^6) were plated in 10 cm petri dishes and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 8 hours. The pMSCVpuromycin (with or without the cDNA of interest), G/P, and VSVG vectors were transfected using ExGen500 (Fermentas, Fisher Scientific Limited, Nepean, ON) and then incubated overnight in the same conditions. The day after, the medium was replaced with fresh DMEM, and cells were incubated for 48 hours prior the virus were harvested through filtration, aliquoted, and kept at -80°C.

Infection and treatment: Cells were grown to a 40% confluency, medium was taken out and retrovirus (1.5 to 2 ml previously aliquoted in the virus production) was added along with culture medium and polybrene (Sigma-Aldrich) at a concentration of 10µg/ml. Cells were resuspended at 1×10^6 cells per ml of virus. The next day, culture medium was changed and the antibiotic was added. The selection of cells was operated with puromycin (Sigma-Aldrich) (0.8µg/ml) while

cells were then kept in culture at concentrations of 0.5 µg/ml. Given that the concentration of mitomycin C (MMC) differed depending of the experiment, concentration values are indicated in each respective section.

Vector preparation and Minigene assays

The genomic regions containing exons 6 to 8 of *FANCC* gene as well as large flanking intronic sequences were PCR-amplified from BRCAX genomic DNA using primers containing appropriate restriction sites (BamHI/EcoRI/XhoI/XbaI), and then subcloned into the pcDNA3 vector (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON). Given that *FANCC* gene has very long intronic sequences, approximately 250 bp of flanking intronic nucleotides (which contains the major splicing elements necessary for regulation) were included in the amplicon. The total insert of 2469 nucleotides was then confirmed by sequencing and compared with reference sequence (UCSC genome browser).

Sequence variations present in the region of interest were then identified through NCBI and UCSC databases while one variation located in exon 8 was observed in our cohort of French Canadian BRCAX breast cancer families. Directed mutagenesis was performed using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Mississauga, ON) following manufacturer's recommendations. Primers are described in Supplemental Table 1B.

For minigene construct transfection, HEK293T cells were plated at 350 000 cells in 6-wells culture plates (BD Biosciences, Mississauga, ON). 48 hours after plating, cultures were transfected with 3 µg of each minigene constructs. Cells were harvested 24 hours later for RNA extraction. Cells were rinsed with cold phosphate-buffered (PBS) and then suspended in Tri-Reagent.

RNA extraction and qRT-PCR

RNA was extracted from Tri-Reagent following manufacturer's protocol (Ambion, Life Technoloies, Burlington, ON). The RNA extracts were dosed by spectrophotometry (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) and the quality of the RNA samples was verified using a Bioanalyser (Agilent Technologies). Specific primers for *FANCC*Δ7 and WT mRNA forms were designed with the GeneTools (Biotools Inc., Madrid, Spain) software. Complementary DNA (cDNA) was

obtained by reverse transcription using a total of 5 µg of RNA in a 50 µl final volume reaction containing 200 U of Superscript III Rnase H-RT (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON), 50 ng of random hexamers, 300 ng oligo-dT₁₈, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.5 mM dNTPs and 40 U of Protector RNase inhibitor (Roche, Laval, Qc, CA). The reaction was incubated at 25°C for 10 minutes and 50°C for an hour, and then treated with 1 µg of RNase A at 37°C for 30 minutes followed by a PCR purification (Qiagen PCR purification kit, Qiagen, Toronto, ON). The resulting cDNA was eluted in 50 µl of RNase-free water.

For qRT-PCR, 20 ng of cDNA was quantified with the LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Laval, Qc, CA). LightCycler 480 SYBR Green I Master was used according to the manufacturer's recommendations. The PCR conditions were as followed: 45 cycles: 95°C/10 sec, 62°C/10 sec, 72°C/14 sec and a reading at 74°C/5 sec. The software LightCycler 480 v1.5 was used to determine the Cp (Crossing point) by the second derivative method described by Luu-The and coll.⁷⁰. A melting curve analysis was performed to confirm the specificity of the amplified products.

Fluorescence microscopy and immunofluorescence

HEK293T cells were transfected with FANCCwt- or FANCCΔ7-EGFP vectors and then treated (or not) with MMC. Cells (3.5×10^5 cells per well) were seeded on microscopic slides coated with L-lysine. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (10 minutes at room temperature (RT)). Unspecific binding sites were blocked with 1% BSA and 0,02% sodium azide for 1 hour at RT and cells were rinsed twice with PBS and then incubated for 15 min with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Cells on cover slides were rinsed again twice with PBS and then mounted on slides with mounting medium (Sigma-Aldrich). Pictures were taken using a Leica DM5000B microscope with the DFC350x camera with the 40x lens, and imported with Photoshop Professional 5 (Adobe Systems Inc., Seattle, WA).

For immunofluorescence studies, PD331 cells (described above) infected with FANCCwt-HA and FANCCΔ7-HA were washed, fixed and then permeabilized with PBS-T (0,5% (vol/vol) Triton X-100) for 5 min at RT. Following blocking at RT and washings, slides were incubated with a primary antibody against BRCA1 (monoclonal Ab 17F8, GeneTex, 1: 500) then with a secondary antibody anti-mouse Alexa Fluor 568 goat, (Invitrogen, 1:600) as well as with another

secondary antibody to visualize HA tagged protein (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, 1:500). Coverslips were mounted on microscopic slides with fluoromount G (Electron Microscopic Sciences, Hatfield, PA).

Confocal laser scanning microscopy was performed with a BX-61 microscope equipped with the Fluoview SV500 imaging software 4.3 (Olympus America Inc, Melville, NY). The BRCA1-Fluor 568 labelled protein was excited at 603 nm, the FANCCwt-HA-Fluor 488 and FANCC Δ 7-HA-Fluor 488 labelled proteins were excited at 519 nm using an argon-He laser (Melles Griot Laser Group [Carlsbad, CA]). 0.1 μ m confocal z-series were acquired for each observation area and filtered by three-frame Kalman low-speed scans. The complete methodology used is fully described in Rivest S *et al.* 2006⁷¹.

Survival assays

HSC536 cells were selected for approximately 2 months with puromycin. An average of 300 000 HSC536 cells per 10 ml were grown in RPMI medium containing 15% FBS in T-25 flasks. To perform the test, cells were first centrifuged, counted and then diluted to 1.5×10^4 cells/100 μ l/well. The 100 μ l contained the adjusted concentrations of crosslinking agent. The readings were performed after 1, 2, 3, 4, 5 and seven days (Figure 4 and Supplemental Figure 4. Alamar Blue assays (Invitrogen, Calrsbad CA) were performed according to the manufacturer's instructions. 10 μ l of AB was added to each well and after 4 hours the plate was analyzed using an Infinite M1000 (Tecan Systems inc., San Jose, CA) microplate reader using the Megellan program (Tecan). The negative background was subtracted using the measurements obtained from the negative controls (medium and selective agents alone).

Western Blotting and immunoprecipitation

Following culture of HSC536 cell, approximately 40×10^6 cells were used for protein extraction using standard protocol. Cell pellets were resuspended with RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer) buffer and incubated for 30 minutes at 4°C and cell debris were removed by centrifugation. Protein concentrations were measured with the Bradford protein assay. HA-tagged FANCC, FANCC Δ 7 or FANCD2 protein samples were migrated on a 8% acrylamide gel, using the Mini-Protean Tetra Cell kit (BIO-RAD, Life Science Research, Mississauga, ON) and then transferred onto an Amersham Hybond-ECL nitrocellulose membrane (GE HealthCare,

Mississauga, ON). After blocking with 5% milk/PBS, the blot was incubated with the appropriate primary (overnight rocking at 4°C) and secondary antibody (1 hour rocking at RT) diluted in 5% milk/PBS. The following antibodies and dilutions were used: rabbit polyclonal IgG anti-HA SC-805 (Santa Cruz, 1:1000), ECL anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked antibody (GE HealthCare, 1:10 000), rabbit anti-FANCC (FA research Fund, 1:500), rabbit anti-FAND2 (Novus Biologicals, 1:10 000), anti-FANCE (FA research Fund, 1: 500), rabbit anti-Calnexin (Enzo (Life Sciences), 1:1 000). For confirmation of the viral infection of the PD331 and HSC536 cells, Pierce HA Tag IP/Co-IP kit (Fisher Scientific Limited, Nepean, ON) was used following manufacturer's recommendations.

Flow cytometry

For cell cycle analysis, three different MMC concentrations were used at three time points. HSC536 cells (350 000/ml) were infected with the empty virus, the pMSCVpuromycin vector containing *FANCC**wt* or *FANCC* Δ 7 cDNA were grown in media containing 0 ng/ml, 100nM (33 ng/ml), 50ng/ml or 100ng/ml of MMC. The cells were harvested after 12, 24, 36 and 48 hours and then washed with RT PBS (1X), centrifuged (1500 rpm for 5 min) and washed again in cold PBS. Cells were then fixed by adding 4.5 ml of ice cold 70% ethanol to the cell pellet and placed at -20°C overnight. Once fixed, cells were washed, centrifuged at 1500 rpm and 400 μ l of fresh DNA staining solution was added (PBS 1x, [1 μ g/ml] DAPI, [0,2mg/ml] DNase free RNase). Samples were incubated 15 minutes in the dark before taking measurements. The stained cells were sorted on a BD SORP LSR II FACS with a 20mW Coherent® Solid State UV laser 355nm w/z PMT with a BP 450/50 filter and data was analyzed using the DIVA (BD Biosciences) and FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR) programs.

Ribosomal fractions

T47D cells (approximately 4×10^7 cells per fraction) were grown and then collected at 70% confluency. Cycloheximide (50 μ g/ml) was added to the cell culture, which were incubated for 30 minutes and then rinsed with phosphate-buffered (PBS) - cycloheximide (CHX 100 μ g/ml) and trypsin. Cells were resuspended in PBS-cycloheximide (100 μ g/ml) at a concentration of 10^7 cells/ml. The total of 12 ml of cells was then split into 3 samples (- ETDA, + ETDA, protein extraction sample).

Cells were centrifuged at 1 600 rpm for 5 minutes and then resuspended in lysis buffer and NP40 (0,5%) was then added. After 10 min on ice, cells were centrifuged at 750 g (4°C) and the supernatant was harvested, kept on ice and subsequently used in the sucrose gradient. Sucrose gradients were prepared with gradient Maker (CBS Scientific Compagny inc, model GM-100). Each fraction counts 3 samples, including the one adjusted at 20mM EDTA (+ETDA sample). Samples were separated on a 15%-45% sucrose gradient in lysis buffer (without NP40), centrifuged 2 hours 15 minutes at 36 000 rpm at 4°C using a SW40Ti rotor. Gradients were fractionated using the Programmable Density Gradient System (Teledyne Isco incorporated, Lincoln, NE) from the top and measured at A260 to determine the polysome profile. Fractions were then selected for RNA extraction. RNA extraction and qRT-PCR were then performed as described above.

RESULTS

Sequence variations in the FANCC gene.

Direct sequencing of *FANCC* entire coding region and adjacent intronic sequences was performed on individuals from 96 distinct breast and ovarian cancer families (one individual per family) from the French Canadian population. Six variants were identified (Table 1), of which two are new nucleotide variations located in intron 1 (c.-78-73C/T) and 3'-UTR sequence of exon 15 (c.1677+7C/T). Variants identified in the case dataset were also genotyped in 96 unrelated healthy individuals from the same population. All variants genotyped were in HWE. As represented in Table 1, out of the 6 variations, one was located in the coding sequence of exon 8 (c.816G/A), three are found in intronic regions (c.-78-73C/T, c.896+81G/A and c.1155-38T/C) and the two remaining variations are located in untranslated sequences (c.-29A/C; exon 2 and c.1677+7C/T; exon 15). Among the identified variants, two were frequent with a MAF greater than 5%, while the remaining 4 were rare variations. Three nucleotide changes were observed only in the cases series and not in unaffected individuals (Table 1). When genotype frequencies of all variants were compared between both series, the c.896+81G/A intronic variation showed a statistically significant association with breast cancer (OR 2.442, 95% CI: 1.088-5.482; p=0.02). Moreover as displayed in Supplemental Table 2, this nucleotide is conserved in 23 out of 32 species analyzed which could suggest that the high conservation of this particular intronic nucleotide could reflect a certain level of functionality.

As shown in Table 2A and 2B, the only variant located in the coding sequence (c.816G/A) results in the amino acid change Glu273Lys. The Glu residue is almost completely conserved in distant species (apart from Ala in *Anolis carolinensis*), suggesting that this amino acid is under strong functional constraint or may have a specific role on protein conformation (Table 2A). This amino acid Glu273 is located within a region which is known to bind GRP74 and HSP70 proteins (Supplemental Figure 1A). The Glu273Lys change is predicted to be not tolerated by SIFT, and evaluated as probably damaging by the PolyPhen program (Table 2B).

Linkage disequilibrium (LD) block and haplotype determination in FANCC gene.

LD block analyses were performed using HapMap genotyping data (total of 115 SNPs) from the CEPH/CEU cohort using Haploview software. Based on a solid spine of LD algorithm, five LD

blocks of 37, 40, 9, 27 and 98 kb were identified (Supplemental Figure 2). It should be noted that 3 variants (SNPs 4, 5 and 6) identified in the French Canadian cohort are present in the first LD block of 37 kb, with SNP 3 located at the proximity of the 3' end of LD block 1, while variants (SNPs 1 and 2) located on the 5'-part of the gene appear in the largest LD block of 98 kb.

Haplotype phasing of *FANCC* using the PHASE program with all 6 variants indicated that 8 haplotypes are present with an estimated frequency ranging from 0.3 to 46.3% (Table 3). Analysis of the global haplotype distribution between both datasets with 1000 permutations leads to a significant difference with a p-value of 0.003. Based on individual haplotype analysis, only the haplotype H1 displays a significant difference between both series, H1 being more observed in control individuals than breast cancer cases (p-value=0.031). However, as shown in Table 5, four rare haplotypes were found exclusively in the case series namely, H2, H5, H6 and H7.

Closer examination of the haplotypes being exclusively expressed in breast cancer cases and showing a frequency above 1%, revealed the presence of SNP3, SNP4 and SNP6 in haplotypes H6, H4, H5 and H2, respectively. It should be noted that SNP4 represents the only variant showing a significant difference on allele frequency between both datasets.

In an attempt to further evaluate the importance of each variant likely responsible for the significant difference in global haplotype distribution between both series, we performed a PHASE analysis using sliding windows with 1000 permutations. For the analysis leading to a low p-value of 0.001, an additional analysis was performed with 100 000 permutations. All analyses of sliding windows performed with 5, 4 or 3 variants result in a significant difference of global haplotype distribution between both series ranging from 0.001 to 0.006 while an additional analysis with 100 000 permutations for three of them lead to p-values of 0.00033, 0.00043 and 0.00045 (Table 3). This suggests that the significance of haplotype distribution comes from the sequence variations located in the 3'-part of the *FANCC* gene. Particularly, SNP3, SNP4 and SNP6 seem to contribute to this effect.

Identification of FANCC alternative splice forms.

Analysis of *FANCC* cDNA performed on breast cancer cases highlighted the presence of two distinct alternative splicing events (ASEs) (Supplemental Figure 1B). The first alternative spliced isoform, designated *FANCCins4A*, involved the insertion of 145 bp of intronic sequence located between exons 4 and 5 and is expected to result in a premature termination of *FANCC* open

reading frame 13 amino acids downstream of exon 5 (Supplemental Figure 1C). The alternative spliced form identified as *FANCCΔ7*, involves the skipping of exon 7 which is expected to produce an in-frame deletion of 55 amino acids in the region of the FANCC protein involved in the interaction with HSP70 and GRP74 (Supplemental Figure 1A and 1D), while these domains of interaction in addition to the one targeted by the CDC2 protein located in the 3'-end of the wild type protein, are almost completely abolished in *FANCCins4A* protein (Supplemental Figure 1C). However, none of the variants identified in our individuals seem potentially involved in these ASEs following *in silico* analyses (data not shown).

Specific semi-quantitative PCR amplification of both ASEs performed in human cell lines are displayed in Supplemental Figure 1C and 1D. While *FANCCΔ7* mRNA seems to be significantly expressed in all leukemia, breast and ovarian cell lines, *FANCCins4A* mRNA analysis displayed an obvious variability of expression particularly in breast cancer cell lines (Supplemental Figure 1C), while this mRNA is not detectable in the K562 cell line.

Sequence variants modulate the ratio of FANCCΔ7 spliced RNA and FANCCwt RNA

In order to evaluate the involvement of different genomic variants in the expression of *FANCCΔ7*, a minigene assay was designed to assess those effects. The variants selected come either from our breast cancer individuals, the literature, or the NCBI and UCSC databanks. The variant c.553 C>T was used as a positive control as this variation has previously been reported as an exon skipping causing mutation⁷², while the c.816 G>A variant was identified in our high-risk breast cancer families. As described in Figure 1, two variants namely c.568 C>T and c.553 C>T, increased significantly the exclusion of exon 7 by 74% and 85%, respectively. On the other hand, two variants located at the end of exon 6 (c.530C>T) and exon 8 (c.816G>A) showed the opposite effect by increasing the inclusion of exon 7 by 33% and 39%, respectively. The other variations tested, mostly located in intronic regions, did not affect significantly the regulation of inclusion/exclusion of exon 7 within mRNA transcripts.

Nonsense-mediated decay (NMD) verification and polysomes analysis

To confirm the *in vivo* translation of the *FANCCΔ7* mRNA transcript, the action of NMD was first tested by treating (or not) several BRCA1 cell lines with puromycin, an agent known to inhibit NMD. We obtained clear evidence that this alternative mRNA form is not subject to

NMD (data not shown), as experiments performed on mRNA extracted from puromycin-treated cells did not show any modulation of the spliced form relative quantities. The polysomes analysis determines whether a given mRNA form is recruited by the polyribosomes, which drive the translation of mRNAs into functional proteins. Therefore, as illustrated in Figure 2, the ribosomal fractions demonstrate that the *FANCCΔ7* mRNA transcript, being strongly detected in late fractions (peak at fraction 11), is associated with multiple ribosomes (polysomes), therefore confirming its efficient translation. Indeed, a transcript subjected to NMD is associated with monosomes (represented by the first fractions), and this mostly results in mRNA degradation⁷³. As control, each fraction was duplicated and treated with 20mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). EDTA is a chelating agent known to dissociate mRNA from ribosomes. Therefore the absence of the *FANCCΔ7* mRNA transcript in EDTA-treated fractions confirms that the mRNAs were indeed associated with translation complexes. It also plays the role of a negative control for spectrophotometer measures. Thereafter, to further evaluate the effect of the expression of the *FANCCΔ7* protein on DNA repair mechanisms, several DNA repair-related assays such as monoubiquitination, cell localization and survival as well as cell cycle analyses have been performed.

The variant *FANCCΔ7* does not allow the monoubiquitination to take place

As seen in Figure 3, the transduction of HSC536 cells with retroviral vector pMSCV containing the *FANCC* wild type or $\Delta 7$ cDNAs clearly indicates that following a MMC treatment for 12 hours, only cells complemented with the plasmid pMSCVpuromycin-*FANCC*wt have the capacity to monoubiquitinate the *FANCD2* protein. Neither in the cells infected with the variant $\Delta 7$ or the empty virus could we observe the long form (ubiquitinated) of the *FANCD2* protein.

HSC536 cells complemented with *FANCCΔ7* variant harbour deficient cell cycle

Being a hallmark of the FA disease, cell cycle analysis is a standard method used to determine whether cells harbour the FA phenotype^{74,75}. As displayed in Figure 4A, in absence of treatment with the DNA crosslinking agent MMC, all four HSC536 (*FANCC*-deficient) cell samples not transfected (sample identified as HSC536) or transfected with *FANCC*wt, *FANCCΔ7* or empty vector (not shown) showed the same cell cycle profile. However, following 24 hours of MMC treatment, a significant G2/M accumulation can be observed in all samples except for the one

infected with the FANCCwt cDNA, in which we can observe at the highest MMC dose (100ng/ml) an accumulation in the S phase (up to 61.5% in the FANCCwt sample against 20.3% and 27.3% for the HSC536 and $\Delta 7$ samples, respectively). It should be noted that this delayed S phase is not seen in other samples, which rather seem to harbour an accumulation of cells in the G2/M phase. This delay in the S phase was reproduced in another experiment, which confirms this interesting observation (data not shown). The delayed S phase observed after 24 hours is progressing further to the G2/M phase as seen in the 36 hours sample (Supplemental Figure 3). The other samples including the HSC536/FANCC $\Delta 7$ sample exhibit the same exact profile at 36 hours as the one seen after 24 hours of treatment. As shown in Supplemental Figure 3, at 36 hours, the major observation is the pronounced proportion of cells in the G2/M phase in all samples, independently of the MMC treatment. Worth noticing is the fact that only the HSC536/FANCCwt sample showed a regular progression in its cell cycle throughout this experiment.

FANCC $\Delta 7$ fails to rescue the survival advantage of the wild type isoform under mitomycin C treatments

In order to assess the ability of the splicing variant to support high fidelity DNA repair, cell survival assays were performed. HSC536 cells were transduced with empty pMSCV retroviral vector or vector containing the *FANCCwt* cDNA or the *FANCC $\Delta 7$* cDNA. HSC536 cells, previously selected with puromycin for two months, were treated with 6 different doses of MMC for seven days. As shown in Figure 4B, only the HSC536 cells infected with the *FANCCwt* cDNA demonstrated a clear advantage of cell survival when compared with the cells infected with the empty vector or FANCC $\Delta 7$ cDNA. After five days of treatment with 10nM MMC, no significant differences in the FANCCwt sample contrasting with others where less than 50% of cells survived at this point. These data suggest that FANCC $\Delta 7$ is unable to support cell survival and viability, which is observed following transduction of *FANCCwt* cDNA. The whole experiment is shown in Supplemental Figure 4 where, after only 48 hours with 10nM and 30nM of MMC treatment, a clear advantage is seen in the sample infected with *FANCCwt*, which is in accordance with the literature⁷⁶.

The FANCCΔ7 and FANCCwt proteins localized differently following MMC treatment in HEK293T

Given that the protein FANCC is mainly found in the cytoplasm, but also in the nucleus under normal conditions, it was therefore interesting to compare the localization profile of the wildtype FANCC and FANCCΔ7 variant in normal conditions and under MMC treatment. HEK293T cells transfected with either FANCCwt-EGFP or FANCCΔ7-EGFP were treated (or not) with MMC for a period of 12 hours. In the absence of MMC treatment, both the wildtype and variant proteins are present mostly in the cytoplasm of cells. However, following a 12 hours MMC treatment, the recruitment of the wildtype FANCC-EGFP protein is strongly enhanced in the nucleus of the cell, while the variant FANCCΔ7-EGFP protein clearly remains in the cytoplasm. This cytoplasmic localization of the variant is similarly observed for both doses of MMC treatments (Figure 5 and Supplemental Figure 5).

FANCC and FANCCΔ7 seem to localize to centrosomes of cells

Throughout the fluorescence microscopy and immunofluorescence experiments, often did we observe a notable localization of FANCCwt as well as FANCCΔ7 to a particular place near the nucleus of many cells (HEK293T and PD331). We noted these observations first at a magnitude of 40x (Supplemental Figure 5). This prompted us to hypothesize that this localization would in fact be the centrosomes of the cells. To confirm our observation, we operated immunofluorescences on BRCA1 (known to localize in these structures) as well as on FANCCwt-HA and FANCCΔ7-HA, and we confirmed their co-localization through confocal microscopy (Figure 5B with FANCCwt-HA).

DISCUSSION

To increase the power of our study aiming at identifying genetic variants involved in breast cancer susceptibility, we selected individuals from our cohort of French Canadian non-*BRCA1/2* high-risk breast cancer families (one individual per family). Given that this population is considered a founder population, it allows to increase the likelihood of potentially identifying genetic variants associated with breast cancer⁷⁷. The previous identification of *BRCA2/FANCD1*, *PALB2/FANCN*, *BRIP1/FANCI* and *FANCO/RAD51C* as breast cancer susceptibility genes further strengthens the implication of FA genes in breast cancer susceptibility^{26,32-34}.

Apart from this study, a number of case-control studies investigated the potential association of *FANCC* germline mutations with breast cancer susceptibility. Among the few polymorphisms/mutations not identified in our study, and for which a significant association has been demonstrated, L554P, c.711+4A/T and c.322delG have been observed at a significantly higher rate than expected among heterozygous *FANCC* mutation carriers' grandmothers (SIR=1.7, 95% CI, 1.1-5.2), in a study regrouping 944 subjects³⁵. However, Tischkowitz and coll. did not find any increase of incidence of the overall cancer risk in FA family members⁷⁸. Although the statistical power of the study conducted by Barroso *et al.* is limited, they reported an association between rs1045276, located 3' downstream of the *FANCC* gene and poorer survival in breast cancer patients⁷⁹. Our results demonstrated an over-representation of the variant c.896+81G/A (OR=2.442, p=0.02) in breast cancer cases which could suggest an association with the disease, however this association remains to be confirmed in larger cohorts.

A close analysis of nucleotides or amino acids conservation in multiple species suggest that the variants c.896+81G/A (Supplemental Table 2) or c.816G/A (Table 2) may have an impact on gene function or regulation of its expression. Indeed, although both amino acids are polar and have a similar hydropathy index (Glu: -3.5 and Lys: -3.9), Glu is acidic while the Lys residue is basic, which could affect the tertiary structure of the protein conformation. In addition, the amino acid change Glu273Lys, located in exon 8, is predicted to be damaging by the PolyPhen software and this variation is comprised within the binding domains of HSP70 and GRP94.

To this extent, it has been demonstrated that the complex FANCC-HSP70 has an anti-apoptotic role against a variety of environmental factors including oxydative stress, chemotherapeutic agents, radiation, IFN- γ and TNF- α , and both proteins can also suppress double-stranded RNA-

dependent protein kinase (PKR) activity and caspase 3 activation^{43,80-83}. Indeed, this FANCC-HSP70 complex can inhibit the activity of PKR, which possesses a pro-apoptotic action⁴. It should be noted that the formation of this complex is dependent on HSP40, and a fully functional FANCC protein is required in the complex for the cytoprotection activity⁸⁴. Indeed, the L554P mutation in FANCC retains its ability to interact with HSP70 but renders cells hypersensitive to IFN- γ and TNF- α , therefore demonstrating the need of a functional FANCC protein⁴. On the other hand, GRP94 could protect FANCC protein from degradation given that FANCC has a rapid turnover with a half-life of approximately 45 minutes⁸⁵.

Several spliced isoforms of the *FANCC* gene have been identified and partially characterized over the last two decades, the most common being caused by the IVS4+4A/T mutation which results in the deletion of exon 4^{86,87}. The FANCC Δ 7 spliced variant identified in our breast cancer cases was already known to cause the skipping of exon 7 in two studies^{54,88}. However, these studies associated the skipping of exon 7 with two nonsense mutations (R174X and R185X) which led to translational termination codons. Therefore it has been proposed that, as reported for some genes related to diseases such as African cattle goitre (thyroglobulin gene), haemophilia A (factor VIII gene), Marfan syndrome (*FBNI* gene) and gyrate atrophy (*OAT* gene)⁸⁹⁻⁹¹, the skipping of exons could maintain transcription and translation of a partially functional protein and thus moderate the disease phenotype.

Regarding the insertion of the intronic sequence 4A, this spliced mRNA would produce a truncated protein of 119 amino acids lacking most of the functional binding domains of the wild type protein (see Supplemental Figure 1). Although we could presume that this protein could not have any significant activity, it has been reported that the *FANCC* mutation delG322 results in the expression of a 50-kD polypeptide which partially corrects MMC sensitivity in FANCC-deficient cell lines⁹². Therefore additional experiments would be needed to characterize the potential action and the role of this FANCCins4A protein in cell physiology.

A skipping of exon 14 reported in the literature, appears to be a common ASE, observed significantly in both FA patients and control individuals, however it has not been established that this aberrant transcript results in a functional protein⁵⁴. However, the deletion of exon 14 abrogates the first four amino acids of the CDC2 binding domain and the c-terminal portion has been identified as a key element in the protein activity as a mutation located in exon 15 such as L554P yields to the loss of activity of the FANCC protein as demonstrated in the HSC536 cell

line^{93,94}.

No sequence variants on its own seem to alter breast cancer risk. We performed haplotype analysis to see whether a combination of variants could have an effect on breast cancer susceptibility. Haplotype reconstruction using the 6 sequence variations detected in both sample sets led to the identification of 8 haplotypes with frequencies ranging from 0.5 to 46% (Table 3). Four haplotypes (H2, H5, H6 and H7) are found exclusively in the case series while the haplotypes H1, H3 and H4 represent more than 95% of all haplotypes when both datasets are combined. In particular, H1 is significantly more represented in the control series ($p= 0.031$) which could suggest a protective effect of this haplotype on breast cancer susceptibility. Of interest, H4 seems to be over-represented in breast cancer cases, although this difference is not statistically significant. The global haplotype comparison between both series leads to a significant p -value of 0.003, which suggests a significant difference in haplotype distribution, even though we should be cautious, as the presence of some variants display a low frequency.

To further restrict which variant or which portion of the gene seems to provide the significant difference between cases and controls, sliding windows of 3, 4 and 5 variants were used to generate haplotype comparison between both series. As illustrated in Supplemental Table 3, additional analyses with 100 000 permutations generate p -values lower than 0.00045 when using windows including variants 3, 4 and 6 (c.816G>A, c.896+81G/A and c.1677+7C/T respectively). At first glance, it is tempting to speculate that the variants located in the 3'-part of the gene are potentially involved in the difference observed regarding the haplotype distribution. This is supported by the LD block analysis (Supplemental Figure 2) which locates the variants 3-6 in a relatively confined region in blocks 1 and 2, while the variants 1 and 2 are found in block 5 which encompasses the 5' part of the *FANCC* gene. Moreover, following LD value calculation of all SNP combinations of Hapmap data covering the *FANCC* gene, we can observe a perfect D' value of 1.0 (data not shown) between the variants rs4743056 (located in the proximal region of SNP6) and rs7847194 (close from SNP3).

However, it is difficult to pinpoint which variant in the haplotype would be responsible for this effect, as no sequence variation taken on its own shows a significant effect. To date, no study was performed to investigate the involvement of *FANCC* haplotypes in breast cancer predisposition.

Regarding the FA gene family, many splicing variants have been identified, however only a few were characterized, including those of the *BRCA2/FANCD1* gene⁹⁵⁻⁹⁸, and more recently a splicing variant of the core complex member FANCL⁵⁶.

As clearly demonstrated in Figure 1, a few genomic variants seem to modulate the WT/ Δ 7 expression ratio. Certain variants such as c.553 C>T and c.568 C>T modulated transcription by increasing the expression of the Δ 7 spliced transcripts by 85% and 74%, respectively, while the c.816 G>A variation diminished the number of spliced transcripts by 39%. Changing the expression ratio of spliced variants of genes can have significant consequences on cell homeostasis⁹⁹. As the expression of spliced proteins can exert a dominant negative effect on the function of the WT protein by several mechanisms, it was therefore of great interest to go deeper into the characterization of the *FANCC Δ 7* splice variant to evaluate its properties and roles in the cell.

The first steps to the characterization of the variant *FANCC Δ 7* was to ensure that the transcript was not subject to NMD and would go through the translation process. As described in the result section, puromycin treatments and polyribosomal fractions supported the efficient translation of the Δ 7 spliced mRNA. Previously, the polysome analysis has been successfully used for the translation of the ASE sCRH-R2 α in mice and the inefficient translation of the opioid peptide precursor proenkephalin in rat testis^{73,100,101}.

In contrast to FANCCwt^{7,9,11,15,17,102}, we demonstrated that the variant FANCC Δ 7-EGFP was not recruited to the nucleus after a MMC treatment. Because the FA core complex needs all of its 8 FA components (FANCA-B-C-E-F-G-L-M), as well as FA associated protein 24 and 100 (FAAP24 and FAAP100) to be functional, a missing or dysfunctional protein of the core complex causes a defect in the monoubiquitination of FANCD2/FANCI¹⁰³. This deficiency in the activation of the ID complex restricts the recruitment of the complex III (FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCI/BRIP1, FANCO/RAD51C, FANCP/SLX4, FAN1), thus preventing the assembly of the proteins responsible for DNA repair¹⁰⁴. Worth knowing is the fact that being defective in any of the FA gene whether upstream or downstream of the ubiquitination step causes the FA disease^{39,75}. Thus, the absence of recruitment of the Δ 7 protein suggests strongly that this splicing variant is unlikely involved in DNA repair.

As illustrated in Figure 3, it is clear that the long form of FANCD2 (ubiquitinated) protein is not present in the HSC536 cells infected with *FANCC Δ 7* cDNA, empty vector or not infected, as

opposed to the ones infected with the wildtype cDNA. It indicates that the crucial step of monoubiquitination does not occur in the presence of the variant FANCC Δ 7, therefore suggesting that the FANC-BRCA pathway is dysfunctional and may not be able to remove efficiently ICLs present in the DNA. When such lesions are not properly repaired, they can lead to chromosomal breakage, chromosomal instability and ultimately cell death¹⁰⁵. A hallmark of the FA phenotype is the disturbance of the cell cycle. The FA alteration in the cell cycle was first described and demonstrated by Dutrillaux *et al.* 1982 where a prolongation of the G2 phase was observed in short-term cultures of FA peripheral blood lymphocytes.

The fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis demonstrated that HSC536 cells infected with the variant Δ 7 cDNA showed an evident accumulation of cells in the G2/M stage, which is similar to the empty virus-transfected or not transfected cells. Indeed, when cells are deficient in any of the FA genes, an accumulation of cells can be observed in the G2/M stage following DNA damage^{74,106-108}. However, it is unknown whether this delay is strictly related to the G2/M phase or could be in fact shared with the late S phase¹⁰⁷. In normal cells, such MMC treatment slows down the S phase, which represents the stage where most of DNA repairs occur¹⁰⁶⁻¹¹⁰, and this is consistent with what we observed in the HSC536/*FANCC**wt* after 24 hours of MMC treatment (Figure 4).

This accumulation can be explained by DNA repair which takes place during this phase and causes the «deceleration» observed in the S phase. 12 hours after this reading, we observe a progression of the corrected cells into the G2/M phase where the deficient ones, in addition to a diminution in cells count, seem to fail at showing a progression in their cell cycle. The time lapse operated in the flow cytometry experiment allowed to demonstrate that the G2/M accumulation was sustained for more than 24 hours (Supplemental Figure 3). It is reported in the literature that FA cells defective in the core complex have a S-phase checkpoint defect that appears to be specific for ICL damage^{106,107}. In contrast to normal cells, FA cells cannot stop the S-phase progression due to DNA damages and this incapacity is seen in HSC536 deficient cells, HSC536/pMSCVpuro as well as in the HSC536 cells complemented with the *FANCC* Δ 7 cDNA. It has been demonstrated that FANCC is implicated in the G2 checkpoint notably by its interaction with the cyclin-dependent kinase CDC2 (also known as CDK1) by maintaining its phosphorylation¹¹¹.

Throughout the time course (24 to 36 hours) of the experiment, the cell counts observed in flow

cytometry correlates with the data acquired in the survival assay (Figure 4b). Therefore, even at low doses of MMC (1mM) and through higher doses (10 and 30 nM), a clear survival advantage of the HSC536 cells complemented with the wildtype *FANCC* cDNA is seen (as previously demonstrated^{11,112,113}) in comparison with the *FANCCΔ7* cDNA. This diminution of surviving cells in the HSC536/*FANCCΔ7* cells shows once again the inefficiency of the variant Δ7 to promote DNA repair.

During the cell localization experiments, we noticed a localization of both FANCCwt and FANCCΔ7 proteins near the nucleus in many cells under normal and crosslinking agent conditions. The co-localization of FANCCwt-HA or FANCCΔ7-HA with BRCA1 by immunofluorescence assays suggests their location in the centrosomes of the cells. This localization was seen independently of MMC treatments. Until now, no connections have been proposed between members of the FANC family and centrosomes of cells. However, it has been previously demonstrated that FANCA can directly interact with BRCA1¹¹⁴. Therefore such interaction may pave the way to a possible implication of other FANC proteins of the core complex in the centrosomes of cells. Given that the Δ7 protein seems to also co-localize in the centrosomes, this may indicate a different role than FANCCwt since Δ7 seems to be unlikely a functional member of the core complex, based on the results described above. Since FANCC is a multifunctional protein, specific and yet unknown roles of the Δ7 protein remain to be elucidated.

In conclusion, we see exciting advances in the field of FA research as new isoforms of the FANC family are identified and new roles are discovered. Many studies over the last few years helped to understand this complex and puzzling FANC-BRCA DNA repair pathway. Studying the ASEs of FANC genes unravel a completely new dimension to the complexity of this gene family. In this study, we characterized an ASE that does not seem to participate in the FANC-BRCA DNA repair pathway, however, we cannot exclude a significant effect of this splicing variant on the normal activity of the WT protein. In addition, to our knowledge, this is the first study reporting the localization of FANCC protein in the centrosomes.

Having ASE whose functions differ from their respective wildtype gene brings up an additional level of complexity to the already understudied notion of alternative splicing. Because the FANC proteins are known to be implicated in numerous ways for cell homeostasis but are also associated with pathological conditions such as cancers, going further into the characterization of

these genes by unraveling their ASE is a most interesting path worth investigating further.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank all individuals and families who participated in this study. We thank C. Brousseau, Dr. S. Délos, M.-A. Lajoie, P. Léger, J. Rhéaume, C. Samson, M. Tranchant, Dr. M. Dumont, G. Leblanc, H. Malouin, N. Bolduc, A. MacMillan and T. Babineau of the Cancer Genomics Laboratory for genetic counselling, sample management and mutation screening. We also thank F. Guénard for advices regarding luciferase assays, M. Ouellet and A.-M. Bureau-Blouin for skillful technical help and Dr. D. Labuda and C. Moreau at the Centre de Cancérologie Charles Bruneau of Ste-Justine Hospital for help with control DNA samples. We kindly thank the Dr Jean-Yves Masson as well as Dre Amélie Rodrigue at the Centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec for their precious help regarding immunofluorescence experiments and numerous constructive discussions. We would also like to thank Dr Serge Rivest for the use of their confocal microscope and the research professional Paul Préfontaine for his support. We give our thanks to Dre Jasna Kriz for letting us use their microscope.

Financial support: This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Institute of Cancer and Institute of Gender and Health for the INHERIT BRCA research program, the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ)/Réseau de Médecine Génétique Appliquée (RMGA), the Canadian Breast Cancer Research Alliance (CBCRA) and the CURE Foundation. S.D. holds studentships from Fondation René Bussièrès and Fondation Desjardins, C.J.B. holds a Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships - Master's Award studentship from CIHR, S.B is a recipient of a studentship from foundation Rene Bussierès and F.D. is recipient of a Research Career Award in the Health Sciences from CIHR/R&D HRF.

REFERENCES

1. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(20):2143–2153.
2. Antoniou AC, Beesley J, McGuffog L, et al. Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Research.* 2010;70(23):9742–9754.
3. Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet.* 2004;5(5):389–396.
4. Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Koretsky T, Bagby GC. The anti-apoptotic function of Hsp70 in the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. *J. Biol. Chem.* 2002;277(51):49638–49643.
5. Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature Publishing Group.* 2008;40(1):17–22.
6. Thompson E, Dragovic RL, Stephenson S-A, Eccles DM, Campbell IG, Dobrovic A. A novel duplication polymorphism in the FANCA promoter and its association with breast and ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2005;5:43.
7. Youssoufian H. Localization of Fanconi anemia C protein to the cytoplasm of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(17):7975–7979.
8. Fei P, Yin J, Wang W. New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. *cc.* 2005;4(1):80–86.
9. de Winter JP, van der Weel L, de Groot J, et al. The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. *Human Molecular Genetics.* 2000;9(18):2665–2674.
10. Kitao H, Yamamoto K, Matsushita N, Ohzeki M, Ishiai M, Takata M. Functional interplay between BRCA2/FancD1 and FancC in DNA repair. *J. Biol. Chem.* 2006;281(30):21312–21320.
11. Diaz J, Faulkner G, Reifsteck C. The Fanconi anemia complementation group C gene product: structural evidence of multifunctionality. 2001.
12. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science.* 2002;297(5581):606–609.
13. Fagerlie SR. Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood.* 2001;97(10):3017–3024.

14. Hussain S, Wilson JB, Medhurst AL, et al. Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Human Molecular Genetics*. 2004;13(12):1241–1248.
15. Taniguchi T. The Fanconi anemia protein, FANCE, promotes the nuclear accumulation of FANCC. *Blood*. 2002;100(7):2457–2462.
16. Gordon S, Alon N, Buchwald M. FANCC, FANCE, and FANCD2 form a ternary complex essential to the integrity of the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(43):36118–36125.
17. Léveillé F, Ferrer M, Medhurst AL, et al. The nuclear accumulation of the Fanconi anemia protein FANCE depends on FANCC. *DNA Repair*. 2006;5(5):556–565.
18. Wang Z, Li M, Lu S, Zhang Y, Wang H. Promoter hypermethylation of FANCF plays an important role in the occurrence of ovarian cancer through disrupting Fanconi anemia-BRCA pathway. *Cancer Biol. Ther.* 2006;5(3):256–260.
19. Hussain S, Witt E, Huber PAJ, Medhurst AL, Ashworth A, Mathew CG. Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Human Molecular Genetics*. 2003;12(19):2503–2510.
20. Sims AE, Spiteri E, Sims RJ, et al. FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2007;14(6):564–567.
21. Litman R, Peng M, Jin Z, et al. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. *Cancer Cell*. 2005;8(3):255–265.
22. Meetei AR, Yan Z, Wang W. FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *cc*. 2004;3(2):179–181.
23. Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, et al. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat. Genet*. 2005;37(9):958–963.
24. Tischkowitz M, Xia B, Sabbaghian N, et al. Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(16):6788–6793.
25. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet*. 2007;8(10):735–748.
26. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Publishing Group*. 2010;42(5):406–409.
27. Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature Publishing Group*. 2011;43(2):142–146.
28. Stoepker C, Hain K, Schuster B, et al. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nature Publishing Group*. 2011;43(2):138–141.

29. Somyajit K, Subramanya S, Nagaraju G. Distinct Roles of FANCO/RAD51C Protein in DNA Damage Signaling and Repair IMPLICATIONS FOR FANCONI ANEMIA AND BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(5):3366–3380.
30. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell*. 2001;105(1):149–160.
31. Cantor S, Drapkin R, Zhang F, et al. The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(8):2357–2362.
32. Seal S, Thompson D, Renwick A, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat. Genet.* 2006;38(11):1239–1241.
33. Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat. Genet.* 2007;39(2):165–167.
34. Erkkö H, Xia B, Nikkilä J, et al. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature*. 2007;446(7133):316–319.
35. Berwick M, Satagopan JM, Ben-Porat L, et al. Genetic Heterogeneity among Fanconi Anemia Heterozygotes and Risk of Cancer. *Cancer Research*. 2007;67(19):9591–9596.
36. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, et al. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Molecular Cell*. 2001;7(2):249–262.
37. Gregory RC, Taniguchi T, D'Andrea AD. Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Semin. Cancer Biol.* 2003;13(1):77–82.
38. Nakanishi K, Yang Y-G, Pierce AJ, et al. Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(4):1110–1115.
39. de Winter JP, Joenje H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009;668(1-2):11–19.
40. Hirano S, Yamamoto K, Ishiai M, et al. Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. *EMBO J*. 2005;24(2):418–427.
41. Fagerlie SR, Koretsky T, Torok-Storb B, Bagby GC. Impaired type I IFN-induced Jak/STAT signaling in FA-C cells and abnormal CD4⁺ Th cell subsets in Fancc^{-/-} mice. *J. Immunol.* 2004;173(6):3863–3870.
42. Saadat zadeh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Hong P, Bergmann H, Haneline LS. Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway. *J. Biol. Chem.* 2004;279(16):16805–16812.

43. Pang Q, Fagerlie S, Christianson TA, et al. The Fanconi anemia protein FANCC binds to and facilitates the activation of STAT1 by gamma interferon and hematopoietic growth factors. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(13):4724–4735.
44. Brodeur I. Regulation of the Fanconi Anemia Group C Protein through Proteolytic Modification. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;279(6):4713–4720.
45. Reuter TY, Medhurst AL, Waisfisz Q, et al. Yeast two-hybrid screens imply involvement of fanconi anemia proteins in transcription regulation, cell signaling, oxidative metabolism, and cellular transport. *Experimental Cell Research.* 2003;289(2):211–221.
46. Phelps RA, Gingras H, Hockenbery DM. Loss of FANCC function is associated with failure to inhibit late firing replication origins after DNA cross-linking. *Experimental Cell Research.* 2007;313(11):2283–2292.
47. Salles D, Cabral REC, Pizzatti L, et al. Changes in protein expression due to deleterious mutations in the FA/BRCA pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;364(4):755–760.
48. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet.* 1997;15 Spec No:417–474.
49. Jain AN, Chin K, Børresen-Dale AL, et al. Quantitative analysis of chromosomal CGH in human breast tumors associates copy number abnormalities with p53 status and patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98(14):7952–7957.
50. Naylor TL, Greshock J, Wang Y, et al. High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):R1186–98.
51. Korsching E, Packeisen J, Helms MW, et al. Deciphering a subgroup of breast carcinomas with putative progression of grade during carcinogenesis revealed by comparative genomic hybridisation (CGH) and immunohistochemistry. *Br. J. Cancer.* 2004;90(7):1422–1428.
52. Simoneau M, Aboukassim TO, LaRue H, Rousseau F, Fradet Y. Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene.* 1999;18(1):157–163.
53. Sinha S, Singh RK, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK. Alterations in candidate genes PHF2, FANCC, PTCH1 and XPA at chromosomal 9q22.3 region: pathological significance in early- and late-onset breast carcinoma. *Mol Cancer.* 2008;7:84.
54. Gibson R, Hajianpour A. A nonsense mutation and exon skipping in the Fanconi anaemia group C gene. *Human molecular Genetics.* 1993;2(6):707-799.
55. Yamashita T, Yagasaki H, Toda T. The IVS4+ 4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood.* 2000;9:1493-1498.

56. Zhang J, Zhao D, Park HK, et al. FAVL elevation in human tumors disrupts Fanconi anemia pathway signaling and promotes genomic instability and tumor growth. *J. Clin. Invest.* 2010;120(5):1524–1534.
57. Hansen TVO, Steffensen AY, Jønson L, Andersen MK, Ejlertsen B, Nielsen FC. The silent mutation nucleotide 744 G --> A, Lys172Lys, in exon 6 of BRCA2 results in exon skipping. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119(3):547–550.
58. Levran O, Attwooll C, Henry RT, et al. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 2005;37(9):931–933.
59. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, et al. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat. Genet.* 2005;37(9):934–935.
60. Guénard F, Labrie Y, Ouellette G, et al. Mutational analysis of the breast cancer susceptibility gene BRIP1 /BACH1/FANCI in high-risk non-BRCA1/BRCA2 breast cancer families. *J. Hum. Genet.* 2008;53(7):579–591.
61. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat. Genet.* 2007;39(2):162–164.
62. Avard D, Bridge P, Bucci LM, et al. Partnering in oncogenetic research--the INHERIT BRCA experience: opportunities and challenges. *Fam. Cancer.* 2006;5(1):3–13.
63. Simard J, Dumont M, Moisan A-M, et al. Evaluation of BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence, risk prediction models and a multistep testing approach in French-Canadian families with high risk of breast and ovarian cancer. *J. Med. Genet.* 2007;44(2):107–121.
64. Moisan A-M, Fortin J, Dumont M, et al. No Evidence of BRCA1/2 genomic rearrangements in high-risk French-Canadian breast/ovarian cancer families. *Genet. Test.* 2006;10(2):104–115.
65. Durocher F, Labrie Y, Soucy P, et al. Mutation analysis and characterization of ATR sequence variants in breast cancer cases from high-risk French Canadian breast/ovarian cancer families. *BMC Cancer.* 2006;6:230.
66. Desjardins S, Belleau P, Labrie Y, et al. Genetic variants and haplotype analyses of the ZBRK1/ZNF350 gene in high-risk non BRCA1/2 French Canadian breast and ovarian cancer families. *Int. J. Cancer.* 2008;122(1):108–116.
67. Fortin J, Moisan A-M, Dumont M, et al. A new alternative splice variant of BRCA1 containing an additional in-frame exon. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1731(1):57–65.
68. Boukamp P, Stanbridge EJ, Foo DY, Cerutti PA, Fusenig NE. c-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential in vivo but lacks correlation with malignancy. *Cancer Research.* 1990;50(9):2840–2847.
69. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell*

Biol. 1988;106(3):761–771.

70. Luu-The V, Paquet N, Calvo E, Cumps J. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotech.* 2005;38(2):287–293.

71. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien J-P, Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2006;49(4):489–502.

72. Palagyi A, Neveling K, Plinninger U, et al. Genetic inactivation of the Fanconi anemia gene FANCC identified in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 confers sensitivity towards DNA-interstrand crosslinking agents. *Mol Cancer.* 2010;9(1):127.

73. Evans RT, Seasholtz AF. Soluble corticotropin-releasing hormone receptor 2alpha splice variant is efficiently translated but not trafficked for secretion. *Endocrinology.* 2009;150(9):4191–4202.

74. Seyschab H, Friedl R, Sun Y, et al. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood.* 1995;85(8):2233–2237.

75. Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2009;668(1-2):4–10.

76. Kupfer GM, D'Andrea AD. The effect of the Fanconi anemia polypeptide, FAC, upon p53 induction and G2 checkpoint regulation. *Blood.* 1996;88(3):1019–1025.

77. Antoniou AC, Easton DF. Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. *Genet. Epidemiol.* 2003;25(3):190–202.

78. Tischkowitz M, Easton DF, Ball J, Hodgson SV, Mathew CG. Cancer incidence in relatives of British Fanconi Anaemia patients. *BMC Cancer.* 2008;8(1):257.

79. Barroso E, Pita G, Arias JI, et al. The Fanconi anemia family of genes and its correlation with breast cancer susceptibility and breast cancer features. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;118(3):655–660.

80. Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* 1998;17(21):6124–6134.

81. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* 2000;275(33):25665–25671.

82. Melville MW, Tan SL, Wambach M, Song J, Morimoto RI, Katze MG. The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity. *J. Biol. Chem.* 1999;274(6):3797–3803.

83. Rathbun RK, Christianson TA, Faulkner GR, et al. Interferon-gamma-induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve caspase 8-dependent activation of caspase 3 family members. *Blood*. 2000;96(13):4204–4211.
84. Pang Q, Keeble W, Christianson TA, Faulkner GR, Bagby GC. FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *EMBO J*. 2001;20(16):4478–4489.
85. Hoshino T, Wang J, Devetten MP, et al. Molecular chaperone GRP94 binds to the Fanconi anemia group C protein and regulates its intracellular expression. *Blood*. 1998;91(11):4379–4386.
86. Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M. A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nat. Genet*. 1993;4(2):202–205.
87. Verlander PC, Lin JD, Udono MU, et al. Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *The American Journal of Human Genetics*. 1994;54(4):595–601.
88. Ten Foe Lo JR, Kruyt FA, Zweekhorst MB, et al. Exon 6 skipping in the Fanconi anemia C gene associated with a nonsense/missense mutation (775C-->T) in exon 5: the first example of a nonsense mutation in one exon causing skipping of another downstream. *Hum. Mutat*. 1998;Suppl 1:S25–7.
89. Ricketts MH, Simons MJ, Parma J, Mercken L, Dong Q, Vassart G. A nonsense mutation causes hereditary goitre in the Afrikaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987;84(10):3181–3184.
90. Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F. Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Human Molecular Genetics*. 1993;2(1):11–17.
91. Dietz HC, Valle D, Francomano CA, Kendzior RJ, Pyeritz RE, Cutting GR. The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. *Science*. 1993;259(5095):680–683.
92. Yamashita T, Wu N, Kupfer G, et al. Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood*. 1996;87(10):4424–4432.
93. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature*. 1992;356(6372):763–767.
94. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature*. 1992;358(6385):434.
95. Hofmann W, Horn D, Hüttner C, Classen E, Scherneck S. The BRCA2 variant 8204G>A is a splicing mutation and results in an in frame deletion of the gene. *J. Med. Genet*. 2003;40(3):e23.
96. Zou JP, Hirose Y, Siddique H, Rao VN, Reddy ES. Structure and expression of variant BRCA2a lacking the transactivation domain. *Oncol Rep*. 1999;6(2):437–440.

97. Walker LC, Whiley PJ, Couch FJ, et al. Detection of splicing aberrations caused by BRCA1 and BRCA2 sequence variants encoding missense substitutions: implications for prediction of pathogenicity. *Hum. Mutat.* 2010;31(6):E1484–505.
98. Zhang L, Chen L, Bacares R, et al. BRCA1 R71K missense mutation contributes to cancer predisposition by increasing alternative transcript levels. *Breast Cancer Res Treat.* 2011.
99. Shkreta L, Michelle L, Toutant J, Tremblay ML, Chabot B. The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *Journal of Biological Chemistry.* 2011;286(1):331–340.
100. Garrett JE, Collard MW, Douglass JO. Translational control of germ cell-expressed mRNA imposed by alternative splicing: opioid peptide gene expression in rat testis. *Mol. Cell. Biol.* 1989;9(10):4381–4389.
101. Goldenberg D, Mador N, Ball MJ, Panet A, Steiner I. The abundant latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 are bound to polyribosomes in cultured neuronal cells and during latent infection in mouse trigeminal ganglia. *J. Virol.* 1997;71(4):2897–2904.
102. Fagerlie SR, Diaz J, Christianson TA, et al. Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood.* 2001;97(10):3017–3024.
103. Hodson C, Walden H. Towards a molecular understanding of the fanconi anemia core complex. *Anemia.* 2012;2012:926787.
104. Kitao H, Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol.* 2011;93(4):417–424.
105. Neveling K, Endt D, Hoehn H, Schindler D. Genotype–phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2009;668(1-2):73–91.
106. Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, Laquerbe A, Moustacchi E, Papadopoulo D. Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Experimental Cell Research.* 2000;260(2):208–215.
107. Thompson LH, Hinz JM. Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: Mechanistic insights. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2009;668(1-2):54–72.
108. Wang LC, Gautier J. The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2010;45(5):424–439.
109. Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ, et al. DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood.* 1998;91(1):275–287.

110. Mi J. The Fanconi anemia core complex associates with chromatin during S phase. *Blood*. 2005;105(2):759–766.
111. Freie BW, Ciccone SLM, Li X, et al. A role for the Fanconi anemia C protein in maintaining the DNA damage-induced G2 checkpoint. *J. Biol. Chem.* 2004;279(49):50986–50993.
112. Platzbecker U, Kurre P, Guardiola P, et al. Fanconi anemia type C–deficient hematopoietic cells are resistant to TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-induced cleavage of pro-caspase-8. *Experimental Hematology*. 2004;32(9):815–821.
113. Yates J, Keeble W, Pals G, et al. Novel inactivating mutations of FANCC in Brazilian patients with Fanconi anemia. *Hum. Mutat.* 2006;27(2):214–214.
114. Folias A, Matkovic M, Bruun D, et al. BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA. *Human Molecular Genetics*. 2002;11(21):2591–2597.
112. Desjardins S, Ouellette G, Labrie Y, INHERIT BRCAs, Durocher F (2008). Genomic sequence and transcript variations of the FANCA gene in non-BRCA1/2 families with high risk of breast cancer. Twentieth Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Hilton Hotel and Conference Center, 4-7 October, Eugene, Oregon, USA.
113. Joly Beuparlant C, Desjardins S, Ouellette G, Labrie Y, INHERIT BRCAs, Durocher F (2008). Characterization and analyses of sequence variations in the FANCC gene on breast cancer susceptibility in affected French-Canadian women from families with a high risk of breast cancer. Twentieth Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Hilton Hotel and Conference Center, 4-7 October, Eugene, Oregon, USA.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Minigene assay. Ratios of spliced and long forms obtained from 3 different plasmids (constructions). Ratios are normalized in respect to the wildtype plasmid. Upper graph shows the result of the reverse mutagenesis on the c.568c>t mutant to reestablish the wildtype sequence.

Figure 2: Ribosomal fractions. Polysomes analysis of the *FANCCΔ7* alternative transcript in T47D cells. The square line is the data acquired from the -EDTA sample whereas the circle line is the data from the +EDTA sample.

Figure 3: Monoubiquitination assays. Western blotting of the FANCD2 protein in whole cell lysate of HSC536 cells infected with either the *FANCCwt* cDNA, *FANCCΔ7* cDNA, with the empty viral vector (pMSCVpuro), or not infected (\emptyset). Cells were treated or not with 50ng/ml of MMC for 16 hours. FANCD2 associated with an ubiquitin is found at 162 kDa whereas FANCD2 alone weights 155 kDa. Calnexin (95 kDa) was used as loading control.

Figure 4: Cell cycle profiles and survival assay. a) FACs analysis of the deficient *FANCC* cell line HSC536 infected with *FANCCwt* cDNA, *FANCCΔ7* cDNA or not infected at all. Cells were treated with indicated concentrations of MMC for 24 hours prior to FACs analysis. b) MMC induced cell death. Differential survival of HSC536 (lozenge, dashed and dots), HSC536/pMSCVpuro (triangle, full line), HSC536/*FANCCwt* (square, full line), HSC536/*FANCCΔ7* (circle, dashed line) cells after 5 days of incubation in escalating concentrations of MMC. The fraction of surviving cells was measured by the Alamare Blue assay.

Figure 5: Cellular localization. a) Fluorescence microscopy of FANCC-EGFP and FANCCΔ7-EGFP transiently transfected in HEK293T cells treated or not with 50 ng/ml of MMC for 16 hours. Counterstaining with DAPI is performed to visualize the nucleus. b) Immunofluorescence of FANCC-HA and FANCCΔ7-HA (in green) with BRCA1 (red) in *FANCC* deficient cells PD331 infected by retrovirus (using viral vector pMSCVpuro and indicated cDNA). Dashed white squares show the region analyzed by confocal microscopy to confirm co-localization.

Supplemental Figure 1: FANCC interaction domains, FANCC splicing and their tissue expression. (A) Schematic representation of FANCC interaction domains based on the literature. (B) FANCC exon structure and the three splicing variants that could be detected via the cDNA analysis: *FANCCins4a* and *FANCCΔ7*. (C) and (D) Schematic representation of the putative protein produced by the insertion of exon 4a and the deletion of exon 7, respectively, with an RT-PCR analysis on various cell lines using a set of primers specific for each event.

Supplemental Figure 2: LD block analysis. A total of 115 SNPs from the CEPH/CEU cohort of HapMap was used to identify five LD blocks using a solid spine of LD algorithm (denoted by arrows). SNPs 1 to 6 are identified accordingly with their RefSNP accession number, when available.

Supplemental Figure 3: Cell Cycle analysis. FACS analysis of HSC536 *FANCC* deficient cell line either not infected or infected with *FANCCwt* cDNA, *FANCCΔ7* cDNA, or with the empty virus. Cells were either not treated, treated with 50ng/ml, or 100ng/ml of MMC. Cells were fixed at two time points, after 24 and 36 hours of treatment.

Supplemental Figure 4: Survival assay. Survival experiment on HSC536 (lozenge, dashed and dots), HSC536/pMSCVpuro (triangle, full line), HSC536/*FANCCwt* (square, full line), HSC536/*FANCCΔ7* (circle, dashed line) cell line that lasted seven days. The survival percentage of cell was recorded after 1, 2, 3, 4, 5 and 7 days (a through f respectively). The fraction of surviving cell was measured by the Alamar Blue assay.

Supplemental Figure 5: Cell localization and centrosomes. A) Fluorescence microscopy of HEK293T cells transiently transfected with the *FANCCwt*-EGFP or *FANCCΔ7*-EGFP vectors. Cells were treated or not with 50ng/ml of MMC for 16 hours. B) Immunofluorescence of *FANCC*-HA and *FANCCΔ7*-HA (in green) with BRCA1 (red) in *FANCC* deficient cells PD331 infected by retrovirus (using viral vector pMSCVpuro and indicated cDNA). Pictures were taken at a magnification of 40x.

Table 1

Observed sequence variations in FANCC gene and genotype frequencies in familial breast cancer cases and controls

SNP	SNP ID ¹	dbSNP ID	Series	Number of individuals	Common homozygote No. (expected) ²	Heterozygote No. (expected) ²	Rare homozygote No. (expected) ²	MAF ³	HWE ⁴	OR ⁵ (95% CI)
1	c.-78-73C/T	N/A	Cases	96	95 (95.00)	1 (0.99)	0 (0.00)	0.01	0.96	0.192 (0.022-1.656)
			Controls	94	89 (89.07)	5 (4.87)	0 (0.07)	0.03	0.79	
2	c.-29A/C	rs4647414	Cases	96	95 (95.00)	1 (0.99)	0 (0.00)	0.01	0.96	2.953 (0.120-73.948)
			Controls	94	94 (94.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0.00	1.00	
3	c.816G/A	rs34671520	Cases	96	92 (94.04)	4 (3.92)	0 (0.05)	0.02	0.84	9.000 (0.481-168.331)
			Controls	94	94 (94.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0.00	1.00	
4	c.896+81G/A	rs4647512	Cases	96	76 (76.15)	19 (18.70)	1 (1.15)	0.11	0.88	2.442 (1.088-5.482)
			Controls	92	85 (85.13)	9 (8.57)	0 (0.22)	0.05	0.70	
5	c.1155-38T/C	rs4647534	Cases	96	25 (29.26)	56 (47.48)	15 (19.26)	0.45	0.08	1.072 (0.715-1.607)
			Controls	94	30 (30.45)	47 (46.10)	17 (17.45)	0.43	0.85	
6	c.1677+7C/T	N/A	Cases	96	92 (92.04)	4 (3.92)	0 (0.04)	0.02	0.84	8.809 (0.471-164.772)
			Controls	92	92 (92.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0.00	1.00	

¹ According to the nomenclature of the Human Genome Variation Society² As expected under Hardy-Weinberg equilibrium³ Minor Allele Frequency⁴ p-value for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium⁵ Odds Ratio (95% confidence interval)

Table 2A

Non-synonymous sequence variants detected in human FANCC and residues found in orthologues									
SNP*	SNP ID**	Amino acid change	<i>Macaca mulatta</i>	<i>Tarsier syrichta</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Loxodonta africana</i>	<i>Monodelphis domestica</i>	<i>Anolis carolinensis</i>
3	c.816G>A	Glu273Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala

* According to Table 1

** According to the nomenclature of the Human Genome Variation Society

Table 2B

Prediction of the amino acid change Glu273Lys on FANCC protein function					
SNP*	SNP ID**	Amino acid change	Location	SIFT	PolyPhen (score difference)
3	c.816G>A	Glu273Lys	Exon 8	Tolerated	Probably damaging

* According to Table 1

** According to the nomenclature of the Human Genome Variation Society

Table 3

Estimated haplotype frequencies observed in FC breast cancer cases and Controls

Haplotype (SNP 1-2-3-4-5-6)*	Cases	Controls	Combined	p-value**
H1: CAGGTC	0.406	0.521	0.463	0.031
H2: CAGGTT	0.021	0.000	0.011	0.123
H3: CAGGCC	0.432	0.404	0.418	0.604
H4: CAGATC	0.099	0.048	0.074	0.076
H5: CAGACC	0.010	0.000	0.005	0.499
H6: CAAGTC	0.021	0.000	0.011	0.123
H7: CCGGTC	0.005	0.000	0.003	0.495
H8: TAGGCC	0.005	0.027	0.016	1.113

* According to Table 1

**Fisher Exact Test, two-tailed

Testing H0: p-value = 0.003 (1000 perm)

Figure 1

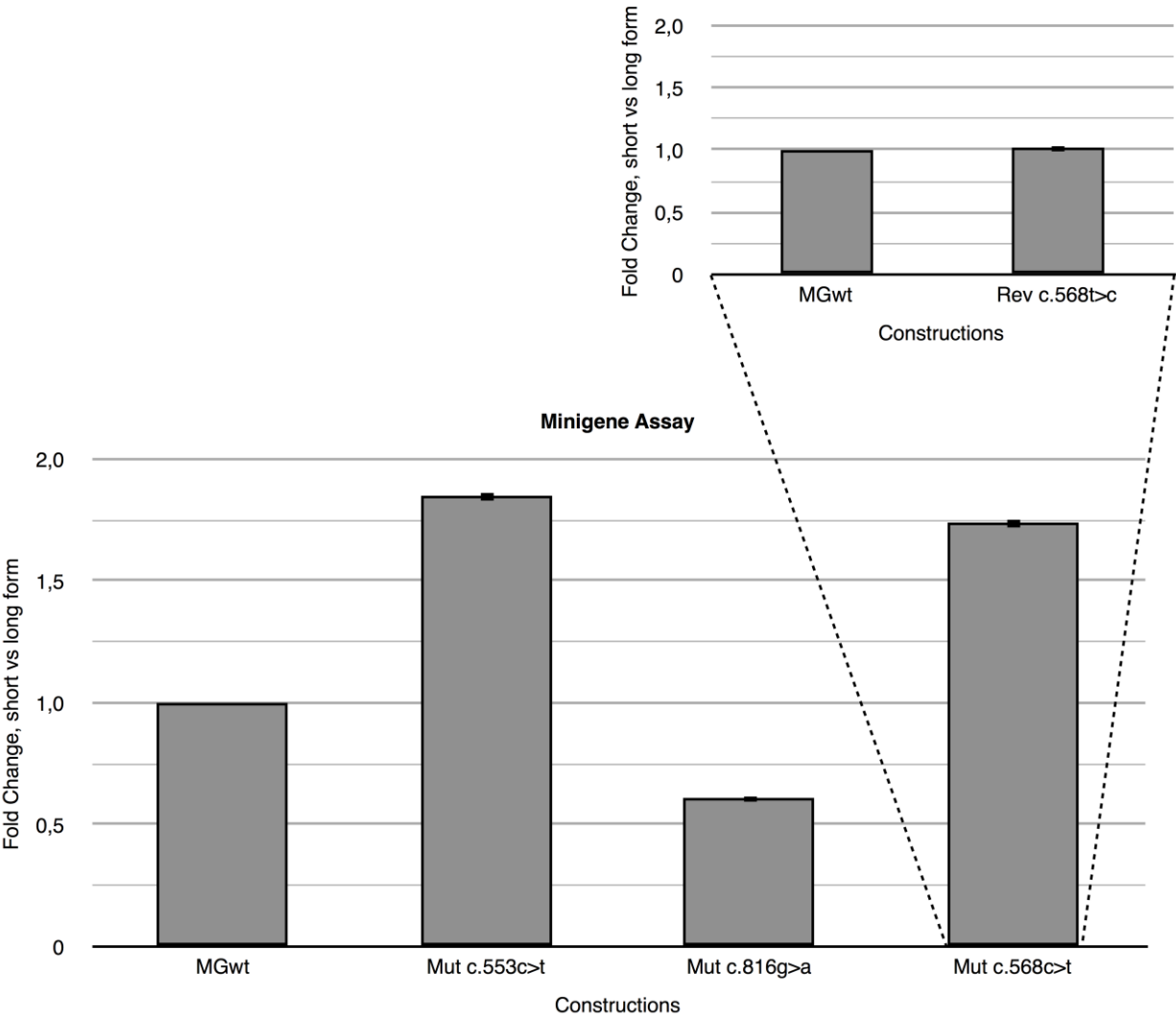


Figure 2

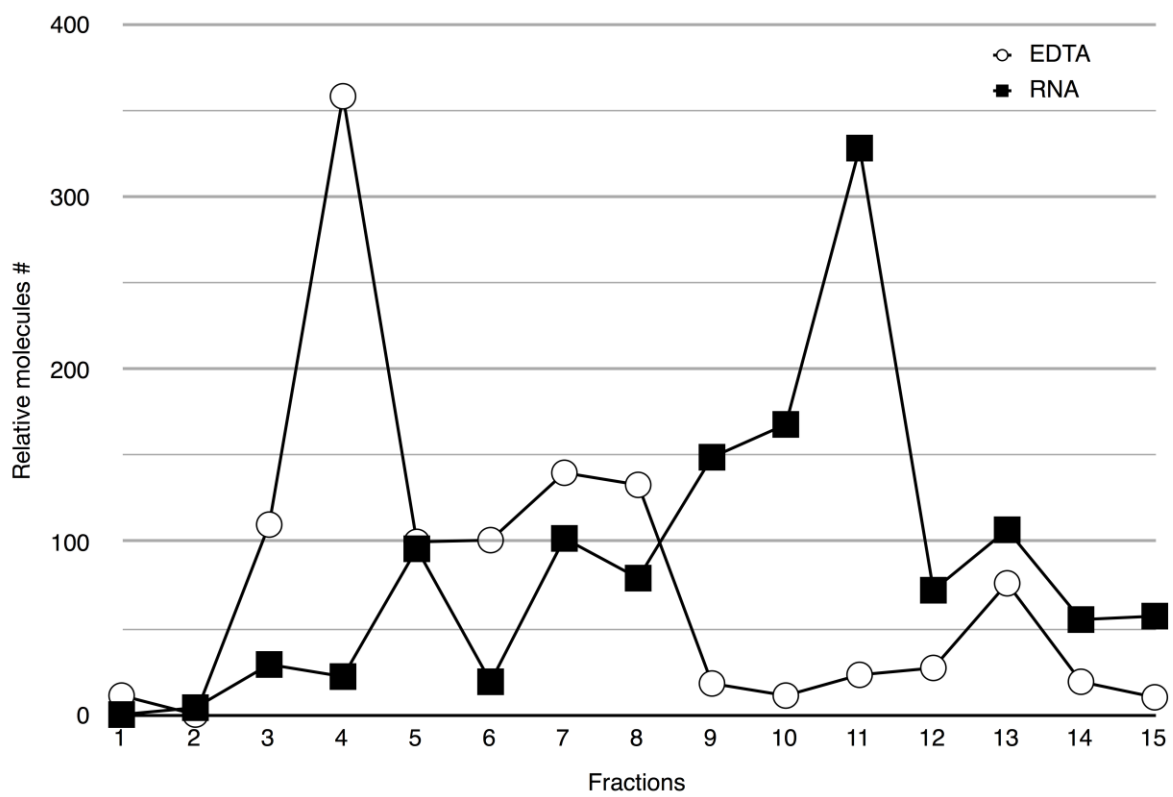


Figure 3

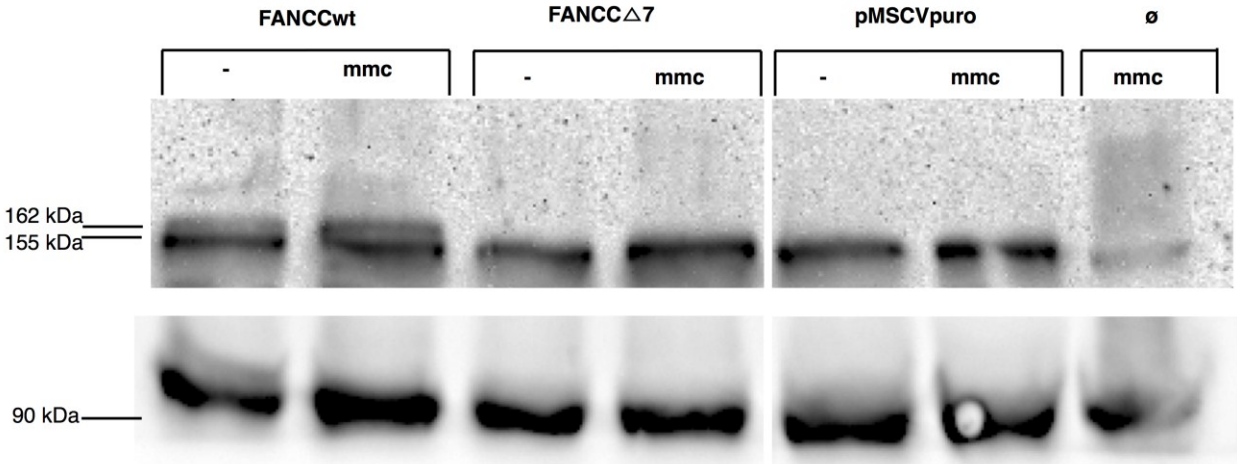


Figure 4

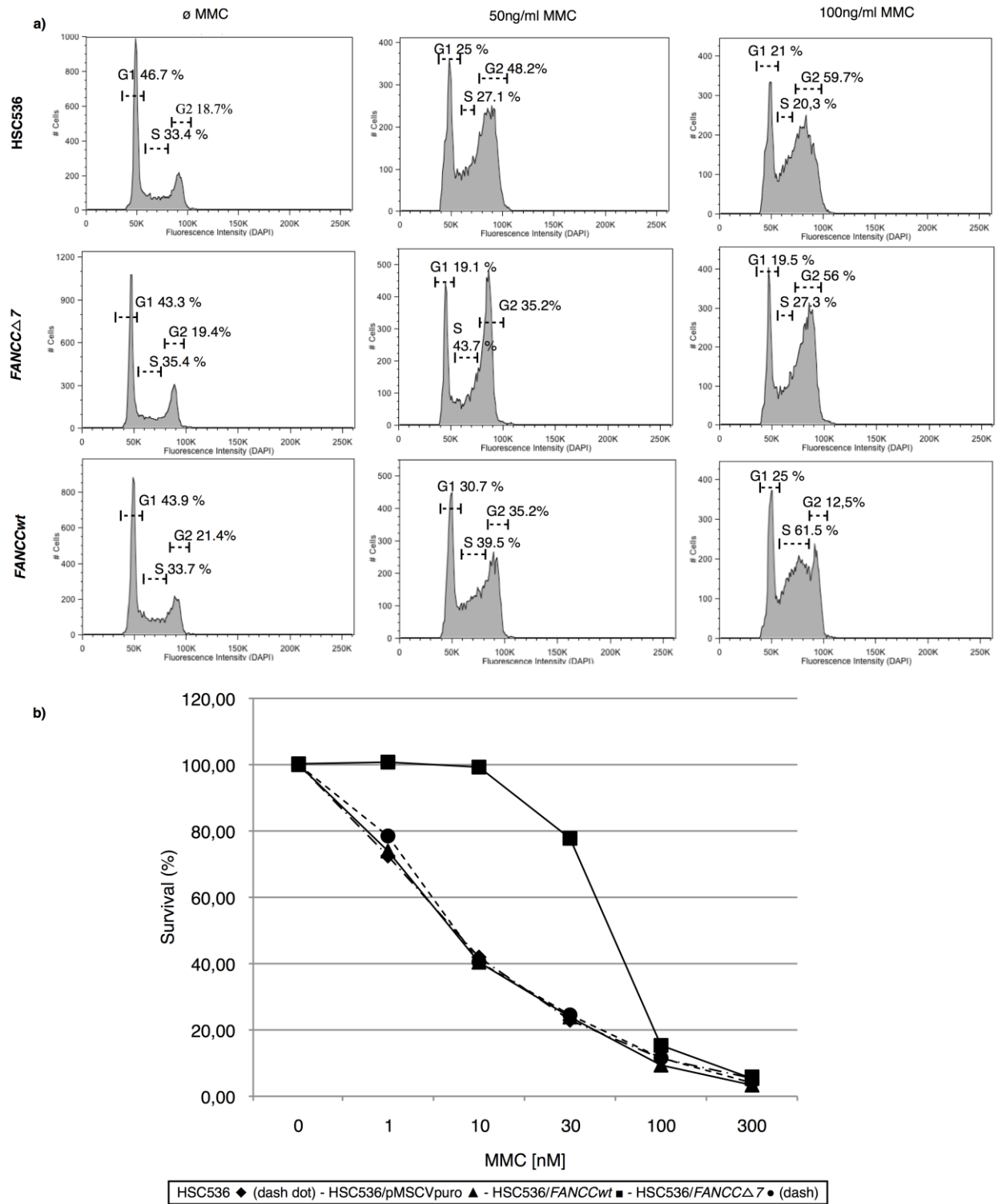
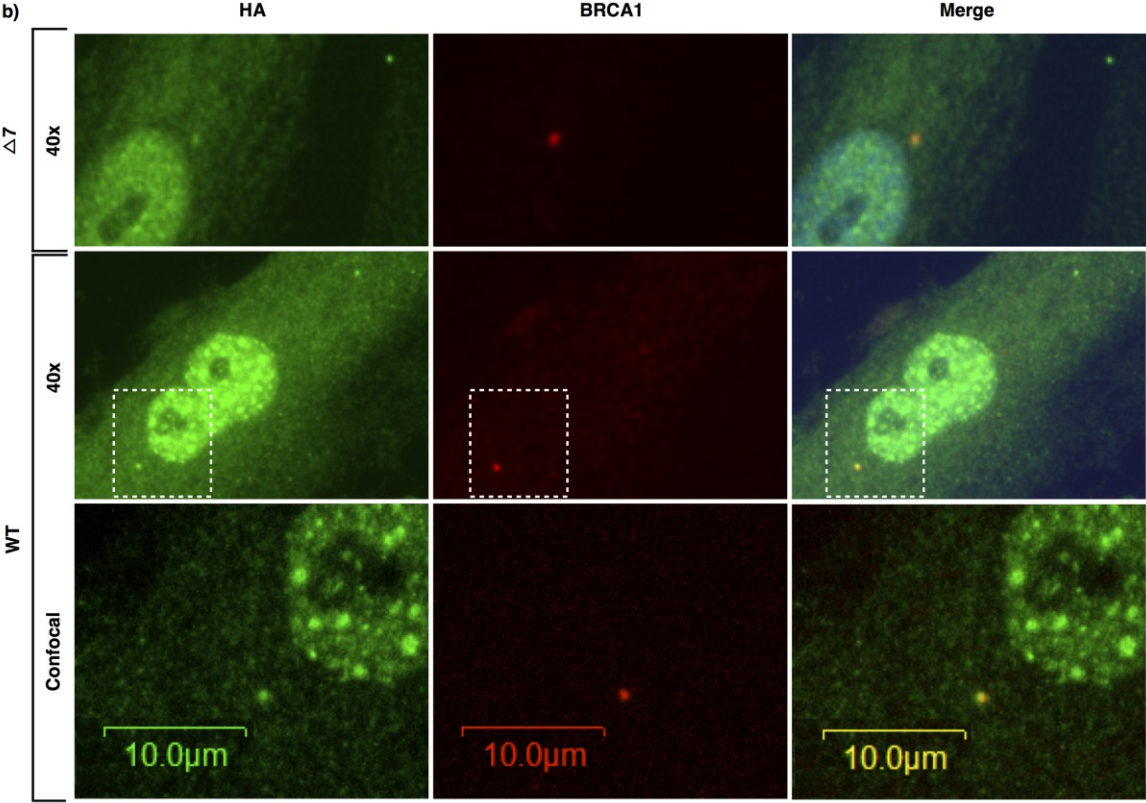
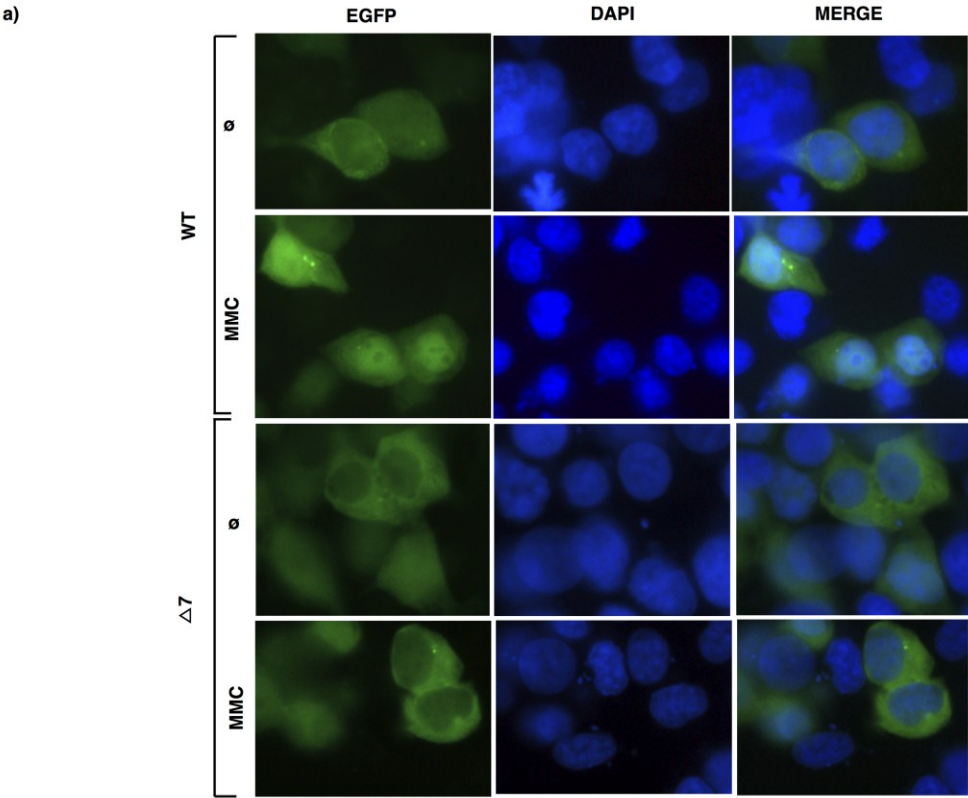


Figure 5



Supplementary Table 1A**List of oligonucleotides used for FANCC exonic amplification**

Exon*	F/R	Oligonucleotide Sequence (5'-3')	Annealing Temp (°C)	PCR length (bp)
2	F2	GATGGCTCCAGCATAGAAGC	58	468
	R2	ACCACAAGTCCCGATTCTGGG		
3	F3	CCCTCAATCTATAATGTCAG	58	232
	R3	GTAAGCCTCTGTGAAACAATG		
4	F4	ATGTTATATTCAGGGATACTTG	58	364
	R4	TAACAGTGAAGGGTATGTTTG		
5	F5	TAGGTAAAGCACTGCTCATTG	59	587
	R5	TTTAGGAAAACCCTTCCTGGTT		
6	F6	ACAGAGTGAAACATGAGAAG	56	258
	R6	CCTCTCATAACCAAACACTGATAC		
7	F7	GTCCTTAATTATGCATGGCTC	58	289
	R7	CAACACACCACAGCCTTCTAAG		
8	F8	TTTTCAGTGAGCCATTTCTG	59	265
	R8	AAATGATTCCAAGCATCTCC		
9	F9	CTCCTTTGGCTGATAATAGC	56	230
	R9	CCCATGATACAGCCAGAGAC		
10	F10	TTCCCTTATACAGTGCAGG	58	254
	R10	GTGCTCTTGTCCAAATACTC		
11	F11	TTCCTGACCCCGTTTCAATC	58	193
	R11	TTGACAATGCTCTTCCCAGG		
12	F12	GTGAACCAGAAGTAAAGGGC	58	254
	R12	AGGATCTAGGGAAACCATG		
13	F13	CAGTGGATAAGTACAATTTAAG	58	429
	R13	GAATGGGCTGGCAGCGTCTCGTC		
14	F14	CCTAGAAGTATGTCTGTCTG	58	303
	R14	CTCTCCTTGACTAGGATGCTG		
15	F15	GGATAGGGCTTCTTTCAGGG	54	391
	R15	TCCAAGATGTGTACAGCTC		

*The non-coding exon 1 has not been analyzed.

Supplementary Table 1B

List of oligonucleotides used for directed mutagenesis on <i>FANCC</i> minigene		
Mutant	F/R	Oligonucleotide Sequence (5'-3')*
c.520 C > T	F	GGATTTAACTCAAGG T Ggtaggtgtaaactaacatcc
	R	GGATGTTTAGTTTAAACACCTACC A CCTTTGAGTGTTAAATCC
c.521+109 A>G	F	<i>ggatgttcagttatggttgt</i> G ttttatagaaagatta
	R	taatcttctatataaaa C acaaccataactgaacatcc
c.521+261 T>G	F	ggtagaaagccctaca G acacagtagggagc
	R	gctccctactgtgt C tgtagggctttctacc
c.550 T > A	F	GTGGCGTCCCTG A CACGAGTTTGTG
	R	CACAACTCGT T CAGGGACGCCAC
c.550 A>T (wt)	F	GTGGCGTCCCTG T CACGAGTTTGTG
	R	CACAACTCGT A CAGGGACGCCAC
c.553 C > T	F	GGCGTCCCTGTCA T GAGTTTGTGTCCC
	R	GGCGTCCCTGTCA T GAGTTTGTGTCCC
c.568 C > T	F	CCCTGTCACGAGTTTGTGTCCCA T TTATTACCCTGACAGATG
	R	CATCTGTCAGGGTAATAA A TGGGACACAAACTCGTGACAGG G
c.568 T > C (wt)	F	CCCTGTCACGAGTTTGTGTCCCA C TTATTACCCTGACAGATG
	R	CATCTGTCAGGGTAATAA G TGGGACACAAACTCGTGACAGG G
C.584 A>T	F	CACTTATTACCCTGACAG T TGTTGACCCCCTGG
	R	CCAGGGGGTCAACA A CTGTCAGGGTAATAAGTG
c.686+30 C > T	F	cctgtcatcctg T gtggttttcc
	R	ggaaaaacgac A caggatgacagg
c.686+33 C > T	F	gtttcctgtcatcctg T gttttcttttc
	R	gaaaaggaaaaac A acgcaggatgacaggaaac
c.816 G > A	F	GTCTGAGAAGGATC A AATGCTTTATAAATCTAGAGGGCCCG
	R	CGGGCCCTCTAGATTTATAAAGCATT T GATCCTTCTCAGAC

*Capital letters represent exonic sequences as lower cases represent intronic nucleotides.

Supplementary Table 1C

List of oligonucleotides used for the construction of the <i>FANCC</i> minigene				
Minigene	F/R	Oligonucleotide Sequence (5'-3')	T _{ann} (°C)	PCR length (bp)
Part 1 (Ex6-Int6)	F	ATATATGGATCCATTAGCGTCTGAACTCAGAGA GA	58	385
	R	ATATAGAATTCTCCTCTTGCAGAGTGAGCAA		
Part 2 (Int6-Ex7- Int7)	F	ACAGTGATGGAGGTGTTTACAAGA	60	1504
	R	TATACTCGAGCAGTCTTAGGGTAGAAAATGAG		
Part 3 (Int7-Ex8)	F	ATATACTCGAGGATCATAACAGTTAGTAGGCAG	60	580
	R	ATATATCTAGATTTATAAAGCATTTCGATCCTT		

Supplementary Table 2

Conservation of the c.896+81G/A variant in other species

Species	Nucleotide sequence*
Homo sapiens	TGTTGTGGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTG
Vicugna pacos	TTCTGTGCTAG <u>T</u> TCT-CTGGGTG
Felis catus	T-TCGTGGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTA
Gallus gallus	-----
Pan troglodytes	TGTTGTGGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTA
Bos taurus	TTCTGTGGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTG
Canis familiaris	TTTTGTGGTAG <u>T</u> CTC-CTGTATA
Tursiops truncatus	CTCTGTGGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTG
Loxodonta africana	TTCTGCGGTGA <u>T</u> TCT-CTGACTG
Gorilla gorilla	TGTTGTGGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTG
Cavia porcellus	ATCTGTAATA <u>G</u> CCT-CTGGCTG
Erinaceus europaeus	-----TTATAG <u>T</u> TAT-CTGACTG
Equus caballus	TTCTGTGCGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTG
Procavia capensis	TTTTGTAGCAG <u>T</u> TCT-CTGGCTG
Dipodomys ordii	TGTTGTGGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTG
Echinops telfairi	TTCTGT-----
Macaca mulatta	TGCTGTGGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTG
Pteropus vampyrus	TTCTGTTGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCTA
Myotis lucifugus	TTCTGGGGTGA <u>T</u> TCT-CTGGGTG
Mus musculus	----- <u>G</u> TCT-CTGGCTG
Microcebus murinus	TTCTGTGGTACT <u>T</u> TCT-TTGGCTG
Monodelphis domestica	TATCTT--TAG <u>A</u> CTACTGAC---
Pongo pigmaeus	TGTTGTGGTT <u>T</u> TCT-CTGGCTG
Ochotona princeps	-----
Ornithorhynchus anatinus	-----
Oryctolagus cuniculus	--CTGCGGTC <u>G</u> CCC-CCGGCGC
Rattus norvegicus	-----TCT-CTGGCTG
Sorex araneus	-----
Choloepus hoffmanni	TTCTTTGGTAG <u>T</u> TGT-CCGGCTA
Spermophilus tridecemlineatus	ATCTGCAGTT <u>G</u> --T-CTGGCTA
Tarsius syrichta	TTTTGCAGTAG <u>T</u> TCT-CTGGCCA
Tupaia belangeri	TTTTGTGGTAG <u>T</u> TTT-CTGGCCC

*The underlined bold letter represents the corresponding nucleotide of the c.896+81G/A variant.

Supplemental Table 3

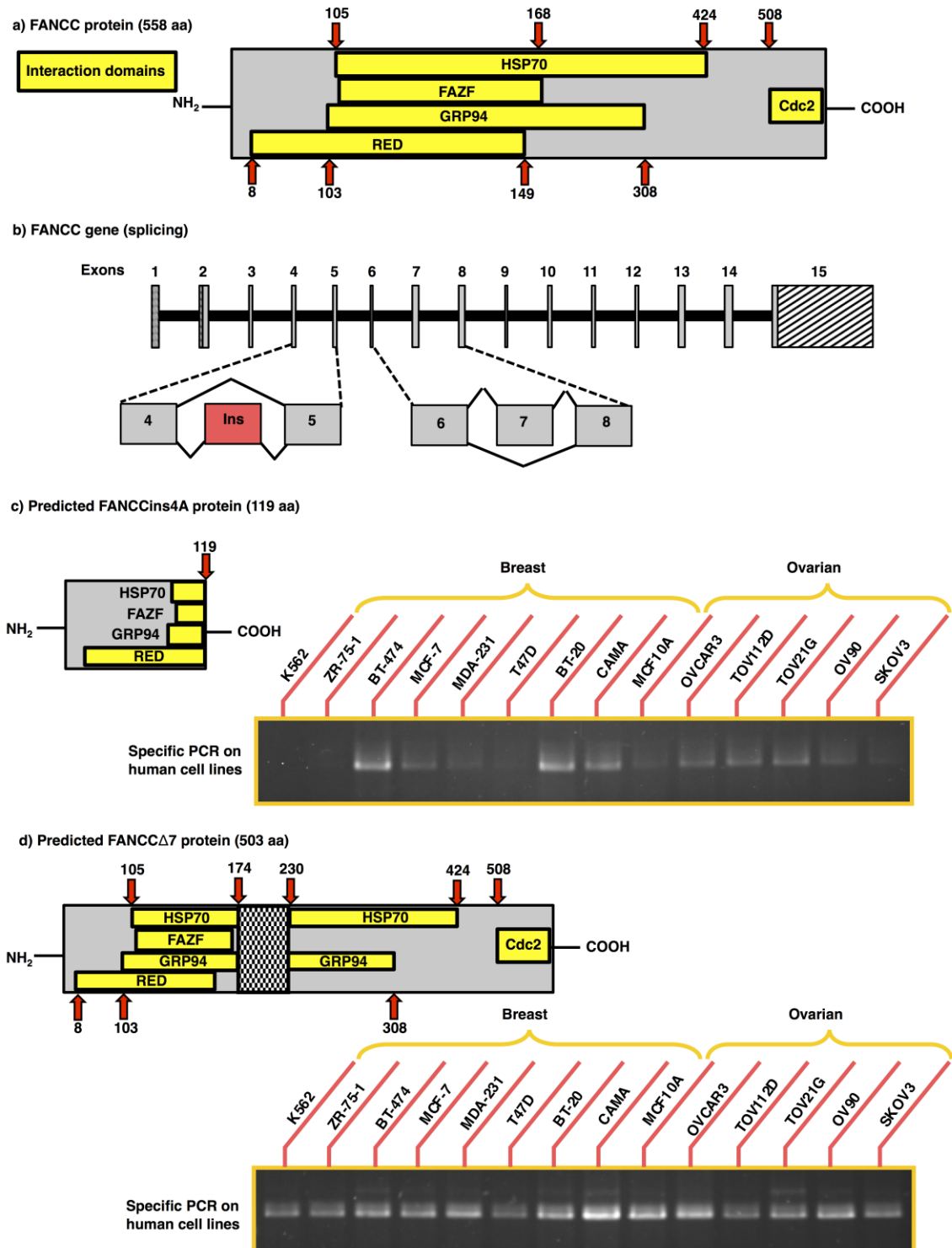
Significativity of PHASE analysis between FC breast cancer cases and controls using sliding windows of SNPs

SNPs analyzed*	p-value**	
	1000 perm	100 000 perm
1-2-3-4-5	0.006	-
2-3-4-5-6	0.001	0.00043
2-3-4-5	0.006	-
3-4-5-6	0.001	0.00045
3-4-5	0.004	-
4-5-6	0.006	-
3-4-6	0.001	0.00033

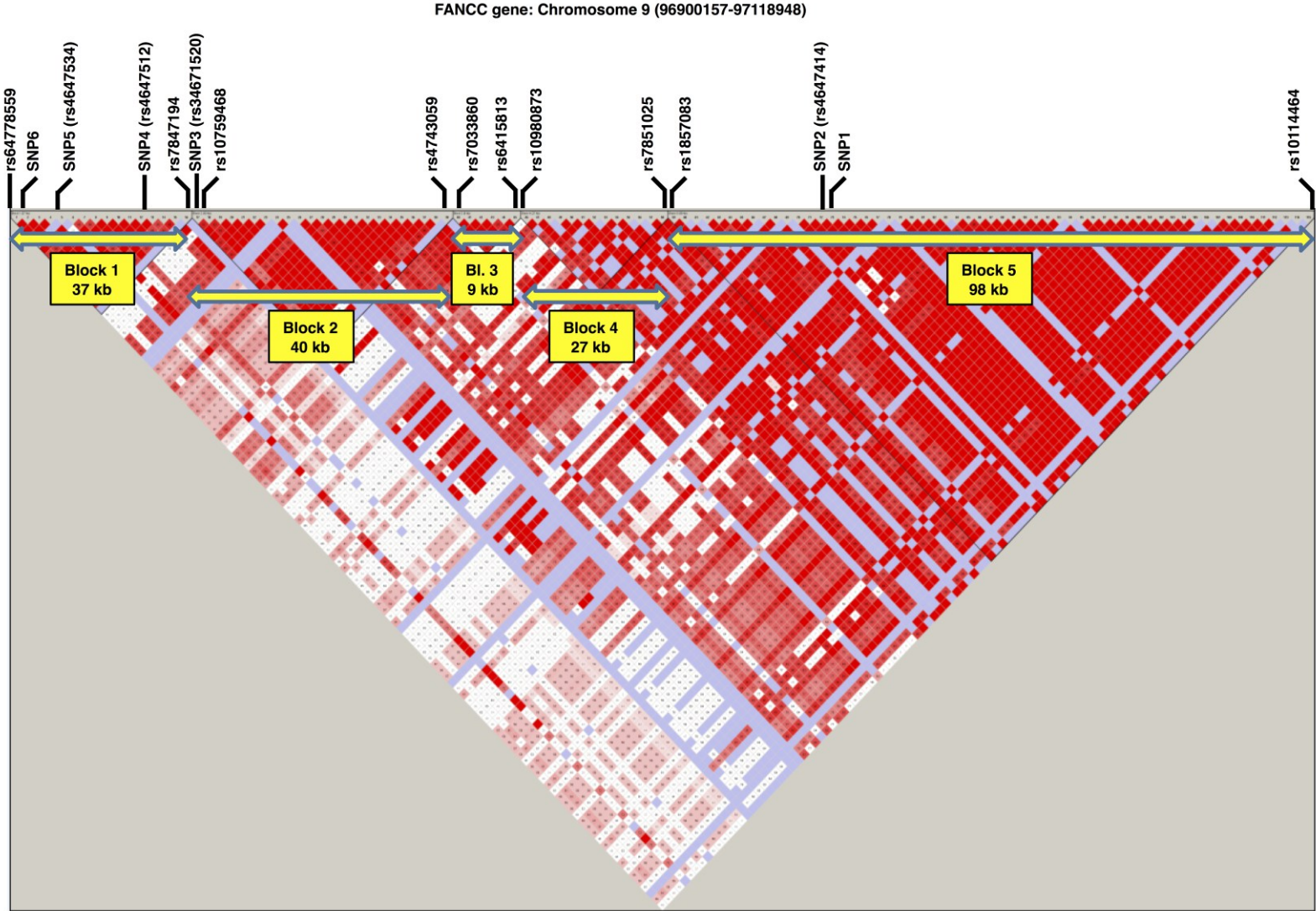
* According to Table 1.

**p-value for testing H0, perm: permutation.

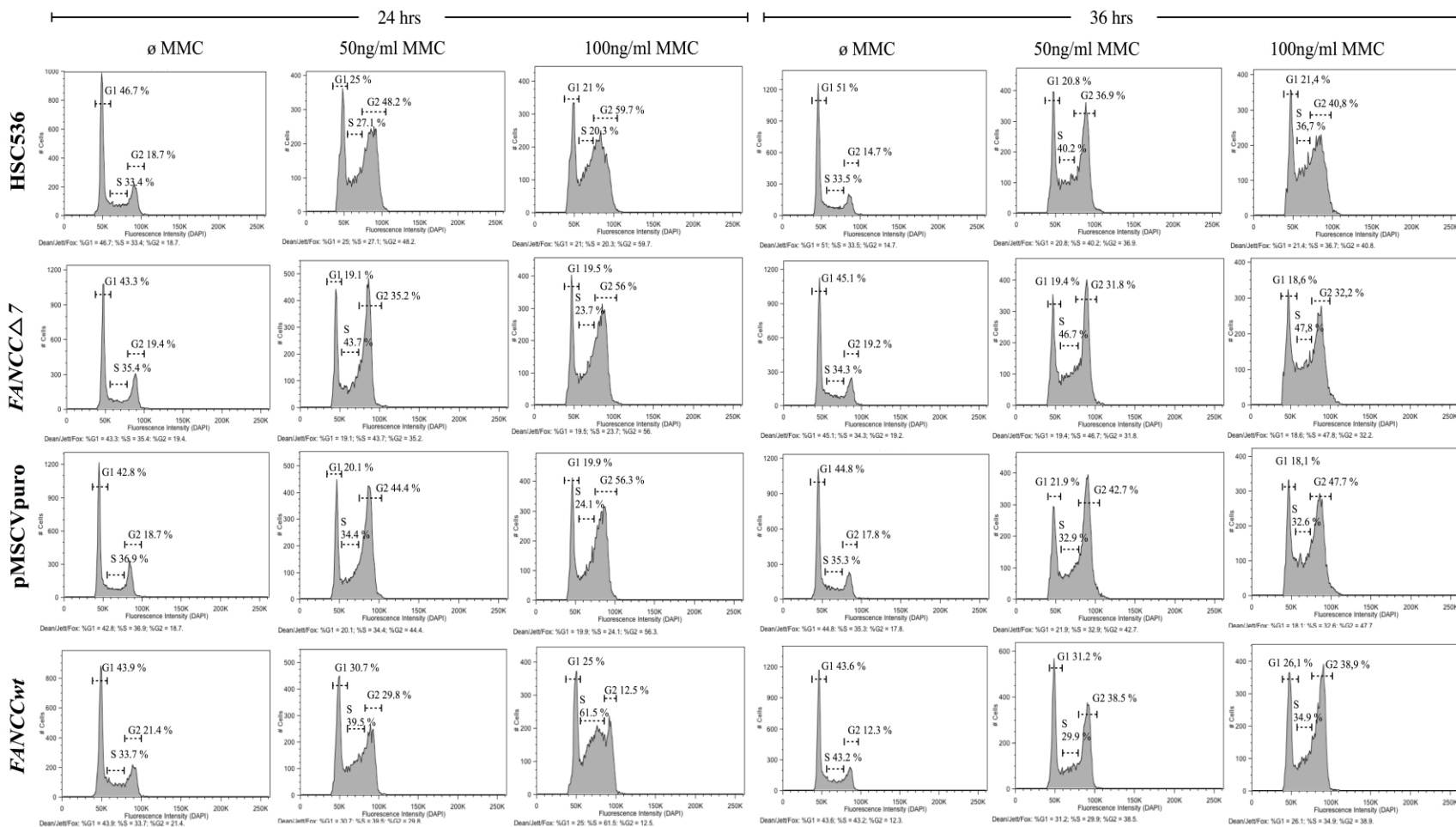
Supplemental Figure 1



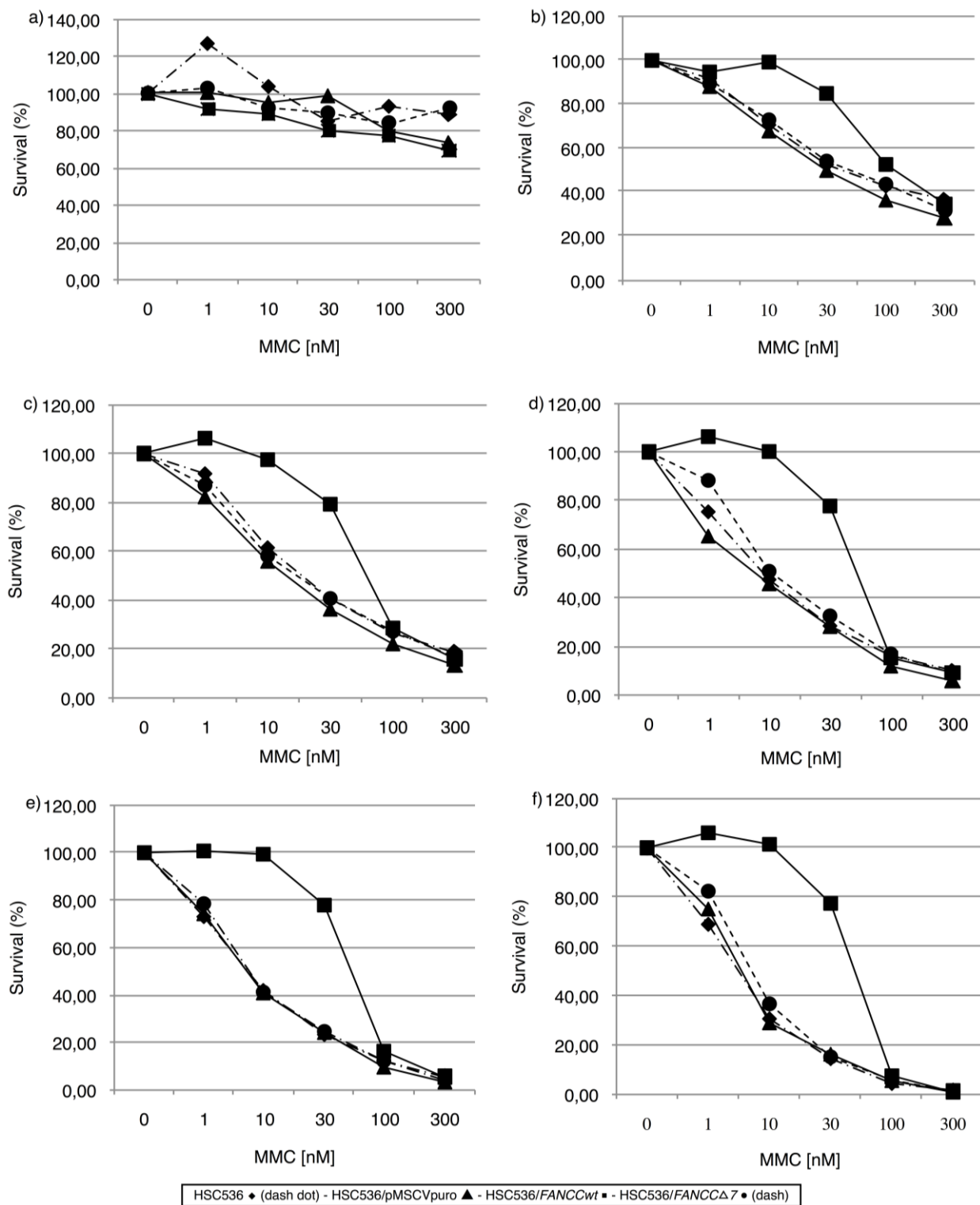
Supplemental Figure 2



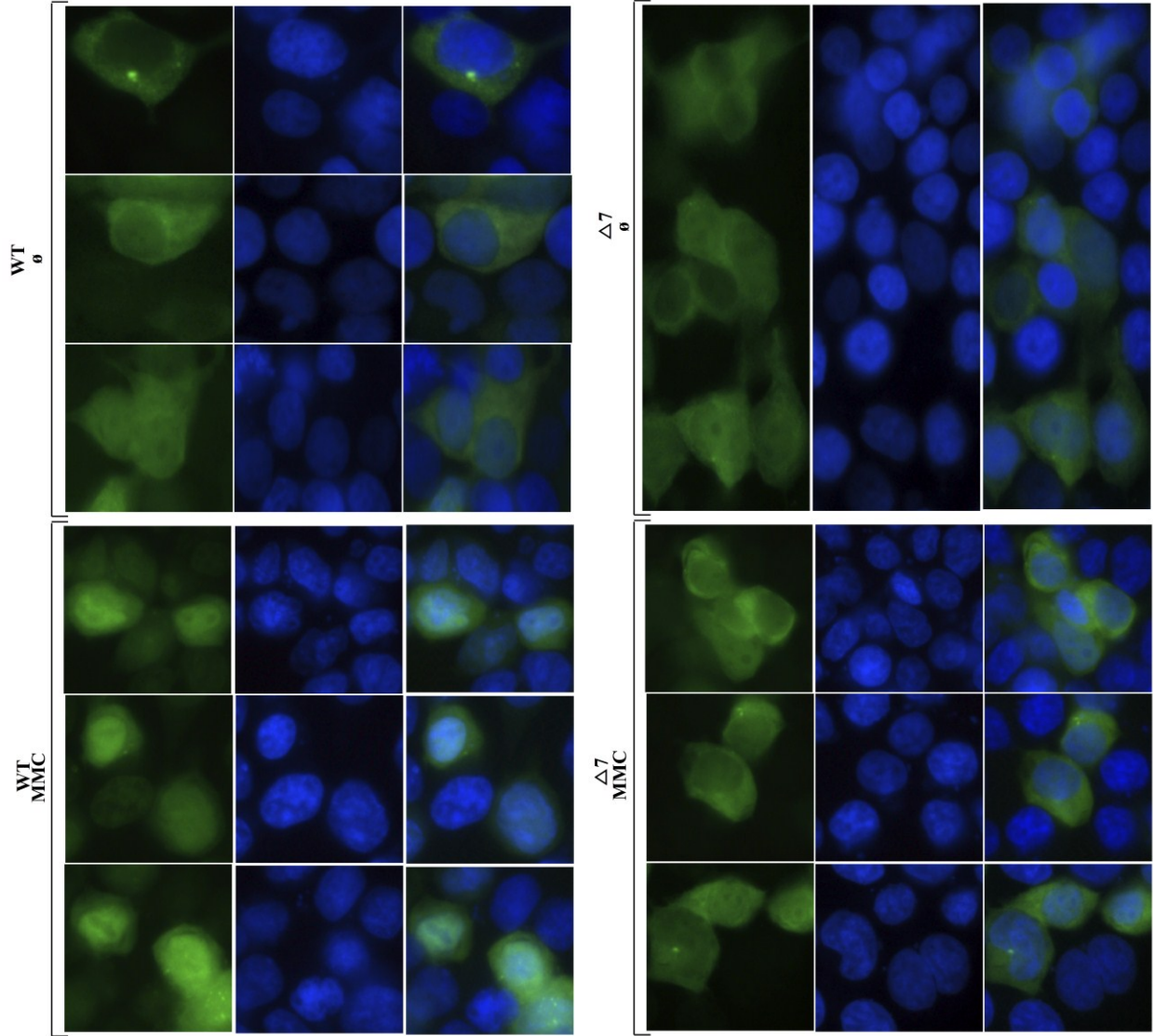
Supplemental Figure 3



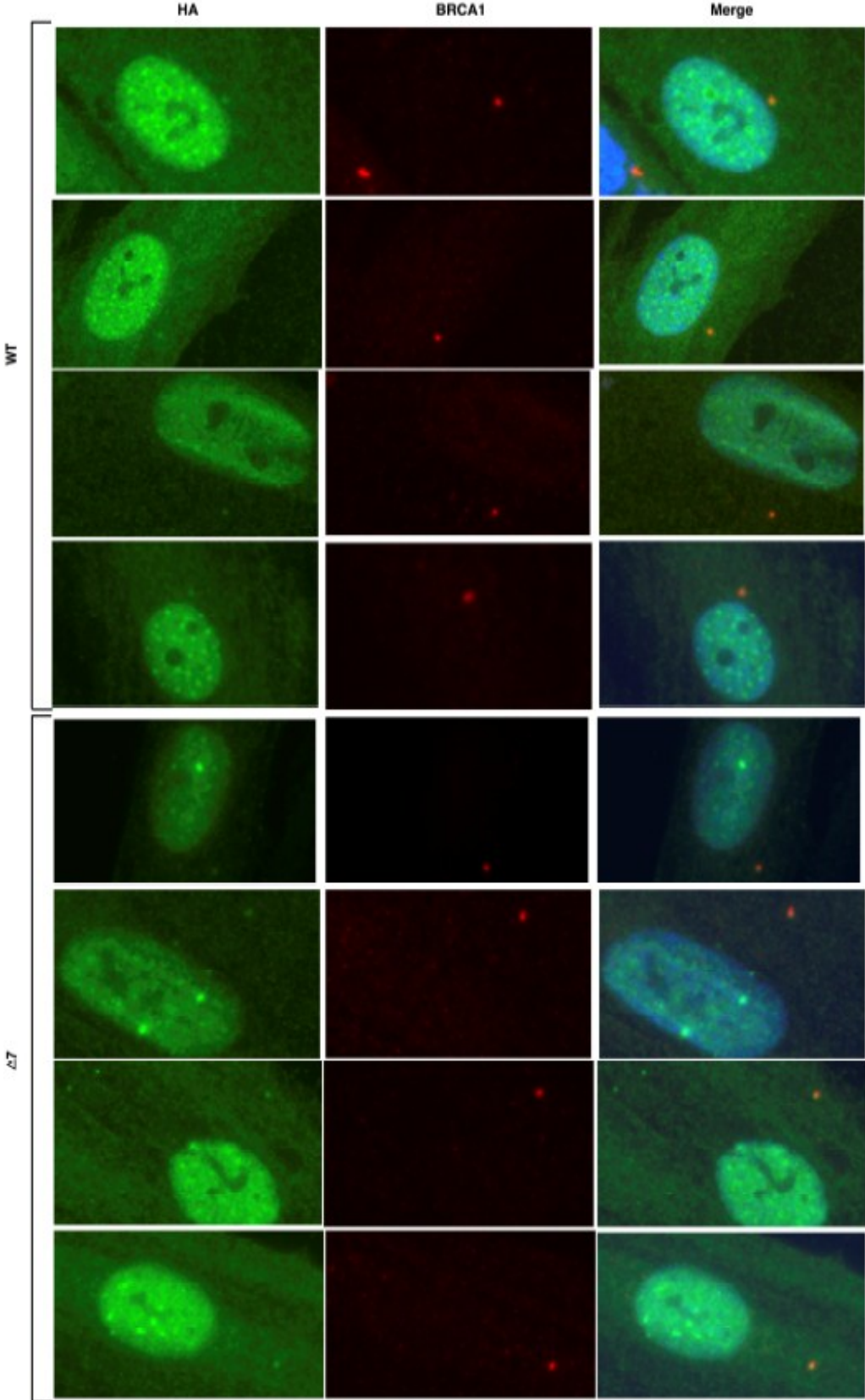
Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5A



Supplemental Figure 5B



DISCUSSION

Le lien entre le cancer et l'anémie de Fanconi se concrétise de plus en plus depuis les dernières années. Toutefois, le premier lien entre ces 2 maladies remonte à 1971¹⁹². Depuis ces années, plusieurs FANCs ont été identifiés comme des gènes de susceptibilité à divers types de cancers. Il se trouverait donc une étroite relation entre cette famille de gènes et la bonne maintenance de la cellule. Que la voie FANC-BRCA brimée mène inévitablement à l'instabilité chromosomique ne fait pas de doute sur le fait que cette dernière est un mécanisme crucial pour la cellule en plus des implications parallèles que comptent les gènes qui la composent. Afin de caractériser ces gènes, une attention particulière apportée aux variants d'épissage est nécessaire considérant leur forte présence. Premièrement, afin d'en apprendre d'avantage sur comment la régulation de l'épissage alternatif *FANCCΔ 7* s'effectue, la technique du minigène fut utilisée pour étudier précisément le rôle de certains polymorphismes connus à l'égard de l'exclusion ou l'inclusion de l'exon 7. Suite aux mutagenèses dirigées, transfections, extractions d'ARN et quantifications des transcrits, il fut mis en évidence que certains SNPs sont en mesure de moduler le ratio de transcrits sauvages (avec l'exon 7) versus transcrits alternatifs (sans l'exon 7). Cette modulation de la transcription peut se faire en augmentant le nombre de transcrits alternatifs comme le font les SNPs c.553 C>T et c.568 C>T par 85% et 74% respectivement ou encore en diminuant ce nombre comme c'est le cas avec le SNP c.816 G>A qui réduit le nombre de transcrits alternatifs *FANCCΔ 7* par 39%. Changer le ratio entre différentes isoformes de certains gènes peut parfois s'avérer problématique pour l'homéostasie de la cellule. Un bon exemple est le gène BCL-X chez qui l'isoforme BCL-XL a des propriétés anti-apoptotiques tandis que l'isoforme BCL-XS promeut la mort cellulaire par des propriétés pro-apoptotiques¹⁷⁵. Cet exemple démontre à quel point les épissages alternatifs peuvent être différents du gène sauvage. C'est sous cette optique que la caractérisation des variants d'épissage de *FANCC* tire son intérêt afin d'en découvrir les propriétés et implications dans la cellule. Tel que mentionné précédemment, *FANCCΔ7* n'est pas le seul épissage du gène FANCC et il est intéressant de noter qu'en amplifiant le variant *FANCCΔ7*, il est possible de détecter le variant *FANCCins4a* (voir Figure Supplémentaire 1d, la bande supérieure dans les lignées BT-474, BT-20, CAMA, TOV112D, TOV21G et OV90).

Parmi les gènes de la famille FANC, plusieurs épissages alternatifs ont été identifiés mais peu ont été caractérisés ou ont été sujets d'études plus poussées comme ceux du gène *FANCD1/BRCA2*¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ ou plus récemment un variant de *FANCL*, *FAVL*¹³⁰. Au niveau de *FANCC* et du variant d'épissage *FANCCΔ 7*, ce projet permet de mettre en lumière des différences notables entre les deux.

D'abord, il est important de mentionner qu'avant d'être en mesure d'effectuer les tests fonctionnels, une partie considérable du travail a consisté à effectuer le sous-clonage des différentes isoformes. Cette phase du projet fut très fastidieuse en raison des différents caprices de cette technique. En effet, la technique de sous-clonage peut paraître simple en apparence mais peut s'avérer très ardue en raison des nombreuses étapes à accomplir et des différentes conditions techniques à respecter. Afin de réaliser tous les tests attendus, plusieurs sous-clonages étaient requis et ce, dans plusieurs vecteurs différents. Que ce soit pour les tests de localisation cellulaire, de survie, de complémentarité pour étudier la monoubiquitination ainsi que les infections virales, toutes ces expérimentations sont dépendantes du sous-clonage de l'ADNc ou ADNg de *FANCC* et *FANCCΔ 7*. Dans le même ordre d'idée, confirmer la traduction en protéine du variant *FANCCΔ 7* était cruciale. En premier lieu, des tests à la puromycine ont permis de voir que l'ARNm du variant n'était pas sujet au NMD (dégradation des ARN nonsense). N'étant donc pas sujet à la dégradation, ce dernier serait en bonne posture pour être traduit en protéine. Les analyses de polysomes ont permis de confirmer cette traduction par la machinerie cellulaire puisque l'ARNm du variant se retrouve bel et bien en présence de polysomes.

Les premières observations effectuées à l'égard du variant *FANCCΔ 7* ont été faites au niveau de sa localisation cellulaire. L'hypothèse initiale voulait que le variant aurait un patron d'action différent de celui du gène sauvage. Ce patron du gène sauvage est défini par une présence majoritairement cytoplasmique en conditions normales et une localisation s'orientant vers le noyau suite à un stress au niveau de l'ADN tel un PIB, comme il est bien décrit à ce jour dans la littérature^{145-148,164,179,180}. Suite aux transfections des constructions *FANCC-EGFP* et *FANCCΔ7-EGFP* dans les cellules HEK293T, certaines ont reçu un traitement à la mitomycine C (50 ng/ml et 100 ng/ml pour 16 heures) et d'autres aucun agent pontant. Ce fut surprenant de voir que,

contrairement à FANCC sauvage, le variant d'épissage FANCC Δ 7 n'était pas recruté au noyau chez les cellules traitées à la MMC (ces mêmes observations ont été réalisées chez ces cellules avec l'épitope HA au niveau de FANCC et FANCC Δ 7). Parce que le complexe I requiert tous ses composants pour être actif et permettre le bon déroulement de la voie FANC-BRCA, le mauvais recrutement de la protéine FANCC Δ 7 au noyau laisse présager un dérèglement de la voie et nous porte à croire que les étapes suivant la formation du complexe I ne pourront s'effectuer. L'étape subséquente est celle de la monoubiquitination du complexe ID formé par FANCD2 et FANCI. Si un seul FANC ou FAAP n'est pas fonctionnel, ce stade clef de la voie FANC-BRCA ne peut pas avoir lieu.

Afin de répondre à cette nouvelle interrogation, il était de mise d'effectuer des essais de monoubiquitination afin de comparer l'implication du variant en comparaison avec celle du gène sauvage. Afin de s'assurer d'isoler le rôle qu'opère le variant pour ce test, une lignée déficiente de FANCC a été utilisée, les HSC536. Puisque cette dernière n'exprimait pas les gènes transfectés en transitoire, il a fallu sous-cloner les ADNcs d'intérêt dans des vecteurs viraux pour ensuite, à l'aide de retrovirus, infecter les cellules et obtenir ainsi des expressions stables dans les cellules HSC536. Une fois cette étape réalisée, le traitement des cellules HSC536 à la mitomycine C durant 16 heures permettait d'activer la voie FANC-BRCA pour être en mesure de voir s'il y avait bel et bien monoubiquitination du complexe ID. Des immunobuvardages dirigés contre la protéine FANCD2 permettent de voir les deux formes de FANCD2, soient longue avec ubiquitine et courte sans ubiquitine. Ce test a démontré que les cellules déficientes FANCC infectées avec l'ADNc de *FANCC Δ 7* ne démontraient pas de formes longues de FANCD2 à la différence des cellules déficientes infectées avec l'ADNc de *FANCC* sauvage. L'absence de forme ubiquitinée de FANCD2 indique que la voie ne peut s'opérer plus loin sans la bonne localisation du complexe ID monoubiquitiné sur la chromatine au site de lésion. Le mauvais traitement de ses lésions d'ADN (PIBs) peut causer plusieurs problèmes tels que des bris chromosomiques, l'instabilité chromosomique et la mort cellulaire²⁰.

L'une des caractéristiques des cellules AF est le dérèglement du cycle cellulaire comme il a été démontré pour la première fois par Dutrillaux *et al.* en 1982 où un prolongement de la phase G2 était observable dans des lymphocytes de sang périphériques. Les études subséquentes ont confirmé ces observations et démontré un arrêt du cycle cellulaire lorsque les cellules AF étaient

traitées avec des agents chimiques tels que la mitomycine, le diepoxybutane et le cisplatine³⁵. En lien avec le variant d'épissage *FANCCΔ7*, les tests de monoubiquitination ont démontré l'inefficacité du variant à compléter le rôle de *FANCC* sauvage au niveau de la réparation de l'ADN et donc ceci laisse prévoir des complications dans le cycle cellulaire. Les tests de cytométrie de flux sur les cellules déficientes *HSC536*, *HSC536/FANCCwt*, *HSC536/FANCCΔ 7* et *HSC536/pMSCVpuro* ont été très révélateurs à ce sujet. En effet, les *HSC536* non infectées, infectées avec le variant *FANCCΔ 7* et celles infectées avec le vecteur viral vide *pMSCVpuromycine* ont toutes démontré un profil de cycle cellulaire semblable. Dans les 3 cas ce dernier est perturbé. L'ajout de l'agent pontant MMC cause une forte accumulation en phase G2/M et cause un arrêt dans la progression du cycle cellulaire. Toutefois, un patron différent est observable chez les cellules infectées avec *FANCC* sauvage chez lesquelles on remarque un ralentissement en phase S. Ce phénomène s'explique par le fait que c'est à ce stage (S) que la majorité des opérations de réparations d'ADN prennent place^{181,182}. La cellule ralentit ainsi son cycle cellulaire afin de permettre la réparation des lésions présentes dans son ADN. Le blocage en G2/M permet d'empêcher les cellules ayant des lésions dans leur matériel génétique de progresser en phase M. En lien avec ces observations, il a été rapporté que les cellules AF déficientes au niveau du complexe I aurait une défaillance à un point de contrôle en phase S qui semblerait être spécifique aux dommages causés par les PIBs⁵¹. D'observer ce ralentissement en phase S seulement chez les cellules déficientes complémentées avec *FANCC* sauvage vient corroborer cette affirmation. C'est une autre évidence pointant vers la défaillance du variant *FANCCΔ7* à interagir avec le complexe I de la voie FANC-BRCA. Aux temps plus avancés des tests de cytométrie de flux, on observe une certaine accumulation en phase G2/M aussi chez les cellules infectées avec *FANCC* sauvage. Il est à noter que les doses de MMC utilisées dans cette expérimentation sont élevées et soutenues durant un temps considérable. Malgré la complémentation par le gène sauvage, il est très probable que les cellules ne puissent être en mesure d'éradiquer totalement les dommages causés par ces doses d'agents pontants. Elles permettent toutefois de bien voir la différence entre les patrons des cycles cellulaires des cellules infectées par le variant d'épissage *FANCCΔ 7* et celui des cellules infectées avec

FANCC sauvage. Les cellules complémentées par le gène sauvage voient leur progression au niveau du cycle cellulaire possible et subissent un niveau plus bas de mort cellulaire. C'est tout le contraire chez les cellules infectées avec *FANCCΔ 7*, non infectées et infectées avec le virus vide où le blocage persiste avec le temps et donne lieu à beaucoup de mort cellulaire.

Comme il a déjà été mentionné, les cellules testées pour la cytométrie de flux furent traitées avec des doses importantes de MMC. Dans une optique semblable, les tests de survie avec le protocole de l'Alamare Blue ont permis d'observer la façon dont les cellules HSC536 infectées ou non répondaient aux traitements à la MMC et ce, à des concentrations différentes. Les résultats sont plutôt éloquentes, le variant *FANCCΔ 7* ne confère pas d'avantage en terme de protection contre les agents pontants. Déjà à faibles doses de MMC, les cellules infectées avec le variant *FANCCΔ 7* suivent le même patron de survie que celles non infectées ou infectées avec le virus vide. Possiblement que les dommages accumulés dans ces cellules ne peuvent être réparés et que le blocage persistant du cycle cellulaire en G2/M mènerait les cellules à l'apoptose.

En somme, à la lumière de ces résultats, il est plausible d'affirmer que le variant d'épissage *FANCCΔ 7* est incapable de compléter le rôle de l'isoforme sauvage au niveau de la réparation de l'ADN avec la voie FANC-BRCA. Ce variant est omniprésent dans les tissus et nombreuses lignées de différentes provenances testées, cette ubiquité s'accorderait étrangement avec une inutilité à la cellule. Cependant, de savoir son inefficacité en terme de réparation de l'ADN donne un aspect important lorsque l'on considère les ratios de formes épissées $\Delta 7$ et sauvages. La présente étude s'est concentrée exclusivement à l'implication possible du variant *FANCCΔ 7* dans la réparation de l'ADN mais *FANCC* est aussi très impliqué dans la défense contre le stress oxydatif et l'apoptose au niveau du cytoplasme. Ainsi, il serait très intéressant de pousser l'analyse de ce variant d'épissage sous ces différentes implications notamment au niveau de la kinase PKR avec la chaperonne HSP70 ou encore s'il est en mesure d'empêcher l'inactivation de GSTP1 en situation de stress oxydatifs.

PERSPECTIVES

FANCC est aussi très impliqué au niveau du cytoplasme où il participe à plusieurs mécanismes de défense dont la protection contre les stress oxydatifs et la production de ROS^{150,151,153,155,156,158,160,183-185} ainsi que la protection contre l'apoptose^{149,159,161,180}. Ayant démontré par cette étude que le variant d'épissage FANCCΔ7 n'est pas impliqué au niveau de la réparation de l'ADN, son ou ses rôles sont peut-être orientés vers le cytoplasme de la cellule, la localisation prédominante de ce variant. Sachant que la région protéique de FANCC encodée par l'exon 7 lorsqu'exclue vient scinder certains domaines d'interactions (domaines interagissant avec HSP70 et GRP94 par exemple), savoir si ces derniers sont toujours actifs serait très révélateur à l'égard de ses fonctions possibles dans le cytoplasme. Dans un autre ordre d'idées, il serait aussi intéressant de confirmer les interactions non touchées par l'exclusion de l'exon 7 telle celle entre FANCC et la kinase cycline-dépendante Cdc2. De vérifier si le variant FANCCΔ7 est en mesure de soutenir l'état phosphorylé de Cdc2 au niveau de la tyrosine 15 serait important puisque cet état est nécessaire au bon maintien du point de contrôle G2/M du cycle cellulaire¹⁸⁶.

Au cours des analyses de localisation cellulaire du gène sauvage et du variant FANCCΔ7, une localisation récurrente chez les deux isoformes a retenu notre attention. Au premier coup d'oeil, cette dernière semblait indiquer une localisation au niveau des centrosomes. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé BRCA1 pour l'identification de ces derniers¹⁸⁷. Des co-immunofluorescences ont démontré qu'il y avait co-localisation entre FANCCΔ7 et FANCCwt avec BRCA1, une localisation qui a été ensuite confirmée par microscopie confocale. Cette observation n'a jamais été rapportée auparavant. Ces observations pourraient donc être les premières preuves d'une implication possible entre FANCC ainsi que son variant d'épissage FANCCΔ7 avec BRCA1 au niveau des centrosomes. La présence de FANCC n'exclue pas la présence de d'autres FANCCs, permettant d'émettre l'hypothèse d'un possible rôle auxiliaire du complexe ou d'une partie du complexe I au niveau des centrosomes. Comme FANCCΔ7 ne semble pas être impliqué avec ce complexe, sa localisation au niveau de ces structures soulève bien des interrogations. Des anomalies au niveau des centrosomes peuvent mener à la mauvaise ségrégation des chromosomes pouvant causer l'aneuploïdie. Comme ils sont impliqués dans la régulation des changements de phase dans le cycle cellulaire, leur dérèglement peut affecter la prolifération cellulaire¹⁸⁸. Sachant que ces troubles liés aux centrosomes sont associés à

certains cas de cancers et de tumeurs, notamment de cancer du sein¹⁸⁸, pousser d'avantage l'analyse de ces régions et des possibles implications de FANCC et de son variant d'épissage FANCC Δ 7 apparait comme une avenue d'étude forte intéressante. Il serait aussi très intéressant d'intégrer un volet *in vivo* au projet en utilisant un modèle animal (i.e souris) afin d'étudier les impacts du variant d'épissage FANCC Δ 7 sur l'organisme. Comme FANCC possède de multiples rôles dans la cellule, il serait pertinent de pouvoir identifier la ou les voies affectées par le variant FANCC Δ 7 dans un contexte *in vivo*. Ces expérimentations seraient d'autant plus pertinentes sachant qu'il a été démontré dans la littérature qu'un épissage alternatif du gène *FANCL*, dénommé *FAVL*, qui lorsqu'exprimé, augmente la croissance tumorale, promeut l'instabilité génétique en plus d'inhiber la voie FANC-BRCA¹³⁰.

Somme toute, l'ensemble de ce travail démontre la complexité de l'épissage alternatif. Ce concept est encore jeune et sous étudié et nous commençons seulement à en connaître les bases. Toutefois, les implications de ce mécanisme dans l'organisme tant au niveau physiologique que pathologique sont bien présentes. De caractériser et comprendre ces différents événements dans des gènes impliqués dans des mécanismes majeurs de la cellule tel que celui de la réparation de l'ADN chez les gènes FANCs en est un bon exemple. Ces efforts de recherches permettront de pousser plus loin notre compréhension des phénomènes et mécanismes moléculaires qui régissent notre matériel génétique et qui préservent notre intégrité génique. Cette probité génétique qui, lorsque flouée, est fortement corrélée avec le cancer et la tumorigenèse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Friedman R. *Cdn Cancer Stats 2011E*.vp. 2011:1–135.
2. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*. 2006;25(43):5898–5905.
3. Liu DJ, Leal SM. A novel adaptive method for the analysis of next-generation sequencing data to detect complex trait associations with rare variants due to gene main effects and interactions. *PLoS Genet*. 2010;6(10):e1001156.
4. Antoniou AC, Beesley J, McGuffog L, et al. Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Research*. 2010;70(23):9742–9754.
5. Antoniou AC, Pharoah PDP, McMullan G, et al. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br. J. Cancer*. 2002;86(1):76–83.
6. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 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):1389–1399.
7. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000;321(7261):624–628.
8. Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature Publishing Group*. 2008;40(1):17–22.
9. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:321–345.
10. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*. 2002;297(5581):606–609.
11. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, et al. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat. Genet*. 2005;37(9):934–935.
12. Levrán O, Attwooll C, Henry RT, et al. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet*. 2005;37(9):931–933.

13. Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat. Genet.* 2007;39(2):159–161.
14. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat. Genet.* 2007;39(2):162–164.
15. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia–like disorder. *Nature Publishing Group.* 2010;42(5):406–409.
16. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature Publishing Group.* 2010;42(5):410–414.
17. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet.* 2001;2(6):446–457.
18. Berwick M, Satagopan JM, Ben-Porat L, et al. Genetic Heterogeneity among Fanconi Anemia Heterozygotes and Risk of Cancer. *Cancer Research.* 2007;67(19):9591–9596.
19. Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2009;668(1-2):4–10.
20. Neveling K, Endt D, Hoehn H, Schindler D. Genotype–phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2009;668(1-2):73–91.
21. Moldovan G-L, D'Andrea AD. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annu. Rev. Genet.* 2009;43(1):223–249.
22. Lichiardopol C, Militaru C, Popescu B, Hila G, Mixich F. Holt-Oram syndrome. *Rom J Morphol Embryol.* 2007;48(1):67–70.
23. Miller EM, Hopkin R, Bao L, Ware SM. Implications for genotype-phenotype predictions in Townes-Brocks syndrome: case report of a novel SALL1 deletion and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. A.* 2012;158A(3):533–540.
24. Casper AM, Durkin SG, Arlt MF, Glover TW. Chromosomal instability at common fragile sites in Seckel syndrome. *The American Journal of Human Genetics.* 2004;75(4):654–660.

25. Chrzanowska KH, Gregorek H, Dembowska-Baginska B, Kalina MA, Digweed M. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7(1):13.
26. New HV, Cale CM, Tischkowitz M, et al. Nijmegen breakage syndrome diagnosed as Fanconi anaemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2005;44(5):494–499.
27. Ball S. Diamond Blackfan anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:487–491.
28. Akbari MR, Malekzadeh R, Lepage P, et al. Mutations in Fanconi anemia genes and the risk of esophageal cancer. *Hum Genet.* 2011;129(5):573–582.
29. D'Andrea A. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2010.
30. Ghosh A, Ghosh S, Maiti GP, et al. Association of FANCC and PTCH1 with the Development of Early Dysplastic Lesions of the Head and Neck. *Ann Surg Oncol.* 2011.
31. Dokal I. Fanconi anemia is a highly penetrant cancer susceptibility syndrome. *Haematologica.* 2008;93(4):486–488.
32. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood.* 2003;101(3):822–826.
33. Pang Q, Andreassen PR. Fanconi anemia proteins and endogenous stresses. *Mutat. Res.* 2009;668(1-2):42–53.
34. Du W, Adam Z, Rani R, Zhang X, Pang Q. Oxidative Stress in Fanconi Anemia Hematopoiesis and Disease Progression. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2008;10(11):1909–1921.
35. Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. 2011:1–14.
36. Muniandy PA, Liu J, Majumdar A, Liu S-T, Seidman MM. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2010;45(1):23–49.
37. Newell AEH, Akkari YMN, Torimaru Y, et al. Interstrand crosslink-induced radicals form between non-homologous chromosomes, but are absent in sex chromosomes. *DNA Repair.* 2004;3(5):535–542.

38. Crossan GP, Patel KJ. The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. *J. Pathol.* 2011.
39. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood.* 1994;84(5):1650–1655.
40. Macé G, Briot D, Guervilly J-H, Rosselli F. [Fanconi anemia: cellular and molecular features]. *Pathol. Biol.* 2007;55(1):19–28.
41. Tönnies H, Huber S, Kuhl J-S, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood.* 2003;101(10):3872–3874.
42. Eastman A. Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry.* 1986;25(13):3912–3915.
43. Niedernhofer LJ, Lalai AS, Hoeijmakers JHJ. Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell.* 2005;123(7):1191–1198.
44. Heck HD, Casanova M. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2004;40(2):92–106.
45. Ridpath JR, Nakamura A, Tano K, et al. Cells deficient in the FANCM/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde. *Cancer Research.* 2007;67(23):11117–11122.
46. Kee Y, D'Andrea AD. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes & Development.* 2010;24(16):1680–1694.
47. Ciccia A, Ling C, Coulthard R, et al. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Molecular Cell.* 2007;25(3):331–343.
48. Kim JM, Kee Y, Gurtan A, D'Andrea AD. Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. *Blood.* 2008;111(10):5215–5222.
49. Singh TR, Saro D, Ali AM, et al. MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM. *Molecular Cell.* 2010;37(6):879–886.
50. Yan Z, Delannoy M, Ling C, et al. A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. *Molecular Cell.* 2010;37(6):865–878.

51. Thompson LH, Hinz JM. Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: Mechanistic insights. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009;668(1-2):54–72.
52. Collis SJ, Ciccia A, Deans AJ, et al. FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. *Molecular Cell*. 2008;32(3):313–324.
53. Garner E, Smogorzewska A. Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway. *FEBS LETTERS*. 2011:1–8.
54. Garcia-Higuera I, Kuang Y, Denham J, D'Andrea AD. The fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex. *Blood*. 2000;96(9):3224–3230.
55. Medhurst AL, Laghmani EH, Steltenpool J, et al. Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway. *Blood*. 2006;108(6):2072–2080.
56. Léveillé F, Blom E, Medhurst AL, et al. The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein. *J. Biol. Chem.* 2004;279(38):39421–39430.
57. Deans AJ, West SC. FANCM Connects the Genome Instability Disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Molecular Cell*. 2009;36(6):943–953.
58. Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & Development*. 2004;18(16):1958–1963.
59. Ho GPH, Margossian S, Taniguchi T, D'Andrea AD. Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(18):7005–7015.
60. Collins NB, Wilson JB, Bush T, et al. ATR-dependent phosphorylation of FANCA on serine 1449 after DNA damage is important for FA pathway function. *Blood*. 2009;113(10):2181–2190.
61. Wilson JB, Yamamoto K, Marriott AS, et al. FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3. *Oncogene*. 2008;27(26):3641–3652.
62. Qiao F, Mi J, Wilson JB, et al. Phosphorylation of fanconi anemia (FA) complementation group G protein, FANCG, at serine 7 is important for function of the FA pathway. *J. Biol. Chem.* 2004;279(44):46035–46045.

63. Wang X, Kennedy RD, Ray K, Stuckert P, Ellenberger T, D'Andrea AD. Chk1-mediated phosphorylation of FANCE is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(8):3098–3108.
64. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, et al. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell.* 2007;129(2):289–301.
65. Alpi AF, Pace PE, Babu MM, Patel KJ. Mechanistic insight into site-restricted monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. *Molecular Cell.* 2008;32(6):767–777.
66. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 2003;35(2):165–170.
67. Ali AM, Kirby M, Jansen M, et al. Identification and characterization of mutations in FANCL gene: A second case of Fanconi anemia belonging to FA-L complementation group. *Hum. Mutat.* 2009;30(7):E761–E770.
68. Ishiai M, Kitao H, Smogorzewska A, et al. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nature Structural & Molecular Biology.* 2008;15(11):1138–1146.
69. Alpi A, Langevin F, Mosedale G, Machida YJ, Dutta A, Patel KJ. UBE2T, the Fanconi anemia core complex, and FANCD2 are recruited independently to chromatin: a basis for the regulation of FANCD2 monoubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(24):8421–8430.
70. Sareen A, Chaudhury I, Adams N, Sobek A. Fanconi anemia proteins FANCD2 and FANCI exhibit different DNA damage responses during S-phase. *Nucleic Acids Research.* 2012.
71. de Winter JP, Joenje H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2009;668(1-2):11–19.
72. Su X, Huang J. The Fanconi anemia pathway and DNA interstrand cross-link repair. *Protein Cell.* 2011;2(9):704–711.
73. MacKay C, Déclais A-C, Lundin C, et al. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell.* 2010;142(1):65–76.
74. Kratz K, Schöpf B, Kaden S, et al. Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell.* 2010;142(1):77–88.

75. Smogorzewska A, Desetty R, Saito TT, et al. A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Molecular Cell*. 2010;39(1):36–47.
76. Liu T, Ghosal G, Yuan J, Chen J, Huang J. FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science*. 2010;329(5992):693–696.
77. Kuraoka I, Kobertz WR, Ariza RR, Biggerstaff M, Essigmann JM, Wood RD. Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease. *J. Biol. Chem*. 2000;275(34):26632–26636.
78. Hanada K, Budzowska M, Modesti M, et al. The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks. *EMBO J*. 2006;25(20):4921–4932.
79. Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nature Publishing Group*. 2011;43(2):142–146.
80. Stoepker C, Hain K, Schuster B, et al. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nature Publishing Group*. 2011;43(2):138–141.
81. Yamamoto KN, Kobayashi S, Tsuda M, et al. Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(16):6492–6496.
82. Waters LS, Minesinger BK, Wiltrout ME, D'Souza S, Woodruff RV, Walker GC. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2009;73(1):134–154.
83. de Groote FH, Jansen JG, Masuda Y, et al. The Rev1 translesion synthesis polymerase has multiple distinct DNA binding modes. *DNA Repair*. 2011;10(9):915–925.
84. Bienko M, Green CM, Crosetto N, et al. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*. 2005;310(5755):1821–1824.
85. Lawrence CW. Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv. Protein Chem*. 2004;69:167–203.
86. Zhang F, Ma J, Wu J, et al. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr. Biol*. 2009;19(6):524–529.

87. Tischkowitz M, Xia B. PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia. *Cancer Research*. 2010;70(19):7353–7359.
88. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat· Rev· Cancer*. 2012;12(1):68–78.
89. Gupta R, Sharma S, Sommers JA, Jin Z, Cantor SB, Brosh RM. Analysis of the DNA substrate specificity of the human BACH1 helicase associated with breast cancer. *J· Biol· Chem*. 2005;280(27):25450–25460.
90. Zhang F, Fan Q, Ren K, Auerbach AD, Andreassen PR. FANCI/BRIP1 recruitment and regulation of FANCD2 in DNA damage responses. *Chromosoma*. 2010;119(6):637–649.
91. Litman R, Peng M, Jin Z, et al. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell*. 2005;8(3):255–265.
92. Nijman SMB, Huang TT, Dirac AMG, et al. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular Cell*. 2005;17(3):331–339.
93. Huang TT, Nijman SMB, Mirchandani KD, et al. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat· Cell Biol*. 2006;8(4):339–347.
94. Cohn MA, Kowal P, Yang K, et al. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular Cell*. 2007;28(5):786–797.
95. Kee Y, Kim JM, D'Andrea AD, D'Andrea A. Regulated degradation of FANCD1 in the Fanconi anemia pathway during mitosis. *Genes & Development*. 2009;23(5):555–560.
96. Murai J, Yang K, Dejsuphong D, Hirota K, Takeda S, D'Andrea AD. The USP1/UAF1 complex promotes double-strand break repair through homologous recombination. *Mol· Cell· Biol*. 2011;31(12):2462–2469.
97. Kim JM, Parmar K, Huang M, et al. Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. *Dev· Cell*. 2009;16(2):314–320.
98. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature*. 1992;356(6372):763–767.
99. Yamashita T, Wu N, Kupfer G, et al. Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood*. 1996;87(10):4424–4432.

100. Yamashita T, Yagasaki H, Toda T. The IVS4+ 4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. 2000.
101. Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M. A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nat. Genet.* 1993;4(2):202–205.
102. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431(7011):931–945.
103. Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature.* 2008;456(7221):470–476.
104. Barash Y, Calarco JA, Gao W, et al. Deciphering the splicing code. *Nature.* 2010;465(7294):53–59.
105. Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol.* 2004;5(10):R74.
106. Tarn W-Y. Cellular signals modulate alternative splicing. *J. Biomed. Sci.* 2007;14(4):517–522.
107. Blaustein M, Pelisch F, Srebrow A. Signals, pathways and splicing regulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39(11):2031–2048.
108. Lareau LF, Inada M, Green RE, Wengrod JC, Brenner SE. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature.* 2007;446(7138):926–929.
109. Tan S, Guo J, Huang Q, et al. Retained introns increase putative microRNA targets within 3' UTRs of human mRNA. *FEBS LETTERS.* 2007;581(6):1081–1086.
110. Tsukamoto H, Takizawa T, Takamori K, Ogawa H, Araki Y. Genomic organization and structure of the 5'-flanking region of the TEX101 gene: alternative promoter usage and splicing generate transcript variants with distinct 5'-untranslated region. *Mol. Reprod. Dev.* 2007;74(2):154–162.
111. Marden JH. Quantitative and evolutionary biology of alternative splicing: how changing the mix of alternative transcripts affects phenotypic plasticity and reaction norms. *Heredity (Edinb).* 2008;100(2):111–120.

112. Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet.* 2002;18(3):123–127.
113. Srebrow A, Kornblihtt AR. The connection between splicing and cancer. *J. Cell. Sci.* 2006;119(Pt 13):2635–2641.
114. Brinkman BMN. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin. Biochem.* 2004;37(7):584–594.
115. Venables JP. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays.* 2006;28(4):378–386.
116. Nissim-Rafinia M, Kerem B. The splicing machinery is a genetic modifier of disease severity. *Trends Genet.* 2005;21(9):480–483.
117. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & Development.* 2003;17(4):419–437.
118. Ars E, Serra E, García J, et al. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Human Molecular Genetics.* 2000;9(2):237–247.
119. Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M. The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility. *Clin. Exp. Immunol.* 2007;150(1):1–12.
120. Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Molecular analysis of HPV 16 E6I/E6II spliced mRNAs and correlation with the viral physical state and the grade of the cervical lesion. *J. Med. Virol.* 2009;81(7):1276–1282.
121. Maxwell CA, Rasmussen E, Zhan F, et al. RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma. *Blood.* 2004;104(4):1151–1158.
122. Matlin AJ, Clark F, Smith CWJ. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6(5):386–398.
123. Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet.* 2004;5(5):389–396.
124. Skotheim RI, Nees M. Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39(7-8):1432–1449.

125. French PJ, Peeters J, Horsman S, et al. Identification of differentially regulated splice variants and novel exons in glial brain tumors using exon expression arrays. *Cancer Research*. 2007;67(12):5635–5642.
126. Durocher F, Labrie Y, Soucy P, et al. Mutation analysis and characterization of ATR sequence variants in breast cancer cases from high-risk French Canadian breast/ovarian cancer families. *BMC Cancer*. 2006;6:230.
127. Fortin J, Moisan A-M, Dumont M, et al. A new alternative splice variant of BRCA1 containing an additional in-frame exon. *Biochim· Biophys· Acta*. 2005;1731(1):57–65.
128. Desjardins S, Beuparlant JC, Labrie Y, Ouellette G, Durocher F, INHERIT BRCA. Variations in the NBN/NBS1 gene and the risk of breast cancer in non-BRCA1/2 French Canadian families with high risk of breast cancer. *BMC Cancer*. 2009;9:181.
129. Zhang J, Wang X, Lin C-J, Couch FJ, Fei P. Altered expression of FANCL confers mitomycin C sensitivity in Calu-6 lung cancer cells. *Cancer Biol· Ther·* 2006;5(12):1632–1636.
130. Zhang J, Zhao D, Park HK, et al. FAVL elevation in human tumors disrupts Fanconi anemia pathway signaling and promotes genomic instability and tumor growth. *J· Clin· Invest·* 2010;120(5):1524–1534.
131. Hansen TVO, Steffensen AY, Jønson L, Andersen MK, Ejlersen B, Nielsen FC. The silent mutation nucleotide 744 G --> A, Lys172Lys, in exon 6 of BRCA2 results in exon skipping. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119(3):547–550.
132. Guénard F, Labrie Y, Ouellette G, et al. Mutational analysis of the breast cancer susceptibility gene BRIP1 /BACH1/FANCI in high-risk non-BRCA1/BRCA2 breast cancer families. *J· Hum· Genet·* 2008;53(7):579–591.
133. Verhagen MMM, Abdo WF, Willemsen MAAP, et al. Clinical spectrum of ataxia-telangiectasia in adulthood. *Neurology*. 2009;73(6):430–437.
134. Szabo CI, Schutte M, Broeks A, et al. Are ATM mutations 7271T-->G and IVS10-6T-->G really high-risk breast cancer-susceptibility alleles? *Cancer Research*. 2004;64(3):840–843.
135. Gibson R, Hajianpour A. A nonsense mutation and exon skipping in the Fanconi anaemia group C gene. *Human molecular Genetics*, 1993;2(6):707-799.
136. Palagyi A, Neveling K, Plinninger U, et al. Genetic inactivation of the Fanconi anemia gene FANCC identified in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 confers sensitivity towards DNA-interstrand crosslinking agents. *Mol Cancer*. 2010;9(1):127.

137. Ten Foe Lo JR, Kruyt FA, Zweekhorst MB, et al. Exon 6 skipping in the Fanconi anemia C gene associated with a nonsense/missense mutation (775C-->T) in exon 5: the first example of a nonsense mutation in one exon causing skipping of another downstream. *Hum. Mutat.* 1998;Suppl 1:S25–7.
138. Parker L, Santos dos C, Buchwald M. The delta327 mutation in the Fanconi anemia group C gene generates a novel transcript lacking the first two coding exons. *Hum. Mutat.* 1998;Suppl 1:S275–7.
139. Verlander PC, Lin JD, Udono MU, et al. Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *The American Journal of Human Genetics.* 1994;54(4):595–601.
140. Chen M, Tomkins DJ, Auerbach W, et al. Inactivation of Fac in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat. Genet.* 1996;12(4):448–451.
141. Stoss O, Stoilov P, Hartmann AM, Nayler O, Stamm S. The in vivo minigene approach to analyze tissue-specific splicing. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 1999;4(3):383–394.
142. Cooper TA. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods.* 2005;37(4):331–340.
143. Mašek T, Valášek L, Pospíšek M. Polysome analysis and RNA purification from sucrose gradients. *Methods Mol. Biol.* 2011;703:293–309.
144. Evans RT, Seasholtz AF. Soluble corticotropin-releasing hormone receptor 2alpha splice variant is efficiently translated but not trafficked for secretion. *Endocrinology.* 2009;150(9):4191–4202.
145. Yamashita T, Barber DL, Zhu Y, Wu N, D'Andrea AD. The Fanconi anemia polypeptide FACC is localized to the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(14):6712–6716.
146. Youssoufian H. Localization of Fanconi anemia C protein to the cytoplasm of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(17):7975–7979.
147. Taniguchi T. The Fanconi anemia protein, FANCE, promotes the nuclear accumulation of FANCC. *Blood.* 2002;100(7):2457–2462.
148. Léveillé F, Ferrer M, Medhurst AL, et al. The nuclear accumulation of the Fanconi anemia protein FANCE depends on FANCC. *DNA Repair.* 2006;5(5):556–565.

149. Platzbecker U, Kurre P, Guardiola P, et al. Fanconi anemia type C—deficient hematopoietic cells are resistant to TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-induced cleavage of procaspase-8. *Experimental Hematology*. 2004;32(9):815–821.
150. Castillo P, Bogliolo M, Surralles J. Coordinated action of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia pathways in response to oxidative damage. *DNA Repair*. 2011:1–8.
151. Kruyt FA, Hoshino T, Liu JM, Joseph P, Jaiswal AK, Youssoufian H. Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase. *Blood*. 1998;92(9):3050–3056.
152. Futaki M, Igarashi T, Watanabe S, et al. The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage. *Carcinogenesis*. 2002;23(1):67–72.
153. Kruyt FAE, Youssoufian H. Do Fanconi anemia genes control cell response to cross-linking agents by modulating cytochrome P-450 reductase activity? *Drug Resist. Updat.* 2000;3(4):211–215.
154. Cumming RC, Lightfoot J, Beard K, Youssoufian H, O'Brien PJ, Buchwald M. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat. Med.* 2001;7(7):814–820.
155. Shen H, Tsuchida S, Tamai K, Sato K. Identification of cysteine residues involved in disulfide formation in the inactivation of glutathione transferase P-form by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993;300(1):137–141.
156. Terada T, Maeda H, Okamoto K, Nishinaka T, Mizoguchi T, Nishihara T. Modulation of glutathione S-transferase activity by a thiol/disulfide exchange reaction and involvement of thioltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993;300(1):495–500.
157. Lay AJ, Jiang XM, Kisker O, et al. Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature*. 2000;408(6814):869–873.
158. Fagerlie S, Lensch M, Pang Q, Bagby G. The Fanconi anemia group C gene product: Signaling functions in hematopoietic cells. *Experimental Hematology*. 2001;29(12):1371–1381.
159. Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Koretsky T, Bagby GC. The anti-apoptotic function of Hsp70 in the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. *J. Biol. Chem.* 2002;277(51):49638–49643.

160. Zhang X, Li J, Sejas DP, Rathbun KR, Bagby GC, Pang Q. The Fanconi anemia proteins functionally interact with the protein kinase regulated by RNA (PKR). *J. Biol. Chem.* 2004;279(42):43910–43919.
161. Vanderwerf SM, Svahn J, Olson S, et al. TLR8-dependent TNF- overexpression in Fanconi anemia group C cells. *Blood.* 2009;114(26):5290–5298.
162. Hoshino T, Wang J, Devetten MP, et al. Molecular chaperone GRP94 binds to the Fanconi anemia group C protein and regulates its intracellular expression. *Blood.* 1998;91(11):4379–4386.
163. Fagerlie SR. Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood.* 2001;97(10):3017–3024.
164. Diaz J, Faulkner G, Reifsteck C. The Fanconi anemia complementation group C gene product: structural evidence of multifunctionality. 2001.
165. Kupfer GM, Yamashita T, Naf D, Suliman A, Asano S, D'Andrea AD. The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinase, cdc2. *Blood.* 1997;90(3):1047–1054.
166. Kruyt FA, Dijkmans LM, Arwert F, Joenje H. Involvement of the Fanconi's anemia protein FAC in a pathway that signals to the cyclin B/cdc2 kinase. *Cancer Research.* 1997;57(11):2244–2251.
167. Mi J, Qiao F, Wilson JB, et al. FANCG is phosphorylated at serines 383 and 387 during mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24(19):8576–8585.
168. Ying S, Hickson ID. Fanconi anaemia proteins are associated with sister chromatid bridging in mitosis. *Int J Hematol.* 2011;93(4):440–445.
169. Hoffelder DR, Luo L, Burke NA, Watkins SC, Gollin SM, Saunders WS. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma.* 2004;112(8):389–397.
170. Chan K-L, North PS, Hickson ID. BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J.* 2007;26(14):3397–3409.
171. Chan K-L, Palmai-Pallag T, Ying S, Hickson ID. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(6):753–760.

172. Niedzwiedz W, Mosedale G, Johnson M, Ong CY, Pace P, Patel KJ. The Fanconi Anaemia Gene FANCC Promotes Homologous Recombination and Error-Prone DNA Repair. *Molecular Cell*. 2004;15(4):607–620.
173. Wang LC, Gautier J. The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2010;45(5):424–439.
174. Kitao H, Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol*. 2011;93(4):417–424.
175. Shkreta L, Michelle L, Toutant J, Tremblay ML, Chabot B. The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(1):331–340.
176. Walker LC, Whiley PJ, Couch FJ, et al. Detection of splicing aberrations caused by BRCA1 and BRCA2 sequence variants encoding missense substitutions: implications for prediction of pathogenicity. *Hum. Mutat*. 2010;31(6):E1484–505.
177. Hofmann W, Horn D, Hüttner C, Classen E, Scherneck S. The BRCA2 variant 8204G>A is a splicing mutation and results in an in frame deletion of the gene. *J. Med. Genet*. 2003;40(3):e23.
178. Zou JP, Hirose Y, Siddique H, Rao VN, Reddy ES. Structure and expression of variant BRCA2a lacking the transactivation domain. *Oncol Rep*. 1999;6(2):437–440.
179. de Winter J, Leveille F, van Berkel C, et al. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67(5):1306–1308.
180. Fagerlie SR, Diaz J, Christianson TA, et al. Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood*. 2001;97(10):3017–3024.
181. Heinrich MC, Hoatlin ME, Zigler AJ, et al. DNA cross-linker-induced G2/M arrest in group C Fanconi anemia lymphoblasts reflects normal checkpoint function. *Blood*. 1998;91(1):275–287.
182. Mi J. The Fanconi anemia core complex associates with chromatin during S phase. *Blood*. 2005;105(2):759–766.
183. Pang Q, Keeble W, Christianson TA, Faulkner GR, Bagby GC. FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *EMBO J*. 2001;20(16):4478–4489.

184. Pagano G, Youssoufian H. Fanconi anaemia proteins: major roles in cell protection against oxidative damage. *Bioessays*. 2003;25(6):589–595.
185. Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem· Pharmacol·* 2004;67(3):539–546.
186. Freie BW, Ciccone SLM, Li X, et al. A role for the Fanconi anemia C protein in maintaining the DNA damage-induced G2 checkpoint. *J· Biol· Chem·* 2004;279(49):50986–50993.
187. Kais Z, Barsky SH, Mathsyaraja H, et al. KIAA0101 interacts with BRCA1 and regulates centrosome number. *Mol· Cancer Res·* 2011;9(8):1091–1099.
188. Olson JE, Wang X, Pankratz VS, et al. Centrosome-related genes, genetic variation, and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat·* 2011;125(1):221–228.
189. Desjardins S, Ouellette G, Labrie Y, INHERIT BRCAs, Durocher F (2008). Genomic sequence and transcript variations of the FANCA gene in non-BRCA1/2 families with high risk of breast cancer. Twentieth Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Hilton Hotel and Conference Center, 4-7 October, Eugene, Oregon, USA.
190. Joly Beuparlant C, Desjardins S, Ouellette G, Labrie Y, INHERIT BRCAs, Durocher F (2008). Characterization and analyses of sequence variations in the FANCC gene on breast cancer susceptibility in affected French-Canadian women from families with a high risk of breast cancer. Twentieth Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Hilton Hotel and Conference Center, 4-7 October, Eugene, Oregon, USA.
191. P.F. Giampietro, P.C. Verlander, A. Maschan, J.G. Davis, A.D. Auerbach, Fanconi anemia: a model for somatic gene mutation during development, *Am· J· Med· Genet·* 52 (1994) 36–37.
192. Swift M. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. *Nature·* 1971;230(5293):370–373.