

ANNE-MARIE DION-CÔTÉ

**PALB2, UNE PROTÉINE À LA CROISÉE DE
L'ANÉMIE DE FANCONI, DU CANCER DU SEIN
ET DE LA RÉPARATION DE L'ADN**
Caractérisation biochimique

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître es Sciences (M. Sc.)

BIOLOGIE MÉDICALE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

© Anne-Marie Dion-Côté, 2010

Résumé

L'anémie de Fanconi est une maladie génétique récessive rare se manifestant par des troubles développementaux, sanguins, et une prédisposition à certains cancers. Les cellules de patients montrent une sensibilité élevée aux agents causant des ponts inter-brins dans l'ADN, dont la réparation implique l'activation de la recombinaison homologue.

La présence de PALB2, mutée dans l'anémie de Fanconi, est nécessaire pour la localisation chromatiniennne de BRCA2 et RAD51, en réponse aux dommages à l'ADN. Comme BRCA2, PALB2 est un gène de prédisposition au cancer du sein. Il devient important de mieux comprendre le rôle de PALB2/FANCN dans la recombinaison homologue.

Nous avons entrepris la caractérisation de l'activité biochimique de PALB2 en la purifiant, de même qu'un mutant associé au cancer du sein, PALB2Q775X, afin de clarifier son rôle dans la réparation de l'ADN. Les données obtenues suggèrent que PALB2 possède les caractéristiques d'un médiateur de la recombinaison homologue, ce qui en fait une cible privilégiée dans le développement de thérapies anticancéreuses dans le futur.

Avant-propos

La réalisation de mes travaux de maîtrise présentait le défi important d'être un nouveau champ d'intérêt pour le laboratoire. Jean-Yves, merci de m'avoir donné la possibilité de contribuer à un si beau projet, tant par sa complexité technique qu'intellectuelle. Je ne peux également passer sous silence ton écoute et ton support de tous les moments, tant aux plans scientifique que personnel. Merci également de m'avoir donné la chance de participer à un congrès d'envergure internationale et de découvrir un coin d'Amérique un peu particulier. J'espère que l'avenir saura t'apporter les fruits de ton travail acharné.

Yan, je souhaite te remercier pour ton support incomparable et ta présence essentielle au bon fonctionnement humain et scientifique du laboratoire. Julien, ton sens de l'humour, ta présence d'esprit et même tes compétences scientifiques (!) auront fait de toi un collègue exceptionnel. Amélie, tu as été pour moi une présence féminine essentielle et j'ai beaucoup apprécié ton aide. Hélène, tu auras été une aide technique précieuse et une amie importante. Karine, merci pour l'énergie nouvelle apportée au laboratoire et ton amitié désormais précieuse. Un merci tout spécial à Gilles pour son travail assidu et son sourire. Rémi, je te lève mon chapeau pour l'énergie fournie à la continuité de ce projet d'envergure; je te souhaite le meilleur des succès et j'espère que le futur nous réserve, à nous et notre « bébé », de belles surprises. Merci aussi pour ta précieuse contribution à la correction de ce mémoire.

Je tiens à remercier ceux qui ont quitté le laboratoire, en particulier Ugo pour l'immense plaisir que j'ai eu à travailler avec toi. Constance, Michel, Charles-Olivier, Mathilde, Emilie et Guillaume, merci pour votre précieux support tout au long de mes études, et durant ma maîtrise. Vous m'avez permis chacun à votre façon de donner le meilleur de moi-même, surtout dans les moments les plus difficiles.

Enfin, merci à nos collaborateurs Alicja et Andrzej Stasiak pour la microscopie, Bing Xia pour ses précieux conseils et contributions multiples, et bien entendu Éric Paquet pour son support bio-informatique et son sens de l'humour décapant. En terminant, je tiens à remercier sincèrement La Société de Recherche sur le Cancer qui a accepté de subventionner la continuité de ces travaux de recherche.

*À tous ceux qui ont alimenté ma
curiosité.*

Table des matières

Résumé.....	i
Avant-propos	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	iii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	x
Introduction	1
1. <i>Stress génotoxique et conséquences</i>	1
1.1. Oncogénèse et gènes impliqués.....	2
1.1.1. Les oncogènes.....	3
1.1.2. Les suppresseurs de tumeur : <i>gatekeepers</i> et <i>caretakers</i>	3
1.2. Un cas précis : le cancer du sein et gènes de susceptibilité	4
2. <i>L'anémie de Fanconi</i>	5
2.1. Phénotype clinique	5
2.2. Phénotype cellulaire	7
2.3. La réparation des ICL.....	8
2.4. La voie de Fanconi.....	9
2.4.1. Le groupe I : Le complexe cœur	10
2.4.2. Le groupe II : Les paralogues FANCD2 et FANCI.....	12
2.4.3. Le groupe III : FANCD1, FANCI et FANCN.....	14
3. <i>Les cassures double-brin de l'ADN</i>	15
3.1. La recombinaison homologue	17
3.1.1. La réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue.....	17
3.1.2. La signalisation associée à la recombinaison homologue	19
3.2. La recombinase RAD51.....	21
3.2.1. Caractéristiques biochimiques.....	21
3.2.2. Importance des médiateurs.....	22
3.3. Les médiateurs de RAD51.....	23
3.3.1. Les médiateurs RPA et RAD52	23
3.3.2. BRCA2, un régulateur important de RAD51.....	24
3.3.3. Caractéristiques de BRCA2	25
3.3.4. Interaction entre BRCA2 et RAD51 et régulation de la fonction de RAD51.....	26
3.3.4.1. Régulation de RAD51 par le domaine C-terminal de BRCA2	26
3.3.4.2. Régulation de RAD51 par les domaines BRC de BRCA2	27
3.4. Rôle de BRCA1 en recombinaison homologue	29
3.4.1. BRCA1, une E3-ubiquitine-ligase orpheline.....	29
3.4.2. BRCA1, une plate-forme de coordination de la recombinaison homologue.....	30
3.4.3. La signalisation associée à BRCA1	31
4. <i>PALB2 : Partner and localizer of BRCA2</i>	32
4.1. PALB2, un nouveau partenaire de BRCA2	32
4.2. PALB2, un gène de susceptibilité aux cancers du sein et du pancréas.....	33
4.3. PALB2 ou FANCN, un gène de l'anémie de Fanconi	36
5. <i>Objectifs des travaux de maîtrise</i>	37
5.1. Problématique	37
5.2. Objectif général	37
5.2.1. Objectif spécifique 1	38
5.2.2. Objectif spécifique 2.....	38

5.2.3. Objectif spécifique 3.....	38
Matériels et méthodes.....	39
1. Purification de PALB2 humaine en cellules d'insecte Sf9.....	39
1.1. Construction des plasmides d'expression en cellules d'insecte.....	39
1.2. Génération du bacmide recombinant.....	41
1.3. Transfection des cellules d'insecte Sf9.....	43
1.4. Amplification du virus.....	43
1.5. Expression de la protéine recombinante.....	44
1.6. Production de PALB2 recombinante.....	44
1.7. Purification sur colonne Talon.....	44
1.8. Purification sur échangeuse d'ions Q sepharose.....	46
2. Purification de RAD51 humaine en bactérie.....	47
3. Co-précipitation en cellules humaines.....	48
3.1. Transfection des cellules HEK 293T.....	48
3.2. Lyse et co-précipitation.....	48
3.3. SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.....	49
4. Immunoprécipitation de RAD51 en Sf9.....	49
5. Filtration sur gel.....	50
5.1. Les standards de poids moléculaire.....	50
5.2. Filtration sur gel de la protéine PALB2 purifiée.....	50
5.3. Filtration sur gel d'extraits de cellules Sf9.....	50
5.4. Filtration du gel d'extraits de cellules humaines.....	51
6. Essais de retard sur gel.....	51
6.1. Préparation de la sonde d'ADN simple brin (ADNsb).....	51
6.2. Appariement d'oligonucléotides complémentaires.....	52
6.3. Purification des sondes sur gel d'acrylamide.....	52
6.4. Dosage des sondes au compteur à scintillation.....	52
6.5. Titration de PALB2 et retard sur gel d'acrylamide.....	53
6.6. Titration de PALB2 et retard sur gel d'agarose.....	53
6.7. Retard sur gel d'agarose en présence d'un anticorps.....	54
7. Essai de réappariement de duplex d'ADN.....	54
7.1. Préparation du substrat.....	54
7.2. Réaction de réappariement d'ADN.....	54
8. Essai d'échange de brin.....	55
9. Microscopie électronique.....	55
10. Recherche bio-informatique d'un domaine de liaison à l'ADN.....	56
Résultats.....	58
1. Purification de PALB2 recombinante.....	58
2. Formation de multimères.....	60
2.1. Filtration sur gel.....	61
2.2. Co-précipitation de PALB2 en cellules humaines.....	63
2.3. Microscopie électronique.....	64
3. Comportement de PALB2 sur l'ADN.....	66
3.1. PALB2 préfère l'ADN simple-brin.....	66
3.2. Identification d'un domaine de liaison à l'ADN par le logiciel BindN.....	70
4. Activité de réappariement de l'ADN.....	71
5. Échange de brin.....	73
6. PALB2 interagit directement avec RAD51.....	74
Discussion.....	77

1. <i>PALB2 forme des interactions homotypiques</i>	77
2. <i>PALB2 lie l'ADN</i>	79
3. <i>PALB2 stimule l'échange de brin catalysé par RAD51</i>	81
4. <i>PALB2 interagit directement avec RAD51</i>	82
5. <i>Modèle proposé</i>	82
5.1. <i>PALB2, un médiateur de la recombinaison homologue</i>	83
5.2. <i>Recrutement de PALB2 et des protéines de l'anémie de Fanconi</i>	84
5.3. <i>Recrutement des protéines de la recombinaison homologue</i>	84
5.4. <i>Collaboration entre les protéines de l'anémie de Fanconi et de la recombinaison homologue</i>	87
6. <i>Relation avec le phénotype</i>	88
Conclusion et implications futures	90
Bibliographie	92

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des protéines de l'anémie de Fanconi.....	10
Tableau 2 : Amorces utilisées pour le clonage des différentes constructions de PALB2 et la formation des différents substrats utilisés en essais de retard sur gel.	57

Liste des figures

Figure 1 : Différents types de dommages et les voies de réparation associées.....	2
Figure 2 : Phénotypes clinique de l'anémie de Fanconi et micrographies de chromosomes anormaux provenant de patients atteints.....	6
Figure 3 : Réparation des ICL.....	9
Figure 4 : Activation de la voie de Fanconi et réparation des ponts inter-brins.	12
Figure 5 : Représentation schématique des étapes de la recombinaison homologue..	18
Figure 6 : Signalisation associée à la réparation des dommages à l'ADN en phases S et G2/M.	20
Figure 7 : Micrographie électronique du nucléofilament hélicoïdal de hRAD51.....	22
Figure 8 : Système d'étude de la recombinaison homologue DR-GFP.	24
Figure 9 : Structure schématique de BRCA2.....	26
Figure 10 : Quelques-uns des partenaires de BRCA1 impliqués en recombinaison homologue.....	31
Figure 11 : La présence de PALB2 est critique pour l'efficacité de la recombinaison homologue.....	33
Figure 12 : Détection des foyers de RAD51 par immunofluorescence en réponse à la mitomycine C.....	36
Figure 13 : Carte du plasmide pCR-Blunt II-TOPO®.....	39
Figure 14 : Vecteur pFastBac TM 1 et pET-52b(+).	40
Figure 15 : Système d'expression Bac-to-Bac®.....	42
Figure 16 : Principe de la colonne Talon.	45
Figure 17 : Structure de l'imidazole, un compétiteur de l'histidine.	46
Figure 18 : Schéma représentant les étapes suivies pour la purification de PALB2...	47
Figure 19 : Purification de PALB2 (131kDa) sur colonne Talon. La protéine purifiée (250ng) a été déposée sur SDS-PAGE puis colorée au bleu de Coomassie. L'astérisque identifie le fragment de dégradation de PALB2 d'environ 55kDa. L'identité de la protéine purifiée et de son fragment de dégradation a été confirmé par immunobuvardage de type Western anti-PALB2, non montré ici.	59
Figure 20 : SDS-PAGE des protéines purifiées.	60
Figure 21 : Filtration sur gel de PALB2 purifiée.	62
Figure 22 : Filtration sur gel d'extraits de cellules d'insecte exprimant PALB2 et PALB2Q775X.....	62
Figure 23 : Filtration sur gel d'extraits de cellules humaines HSC93.	63
Figure 24 : Co-précipitation de FLAG-PALB2 à l'aide de PALB2-histidine sur résine Talon en cellules HEK 293T.....	64
Figure 25 : Micrographie électronique de PALB2 purifiée.	65
Figure 26 : Activité de liaison à l'ADN de PALB2.....	67
Figure 27 : Activité de liaison à l'ADN de PALB2 et PALB2Q775X sur un substrat d'ADNsb.	68
Figure 28 : Activité de liaison à l'ADN de PALB2 sur un substrat d'ADNsb avec ou sans anticorps résolu dans un gel d'agarose.....	69
Figure 29 : Micrographie électronique de PALB2 en présence d'ADN présentant des extrémités 3'-protubérantes.	70

Figure 30 : Prédiction de domaines de liaison à l'ADN dans la séquence primaire de PALB2 par le logiciel BindN.	71
Figure 31 : Essai de réappariement d'ADN sur un substrat d'ADN de 400pb.	72
Figure 32 : Principe du test d'échange de brin.	73
Figure 33 : Essai d'échange de brin catalysé par RAD51 stimulé par PALB2.	74
Figure 34 : Interaction directe entre PALB2 et RAD51 en Sf9.	75
Figure 35 : Interaction directe entre PALB2 et PALB2Q775X et RAD51 en Sf9.	76
Figure 36 : Modèle actuel de la recombinaison homologe intégrant PALB2.	86
Figure 37 : Principe de l'essai d'immunoprécipitation de chromatine à une cassure double-brin unique.	88

Liste des abréviations

°C : degré Celcius
% : pourcent
AA: acide aminé
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNdb : ADN double-brin
ADNsb : ADN simple-brin
AIO : *All-in-one*
Amp : Ampicilline
ARN : acide ribonucléique
ARNi : ARN interférent
ATP : adénosine triphosphate
BSA : *bovine serum albumine*
CDB : cassure double-brin
CDK : *cyclin-dependant kinase*
Ci : curie
Cm : chloramphénicol
db : double-brin
DMEM : *Dulbecco's modified Eagle medium*
DO : densité optique
DTT : dithiotreitol
E. coli : *Escherichia coli*
EDTA : *ethylenedaminetetraacetic acid*
FBS : *fetal bovine serum*
GM : Grace's Medium
HU : hydroxyurée
Kan : kanamycine
ICL : *Inter-strand crosslink*, pontage inter-brin
IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IR : radiations ionisantes
l : litre
LB : Luria broth
LOH: *loss of heterozygosity*
M : molaire, moles par litre
MCS : *multiple cloning site*
ml : millilitre
 μ g/ml : microgramme par millilitre
 μ l : microlitre
 μ M : micromolaire, micromole par litre
mM : millimolaire, millimole par litre
MMEJ : *microhomology-mediated end joining*
MRN : MRE11-RAD50-NBS1
NER : *nucleotide excision repair*
ng : nanogramme
NHEJ : *non-homologous end joining*

NLS : *nuclear localization signal*

nM : nanomolaire, nanomole par litre

PCR : réaction de polymérase en chaîne (*polymerase chain reaction*)

pH : puissance des ions hydrogène

pI : point isoélectrique

PMSF : phenylmethylnsulphonyl fluoride

RDS : *radio-resistant DNA synthesis*

sb : simple-brin

SDS-PAGE : *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

S.O.C. : *Super optimal broth with catabolite repression*

T4 PNK : T4 polynucléotide kinase

TEA : triéthanolamine

UV : ultraviolet

Introduction

1. Stress génotoxique et conséquences

La structure de l'ADN a été élucidée en 1953 par Watson et Crick (Watson and Crick, 1953). Ils ont d'abord cru que celle-ci était une molécule très stable. Or, on sait maintenant que l'ADN, gardien du code génétique, est soumis à de nombreux stress endogènes et exogènes, de natures physique et chimique. On pense par exemple au rayonnement ultraviolet émis par le soleil, ou encore à l'attaque des bases de l'ADN par le radical superoxyde généré par le métabolisme oxydatif de la mitochondrie (voir Figure 1A). La résultante est que chaque cellule doit faire face à plusieurs milliers de cassures simple-brin et environ une cinquantaine de cassures double-brin par cycle cellulaire, un défi considérable pour la machinerie de réparation de l'ADN (Vilenchik and Knudson, 2003).

Les dommages à l'ADN sont susceptibles d'engendrer divers mécanismes de réparation selon la sévérité et la nature de ceux-ci. Ces mécanismes sont permis par un arrêt du cycle cellulaire, grâce à différents points de contrôle, afin d'évaluer la sévérité du dommage rencontré (voir Figure 1B). Dans bien des cas, le dommage reconnu sera réparé et le cycle pourra se poursuivre. Cependant, il arrive que les dommages soient trop importants ou mal réparés, et la cellule entame alors un programme de mort cellulaire programmée ou apoptose. Néanmoins, il arrive que les mécanismes de surveillance soient surpassés et s'accumulent alors certaines lésions, pouvant conduire au développement de certaines maladies, en particulier le cancer.

Les conséquences d'une mauvaise réparation des dommages à l'ADN sont variables, dépendamment de leur localisation (séquence codante versus non-codante) et de la façon dont la structure et le nombre de chromosomes sont affectés (voir Figure 1C). Ainsi, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une seule cassure double-brin non réparée est létale pour la cellule (Bennett et al., 1993), alors que l'effet d'une délétion de quelques bases au niveau d'une région intergénique peut s'avérer sans conséquences. On comprend donc que l'évolution ait favorisé l'apparition d'une multitude de mécanismes de réparation chez tous les organismes vivants, permettant de restaurer la structure de l'ADN à son état initial (Hoeijmakers, 2001).

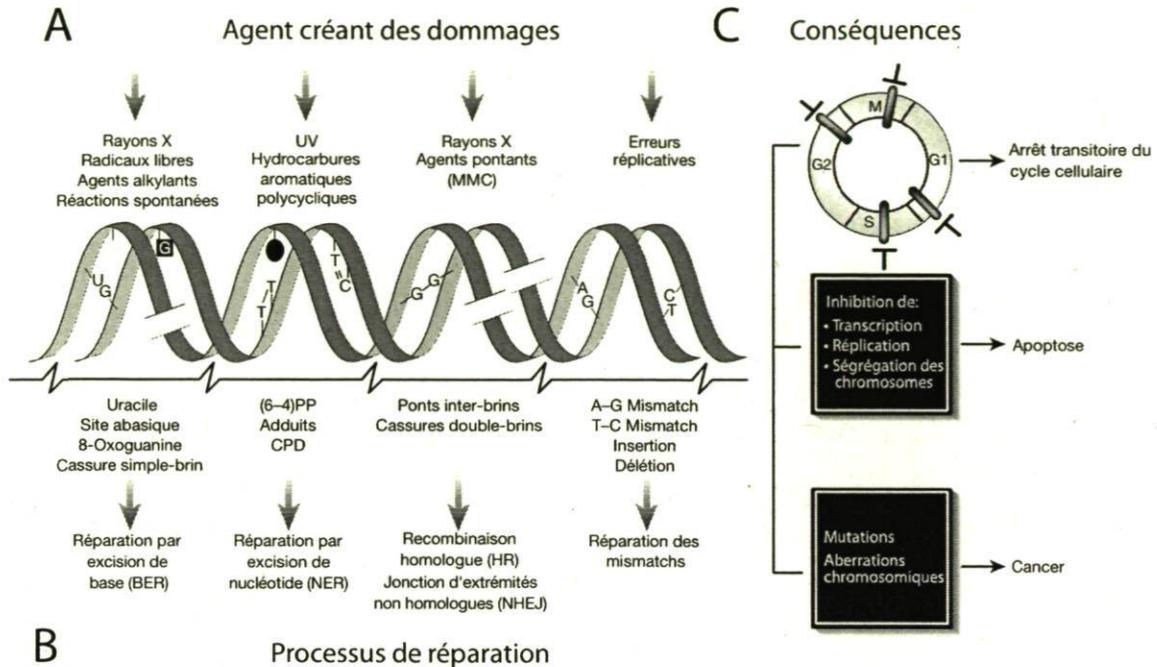


Figure 1 : Différents types de dommages et les voies de réparation associées.

Schéma tiré et adapté de (Hoeijmakers, 2001).

1.1. Oncogénèse et gènes impliqués

Le cancer est une maladie d'origine génétique. Pour devenir cancéreuse, une cellule doit accumuler un certains nombres de mutations dans des gènes clés favorisant l'apparition de caractéristiques bien particulières, par exemple l'insensibilité aux signaux pro-apoptotiques malgré l'accumulation d'aberrations chromosomiques. Deux classes principales de gènes peuvent être affectées, soient les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs, ces derniers comprenant les *caretakers* de même que les *gatekeepers* (Vogelstein and Kinzler, 2004). La dérégulation de ces différents types de gènes peut provenir de la lignée germinale, et donc être transmise à la descendance, ou émerger dans les cellules somatiques. Dans le premier cas, on parlera de prédisposition héréditaire au cancer, tandis qu'il s'agira plutôt de cancer sporadique dans le second. La compréhension des mécanismes régulés par ces différentes classes de gènes favorise une meilleure compréhension du processus tumoral, et a permis à ce jour le développement de nouvelles stratégies d'intervention ciblées.

1.1.1. Les oncogènes

Les oncogènes sont généralement impliqués dans la régulation de la prolifération et de la mort cellulaires. Ceux-ci sont rendus constitutivement actifs, ou actifs dans des circonstances où ils ne devraient pas l'être, et confèrent de façon générale un avantage prolifératif à la cellule. Leur activation rend la cellule « sourde » aux signaux d'arrêt du cycle cellulaire qui dès lors dépend moins de signaux externes (Vogelstein and Kinzler, 2004). Un exemple largement documenté est celui du récepteur transmembranaire ERBB2, impliqué dans le développement du cancer du sein. Dans 18 à 25% des cas de cancer du sein, le gène est amplifié et la protéine surexprimée. L'activation du récepteur a notamment pour effets la prolifération et la survie cellulaire, deux conditions favorables au développement tumoral (Baselga and Swain, 2009).

1.1.2. Les suppresseurs de tumeur : *gatekeepers* et *caretakers*

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont à l'opposé des oncogènes et contribuent à limiter la croissance cellulaire. La mutation du gène conduit à l'inactivation du produit de celui-ci, que ce soit par l'introduction de codons stop, résultant en la production d'une protéine tronquée et inactive, par la mutation de résidus essentiels à l'activité de la protéine, ou même par *silencing* épigénétique. Certains sont dits haplosuffisants, c'est-à-dire que tant les allèles maternel que paternel doivent être mutés pour conférer un avantage à la cellule. À l'opposé, d'autres sont dits haploinsuffisants et la mutation d'un seul allèle est nécessaire pour conférer un avantage sélectif à la cellule. L'exemple le plus connu de suppresseur de tumeur est sans contredit le facteur de transcription p53. Muté dans près de 50% des cas de cancer, sa cible transcriptionnelle la mieux caractérisée est l'inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (*cdk*, *cyclin-dependant kinase*) p21, qui permet l'arrêt du cycle cellulaire à la frontière G1/S (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Les gènes de stabilité, ou *caretakers*, sont d'une certaine façon un sous-type de suppresseurs de tumeurs. De façon générale, la perte ou mutation des deux allèles est requise pour conférer un avantage à la cellule atteinte. En participant au maintien de la stabilité du génome, ils permettent de réduire toute altération du génome au minimum. Ce sont en fait des protéines qui permettent la réparation de l'ADN et l'intégrité des

chromosomes en termes de nombre et de structure, limitant l'apparition d'aneuploïdie et d'aberrations chromosomiques (Vogelstein and Kinzler, 2004). Un bon exemple serait la protéine kinase ATM, activée par les dommages à l'ADN. En réponse à ceux-ci, elle phosphoryle plusieurs centaines de cibles qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation des dommages, limitant ainsi la transmission aux cellules filles de mutations résultant de dommages non ou mal réparés (Matsuoka et al., 2007).

1.2. Un cas précis : le cancer du sein et gènes de susceptibilité

Les gènes suppresseurs de tumeur *BRCA1* et *BRCA2* ont été identifiés et clonés dans les années 1990 suite à des recherches dans des familles présentant un risque élevé de cancer du sein et de l'ovaire. La fréquence des porteurs varie grandement d'une population à l'autre, et on remarquera qu'il existe au Québec certaines mutations récurrentes en raison de l'effet fondateur (Ghadirian et al., 2009). Ce phénomène de réduction de la variabilité génétique résulte de la colonisation d'une région par une petite population. À ce jour, ce sont les deux seuls gènes pour lesquels une forte pénétrance a été prouvée. En effet, le risque cumulatif de développer un cancer du sein à l'âge de 70 ans chez les femmes porteuses d'une mutation de *BRCA1* atteint 50-70%, alors qu'il est de 40-50% pour *BRCA2* (Antoniou et al., 2003). Les cancers chez les porteuses de mutations semblent se développer suite à la perte de l'allèle de type sauvage, un phénomène appelé perte d'hétérozygotie (LOH: *loss of heterozygosity*). Ceci peut se produire par des mutations ou des délétions, mais aussi fréquemment de façon épigénétique par méthylation du promoteur, un mécanisme alternatif d'inactivation du second allèle. Les gènes de susceptibilité au cancer du sein connus (par exemple *BRCA1*, *BRCA2*, *CHK2*, *p53*) n'expliqueraient que 10% des cancers du sein familiaux. Ceci suggère qu'il existe encore un certain nombre d'entre eux à être identifiés, mais il semble peu probable après 15 années de recherche intensive qu'on identifie d'autres gènes dont l'impact sur la susceptibilité au cancer du sein serait aussi important que *BRCA1* et *BRCA2*. On s'attend plutôt à identifier des « combinaisons » de susceptibilité, ce qui éventuellement réduirait la fraction de cas dits sporadiques, qui seraient en fait héréditaires (Foulkes, 2008). Enfin, on remarquera qu'il existe une relation très étroite entre le cancer du sein et une maladie génétique récessive rare, l'anémie de Fanconi, approfondie dans la prochaine section.

2. L'anémie de Fanconi

Cette maladie a été décrite en 1927 par le pédiatre suisse Guido Fanconi qui avait observé plusieurs malformations congénitales jumelées à une anémie aplasique chez les membres d'une fratrie (Fanconi, 1927). L'anémie de Fanconi est une maladie génétique autosomale récessive rare (à l'exception d'un gène, *FANCB*, localisé sur le chromosome X) dont la fréquence des porteurs de mutations est estimée à 1 sur 300, tous groupes de complémentation confondus. On compte à ce jour 13 gènes (*FANCA* à *FANCN*), auxquels correspondent 13 groupes de complémentations FA-A à FA-N, dont la mutation peut conduire au phénotype que l'on connaît et décrit ci-bas. Ces différents groupes sont représentés de façon très hétérogène, sachant que le groupe A représente entre 60 et 80% des patients, suivi de FA-C et FA-G (Levitus et al., 2006).

2.1. Phénotype clinique

Les patients atteints de l'anémie de Fanconi présentent certaines caractéristiques cliniques, qui varient toutefois énormément d'un individu à l'autre. On note parfois différents types de malformations congénitales telles que des anomalies du pouce et du radius, des défauts de pigmentation et des retards de croissance (voir Figure 2A à C). On remarque fréquemment des anomalies rénales, telles que des aplasies ou des reins en forme de fer à cheval. On retrouve également une aplasie médullaire conduisant à une pancytopénie, un état où tous les éléments sanguins sont réduits. On associe l'anémie de Fanconi à un risque cumulatif élevé de développer un cancer, soit environ 30%, le plus souvent une leucémie myéloïde aigüe (risque 15000 fois plus élevé que dans la population en général), mais aussi des tumeurs solides, principalement au niveau de la tête et du cou. Les thérapies actuelles ne visent qu'à améliorer l'état aplasique des patients, principalement par traitement androgénique et greffe de moelle osseuse, la seule façon d'y remédier définitivement (Gluckman et al., 1995). L'espérance de vie des patients atteints serait d'environ 15 à 20 ans, le décès survenant le plus souvent des suites de l'état aplasique de la moelle osseuse (Levitus et al., 2006).

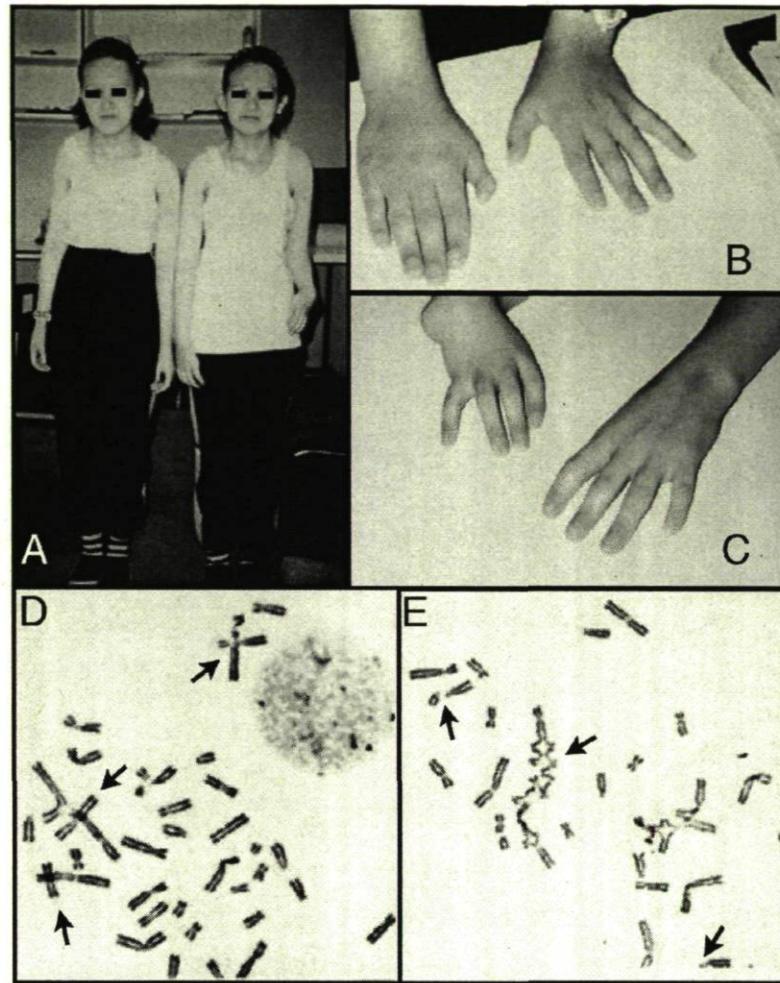


Figure 2 : Phénotypes clinique de l'anémie de Fanconi et micrographies de chromosomes anormaux provenant de patients atteints.

A. Jumelles du groupe de complémentation FA-A âgées de 15 ans. B. et C. Anomalies congénitales au niveau du pouce et du radius chez ces deux patientes. D. Étalement métaphasique de lymphocytes d'un patient atteint de l'anémie de Fanconi et montrant plusieurs aberrations chromatiniennes spontanées, notamment des chromosomes quadri-radiaux montrés par des flèches. E. Étalement métaphasique de lymphocytes d'un patient atteint de anémie de Fanconi et traités au diépoxybutane, un agent pontant de l'ADN. On observe plusieurs bris et échanges entre chromatides, montrés par des flèches. Images tirées et adaptées de (Auerbach, 2009).

2.2. Phénotype cellulaire

Malgré une étonnante hétérogénéité phénotypique chez les patients atteints de anémie de Fanconi, le phénotype cellulaire est remarquablement homogène. Les lymphocytes prélevés chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi montrent une instabilité chromosomique élevée, se traduisant par des bris et des échanges entre chromatides, ainsi que la formation de chromosomes quadri-radiaux (voir Figure 2D). Parce que le phénotype clinique de l'anémie de Fanconi est très variable, le diagnostic repose classiquement sur l'induction d'aberrations chromosomiques suite au traitement de cellules provenant du patient par des agents pontants, telle que la mitomycine C ou le diépoxybutane (DEB). Comparativement à des cellules normales, les cellules prélevées sur les patients atteints montrent une sensibilité extrême à ce type d'agent, de même que de nombreux échanges entre chromatides soeurs (voir Figure 2E). Ceci suggère un rôle pour la voie de l'anémie de Fanconi dans la réponse aux ICL.

Les ICLs sont des lésions extrêmement toxiques, puisqu'ils impliquent que l'ouverture de la double hélice d'ADN n'est plus possible, nuisant ainsi à des processus cellulaires fondamentaux tels que la transcription et la réplication. C'est d'ailleurs pour cette raison que les agents pontants sont abondamment utilisés en thérapie anti-tumorale, puisqu'ils permettent de limiter la prolifération des cellules cancéreuses, particulièrement actives aux niveaux transcriptionnel et répliatif (Dronkert and Kanaar, 2001). On pense entre autres au cisplatine et ses dérivés dans les cas de cancers de l'ovaire et de la vessie, notamment, ou à la mitomycine C dans les cancers de l'estomac et du poumon, à titre d'exemples (2006).

De façon intéressante, les cellules provenant des patients atteints de l'anémie de Fanconi ne montrent généralement pas de sensibilité aux radiations ionisantes qui causent des cassures double-brin de l'ADN (du moins celles appartenant au groupe I, voir ci-bas), ni aux UVC, un agent pontant intra-brin. Les dommages causés par ces deux types d'irradiations sont respectivement réparés par recombinaison homologue et jonction d'extrémités non-homologues, et réparation par excision de nucléotides. Ceci exclue ainsi un rôle pour les protéines de l'anémie de Fanconi dans ces voies (la réparation des dommages sera explicitée plus loin). On notera enfin que la connexion entre les phénotypes clinique et

cellulaire demeure à ce jour difficile à faire, ce qui laisse présager encore d'autres rôles pour les protéines de la voie de Fanconi, explicitée ci-bas.

2.3. La réparation des ICL

Au cours de la phase S du cycle cellulaire, chaque cellule doit répliquer son matériel génétique de façon fidèle. Un échec au cours de ce processus peut représenter un risque pour l'organisme, puisqu'il peut résulter en l'accumulation de mutations et d'aberrations chromosomiques, pouvant ultimement conduire au développement tumoral. Certains types de dommages exigent, par leur complexité, la coordination de plusieurs voies de réparation de l'ADN. C'est le cas des ICL, un type de dommage reliant de façon covalente les deux brins de la double hélice d'ADN. Ce type de lésion est extrêmement toxique, puisqu'il bloque physiquement certains processus essentiels de l'activité cellulaire, tel que mentionné ci-haut. D'autre part, parce qu'ils induisent des distorsions très particulières et considérablement variables de la double hélice d'ADN, ceux-ci ne peuvent être détectés (comme c'est le cas pour les *mismatches* par exemple) autrement que par le bris de la fourche de réplication. Enfin, c'est parce que la chromatide soeur est disponible en phase S du cycle cellulaire que celle-ci peut être utilisée pour la récupération de la fourche de réplication brisée.

Bien que plusieurs scénarios existent pour modéliser la réparation des ICL, il est connu que la séquence de réparation implique le recrutement de diverses protéines de la réparation par excision de nucléotide (NER), de la synthèse translésionnelle d'ADN (TLS) et de la recombinaison homologue (HR) (voir Figure 3). L'incision de l'ICL semble être réalisée par l'hétérodimère Mus81-Eme1, dont la sous-unité catalytique Mus81 est une endonucléase structure-spécifique (Hanada et al., 2006). La seconde incision serait effectuée par l'endonucléase XPF-ERCC1, une enzyme de la voie du NER. Le recrutement de la machinerie de la recombinaison homologue (dont le fonctionnement sera vu en détails à la section 3.1 de l'introduction) permet de récupérer la fourche de réplication brisée. La régulation fine de la réparation des ICL semble être réalisée par la voie de Fanconi, voie dont la mutation d'une des 13 protéines impliquées conduit au développement de l'anémie de Fanconi.

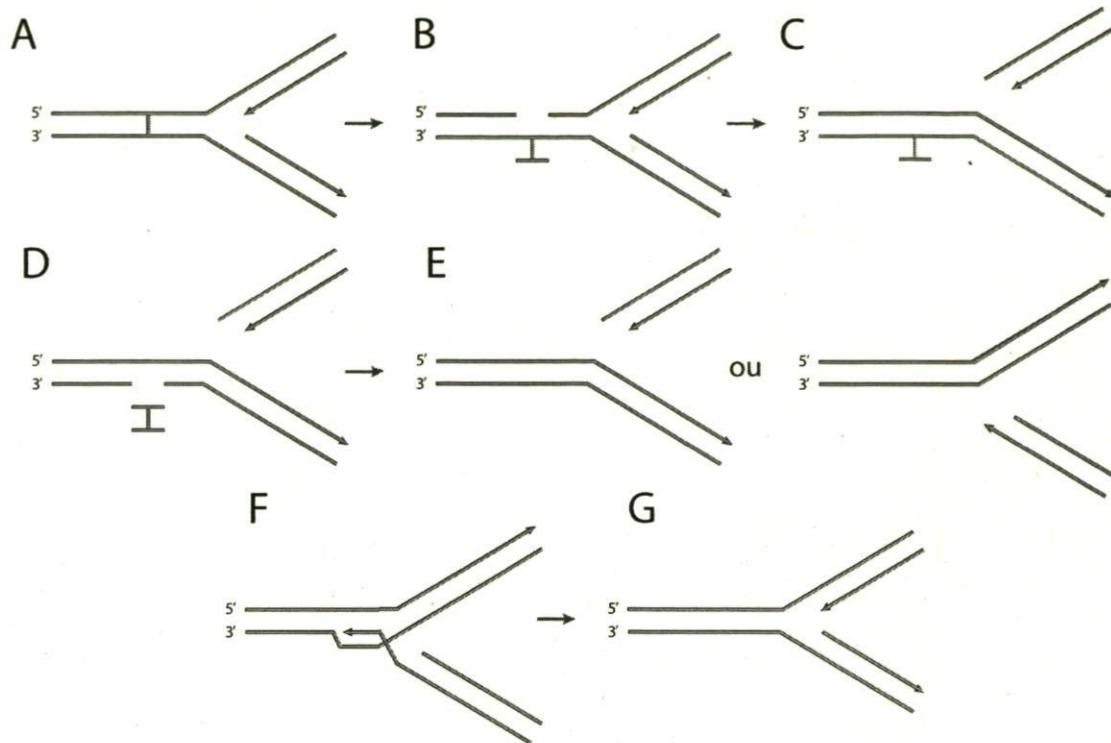


Figure 3 : Réparation des ICL.

A. L'ICL, parce qu'il relie de façon covalente les deux brins de l'ADN, prévient la progression de la fourche de réplication. Le blocage de la fourche et l'ICL sont reconnus par la protéine kinase ATR et les protéines de la voie de l'anémie de Fanconi. B. L'ICL est décroché par les endonucléases du NER. C. Les protéines de l'anémie de Fanconi recrutent les polymérase d'ADN translésionnelles, ce qui permet de surmonter le dommage rencontré. D. L'ICL est complètement excisé par les protéines du NER. E. Le recrutement de la machinerie de la recombinaison homologue permet de générer des extrémités 3'protubérantes servant de substrat pour la polymérisation d'ADN. F. La recombinaison homologue permet à la fourche de réplication de progresser. G. Les intermédiaires de recombinaison sont résolus et la réplication peut recommencer. Schéma tiré et adapté de (Wang, 2007).

2.4. La voie de Fanconi

Weidong Wang a proposé en 2007 une classification des gènes de l'anémie de Fanconi (Voir Tableau 1) en trois groupes : le groupe I comprend les protéines du complexe coeur (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM), le groupe II correspond au complexe FANCI-FANCD2, tandis que le groupe III inclus FANCD1 (BRCA2, *Breast cancer susceptibility gene 2*), FANCI (BRIPI, *BRCA1 interacting protein 1*) et FANCN (PALB2, *Partner and localizer of BRCA2*) (Wang, 2007). À l'exception des

protéines des groupes II et III, de même que FANCM, les protéines de l'anémie de Fanconi sont présentes uniquement chez les vertébrés.

Tableau 1 : Caractéristiques des protéines de l'anémie de Fanconi.

Tableau adapté de (de Winter and Joenje, 2009) et de (Moldovan and D'Andrea, 2009).

Sous-type	Prévalence	Gène	Caractéristiques
A	66%	<i>FANCA</i>	Partenaire de FANCG, comporte un NLS
B	2%	<i>FANCB</i>	Partenaire de FANCL, comporte un NLS
C	10%	<i>FANCC</i>	Partenaire de FANCE
D1	2%	<i>FANCD1/BRCA2</i>	Stimule la formation du filament de RAD51, possède des répétitions BRC et un motif OB-fold
D2	2%	<i>FAND2</i>	Monoubiquitinée et phosphorylée en réponse aux dommages à l'ADN
E	2%	<i>FANCE</i>	Partenaire de FANCC et FANCD2, cible de CHK1, comporte un NLS
F	2%	<i>FANCF</i>	Protéine adaptatrice stabilisant les interactions FANCA/FANCG et FANCE/FANCC
G	9%	<i>FANCG</i>	Partenaire de FANCA, comporte des motifs TPR
I	2%	<i>FANCI</i>	Partenaire de FANCD2, monoubiquitinée et phosphorylée en réponse aux dommages à l'ADN
J	2%	<i>FANCI/BRIP1</i>	Hélicase DEAH 5'-3', déroule les structures G4
L	0,2%	<i>FANCL</i>	E3-ubiquitine ligase, motifs RING-finger et domaines WD40
M	0,2%	<i>FANCM</i>	Translocase, domaines hélicase DEAH et ERCC4/XPF-like nucléase
N	2%	<i>FANCN/PALB2</i>	Partenaire de BRCA2 essentiel pour sa localisation et sa stabilité

2.4.1. Le groupe I : Le complexe cœur

La voie de l'anémie de Fanconi est « activée » par le stress répliatif et par l'induction d'ICL. À ce jour, il n'est pas possible d'expliquer la sensibilité des cellules provenant de patients atteints de l'anémie de Fanconi autrement que par le bris de cette « activation ». Il est important de spécifier que la fonction de cette « activation » est encore mal connue, mais est généralement décrite de la manière suivante (voir Figure 4).

Il semble que le blocage de la fourche de réplication, conduisant à l'activation de la kinase ATR et détecté par FANCM, stimulerait cette dernière à recruter les autres sous-unités du complexe. Le complexe cœur est formé par l'assemblage d'un certain nombre de sous-complexes, en réponse à divers événements de phosphorylation par la kinase ATR. Le complexe cœur est constitué de 10 protéines (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FAAP100, FAAP24) dont l'activité enzymatique d'E3-ubiquitine-ligase repose sur FANCL, de concert avec l'E2-ubiquitine-conjugase UBE2T. Le complexe cœur catalyse la mono-ubiquitination du complexe FANCD2-FANCI, sur les lysines 561 et 523 respectivement, ce qui entraîne sa translocation chromatinienne.

L'assemblage du complexe cœur est sévèrement affecté par tout défaut à l'une ou l'autre des protéines en jeu, ce qui a pour conséquence d'abolir sa capacité d'activation du complexe FANCD2-FANCI. Ceci pourrait permettre d'expliquer la remarquable homogénéité du phénotype cellulaire des patients atteints de l'anémie de Fanconi. Cependant, il semble que les protéines du complexe cœur possèdent d'autres rôles dans la réparation des ICL (autres que le ciblage du complexe FANCD2-FANCI à la chromatine par sa mono-ubiquitination) qui demeurent à définir. En effet, une protéine de fusion FANCD2 non mono-ubiquitable mais couplée à l'histone H2B et localisant donc spontanément à la chromatine ne suffit pas, chez le poulet, à compléter la sensibilité au cisplatine des cellules déficientes en protéines du complexe cœur (Matsushita et al., 2005). Enfin, on notera qu'aucun patient pour lesquels les gènes des protéines FAAP24 et FAAP100 seraient mutés n'a été identifié à ce jour, ce qui n'exclut pas pour autant qu'il s'agisse là de 2 autres groupes de complémentation.

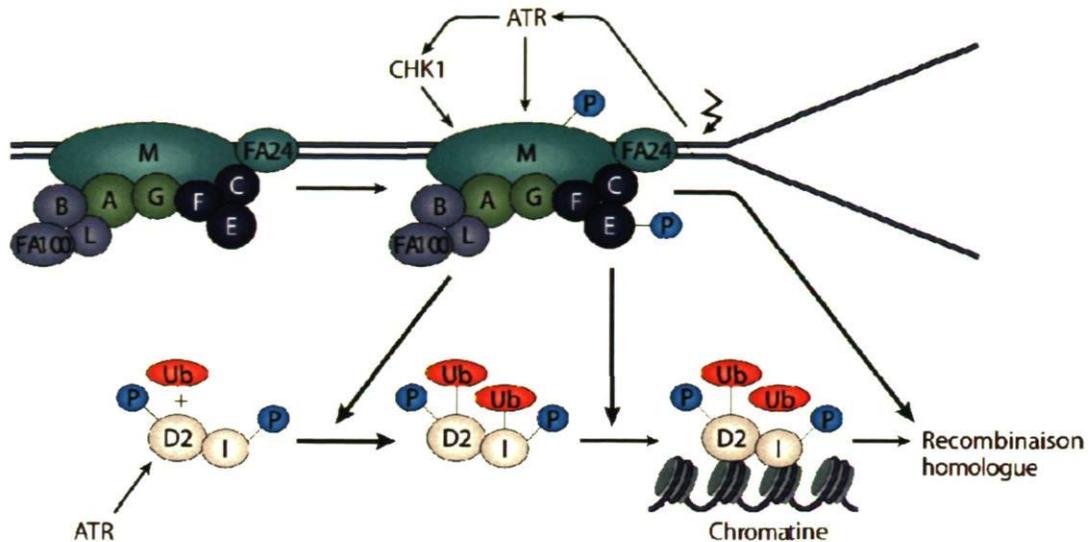


Figure 4 : Activation de la voie de Fanconi et réparation des ponts inter-brins.

Le blocage de la fourche de réplication, détecté par FANCM et activant ATR et son effecteur CHK1 conduit à la formation du complexe cœur. Celui-ci catalyse la mono-ubiquitination de FANCD2-FANCI, ce qui entraîne sa translocation chromatinienne. Le recrutement de la machinerie de la recombinaison homologue, décrit plus loin, permet la réparation de l'ICL et la récupération de la fourche de réplication brisée. Tiré et adapté de (Wang, 2007).

2.4.2. Le groupe II : Les paralogues FANCD2 et FANCI

FANCD2 et FANCI sont des paralogues qui, contrairement à la plupart des protéines du complexe cœur, sont relativement conservés au cours de l'évolution et possèdent des homologues chez la drosophile, *Caenorhabditis elegans* et *Arabidopsis thaliana*. Ces deux protéines coimmunoprécipitent en absence et en présence de dommages à l'ADN, et dépendent l'une de l'autre pour leur stabilité (Smogorzewska et al., 2007). En réponse à la mitomycine C, le complexe est mono-ubiquitiné et transloque à la chromatine, probablement grâce à leur propre capacité de liaison à l'ADN (Roques et al., 2009) (Longerich et al., 2009) (Yuan et al., 2009). On peut dès lors observer qu'elles colocalisent sous forme de foyers par immunofluorescence (Smogorzewska et al., 2007). Parce que FANCD2 colocalise avec BRCA1 en réponse aux radiations ionisantes, que la formation de ses foyers dépend de la présence de BRCA1, et que BRCA1 coimmunoprécipite préférentiellement FANCD2-Ub (Garcia-Higuera et al., 2001), il a été supposé pendant un certain temps que c'était BRCA1 qui était responsable de la mono-ubiquitination de

FANCD2. En effet, sous forme d'hétérodimère avec son partenaire BARD1, BRCA1 est une E3-ubiquitine ligase pour laquelle aucun substrat *in vivo* n'avait été identifié à l'époque (Boulton, 2006). On sait maintenant que c'est plutôt le complexe cœur, de concert avec UBE2T, qui en sont responsables, de même que pour FANCI (Machida et al., 2006) (Meetei et al., 2003) (Longerich et al., 2009). De façon surprenante, il a récemment été démontré chez le poulet que la mono-ubiquitination de FANCD2 repose sur des événements de phosphorylation de FANCI, probablement catalysés par ATR (Ishiai et al., 2008). Ceci suggère une fonction régulatrice de la phosphorylation de FANCI sur la voie de Fanconi.

Un certain nombre d'évidences suggèrent un rôle pour FANCI-FANCD2 en recombinaison homologue, bien qu'il soit à ce jour impossible de dire lequel précisément. D'une part, on sait que FANCD2 est phosphorylée par la protéine kinase ATM, elle-même activée par les cassures double-brin de l'ADN (malgré l'absence de l'activation de la voie de Fanconi telle que décrite ci-haut) (Taniguchi et al., 2002b). Il a été démontré que les foyers de FANCD2 colocalisent non seulement avec RAD51 et son régulateur BRCA2, mais également avec le complexe clé de la recombinaison homologue MRE11-RAD50-NBS1 (Taniguchi et al., 2002a) (Roques et al., 2009). De façon intéressante, la présence de MRE11-RAD50-NBS1 serait nécessaire pour assurer la stabilité de FANCD2 (Roques et al., 2009). Il semble aussi que la présence de FANCI soit nécessaire pour assurer l'efficacité de la recombinaison homologue (Smogorzewska et al., 2007). On remarquera que BRCA2 interagit directement avec FANCD2, qui elle-même colocalise partiellement avec RAD51, en réponse à un traitement à la mitomycine C et à l'hydroxyurée (HU), un agent bloquant les fourches de réplication. La nature de cette interaction demeure toutefois incertaine, sachant que la présence de BRCA2 n'est pas nécessaire pour la relocalisation de FANCD2 sous forme de foyers en réponse à la mitomycine C (Hussain et al., 2004). Certains ont proposé que le fait que BRCA2 soit un gène de l'anémie de Fanconi dont la fonction se situe en aval de l'ubiquitination de FANCD2 et interagissant avec cette dernière une fois ubiquitinée (Hussain et al., 2004) (Wang et al., 2004) suggère une fonction régulatrice de la voie de Fanconi sur BRCA2 (Mirchandani and D'Andrea, 2006). Cependant, ces études demeurent aujourd'hui controversées, vu l'extrême sensibilité des cellules BRCA2-déficientes aux

irradiations, ce qui n'est pas le cas des cellules dérivées de patients atteints de l'anémie de Fanconi, mettant en doute cette hypothèse.

2.4.3. Le groupe III : FANCD1, FANCI et FANCN

Le groupe III comprend les protéines BRCA2 (FANCD1), un régulateur clé de la recombinaison homologue, FANCI (BRIP1, BACH1), une hélicase, et PALB2 (FANCN), un partenaire important de BRCA2. Les protéines appartenant au groupe III sont généralement considérées comme agissant en aval ou parallèlement à l'ubiquitination de FANCD2-FANCI, puisque les niveaux d'ubiquitination de ceux-ci sont normaux chez les cellules provenant de patients appartenant à ce groupe.

De façon intéressante, les hétérozygotes appartenant à ce groupe présentent tous une susceptibilité accrue au cancer du sein, alors que l'état homozygote suppose le développement de l'anémie de Fanconi. La susceptibilité accrue au cancer du sein chez les porteurs de mutations des gènes du groupe III suggère une fonction de suppresseur de tumeur pour ceux-ci. Tant pour FANCI que BRCA2 et PALB2, une interaction avec BRCA1 a été documentée. De plus, la présence de BRCA1 est requise pour la redistribution normale en réponse aux dommages à l'ADN de BRCA2, BRIP1 et PALB2 (Zhang et al., 2009b) (Sy et al., 2009c) (Greenberg et al., 2006).

Les patients des groupes FA-D1 et FA-N montrent un phénotype clinique plus sévère que les autres groupes de complémentation. De façon générale, leur espérance de vie est inférieure et ils présentent un spectre de cancers plus restreint (médulloblastome, tumeur de Wilm, leucémie myéloïde aigue) survenant en très bas âge (risque cumulatif de 97% à l'âge de 5 ans) (Neveling et al., 2009). *Les cas de BRCA2 et PALB2 seront discutés en détails plus loin.*

FANCI a initialement été identifiée dans une étude visant à trouver des partenaires du domaine C-terminal de BRCA1, ou BRCT, un domaine fréquemment muté dans les cas héréditaires de cancer du sein (Cantor et al., 2001). Il semble que l'activité hélicase de FANCI soit nécessaire pour assurer la réparation des ICL, puisque toutes les mutations répertoriées chez des patients FA-J sont situées dans son domaine hélicase. Cependant, contrairement à BRCA2 et PALB2, sa présence ne serait pas nécessaire au recrutement de

RAD51 aux sites de dommages, puisqu'on observe toujours la formation de foyers de RAD51 en son absence. Son activité serait donc requise dans les étapes plus tardives de la réparation, probablement afin d'assurer la résolution des structures formées par l'ADN au cours du processus de réparation (Wu et al., 2009).

Tel qu'évoqué dans cette section, les protéines appartenant au groupe III montrent une relation très étroite avec RAD51 et la recombinaison homologue, responsable de la réparation des cassures double-brin de l'ADN en phase S et G2 du cycle cellulaire. Puisque la réparation des ICL implique la formation d'une cassure double-brin, la section suivante mettra en lumière comment ce type de dommage est réparé, et l'importance des divers partenaires de RAD51 dans ce processus, avec une attention particulière envers BRCA1, BRCA2 et PALB2.

3. Les cassures double-brin de l'ADN

Les cassures double-brin peuvent être causées par une multitude de composés chimiques, par exemple les radicaux libres émis par la respiration cellulaire, ou par des processus physiques, comme les radiations ionisantes. Cependant, c'est plutôt en tant que conséquence de la réparation des ICL que l'intérêt se porte maintenant sur ceux-ci.

Les cassures double-brin peuvent être réparées par différents mécanismes, dont le choix repose essentiellement sur la disponibilité de la chromatide soeur et la séquence d'ADN environnante. Trois mécanismes principaux ont été décrits : la jonction d'extrémités non homologues (*non-homologous end joining*, NHEJ), la jonction d'extrémités médiée par micro-homologie (*micro-homology mediated end joining*, MMEJ) et la recombinaison homologue (*homologous recombination*, HR) (*les deux premiers ne sont pas l'objet du présent mémoire et conséquemment ne seront que brièvement décrits*). Les cellules déficientes en NHEJ n'étant pas sensibles aux agents pontants comme la mitomycine C, on sait que c'est plutôt la voie de la recombinaison homologue qui est activée au cours du processus de réparation des ICL (Biedermann et al., 1991). On notera que le NHEJ et le MMEJ sont délétères pour la cellule, mais qu'elles peuvent cependant être utilisées en phase G1 du cycle, ce qui n'est pas le cas de la recombinaison homologue, active uniquement lorsque l'ADN est répliqué.

La recombinaison homologue est un processus qui contribue au maintien de la stabilité génomique en assurant une réparation fidèle des cassures double-brin de l'ADN, la récupération des fourches de réplication brisées, de même que la réparation des ICL. Bien qu'il s'agisse là du mécanisme de réparation le plus fidèle parce que l'information génétique est restaurée à partir d'un duplex non-endommagé, l'utilisation d'une matrice inappropriée peut conduire à des délétions, des translocations, des duplications, des pertes d'hétérozygotie et de l'aneuploïdie. Ces conséquences délétères contribuent à l'instabilité génétique associée à la tumorigénèse, et sont amplifiées en l'absence de certains suppresseurs de tumeur, comme BRCA1 ou BRCA2.

Le caractère essentiel de ce mécanisme de réparation de l'ADN se reflète dans le fait que la délétion de beaucoup de protéines de recombinaison résulte en un phénotype de létalité embryonnaire (Brown, 2004). Ainsi, on peut raisonnablement penser que ce mécanisme est essentiel au développement des organismes multicellulaires. On notera également que les protéines de réparation de l'ADN sont impliquées dans le phénotype de résistance tumorale aux agents anticancéreux, dont le mode d'action repose essentiellement sur l'induction de dommages à l'ADN (Zhu et al., 2009). À titre d'exemple, la surexpression de RAD51, enzyme clé de la recombinaison homologue, a été remarquée dans une multitude de cancer et contribue de toute évidence à la résistance des cellules tumorales aux agents clastogènes (Klein, 2008). Une meilleure compréhension des mécanismes de résistance tumorale favorise donc le développement de nouvelles thérapies ciblées. Ceci a par ailleurs été démontré de façon élégante dans une étude récente mettant en lumière la possibilité d'utiliser le promoteur de RAD51 (suractivé) en thérapie génique du cancer (Hine et al., 2008). Les auteurs de cette étude ont fusionné le promoteur de RAD51 (dont l'activité est beaucoup plus grande dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales) au gène de la toxine diphtérique, ce qui a permis d'éliminer préférentiellement les cellules cancéreuses.

3.1. La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est initiée par une cassure double-brin, dans un contexte où la chromatide sœur est disponible, soit en phases S et G2 du cycle cellulaire. On notera également qu'il s'agit du mécanisme de choix impliqué dans la récupération des fourches de réplication brisées.

3.1.1. La réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue

On admet généralement que l'événement initiateur du processus de recombinaison homologue est l'arrivée du complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) au site du dommage. Divers événements de signalisation conduisent à la rétention du complexe MRN et de CtIP. En phases S et G2 du cycle cellulaire, il semble que le choix de la voie de réparation utilisée repose essentiellement sur les partenaires CtIP et BRCA1, une donnée qui reviendra plus loin (Yun and Hiom, 2009). La cassure est ensuite résectée par une action endo- et exo-nucléolytique en direction 5'-3', médiée par le complexe MRN et CtIP, résultant en la formation d'extrémités 3'-OH protubérantes. L'ADN simple brin généré est alors protégé par RPA, qui sera ensuite déplacé par RAD52. Cette extrémité simple-brin constitue le substrat pour la formation du filament de recombinase, RAD51 chez les eucaryotes, recrutée grâce à l'action de RAD52 et BRCA2. Cette étape nécessite la participation de nombreux cofacteurs, notamment parce qu'il s'agit de l'étape limitante du processus, et sera développée plus loin. RAD51 pourra alors rechercher et envahir un duplex homologue non endommagé pour former un intermédiaire nommé D-loop (*displacement loop*). Le brin envahissant constitue alors le point de départ pour la réaction de polymérisation d'ADN qui permettra de recopier l'information génétique de façon fidèle. À ce point, il devient possible d'envahir la seconde extrémité de la cassure et de réhybrider l'ADN. Il y a alors formation d'une structure nommée jonction de Holliday. Celle-ci peut être migrée résultant en un échange plus ou moins important d'information entre les chromatides soeurs. Elle sera finalement résolue par une résolvasse, telle que GEN1 ou SLX4 (Ip et al., 2008) (Fekairi et al., 2009).

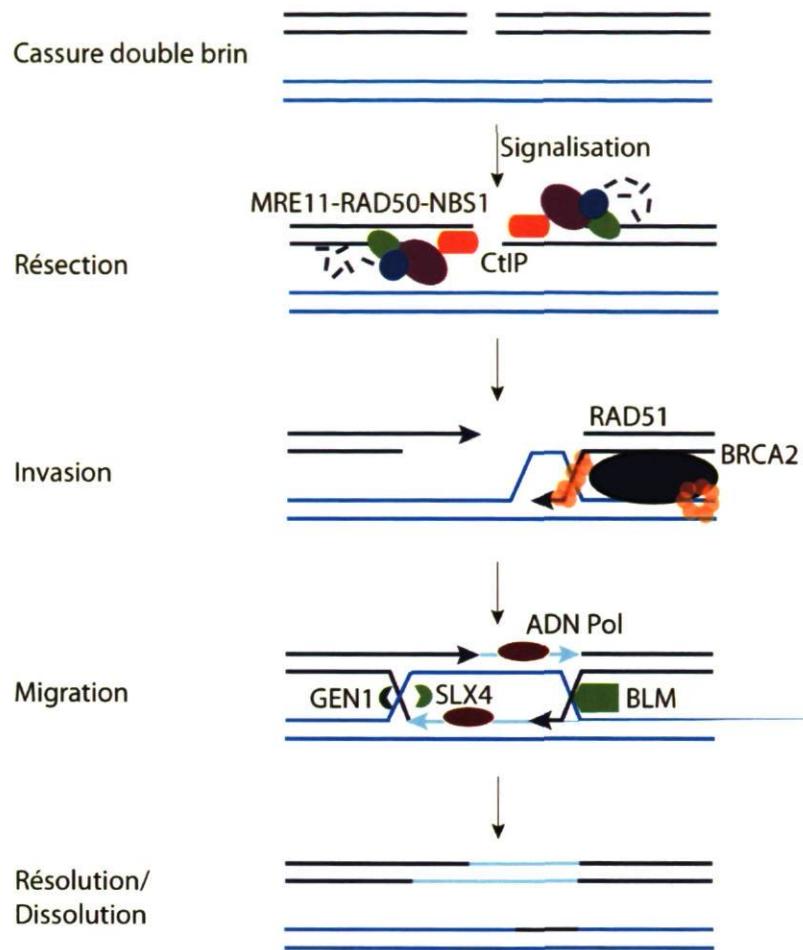


Figure 5 : Représentation schématique des étapes de la recombinaison homologue.

La reconnaissance et la signalisation de la cassure double-brin se fait par l'action concertée du complexe MRN, de la protéine kinase ATM et du variant d'histone H2AX. Des événements de signalisation conduisent à la rétention du complexe MRN et de CtIP qui génèrent une extrémité 3'-protubérante par résection. L'ADNs protégé par RPA constitue le substrat pour la recombinase RAD51, recrutée par RAD52 et BRCA2. RAD51 procède à l'invasion d'un duplex non endommagé pour permettre la polymérisation d'ADN de façon fidèle. La jonction de Holliday résultante peut être migrée résolue par une résolvasse telle que GEN1 ou SLX4. Des hélicases de la famille RecQ telles que BLM peuvent également procéder à la dissolution de la jonction de Holliday.

3.1.2. La signalisation associée à la recombinaison homologue

La recombinaison homologue est finement régulée par un grand nombre de modifications post-traductionnelles des protéines en jeu, modulant leurs interactions et activités. Les points de contrôle en phase S et G2/M sont gouvernés par les protéines kinase ATM et ATR, conduisant à une diminution rapide de la synthèse d'ADN ou la prévention de l'entrée en mitose, afin de permettre la réparation des dommages. Ceci explique que le principal phénotype observé chez les cellules déficientes en ATM soit la synthèse d'ADN radio-résistante ce qui implique un point de contrôle inefficace et une accumulation importante de dommages, en réponse aux radiations ionisantes. On remarquera que la phosphorylation d'un très grand nombre de cibles d'ATM et ATR est nécessaire pour l'efficacité du point de contrôle, sans quoi un phénotype de synthèse d'ADN radio-résistante émerge, ou une entrée en mitose prématurée. On peut également observer une accumulation des cellules traitées en phase S ou G2, en raison d'une incapacité à réparer les dommages rencontrés.

Sous sa forme inactive, ATM est un dimère capable de s'auto-activer par phosphorylation sur la Ser1981 en réponse aux dommages. Son activité kinase envers ses substrats serait stimulée par le complexe MRN, le premier à arriver au site de dommage. ATM possède une multitude de cibles, dont le site consensus de phosphorylation est S/TQ, notamment le complexe MRN, BRCA1, BRCA2, mais surtout CHK2, sa kinase effectrice. CHK2 a pour cible CDC25A, une phosphatase ayant pour substrat le complexe cycline A-cdk2 dont la déphosphorylation conduit au retard de déclenchement des origines de réplication. C'est le point de contrôle intra-S. La phosphorylation du variant d'histone H2AX (γ H2AX) sur la Ser139 par ATM survient sur plusieurs centaines de kilobases flanquant la CDB. C'est pour cette raison que γ H2AX est utilisée comme marqueur des cassures double-brin de l'ADN.

Si le stress est d'origine répllicative, c'est ATR qui sera activée et sa kinase effectrice CHK1, conduisant essentiellement aux mêmes mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, tant l'activité nucléase du complexe MRN que l'activation d'ATM seraient requises, afin de générer un segment d'ADNsb protégé par RPA nécessaire au recrutement d'ATR. Il existe également un certain nombre d'activateurs uniques à ATR (le complexe 9-1-1 et TOPBP1 à titre d'exemples) associés au stress réplificatif.

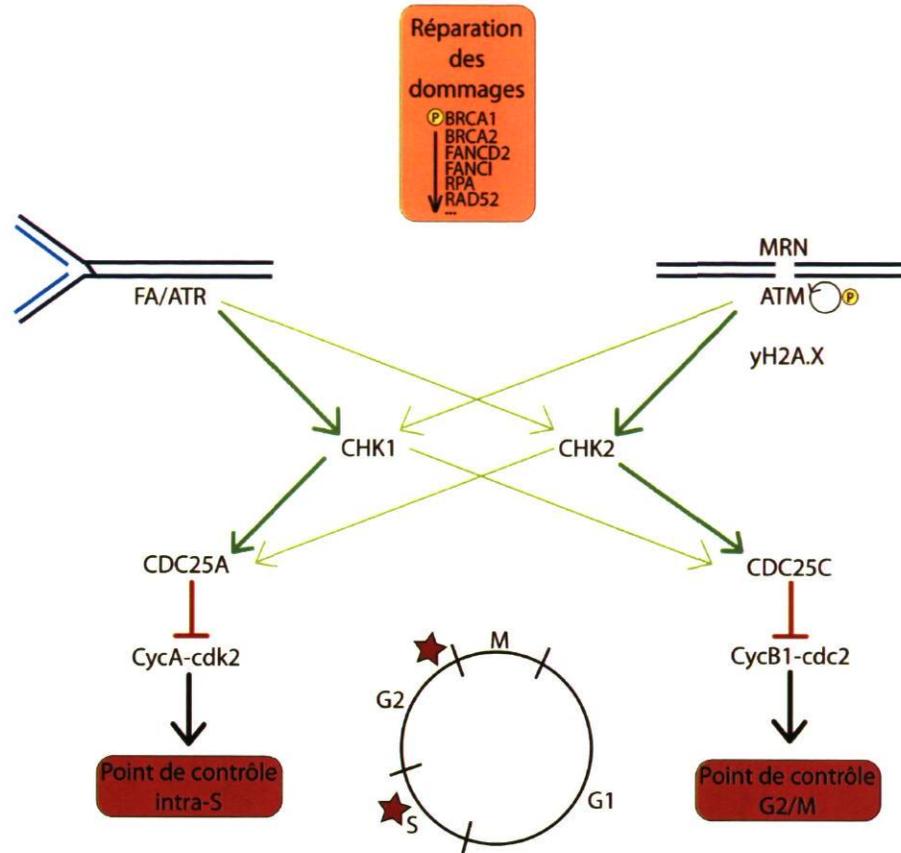


Figure 6 : Signalisation associée à la réparation des dommages à l'ADN en phases S et G2/M.

Le stress réplcatif (à gauche) est détecté par les protéines de la voie de Fanconi, en particulier FANCD2, et ATR. Ceci conduit à la phosphorylation de CHK1 qui elle-même phosphoryle CDC25A, conduisant à sa dégradation. Ceci prévient la déphosphorylation du complexe cyclineA-cdk2, et conséquemment le déclenchement des origines de réplication tardive et donne lieu au point de contrôle intra-S. Les CDB (à droite) conduisent à l'activation d'ATM (par auto-phosphorylation) et à la phosphorylation de sa kinase effectrice CHK2. Cette dernière a pour cible la phosphatase CDC25C, conduisant à sa dégradation, ce qui prévient l'entrée nucléaire du complexe cyclineB1-cdc2, résultant en point de contrôle G2/M. Les kinases ATM, ATR, CHK1 et CHK2 possèdent une multitude de cibles impliquées dans la réparation de l'ADN, ce qui favorise la récupération des fourches de réplication brisées et la réparation des CDB.

En phase G2, tant ATM que ATR sont activées, et leurs kinases effectrices CHK2 et CHK1 respectivement. La phosphorylation de la phosphatase CDC25C par CHK1 conduit à sa séquestration au niveau du cytoplasme, ce qui prévient l'activation du complexe cycline B-cdc2, nécessaire à l'entrée en mitose. Ceci provoque le point de contrôle G2/M. L'incapacité à générer un point de contrôle G2/M efficace résulte en une entrée prématurée en mitose, résultant en l'accumulation de dommages à l'ADN et d'anomalies chromosomiques, par exemple des pertes de bras chromosomique ou des chromosomes quadri-radiaux, tel qu'observé fréquemment dans les cellules cancéreuses et chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi.

3.2. La recombinaise RAD51

Initialement isolé en 1974, le mutant de *Saccharomyces cerevisiae* de RAD51 montre une sensibilité aux radiations ionisantes en plus de défauts de recombinaison, suggérant un rôle important dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN (Game and Mortimer, 1974). En réponse aux dommages à l'ADN, RAD51 forme des foyers qui sont détectables par immunofluorescence (Haaf et al., 1995). Ces foyers sont les sites présumés de réparation de l'ADN par recombinaison homologue, puisqu'il a été démontré que RAD51 et RPA colocalisent avec des régions d'ADNsb, un intermédiaire important de la réparation des cassures double-brin de l'ADN (Raderschall et al., 1999). Chez les eucaryotes supérieurs, la protéine est essentielle, comme en témoigne le phénotype de létalité embryonnaire chez la souris (Lim and Hasty, 1996) (Tsuzuki et al., 1996). Ceci permet de mettre en évidence un rôle important pour la recombinaison homologue dans un contexte de prolifération cellulaire caractéristique du développement.

3.2.1. Caractéristiques biochimiques

La recombinaison homologue implique des interactions entre molécules d'ADN médiées par les recombinaises. Ces enzymes font la recherche d'homologie de séquence en testant les interactions et permettent l'échange de brin entre deux molécules d'ADN. RAD51 est un homologue structural et fonctionnel de la recombinaise bactérienne RecA (56% similaire et 30% identique) (Benson et al., 1994). RAD51 est une protéine de 339 acides aminés, ayant un poids moléculaire de 36,9 kDa, et formant un octamère en solution. RAD51, tout

comme RecA, possède un motif Walker A impliqué dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Cette activité enzymatique est essentielle à la fonction de RAD51 en recombinaison homologue, sans toutefois l'être pour la formation du nucléofilament (Stark et al., 2002) (Chi et al., 2006). Sous cette forme caractéristique, on trouve un monomère pour 3 nucléotides ou 6 monomères par tour d'hélice. Ainsi, ces deux protéines forment des filaments d'apparence striée sur un ADN circulaire simple brin que l'on peut observer en microscopie électronique (voir Figure 7).



Figure 7 : Micrographie électronique du nucléofilament hélicoïdal de hRAD51.

Les réactions sont réalisées sur un substrat d'ADN portant une extrémité 3'-protubérante, lequel est lié par RAD51 (McIlwraith et al., 2000). La barre représente 40nm.

3.2.2. Importance des médiateurs

RAD51 est une recombinase beaucoup moins efficace que son homologue bactérien RecA. L'apport des médiateurs de la recombinaison homologue à la réaction catalysée par RAD51 est indéniable, et supporté par un certain nombre d'évidences biochimiques. D'une part, RAD51 lie l'ADN simple- et double-brin (avec une préférence pour l'ADN simple-brin, toutefois (McIlwraith et al., 2000)), contrairement à RecA qui ne lie que le simple. Il est donc nécessaire qu'il existe un mécanisme pour cibler RAD51 à son substrat d'ADNsb généré par le complexe MRN. D'autre part, RAD51 présente une activité d'échange de brin limitée par rapport à RecA, une activité essentielle à sa fonction (plus de 6kb pour RecA

contrairement à 1,5kb pour RAD51). Des médiateurs doivent donc intervenir afin de stimuler cette étape critique du processus. Enfin, l'hydrolyse de l'ATP est d'environ 200 fois inférieure pour RAD51 comparativement à RecA (0,16ATP/min versus 30ATP/min pour RecA), une activité qui doit donc être stimulée par des médiateurs afin d'assurer l'efficacité de la recombinaison (Baumann and West, 1998) (Masson and West, 2001).

3.3. Les médiateurs de RAD51

Afin de stimuler la recombinaison homologue, les médiateurs de RAD51 possèdent un certain nombre d'activités. De façon générale, ces médiateurs interagissent physiquement avec RAD51, lient l'ADN simple-brin avec une forte affinité et favorisent la nucléation de RAD51 sur l'ADN simple brin en déplaçant RPA (Sung et al., 2003).

3.3.1. Les médiateurs RPA et RAD52

RPA et RAD52 sont deux médiateurs importants de la recombinaison homologue. Il a été démontré que l'ajout de RPA dans une réaction d'échange de brin stimule l'échange et la formation de molécules jointes, probablement en stabilisant l'ADN simple-brin (Baumann and West, 1997). De plus, il semble que RAD52 favorise également ce type de réaction, en plus de montrer un effet additif vis-à-vis RPA sur RAD51. Cette stimulation survient possiblement dans les étapes précoces de la recombinaison, étant donné la préférence de RAD52 pour l'ADN simple-brin versus double-brin (Shinohara and Ogawa, 1998) (New et al., 1998) (Benson et al., 1998). Le modèle actuel préconise donc un point de vue où les extrémités 3'-protubérantes générées par la résection sont protégées par RPA, qui est ensuite déplacé par RAD52 afin de favoriser la formation du nucléofilament de RAD51 (Sugiyama and Kowalczykowski, 2002). De telles évidences supportent un rôle pour différents partenaires de RAD51 afin de favoriser une réaction efficace, dans le but de permettre la poursuite du cycle cellulaire, et spécifique, afin d'éviter des événements de recombinaison indésirables, par exemple au niveau de séquences répétées (McIlwraith et al., 2000).

Bien qu'essentiel chez la levure, le rôle de RAD52 en recombinaison homologue semble accessoire chez les mammifères (Game and Mortimer, 1974) (Malone and Esposito, 1980) (Rijkers et al., 1998). D'autre part, parce que RAD51 à lui seul est incapable de déplacer

RPA pour former le nucléofilament, la stimulation de RPA sur RAD51 dépend étroitement de sa concentration. Ceci suggère la présence d'un certain nombre d'autres médiateurs de la recombinaison homologe, le plus étudié étant incontestablement BRCA2, en raison de son implication dans le développement du cancer du sein.

3.3.2. BRCA2, un régulateur important de RAD51

L'interaction directe entre BRCA2 et RAD51 a été détectée pour la première fois en 1997 dans des analyses de double-hybride en levure (Sharan et al., 1997) (Wong et al., 1997). En 2001, un nouveau système d'étude de la recombinaison homologe en cellules humaines basé sur l'enzyme de restriction *I-SceI* (voir Figure 8) a permis à l'équipe de Maria Jasin de démontrer de façon élégante un rôle important pour BRCA2 dans l'efficacité du processus de recombinaison. De façon remarquable, différentes lignées cellulaires inactivées en BRCA2 montraient un taux de recombinaison 6 à 100 fois inférieur à des cellules de type sauvage (Moynahan et al., 2001).

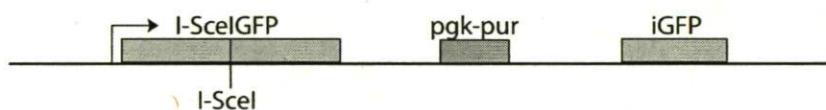


Figure 8 : Système d'étude de la recombinaison homologue DR-GFP.

Deux copies en tandem sont intégrées dans le génome de la lignée cellulaire à l'étude. La première copie est inactivée par troncation et l'ajout d'un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction *I-SceI*, tandis que la seconde est tronquée. La transfection d'un plasmide codant pour l'enzyme *I-SceI* résulte en l'induction d'une CDB unique. Celle-ci peut être réparée par recombinaison homologue à l'aide de la seconde copie, ce qui aura pour effet de restaurer la GFP qui pourra être détectée par cytométrie de flux ou directement en microscopie (Pierce et al., 1999).

BRCA2 est un gène suppresseur de tumeur de type *caretaker*, puisqu'il favorise la réparation des CDB par RH et agit au niveau du point de contrôle du cycle cellulaire intra-S. Il s'agit donc d'un médiateur de première importance de RAD51 dont les principales caractéristiques seront présentées ici.

3.3.3. Caractéristiques de BRCA2

BRCA2 est une protéine de 384kDa (3418 acides aminés) ne présentant que très peu d'homologie à d'autres protéines de fonction connue. En raison de sa grande taille, il a été impossible jusqu'à aujourd'hui de purifier la protéine pleine longueur afin d'en étudier l'activité biochimique. Les études *in vitro* se sont donc concentrées sur certains domaines conservés chez les eucaryotes supérieurs (Voir la Figure 9).

On retrouve dans la portion centrale de la protéine 8 domaines BRC en tandem. Ceux-ci sont impliqués dans la liaison avec RAD51 et la régulation de sa fonction, et seront détaillés à la section suivante. La portion C-terminale de BRCA2 (OB-fold) lie l'ADN simple-brin mais pas double-brin (Yang et al., 2002), ce qui pourrait suggérer un mécanisme de ciblage de RAD51. Deux domaines flanquant les répétitions BRC lient la protéine de l'anémie de Fanconi FANCG, dont un lie également FANCD2 (Hussain et al., 2003) (Hussain et al., 2004). Il a récemment été démontré qu'un complexe regroupant minimalement FANCG, FANCD2, BRCA2 et le paralogue de RAD51 XRCC3 était formé en réponse à la mitomycine C, indépendamment du complexe cœur (Wilson et al., 2008). L'existence de ce complexe pourrait expliquer le fait qu'il n'est pas possible de détecter l'interaction entre FANCD2 et BRCA2 dans des cellules FA-G non complémentées (Hussain et al., 2004). Le rôle de ce complexe demeure hypothétique, mais pourrait servir de modulateur de la recombinaison homologue afin de récupérer les fourches de réplication brisées. Enfin, on retrouve un signal de localisation nucléaire en C-terminal, essentiel à la fonction de BRCA2 en recombinaison homologue (Yano et al., 2000).

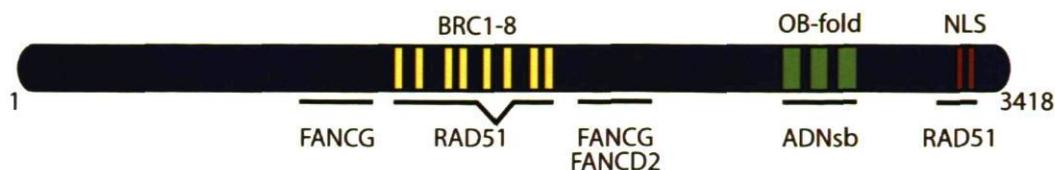


Figure 9 : Structure schématique de BRCA2.

La structure primaire de BRCA2 ne présente que très peu d'homologie avec d'autres protéines de fonction connue. Il a été démontré par double-hybride que la protéine FANCG interagissait directement avec BRCA2 via les acides aminés 499 à 994 et 2118 à 2566 (Hussain et al., 2003). Ces derniers acides aminés (2118 à 2566) sont également impliqués dans la liaison de FANCD2 (Hussain et al., 2004). La portion centrale de la protéine code pour 8 domaines BRC dont 6 sont impliqués dans la liaison et la régulation de la fonction de RAD51 (tous à l'exception des BRC5 et 6). Enfin, on retrouve un signal de localisation nucléaire en C-terminal.

3.3.4. Interaction entre BRCA2 et RAD51 et régulation de la fonction de RAD51

Tel qu'évoqué précédemment, BRCA2 est un régulateur de première importance de la fonction de RAD51. BRCA2 interagit directement avec RAD51 via ses domaines répétés BRC situés dans la portion centrale de la protéine, de même que par son extrémité C-terminale dépendante de la phosphorylation.

3.3.4.1. Régulation de RAD51 par le domaine C-terminal de BRCA2

La régulation de la fonction de RAD51 par BRCA2 repose d'abord sur la capacité de BRCA2 à transloquer au noyau. En effet, on retrouve deux signaux de localisation nucléaire (NLS, *nuclear localization signal*) dans la portion C-terminale de la protéine, dont la mutation résulte en l'exclusion du noyau de BRCA2 (Spain et al., 1999). Dépourvue de signal de localisation nucléaire, RAD51 dépend de BRCA2 pour son import au noyau. Ainsi, il n'est pas possible d'observer la formation de foyers de RAD51 en réponse aux radiations ionisantes dans la lignée cellulaire cancéreuse pancréatique CAPAN-1, dont un allèle de *BRCA2* est inactivé, et le second muté (6174delT) (Yuan et al., 1999). Ceci s'explique par la localisation majoritairement cytoplasmique de RAD51 dans cette lignée, se traduisant par une diminution du taux de recombinaison homologue de près de 100 fois à

une cassure double-brin unique générée par l'enzyme de restriction I-SceI (Davies et al., 2001) (Moynahan et al., 2001).

L'interaction via le C-terminal de BRCA2 avec RAD51 est modulée par la phosphorylation de la sérine 3291 (S3291) de BRCA2. En effet, alors que les niveaux de phosphorylation de BRCA2 sont très bas en phase S, et que c'est à ce moment qu'une interaction entre BRCA2 et RAD51 est le plus susceptible de se produire, ces niveaux augmentent à mesure qu'on progresse vers la mitose, probablement grâce à l'action du complexe cycline A/B – cdk1, et que cette interaction devient indétectable. On observe également une baisse de la phosphorylation de S3291 en réponse aux dommages à l'ADN. La S3291 agit donc littéralement comme un interrupteur moléculaire, inhibant la liaison du domaine C-terminal de BRCA2 à RAD51 (Esashi et al., 2005).

Il a été remarqué chez la souris que BRCA2 agit afin de diminuer les aberrations chromosomiques spontanées (Yu et al., 2000). Récemment, une étude chez le poulet a permis de démontrer que la portion C-terminale de BRCA2 favorise la dissolution des filaments de RAD51, un événement pré-requis pour l'entrée en mitose. Ainsi, le domaine C-terminal n'aurait pas d'impact sur l'efficacité de la recombinaison homologue comme telle, mais plutôt sur la résolution des structures de RAD51 formées lors du processus de réparation des CDB et de la récupération des fourches de réplication brisées (Ayoub et al., 2009).

3.3.4.2. Régulation de RAD51 par les domaines BRC de BRCA2

BRCA2 interagit directement avec RAD51 via ses domaines de répétition BRC (environ 35 acides aminés chacun), au nombre de 8 chez l'humain. Un certain nombre d'études ont utilisé des peptides ou des protéines de fusion afin d'en étudier la fonction *in vitro* et ont suggéré tant des rôles positifs que négatifs de BRCA2 sur RAD51. Ces résultats, parfois contradictoires, s'expliquent par l'utilisation de conditions expérimentales variables, mais surtout par la concentration de peptide utilisée qui peut influencer largement l'effet observé. De plus, il faut savoir que chacun des domaines BRC présente une affinité qui lui est propre pour RAD51, ce qui explique qu'ils soient non-équivalents.

La surexpression du BRC1 et du BRC4 couplés à la GFP, dans des cellules COS7 et MCF-7 respectivement, conduit à une diminution de la formation de foyers de RAD51 en réponse aux radiations ionisantes, tout en les sensibilisant à ce traitement (Yuan et al., 1999) (Chen et al., 1999). De même, la co-expression de ce BRC4 et d'une version de RAD51 marquée par la GFP en cellules humaines prévient la formation de foyers de RAD51 en réponse à l'irradiation (Pellegrini et al., 2002). La résolution de la structure cristallographique du BRC4 et RAD51 a permis de révéler que ces domaines BRC miment les surfaces d'interaction de RAD51 avec lui-même sous forme de filament, prévenant ainsi la formation du nucléofilament actif (Pellegrini et al., 2002). On peut donc penser que la surexpression des BRC1 et 4 prévient la localisation de RAD51 aux CDB par un mécanisme de séquestration, ce qui explique l'absence de formation de foyers de RAD51 en réponse à celles-ci.

En essai de retard sur gel, il est possible de détecter une inhibition de la liaison à l'ADN de RAD51 suite à l'ajout du BRC3 ou BRC4, les deux domaines interagissant le plus fortement avec RAD51, mais pas suite à l'ajout du BRC7 (Davies et al., 2001). En microscopie électronique, cela se traduit par une incapacité de la protéine à former le nucléofilament, la forme active de RAD51. Une étude récente mettant à profit une technique de visualisation moléculaire individuelle a permis de rassembler de façon élégante et cohérente l'information qui était retrouvée jusqu'ici de façon fragmentée dans la littérature. Ils ont pu démontrer que le rôle des domaines BRC serait de favoriser la nucléation de RAD51 sur l'ADNsb au détriment de l'ADNdb, une conclusion reposant sur une expérience utilisant les 8 domaines BRC en entier. Ce faisant, ils stabiliseraient la forme active du nucléofilament, couplé à l'ATP, en prévenant l'hydrolyse de celui-ci en ADP (Carreira et al., 2009).

Le portrait qui émerge maintenant suggère que les domaines BRC sont impliqués dans le recrutement de RAD51 à la CDB et le ciblent à l'ADNsb. Ce mécanisme de ciblage sous-entend la capacité de liaison de BRCA2 à l'ADN dans un contexte cellulaire, ce qui pourrait expliquer la séquestration de RAD51 par les BRC en expériences de surexpression. Les BRC contribuent ainsi à l'efficacité de la recombinaison homologe en stimulant la nucléation de RAD51 sur l'ADNsb, l'étape limitante du processus.

3.4. Rôle de BRCA1 en recombinaison homologue

Comme le suggère son acronyme, BRCA1 (*Breast cancer susceptibility gene 1*) a été, en 1994, le premier gène de susceptibilité au cancer du sein cloné (Miki et al., 1994). L'intérêt se portera ici sur son rôle bien établi au niveau de la réparation de l'ADN, en particulier en recombinaison homologue (*On remarquera que BRCA1 joue également un rôle important dans la voie du NER, qui n'est cependant pas l'objet du présent mémoire*).

3.4.1. BRCA1, une E3-ubiquitine-ligase orpheline

BRCA1 est une protéine multifonctionnelle présentant une activité E3-ubiquitine-ligase sous forme d'hétérodimère avec son partenaire BARD1. Puisqu'un certain nombre de mutations au niveau du domaine d'interaction avec BARD1 ont été retrouvées dans des cas de cancer du sein, il a été suggéré qu'au moins une partie de la fonction de suppresseur de tumeur de BRCA1 repose sur son activité E3-ubiquitine-ligase. Les cibles endogènes de BRCA1-BARD1 demeurent à définir (à l'exception d'elle-même et BARD1), ce qui jusqu'ici constitue une véritable problématique afin de mieux comprendre le rôle de l'activité E3-ubiquitine-ligase de BRCA1 (Starita and Parvin, 2006). Néanmoins, *in vitro*, on sait que le dimère BRCA1-BARD1 est capable d'ubiquitiner un certain nombre de substrats impliqués dans la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN, à savoir les histones H2A et H2AX, de même que FANCD2, ce qu'il n'a pas été possible de démontrer de façon endogène (Chen et al., 2002) (Vandenberg et al., 2003). Ceci peut s'expliquer soit par le fait que ces protéines ne sont pas d'authentiques substrats de BRCA1-BARD1, soit par la possibilité qu'il existe une ou d'autres E3-ubiquitine-ligases capable de pallier à l'absence de BRCA1-BARD1. Bien que l'identification de cibles de l'activité de BRCA1-BARD1 demeure intrigante, il importe de noter qu'une étude récente, ayant utilisé un mutant ponctuel de BRCA1 dont l'activité E3-ubiquitine-ligase est nulle (BRCA1 I26A), a permis de révéler que cette activité n'est pas essentielle à la résistance à la mitomycine C, pas plus qu'elle ne l'est pour l'efficacité de la recombinaison homologue (Reid et al., 2008).

3.4.2. BRCA1, une plate-forme de coordination de la recombinaison homologue.

On sait depuis la fin des années 90 que BRCA1 se retrouve de façon endogène sous forme de complexe avec BRCA2 et RAD51, un complexe reposant probablement sur la présence d'un partenaire alors inconnu (Chen et al., 1998). En phase S, BRCA1 colocalise avec RAD51 sous forme de foyers (Scully et al., 1997). Les cellules déficientes en BRCA1 sont sensibles aux radiations ionisantes et aux agents produisant des ponts inter-brins. Ces évidences suggèrent un rôle important pour BRCA1 en recombinaison homologue.

On sait aujourd'hui que BRCA1 possède une multitude de partenaires essentiels à la réparation des dommages à l'ADN dont il serait difficile de faire le survol en entier dans le présent contexte. Parmi ceux-ci, on retrouve des complexes de remodelage de la chromatine (SWI/SNF et des histone acétylase/déacétylase) et l'hélicase BRIP1 (FANCI), suggérant un rôle pour BRCA1 afin de favoriser l'accessibilité à la CDB de la machinerie de recombinaison homologue. Le complexe MRE11-RAD51-NBS1 et CtIP font également partie des partenaires de BRCA1, une donnée cohérente avec le fait que BRCA1 est un migrant précoce aux foyers de γ H2AX. Enfin, tel que mentionné plus haut, on retrouve également BRCA2 et RAD51, suggérant un rôle pour BRCA1 dans la mécanique même de la recombinaison homologue. Il a ainsi été suggéré que BRCA1 serait en fait une plateforme médiant la formation de divers complexes au cours du processus de réparation des cassures double-brin (Voir la Figure 10). Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'on retrouve une multitude de complexes distincts comprenant BRCA1, dont plusieurs sont mutuellement exclusifs, suggérant des mécanismes de recrutement spécifiques au contexte du dommage et/ou séquentiels (Venkitaraman, 2009).

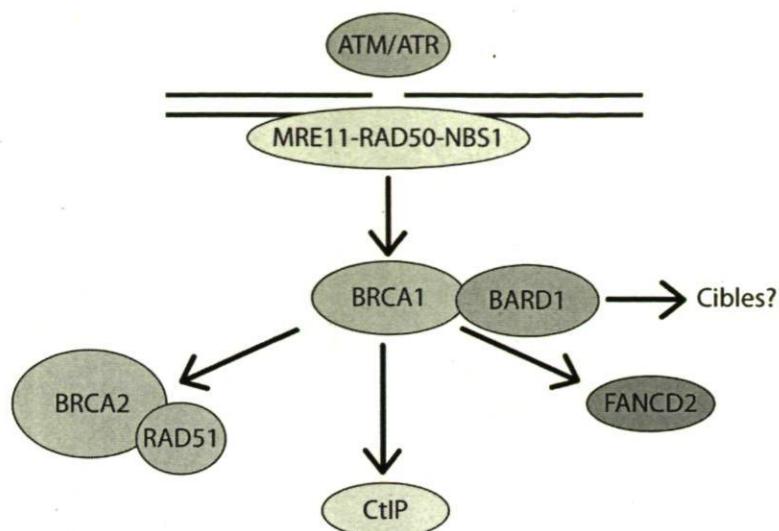


Figure 10 : Quelques-uns des partenaires de BRCA1 impliqués en recombinaison homologue.

3.4.3. La signalisation associée à BRCA1

En plus de son rôle dans la dynamique de la réparation des CDB, BRCA1 est impliquée étroitement dans la signalisation des dommages à l'ADN. Nombre de protéines de réparation sont phosphorylées en réponse aux dommages. C'est également le cas de BRCA1, dont la phosphorylation sur la Ser988 est dépendante de la protéine CHK2, elle-même associée à un risque accru de développer le cancer du sein (Nevanlinna and Bartek, 2006). Cet événement de phosphorylation est associé à la relocalisation sous forme de foyers de BRCA1 en réponse aux radiations ionisantes (Lee et al., 2000). On remarquera que la présence de BRCA1 est nécessaire pour assurer la phosphorylation de plusieurs substrats des protéines kinases ATM et ATR, tels que NBS1 et CHK2, des événements nécessaires à un point de contrôle intra-S efficace (Foray et al., 2003). Enfin, l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G2-M repose également sur une protéine BRCA1 fonctionnelle et son interaction avec la protéine kinase CHK1 (Yarden et al., 2002).

4. PALB2 : *Partner and localizer of BRCA2*

C'est en cherchant à mieux comprendre les événements en amont de la fonction de BRCA2 en recombinaison homologue que l'équipe de Bing Xia et collègues a identifié, en 2006, PALB2, *Partner and localizer of BRCA2*. Grâce à une approche de co-immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse, ils ont pu identifier cette protéine jusqu'ici inconnue de 1186 AA (~130kDa) dont la caractérisation a permis de découvrir qu'il s'agit d'un régulateur hautement important de la fonction de BRCA2 (Xia et al., 2006).

4.1. PALB2, un nouveau partenaire de BRCA2

PALB2 est une protéine nucléaire associée à des structures stables du noyau (e.g. la chromatine) et favorise la localisation sub-nucléaire à ces structures de BRCA2 et RAD51. Il est possible d'observer la formation de foyers de PALB2 en réponse aux radiations ionisantes qui colocalisent avec γ H2AX, un marqueur de cassures double-brin rapidement phosphorylé par ATM en réponse à celles-ci. Ces foyers de PALB2 colocalisent également avec BRCA1 et BRCA2. Dans le même article, les auteurs ont pu montrer un rôle pour PALB2 dans l'activation du point de contrôle intra-S et, de façon importante, dans l'efficacité du processus de recombinaison homologue grâce au système I-SceI (voir Figure 11). Il a également été montré que l'interaction BRCA2-PALB2 se produit via l'extrémité N-terminale de BRCA2 et, de façon non négligeable, que certains mutants ponctuels de cette région associés au cancer du sein étaient défectueux dans leur capacité à lier PALB2 et à stimuler la recombinaison homologue (Xia et al., 2006). Ceci suggère un rôle important pour l'interaction PALB2-BRCA2 dans l'efficacité de la recombinaison homologue et dans la suppression tumorale.

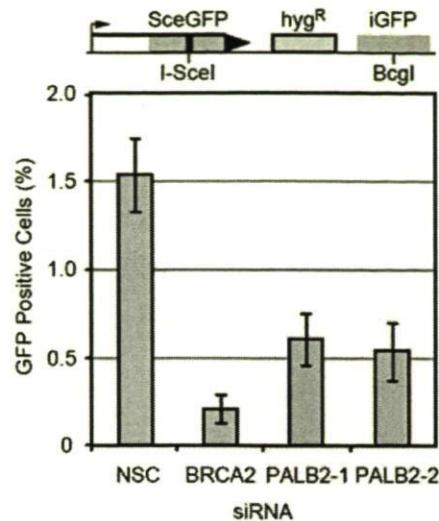


Figure 11 : La présence de PALB2 est critique pour l'efficacité de la recombinaison homologue.

Des cellules DR-U2OS ont été traitées avec les ARNi indiqués (NSC ou contrôle, BRCA2, et deux différents pour PALB2, PALB2-1 et PALB2-2) et l'efficacité de la recombinaison homologue est évaluée à l'aide de l'essai DR-GFP (mesurant le % de cellules GFP-positives) décrit à la section 3.3.2 (Xia et al., 2006).

Comme beaucoup de protéines de réparation de l'ADN, PALB2 possède de nombreux sites putatifs de phosphorylation par ATM/ATR (S/TQ). Alors inconnue, PALB2 a été retrouvée par le groupe du Dr. Gygi dans une étude visant à identifier de nouvelles phosphoprotéines nucléaires (Beausoleil et al., 2004), et de façon indépendante dans un effort d'identification de cibles d'ATM/ATR par le groupe du Dr. Elledge (Matsuoka et al., 2007). Vraisemblablement, la phosphorylation par ATM/ATR en réponse aux dommages à l'ADN pourrait jouer un rôle dans la régulation de la fonction de PALB2.

4.2. PALB2, un gène de susceptibilité aux cancers du sein et du pancréas

Étant donné que PALB2 est un partenaire de BRCA2, un gène de susceptibilité au cancer du sein de forte pénétrance, le groupe du Dr. Livingston a voulu en 2007 étudier la possibilité que PALB2 soit également un gène de prédisposition au cancer du sein. Rappelons que les gènes de susceptibilité connus n'expliquent que la moitié des cas de cancer du sein familiaux. Pour ce faire, ils ont procédé au séquençage du gène chez quelques 113 familles finlandaises atteintes et ont pu identifier un variant (c.1592delT)

récurrent chez cette population associé à un risque accru de 4 fois de développer un cancer du sein. L'introduction de ce variant chez des cellules PALB2-déficientes résulte en une réduction de l'efficacité de la recombinaison homologue et une sensibilité accrue à la mitomycine C, de même qu'une perte d'interaction avec BRCA2. Il s'agit donc d'un cas classique de perte de fonction. Les tissus étudiés ne montraient toutefois pas de perte d'hétérozygotie, suggérant un caractère haploinsuffisant probablement combiné à un effet potentiel de dominant-négatif de la protéine tronquée (Erkko et al., 2007).

Le fait que *PALB2* est un gène de susceptibilité au cancer du sein a été confirmé par un second groupe dirigé par le Dr. Rahman. Pour ce faire, ils ont procédé au séquençage du gène chez des familles pour lesquelles aucune mutation n'avait pu être identifiée dans *BRCA1/2*. Les mutations identifiées dans le gène *PALB2* conduisent toutes à l'expression d'une protéine tronquée, suggérant un rôle pour l'extrémité C-terminale de PALB2 dans sa fonction de suppresseur de tumeur. On remarquera que les porteuses de ces mutations présentaient un risque deux fois plus élevé de développer un cancer du sein comparativement à la population en général, ce qui est plutôt modeste par rapport à *BRCA1/2* (Rahman et al., 2007). De façon intéressante, ils ont pu identifier des cas de cancer du sein chez l'homme, comme dans les familles porteuses de mutations de BRCA2.

Une autre équipe dirigée par le Dr. Tischkowitz a présenté en 2007 l'étude de familles Canadiennes-Françaises et de descendance juive ashkénaze prédisposées au cancer du sein. Cette équipe n'a également pas pu identifier de cas de perte d'hétérozygotie. Toutefois, les mutants étudiés étaient des protéines tronquées qui n'interagissaient pas avec BRCA2 (229delT, 2521delA) et qui ne complétaient pas la déplétion de PALB2 par un ARNi en ce qui a trait au taux de recombinaison homologue de même que le phénotype de sensibilité à la mitomycine C. Une seconde étude dirigée par William D. Foulkes, toujours chez les Canadiennes-françaises, a montré l'existence d'une mutation tronquante (*PALB2Q775X*) dans cette population. Notamment, 0,5% des femmes atteintes de façon précoce du cancer du sein (diagnostiquées avant l'âge de 50 ans) chez cette population sont porteuses de cette mutation, probablement en raison de l'effet fondateur, de façon similaire aux Finlandaises (Foulkes et al., 2007). C'est l'importance de la fréquence de cette mutation dans la population canadienne-française, de même que son incapacité à interagir

avec BRCA2, et donc la capacité de discerner la fonction de PALB2 indépendamment de son domaine d'interaction avec BRCA2, qui nous ont motivés à étudier plus en profondeur cette protéine. Nous y reviendrons à la section 5 de l'introduction.

PALB2 se situe sur la région 16p12.1, une région qui n'a pas été associée de façon notable dans des études de liaison portant sur le cancer du sein (Smith et al., 2006). Malgré qu'il n'ait pas été possible de recenser de cas de perte d'hétérozygotie jusqu'ici, un mécanisme alternatif d'inactivation a néanmoins été rapporté en 2008. En effet, la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur est une façon de diminuer l'expression d'un gène de façon épigénétique, un mécanisme efficace pour la cellule tumorale de perdre la fonction d'un suppresseur de tumeur. Ce mécanisme a d'ailleurs été rapporté pour *BRCA1* dans des cas de cancers du sein familiaux et sporadiques (Esteller et al., 2001). L'équipe du Dr. Cairns a pu montrer que ce mécanisme épigénétique d'inactivation était plus fréquent que les taux rapportés de mutation ponctuelle chez les familles atteintes de cancers du sein ne présentant pas de mutation dans *BRCA1/2*. De plus, il semble que la fréquence d'hyperméthylation du promoteur de *PALB2* soit similaire à celle de *BRCA1*, tant dans les cas familiaux que sporadiques (Potapova et al., 2008).

Deux études récentes ont démontré par des approches fort différentes que PALB2 était, tout comme son partenaire BRCA2, un gène de susceptibilité au cancer du pancréas. Extrêmement agressif, le cancer du pancréas présente un taux de survie de seulement 4% après 5 ans suivant le diagnostic. Ce type de cancer est extrêmement rare avant l'âge de 40 ans et l'âge médian de diagnostic est de 73 ans, un cancer touchant donc majoritairement les personnes âgées (Maitra and Hruban, 2008). La première étude a procédé au séquençage complet du génome codant d'un individu atteint et a pu identifier une mutation germinale produisant un changement de cadre de lecture au codon 58. L'individu avait également une mutation somatique au niveau du site d'épissage de l'exon 10. Ils ont également été en mesure d'identifier trois autres mutations tronquantes chez une cohorte de 96 individus atteints de cancer du pancréas héréditaire (Jones et al., 2009). La seconde étude a séquencé les 13 exons de PALB2 chez une cohorte de 254 patients atteints du cancer du pancréas, dans des familles où l'historique pour les cancers du sein et de l'ovaire n'était pas particulièrement fort (afin d'éliminer un biais pour des mutations associées au

cancer du sein). Bien qu'ils aient été en mesure d'identifier une nouvelle mutation tronquante, les auteurs de l'étude concluent que la mutation de PALB2 est plutôt rare dans les cas de cancers du pancréas héréditaires et sporadiques (Tischkowitz et al., 2009).

4.3. PALB2 ou FANCN, un gène de l'anémie de Fanconi

Dans leur article de 2006, le Dr. Xia et ses collègues avaient montré que l'utilisation d'un ARNi dirigé contre PALB2 sensibilisait les cellules traitées à la mitomycine C, une marque des cellules provenant de patients atteints de l'anémie de Fanconi. Cette caractéristique les a amené, de même qu'une autre équipe dirigée par le Dr. Rahman, à démontrer que PALB2 était en fait le gène muté chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi du groupe de complémentation N (FA-N) (Reid et al., 2007; Xia et al., 2007). Il a été montré que BRCA2 était instable et mal localisé dans les cellules du patient EUFA 1341 et qu'il était impossible d'observer la formation de foyers par RAD51 en réponse à la mitomycine C (Voir la Figure 12). De plus, c'est grâce à l'expression d'une protéine PALB2 tronquée chez ce patient qu'il leur a été possible de situer à la région C-terminale de PALB2 le domaine d'interaction avec BRCA2 (Xia et al., 2007). L'équipe du Dr. Rahman a également pu démontrer que le rôle de PALB2 se situe en aval ou de façon parallèle à l'ubiquitination de FANCD2 (et présumément de FANCI), puisque celle-ci est intacte dans différentes lignées de cellules PALB2-déficientes (Rahman et al., 2007).

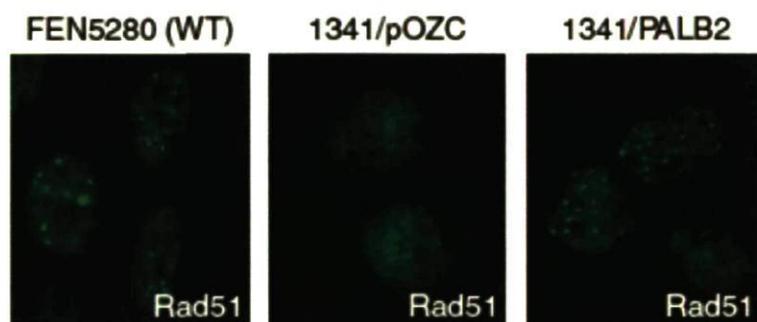


Figure 12 : Détection des foyers de RAD51 par immunofluorescence en réponse à la mitomycine C.

Les cellules de type sauvage (FEN5280) présentent des foyers de RAD51 détectables par immunofluorescence en réponse à un traitement à la mitomycine C, contrairement à des cellules de patients FA-N (1341). Cette capacité est restaurée lorsqu'elles sont complétementées avec PALB2 (Image tirée de (Xia et al., 2007)).

Il est à noter que le phénotype cellulaire des groupes FA-N et FA-D1 est plus sévère que les autres groupes, présentant un nombre plus élevé de bris chromosomiques de façon spontanée et en réponse à la mitomycine C (Reid et al., 2007). De plus, le spectre de tumeurs auxquelles ils sont prédisposés est légèrement différent. On a remarqué un haut risque de tumeurs solides, en particulier des tumeurs de Wilms et des médulloblastomes qui sont très rarement observés chez les autres groupes. Enfin, l'espérance de vie des patients de ces groupes est bien inférieure, soit environ 5 ans (Reid et al., 2007).

À ce stade-ci, il n'est pas possible d'expliquer pourquoi. Cependant, il est possible que PALB2 et BRCA2 jouent un rôle beaucoup plus général que les autres protéines de l'anémie de Fanconi au niveau de la recombinaison homologue, une hypothèse suggérée par leur rôle crucial dans la régulation de RAD51 en recombinaison homologue.

5. Objectifs des travaux de maîtrise

5.1. Problématique

L'efficacité de la recombinaison homologue dépend largement de la présence d'un certain nombre de médiateurs possédant des caractéristiques bien particulières. La littérature actuelle tend à démontrer que PALB2 joue un rôle crucial en recombinaison homologue, notamment en favorisant la relocalisation chromatiniennne de RAD51 sous forme de foyers en réponse aux dommages à l'ADN. Or, les propriétés de PALB2 sur lesquelles repose cette activité sont inconnues. Une meilleure compréhension de celles-ci contribuerait à préciser le modèle actuel de la recombinaison homologue et de la voie de l'anémie de Fanconi. De façon plus générale, cela devrait nous permettre de mieux comprendre comment les porteuses de mutations du gène *PALB2* sont prédisposées au cancer du sein, et éventuellement d'établir de nouvelles stratégies d'intervention pour la prévention et le traitement du cancer.

5.2. Objectif général

Démontrer que PALB2 possède les caractéristiques biochimiques d'un médiateur important de la recombinaison homologue.

Les médiateurs de la recombinaison homologue sont des protéines liant de façon générale l'ADN simple-brin. Elles interagissent également avec RAD51 et favorisent la nucléation

de celle-ci sur l'ADN simple brin pour assurer l'efficacité de la recombinaison homologue. La présente étude tentera de démontrer que PALB2 possède ces caractéristiques, lui permettant de jouer un rôle actif vis-à-vis RAD51 en recombinaison homologue.

5.2.1. Objectif spécifique 1

Évaluer les propriétés biochimiques de PALB2, et, de façon parallèle, celles du mutant PALB2Q775X associé au cancer du sein.

Pour ce faire, les protéines seront purifiées afin de procéder à leur caractérisation biochimique, notamment en ce qui a trait à leurs propriétés de liaison à l'ADN, une caractéristique de nombreuses protéines impliquées dans le processus de recombinaison homologue.

5.2.2. Objectif spécifique 2

Préciser la fonction des domaines prédits de façon bio-informatique et, si possible, en identifier de nouveaux.

PALB2 présente deux domaines d'interaction protéine-protéine. Il semble acquis que le domaine C-terminal interagisse avec BRCA2. La présence d'autres domaines fonctionnels sera évaluée, de même que la capacité de PALB2 à interagir directement avec RAD51, enzyme clé de la recombinaison homologue.

5.2.3. Objectif spécifique 3

Démontrer que le bris des domaines fonctionnels identifiés conduit à une susceptibilité accrue au cancer du sein.

Afin de répondre à cet objectif, les propriétés de la protéine de type sauvage seront comparées à celles du mutant PALB2Q775X associé au cancer du sein. De la même façon, il sera possible d'évaluer l'impact d'autres mutations associées au cancer du sein sur l'efficacité de la recombinaison homologue.

Matériels et méthodes

1. Purification de PALB2 humaine en cellules d'insecte Sf9

1.1. Construction des plasmides d'expression en cellules d'insecte

Le gène *PALB2* a été amplifié par réaction de polymérase en chaîne (PCR) à l'aide d'amorces spécifiques (voir Tableau 2 : Amorces utilisées) auxquelles ont été ajoutés les sites de restriction *KpnI* et *SacI* respectivement (la matrice utilisée était le vecteur pOZ-FH-C ayant intégré *PALB2* gracieusement fourni par le Dr Bing Xia). Cette PCR a été effectuée en présence de dNTPs 0,25mM, de l'enzyme PfuUltra 1,25 unité dans son tampon (fourni par le fabricant) et de 250nM de chaque amorce. La PCR est constituée d'une dénaturation à 94°C pour 2 minutes, suivie d'une dénaturation à 94°C pour 30 secondes et d'une hybridation à 50 °C pour 30 secondes et d'une amplification à 68 °C pendant 4 minutes pour 35 fois, avant d'être complétée par une élongation finale pour 5 minutes. Le fragment ainsi obtenu est purifié sur gel d'agarose à l'aide d'un kit d'extraction sur gel (Feldan Bio).

Les fragments obtenus par PCR sont ensuite ligués dans un vecteur commercial linéaire pTOPO (Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning kit, Invitrogen, voir la Figure 13) qui permet la ligation de bouts francs grâce à l'action de la topoisomérase I du virus *Vaccinia* liée de façon covalente aux extrémités du vecteur. Les instructions du fabricant ont été suivies.

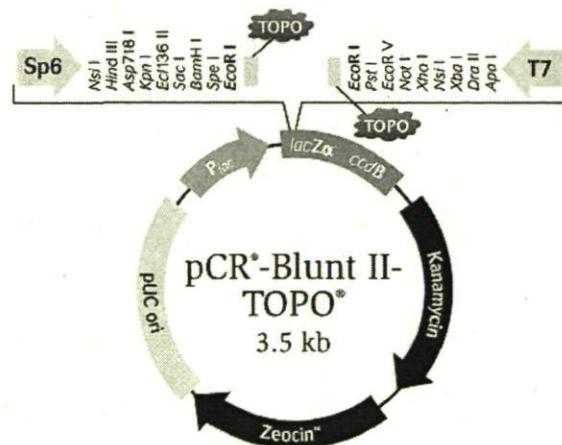


Figure 13 : Carte du plasmide pCR-Blunt II-TOPO®.

L'insert est intégré entre les sites *EcoRI* dans l'une ou l'autre des orientations. (Image tirée de www.invitrogen.com).

Le produit de ligation a été transformé dans les cellules One Shot® Chemically Competent™ *E. coli* qui sont ensuite étalées sur milieu Luria broth (LB) supplémenté avec 50 µg/ml de kanamycine (kan), toujours selon les indications du manufacturier.

Quelques clones parmi ceux obtenus ont été repiqués dans 2ml de LB supplémenté avec 50µg/ml kanamycine afin d'en isoler l'ADN plasmidique à l'aide d'un kit de mini-preps (Feldan Bio). La digestion par enzymes de restriction suivie du séquençage automatisé a permis d'identifier un clone positif. L'ADN isolé a alors été digéré avec les enzymes *EcoRI* et *XhoI* de même que *NcoI* (pour digérer le vecteur qui co-migre avec le gène *PALB2* sur gel d'agarose) et le fragment libéré a été purifié sur gel à l'aide d'un kit d'extraction sur gel (Feldan Bio).

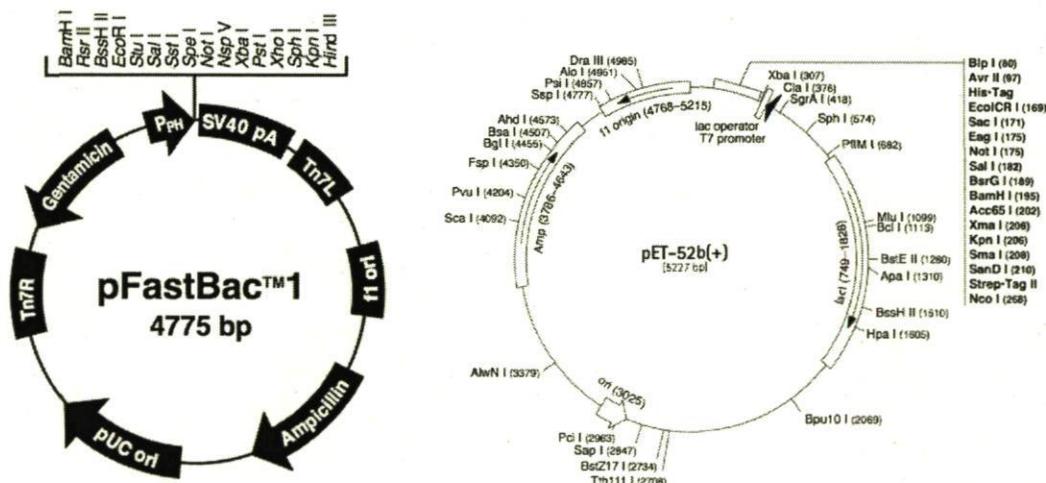


Figure 14 : Vecteur pFastBac™1 et pET-52b(+).

Images tirées de www.invitrogen.com et de www.emdbiosciences.com.

Ce fragment a ensuite été ligué dans le vecteur pFastBac™1 (Invitrogen) qui permet l'expression en cellules d'insecte Sf9 auquel a été inséré le *multiple cloning site* (MCS) du plasmide pET-52b(+) (EMD Biosciences) permettant d'ajouter une étiquette Strep en N-terminal, ainsi qu'une étiquette His en C-terminal (pFB.52b, voir Figure 14). Ces deux étiquettes nous permettront d'effectuer une double purification par affinité de la protéine recombinante et d'obtenir une protéine beaucoup plus pure et pleine longueur. La réaction

de ligation a été réalisée à l'aide du Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs) selon les instructions fournies par le fabricant.

La totalité du produit de ligation obtenu a été mélangée à des cellules compétentes DH5α (100μl) et incubé 30 minutes sur glace. On a ensuite procédé à un choc thermique à 42°C pour 1,5 minutes et refroidi sur glace pendant 2 minutes. 1ml de LB liquide a ensuite été ajouté et on a incubé pendant 1 heure à 37°C. Les cellules ont ensuite été étalées sur LB 2% agar supplémenté d'ampicilline 50μg/ml et incubées à 37°C pour la nuit. L'ADN plasmidique des clones a été isolé, digéré et séquencé. Un clone positif a été sélectionné (pFB.52bPALB2).

La même procédure a été suivie pour pFBPALB2Q775X avec certaines modifications. Ces modifications résultent de l'impossibilité d'utiliser l'étiquette Strep pour la purification de PALB2 en raison de son instabilité et du faible rendement. Ainsi, le vecteur pFastBac™1 a été utilisé tel quel. Les sites *EcoRI* et *XhoI* ont servi à l'insertion de PALB2Q775XHis amplifié à l'aide des amorces appropriées (Voir Tableau 2). Les propriétés biochimiques des protéines étudiées ne devraient pas être influencées parce que les étiquettes sont très petites (8 AA pour l'étiquette Strep, 10 AA pour l'étiquette His).

1.2. Génération du bacmide recombinant

Les cellules utilisées pour cette transformation sont des DH10Bac™ *E. coli* (Invitrogen). Cette souche contient un bacmide portant un gène de résistance à la kanamycine et le gène *LacZα* induit par l'IPTG permettant de procéder à une sélection des transformants par coloration de la colonie (Voir la Figure 15 pour un résumé du système d'expression Bac-to-Bac™). Ainsi, les colonies blanches auront intégré un fragment d'ADN (le plasmide pFastBac™1 contenant notre gène d'intérêt) et seront incapables de transformer le bleu-gal (incolore) en produit bleu.

Les cellules ont d'abord été décongelées sur glace, puis transférées dans un tube 15ml avec 1ng de pFB.52bPALB2 et incubées 30 minutes sur glace. Un choc thermique d'une durée de 45 secondes a ensuite été fait avant de refroidir sur glace 2 minutes. 900 μl de milieu S.O.C. à température de la pièce ont été ajoutés avant d'incuber 4 heures à 37°C sous

agitation. Les bactéries ont ensuite été étalées sur LB 2% agar contenant 50µg/ml de kanamycine, 7µg/ml gentamycine, 10µg/ml tetracycline, 100ug/ml bleu-gal et 40ug/ml IPTG. Les boîtes de pétris ont été incubées pour la nuit à 37°C puis pour 24 heures à 30 °C afin de faciliter la sélection bleu/blanc. Les colonies blanches ont été restriées (sur LB 2% agar contenant 50µg/ml de kanamycine, 7µg/ml gentamycine, 10µg/ml tetracycline, 100ug/mL bleu-gal et 40ug/ml IPTG) dans le but de s'assurer de leur coloration. Elles ont ensuite été repiquées (2ml LB 50µg/ml de kanamycine, 7µg/ml gentamycine, 10µg/ml tetracycline) afin d'en extraire le bacmide selon les indications d'Invitrogen (Bac-toBac® Baculovirus Expression System).

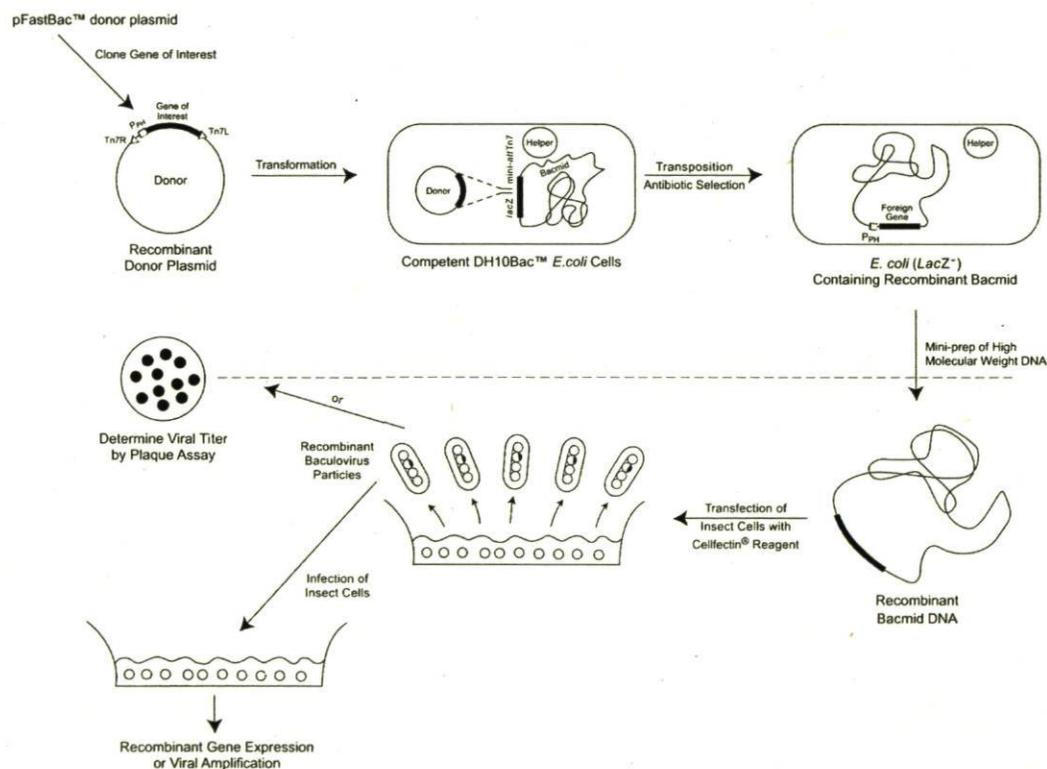


Figure 15 : Système d'expression Bac-to-Bac®.

Le gène d'intérêt est cloné dans le vecteur pFastBac™ qui sert à transformer les cellules DH10Bac™ portant un bacmide recombinant. Le gène d'intérêt est intégré au bacmide grâce à une transposase encodée par un plasmide auxiliaire et l'ADN du bacmide est extrait. Celui-ci sert à la transfection de cellules Sf9 qui produiront un virus codant pour notre protéine, servant à l'infection d'autres cellules. Image tirée du site www.invitrogen.com.

Afin de s'assurer que *PALB2* a bien été intégré dans le bacmide, une combinaison d'amorces M13-213 et JYM910 a été utilisée, l'une s'hybridant sur le bacmide et la seconde dans le gène cloné, afin de réaliser une réaction de PCR sur l'ADN du bacmide extrait. La PCR est constituée d'une période de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes, suivie d'une hybridation à 55 °C pour une durée de 45 secondes et d'une amplification à 72 °C pendant 5 minutes pour 35 fois, avant d'être complétée par une élongation finale pour 7 minutes à 72 °C. Le fragment ainsi obtenu est analysé sur gel d'agarose afin de s'assurer qu'il a la taille attendue.

1.3. Transfection des cellules d'insecte Sf9

Le matin de la transfection, 9×10^5 cellules Sf9 sontensemencées par puit 35mm dans 2ml de milieu de culture Grace's Medium (GM, Gibco) complet (supplémenté avec 10% FBS (Gibco) et 50µg/ml de streptomycine et 50 unités/ml de pénicilline). Les cellules sont remises dans l'incubateur sec à 27°C pour environ 1 heure afin qu'elles adhèrent.

La réaction de transfection est préparée dans un tube 1,5ml. 1µg d'ADN du bacmide est dilué dans 100µl de milieu GM non supplémenté. Dans un second tube, 6µl de Cellfectin® (Invitrogen) est diluée dans 100µl de milieu GM non supplémenté. Les deux tubes sont combinés dans un seul qui sera agité légèrement et incubé pour environ 15 minutes à la température de la pièce. Pendant ce temps, les cellules sont lavées avec 2ml de GM non supplémenté et on ajoute 800µl de GM non supplémenté à la réaction de transfection avant de déposer sur les cellules. Le tout est incubé à 27°C pour 5 heures, avant de retirer ce milieu et d'ajouter 2ml de GM complet. On suit l'infection visuellement (plages de lyse) pour environ 72 heures. Un puit contrôle non transfecté nous permet de visualiser les signes d'infection. À ce moment, le milieu de culture est récolté et clarifié par centrifugation à environ 800g pour 10 minutes.

1.4. Amplification du virus

Le jour de l'amplification, 50×10^6 cellules Sf9 sontensemencées dans 50ml de GM complet dans un plat de culture T-225 et laissées adhérer pour environ 1 heure. On ajoute 700µl de notre première amplification virale et on incube pour une durée de 5 à 7 jours, soit

le temps nécessaire pour obtenir environ 95% de lyse cellulaire. Le milieu est clarifié comme précédemment et stocké à 4°C à l'abri de la lumière.

1.5. Expression de la protéine recombinante

Cette étape est requise afin de déterminer les paramètres optimaux d'infection dans le but d'obtenir un maximum de protéine présentant un minimum de dégradation. Afin de tester l'expression de notre protéine d'intérêt, on infecte 20×10^6 cellules dans 20ml de GM dans un tube de 50ml avec notre virus dilué 1 :100, le tout sous agitation rotative pour une durée de 4 jours. Des aliquots de 1ml sont prélevés à chaque jour et congelés après centrifugation jusqu'à la lyse.

Les cellules sont décongelées sur glace et resuspendues dans 150µl de tampon de lyse (100mM Tris-Cl pH 8, 2mM EDTA pH8, 5% glycérol, 0,5mM DTT, 1mM PMSF, 0,019 UIT/ml aprotinine et 1µg/ml leupeptine). On sonique afin de clarifier l'extrait, on prélève 50µl (= extrait total), et on centrifuge à 13000 rpm pour 15 minutes. On prélève 50µl de nouveau (= extrait soluble). À l'extrait on ajoute 50µl de tampon 2x pour SDS-PAGE (125mM Tris-HCl pH6,8, 2% SDS, 10% glycérol) avant de résoudre nos extraits sur gel 8% acrylamide que l'on analysera ensuite par coloration au bleu de Coomassie (afin de vérifier la quantité de protéine recombinante relative aux protéines totales exprimée) et par immunobuvardage de type Western (afin de s'assurer qu'il s'agit bien de notre protéine d'intérêt).

1.6. Production de PALB2 recombinante

600ml de cellules Sf9 à 9×10^5 cellules/ml ont été infectées avec le virus dilué 1 :100 pour une durée de 48 heures à 27°C sous agitation. Les cellules sont récoltées par centrifugation et l'expression est vérifiée sur un aliquot comme à la section 1.5. Elles sont congelées sur glace sèche et stockées à -80°C.

1.7. Purification sur colonne Talon

La résine Talon (Clontech) est constituée de sépharose couplé à du cobalt de façon non covalente. Ceci permet la liaison d'une étiquette polyhistidine ajoutée en carboxy-terminal de la protéine recombinante (Voir la Figure 16 pour le principe).

Les cellules exprimant PALB2 ont été décongelées sur glace et resuspendues dans 40ml de tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH 7,5, 500mM NaCl, 10% glycérol, 0,02% Triton, 5mM imidazole et inhibiteurs de protéases soient 1mM PMSF, 0,019 UIT/ml aprotinine, 1µg/ml leu-peptine). Elles ont ensuite été homogénéisées à l'aide d'un *douncer*, soniquées 3 fois 30 secondes et homogénéisées de nouveau. Le lysat a été centrifugé à 35 000 rpm pour 55 minutes à 4°C (Sorvall Ultra Pro 80, rotor T647.5) ce qui permet de le clarifier. Ceci constitue notre extrait total soluble.

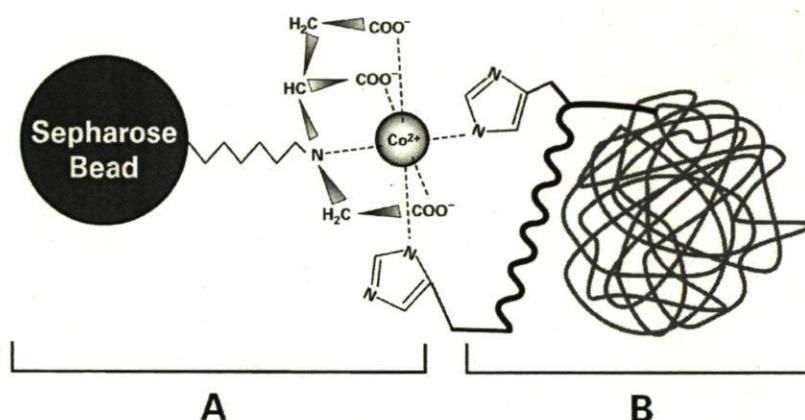


Figure 16 : Principe de la colonne Talon.

A. Résine sépharose portant un chélateur de l'ion cobalt. B. Protéine recombinante portant une étiquette poly-histidine. (Schéma tiré du site www.clontech.com)

La fraction soluble a été appliquée sur 5ml de résine Talon pré-équilibrée dans notre tampon de lyse sans inhibiteurs à un débit de 0,5ml/min. La colonne a ensuite été lavée avec du tampon de lyse contenant 5mM d'imidazole jusqu'à ce que la lecture spectrophotométrique de l'appareil soit stable afin d'éliminer des contaminants. Elle a ensuite été lavée avec 50ml de tampon de lyse contenant 30mM d'imidazole puis 10ml de tampon de lyse contenant 40mM d'imidazole, à 0,5ml/min, toujours afin d'éliminer le plus possible d'éventuels contaminants. L'imidazole est un compétiteur de l'histidine pour le cobalt chargé positivement (Voir la Figure 17 pour la structure). La protéine a ensuite été éluée à l'aide d'un gradient d'imidazole de 40mM à 1M sur 40ml en récoltant des fractions de 1,5ml à un débit de 0,3ml/min. Les fractions contenant notre protéine d'intérêt ont été identifiées par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Celles-ci ont été regroupées et dialysées contre 1l de tampon de conservation 500mM NaCl puis 250mM NaCl (20mM

Tris-HCl pH 8,0, 500mM et 250mM NaCl, 10% glycérol, 0,05% Tween) pendant 45minutes pour chaque tampon à 4°C sous agitation. Elles ont ensuite été aliquotées et congelées sur glace sèche et stockées à -80°C.

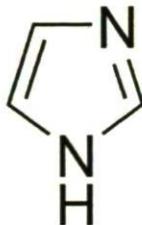


Figure 17 : Structure de l'imidazole, un compétiteur de l'histidine.

1.8. Purification sur échangeuse d'ions Q sepharose

Le principe d'une colonne échangeuse d'ions repose sur la propriété amphotère intrinsèque des protéines. Dans le cas d'une échangeuse d'anions, au delà-du pI de la protéine qui nous intéresse, celle-ci sera chargée négativement et donc retenue sur une matrice chargée positivement (l'échangeuse d'anions). Dès lors il sera possible d'éluer en augmentant graduellement la force ionique du tampon de lavage qui compétitionnera avec la protéine d'intérêt, qui sera éventuellement élue. Alternativement et plus rarement, il est possible d'utiliser un gradient de pH à cette fin.

Les fractions contenant PALB2 purifiée sur la colonne Talon ont été regroupées et dialysées contre 1l de tampon R150 (20mM Tris-Cl pH 8, 10% glycérol, 1mM EDTA, 150mM KCl, 0,5mM DTT). L'échantillon a été chargé sur la colonne pré-équilibrée (HiTrap Q Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) dans le tampon R150 à un débit de 0,5ml/min. Celle-ci a ensuite été lavée avec 20ml de tampon R150 et notre protéine a été élue grâce à l'application d'un gradient de 150mM KCl à 1M KCl sur 10ml à un débit de 0,5ml/min. Des fractions de 250µl ont été récoltées et analysées par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie.

Celles-ci ont été regroupées et dialysées contre 1l de tampon de conservation 500mM NaCl puis 250mM NaCl (20mM Tris-HCl pH 8,0, 500mM et 250mM NaCl, 10% glycérol,

0,05% Tween) pendant 45 minutes pour chaque tampon à 4°C sous agitation. Elles ont ensuite été aliquotées et congelées sur glace sèche et stockées à -80°C.

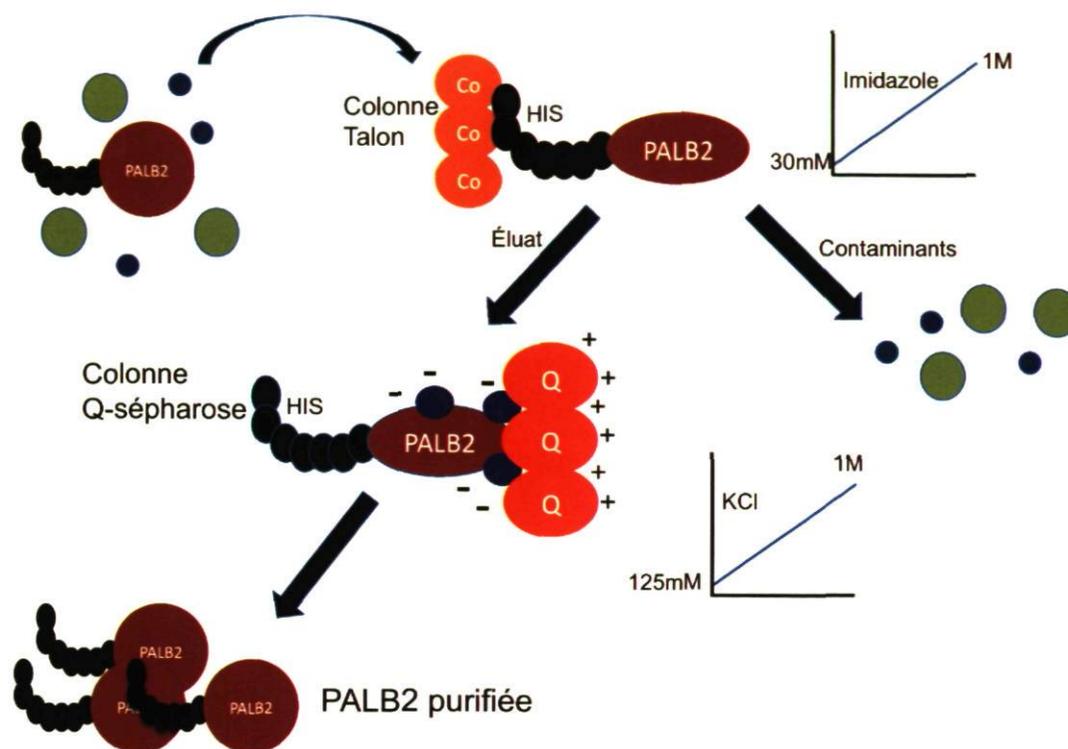


Figure 18 : Schéma représentant les étapes suivies pour la purification de PALB2.

Les cellules Sf9 exprimant notre protéine (PALB2) sont lysées et l'extrait soluble est appliqué sur une colonne Talon. La colonne est lavée avec notre tampon de lyse puis à concentration croissante d'imidazole afin d'éliminer le plus possible d'éventuels contaminants. La protéine éluée est dialysée dans le tampon utilisé pour la colonne Q separose. La protéine partiellement purifiée est appliquée sur la colonne Q separose et un gradient de KCl permet d'éliminer davantage de contaminants. La protéine récoltée est très pure et conservée à -80°C pour un usage ultérieur dans son tampon de conservation.

2. Purification de RAD51 humaine en bactérie

La purification de la protéine RAD51 humaine a été décrite précédemment dans la littérature (Baumann et al., 1997). Brièvement, on utilise une souche bactérienne d'*E. coli* mutante *recA*. Ceci permet d'éliminer le risque de contamination par cet homologue structural et fonctionnel de RAD51. Une première étape de purification est effectuée par la précipitation à la spermidine, un composé permettant la précipitation des protéines filamenteuses. Le culot est resuspendu et appliqué sur une première colonne

d'hydroxylapatite. Par un mécanisme mal compris, les protéines liant l'ADN ont tendance à présenter une bonne affinité pour les ions phosphates immobilisés sur ce composé. Le lavage et l'élution sont effectués avec une concentration croissante de phosphate de potassium. Les fractions contenant RAD51 sont jumelées et appliquées sur une colonne héparine, un composé dont la structure chimique est similaire à l'ATP, lié par RAD51. Une élution en escalier à concentration croissante de KCl permet de récupérer RAD51. Enfin, les fractions récupérées sont appliquées sur une colonne Mono-Q, une échangeuse d'anions qui lie les protéines chargées négativement par l'utilisation d'un pH supérieur à leur point isoélectrique. L'élution se fait encore une fois en augmentant graduellement la concentration de KCl, ce qui permet de compétitionner les interactions ioniques en jeu. La protéine obtenue est très pure et exempte de contaminants.

3. Co-précipitation en cellules humaines

3.1. Transfection des cellules HEK 293T

Afin d'étudier la multimérisation de PALB2 en cellules humaines, il était nécessaire d'utiliser deux constructions de PALB2 portant deux étiquettes différentes et co-transfectées. Pour ce faire, $1,2 \times 10^6$ cellules HEK 293T ont étéensemencées la veille de la transfection dans des pétris de 10cm (3 pétris par condition). 1 heure avant la transfection, 9ml de milieu frais ont été ajoutés. Pour former le précipité, 7,5 μ g de chacun des plasmides utilisés a été dilué dans 375 μ l d' H_2O stérile avant d'ajouter 125 μ l de $CaCl_2$ 1M filtré. 500 μ l de HBS2X (50mM HEPES pH 7,1, 280mM NaCl, 1,5mM Na_2HPO_4) sont ensuite ajoutés goutte à goutte en vortexant. On mélange par l'ajout de trois volumes d'air et on incube à température de la pièce 20 minutes. On ajoute ensuite 25 μ M final de chloroquine aux cellules avant d'ajouter le précipité formé et on incube 6 heures. Les cellules sont lavées deux fois au PBS et on ajoute du milieu frais pour 24 heures avant de récolter les cellules.

3.2. Lyse et co-précipitation

Les cellules sont lysées dans 250 μ l de tampon IP250 (50mM Tris-HCl pH 7,4, 250mM NaCl, 0,5% NP-40 + inhibiteurs 1mM PMSF, 0,019 UIT/ml aprotinine et 1 μ g/ml leupeptine, 5mM NaF et 1mM Na_3VO_4) pour 30 minutes sur glace. Les cellules sont ensuite soniquées 3 fois 5 secondes à moyenne intensité et centrifugées 30min à vitesse

maximale à 4°C pour clarifier l'extrait. Les extraits sont dosés par la méthode de Bradford (Bio-Rad). 2mg d'extrait sont incubés pour la nuit en présence de 20µl de billes Talon (Clontech) dans un volume total de 1ml d'IP250. Les billes sont lavées 3 fois avec 1ml d'IP250 en centrifugeant à basse vitesse à chaque fois et sont ensuite asséchées et resuspendues dans 40µl de tampon 2X pour SDS-PAGE.

3.3. SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western

Les protéines précipitées sur la résine Talon sont déposées sur SDS-PAGE et transférées par la suite sur membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée pendant 1 heure dans du PBS-Tween 0,05% contenant 5% de lait. La membrane est incubée 16 heures dans l'anticorps anti-FLAG (Sigma) 1 :5000 dilué dans du PBS-0,05% Tween contenant 5% de lait. 3 lavages au PBS-Tween 0,05% sont effectués avant d'ajouter l'anticorps secondaire anti-souris dilué 1 :10000 dans du PBS-Tween 0,05%. Les protéines sont révélées par chemiluminescence à l'aide du kit de Amersham ECL Plus TM.

4. Immunoprécipitation de RAD51 en Sf9

On infecte 20 x 10⁶ cellules Sf9 dans 20ml de GM dans un tube de 50ml avec notre virus dilué (PALB2 1 :150, PALB2Q775X 1 :1000 RAD51 1 :500), le tout sous agitation rotative pour une durée de 48 heures. Les cellules sont congelées après centrifugation jusqu'à la lyse.

Les cellules sont décongelées sur glace et resuspendues dans 500µl de tampon IP250 contenant des inhibiteurs de protéases. On sonique afin de clarifier l'extrait et on centrifuge à 13000 rpm pour 15 minutes 2 fois et on prélève le surnageant. 100µl d'extrait sont incubés en présence de l'anticorps polyclonal anti-PALB2 (5µl, Strategic Diagnostics) dans un volume final de 1ml pour 1 heure à 4°C sous agitation. On ajoute ensuite les complexes immuns à 25µl de billes protéines A/G préalablement lavées pour 1 heure à 4°C sous agitation. Les billes sont ensuite lavées à trois reprises dans du tampon IP250/500/1000 avant d'être asséchées et resuspendues dans 30µl de tampon 2x pour SDS-PAGE (125mM Tris-HCl pH6,8, 2% SDS, 10% glycérol) avant de résoudre sur gel 10% acrylamide que l'on analysera ensuite par immunobuvardage de type Western anti-RAD51 (anticorps monoclonal 14B4).

5. Filtration sur gel

La filtration sur gel est une méthode chromatographique qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire et de leur conformation. La matrice utilisée est une résine poreuse inerte dans laquelle les petites molécules sont retardées contrairement aux grosses qui passent plus facilement. De la même façon, une protéine globuleuse sera plus retardée qu'une protéine dont la conformation serait plus « ouverte ». On obtient ainsi des fractions contenant des protéines et des complexes de protéines dont le poids moléculaire diminue à mesure que l'élution progresse. Toutes les filtrations sur gel ont été effectuées sur une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE healthcare).

5.1. Les standards de poids moléculaire

Les standards de filtration sur gel (Bio-Rad) nous permettent d'évaluer par comparaison le poids moléculaire des protéines et/ou complexes élués sur la colonne (selon le même protocole d'élution). Ils sont composés de thyroglobuline (670kDa), γ -globuline bovine (158kDa), ovalbumine de poulet (44kDa), de myoglobine de cheval (17kDa) et de vitamine B12 (1,35kDa).

5.2. Filtration sur gel de la protéine PALB2 purifiée

La protéine PALB2 purifiée a été dialysée contre 1l de tampon GF 100mM NaCl ou 750mM NaCl (20mM Tris-Cl pH 8, 100mM ou 750mM NaCl, 10% glycérol, 0,05% Tween-20, 1mM DTT) pour 1 heure à 4°C. Ensuite, l'échantillon est appliqué (240 μ l, 3 μ g) sur la colonne pré-équilibrée dans le tampon GF, après quoi 26,4ml sert à l'élution à un débit de 0,3ml/min. Des fractions de 500 μ l sont récoltées. Les fractions sont analysées par SDS-PAGE suivi d'un immunobuvardage de type Western.

5.3. Filtration sur gel d'extraits de cellules Sf9

Un culot cellulaire correspondant à 10ml de cellules Sf9 infectées avec les virus codant pour la ou les protéines d'intérêt a été décongelé sur glace et lysé dans 300 μ l de tampon (25mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5% glycérol, 1mM DTT, 0,05% Tween-20 contenant 0,019 UIT/ml aprotinine, 1mM PMSF et 1 μ g/ml leu-peptine). Les cellules sont ensuite soniquées à moyenne intensité et centrifugées deux fois 10 minutes à vitesse maximale à

4°C en récupérant le surnageant à chaque fois afin de clarifier l'extrait. Celui-ci est dosé par la méthode de Bradford (Bio-Rad) et 1,5mg d'extrait dans 240µl de tampon est appliqué sur la colonne. Le protocole d'élution est le même que celui décrit à la section 5.2.

5.4. Filtration du gel d'extraits de cellules humaines

La filtration sur gel d'extraits de cellules humaines permet de détecter la formation de complexes et les formes prédominantes de protéines de façon endogène. 250ml de cellules en suspension (HSC93, lignée lymphoblastique) en phase exponentielle sont traitées (ou non) 30min avec 50µM etoposide (ou DMSO), un inhibiteur des topoisomérases de type II conduisant à l'accumulation de cassures double-brin. Les cellules sont relâchées 30 minutes pour permettre la réponse aux dommages créés de s'articuler, puis récoltées par centrifugation et lysées dans 200µl de tampon (voir section 5.3, on y ajoute les inhibiteurs de phosphatases 5mM NaF et 1mM Na₃VO₄), Les cellules sont soniquées à moyenne intensité et centrifugées à vitesse maximale à 4°C 2 fois 10 minutes en récupérant le surnageant à chaque fois afin de clarifier l'extrait. L'extrait est dosé par la méthode de Bradford et 5mg sont chargés sur la colonne. Le protocole d'élution est le même que celui décrit à la section 5.2.

6. Essais de retard sur gel

6.1. Préparation de la sonde d'ADN simple brin (ADNsb)

Les différents substrats ont été préparés à partir d'un oligonucléotide de 60 bases radiomarké (Voir Tableau 2). 2,5µg d'ADN ont été marqués avec 50µCi de ATP³² à l'aide de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (T4 PNK, *New England BioLabs*) dans son tampon de réaction dans un volume final de 100 µl pour 1 heure à 37°C.

Lorsque les substrats ont été utilisés dans leur forme simple brin seulement, ceux-ci ont été purifiés de la façon suivante. Un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamyl (25 :24 :1) est ajouté et vortexé vigoureusement avant une centrifugation à vitesse maximale de 4 minutes. La phase aqueuse est alors prélevée et on ajoute un volume de chloroforme. On vortexe vigoureusement le tout et on centrifuge comme précédemment. La phase aqueuse est prélevée et subséquemment purifiée sur colonne (Illustra MicroSpin™

G-50 Columns, GE Healthcare) selon le protocole du fabricant. Le volume élué constitue notre sonde et sera dosé à l'aide d'un compteur scintigraphique (Voir la section 6.4).

6.2. Appariement d'oligonucléotides complémentaires

Afin de créer différents substrats (ADNdb, 5'-protubérant, 3'-protubérant, jonction de Holliday synthétique, fourche de réplication), nous utilisons différents oligonucléotides complémentaires ou partiellement complémentaire à l'ADNsb radiomarké. Une quantité en excès d'oligonucléotide est ajoutée au mélange de réaction de phosphorylation préalablement inhibé à 65°C pour 20 minutes. On incube ensuite le tout en série de 5 minutes à 95°C, puis 90°C, et ainsi de suite jusqu'à 10°C. On purifie sur gel d'acrylamide (voir section 6.3).

6.3. Purification des sondes sur gel d'acrylamide

Afin de bien séparer les différents intermédiaires de réaction d'appariement, et en particulier afin d'éliminer l'ADNsb résiduel, il est nécessaire de purifier nos sondes sur gel d'acrylamide 10% en TBE (90mM Tris, 90mM borate, 1mM EDTA, pH 8). Nos sondes sont chargées sur le gel qui sera migré à 250V pour une durée de 3 heures. Le gel est ensuite déposé dans une cassette et recouvert de pellicule plastique. On l'expose sur un film durant 1 minute, ce qui nous permet de repérer notre sonde. La région correspondante est prélevée à l'aide d'un scalpel et transférée dans un tube 1,5ml. On ajoute 200µl de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) et on écrase le gel à l'aide d'un embout. Le tout est incubé pour la nuit sous agitation légère à température de la pièce, afin de permettre à l'ADN de diffuser à l'extérieur du gel. Le lendemain, le tube est centrifugé à vitesse maximale pour 4 minutes et on récupère le surnageant que l'on dosera par scintillation (voir section 6.4).

6.4. Dosage des sondes au compteur à scintillation

Afin de procéder au dosage de notre sonde, 1µl a été prélevé suivant le marquage et un second après les différentes étapes de purification. On le dilue dans 99µl d'EDTA 0,1M pH8. 2µl de cette dilution sont appliqués sur un papier DE81 qui sera ensuite lavé dans le tampon de lavage (0,5M Na₂HPO₄ pH 6,2) et dosé dans 5 ml de liquide à scintillation

(Perkin Elmer) à l'aide du compteur LKB 1214, Wallac RackBeta (Perkin Elmer). Notre concentration sera obtenue grâce au calcul suivant :

$$\frac{C_{\text{initiale}} \left(\frac{\text{Compte}_{\text{avant}}}{\text{Compte}_{\text{après}}} \right)}{0,325} = \mu M$$

6.5. Titration de PALB2 et retard sur gel d'acrylamide

Ce type d'expérience vise à déterminer l'affinité de la protéine purifiée pour différents substrats d'ADN. Il permet également de visualiser dans certains cas la formation de différents types de complexes ADN-protéine.

Les réactions sont effectuées dans un volume final de 10 μ l. Celles-ci contiennent 100nM de la sonde utilisée dans du tampon AIO 1X (*all-in-one*, 20mM TEA-Cl pH 7,5, 2mM ATP, 2,5mM Mg(CH₃COO)₂, 1mM DTT, 100 μ g/ml BSA). On prépare d'abord le milieu de réaction contenant la sonde que l'on équilibre 2 minutes à 37°C. On ajoute ensuite la protéine purifiée dans un volume constant de tampon de dialyse (voir la section 1.7 du Matériels et méthodes) et on incube pour 10 minutes à 37°C. Enfin, puisque la fixation de protéines sur l'ADN est un processus dynamique, on fixe par l'ajout de 0,2% de glutaraldéhyde durant 15 minutes à 37°C. Les complexes sont ensuite migrés sur gel d'acrylamide 4,2% à 150V pour 2h15 dans une solution Tris Glycine (50mM Tris-HCL pH8,8, 50mM glycine). Les gels sont ensuite séchés sur papier DE81 et révélés par autoradiographie sur film HyperfilmTM (Amersham). La quantification, lorsqu'applicable, a été faite sur un écran phosphore (Molecular Dynamics, Amersham) à l'aide d'un appareil FUJIFILM FLA-5100 équipé du logiciel MultiGauge V3.0.

6.6. Titration de PALB2 et retard sur gel d'agarose

Les réactions sont effectuées identiquement à la section 6.5. Cependant, comme les pores d'un gel d'agarose sont plus grands qu'un gel d'acrylamide, ce type de gel nous permet de résoudre des complexes de plus haut poids moléculaire. Les réactions sont donc migrées à 60V pour 2h30 dans un gel 0,8% agarose en TAE (40mM Tris base, 1mM EDTA, 1,1%

acide acétique glacial). Le gel est séché et révélé comme précédemment par autoradiographie.

6.7. Retard sur gel d'agarose en présence d'un anticorps

La réaction est effectuée comme précédemment avec les modifications suivantes. On utilise différentes concentrations de PALB2 (0nM, 0,25nM, 0,5nM) que l'on maintient constante en augmentant la quantité d'anticorps (0µg, 0,25µg et 0,5µg, α -PALB2 pAb, Strategic Diagnostics Inc.). Les réactions sont d'abord incubées 5 minutes suite à l'ajout de PALB2 puis un autre 5 minutes suite à l'ajout de l'anticorps. Les réactions sont fixées avec de la glutaraldéhyde 0,2% final 5 minutes et migrées en gel d'agarose comme à la section 6.6.

7. Essai de réappariement de duplex d'ADN

La recombinaison homologue implique l'appariement de longues séquences complémentaires dont l'efficacité est limitée par l'action d'hélicases, mais maximisée grâce à des activités de réappariement. Ce type d'essai permet de voir si la protéine étudiée possède cette activité.

7.1. Préparation du substrat

Le plasmide pPB4.3 est digéré avec les enzymes *NdeI* et *HindIII*, suivi d'une déphosphorylation avec la phosphatase alcaline de veau (*New England BioLabs*). Le produit de digestion/déphosphorylation est migré sur gel d'agarose en TAE afin de le purifier avec le kit d'extraction sur gel (Feldan Bio). Le fragment de 400pb est marqué et dosé comme précédemment (Sections 6.1 et 6.4 du Matériel et méthodes).

7.2. Réaction de réappariement d'ADN

La sonde est d'abord dénaturée 2 minutes à 100°C (on conserve un petit volume natif) puis déposée directement sur glace afin d'éviter un réappariement aléatoire trop important. On prépare les tubes de réaction comme précédemment et on ajoute PALB2 avant d'incuber 5 minutes à température de la pièce. On ajoute ensuite la sonde et on incube de nouveau 5 minutes à température de la pièce. La réaction est déprotéinisée par l'ajout de 2µl de protéinase K 20mg/ml 10% SDS ou fixée par l'ajout de 0,2% glutaraldéhyde pour 15

minutes à température de la pièce. Enfin, on résout le tout sur gel 4,2 % acrylamide migré en TBE (90mM Tris base 90mM acide borique, 2mM EDTA), 2h30 à 175V.

8. Essai d'échange de brin

Les réactions sont réalisées dans un volume final de 10 μ l. On incube d'abord RAD51 avec un oligo froid de 63 nucléotides (0,7 μ M) avec ou sans PALB2 afin de permettre la formation du nucléofilament dans du tampon PTUK (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 1 mM DTT, 7,5 mM créatine-phosphate et 30 U/ml créatine kinase) pour 5 minutes à 37°C. Par la suite, on ajoute l'ADNdb de 63pb (0,7 μ M) préalablement radiomarqué (voir les sections 6.1 à 6.4 du matériel et méthodes) et on incube le tout pour 90 minutes à 37°C. Les réactions sont déprotéinisées par l'ajout de 2 μ l de tampon d'arrêt (100mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM MgCl₂, 3% SDS, 5 μ g/ml de bromure d'éthidium et 10 mg/ml de protéinase K) pendant 30 minutes à 37°C. Les produits de réactions sont analysés par électrophorèse en gel d'acrylamide 8% TBE, séchés et révélés comme précédemment.

9. Microscopie électronique

La microscopie électronique est une puissante technique d'imagerie qui permet de résoudre des structures beaucoup plus petites qu'en microscopie optique grâce à un faisceau d'électrons. Ainsi, il est possible d'observer des structures particulières formées par une protéine sur l'ADN, par exemple un filament nucléoprotéique de RAD51.

Le plasmide pcDNA3 (Invitrogen) a été linéarisé à l'aide de l'enzyme *EcoRV* (*NewEngland BioLabs*), celle-ci permettant de générer des extrémités non-cohésives en un seul site. Pour ce faire, 25 μ g d'ADN ont été digérés avec 150U d'enzyme pour une durée de 6 heures à 37°C dans un volume final de 200 μ l, dans le tampon fourni par le fabricant. L'ADN a ensuite été migré sur gel d'agarose et extrait à l'aide du kit approprié (Feldan Bio). L'ADN a été dosé au spectrophotomètre.

Les réactions sont réalisées dans du tampon AIO sans BSA (voir section 6.5) dans un volume final de 10 μ l. De plus, le tampon de dialyse utilisé ne contient pas de Tween-20 ni de glycérol (20mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl). Les réactions sont préparées avec le tampon de réaction AIO sans BSA et notre ADN à 10 μ M final (pcDNA3 linéarisé, ϕ X174

virion, ϕ X174 RF I de *New England BioLabs*) que l'on incube 2 minutes à 37°C. On ajoute ensuite PALB2 à une concentration finale de 10nM ou 45nM et l'on incube 10 minutes à 37°C. Enfin, on fixe les réactions par l'ajout de 0,4% de glutaraldéhyde 0,2% final 15 minutes à 37°C. On congèle sur glace sèche. Les complexes sont visualisés sur un appareil de type Phillips CM100.

10. Recherche bio-informatique d'un domaine de liaison à l'ADN

BindN est un outil bio-informatique disponible publiquement sur internet (<http://bioinfo.ggc.org/bindn/>) (Wang and Brown, 2006). Ce logiciel permet l'analyse de séquences primaires de protéines en vue d'y trouver un domaine potentiel de liaison à l'ADN ou à l'ARN. Pour ce faire, la séquence de la protéine d'intérêt est comparée à une banque d'une soixante de domaines de liaison à l'ADN connus en tenant compte du pKa des chaînes latérales et de la masse moléculaire des acides aminés ainsi que de l'indice d'hydrophobicité. L'exactitude, la sensibilité et la spécificité sont estimées à environ 70%.

Résultats

1. Purification de PALB2 recombinante

L'expression hétérologue de protéines humaines en vue d'en faire la purification nécessite un choix judicieux de l'hôte, de même qu'un certain nombre de mises au point afin d'optimiser la quantité et la qualité (i.e. pleine longueur) de la protéine traduite et ultimement purifiée. Les cellules d'insecte Sf9 sont une excellente option pour plusieurs raisons. D'abord, puisqu'il s'agit de cellules eucaryotes, le repliement risque d'être plus adéquat que si l'hôte utilisé était procaryote (e.g. *E. coli*). Cet élément est d'autant plus important que les essais biochimiques nécessitent des protéines non seulement pleine longueur, mais fonctionnelles. D'autre part, ces cellules sont reconnues pour procéder à des modifications post-traductionnelles semblables aux cellules humaines, ce qui est fortement intéressant quand on sait que l'activité d'une protéine peut reposer sur un événement de phosphorylation, par exemple.

Ainsi, *PALB2* et les autres mutants ont été insérés dans le vecteur d'expression pFastBacTM1 avec une étiquette histidine, ce qui permet de produire un bacmide recombinant. Ce bacmide permet de produire un virus qui infectera les cellules Sf9, qui exprimeront alors notre protéine d'intérêt. Le ratio et la durée d'infection optimaux doivent être déterminés, afin de s'assurer que le niveau d'expression atteint est suffisant sans toutefois conduire à la dégradation de la protéine, qui survient lorsque la durée d'infection est trop longue. Une fois ces paramètres connus, nous avons procédé à l'infection et la récolte des cellules infectées.

L'extrait soluble est appliqué sur une colonne Talon qui permet la liaison de l'étiquette histidine grâce à sa résine couplée à du cobalt. Cette étape de purification permet d'éliminer une très grande partie des contaminants, par des lavages à concentration croissante d'imidazole, un compétiteur de l'histidine. Comme on peut le constater à la Figure 19 sur un gel coloré au bleu de Coomassie, il est possible de purifier PALB2 pleine longueur en suivant cette procédure. Cependant, il reste un contaminant majeur (identifié par l'astérisque), qui est en fait un fragment de dégradation de PALB2, et nous avons par la suite testé plusieurs procédures afin de l'éliminer.

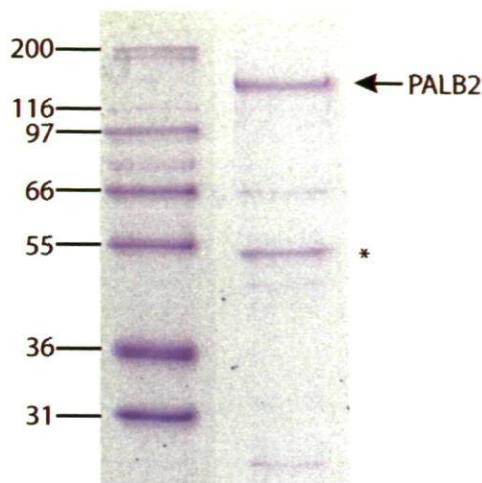


Figure 19 : Purification de PALB2 (131kDa) sur colonne Talon. La protéine purifiée (250ng) a été déposée sur SDS-PAGE puis colorée au bleu de Coomassie. L'astérisque identifie le fragment de dégradation de PALB2 d'environ 55kDa. L'identité de la protéine purifiée et de son fragment de dégradation a été confirmée par immunobuvardage de type Western anti-PALB2, non montré ici.

La première approche a été d'ajouter une étiquette strep à l'extrémité N-terminale de PALB2. L'avantage de cette méthode réside en le fait que la protéine éluée sera pleine longueur, puisque deux étapes de purification utilisant des étiquettes à chaque extrémité sont effectuées. Malheureusement, la protéine récoltée sur la colonne Talon n'était pas suffisamment concentrée pour donner des résultats satisfaisants. En effet, la colonne streptactin exige une protéine très concentrée, ce qui n'était pas le cas (1 μ M vs 100nM).

Une seconde approche aurait été d'utiliser une colonne de filtration sur gel. Par son poids moléculaire inférieur, nous nous serions attendus à ce que le contaminant élué dans des fractions correspondant à des poids moléculaires inférieurs à la protéine pleine longueur. Malheureusement, le contaminant co-élué avec PALB2 et nous verrons plus loin que ceci est probablement dû à une propriété intrinsèque de multimérisation de PALB2.

Enfin, il nous aura été possible d'obtenir une protéine très pure par l'utilisation d'une colonne échangeuse d'anions de type Q sepharose (Voir la Figure 20). Sa résine chargée positivement permet la liaison des protéines chargées négativement au-delà de leur pI. L'utilisation d'un gradient de KCl compétitionne ces interactions ioniques, ce qui permet d'élué notre protéine à forte concentration (environ 400mM). Encore une fois, comme

indiqué par un astérisque à la Figure 20, le contaminant éluait partiellement avec la protéine pleine longueur, mais il nous a été possible d'isoler quelques fractions de protéine pleine longueur très pure. On notera que PALB2 s'est avérée être une protéine particulièrement difficile à purifier, en plus d'être très susceptible à la dégradation et de mal tolérer les cycles congélation-décongélation. Néanmoins, les quantités obtenues auront été suffisantes pour réaliser la plupart des essais souhaités.

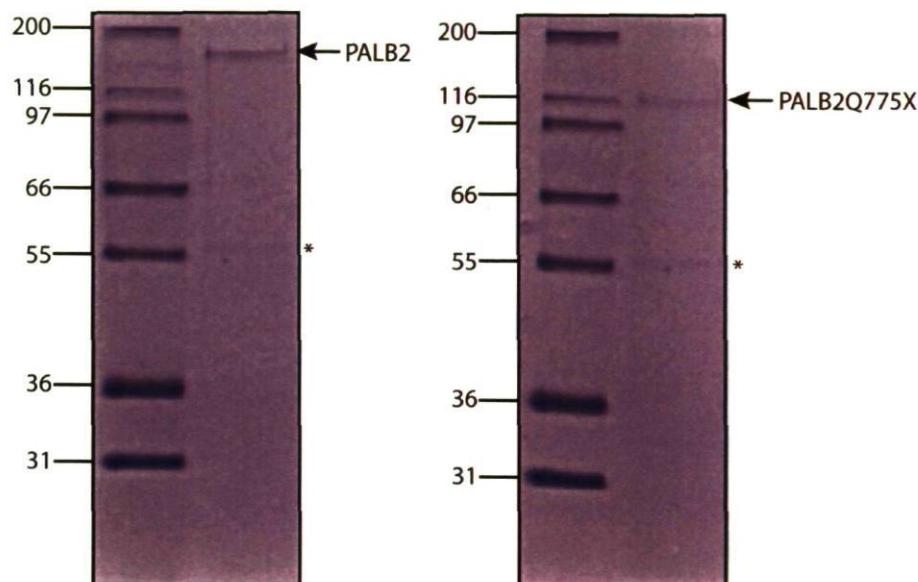


Figure 20 : SDS-PAGE des protéines purifiées.

Purification des protéines PALB2 (131kDa) par l'utilisation successive d'une colonne Talon et Q-sépharose et PALB2Q775X (86kDa) par l'utilisation d'une colonne Talon. Les protéines purifiées (250ng) ont été déposées sur SDS-PAGE puis colorées au bleu de Coomassie. L'astérisque identifie le fragment de dégradation de PALB2 d'environ 55kDa. L'identité des protéines purifiées et de leur fragment de dégradation a été confirmée par immunobuvardage de type Western anti-PALB2, non montré ici.

2. Formation de multimères

Nombre de protéines impliquées dans la recombinaison homologue possèdent une capacité de multimérisation. On pense notamment à la protéine kinase ATM qui, sous sa forme inactive, est un dimère. Comme discuté précédemment, RAD51 forme des multimères tant en solution que sur l'ADN dont la structure varie (octamère et nucléofilament hélicoïdal

respectivement). Cette capacité de multimérisation est étroitement liée à la fonction de la protéine et constitue un niveau de régulation important.

PALB2 possède à son extrémité N-terminale un domaine coiled-coil prédit de façon bio-informatique. Ce type de domaine, prédit chez près de 10% des protéines eucaryotes, montre une structure très organisée sous forme d'hélice alpha. Ils sont impliqués dans des interactions protéine-protéine et médient très souvent la formation d'homo-multimères (Grigoryan and Keating, 2008). Nous avons donc voulu, par différentes techniques, voir si PALB2 était capable d'interagir avec lui-même.

2.1. Filtration sur gel

La filtration sur gel est une technique qui permet d'estimer de façon comparative le poids moléculaire d'une protéine. Déjà, la présence d'un domaine coiled-coil dans la séquence primaire d'une protéine révèle fréquemment une capacité de multimérisation (Grigoryan and Keating, 2008). Nous avons donc voulu vérifier si cette technique nous permettrait d'observer la formation d'homo-multimères de PALB2, dans différents contextes.

L'utilisation de standards de poids moléculaires préalable au passage de notre protéine nous permet, par comparaison des profils d'élution, d'évaluer approximativement le poids moléculaire de celle-ci. À la Figure 21, on peut voir le profil d'élution de PALB2 purifiée observé par immunobuvardage de type Western anti-histidine. On note une absence de PALB2 dans les fractions correspondant à son poids moléculaire prédit de 130kDa. Ensuite, on remarque un profil d'élution très étendu, largement au-delà du marqueur de 158kDa. Ceci suggère la formation de multimères présentant un nombre variable de sous-unités en solution. On observe également un pic de protéines aux environs de 400kDa. Ceci laisse croire que la forme dominante pourrait être un dimère ou un trimère (puisque le poids apparent dépend étroitement de la conformation adoptée).

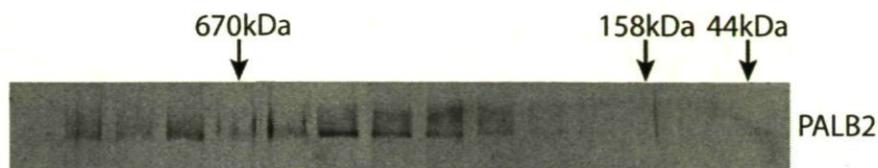


Figure 21 : Filtration sur gel de PALB2 purifiée.

Fractions d'élution visualisées par immunobuvardage de type Western anti-histidine permettant de révéler PALB2.

Nous avons tenté de vérifier s'il était possible de briser ces interactions à fortes concentrations de sels. Le cas échéant, cela suggérerait que la multimérisation de PALB2 serait médiée par des interactions de nature hydrophiles, déstabilisées par les sels. Cependant, même à 750mM NaCl, le profil d'élution demeure inchangé. Ceci suggère ou des interactions de nature hydrophobes, stabilisées par l'ajout de charges ioniques, ou des interactions très stables et fortes.

On observe sensiblement le même profil d'élution pour la protéine de type sauvage et le mutant PALB2Q775X associé au cancer du sein lorsque surexprimés en cellules d'insecte (Voir la Figure 22). Ceci ajoute à l'hypothèse que la formation de multimères est médiée par la portion N-terminale de la protéine, puisque le domaine C-terminal est ici tronqué.

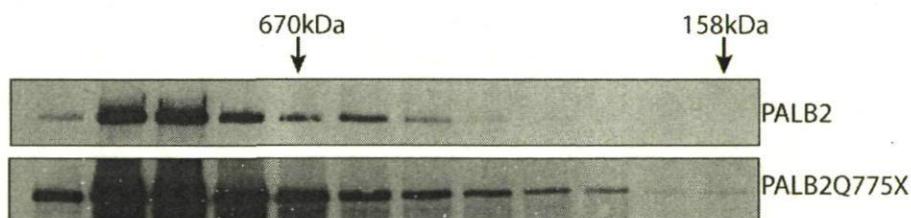


Figure 22 : Filtration sur gel d'extraits de cellules d'insecte exprimant PALB2 et PALB2Q775X.

Fractions d'élution visualisées par immunobuvardage de type Western anti-histidine, permettant de visualiser PALB2 et PALB2Q775X. La différence observée résulte d'un niveau d'expression et de stabilité beaucoup plus élevés pour PALB2Q775X que PALB2.

Nous avons ensuite voulu voir si PALB2, de façon endogène, pouvait se retrouver sous forme de monomère (Voir la Figure 23). Encore une fois, on retrouve PALB2 majoritairement dans les fractions de haut poids moléculaire, mais toujours absent dans les

fractions correspondant à son poids moléculaire sous forme de monomère attendu. De façon intéressante, on remarque la présence d'un pic dans les fractions d'environ 350kDa, ce qui peut suggérer la présence d'homodimère, sans toutefois nous le confirmer. En effet, il pourrait s'agir d'un monomère en complexe avec une autre protéine de poids moléculaire similaire. On observe également un léger déplacement de la protéine dans des fractions de plus haut poids moléculaires (Fractions 16, 18 et 19) en réponse au traitement à l'étoposide, un inhibiteur des topoisomérases de type II induisant des cassures double-brin à l'ADN. Ceci suggère un réassemblage des complexes en réponse aux dommages à l'ADN.

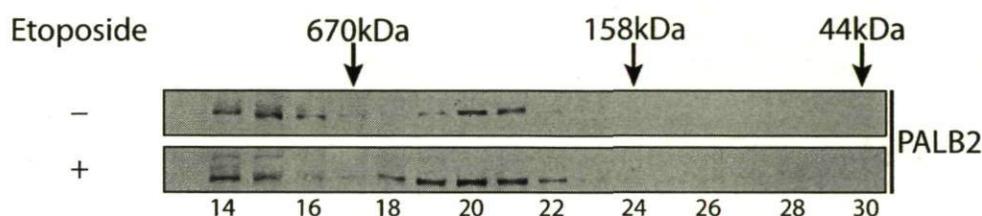


Figure 23 : Filtration sur gel d'extraits de cellules humaines HSC93.

Les cellules sont traitées ou non à l'étoposide 50 μ M 30 minutes et relâchées 30 minutes. Immunobuvardage de type Western anti-PALB2.

2.2. Co-précipitation de PALB2 en cellules humaines

Afin de vérifier si PALB2 était capable d'interagir avec lui-même en cellules humaines, nous avons procédé à des expériences de co-précipitation en utilisant une stratégie basée sur la résine Talon. Nous avons donc exprimé seules ou de façon simultanée deux constructions de PALB2 portant une étiquette histidine en C-terminal ou FLAG en N-terminal de la protéine. Le lysat cellulaire est appliqué sur des billes Talon qui nous permettent de précipiter PALB2-histidine et conséquemment FLAG-PALB2 lorsque co-exprimée. En effet, c'est seulement lorsqu'on co-exprime PALB2-histidine avec FLAG-PALB2 que nous sommes en mesure de précipiter ce dernier. Ceci nous confirme donc que PALB2 est en mesure d'interagir avec lui-même.

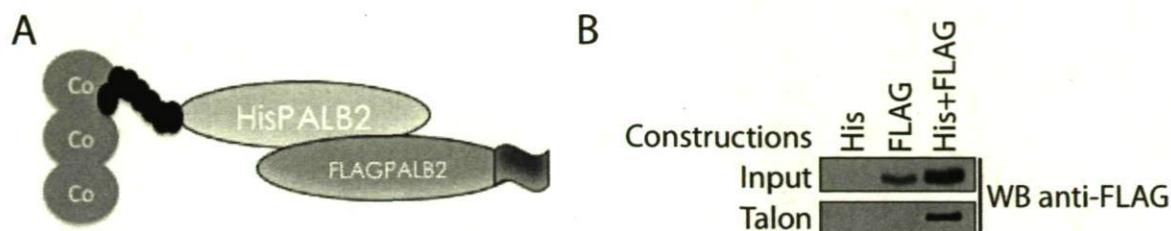


Figure 24 : Co-précipitation de FLAG-PALB2 à l'aide de PALB2-histidine sur résine Talon en cellules HEK 293T.

A. Stratégie expérimentale : La construction PALB2-histidine permet, par précipitation sur billes Talon (Co), de co-précipiter FLAG-PALB2 lorsque co-exprimées, s'il y a formation d'homo-multimères.

2.3. Microscopie électronique

La filtration sur gel est une technique informative, mais qui présente certaines faiblesses. D'une part, le poids déterminé dépend étroitement de la conformation de la protéine étudiée. Ainsi, une protéine globulaire présentera un poids moléculaire apparent inférieur à son poids réel. D'autre part, lorsqu'on étudie la formation de complexes de façon endogène, rien ne nous indique la nature des partenaires réels de la protéine, et dès lors, il est impossible de conclure sur ceux-ci, à moins de coupler la technique à des expériences d'immunoprécipitations sur les fractions isolées. De plus, les expériences de co-précipitations effectuées ne nous renseignent pas sur la stoechiométrie du multimère de PALB2. Il devient donc nécessaire d'observer directement la protéine purifiée afin de conclure à la formation de multimères, et d'évaluer le nombre de molécules interagissant, par homo-multimère. La microscopie électronique est en ce sens une technique idéale puisqu'elle permet d'observer directement une protéine purifiée en solution.

Pour ce faire, des échantillons de protéine purifiée sont préparés sans glycérol, BSA ni détergent, ce qui nuirait à la technique de coloration à l'acétate d'uranyl utilisée. La protéine purifiée utilisée dans le cadre de cette expérience a été obtenue par Rémi Buisson, dans le laboratoire. On remarquera que cette dernière était beaucoup plus concentrée et ne présentait que très peu de fragments de dégradation grâce à l'utilisation d'un nouveau protocole de purification.

On observe à la Figure 25 la formation d'agrégats de tailles variables, ce qui confirme que PALB2 est en mesure d'interagir avec lui-même. Malheureusement, ces agrégats regroupent un très grand nombre de molécules, ce qui n'est probablement pas le cas de façon endogène. Il n'est donc pas possible de conclure sur le nombre de molécules impliquées de façon endogène par cette approche. On note également la présence de plus petites structures arrondies (probablement des monomères ou des dimères) avec potentiellement une cavité au centre, similaire à ce que l'observe chez d'autres protéines de la réparation de l'ADN, notamment RAD52. La présence de cette cavité pourrait être confirmée par la modélisation de la structure observée, exigeant toutefois plusieurs centaines de clichés dans différentes orientations utilisés afin de reconstruire de façon informatique la structure de la protéine observée. Parce que la protéine utilisée pour réaliser ces images étaient très pures, nous croyons fermement que la protéine observée est PALB2. Néanmoins, afin de s'en assurer, il serait bien d'utiliser la technique de microscopie électronique en combinaison avec l'utilisation d'un anticorps marqué avec une particule d'or, dont la densité élevée permet la détection et l'identification de la protéine reconnue avec une certitude beaucoup plus élevée.

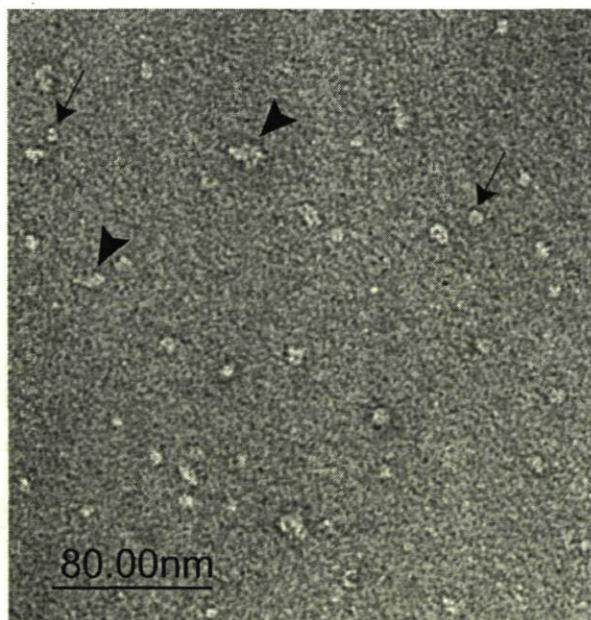


Figure 25 : Micrographie électronique de PALB2 purifiée.

Les flèches montrent de petites structures qui sont probablement des dimères tandis que les pointes de flèches indiquent des complexes de tailles supérieures et variables.

3. Comportement de PALB2 sur l'ADN

Parce que la formation du filament de RAD51 est l'événement limitant de la recombinaison homologue, la stimulation de cette étape et de l'invasion requièrent différentes activités biochimiques de la part des médiateurs. RAD51, tel que discuté précédemment, ne montre que très peu de préférence *in vitro* pour l'ADN simple-brin versus double-brin. Il doit donc exister un mécanisme qui permet de le cibler spécifiquement à l'ADN simple-brin, ce qui a d'ailleurs déjà été suggéré pour BRCA2. On peut donc s'attendre à ce qu'un médiateur de la recombinaison homologue lie l'ADN, et nous avons voulu vérifier cette hypothèse chez PALB2, d'autant plus qu'il s'agit d'un partenaire important de BRCA2. Le cas échéant, une préférence pour l'ADNsb de PALB2 pourrait suggérer un mécanisme de ciblage et de recrutement de RAD51 agissant de façon synergique avec BRCA2.

3.1. PALB2 préfère l'ADN simple-brin

Afin de déterminer la préférence de substrat de PALB2, un certain nombre de substrats marqués radioactivement ont été créés. Ainsi, en mettant en présence la protéine purifiée et ces sondes, il est possible de visualiser les produits de liaison par électrophorèse et autoradiographie. Ces essais nous ont permis de démontrer dans un premier temps, tel que montré à la Figure 26, que PALB2 lie l'ADN, et qu'elle possède une nette préférence pour l'ADN simple-brin versus double-brin (lignes a à n). On remarque également que PALB2 lie tout aussi bien les extrémités 5'- et 3'-protubérantes, et ne présente donc pas de préférence de polarité (lignes o à b'). De plus, la fourche de réplication synthétique est également bien liée par PALB2 (lignes c' à i'). On remarquera que ces substrats ont pour point commun de présenter de l'ADNsb, bien lié par PALB2 tel que montré ici.

Étonnamment, une jonction de Holliday synthétique constitue un substrat tout aussi idéal, bien qu'il n'y ait pas d'ADNsb (lignes j' à p'). Ceci a pu être vérifié par un essai de liaison avec SSB, une protéine de *E.coli* possédant une affinité très élevée pour l'ADNsb et incapable de lier ce substrat (non montré ici). Afin de bien clarifier la préférence de substrat de PALB2, des expériences de compétitions devront être réalisées dans le futur.

Que PALB2 soit capable de lier l'ADN était un peu surprenant, puisque des analyses bio-informatiques préliminaires n'avaient pas pu démontrer la présence d'un domaine de

liaison à l'ADN sur cette protéine. Cependant, nous sommes en mesure d'affirmer que ce domaine de liaison à l'ADN ne se situe pas dans la portion C-terminale de la protéine, puisque le mutant PALB2Q775X est toujours en mesure de lier l'ADN, comme on peut voir à la Figure 27. Une fois ce domaine de liaison identifié, nous serons en mesure de purifier un mutant de celui-ci qui nous permettra de confirmer avec certitude que l'activité de liaison à l'ADN de PALB2 repose sur son propre domaine de liaison.

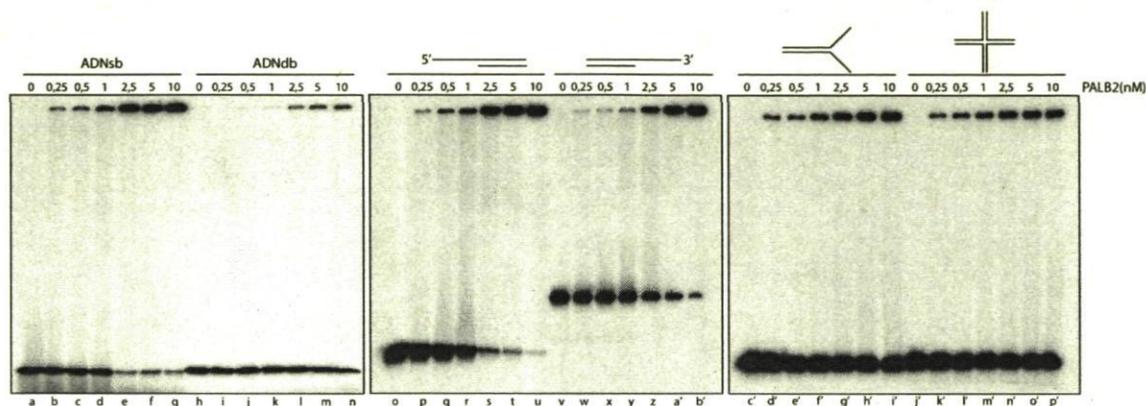


Figure 26 : Activité de liaison à l'ADN de PALB2.

ADN sb, ADNdb, 5'-protubérant, 3'-protubérant, fourche de réplication et jonction de Holliday synthétique. Les substrats radio-marqués à l'ATP³² sont incubés en présence de la protéine purifiée. Les réactions sont ensuite pontées par l'ajout de glutaraldéhyde et résolues par PAGE dans un tampon Tris-glycine.

Puisque les complexes ADN-protéine avaient tendance à s'accumuler au niveau des puits, le gel d'acrylamide ne nous permettait pas de visualiser les potentiels complexes intermédiaires formés. Nous avons donc effectué le même type d'essais en gel d'agarose. On peut noter à la Figure 28 dans la ligne b que les différents complexes visualisés en agarose par la présence d'une traînée suggèrent des interactions homotypiques et représenteraient des complexes composés d'un nombre variable de protéines et de molécules d'ADN.

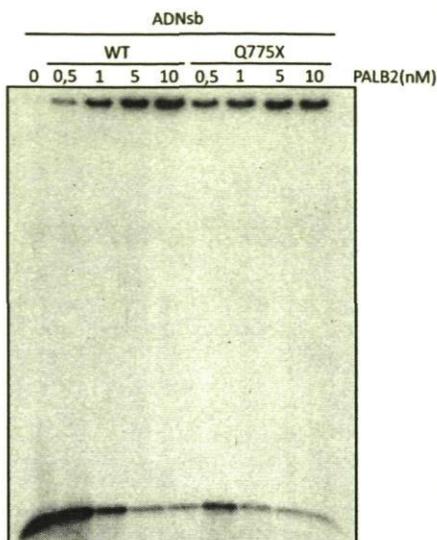


Figure 27 : Activité de liaison à l'ADN de PALB2 et PALB2Q775X sur un substrat d'ADNsb.

Le substrat radio-marqué à l'ATP³² est incubé en présence de la protéine purifiée. Les réactions sont ensuite pontées par l'ajout de glutaraldéhyde et résolues par PAGE dans un tampon Tris-glycine.

Afin de s'assurer qu'il s'agissait bien de PALB2 qui liait notre sonde et non pas un quelconque contaminant, nous avons réalisé un essai de retard sur gel en agarose à concentration constante de PALB2 mais en augmentant graduellement la concentration d'anticorps dirigé contre PALB2. Toujours à la Figure 28, puisque les complexes formés avec l'anticorps sont davantage retardés, ceci confirme que PALB2 est responsable de la liaison à l'ADN observée.

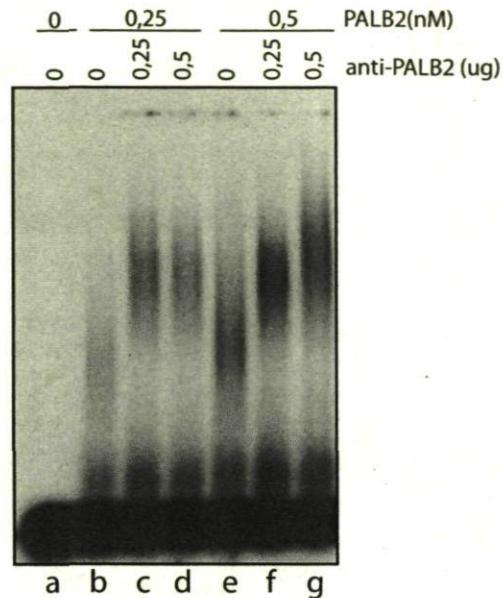


Figure 28 : Activité de liaison à l'ADN de PALB2 sur un substrat d'ADNsb avec ou sans anticorps résolu dans un gel d'agarose.

Enfin, afin d'observer directement la liaison de PALB2 sur l'ADN, nous avons voulu réaliser des réactions similaires à celles effectuées en essais de retard sur gel mais dans le but de les observer directement en microscopie électronique. La réaction montrée ici a été effectuée par Rémi Buisson dans le laboratoire, étant donné que les réactions précédentes contenaient trop peu de protéine et d'ADN (Voir la Figure 29). La réaction a été effectuée en présence d'un plasmide linéarisé sur lequel des extrémités 3'-protubérantes ont été générées. On observe que PALB2 lie directement cet ADN, et de façon plus spécifique et cohérente avec nos résultats obtenus en essai de retard sur gel, qu'il lie les extrémités d'ADNsb.

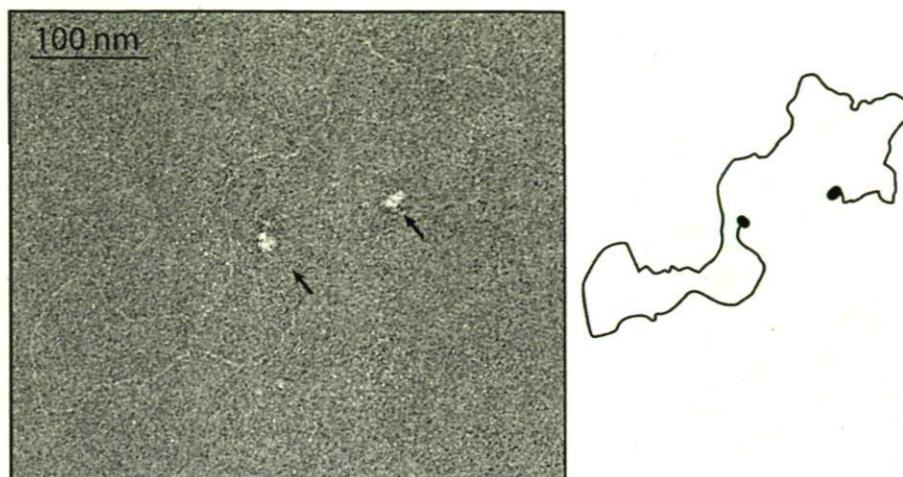


Figure 29 : Micrographique électronique de PALB2 en présence d'ADN présentant des extrémités 3'-protubérantes.

3.2. Identification d'un domaine de liaison à l'ADN par le logiciel BindN

Tel que mentionné précédemment, aucune des données publiées dans la littérature ne suggérait la présence d'un domaine de liaison à l'ADN avant que nous ne réalisions ces essais. Nous avons donc utilisé l'outil bio-informatique BindN afin d'évaluer la possibilité de retrouver un domaine de liaison à l'ADN dans la séquence primaire de PALB2. C'est ainsi que nous avons pu identifier deux sites de liaison à l'ADN potentiels (Voir la Figure 30). Le premier se situe dans la portion N-terminale de PALB2, au cœur du domaine coiled-coil prédit. Le second se retrouve dans la portion interne de la protéine. On remarquera que ces deux domaines sont situés dans des régions hautement conservées de la protéine et qu'ils sont intacts chez la protéine associée au cancer du sein PALB2Q775X.

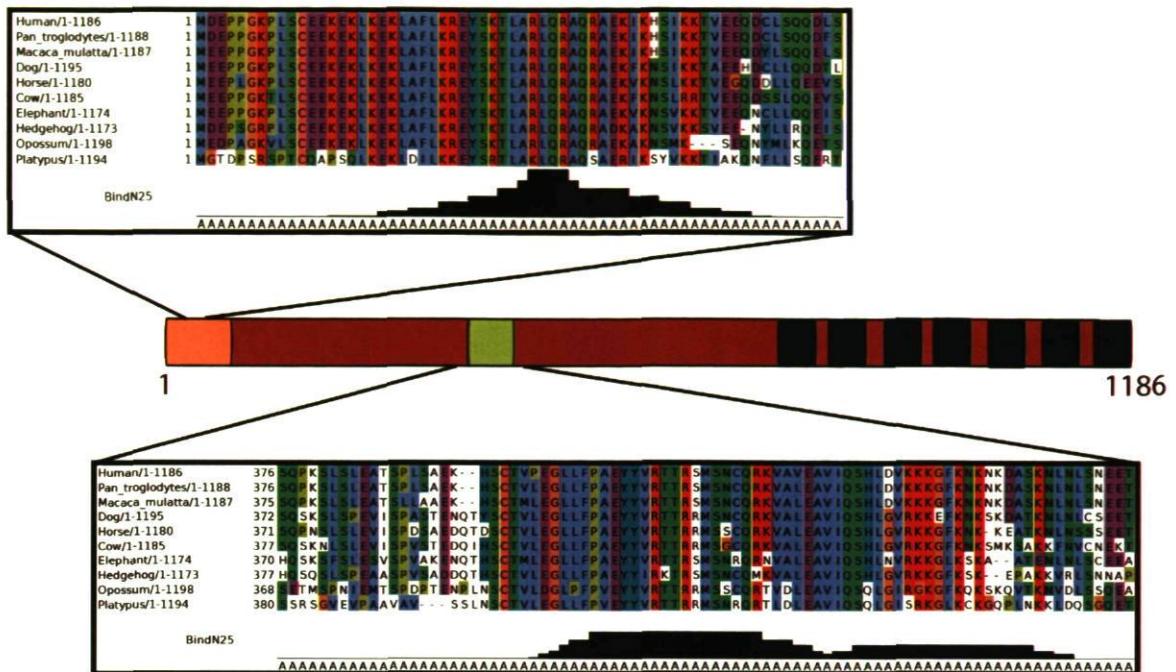


Figure 30 : Prédiction de domaines de liaison à l'ADN dans la séquence primaire de PALB2 par le logiciel BindN.

Au centre, on retrouve la structure schématique de PALB2, avec ses domaines N-terminal (orangé, coiled-coil), central (vert) et C-terminal (bleu, WD40) conservés. De part et d'autre, on retrouve l'alignement de la séquence primaire (effectué à l'aide de Jalview, <http://www.jalview.org>) chez 10 espèces de vertébrés et la localisation prédite du domaine de liaison à l'ADN.

4. Activité de réappariement de l'ADN

Lors de l'étape d'invasion de la recombinaison homologe, de longues séquences d'ADN doivent être réhybridées. Ceci implique qu'un grand nombre d'interactions doivent être testées par la recombinaise RAD51. Comme les intermédiaires sont très instables et susceptibles à l'action d'hélicases qui viendraient les briser, une activité de réappariement de l'ADN permettrait à PALB2 de stimuler l'étape d'invasion en stabilisant ces intermédiaires. Nous avons donc voulu vérifier si PALB2 pouvait favoriser le réappariement de longues séquences d'ADN complémentaires par des essais de réappariement *in vitro*.

Pour ce faire, deux longs produits de digestion du vecteur pPB4.3 (400pb et 1000pb) ont été produits, purifiés sur gel et radiomarqués. La dénaturation suivie d'une période d'incubation avec PALB2 nous permet de constater que PALB2 possède cette activité qui atteint un maximum à 1nM (voir Figure 31 ligne o) tandis que le réappariement spontané est pratiquement nul (voir Figure 31 ligne k). Il est important de noter que cette concentration est très faible versus d'autres médiateurs de la recombinaison. Par exemple, l'homologue viral de RAD52, Sak, atteint un maximum d'activité de réappariement dans un essai identique à 250nM (Ploquin et al., 2008). De plus, le fait que cette activité soit détectable sur un substrat aussi long que 1000pb suggère que cette réaction est très efficace (non montré ici). Si on compare les réactions fixées aux réaction déprotéinisées, on remarque que PALB2 semble relâcher l'ADNdb une fois celui-ci formé (comparer les lignes e et n). Cette dynamique est donc cohérente avec nos résultats de retards sur gel, montrant que PALB2 possède une nette préférence pour l'ADNsb comparativement à l'ADNdb.

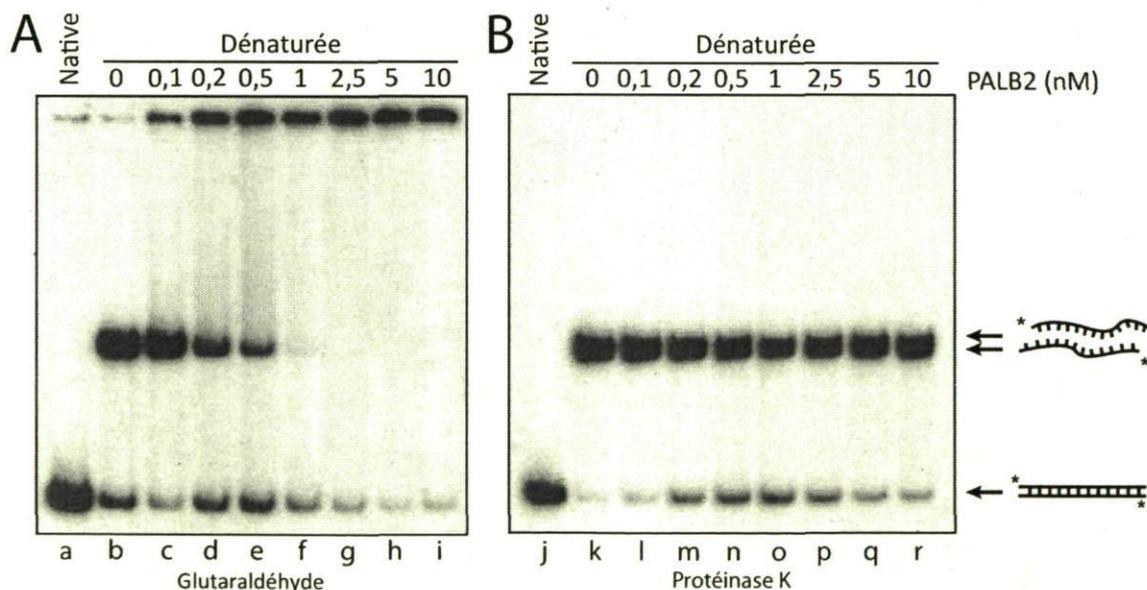


Figure 31 : Essai de réappariement d'ADN sur un substrat d'ADN de 400pb.

A. Réactions fixées à la glutaraldéhyde, permettant de visualiser les complexes formés entre la sonde et PALB2. B. Réactions déprotéinisées, permettant de visualiser les produits de réaction de réappariement formés.

5. Échange de brin

L'activité principale d'une recombinase est de rapprocher suffisamment deux brins d'ADN complémentaires pour permettre la recherche d'homologie et éventuellement l'échange d'information entre ceux-ci. *In vitro*, on peut visualiser cette activité par un test d'échange de brin. On utilise un ADN simple brin froid de 63b homologue au brin radiomarqué d'un duplex d'ADN de 63pb. L'ADN simple brin est d'abord incubé avec RAD51 en présence ou non de PALB2, ce qui permet la formation du nucléofilament de recombinase. On ajoute ensuite le duplex radiomarqué et l'échange de brin peut être observé par une migration différentielle sur gel d'acrylamide, puisque la sonde sera relâchée sous forme d'ADNsb (voir Figure 32).

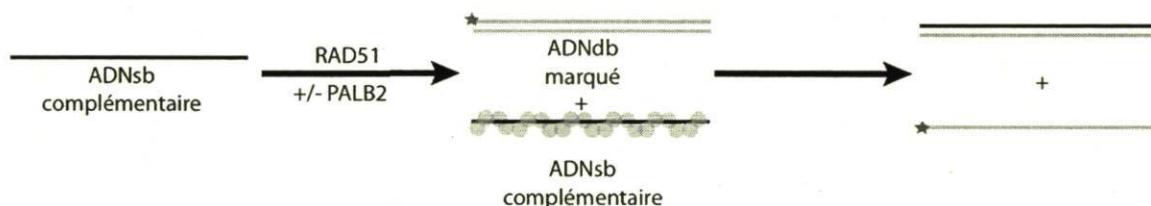


Figure 32 : Principe du test d'échange de brin.

L'ADNsb froid et homologue au brin chaud du duplex est d'abord incubé en présence de RAD51 avec ou sans PALB2. On ajoute ensuite l'ADNdb radio-marqué et les produits de la réaction sont résolus sur gel d'agarose et révélés par auto-radiographie.

Nous avons été en mesure d'observer tel que démontré précédemment dans la littérature que RAD51 est en mesure de catalyser l'échange de brin de façon sub-optimale dans cet essai à une concentration de $0,5\mu\text{M}$ (Voir la Figure 33, ligne b, l'échange observé constitue notre référence du graphique que nous avons arbitrairement fixé à 1). À 10nM et 15nM , PALB2 seule est en mesure de favoriser cet échange par environ 0,25 fois versus RAD51 (ligne d). De façon remarquable, on remarque que l'ajout de 10nM et 15nM de PALB2 à la réaction catalysée par RAD51 permet une stimulation d'environ 1,5 à 2 fois (lignes e et f). Cette stimulation est probablement additive et synergique, puisque la résultante est supérieure à la sommation des deux activités observées indépendamment.

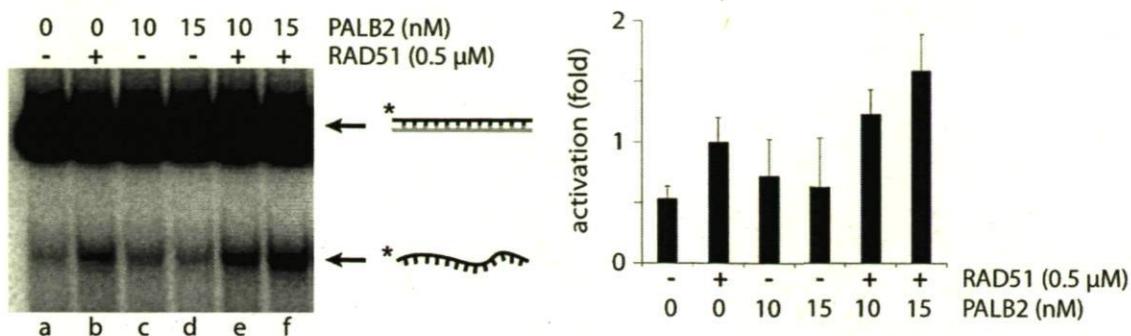


Figure 33 : Essai d'échange de brin catalysé par RAD51 stimulé par PALB2.

RAD51 catalyse l'échange de brin sur un substrat de 63pb de façon sub-optimale à 0,5μM. La stimulation par PALB2 observée est de l'ordre de deux fois, comme on peut voir une fois portée en graphique (à droite).

On peut maintenant se demander comment PALB2 est en mesure de favoriser la réaction d'échange de brin. Nous avons précédemment montré que PALB2 liait l'ADN. Toutefois, on ne sait toujours pas si PALB2 est en mesure de lier directement RAD51, une interaction qui pourrait par exemple stimuler dans un premier temps la formation du nucléofilament, une étape limitante de la recombinaison, mais aussi favoriser l'activité d'échange en facilitant la recherche d'homologie ou l'échange à proprement parler. Nous avons donc voulu savoir si PALB2 était en mesure de lier directement RAD51.

6. PALB2 interagit directement avec RAD51

Il avait été montré précédemment que PALB2 était en mesure de co-immunoprécipiter RAD51 de façon endogène (Xia et al., 2006). Cependant, de telles expériences ne nous indiquent pas si l'interaction se fait de façon directe, ou via un partenaire commun, BRCA2 par exemple. Nous avons donc voulu voir si PALB2 et RAD51 co-exprimées dans un contexte hétérologue en cellules d'insecte étaient en mesure de co-immunoprécipiter.

Pour ce faire, nous avons co-infecté des cellules de type Sf9 avec les baculovirus codant pour RAD51 et PALB2. Le lysat cellulaire dans lequel nos deux protéines sont largement surexprimées a été immunoprécipité à l'aide de l'anticorps anti-PALB2. Des lavages à concentration croissante de NaCl ont été effectués afin de tester la force des interactions en jeu, de même qu'éliminer la possibilité qu'une éventuelle interaction soit médiée par l'ADN. On remarque tout d'abord que PALB2 est en mesure de co-immunoprécipiter RAD51 dans un contexte hétérologue, ce qui suggère une interaction directe entre ces deux protéines (Voir la Figure 34). Parce que les protéines humaines sont fortement surexprimées, et qu'il n'existe pas d'homologue de PALB2 chez les invertébrés, nous croyons qu'il est peu probable que cette interaction soit artéfactuelle, résultant de la formation de complexes avec les protéines endogènes. De plus, il est possible de constater que la nature de cette interaction est relativement forte ou de nature hydrophobe, et non médiée par l'ADN, puisque celle-ci est toujours présente à une concentration de 1M NaCl.



Figure 34 : Interaction directe entre PALB2 et RAD51 en Sf9.

Les deux protéines sont coexprimées à l'aide d'un baculovirus. Le lysat cellulaire est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps dirigé contre PALB2 à concentration croissante de NaCl puis révélé par SDS-PAGE suivi d'un immunobuvardage de type Western anti-RAD51.

Nous avons également voulu vérifier si le mutant PALB2Q775X interagissait toujours avec RAD51. D'une part, afin de voir si l'impossibilité d'interagir avec RAD51 ne serait pas ce qui conduit à une susceptibilité accrue au cancer du sein chez les porteuses de cette mutation, en plus de l'interaction interrompue avec BRCA2 suspectée. D'autre part, afin de nous permettre de cibler davantage le domaine d'interaction avec RAD51. On constate que le mutant PALB2Q775X interagit toujours avec RAD51. Cependant, il semble co-immunoprécipiter moins de RAD51, alors que les quantités exprimées de RAD51 sont similaires dans les deux échantillons et qu'on trouve largement davantage de

PALB2Q775X versus la protéine plein longueur. Ceci suggère la présence de deux domaines d'interaction avec RAD51, l'un en C-terminal, tronqué chez le mutant, et l'autre en amont de la Q775. Cette hypothèse aura été confirmée plus tard dans le laboratoire et nous savons maintenant que PALB2 interagit avec RAD51 via ses domaines C-terminal et N-terminal, légèrement en aval du domaine coiled-coil.

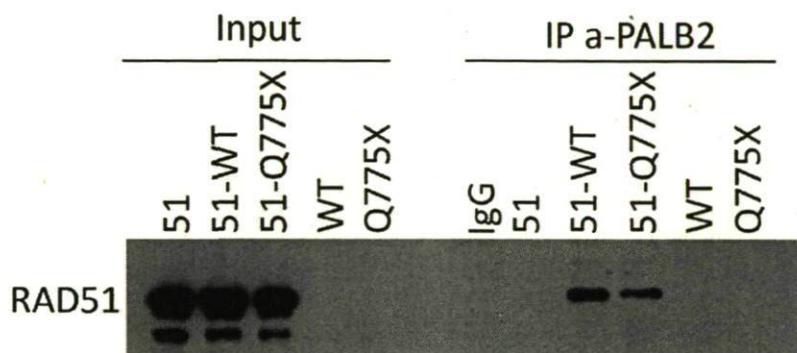


Figure 35 : Interaction directe entre PALB2 et PALB2Q775X et RAD51 en Sf9.

Les deux protéines sont coexprimées à l'aide d'un baculovirus. Le lysat cellulaire est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps dirigé contre PALB2 puis révélé par SDS-PAGE suivi d'un immunobuvardage de type Western anti-RAD51.

Discussion

En 2007, la littérature s'accordait pour attribuer à PALB2 un rôle de partenaire de BRCA2 dont la fonction consistait en l'ancrage de BRCA2 et RAD51 à la chromatine. De par son absence de domaines fonctionnels autres que deux domaines d'interaction protéine-protéine, rien ne laissait présager que PALB2 puisse jouer un rôle actif en recombinaison homologue. Or, les travaux présentés ici démontrent que PALB2 est bien plus qu'un simple partenaire de BRCA2, et lui attribuent maintenant un rôle en tant que médiateur à part entière de la recombinaison homologue.

1. PALB2 forme des interactions homotypiques

La multimérisation est un mode de régulation et d'action largement répandu chez les protéines impliquées en recombinaison homologue. Il semble que PALB2 ne fasse pas exception à cette règle et les données présentées ici démontrent que PALB2 forme des interactions homotypiques. Nous avons observé que ces interactions résistaient à de très fortes concentrations de sels, suggérant des interactions très stables ou hydrophobes. Or, on sait que la formation de multimères par les domaines coiled-coil implique des interactions hydrophobes médiées par des acides aminés hydrophobes et isolés du solvant, alors que des acides aminés hydrophiles seront exposés au solvant (Grigoryan and Keating, 2008). Le fait qu'il ne soit pas possible de déstabiliser les multimères par l'ajout de NaCl renforce l'hypothèse que cette interaction soit médiée par son domaine coiled-coil. Ce résultat a d'ailleurs été récemment démontré dans une étude indépendante, suggérant également que l'oligomérisation de PALB2 reposait sur son domaine N-terminal coiled-coil (Sy et al., 2009d).

Nous avons également remarqué qu'il n'était pas possible d'observer PALB2 dans les fractions correspondant au poids moléculaire du monomère de façon endogène, avec ou sans dommages à l'ADN. Cependant, il serait intéressant de répéter ces expériences sur des extraits chromatiniens préalablement traités à la DNase. En effet, il n'est pas impossible d'exclure que les complexes de hauts poids moléculaires observés soient médiés par l'ADN, masquant ainsi l'existence de PALB2 à l'état monomérique. Ce traitement pourrait

potentiellement permettre de détecter certaines dynamiques en réponse aux dommages à l'ADN, si par exemple PALB2 se monomérisait en réponse aux dommages ou inversement.

La fonction et l'importance de la multimérisation de PALB2 demeurent floues à ce jour, principalement parce que c'est via le même domaine que PALB2 interagit avec BRCA1 et avec lui-même. Il semble acquis que l'interaction BRCA1-PALB2 soit importante pour la survie cellulaire en réponse à un traitement à la mitomycine C, de même qu'en ce qui a trait à l'efficacité de la recombinaison homologe, une conclusion solide reposant sur l'utilisation de mutants ponctuels de ces deux protéines corroborée par trois études indépendantes (Zhang et al., 2009a) (Sy et al., 2009c) (Zhang et al., 2009b). Toutefois, la seule étude publiée à ce jour sur l'oligomérisation de PALB2 présente des études cellulaires portant sur des mutants de délétion du N-terminal de PALB2 (Sy et al., 2009d). Ainsi, il est impossible de distinguer les effets observés attribuables à l'interaction avec BRCA1 de l'interaction de PALB2 avec lui-même. Dans le futur, il sera nécessaire d'identifier des mutants ponctuels brisant l'oligomérisation de PALB2, mais pas son interaction avec BRCA1, afin d'en apprendre davantage sur la fonction cellulaire de cette multimérisation. Bien sûr, on ne peut exclure pour l'instant que ces interactions soient mutuellement exclusives et donc indiscernables par l'utilisation de mutants ponctuels de PALB2. En effet, les domaines coiled-coil sont des structures très organisées et la mutation d'un seul acide aminé peut avoir un impact important sur la conformation de la surface d'interaction.

Sans toutefois le prouver, un certain nombre d'observations suggèrent que PALB2 se retrouve majoritairement sous forme de dimère. En effet, on constate en filtration sur gel que la protéine purifiée tend à s'accumuler au niveau des fractions correspondant au poids moléculaire du dimère. Il en va de même pour la protéine endogène, dans des extraits cellulaires totaux. La stœchiométrie exacte du multimère de PALB2 sera une donnée intéressante mais difficile à déterminer. Pour ce faire, une reconstitution informatique à partir d'images obtenues en microscopie électronique sera nécessaire, un travail qui exige une multitude de clichés (plusieurs milliers) dont l'accumulation pourrait être limitée par la formation de complexes d'ordres supérieurs et par la difficulté de purifier PALB2. On remarquera que cette technique de reconstruction a donné des résultats impressionnants auparavant. On pense notamment à l'image qui a été générée pour la protéine Sak, un

homologue viral de RAD52 présentant une structure organisée sous forme d'oligomère à 11 sous-unités capables de s'assembler entre eux par empilement (Ploquin et al., 2008).

Il n'en demeure pas moins qu'une meilleure compréhension de la multimérisation de PALB2 renseignera sur son mode d'action. Si le multimère était la forme active de la protéine, on pourrait penser que l'utilisation d'un inhibiteur peptidique spécifique mimant la surface d'interaction pourrait sensibiliser des cellules tumorales à l'action d'agents anti-cancéreux étant donné que, comme on le sait, RAD51 est mal recruté aux sites de dommages à l'ADN en l'absence de PALB2.

2. PALB2 lie l'ADN

Il avait précédemment été suggéré dans la littérature que la fonction de PALB2 consistait en l'ancrage de BRCA2 et RAD51 à la chromatine. Or, la façon dont PALB2 était capable d'accomplir cette fonction était inconnue. Est-ce que PALB2 lie une protéine liant elle-même l'ADN, par exemple les histones? Est-ce que PALB2 est capable de lier directement l'ADN, malgré l'absence d'un domaine putatif de liaison à l'ADN? Nous avons voulu clarifier cet aspect de la fonction de PALB2 en testant sa capacité de liaison à l'ADN.

Les travaux présentés ici démontrent clairement que PALB2 est capable de lier directement l'ADN. De plus, PALB2 montre une plus grande affinité pour un substrat d'ADNsb versus db. Il en va de même pour une jonction de Holliday synthétique. Ainsi, afin de clarifier la préférence de substrat de PALB2, des essais de compétition devront être réalisés, permettant par le fait même de mieux définir le rôle de PALB2 au cours des différentes étapes de la recombinaison homologue. Rappelons que l'ADNsb et la jonction de Holliday sont deux intermédiaires extrêmement importants de la recombinaison homologue, et on comprend maintenant mieux comment la présence de PALB2 permet de recruter RAD51 aux sites de dommages à l'ADN. En effet, en l'absence de PALB2, il n'y a pas de formation de foyers de RAD51, tel qu'observé chez les cellules EUFA1341, déficientes en PALB2 (Xia et al., 2007). On peut maintenant penser qu'une fois l'ADN résecté, PALB2 lie directement l'extrémité 3'-protubérante simple-brin formée par le complexe MRN et CtIP, ce qui permet ensuite le recrutement de BRCA2 et RAD51. Ceci pourrait être confirmé par l'utilisation de mutants, idéalement ponctuels, de liaison à l'ADN de PALB2.

De façon plus tardive, PALB2 pourrait également stabiliser des structures particulières de l'ADN, comme la D-loop. En effet, ces structures sont très sensibles à l'action de diverses hélicases, dont le rôle consiste en l'élimination de telles structures se formant de façon inappropriée. On peut s'attendre à une accumulation de dommages dans un contexte utilisant des mutants de liaison à l'ADN de PALB2 résultant d'une incapacité à compléter le processus de recombinaison homologue, une hypothèse suggérée par l'étonnante capacité de liaison de PALB2 à la jonction de Holliday synthétique.

D'autre part, c'est en utilisant le logiciel BindN qu'il a été possible de cibler deux domaines potentiels de liaison à l'ADN, bien conservés à travers les espèces. Le premier est situé en N-terminal, chevauchant le domaine coiled-coil. On peut dès lors envisager une régulation très complexe de la fonction de PALB2, puisque ce domaine a déjà été impliqué dans la liaison de BRCA1, et potentiellement dans la multimérisation de PALB2. Cette régulation pourrait passer, par exemple, par des événements de phosphorylation contrôlant l'affinité du domaine pour ses différents partenaires (PALB2, BRCA1, ADN). Le second est situé dans le domaine central conservé de la protéine au niveau des acides aminés 400 à 452. À ce propos, il est intéressant de remarquer que la troncation d'une partie du domaine central conservé de la protéine résulte en une diminution marquée de la formation de foyers par PALB2, une donnée non soulignée par les auteurs de l'étude présentant ces résultats (Sy et al., 2009d). Ainsi, le recrutement de PALB2 aux foyers de réparation de l'ADN, et subséquemment de BRCA2 et RAD51, pourrait dépendre de sa propre activité de liaison à l'ADN, tel que suggéré ci-haut.

Malgré ces éléments de réponse, il est difficile de prédire à ce jour le domaine de liaison à l'ADN de PALB2. C'est d'ailleurs également le cas de FANCD2 et FANCI, deux protéines paralogueues de l'anémie de Fanconi liant également l'ADN. Ces protéines présentent probablement des domaines de liaison atypiques, apparus de façon tardive au cours de l'évolution. La comparaison de la séquence primaire de ces protéines pourrait permettre de mettre en lumière des motifs conservés entre celles-ci potentiellement impliqués dans la liaison à l'ADN.

PALB2 localise de façon endogène à la chromatine. Il serait intéressant de voir l'affinité de PALB2 pour un substrat chromatinien. Rappelons que les essais de retard sur gel présentés

ici ont été réalisés sur un ADN nu. De façon intéressante, il a été récemment démontré que PALB2 coimmunoprécipite avec MRG15 via ses AA 611 à 764, une région non requise pour la formation de foyers de RAD51 comprenant 3 domaines conservés pour lesquels aucune fonction n'a été attribuée jusqu'ici (Sy et al., 2009a). MRG15 est une protéine dont l'homologue chez la levure Eaf3 fait partie des complexes Tip60-NuA4 histone acétyltransférase et Rpd3 histone déacétylase. Elle possède un chromodomaine impliqué dans la liaison de l'histone H3 méthylée sur la lysine 36, une marque associée aux régions activement transcrites. L'acétylation permet de relaxer la chromatine et de favoriser l'accès des protéines à l'ADN. Les fibroblastes de souris *Mrg15* montrent des défauts de recombinaison (Garcia et al., 2007), suggérant un rôle pour MRG15 en recombinaison homologue. Cette interaction entre MRG15 et PALB2 semble permettre de réduire les échanges entre chromatides soeurs, suggérant un rôle pour PALB2 dans le choix de matrice pour effectuer la recombinaison homologue catalysée par RAD51. PALB2 pourrait donc permettre le recrutement de complexes histone acétyltransférase afin de moduler l'accès de RAD51 à l'ADN à l'emplacement approprié.

3. PALB2 stimule l'échange de brin catalysé par RAD51

C'est parce que la présence de PALB2 est nécessaire à la formation des foyers de RAD51, suggérant un rôle précoce en recombinaison homologue, et que PALB2 lie l'ADNsb que nous avons voulu approfondir le rôle potentiel joué par PALB2 au cours de l'étape d'invasion. De façon étonnante, PALB2 est capable à lui seul de favoriser l'échange de brin. On notera que l'essai réalisé ici est effectué avec des oligonucléotides et un tel résultat ne serait pas nécessairement observé sur de plus longs substrats, moins sujets à l'apparition d'artefacts. Cependant, on observe une bonne stimulation de l'échange de brin catalysé par RAD51 par PALB2, un effet certainement synergique et potentiellement additif.

L'essai de formation de D-loop utilise un substrat plamidique (décrit précédemment, (Ploquin et al., 2008)), beaucoup plus difficile à envahir qu'un duplex d'oligonucléotides. On peut donc anticiper que PALB2 seul serait incapable d'envahir celui-ci. Cependant, par un bel effet synergique, on peut s'attendre à ce que PALB2 stimule l'invasion catalysée par RAD51, tel que suggéré par l'essai d'échange de brin.

On peut maintenant se demander comment PALB2 peut stimuler cet échange. Serait-ce via une stabilisation des intermédiaires formés? Ou plutôt en favorisant les changements de conformation nécessaires à cet échange via une interaction directe avec RAD51? Nous avons donc voulu vérifier si PALB2 était capable d'interagir directement avec RAD51.

4. PALB2 interagit directement avec RAD51

Il avait été démontré précédemment dans la littérature qu'un anticorps dirigé contre PALB2 était capable de co-immunoprécipiter RAD51 de façon endogène, une donnée peu surprenante puisque tous deux interagissent directement avec BRCA2. Il devenait important de déterminer si PALB2 et RAD51 interagissaient directement, afin d'évaluer comment PALB2 est en mesure de stimuler l'échange de brin catalysé par RAD51. C'est en exprimant ces deux protéines de façon hétérologue qu'il a été possible de démontrer qu'elles interagissaient directement ensemble. Que le mutant PALB2Q775X montre une diminution dans sa capacité à co-immunoprécipiter RAD51 suggère l'existence de deux domaines de liaison à RAD51, l'un situé en C-terminal tronqué chez le mutant et le second plus en amont, probablement l'une des deux régions conservées en N-terminal ou dans la portion centrale de la protéine. Il sera également intéressant de voir si cette interaction module l'activité ATPase de RAD51, une façon par laquelle PALB2 pourrait favoriser l'échange de brin. Il sera important de bien cibler dans le futur le ou les domaines d'interactions de PALB2 avec RAD51, afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel PALB2 stimule la recombinaison homologe et l'impact des mutations de PALB2 associées au cancer du sein. En effet, il n'est pas possible à l'heure actuelle d'affirmer que c'est en interagissant directement avec RAD51 que PALB2 stimule son activité. Cette importante conclusion pourra être tirée de l'utilisation de mutants ponctuels incapables d'interagir avec RAD51 dans des essais *in vitro* d'échange de brin.

5. Modèle proposé

Au commencement de la présente étude, PALB2 était considéré comme un partenaire de BRCA2 nécessaire pour l'ancrage de BRCA2 et RAD51 à la chromatine. Voyons comment les données présentées ici peuvent s'inscrire dans le modèle présenté dans la littérature actuelle, sachant que PALB2 est une protéine de l'anémie de Fanconi, mais est également

impliqué de façon plus générale dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue.

5.1. PALB2, un médiateur de la recombinaison homologue

Nous avons démontré que PALB2 possède deux des trois caractéristiques essentielles d'un médiateur de la recombinaison homologue, à savoir la capacité d'interagir physiquement avec RAD51 et de lier l'ADN simple-brin. Une question fort importante demeure en suspens : l'activité de PALB2, de façon endogène, repose-t-elle entièrement sur la fonction de BRCA2, elle-même capable de favoriser la nucléation de RAD51?

Il a été démontré ici que, *in vitro*, PALB2 est capable de stimuler à elle seule l'échange de brin catalysé par RAD51. Il n'est donc pas impossible que, au niveau de la recombinaison et de l'invasion, PALB2 soit capable de stimuler RAD51 de façon indépendante de BRCA2. Cette hypothèse est renforcée par une observation importante. Il semble que RAD51, sous le contrôle transcriptionnel négatif du suppresseur de tumeur p53, fréquemment muté dans les cellules cancéreuses, est conséquemment souvent surexprimé dans les cellules tumorales, même BRCA2-déficientes (Hine et al., 2008). De plus, il semble que la surexpression de RAD51 dans des cellules de souris BRCA2-déficientes permette de restaurer les défauts de recombinaison observés (Lee et al., 2009). On peut donc penser que la surexpression de RAD51 permet de pallier au défaut d'import dû à l'absence de BRCA2, et que dès lors PALB2 est capable d'agir à titre de médiateur de la recombinaison, en l'absence de BRCA2. Ceci pourrait être vérifié par des expériences utilisant une construction de PALB2 portant la mutation A1025R. En effet, il a récemment été démontré que cette mutation abolit complètement l'interaction entre BRCA2 et PALB2 en cellules humaines (Oliver et al., 2009). Si ce mutant s'avérait capable d'interagir avec RAD51 à des niveaux comparables à la protéine de type sauvage, il serait fort intéressant de voir dans quelle mesure celui-ci est capable de stimuler la recombinaison homologue *in vitro* par des essais d'échange de brin ou de D-loop et en cellules par un essai I-SceI. Une capacité de ce mutant à compléter au moins partiellement un ARNi dirigé contre PALB2 suggèrerait une fonction indépendante de BRCA2 pour PALB2 en recombinaison homologue.

5.2. Recrutement de PALB2 et des protéines de l'anémie de Fanconi

La reconnaissance et la signalisation des dommages à l'ADN sont des phénomènes fort complexes dépendant largement de la nature du dommage rencontré. C'est d'ailleurs le type de dommage qui dirige la voie qui sera utilisée pour le réparer. Ainsi, les protéines de l'anémie de Fanconi sont impliquées dans la reconnaissance des ICL.

Une étude récente propose un mode de recrutement différentiel pour les protéines du complexe cœur de l'anémie de Fanconi et FANCI-FANCD2, comparativement aux protéines de l'anémie de Fanconi associées au cancer du sein, à savoir FANCI, BRCA2 et PALB2. En effet, il semble que le complexe cœur soit recruté de façon dépendante des protéines du NER, XPA et XPC, mais indépendamment de la réplication. Ce n'est pas le cas de PALB2, FANCI et BRCA2 qui sont recrutées de façon dépendante de la réplication (Shen et al., 2009). Ceci suggère que les protéines du complexe cœur sont impliquées très tôt dans la reconnaissance du dommage, alors que PALB2, FANCI et BRCA2 sont davantage responsables de leur réparation par recombinaison homologue en phase S et G2 du cycle cellulaire. Cette perspective est cohérente avec le fait que le processus de recombinaison homologue requiert la présence d'une copie de l'ADN endommagé pour le réparer. Rappelons qu'il a été démontré ici que PALB2 lie très bien un substrat d'ADN similaire à une fourche de réplication, ce qui renforce cette hypothèse. Il s'agit d'une donnée importante et cohérente avec nos résultats, proposant un rôle pour PALB2 dans la stimulation de l'étape d'invasion catalysée par RAD51, ultérieure à la reconnaissance du dommage.

5.3. Recrutement des protéines de la recombinaison homologue

En introduction, il a été vu que le choix de la recombinaison homologue comme mode de réparation des CDB semblait reposer sur les partenaires CtIP et BRCA1. Or, on sait maintenant que PALB2 se situe au cœur d'un complexe formé par BRCA2, BRCA1 et lui-même, et que CtIP co-immunoprécipite avec PALB2 (Zhang et al., 2009b) (Sy et al., 2009d) (Zhang et al., 2009b). Il semble acquis que cette interaction entre BRCA1 et PALB2 ne soit pas nécessaire pour le recrutement de BRCA1 aux sites de dommages à l'ADN, ce qui place BRCA1 en amont de PALB2 et BRCA2 dans la voie de la

recombinaison homologue. Cependant, il est moins évident de savoir si la présence de BRCA1 est essentielle au recrutement de PALB2 en présence de dommages à l'ADN, la littérature ne s'accordant pas sur ce point, malgré des designs expérimentaux forts similaires. Ce qui apparaît plus certain, c'est que cette interaction entre BRCA1 et PALB2 est requise pour assurer l'efficacité de la recombinaison homologue en réponse à une cassure double-brin unique (Zhang et al., 2009b). Ce résultat est appuyé par le fait que certaines des mutations ponctuelles de BRCA1 associées au cancer du sein brisent l'interaction avec PALB2 (Sy et al., 2009b). Ainsi, on peut raisonnablement penser que l'incapacité de la cellule à former le complexe BRCA1-PALB2-BRCA2 peut jouer un rôle important dans la tumorigénèse en favorisant l'instabilité génétique.

De façon purement spéculative, on pourrait imaginer que dès que CtIP-BRCA1 ont « choisi » la voie de la recombinaison homologue pour la réparation du dommage, il y a stabilisation de PALB2 au site par ceux-ci. Ainsi, PALB2 est en mesure de recruter à son tour BRCA2 et RAD51 afin de procéder à la réparation du dommage.

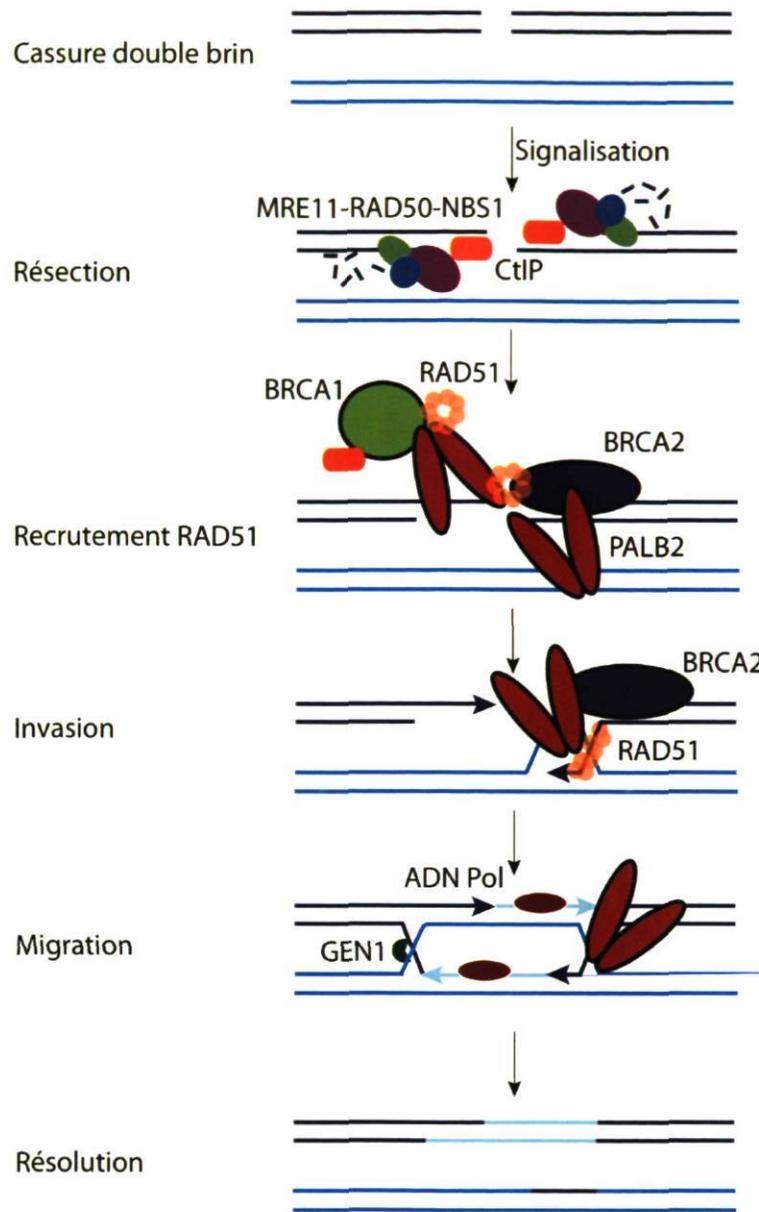


Figure 36 : Modèle actuel de la recombinaison homologue intégrant PALB2.

La reconnaissance et la signalisation de la cassure double-brin se fait par l'action concertée du complexe MRN, de la protéine kinase ATM et du variant d'histone H2AX. Des événements de signalisation conduisent à la rétention du complexe MRN et de CtIP qui génèreront une extrémité 3'-protubérante par résection pouvant être liée par PALB2. L'ADNs b protégé par RPA constitue le substrat pour la recombinase RAD51, recrutée par RAD52 et BRCA2/PALB2. RAD51 procède à l'invasion d'un duplex non endommagé, stimulée par PALB2 pour permettre la polymérisation d'ADN de façon fidèle. La jonction de Holliday résultante probablement stabilisée par PALB2 peut être migrée et finalement résolue par une résolvasse telle que GEN1.

5.4. Collaboration entre les protéines de l'anémie de Fanconi et de la recombinaison homologue

Plusieurs relations très étroites existent entre les protéines de l'anémie de Fanconi et de la recombinaison homologue. On sait par exemple que FANCD2 interagit directement avec BRCA2 et le complexe MRN (Roques et al., 2009). Comme les protéines de l'anémie de Fanconi sont impliquées très tôt dans la reconnaissance des ICL, on pourrait croire que FANCD2 (et probablement FANCI) se retrouve très tôt au site du dommage là où une interaction avec le complexe MRN est susceptible de se produire une fois la CDB formée. On peut donc penser que BRCA1, qui interagit comme on le sait avec une multitude de protéines de l'anémie de Fanconi et de la recombinaison homologue, contribue au recrutement de PALB2, une fois la réplication entamée, afin qu'elle recrute à son tour BRCA2 et RAD51, de concert avec FANCD2 (et potentiellement FANCI). La séquence de recrutement pourrait être vérifiée grâce à un essai d'immunoprécipitation de chromatine à une cassure double-brin unique (I-SceI), qui permettrait de déterminer la chronologie de recrutement de ces protéines et leur localisation par rapport à la CDB. (On remarquera toutefois que cet essai constitue davantage un modèle de réparation de CDB que d'ICL. Néanmoins, on sait que FANCD2 localise à cette cassure (Roques et al., 2009), tout comme la plupart des autres protéines de la recombinaison homologue, ce qui pourrait permettre de clarifier les étapes plus tardives de la réparation de l'ICL, lorsque la CDB est formée.)

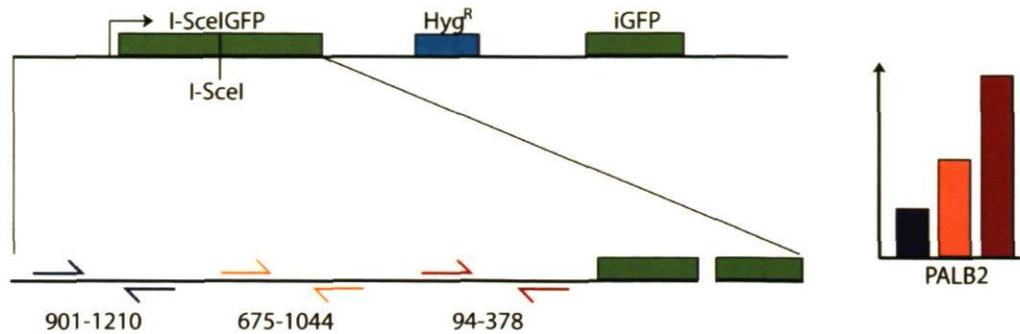


Figure 37 : Principe de l'essai d'immunoprécipitation de chromatine à une cassure double-brin unique.

Le principe de cet essai repose sur l'enzyme de restriction I-SceI tel que décrit à la Figure 8. Trois couples d'amorces permettent de détecter la localisation des protéines immunoprécipitées afin de les localiser par rapport à la CDB. On pourrait s'attendre à retrouver un patron de localisation de PALB2 similaire à ce qui est montré en graphique, sachant que l'on mesure l'ADN co-immunoprécipité par PCR quantitative.

6. Relation avec le phénotype

Il est maintenant clairement établi que PALB2 joue un rôle essentiel en recombinaison homologue. Comme ses partenaires BRCA1 et BRCA2, PALB2 est un gène de susceptibilité au cancer du sein. De plus, on sait que *PALB2* est un gène de l'anémie de Fanconi dont l'inactivation conduit à un phénotype similaire à celui des deux autres gènes (*FANCF* et *BRCA2*) dont le rôle se situe en aval de l'activation de la voie de l'anémie de Fanconi. Comment expliquer, d'une part, que les gènes de l'anémie de Fanconi associés au cancer du sein présentent un phénotype clinique de l'anémie de Fanconi légèrement différent des autres gènes de cette voie et, d'autre part, que la pénétrance des mutations de *PALB2* diffère de celles de ses partenaires BRCA1 et BRCA2.

Il faut réaliser que la pénétrance des mutations de BRCA2 associées au cancer du sein est beaucoup plus grande que celles de PALB2. Ceci suggère à première vue une fonction plus cruciale dans le processus de tumorigénèse pour BRCA2 comparativement à PALB2. Puisque le NLS de BRCA2 est situé dans sa portion extrême C-terminale, celui-ci est fréquemment tronqué par les mutations associées au cancer du sein. Ceci a pour impact de séquestrer RAD51 au niveau du cytoplasme. À cet endroit, il n'est absolument pas possible pour RAD51 d'accomplir sa fonction, et encore moins pour PALB2 au niveau de la

stimulation de la recombinaison homologue. Ceci peut contribuer au processus de tumorigénèse en favorisant l'instabilité génomique. Sous cet angle, la fonction de médiateur de PALB2 est complètement dépendante de BRCA2.

Nous avons vu que les mutations de PALB2 ne conféraient qu'un mince risque accru de prédisposition au cancer du sein versus BRCA2. Or, on sait que la plupart des mutations de PALB2 répertoriées sont tronquantes, alors que le domaine N-terminal de PALB2 possède une multitude de fonctions. Ceci suggère que les fonctions indépendantes de BRCA2 pourraient occuper une place prépondérante dans la fonction de PALB2, puisque son domaine d'interaction avec celle-ci est fréquemment tronqué. Il serait très intéressant à cet effet de procéder à une comparaison de la pénétrance des mutations du domaine d'interaction de BRCA2 avec PALB2 comparativement au reste de la protéine, en particulier au C-terminal. En effet, on pourrait s'attendre à ce que la pénétrance des mutations du N-terminal soient plus faibles. De la même façon, il sera intéressant de voir dans le futur si de nouvelles mutations de *PALB2* dont la pénétrance serait plus élevée viendront à être identifiées, et où dans le gène elles seront situées.

La susceptibilité accrue au cancer chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi des groupes de complémentation D1 (BRCA2) et N (PALB2) est plus facile à comprendre. Tandis que les protéines des autres groupes de complémentation sont impliquées dans la réparation des ICL, BRCA2 et PALB2 sont impliquées de façon beaucoup plus générale en recombinaison homologue. De façon remarquable, l'absence de PALB2 résulte en une incapacité complète à former des foyers de RAD51 en réponse à la mitomycine C, de façon similaire à BRCA2.

Conclusion et implications futures

Seulement quatre années se sont écoulées depuis la découverte de PALB2 et un nombre impressionnant de données à son sujet se sont accumulées. Il est maintenant clair que PALB2 joue un rôle fondamental en recombinaison homologue, ce qui en fait maintenant une cible de choix à étudier d'un point de vue thérapeutique.

En effet, comme la plupart des thérapies anti-cancéreuses actuelles visent à causer des dommages à l'ADN, on peut s'attendre à ce que l'inhibition de PALB2, et conséquemment de la recombinaison homologue, résulte en une sensibilisation des cellules tumorales à l'action des agents clastogènes. Les données présentées ici, et celles retrouvées dans la littérature, tendent à démontrer que le domaine N-terminal de PALB2 possède un certain nombre d'activités essentielles à sa fonction, ce qui pourrait en faire une cible privilégiée pour le développement d'un inhibiteur peptidique. En tirant profit de la littérature actuelle, on peut également s'attendre à ce que les inhibiteurs de PARP¹, déjà utilisés en essais cliniques de phase III chez des patientes porteuses de mutations du gène *BRCA2*, soient des molécules intéressantes dans le traitement de cancers du sein de patientes porteuses de mutations du gène *PALB2*.

D'un point de vue théorique, il demeure essentiel de mieux définir le mécanisme par lequel PALB2 stimule la recombinaison homologue. Bien qu'il soit clair que la présence de PALB2 est essentielle au recrutement de BRCA2 et RAD51 à la CDB, il semble que PALB2 puisse jouer un rôle dans les étapes plus tardives qui reste à clarifier.

Dans un contexte plus large, on comprend encore mal comment les protéines de la voie de Fanconi favorisent la réparation des ICL. Bien qu'un très grand nombre d'interactions entre les protéines de l'anémie de Fanconi et de la recombinaison homologue aient été mises en lumière à ce jour, le mécanisme par lequel FANCD2 et FANCI, notamment, interviennent

¹ Les inhibiteurs de PARP inhibent l'enzyme PARP1 essentielle dans la réparation des cassures simple-brin. Plusieurs centaines de cassures simple-brin s'accumulent à chaque cycle cellulaire, et, non réparées, celles-ci conduisent à CDB en phase S. Rappelons qu'une seule CDB est létale chez la levure. Ainsi, les cellules tumorales, dont la recombinaison homologue est déjà défaillante chez les porteuses de mutations *BRCA2*, sont grandement sensibilisées au traitement anti-tumoral, et les inhibiteurs de PARP peuvent même être utilisés seuls.

au cours du processus de réparation des CDB demeure abstrait. Il sera extrêmement intéressant d'intégrer ces protéines dans des essais classiques de recombinaison homologue dans un avenir rapproché.

Cette étude a donc permis de démontrer que PALB2 possède l'essentiel des caractéristiques d'un médiateur de la recombinaison homologue. Les résultats obtenus ouvrent la voie aux études subséquentes qui viseront à élucider les mécanismes par lesquels PALB2 stimule la recombinaison homologue. La clarification de ceux-ci pourrait avoir dans le futur un impact important dans le traitement du cancer du sein, en permettant l'identification de cibles thérapeutiques intéressantes dans la voie de la recombinaison homologue.

Bibliographie

- Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72, 1117-1130.
- Auerbach, A.D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 668, 4-10.
- Ayoub, N., Rajendra, E., Su, X., Jeyasekharan, A.D., Mahen, R., and Venkitaraman, A.R. (2009). The carboxyl terminus of Brca2 links the disassembly of Rad51 complexes to mitotic entry. *Curr Biol* 19, 1075-1085.
- Baselga, J., and Swain, S.M. (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9, 463-475.
- Baumann, P., Benson, F.E., Hajibagheri, N., and West, S.C. (1997). Purification of human Rad51 protein by selective spermidine precipitation. *Mutat Res* 384, 65-72.
- Baumann, P., and West, S.C. (1997). The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *EMBO J* 16, 5198-5206.
- Baumann, P., and West, S.C. (1998). Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci* 23, 247-251.
- Beausoleil, S.A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J.E., Villen, J., Li, J., Cohn, M.A., Cantley, L.C., and Gygi, S.P. (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12130-12135.
- Bennett, C.B., Lewis, A.L., Baldwin, K.K., and Resnick, M.A. (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5613-5617.
- Benson, F.E., Baumann, P., and West, S.C. (1998). Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* 391, 401-404.
- Benson, F.E., Stasiak, A., and West, S.C. (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J* 13, 5764-5771.
- Biedermann, K.A., Sun, J.R., Giaccia, A.J., Tosto, L.M., and Brown, J.M. (1991). scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1394-1397.
- Boulton, S.J. (2006). BRCA1-mediated ubiquitylation. *Cell Cycle* 5, 1481-1486.
- Brown, E.J. (2004). Analysis of cell cycle progression and genomic integrity in early lethal knockouts. *Methods Mol Biol* 280, 201-212.
- Cantor, S.B., Bell, D.W., Ganesan, S., Kass, E.M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D.C., Sgroi, D.C., Lane, W.S., Haber, D.A., and Livingston, D.M. (2001). BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 105, 149-160.
- Carreira, A., Hilario, J., Amitani, I., Baskin, R.J., Shivji, M.K., Venkitaraman, A.R., and Kowalczykowski, S.C. (2009). The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. *Cell* 136, 1032-1043.
- Chen, A., Kleiman, F.E., Manley, J.L., Ouchi, T., and Pan, Z.Q. (2002). Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 277, 22085-22092.

- Chen, C.F., Chen, P.L., Zhong, Q., Sharp, Z.D., and Lee, W.H. (1999). Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G(2)/M checkpoint control. *J Biol Chem* 274, 32931-32935.
- Chen, J., Silver, D.P., Walpita, D., Cantor, S.B., Gazdar, A.F., Tomlinson, G., Couch, F.J., Weber, B.L., Ashley, T., Livingston, D.M., and Scully, R. (1998). Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 2, 317-328.
- Chi, P., Van Komen, S., Sehorn, M.G., Sigurdsson, S., and Sung, P. (2006). Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function. *DNA Repair (Amst)* 5, 381-391.
- Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R., and West, S.C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* 7, 273-282.
- de Winter, J.P., and Joenje, H. (2009). The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat Res* 668, 11-19.
- Dronkert, M.L., and Kanaar, R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* 486, 217-247.
- Erkko, H., Xia, B., Nikkila, J., Schleutker, J., Syrjakoski, K., Mannermaa, A., Kallioniemi, A., Pylkas, K., Karppinen, S.M., Rapakko, K., *et al.* (2007). A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 446, 316-319.
- Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M., and West, S.C. (2005). CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 434, 598-604.
- Esteller, M., Fraga, M.F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A.K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y.J., Ramus, S., *et al.* (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 10, 3001-3007.
- Fanconi, G. (1927). Familiäre infantile perniziosaartige anämie (pernizioses blutbild und konstitution). *Jahrbuch Kinderhilkd* 117, 257-280.
- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E.R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M.Q., Ruse, C., Yates, J.R., 3rd, Russell, P., *et al.* (2009). Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell* 138, 78-89.
- Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., Ashworth, A., and Jeggo, P. (2003). A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J* 22, 2860-2871.
- Foulkes, W.D. (2008). Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* 359, 2143-2153.
- Foulkes, W.D., Ghadirian, P., Akbari, M.R., Hamel, N., Giroux, S., Sabbaghian, N., Darnel, A., Royer, R., Poll, A., Fafard, E., *et al.* (2007). Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast Cancer Res* 9, R83.
- Game, J.C., and Mortimer, R.K. (1974). A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutat Res* 24, 281-292.

- Garcia, S.N., Kirtane, B.M., Podlutzky, A.J., Pereira-Smith, O.M., and Tominaga, K. (2007). Mrg15 null and heterozygous mouse embryonic fibroblasts exhibit DNA-repair defects post exposure to gamma ionizing radiation. *FEBS Lett* 581, 5275-5281.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7, 249-262.
- Ghadirian, P., Robidoux, A., Zhang, P., Royer, R., Akbari, M., Zhang, S., Fafard, E., Costa, M., Martin, G., Potvin, C., *et al.* (2009). The contribution of founder mutations to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Clin Genet* 76, 421-426.
- Gilman's, G.a. (2006). *The pharmacological basis of therapeutic*, 11th edition edn (McGraw-Hill).
- Gluckman, E., Auerbach, A.D., Horowitz, M.M., Sobocinski, K.A., Ash, R.C., Bortin, M.M., Butturini, A., Camitta, B.M., Champlin, R.E., Friedrich, W., *et al.* (1995). Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Blood* 86, 2856-2862.
- Greenberg, R.A., Sobhian, B., Pathania, S., Cantor, S.B., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev* 20, 34-46.
- Grigoryan, G., and Keating, A.E. (2008). Structural specificity in coiled-coil interactions. *Curr Opin Struct Biol* 18, 477-483.
- Haaf, T., Golub, E.I., Reddy, G., Radding, C.M., and Ward, D.C. (1995). Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2298-2302.
- Hanada, K., Budzowska, M., Modesti, M., Maas, A., Wyman, C., Essers, J., and Kanaar, R. (2006). The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks. *EMBO J* 25, 4921-4932.
- Hine, C.M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008). Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20810-20815.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hussain, S., Wilson, J.B., Medhurst, A.L., Hejna, J., Witt, E., Ananth, S., Davies, A., Masson, J.Y., Moses, R., West, S.C., *et al.* (2004). Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum Mol Genet* 13, 1241-1248.
- Hussain, S., Witt, E., Huber, P.A., Medhurst, A.L., Ashworth, A., and Mathew, C.G. (2003). Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Hum Mol Genet* 12, 2503-2510.
- Ip, S.C., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M., and West, S.C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* 456, 357-361.
- Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., *et al.* (2008). FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1138-1146.
- Jones, S., Hruban, R.H., Kamiyama, M., Borges, M., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Palmisano, E., Brune, K., Jaffee, E.M., *et al.* (2009). Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 324, 217.

- Klein, H.L. (2008). The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair (Amst)* 7, 686-693.
- Lee, J.S., Collins, K.M., Brown, A.L., Lee, C.H., and Chung, J.H. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404, 201-204.
- Lee, S.A., Roques, C., Magwood, A.C., Masson, J.Y., and Baker, M.D. (2009). Recovery of deficient homologous recombination in Brca2-depleted mouse cells by wild-type Rad51 expression. *DNA Repair (Amst)* 8, 170-181.
- Levitus, M., Joenje, H., and de Winter, J.P. (2006). The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance. *Cell Oncol* 28, 3-29.
- Lim, D.S., and Hasty, P. (1996). A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* 16, 7133-7143.
- Longerich, S., San Filippo, J., Liu, D., and Sung, P. (2009). FANCI binds branched DNA and is monoubiquitinated by UBE2T-FANCL. *J Biol Chem* 284, 23182-23186.
- Machida, Y.J., Machida, Y., Chen, Y., Gurtan, A.M., Kupfer, G.M., D'Andrea, A.D., and Dutta, A. (2006). UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Mol Cell* 23, 589-596.
- Maitra, A., and Hruban, R.H. (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 3, 157-188.
- Malone, R.E., and Esposito, R.E. (1980). The RAD52 gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 503-507.
- Masson, J.Y., and West, S.C. (2001). The Rad51 and Dmcl1 recombinases: a non-identical twin relationship. *Trends Biochem Sci* 26, 131-136.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.
- Matsushita, N., Kitao, H., Ishiai, M., Nagashima, N., Hirano, S., Okawa, K., Ohta, T., Yu, D.S., McHugh, P.J., Hickson, I.D., *et al.* (2005). A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. *Mol Cell* 19, 841-847.
- McIlwraith, M.J., Van Dyck, E., Masson, J.Y., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. (2000). Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins. *J Mol Biol* 304, 151-164.
- Meetei, A.R., de Winter, J.P., Medhurst, A.L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H.J., Oostra, A.B., Yan, Z., Ling, C., Bishop, C.E., *et al.* (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 35, 165-170.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., and *et al.* (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.
- Mirchandani, K.D., and D'Andrea, A.D. (2006). The Fanconi anemia/BRCA pathway: a coordinator of cross-link repair. *Exp Cell Res* 312, 2647-2653.
- Moldovan, G.L., and D'Andrea, A.D. (2009). How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annu Rev Genet*.

- Moynahan, M.E., Pierce, A.J., and Jasin, M. (2001). BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 7, 263-272.
- Nevanlinna, H., and Bartek, J. (2006). The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* 25, 5912-5919.
- Neveling, K., Endt, D., Hoehn, H., and Schindler, D. (2009). Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat Res* 668, 73-91.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 391, 407-410.
- Oliver, A.W., Swift, S., Lord, C.J., Ashworth, A., and Pearl, L.H. (2009). Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep* 10, 990-996.
- Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., and Venkitaraman, A.R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 420, 287-293.
- Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H., and Jasin, M. (1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev* 13, 2633-2638.
- Ploquin, M., Bransi, A., Paquet, E.R., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Yu, X., Cieslinska, A.M., Egelman, E.H., Moineau, S., and Masson, J.Y. (2008). Functional and structural basis for a bacteriophage homolog of human RAD52. *Curr Biol* 18, 1142-1146.
- Potapova, A., Hoffman, A.M., Godwin, A.K., Al-Saleem, T., and Cairns, P. (2008). Promoter hypermethylation of the PALB2 susceptibility gene in inherited and sporadic breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 68, 998-1002.
- Raderschall, E., Golub, E.I., and Haaf, T. (1999). Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1921-1926.
- Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., *et al.* (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 39, 165-167.
- Reid, L.J., Shakya, R., Modi, A.P., Lokshin, M., Cheng, J.T., Jasin, M., Baer, R., and Ludwig, T. (2008). E3 ligase activity of BRCA1 is not essential for mammalian cell viability or homology-directed repair of double-strand DNA breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20876-20881.
- Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., *et al.* (2007). Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* 39, 162-164.
- Rijkers, T., Van Den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A.G., Baarends, W.M., Van Sloun, P.P., Lohman, P.H., and Pastink, A. (1998). Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 18, 6423-6429.
- Roques, C., Coulombe, Y., Delannoy, M., Vignard, J., Grossi, S., Brodeur, I., Rodrigue, A., Gautier, J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., *et al.* (2009). MRE11-RAD50-NBS1 is a critical regulator of FANCD2 stability and function during DNA double-strand break repair. *EMBO J* 28, 2400-2413.

- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D.M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-275.
- Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., and Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 386, 804-810.
- Shen, X., Do, H., Li, Y., Chung, W.H., Tomasz, M., de Winter, J.P., Xia, B., Elledge, S.J., Wang, W., and Li, L. (2009). Recruitment of fanconi anemia and breast cancer proteins to DNA damage sites is differentially governed by replication. *Mol Cell* 35, 716-723.
- Shinohara, A., and Ogawa, T. (1998). Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature* 391, 404-407.
- Smith, P., McGuffog, L., Easton, D.F., Mann, G.J., Pupo, G.M., Newman, B., Chenevix-Trench, G., Szabo, C., Southey, M., Renard, H., *et al.* (2006). A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 646-655.
- Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D., and Elledge, S.J. (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* 129, 289-301.
- Spain, B.H., Larson, C.J., Shihabuddin, L.S., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1999). Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13920-13925.
- Starita, L.M., and Parvin, J.D. (2006). Substrates of the BRCA1-dependent ubiquitin ligase. *Cancer Biol Ther* 5, 137-141.
- Stark, J.M., Hu, P., Pierce, A.J., Moynahan, M.E., Ellis, N., and Jasin, M. (2002). ATP hydrolysis by mammalian RAD51 has a key role during homology-directed DNA repair. *J Biol Chem* 277, 20185-20194.
- Sugiyama, T., and Kowalczykowski, S.C. (2002). Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem* 277, 31663-31672.
- Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S., and Sehorn, M.G. (2003). Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem* 278, 42729-42732.
- Sy, S.M., Huen, M.S., and Chen, J. (2009a). MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination. *J Biol Chem* 284, 21127-21131.
- Sy, S.M., Huen, M.S., and Chen, J. (2009b). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7155-7160.
- Sy, S.M., Huen, M.S., and Chen, J. (2009c). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Sy, S.M., Huen, M.S., Zhu, Y., and Chen, J. (2009d). PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization. *J Biol Chem* 284, 18302-18310.

- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2002a). S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 100, 2414-2420.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Kim, S.T., Lane, W.S., Kastan, M.B., and D'Andrea, A.D. (2002b). Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 109, 459-472.
- Tischkowitz, M.D., Sabbaghian, N., Hamel, N., Borgida, A., Rosner, C., Taherian, N., Srivastava, A., Holter, S., Rothenmund, H., Ghadirian, P., *et al.* (2009). Analysis of the gene coding for the BRCA2-interacting protein PALB2 in familial and sporadic pancreatic cancer. *Gastroenterology* 137, 1183-1186.
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and Morita T (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6236-6240.
- Vandenberg, C.J., Gergely, F., Ong, C.Y., Pace, P., Mallery, D.L., Hiom, K., and Patel, K.J. (2003). BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2. *Mol Cell* 12, 247-254.
- Venkitaraman, A.R. (2009). Linking the cellular functions of BRCA genes to cancer pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol* 4, 461-487.
- Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12871-12876.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Wang, L., and Brown, S.J. (2006). BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences. *Nucleic Acids Res* 34, W243-248.
- Wang, W. (2007). Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* 8, 735-748.
- Wang, X., Andreassen, P.R., and D'Andrea, A.D. (2004). Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol* 24, 5850-5862.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 18, 123-131.
- Wilson, J.B., Yamamoto, K., Marriott, A.S., Hussain, S., Sung, P., Hoatlin, M.E., Mathew, C.G., Takata, M., Thompson, L.H., Kupfer, G.M., and Jones, N.J. (2008). FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3. *Oncogene* 27, 3641-3652.
- Wong, A.K., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V., and Bartel, P.L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J Biol Chem* 272, 31941-31944.
- Wu, Y., Suhasini, A.N., and Brosh, R.M., Jr. (2009). Welcome the family of FANCD1-like helicases to the block of genome stability maintenance proteins. *Cell Mol Life Sci* 66, 1209-1222.
- Xia, B., Dorsman, J.C., Ameziane, N., de Vries, Y., Rooimans, M.A., Sheng, Q., Pals, G., Errami, A., Gluckman, E., Llera, J., *et al.* (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet* 39, 159-161.

- Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J., and Livingston, D.M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* 22, 719-729.
- Yang, H., Jeffrey, P.D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N.H., Zheng, N., Chen, P.L., Lee, W.H., and Pavletich, N.P. (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 297, 1837-1848.
- Yano, K., Morotomi, K., Saito, H., Kato, M., Matsuo, F., and Miki, Y. (2000). Nuclear localization signals of the BRCA2 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 171-175.
- Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H., and Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 30, 285-289.
- Yu, V.P., Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L.A., van Gool, A.J., West, S.C., and Venkitaraman, A.R. (2000). Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* 14, 1400-1406.
- Yuan, F., El Hokayem, J., Zhou, W., and Zhang, Y. (2009). FANCI protein binds to DNA and interacts with FANCD2 to recognize branched structures. *J Biol Chem* 284, 24443-24452.
- Yuan, S.S., Lee, S.Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G.E., and Lee, E.Y. (1999). BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res* 59, 3547-3551.
- Yun, M.H., and Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 459, 460-463.
- Zhang, F., Fan, Q., Ren, K., and Andreassen, P.R. (2009a). PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res* 7, 1110-1118.
- Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., and Yu, X. (2009b). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol* 19, 524-529.
- Zhu, Y., Hu, J., Hu, Y., and Liu, W. (2009). Targeting DNA repair pathways: a novel approach to reduce cancer therapeutic resistance. *Cancer Treat Rev* 35, 590-596.