

CHARLES JOLY BEUPARLANT

**ANALYSE DES VARIANTS DE SÉQUENCE ET  
D'ÉPISSAGE DU GÈNE *FANCC* CHEZ LES  
FAMILLES CANADIENNES-FRANÇAISES À  
RISQUE ÉLEVÉ POUR LE CANCER DU SEIN ET/OU  
DE L'OVAIRE**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de physiologie-endocrinologie  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département de médecine moléculaire  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2011

## RÉSUMÉ

Les gènes de susceptibilité connus n'expliquent qu'environ 25% des cas de cancer du sein familiaux. La recherche de nouveaux gènes de susceptibilité s'avère donc primordiale. Les gènes de la famille FANC sont des candidats intéressants, car au moins quatre gènes FANC ont été associés à un risque accru de cancer du sein. Le gène *FANCC* se démarque également par sa localisation principalement cytoplasmique et ses rôles dans diverses voies dans ce compartiment. Le séquençage des exons et des régions introniques avoisinantes ont permis d'identifier six variants, dont deux semblent intéressants. c.816G>A mène à un changement d'acide aminé pouvant affecter la fonction de FANCC alors que le variant c.896+81G>A se retrouve plus fréquemment chez les cas de cancer du sein par rapport à une cohorte de femmes non atteintes. L'analyse de l'ADN complémentaire (ADNc) a permis d'identifier trois variants d'épissage dont un jamais rapporté. L'impact de ces variants sur la fonction de la protéine FANCC demeure très peu étudié.

## **REMERCIEMENTS**

Le soutien irréprochable que j'ai reçu de ma directrice, Dre Francine Durocher, pour mes stages puis pour mes études de deuxième cycle m'a été essentiel pour atteindre cette étape cruciale dans mon cheminement académique. Son appui durant les périodes les plus difficiles m'a permis de persévérer pour être en mesure de conclure cette formation. Merci.

L'assistance de Dr Yvan Labrie ne peut pas être passée sous silence. Son expérience en laboratoire m'a fortement influencé et son aide fut indispensable pour la rédaction de l'article.

Mes échanges avec le Dr Jacques Simard se sont toujours avérés très instructifs et m'ont non seulement permis de faire évoluer grandement ma perception et ma compréhension de nombreux aspects essentiels pour mon projet, mais m'ont également aidé à me développer en tant que scientifique.

Je tiens à remercier les autres membres de mon équipe avec lesquels j'ai partagé d'innombrables heures de travail au cours des dernières années. Notamment Geneviève Ouellette, son savoir-faire et sa diligence la rendent irremplaçable. Frédéric Guénard pour son talent, sa patience et son souci du travail bien fait et Sylvie Desjardins pour ses connaissances théoriques inégalées et sa détermination. Tous deux m'ont guidé au début de mon cheminement académique et m'ont fourni les bases essentielles pour ma réussite.

Je tiens de plus à remercier les plus récents étudiants de l'équipe: Christopher St-Laurent Pednault et Simon Bélanger. Leur énergie et leur curiosité sont tout particulièrement motivantes.

Finalement, j'aimerais remercier les membres du Laboratoire de génomique des cancers que j'ai eus l'immense plaisir de côtoyer tout au long de mes études universitaires.

# AVANT-PROPOS

Ce mémoire est présenté avec insertion d'article. L'introduction se veut une revue de la littérature pertinente la plus complète possible et traitant des divers aspects en lien avec mon sujet de recherche. Elle sert également à définir mes hypothèses de recherche et à justifier les manipulations réalisées.

Le chapitre 1 comprend essentiellement les résultats de laboratoire obtenus tout au long de ma maîtrise, sous forme d'article scientifique rédigé en anglais pour faciliter la publication. Ce projet fait suite à des recherches entamées par Dr Jacques Simard qui avait analysé les gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans une cohorte de femmes canadiennes-françaises atteintes de cancer du sein et/ou de l'ovaire et provenant de familles à risque élevé. Les patientes chez lesquelles aucune mutation délétère dans ces deux gènes n'a pu être identifiée ont par la suite été étudiées dans l'équipe de ma directrice de mémoire, Dre Francine Durocher, dans le but d'identifier de nouveaux gènes de susceptibilité. Ce chapitre traite donc principalement des résultats du séquençage du gène candidat *FANCC* et de l'analyse des résultats ainsi obtenus. Il touche également aux formes d'épissages alternatifs qui ont pu être discernées lors de l'analyse de l'ADNc de patientes. Ces résultats seront soumis sous peu pour publication. L'aide indispensable du Dr Yvan Labrie en lien avec la rédaction de cet article se doit d'ailleurs d'être soulignée ainsi que la contribution de Geneviève Ouellette pour son aide lors de certaines manipulations.

Le mémoire se termine par une conclusion qui rappelle les points principaux de l'étude et qui se penche sur les forces ainsi que les limites de la méthodologie utilisée. Les avenues de recherche futures en lien avec ce sujet y sont également explorées.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>ii</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>iii</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</b> .....	<b>viii</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. CANCER DU SEIN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. STATISTIQUES SUR LE CANCER DU SEIN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. FACTEURS DE RISQUE</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3.1. Les syndromes associés aux gènes de susceptibilité</b> .....	<b>7</b>
<b>2. ANÉMIE DE FANCONI</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. MANIFESTATIONS CLINIQUES</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1.1. Défauts congénitaux</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1.2. Troubles hématopoïétiques</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1.3. Susceptibilité aux cancers</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1.4. Caractéristiques cellulaires</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2. VOIE FANC-BRCA: LA RÉPARATION DES PONTAGES</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.1. La détection des pontages interbrins et l'arrêt du cycle cellulaire</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.2. L'assemblage du complexe I</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.3. Le complexe ID</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.4. L'inactivation de la voie FANC</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.5. Le complexe III</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.6. Modèle de réparation des pontages interbrins</b> .....	<b>27</b>
<b>3. FANCC</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1. STRUCTURE ET LOCALISATION DU GÈNE <i>FANCC</i></b> .....	<b>30</b>
<b>3.2. FANCC, DOMMAGES OXYDATIFS ET APOPTOSE</b> .....	<b>35</b>
<b>3.3. MODÈLES MURINS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.4. INTERACTION ENTRE FANCC ET DES PROTÉINES NON-FANC</b> .....	<b>38</b>
<b>4. PROBLÉMATIQUE DE L'ÉTUDE PRÉSENTÉE: ANALYSES DU GÈNE CANDIDAT <i>FANCC</i></b> .....	<b>40</b>
<b>CHAPITRE 1</b> .....	<b>43</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>45</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>49</b>
<b>Materials and Methods</b> .....	<b>52</b>
<b>Results</b> .....	<b>55</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>59</b>
<b>Acknowledgements</b> .....	<b>64</b>
<b>Appendix</b> .....	<b>65</b>
<b>References</b> .....	<b>66</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>82</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>86</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## INTRODUCTION

**Tableau 1:** Facteurs modifiant le risque de développer le cancer du sein.

**Tableau 2:** Polymorphismes communs de faible pénétrance trouvés grâce à des études d'association à l'échelle génomique.

**Tableau 3:** Variants de *FANCC* retrouvés chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi rapportés dans la littérature.

## CHAPITRE 1

**Table 1:** List of oligonucleotides used for *FANCC* exonic amplification.

**Table 2:** Observed sequence variations in *FANCC* gene and genotype frequencies in familial breast cancer cases and controls.

**Table 3:** Conservation of the c.896+81G/A variant in other species.

**Table 4a:** Non-synonymous sequence variants detected in human *FANCC* and residues found in orthologues.

**Table 4b:** Prediction of the amino acid change Glu273Lys on *FANCC* protein function.

**Table 5:** Estimated haplotype frequencies observed in French Canadian breast cancer cases and controls.

**Table 6:** Significativity of PHASE analyses between French Canadian breast cancer cases and controls using sliding windows of SNPs.

# LISTE DES FIGURES

## INTRODUCTION

**Figure 1:** Caractéristiques typiques retrouvées chez les patients AF.

**Figure 2:** Pontage interbrin.

**Figure 3:** Interaction entre les protéines FANC.

**Figure 4:** Mutations rapportées dans les régions codantes du gène *FANCC* et dans les régions introniques en périphérie.

## CHAPITRE 1

**Figure 1:** FANCC interaction domains, *FANCC* splicing and their tissue expression.

**Figure 2:** LD block analysis.

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

22RV1	Human prostate carcinoma cell line
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AF	Anémie de Fanconi
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATR	Ataxia-telangiectasia and RAD3-related
β-TRCP	Beta transducin repeat containing protein
BOC	Breast and ovarian cancer
bp	Base pairs
BRCA1/X	Breast cancer susceptibility gene 1/X
BRCA2/FANCD1	Breast cancer susceptibility gene 2 / Fanconi anemia group D1
BRIP1/FANCI	BRCA1-interacting protein 1 / Fanconi anemia group J
BT-20/474	Breast tumor 20/474
CA150	Cancer antigen 150
CAMA-1	Mammary carcinoma isolated from malignant pleural effusion
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
Cdc25a	Cell division cycle 25 homolog a
CEPH	Centre d'étude du polymorphisme humain
CEU	CEPH
CHEK2	Checkpoint kinase 2
Chk1	Checkpoint kinase 1
Ci	Confidence interval
COX11	Cytochrome c oxidase assembly protein
CYP2E1	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
DEB	Diepoxybutane
EBV	Epstein-Barr virus
ER+/-	Estrogen receptor positive / negative
ERCC1	Excision-repair, complementing defective, in Chinese hamster, 1
ESR1	Estrogen receptor 1
FAAP24/100	Fanconi anemia associated protein 24 / 100
FAN1	Fanconi-associated nuclease 1
FANCI*	Fanconi anemia group *
Fas/-R	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6
FATRX	Thioredoxin like protein
FAZF	Fanconi anemia zinc finger
FBN1	Fibrillin-1
FC	French Canadian
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2
FRP50	FAC-related protein 50
Fte-1	v-fos transformation effector
γ-H2AX	Histone family, member x

GRP94	Glucose regulated protein 94
GSTP1	Glutathione s-transferase PI pseudogene
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
HaCat	Human keratinocyte cell line
HCLK2	Human clock protein 2
HeLa	Henrietta Lacks
HHR23B	RAD24 homolog B
HOXA10	Homeobox A10
HR	Homologous recombination
HSC62/230	Human stem cells 62 / 230
Hsp70/90	Heat shock protein 70 / 90
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
ICL	Interstrand crosslink
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
INHERIT BRCA <sub>s</sub>	Interdisciplinary health research international team on breast cancer susceptibility
IR	Ionizing radiations
JAK	Janus Kinase
kDa/MDa	Kilo-Daltons / Mega-Daltons
LD	Linkage disequilibrium
LMA	Leucémie myéloïde aiguë
LNCaP	Lymph node carcinoma of the prostate
LSP1	Lymphocyte-specific protein 1
MAF	Minor allele frequency
MAP3K1	Mitogen-activated kinase kinase kinase 1
Mb	Mega bases
MCF7	Michigan cancer foundation 7
MDA-MB-231	M.D. Anderson - Metastatic Breast - 231
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1-alpha
MLH1	mutL homolog 1
MMC	Mitomycin C
MRPS30	Mitochondrial ribosomal protein S30
NBN/NBS1	Nibrin / Nijmegen breakage syndrome protein
NER	Nucleotide excision repair
NMD	Non-sense mediated mRNA decay
NRL	Neural retina-specific leucine zipper protein
OAT	Ornithine aminotransferase
OR	Odd ratio
PALB2/FANCN	Partner and localizer of BRCA2
PC3	Prostate cancer 3
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PHF2	PHD finger protein 2
PKR	Protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA-activated
Plk1	Polo-like kinase 1
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger

Pol- $\zeta$	Polymerase, DNA, Iota
PRDX3	Peroxiredoxin 3
PTCH1	Protein patched homolog 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
RAD50/51L	Radiation sensitivity abnormal 50 / 51L
RAD51C/FANCO	Radiation sensitivity abnormal 51C / Fanconi anemia group O
RED	Cytochrome P450 reductase
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication protein A
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SIR	Standardized Incidence Ratios
SNP	Single nucleotide polymorphism
SLC4A7	Solute carrier family 4, member 7
SMD	Syndrome myélosdysplasique
SNX3	Sorting nexin 3
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STK11/LKB1	Serine/threonine kinase 11
TFIIH	General transcription factor IIIH
TGFB1	Transforming growth factor beta-1
TLS	Translesion synthesis
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
TOX3	High mobility group box family member 3
TP53	Tumor protein p53
tSNP	Tagging single nucleotide polymorphism
UAF	USP-associated factor
UBE2T	Ubiquitin-conjugating enzyme E2T
USP1/14	Ubiquitin-specific protease 1 / 14
UTR	Untranslated regions
UV	Ultraviolet
Wt	Wild type
XPA/F	Xeroderma pigmentosum group A/F
XPR	Extracellular protein regulator
XRCC3	X-ray repair, complementing defective, in Chinese hamster 3
ZNF365	Zinc finger protein 365
ZR75	oestrogen-dependent human breast cancer cell line

*À Valérie, mes parents  
et mon frère Stéphen, pour  
leur soutien inconditionnel.*

# INTRODUCTION

## 1. CANCER DU SEIN

### 1.1. STATISTIQUES SUR LE CANCER DU SEIN

Le cancer du sein est un type de cancer qui se démarque des autres non seulement par sa fréquence élevée chez les femmes, mais également parce qu'il touche directement un des symboles de la féminité. Bien qu'elle ait été étudiée de manière intensive, plusieurs aspects de cette maladie demeurent encore inconnus. Plus d'un million de cas de cancer du sein sont diagnostiqués chaque année à travers le monde et près de 500 000 femmes en meurent durant la même période (1). Selon les dernières statistiques disponibles, on devrait s'attendre à diagnostiquer environ 23 200 cas de cancer du sein pour l'année 2010 au Canada (dont 6 100 au Québec), ce qui représente 500 cas de plus que pour l'année 2009 (2). Le nombre de décès causé par cette maladie pour l'année 2010 serait de 5 300 au Canada et de 1 400 au Québec (2).

Lorsqu'on analyse les statistiques publiées par divers organismes sur le cancer du sein, on observe que le nombre de cas diagnostiqués augmente légèrement chaque année depuis le début des années 1980-1990 (2; 3). Il est évident que l'implantation d'un programme de dépistage par mammographie à grande échelle en est partie responsable (4). Selon les données publiées pour le Québec, on remarque qu'il y a eu une forte augmentation des cas diagnostiqués lors des dix premières années du programme de dépistage, puis cette augmentation s'est atténuée au cours des années subséquentes (4). Le vieillissement de la population est un autre facteur important qui contribue à faire augmenter le nombre de cas de cancer du sein (et de tous les types de cancer) (2). On doit donc s'attendre à ce que la fréquence des cancers du sein continue d'augmenter tant que cette tendance démographique sera présente.

Par contre, malgré une augmentation constante du nombre de cas diagnostiqués, la mortalité tend à diminuer d'une année à l'autre (2; 4). Le diagnostic précoce de la maladie grâce à l'application de méthodes sensibles à grande échelle et l'amélioration de l'efficacité des traitements explique en grande partie cette baisse du taux de mortalité.

## **1.2. FACTEURS DE RISQUE**

Le tableau 1 résume la plupart des facteurs qui sont reconnus pour influencer à divers degrés le risque de développer un cancer du sein. Il est intéressant de noter qu'une bonne partie de ces facteurs peuvent être interprétés en tenant compte de leur influence sur l'exposition des femmes aux estrogènes. En effet, l'augmentation du risque de tous les facteurs reproductifs, la grande taille, le poids élevé à la naissance ainsi que l'exposition à des sources exogènes d'estrogène (contraceptifs oraux et traitements hormonaux substitutifs) peut être expliquée par le fait qu'une exposition accrue aux estrogènes favorise le développement de tumeurs mammaires.

L'histoire familiale est un autre critère important qui influence le risque relatif de développer un cancer du sein. En effet, une analyse de plus de 58 000 cas de cancer du sein et 100 000 contrôles a permis de déterminer qu'une personne est plus à risque de développer un cancer du sein lorsque ses apparentées au premier degré sont atteintes (5). Le risque relatif est de 1,80 lorsqu'une apparentée est atteinte, de 2,93 lorsque deux apparentées sont atteintes et de 3,90 pour trois apparentées ou plus qui ont développé un cancer du sein. De plus, plus l'âge au diagnostic est bas chez les apparentés, plus le risque relatif de développer un cancer du sein augmente. Bien que la ségrégation de la maladie dans une famille puisse théoriquement être expliquée par des facteurs environnementaux partagés, les études réalisées chez des jumeaux monozygotes favoriseraient plutôt la présence de facteurs génétiques (6-8). Il est peu probable que des facteurs environnementaux puissent expliquer plus de 10% des cas de cancers du sein familiaux (9).

**Tableau 1:** Facteurs modifiant le risque de développer le cancer du sein.

<b>Facteurs reproductifs</b>	
Puberté précoce	↑↑
Forte densité mammaire	↑↑
Nulliparité	↑↑
Grossesse après 40 ans	↑
Ménopause tardive	↑
Nombre élevé de grossesses à terme	↓
Allaitement	↓
<b>Facteurs environnementaux et habitudes de vie</b>	
Provenance: Amérique du Nord ou Europe	↑↑
Exposition à des radiations	↑
Prise de contraceptifs oraux	↑
Traitements hormonaux substitutifs	↑
Alimentation riche en gras saturé	↑
Consommation d'alcool	↑
Déficience en folate	↑
Classe socioéconomique élevée	↑
Provenance: Afrique ou Asie	↓↓
Exercice physique	↓
<b>Facteurs génétiques</b>	
Histoire familiale	↑↑
Mutations de forte pénétrance (BRCA1/2)	↑↑
Mutations de faible pénétrance	↑
<b>Autres facteurs</b>	
Âge avancé	↑↑
Affections mammaires antérieures bénignes	↑↑
Grande taille	↑
Poids élevé à la naissance	↑

**Adapté des articles:** McPherson et coll. 2000 (10), Key et coll. 2001 (11), Sakorafas et coll. 2002 (12), Brekelmans 2003 (13), Singletary 2003 (14), Dumitrescu et Cotarla 2005 (15), Veronesi et coll. 2005 (16), Narod 2006 (17) et Khan et coll. 2010 (18).

↑↑: Forte augmentation du risque

↓↓: Forte diminution du risque

↑: Augmentation modérée du risque

↓: Diminution modérée du risque

### 1.3. GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ

Les gènes de susceptibilité connus n'expliquent qu'environ 25% à 50% des cas familiaux de cancer du sein, selon les cohortes étudiées. Plusieurs modèles de transmission peuvent expliquer l'agrégation familiale. Le modèle polygénique semble être le plus probable (8; 19-23). Selon ce modèle, plusieurs mutations plus ou moins fréquentes dans la population, mais avec une faible pénétrance, agiraient ensemble de manière multiplicative pour augmenter le risque de développer un cancer du sein. Une conséquence de ce modèle serait qu'une forte proportion de cancer se développerait dans un sous-groupe de la population à risque élevé (possédant de nombreux allèles de susceptibilité) (21). Des études d'associations conduites à l'échelle génomique ont d'ailleurs connu un certain succès à cet égard au cours des dernières années (voir tableau 2). On constate que tous les polymorphismes ainsi trouvés n'augmentent que faiblement le risque de développer un cancer du sein par lui-même (la plus forte augmentation du risque étant de 1,63 pour les personnes qui portent l'allèle rare à l'état homozygote). Par contre, leur fréquence élevée fait qu'une proportion non négligeable de la population peut être porteuse de plusieurs allèles de susceptibilité à l'état homozygote et conséquemment avoir un risque important de développer cette maladie. On doit tout de même noter que dans la majorité des études, le variant causal n'a pas pu être identifié hors de tout doute, même lorsque des gènes ont été proposés pour expliquer l'association.

Depuis la découverte de *BRCA1* (24), *BRCA2* (25) et *TP53* (26) qui ont une forte pénétrance, peu d'études ont réussi à mettre en évidence d'autres gènes associés à une forte augmentation du risque de développer un cancer du sein. Il semble donc que si d'autres gènes du même calibre existent, ils n'expliqueraient qu'une faible proportion des cas. Certains chercheurs ont tout de même postulé l'hypothèse qu'une proportion importante des cas de cancer du sein pourrait être causée par de nombreuses mutations rares, conférant une augmentation modérée à élevée du risque (27). De telles mutations pourraient être spécifiques à certaines populations chez lesquelles la fréquence de l'allèle mineur serait augmentée par l'effet fondateur et la dérive génétique. Les gènes *ATM*, *BRIP1/FANCI*, *PALB2/FANCD1* et *CHEK2* en sont de bons exemples (28). D'ailleurs, on retrouve des

mutations fondatrices dans les gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2/FANCN* et *CHEK2* dans la population canadienne-française (29-35).

La meilleure méthode pour détecter des gènes de susceptibilité peu fréquents, mais avec une pénétrance modérée est le reséquençage de gènes candidats. Malgré de nombreuses recherches, seulement un nombre limité de gènes dans cette catégorie a pu être mis en évidence. En plus des gènes mentionnés précédemment (*ATM* (36), *BRIP1/FANCI* (37), *PALB2/FANCN* (32) et *CHEK2* (38)), on peut également ajouter les gènes *STK11/LKB1* (39), *PTEN* (40), *RAD51C/FANCO* (41), *NBN/NBS1* (42) et *RAD50* (43).

**Tableau 2:** Polymorphismes communs de faible pénétrance trouvés grâce à des études d'association à l'échelle génomique.

Position	Gène proposé	RefSeq	Fréq. allélique	OR hétérozygotes	OR homozygotes	Réf.
2q33	CASP8	rs1045485	0,13	0,89	0,74	(44; 45)
19q13	TGFB1	rs1982073	0,38	1,07	1,16	(44)
10q26	FGFR2	rs2981582	0,38	1,23	1,63	(45-50)
16q12	TOX3	rs3803661	0,25	1,23	1,39	(46; 48; 51)
5q11	MAP3K1	rs889312	0,28	1,13	1,27	(45; 46; 50)
11q15	LSP1	rs3817198	0,30	1,06	1,17	(45; 46)
8q24		rs13281615	0,40	1,24	1,79	(45; 46; 50)
2q35		rs13387042	0,57	1,11	1,44	(48; 50)
5p12	MRPS30	rs10941679	0,24	-*	-*	(45; 49; 50)
6q25	ESR1	rs2046210	0,35	1,36	1,59	(45; 52)
3p24	SLC4A7	rs4973768	0,46	1,12	1,23	(45; 53)
17q23	COX11	rs6504950	0,27	0,96	0,89	(45; 53)
1p11		rs11249433	0,39	1,16	1,30	(45; 50)
14q24	RAD51L1	rs999737	0,76	0,94	0,70	(45; 50)
9p21		rs1011970	0,17	1,07	1,29	(45)
10p14		rs2380205	0,43	0,95	0,89	(45)
10p21	ZNF365	rs10995190	0,15	0,84	0,83	(45)
10q22		rs704010	0,39	1,11	1,13	(45)
11q13		rs614367	0,15	1,16	1,27	(45)

\* Seule l'augmentation relative du risque pour l'allèle est disponible (OR = 1,27).

Il est fort probable qu'il y ait un continuum pour la fréquence des allèles de susceptibilité et pour leur pénétrance. Le fait qu'elles apparaissent en diverses catégories plus ou moins distinctes (allèles rares conférant un risque élevé, allèles rares conférant un risque modéré et allèles fréquents conférant un faible risque) reflèterait plutôt les limitations des technologies qui détectent plus facilement les cas situés dans les extrêmes de la distribution (28).

### **1.3.1. Les syndromes associés aux gènes de susceptibilité**

Une partie des gènes de susceptibilité mentionnés dans la dernière section sont également associés avec des syndromes héréditaires caractérisés entre autres par une forte prédisposition à développer divers cancers (dont le cancer du sein). Une partie de ces syndromes sont transmis de manière autosomique dominante. Le syndrome de Li-Fraumeni (54) est causé par des mutations dans le gène *TP53* (55). La description classique du syndrome consiste en un sarcome diagnostiqué avant l'âge de 45 ans avec un apparenté ayant développé un cancer dans le même intervalle, ainsi qu'un autre apparenté au premier ou au deuxième degré qui a développé n'importe quel type de cancer également avant 45 ans ou un sarcome à n'importe quel âge (26). Depuis, d'autres descriptions moins sévères du syndrome ont été proposées, dont les critères de Chompret (56; 57) et le syndrome de Li-Fraumeni *like* (58). L'utilisation de ces critères permet de trouver des mutations délétères dans le gène *TP53* chez des patients qui n'auraient pas été inclus selon les critères classiques du syndrome de Li-Fraumeni (59). Des mutations dans le gène *CHEK2* seraient responsables de certains cas du syndrome de Li-Fraumeni (60), quoique son implication dans ce syndrome ait été remise en question (61).

Les porteurs hétérozygotes de mutations dans le gène *PTEN* sont atteints du syndrome de Cowden (62; 63). Cette maladie est caractérisée par des hamartomes (des malformations tissulaires d'aspect tumoral) qui peuvent toucher tous les tissus, par la présence de macrocéphalie ainsi que par une prédisposition à développer plusieurs types de cancer (principalement du sein, de la thyroïde et de l'endomètre) (64). Dans environ 20% des cas du syndrome de Cowden, on ne retrouve pas de mutations dans le gène *PTEN* (64). Une certaine proportion des cas du syndrome de Bannaran-Riley-Ruvalcaba seraient causés par

des mutations dans ce gène (65), la maladie de Lhermitte–Duclos (66) et certaines formes d'autismes (possiblement en lien avec la macrocéphalie) (67; 68).

Le syndrome de Peutz-Jeghers (69; 70) est caractérisé par la présence de polypes intestinaux et gastriques généralement accompagnés par une pigmentation anormale de la peau et des muqueuses (71). Les patients sont également à risque de développer plusieurs types de cancers, principalement intestinaux, mais également du sein (72-77). On retrouve ce syndrome chez les porteurs de mutations à l'état hétérozygote du gène suppresseur de tumeur *STK11/LKB1* (78; 79).

Des mutations récessives dans les gènes *ATM* (80) et *NBS1/NBN* (81) sont associées à l'ataxie télangiectasie (82; 83) et au syndrome de Nimègue (*Nijmegen*) (84), respectivement. Au niveau cellulaire, ces deux syndromes sont pratiquement indissociables, étant tous les deux caractérisés par de l'instabilité chromosomique, de la radiosensibilité, de la synthèse d'ADN radorésistante et par une défaillance pour l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et G2/M (85). L'ataxie télangiectasie est caractérisée par une ataxie cérébelleuse progressive (perte de coordination pour les mouvements volontaires), une immunodéficience menant au développement de nombreuses infections, de la radiosensibilité clinique ainsi qu'une prédisposition à développer plusieurs types de cancers (83). On retrouve également la présence de vaisseaux sanguins dilatés principalement au niveau des yeux qu'on nomme la télangiectasie (83). Outre l'ataxie et la télangiectasie, toutes ces caractéristiques se retrouvent chez les patients atteints du syndrome de Nimègue (*Nijmegen*) (86).

Finalement, l'anémie de Fanconi sera traitée au cours de la prochaine section.

## **2. ANÉMIE DE FANCONI**

### **2.1. MANIFESTATIONS CLINIQUES**

#### **2.1.1. Défauts congénitaux**

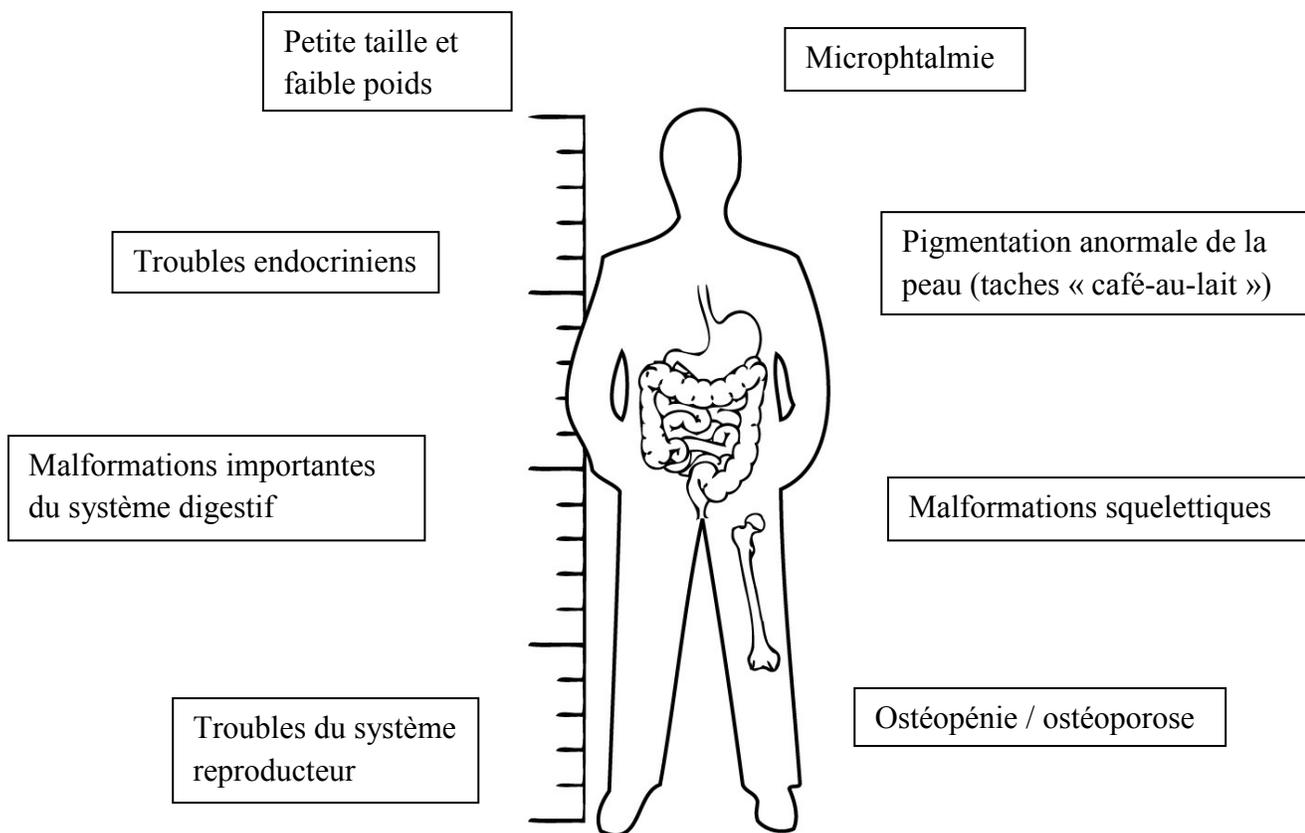
Le spectre des défauts congénitaux observés chez les patients atteints d'anémie de Fanconi (AF) est extrêmement vaste. Chez certains patients, aucun défaut congénital n'est observé (87) alors qu'un phénotype beaucoup plus sévère est présent pour d'autres, incluant de nombreuses malformations touchant divers organes (88). Tous les systèmes du corps humain peuvent être potentiellement atteints par ce syndrome. Parmi les anomalies les plus fréquemment rencontrées, on note les malformations squelettiques (71% des cas), une pigmentation anormale de la peau (64%), une petite taille (63%), une microphthalmie (de petits yeux; dans 38% de cas), des défauts au niveau des reins et du tractus urinal (34%) et un sous-développement du système génital chez les mâles (20%) (89). On retrouve, moins fréquemment, un retard mental, un faible poids à la naissance, des malformations du système digestif, du cœur et des poumons, du système auditif, du système génital féminin et du système nerveux central (90). De plus, une étude a démontré qu'environ 92% des patients de plus de 18 ans sont atteints d'ostéopénie ou bien d'ostéoporose (91). La figure 1 est un résumé des principales déformations retrouvées chez les patients AF.

Près du tiers des personnes atteintes d'AF ne présentent aucune malformation (89). Le diagnostic d'AF pour ce sous-groupe sans malformations congénitales majeures arrive en moyenne beaucoup plus tard que chez les patients en présentant (92). Une analyse plus poussée semble par contre démontrer que des malformations plus subtiles, telles que des paramètres de croissance inférieurs au 5e percentile, des anomalies dans la pigmentation de la peau ou une microphthalmie, sont présentes chez pratiquement tous les cas (93). De telles malformations mineures, se retrouvant parfois chez des patients souffrant d'autres syndromes ou même dans la population en général, sont facilement manquées lors des examens médicaux de routines. Il est d'ailleurs fort probable que plus d'un tiers des patients souffrant d'AF ne présentent pas de malformations congénitales majeures, car il semble y avoir un biais favorisant les cas les plus sévères lors de la description de la maladie. En effet, on retrouve généralement moins de malformations congénitales chez les

apparentés atteints d'AF que chez les patients ayant été les premiers de leur famille à en recevoir le diagnostic (94).

Il est intéressant de noter la grande variabilité phénotypique observée chez les patients, y compris ceux provenant du même sous-groupe de complémentation (95), avec la même mutation (96; 97) ou encore chez des jumeaux monozygotes (98; 99). Un patient avec un pouce surnuméraire pour une main et un pouce dysplasique pour l'autre a également été décrit (100). Il semble donc que les malformations congénitales observées chez les nombreux patients ne soient pas causées directement par un défaut de la voie FANC, mais plutôt que ce soit le mauvais fonctionnement de cette voie qui créerait un environnement propice à leur apparition lors du développement des personnes atteintes.

**Figure 1:** Caractéristiques typiques retrouvées chez les patients AF.



## Troubles hématopoïétiques

C'est généralement lors de l'apparition de troubles hématopoïétiques importants que les médecins commencent à soupçonner que l'AF puisse être en cause, même lorsqu'il y a présence de plusieurs malformations congénitales typiques à cette maladie (93). Pratiquement toutes les personnes atteintes d'AF vont développer des troubles hématopoïétiques au cours de leur vie, ce qui en fait la principale manifestation clinique de la maladie. En effet, on estime que leur incidence cumulative peut atteindre 90% (101-103). Ces troubles sont les principaux facteurs de morbidité et de mortalité associés à l'AF (104), même si environ 40% des défaillances de la moelle osseuse ne nécessitent pas de traitement (105).

Les premiers désordres hématopoïétiques auxquels les patients AF doivent faire face sont généralement les cytopénies qui peuvent toucher tous les éléments cellulaires du sang, que ce soit les globules rouges (anémie), les globules blancs (leucopénie) ou les plaquettes (thrombocytopénie) (106). La thrombocytopénie est généralement la première cytopénie à se présenter (107). La probabilité qu'un patient AF se présentant avec une thrombocytopénie développe une pancytopenie dans les 20 années suivantes est estimée à 84% (108). À l'inverse, il arrive que des patients AF manifestant un décompte anormal des cellules sanguines demeurent dans cet état indéfiniment (107). Les défaillances de la moelle osseuse sont généralement diagnostiquées vers l'âge de 7 ans, bien que cet âge puisse varier énormément (108). Il est estimé qu'environ 12% des patients AF meurent directement de complications associées à une défaillance de la moelle osseuse (103) et le pourcentage pourrait atteindre 38% à 45 ans (108).

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont en fait un regroupement de syndromes dont le critère minimal nécessaire au diagnostic est la présence de plus de 10% de cellules dysplasiques (dont la maturation n'a pas lieu correctement) dans la moelle osseuse pour n'importe laquelle des lignées découlant de la lignée myéloïde (109). D'autres critères sont ensuite nécessaires pour discerner entre les divers types de SMD, dont la proportion de blastes (globules blancs immatures) en circulation ou dans la moelle. Lorsque la proportion de blastes dépasse 20% (110) ou 30% (111), variant selon les recommandations utilisées,

on parle alors de leucémie myéloïde aigüe (LMA). Chez les patients AF, une LMA peut également se présenter sans SMD, et ce sous-groupe de LMA répond mieux aux thérapies traditionnelles (112). Le risque brut des personnes atteintes d'AF de développer une leucémie se situe entre 5% et 10% et celui de développer un SMD est de 5% (105). D'ailleurs, leur risque de développer une leucémie croît rapidement durant l'enfance et l'adolescence (la médiane se situant à 11 ans) et reste stable, voir même décline par la suite (103). Il a été suggéré que la LMA chez les patients AF serait équivalente aux LMA secondaires (causées par l'exposition à des agents alkylants) dans la population en général (112; 113). En effet, on retrouve fréquemment dans les deux cas des clones présentant une monosomie du chromosome 7, rarement retrouvés dans les autres formes de LMA (113).

Outre la monosomie du chromosome 7, on remarque fréquemment la présence d'autres réarrangements chromosomiques lors des analyses cytogénétiques des cellules des patients AF, tels que la trisomie du chromosome 1 et la délétion du segment 5q (114). Leur impact sur la santé des patients est par contre sujet de controverse d'une étude à l'autre. Il a été noté que certains clones ne se présentent que de façon transitoire et que les SMD se présentent parfois sans la présence de clones (115). Par contre, d'autres études ont pu démontrer que la présence d'anormalités cytogénétiques chez les patients AF augmente le risque de voir apparaître un SMD et/ou une LMA (108; 114). Des recherches récentes utilisant des méthodes plus sensibles que les analyses cytogénétiques traditionnelles (génomique comparative et hybridation fluorescente *in situ*) ont également permis de déterminer que des gains de la région 3q se retrouvent chez 70% des patients AF étudiés et sont associés à un risque accru de développer des SMD ou des LMA (116). Il a été proposé que l'hypersensibilité des cellules AF aux effets antiprolifératifs de certaines cytokines fréquemment surexprimées chez les patients AF (Interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ )) (117-119) offrirait un avantage prolifératif aux cellules ayant développé une résistance à ces signaux grâce à des aberrations cytogénétiques (113; 120).

### **2.1.2. Susceptibilité aux cancers**

En plus du risque fortement accru pour les leucémies, les patients AF ont également un risque élevé d'être touchés par d'autres types de cancer. On estime que la probabilité de développer des tumeurs est environ 50 fois plus élevée chez les patients AF que dans la

population en général (103; 121). L'âge moyen de l'apparition des tumeurs solides (26 ans) est plus élevé que l'âge moyen d'apparition des leucémies (14 ans) (122). De plus, le diagnostic d'AF arrive plus tard dans le sous-groupe atteint de cancers que celui sans (dans 25% des cas, le diagnostic de cancer précède même celui d'AF), ce qui laisse entendre que les cancers apparaissent plus fréquemment chez les patients AF pour lesquels le phénotype est moins sévère (101; 122). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les patients avec un phénotype plus sévère décèdent des complications hématopoïétiques avant d'atteindre l'âge auquel se présentent généralement les tumeurs solides (123). On peut donc s'attendre à ce que leur prévalence augmente au fur et à mesure que l'espérance de vie des patients AF s'améliore grâce aux progrès dans le traitement des troubles hématopoïétiques. Il est intéressant de noter que l'espérance de vie des patients a passé d'environ 10 ans chez les cas rapportés avant 1960, à 24-30 ans chez les cas étudiés plus récemment (102; 124). De nettes améliorations ont été notées dans le domaine de la transplantation de moelle osseuse (125). Par contre, on a également pu constater que la procédure de transplantation augmente d'environ quatre fois le risque de développer un cancer (122; 126). Cela est causé entre autres par la préparation du patient pour la greffe qui nécessite une irradiation ou l'exposition à des agents cytotoxiques auxquels les patients AF sont hypersensibles (125). Les réactions du greffon contre l'hôte, aiguës ou chroniques, augmentent aussi le risque de développer un cancer (126; 127).

Des tumeurs solides, principalement des carcinomes squameux, ont été rapportées dans environ 5% des patients AF (90; 101) et leur risque cumulatif d'en développer est estimé à 30% à l'âge de 45 ans (103; 105). Les endroits les plus fréquemment touchés sont la tête et le cou (la langue, les gencives, l'œsophage, le larynx et l'oropharynx) chez les hommes et le tractus génital (vulve et col de l'utérus) chez les femmes. Globalement, le risque de développer des cancers squameux des voies aérodigestives supérieures et génitales est 700 fois plus élevé que celui de la population en général (il augmente à 2000 fois si on considère uniquement les cancers de l'œsophage et 4000 fois pour ceux de la vulve) (103; 121; 122).

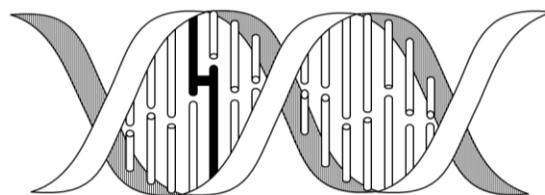
Environ 3-5% des patients AF sont touchés par des adénomes du rein ou des hépatocarcinomes (101; 124). Ils sont diagnostiqués en moyenne vers l'âge de 16 ans (124).

C'est une classe de cancer à part pour les patients AF, car elle est principalement associée au traitement avec des androgènes qu'ils doivent parfois subir pour tenter de diminuer la progression des troubles sanguins, faute de donneur compatible pour la transplantation (128; 129). D'autres types de cancer chez les patients AF ont également été rapportés, bien que leur fréquence soit inférieure à celle des leucémies, des cancers des voies aérodigestives et des cancers hépatiques. La liste inclut, entre autres, des tumeurs au cerveau et aux reins, des carcinomes aux seins, des carcinomes basocellulaires, des neuroblastomes, des mélanomes et des ostéosarcomes (130).

Les patients AF doivent donc faire face à de nombreux risques qui peuvent se présenter successivement au cours de leur vie. En ordre moyen d'apparition, on note une défaillance de la moelle osseuse, les leucémies, les tumeurs hépatiques, les anomalies clonales et SMD et finalement les autres types de cancers (124). En effet, à l'âge de 48 ans, 93% des patients sont soit décédés, ont reçu une greffe de moelle ou bien ont développé une leucémie et/ou une tumeur solide (103).

### 2.1.3. Caractéristiques cellulaires

Les cellules des patients AF sont sujettes à un plus grand nombre d'aberrations chromosomiques spontanées lorsqu'elles sont mises en culture comparativement à des cellules contrôles (131). On note fréquemment l'apparition de chromosomes quadridiaux, causés par la fusion de deux chromosomes suite à une erreur lors de la réparation de bris doubles-brins (132). De plus, leur fréquence et leurs impacts néfastes sur les cellules peuvent être exacerbés par une exposition à divers agents génotoxiques, dont la mitomycine C (MMC) (131), les moutardes azotées (131) et le diépoxybutane (DEB) (133). Des études supplémentaires avec d'autres produits ont contribué à déterminer que toutes les cellules des patients AF sont particulièrement sensibles aux agents chimiques pouvant créer des pontages, c'est-à-dire des liens covalents, entre les deux brins d'ADN



**Figure 2:** Pontage interbrin. En blanc; lien hydrogène entre deux nucléotides. En noir; lien covalent entre deux nucléotides de brins opposés.

d'une même hélice (figure 2) (134). Le diagnostic d'AF repose sur l'analyse des dommages chromosomiques induits par des agents pontants sur une culture de cellules lymphocytaires (135).

Il arrive dans au moins 10% des cas qu'il y ait présence d'une sous-population de cellules sanguines résistante aux effets clastogènes des agents pontants et qui peuvent fausser le diagnostic (136). On parle dans ce cas de mosaïcisme, une forme de thérapie génique naturelle (137). C'est pour cette raison que lorsqu'on retrouve à la fois un phénotype qui laisse croire à l'AF et un résultat négatif lors des tests sur les lymphocytes, il est recommandé de faire un test supplémentaire sur une culture de fibroblastes du patient, car ces dernières ne sont pas affectées par le mosaïcisme (138). Il est également intéressant de noter que certains auteurs ont postulé l'hypothèse selon laquelle les agents tels que la MMC et le DEB mèneraient à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS: *Reactive Oxygen Species*) et que ces derniers seraient les principaux responsables des aberrations chromosomiques observées dans les cellules FANC y étant exposées (139; 140).

Il y a maintenant près de 30 ans qu'il est reconnu que les cellules des patients AF accumulent moins de bris chromosomiques lorsqu'elles sont cultivées dans un environnement hypoxique (5% d'oxygène) comparativement à des conditions normales d'oxygène (20%) (141). D'autres équipes ont également reproduit ces résultats (142-144). De plus, la plupart des études qui ont évalué la sensibilité des cellules FANC à divers stress oxydatifs ont pu démontrer une sensibilité accrue (145; 146), du moins pour certains sous-groupes de complémentation (147). Une telle sensibilité peut être expliquée soit par une production anormale de ROS et/ou par une mauvaise détoxification de ces dérivés (148). Dans le cas de l'AF, de nombreux résultats corroborent le fait que la sensibilité accrue à l'oxygène et à ses composés dérivés soit un amalgame de ces deux possibilités. D'une part, les taux anormalement élevés de certains composés tels que le TNF- $\alpha$  (117; 119; 149; 150) et peut-être de l'IFN- $\gamma$  (119; 149) ont été proposés comme responsables de l'état prooxydatif dans lequel les cellules des patients AF se retrouvent (149). De plus, lorsque les lymphocytes subissent des dommages causés par des ROS, ils vont sécréter du TNF- $\alpha$  (149), enclenchant un cycle qui pourrait potentiellement maintenir les cellules en état de stress oxydatif. D'autre part, de nombreuses interactions ont pu être identifiées entre des

protéines FANC et des protéines associées à la détoxification de divers agents génotoxiques, dont les ROS (151; 152). À cet effet, on peut noter des interactions entre FANCC avec GSTP1 (145; 153) et RED (154) ainsi que FANCG avec CYP2E1 (155) et PRDX3 (156). Une autre étude a permis de démontrer que les fibroblastes des patients AF ont une concentration réduite de la protéine Trx et qu'une surexpression de cette dernière fusionnée à un domaine de localisation nucléaire permet de diminuer fortement la fréquence des aberrations chromosomiques spontanées dans ces cellules (157). Un phénomène semblable est observé lorsqu'on traite les cellules FANC avec des antioxydants (142; 148).

## 2.2. VOIE FANC-BRCA: LA RÉPARATION DES PONTAGES

La découverte, en 1985, que les cellules des patients AF pouvaient être classées en au moins deux groupes de complémentation distincts a été un point majeur dans la recherche sur cette maladie (158). Cette méthode consiste à fusionner des cellules de référence pour un groupe de complémentation avec les cellules d'un groupe inconnu pour vérifier si le taux de survie en réponse au traitement avec des agents pontants des cellules hybrides est rétabli à un niveau normal (159). Si c'est le cas, on considérera que les lignées utilisées ne sont pas du même groupe de complémentation, puisqu'une version sauvage de chaque gène défectueux aura été fournie par l'autre lignée. Dans les années suivant cette première publication, de nombreuses autres études sont apparues, augmentant à chaque fois le nombre de groupes de complémentation connus (160-163). Progressivement, les divers gènes défectueux pour chaque groupe de complémentation ont été identifiés et clonés. Treize gènes responsables de l'AF sont mutés chez au moins un patient (à l'exception du seul patient FANCM connu, qui s'est avéré avoir également des mutations bi-alléliques dans le gène *FANCA* (164)) et au moins deux autres qui sont essentiels à cette voie de réparation de l'ADN sans avoir été retrouvés chez les patients analysés. Dans l'ordre où le gène correspondant a été identifié, on note: *FANCC* (165), *FANCA* (166; 167), *FANCG/XRCC9* (168), *FANCF* (169), *FANCE* (170), *FANCD2* (171), *FANCD1/BRCA2* (172), *FANCL* (173), *FANCB* (174), *FANCI/BRIP1* (175-177), *FANCM/FAAP250* (178), *FANCI* (179-181) et *FANCN/PALB2* (182; 183).

En résumé, les protéines FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG et FANCL forment un complexe (nommé le complexe I) qui nécessite la présence de l'hétérodimère FANCM-FAAP24 pour s'associer à la chromatine en phase S ou lors de certains types de dommages à l'ADN. Le rôle principal du complexe I serait la monoubiquitination des deux protéines du complexe ID (FANCD2 et FANCI). Les autres protéines seraient nécessaires pour une ou des étapes en aval de la monoubiquitination du complexe ID. Plus de détails seront fournis dans les prochaines sections (voir également la figure 3).

Il est important de noter qu'après l'étude publiée par Duckworth-Rysiecki et collaborateurs en 1985 (158), plusieurs articles ont considéré qu'il n'y avait que deux groupes de

complémentation et le groupe alors considéré comme FANCB s'est avéré être deux groupes distincts. Plus spécifiquement, les lignées HSC62 et HSC230 ont été classées dans le groupe B (184-191) jusqu'en 1992, où elles ont été classifiées dans le groupe D (160) pour finalement être reclassées dans le groupe D1 près de 10 ans plus tard (171; 172). De plus, le groupe de complémentation FANCH s'est avéré être le groupe FANCA pour lequel les cellules avaient subi une réversion spontanée à l'état sauvage en culture, ce qui avait faussement permis la complémentation de la lignée de référence FANCA (192). Finalement, il n'y a jamais eu de groupe de complémentation FANCK car la prononciation ressemble trop à FANCA, ce qui pourrait être source de confusion (159).

Lorsqu'il a été démontré qu'il y avait eu une erreur lors de l'assignation du groupe de complémentation FANCH, les auteurs avaient alors recommandé l'utilisation de critères plus stringents (159; 192). Selon ces critères, il faudrait au moins avoir accès à deux lignées cellulaires provenant de patients différents qui ne complémentent avec aucun des groupes connus et qui ne complémentent pas ensemble. Ce n'est définitivement pas le cas du gène *FANCM*, pour lequel il n'existe qu'un seul patient également porteur de mutations bi-alléliques dans le gène *FANCA* (164). Selon les critères mentionnés, il faudrait donc utiliser le nom *FAAP250* plutôt que *FANCM*. Malgré cela, le nom *FANCM* semble tout de même avoir été adopté par la majorité des équipes qui publient sur ce gène (193-202). Le cas de *RAD51C/FANCO* sera traité plus loin dans le texte.

### **2.2.1. La détection des pontages interbrins et l'arrêt du cycle cellulaire**

Dans la majorité des cas étudiés, il semble clair que la réparation des pontages interbrins a lieu lors de la phase S du cycle cellulaire et doit être complétée avant le début de la phase M (203). Le candidat le plus intéressant pour l'étape initiale de détection du dommage est l'hétérodimère FANCM-FAAP24. En effet, ce dimère est constitutivement associé à la chromatine tout au long du cycle cellulaire (204). De plus, il possède une forte affinité pour les structures de l'ADN qui miment une fourche de réplication bloquée (205-208). Lorsque les fourches de réplifications se retrouvent bloquées au pontage interbrins, FANCM-FAAP24 activerait la voie de signalisation ATR-Chk1 (209).

L'activation d'ATR nécessite l'activité translocase (ATPase-dépendante) de FANCM (209), ce qui n'est pas le cas pour la formation du complexe I, son association avec la chromatine et pour la monoubiquitination du complexe ID (164; 210; 211). Il semble y

avoir une distinction importante à faire entre l'activation basale d'ATR et son activation par FANCM. En effet, même en absence de FANCM, on note une certaine proportion d'ATR activée qui semble suffisante pour l'activation de la voie de réparation des pontages interbrins (du moins pour la phosphorylation de FANCA (212; 213), FANCD2 (214; 215) et FANCI (216)). Par contre, lorsque l'activité translocase de FANCM est absente, les cellules demeurent hypersensibles aux dommages causés par des agents pontants de l'ADN, ce qui démontre que FANCM est essentielle pour une (plusieurs) étape (s) en aval de la monoubiquitination du complexe ID (206). De plus, chez les mutants sans activité translocase, l'arrêt du cycle cellulaire qui permet d'empêcher l'entrée en mitose avant que tous les dommages soient réparés n'a pas lieu correctement, ce qui laisse donc penser que l'activation basale d'ATR n'est pas suffisante pour effectuer cette étape. Plus spécifiquement, il semblerait que ce soit l'activation de Chk1 par ATR en réponse à certains types de dommages à l'ADN qui soit affectée. En effet, en absence de l'activation d'ATR dépendante de l'activité translocase de FANCM, on note une diminution de la phosphorylation de nombreux substrats de Chk1, notamment FANCE (voir plus loin dans le texte), Cdc25A et p53 (ce qui nuirait à l'arrêt du cycle cellulaire en phase S, étape nécessaire pour réparer correctement les dommages à l'ADN avant l'entrée en mitose) (209). De plus, le fait que FANCM, FAAP24, ATR, Chk1 et HCLK2 co-immunoprécipitent (y compris dans des cellules déficientes pour les gènes du complexe I) et que leur inactivation ciblée par ARNi mène à un phénotype cellulaire semblable semble démontrer que ces protéines agissent ensemble dans une seule et même voie pour permettre l'arrêt du cycle cellulaire et ainsi s'assurer que les dommages de l'ADN soient convenablement réparés avant l'entrée en phase M (209).

### **2.2.2. L'assemblage du complexe I**

De nombreuses études ont pu démontrer que l'assemblage du complexe I se fait de manière séquentielle, nécessitant un préassemblage ordonné de plusieurs sous-complexes (217). Chacun de ces sous-complexes pourrait avoir des fonctions autres que de favoriser la monoubiquitination des deux membres du complexe ID. Étant donné qu'il a été démontré que la monoubiquitination de FANCD2 est essentielle, mais pas suffisante pour rétablir une sensibilité cellulaire normale à l'exposition à des agents pontants de l'ADN (218), il ne

serait donc pas surprenant que les sous-complexes s'avèrent importants pour d'autres étapes dans la réparation des pontages interbrins, ou pour d'autres types de dommages à l'ADN.

Le complexe I existe sous au moins quatre formes qui diffèrent lors de la progression du cycle cellulaire ou selon leur localisation (219). Plus spécifiquement, on note une forme cytoplasmique de 700 kDa, une forme nucléaire de 2 MDa et une forme directement associée à la chromatine de 1 MDa. La quatrième forme est spécifique à la phase M et fait environ 750 kDa. La stœchiométrie précise de ces différentes versions du complexe I est encore peu connue, mais la grande variabilité dans la composition du complexe I semble démontrer que sa formation, sa localisation et sa (ou ses) fonction (s) sont très fortement régulées dans le temps et dans l'espace.

Les premiers éléments du complexe I qui s'associent ensemble sont les sous-complexes FANCA/FANCG (220-222), FANCB/FANCL/FAAP100 (223; 217) et FANCC/FANCE (222; 224; 225). Dans tous les cas, l'absence d'un des membres des sous-complexes résulte en une baisse importante de la stabilité des autres membres (217; 220; 221; 224; 226; 227). Il semblerait donc que ces sous-complexes soient la configuration par défaut de ces protéines et que la perte de ces interactions mènerait à une forte diminution de leur stabilité. Il existe cependant certaines exceptions qui seront traitées dans les sections suivantes. Lorsque tous les sous-complexes sont présents dans le noyau, ils peuvent s'associer pour former le complexe I. Plus spécifiquement, les sous-complexes FANCA/FANCG et FANCB/FANCL/FAAP100 s'associent grâce à une interaction directe entre FANCB/FANCL et FANCA (223). Les protéines FANCC/FANCE peuvent s'associer avec FANCF pour former le sous-complexe FANCC/FANCE/FANCF (228). Finalement, la protéine FANCF va servir d'adaptateur qui va permettre d'associer FANCC/FANCE aux autres protéines du complexe I grâce à son interaction directe avec FANCG (222; 225; 228). Les interactions directes, faibles, mais reproductibles, qui ont été démontrées entre les protéines FANCE et FANCA ainsi qu'entre FANCE et FANCG permettent d'augmenter la stabilité du complexe (225). Il n'est pas impossible qu'il y ait d'autres interactions directes entre les protéines du complexe I qui demandent la présence de plus de trois protéines. Par

contre, les méthodes utilisées de double et de triple-hybrides ne peuvent pas démontrer la présence de ce type d'interaction.

La formation du complexe I dans le noyau débute en fin de phase G1, atteint son niveau maximal en phase S et commencerait à diffuser en périphérie nucléaire en début de phase G2 (229). Des analyses plus poussées ont également permis de déterminer qu'au moins une partie du complexe I était associée directement avec la chromatine (229; 230). D'ailleurs, on note une forte corrélation entre le niveau de phosphorylation de la protéine FANCM et l'association du complexe I avec la chromatine. En effet, la phosphorylation de FANCM semble débiter en début de phase S (204). De plus, l'utilisation d'ARNi ciblant spécifiquement FANCM empêche les protéines du complexe I de s'associer correctement avec la chromatine, bien que la migration vers le noyau ne soit pas affectée, diminuant fortement la monoubiquitination de FANCD2 (204). Le lien entre le complexe I et FANCM semble se faire grâce à une interaction directe entre FANCF et FANCM (231).

L'hétérodimère FANCM/FAAP24 était initialement considéré comme membre du complexe I car on ne pouvait pas observer de monoubiquitination de FANCD2 dans les cellules du seul patient FANCM connu. Lorsqu'il a été démontré que ce patient avait également des mutations bialléliques dans le gène *FANCA*, de nouvelles études ont été réalisées chez les cellules de ce patient préalablement complétées avec une copie fonctionnelle de *FANCA* (164). Cette étude a permis de mettre en lumière certains points par rapport au rôle de FANCM. D'une part, l'ubiquitination de FANCD2 n'est pas entièrement abrogée en absence de FANCM, ce qui semble démontrer qu'elle ne serait pas essentielle à cette étape, bien qu'elle la favorise (164; 210). D'autre part, l'utilisation d'un mutant tronqué pour la portion C-terminale (impliquée dans l'interaction en FANCM et FAAP24 (205)) est capable de rétablir une sensibilité normale à la MMC dans des lymphocytes même si FAAP24 ne semble pas pouvoir s'associer ni à FANCM, ni à la chromatine (164). Ces résultats semblent contredire une étude réalisée dans des cellules HeLa qui avait déterminé que l'inhibition de FAAP24 par ARNi était suffisante pour rendre les cellules sensibles aux effets de la MMC (205). Il n'est donc pas encore clair si ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par l'utilisation de deux types cellulaires

différents ou bien si FAAP24 est tout simplement impliquée dans la voie FANC-BRCA d'une manière indépendante de son interaction directe avec FANCM et avec la chromatine.

### **2.2.3. Le complexe ID**

Le complexe ID est formé par l'interaction directe entre FANCD2 et FANCI. Les deux membres de ce complexe sont mono-ubiquitinés (232) lors de la phase S (233) du cycle cellulaire et lors de dommages à l'ADN tels qu'observés suite à un traitement avec de la MMC, des radiations ionisantes (IR) ou des UV (232). On note une forte diminution de la quantité de FANCD2 ubiquitinée en absence de la protéine ATR (214). La présence de tous les membres du complexe I est essentielle pour que la monoubiquitination du complexe ID ait lieu (232). De tous les membres du complexe I, FANCL est le seul qui possède une activité ubiquitine ligase (173) et FANCE est la seule protéine du complexe I qui interagit directement avec FANCD2 (234). De plus, FANCL est capable d'ubiquitiner FANCD2 *in vitro* lorsqu'elle est exprimée en même temps qu'UBE2T (235) (à ce jour, le (s) facteur (s) nécessaire (s) pour l'ubiquitination de FANCI reste (nt) encore inconnu (s) (236)). L'inactivation d'UBE2T mène d'ailleurs à un phénotype cellulaire semblable à l'inactivation des autres membres du complexe I (237; 238).

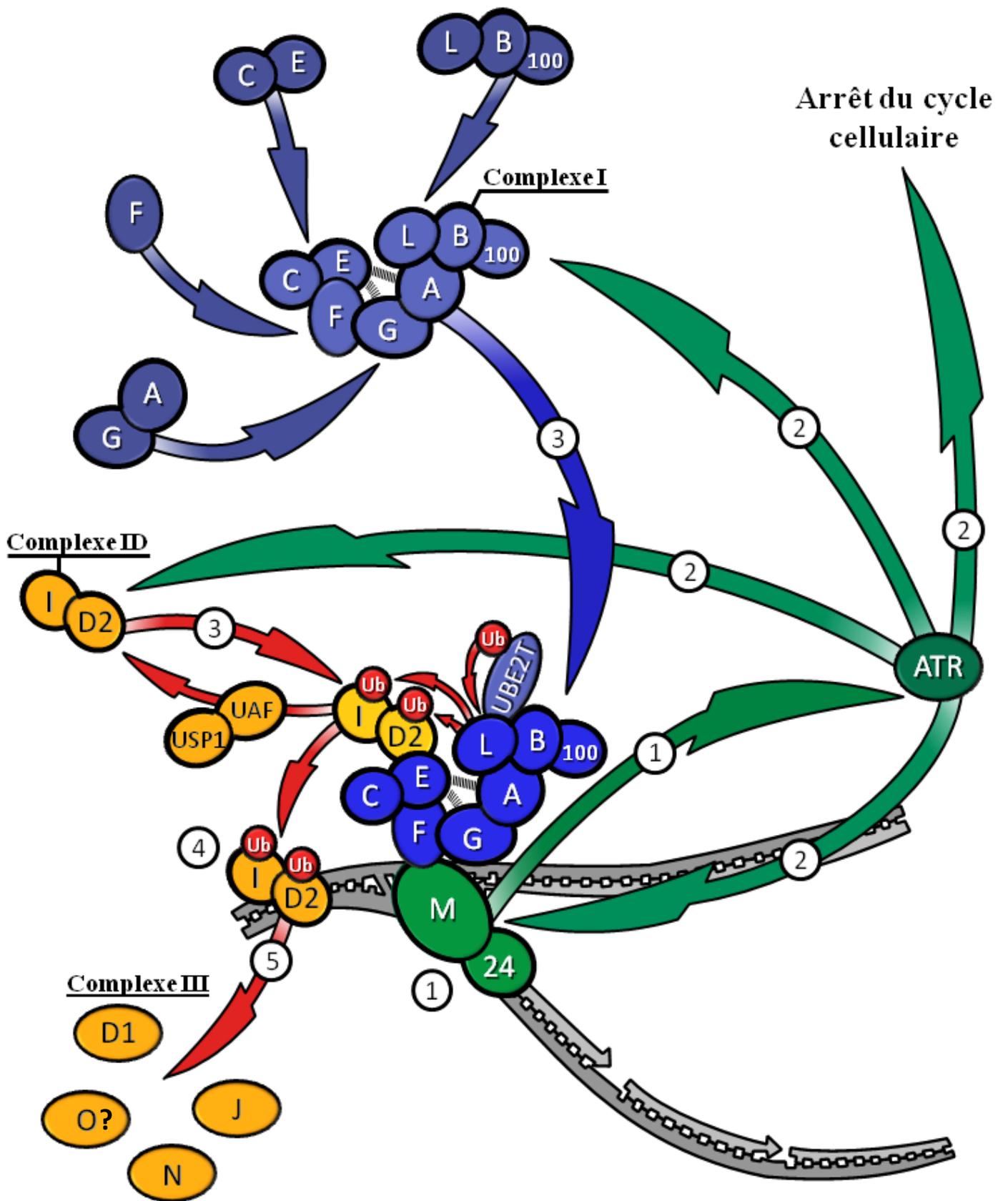
Le rôle principal de cette modification serait d'agir comme signal pour permettre l'association du complexe ID avec la chromatine (c'est-à-dire que sans ubiquitination, FANCD2 n'est pas en mesure de s'associer à la chromatine) (239). Une construction de FANCD2 qui est constitutivement ubiquitinée est en mesure de s'associer à la chromatine, mais pas de former des foci de réparation (cette même construction n'est pas capable de s'associer correctement à la chromatine en absence d'un complexe I fonctionnel: le rôle de ce dernier dans l'association de FANCD2 avec la chromatine ne se limite donc pas uniquement à l'étape d'ubiquitination) (218).

Pour être en mesure de rétablir une sensibilité normale aux agents pontants de l'ADN, le complexe ID doit non seulement être en mesure de s'associer à la chromatine, mais également se retrouver au sein de foci de réparation. Un complexe I fonctionnel est essentiel pour ses deux étapes, mais l'activité ubiquitine ligase n'est pas suffisante pour permettre la formation de foci de réparation (218). Au sein de ces foci de réparation, on note fréquemment une colocalisation de FANCD2 avec d'autres protéines qui pourraient

être impliquées dans certaines des étapes de la réparation des pontages interbrins qui auraient lieu en aval de la monoubiquitination de FANCD2 (BRCA1 (232; 233; 240), FANCD1/BRCA2 (241; 234), RAD51 (233; 241),  $\gamma$ -H2AX (234; 242), NBS1 (243), etc.).

La protéine FANCI a été identifiée récemment et semble stimuler l'ubiquitination de FANCD2 et serait importante pour que la monoubiquitination de FANCD2 ait lieu sur le bon résidu, du moins *in vitro* (235). De plus, la monoubiquitination de chacun des deux membres du complexe ID serait interdépendante, c'est-à-dire que la stabilité de cette modification post-traductionnelle sur FANCD2 dépend de celle sur FANCI, et vice versa. Finalement, des analyses ont permis de déterminer que la phosphorylation de certains résidus conservés de FANCI serait un événement nécessaire et suffisant pour permettre la monoubiquitination de FANCD2 et sa localisation au sein de foci. En effet, l'utilisation d'une construction de FANCI qui mime un état de phosphorylation constitutive mène à une monoubiquitination constitutive de FANCD2, à son association avec la chromatine et à la formation de foci. Par contre, lorsqu'on utilise ce mutant, les foci de FANCD2 semblent se localiser moins fréquemment avec ses partenaires habituels (tels que BRCA1, BRCA2, RAD51 et  $\gamma$ -H2AX) ce qui pourrait expliquer pourquoi la sensibilité à la MMC n'est pas entièrement rétablie par cette construction. La phosphorylation de FANCI serait donc le point de contrôle principal pour l'activité de FANCD2, bien que d'autres étapes, telles que la phosphorylation de FANCD2 (215), pourraient également être importantes.

Il a été proposé que les protéines FANCD2 et FANCI n'aient pas une grande affinité l'une pour l'autre en absence de dommages à l'ADN. Lorsque la cellule est exposée à divers types d'agents génotoxiques, ces deux protéines subiraient diverses modifications post-traductionnelles (phosphorylations et monoubiquitination) qui auraient pour effet d'augmenter leur affinité entre elles et envers la chromatine (236). Il est également possible que cette modification diminue l'affinité entre USP1 et FANCD2, ce qui inhiberait la déubiquitination (voir plus loin dans le texte) (244).



**Figure 3:** Interactions entre les protéines FANCD1, FANCD2, FANCD3 (Complexe I) et d'autres protéines (Complexe II, Complexe III) dans le contexte de la réparation d'un pontage et de l'arrêt du cycle cellulaire. 1) Détection du pontage et activation d'ATR. 2) Activation de la voie FANCD. 3) Relocalisation au niveau de la chromatine. 4) Ubiquitination du complexe ID permettant sa translocation au niveau du bris. 5) Réparation du pontage. FANCD1=BRCA2; FANCD2=BRIP1; FANCD3=PALB2; et FANCO=RAD51C.

#### 2.2.4. L'inactivation de la voie FANC

Il est important pour la cellule que la voie FANC soit inactive lors de la phase M pour éviter l'instabilité chromosomique qui pourrait être engendrée par la présence de structures de réparation non résolues. Il existe au moins trois mécanismes permettant clairement d'inactiver la voie FANC en phase M. Tout d'abord, la protéine FANCM est phosphorylée par Plk1, ce qui mène à sa polyubiquitination dépendante de  $\beta$ -TRCP puis à sa dégradation par le protéasome (245). De plus, le site consensus de phosphorylation de FANCM par Plk1 se retrouve dans la même région que le site de liaison avec FANCF, ce qui offre probablement un autre niveau d'inhibition de la voie FANC, avant même la dégradation de FANCM (231). Puisque FANCM est la seule protéine connue pour s'associer à la fois au complexe I en amont de l'étape d'ubiquitination du complexe ID et à l'ADN (207; 246; 247), sa dégradation est assurément un moyen efficace d'inhiber la voie de réparation. La protéine FANCG est une des cibles de phosphorylation de la protéine Cdc2 et cette modification semble être importante pour la localisation de FANCG en périphérie du noyau lors de la phase M (248). C'est probablement un niveau de contrôle supplémentaire pour s'assurer que le complexe I ne soit pas associé avec la chromatine lors de la phase M. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'une interaction directe entre FANCC et Cdc2 avait déjà été démontrée (249; 250). La protéine FANCE va également être dégradée suite à l'exposition à des agents génotoxiques (251). FANCE doit être phosphorylée par Chk1 pour que cette dégradation ait lieu (251). Puisque FANCE est le lien direct entre le complexe I et FANCD2, elle représente fort probablement un mécanisme important de rétro-inhibition de la voie FANC, du moins de l'étape de monoubiquitination de FANCD2.

D'autres mécanismes de régulation de la voie FANC ont été proposés, mais leur rôle exact demeure encore mal compris. Par exemple, un mécanisme de régulation négative d'UBE2T par FANCL a été proposé. En effet, l'auto-monoubiquitination d'UBE2T est favorisée par la présence de FANCL et cette modification inhibe l'activité d'UBE2T (237). L'impact réel de cette inhibition sur la voie FANC n'a par contre pas été démontré. La phosphorylation de FANCE par Chk1 précède sa dégradation de plusieurs heures et pourrait également avoir d'autres fonctions dans cette voie de réparation de l'ADN que de simplement constituer un signal pour sa dégradation (251). FANCA est phosphorylée sur plusieurs résidus, mais bien

qu'au moins une partie de ces phosphorylations semblent être importantes, leur (s) rôle (s) n'ont pas été élucidé (s) (212; 213; 252).

### **2.2.5. Le complexe III**

Les patients avec des mutations dans les gènes du complexe III, *FANCD1/BRCA2*, *FANCI/BRIP1*, *FANCN/PALB2* et *FANCO/RAD51C*, ont un phénotype AF. Par contre, l'ubiquitination de FANCD2 n'est pas compromise, ce qui laisse donc croire qu'ils agissent en amont de cette étape dans la réparation des pontages interbrins. Alors que les étapes menant à la formation du complexe I et à la mono-ubiquitination commencent à être bien comprises, ce n'est toujours pas le cas pour les étapes en aval de cette modification post-traductionnelle. De plus, il semblerait que ces trois protéines soient recrutées au site endommagé par un mécanisme distinct du complexe I (253).

La protéine FANCI semble avoir au moins deux rôles distincts dans la réparation des pontages interbrins: la stimulation de la recombinaison homologue et la promotion de la synthèse translésionnelle. Son rôle dans la réparation homologue nécessite son interaction directe avec BRCA1 (254). BRCA1 permettrait à FANCI d'interagir directement avec RPA (255), une autre protéine importante non seulement pour la recombinaison homologue, mais également pour la voie de réparation par excision de nucléotides (256). De plus, il a été démontré que des mutations dans le gène *FANCI* qui inactiveraient spécifiquement son interaction avec BRCA1 n'augmenteraient pas la sensibilité des cellules aux agents pontants car une autre voie de réparation des pontages interbrins indépendante de la recombinaison homologue serait alors favorisée (254). Cette voie indépendante de la recombinaison homologue impliquerait l'utilisation d'une polymérase capable de synthèse translésionnelle et nécessiterait une interaction directe entre FANCI et MLH1, un des membres du système de réparation des mésappariements (*Mismatch Repair*) (254).

La découverte qu'un des patients AF était porteur de mutations bi-alléliques dans le gène *BRCA2* a été un des points tournant dans la recherche sur cette maladie (172; 257). Il est important de mentionner que les mutations de ces patients sont hypomorphiques, car l'absence complète des deux allèles de ce gène est probablement létale au niveau embryonnaire. *FANCD1/BRCA2* interagit directement avec la protéine Rad51 et est

essentielle pour la localisation nucléaire de cette dernière ainsi que pour sa migration dans les foci de réparation des dommages à l'ADN (258; 259). En absence de BRCA2, Rad51 n'est pas en mesure de permettre l'invasion de la chromatide sœur par l'ADN simple brin, ce qui est une des étapes initiales essentielles à la réparation des dommages à l'ADN qui nécessite le mécanisme de recombinaison homologue. BRCA2 interagit également avec la protéine Plk1, protéine importante pour la dégradation de FANCM lors de la phase M. Finalement, la protéine FANCN est essentielle pour le bon fonctionnement de BRCA2. En absence de FANCN, BRCA2 ne migre pas vers les foci de réparation lors de dommages à l'ADN et la réparation par le mécanisme de recombinaison homologue ne peut pas avoir lieu correctement. De plus, FANCN serait une protéine adaptatrice qui interagit directement avec BRCA1 et BRCA2, permettant ainsi de faire le lien entre les deux.

Tout récemment, une équipe a déterminé qu'une famille avec un phénotype semblable à l'AF (mais dont les troubles hématopoïétiques ne se sont pas encore développés chez le patient le plus vieux, âgé de 10 ans) était porteuse de mutations hypomorphiques dans le gène *RAD51C* (260). *RAD51C* serait une protéine essentielle pour que *RAD50* puisse se localiser correctement dans les foci de réparation pour ainsi permettre la réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologue (261). Les auteurs qui ont proposé de nommer ce gène *FANCO* demeurent tout de même prudents. D'une part, ils ne parlent pas d'un phénotype AF chez la famille analysée, mais plutôt d'un phénotype semblable à l'AF (*Fanconi-like*). En fait, les auteurs ont noté la présence de malformations congénitales typiques de l'AF, mais le seul enfant encore en vie est âgé de 10 ans et n'a pas encore développé de troubles hématopoïétiques. Par contre, il arrive fréquemment que des patients AF n'aient pas développé de troubles hématopoïétiques à cet âge (262). De plus, comme leur étude ne comprend qu'une seule famille, mais que les mutations délétères ont été identifiées, les auteurs proposent donc de donner provisoirement le nom *FANCO* à ce gène, jusqu'à ce qu'une autre famille soit identifiée (260).

#### **2.2.6. Modèle de réparation des pontages interbrins**

La réparation des pontages interbrins semble avoir lieu principalement, voire exclusivement, lors de la phase S du cycle cellulaire (263; 264). Bien que les mécanismes

précis impliqués dans la réparation des pontages interbrins restent encore peu connus, tout particulièrement pour ce qui est du rôle précis de la voie FANC, certaines grandes lignes sont tout de même bien expliquées. La première étape serait la reconnaissance du pontage interbrin, suivie par une incision de part et d'autre du bris. Par la suite, la synthèse translésionnelle dépendante de Pol $\zeta$  serait importante pour remplir l'espace laissé par les incisions. Finalement, un mécanisme dépendant de la recombinaison homologue permettrait de remettre en marche la machinerie de réplication.

La réparation des pontages interbrins nécessite donc l'action coordonnée d'au moins trois voies de réparation de l'ADN distinctes: excision de nucléotide, synthèse translésionnelle et recombinaison homologue. En effet, l'inhibition des protéines impliquées dans ces voies mène à une hypersensibilité aux agents pontants de l'ADN (265). Il semblerait qu'un des rôles importants de la voie FANC serait d'agir à titre d'aiguilleur pour s'assurer que chaque voie de réparation soit recrutée dans le bon ordre. D'ailleurs, diverses protéines FANC sont directement impliquées dans les trois voies. Par exemple, il a été démontré qu'en absence de la forme ubiquitinée de FANCD2, l'étape initiale d'incision de part et d'autre du pontage interbrin était fortement diminuée (266). De plus, l'étape de synthèse translésionnelle dépend de la présence de FANCC (267) ainsi que de FANCA et FANCG (268) et est indépendante de FANCD2 et de FANCI (268). Finalement, FANCG et FANCD2 interagissent avec FANCD1/BRCA2 dans la recombinaison homologue. En effet, un des éléments clés de cette étape est la phosphorylation de FANCG au niveau de la Ser7 (269). Cette modification post-traductionnelle permettrait l'assemblage d'un sous-complexe composé minimalement des protéines FANCD1/BRCA2, FANCD2, FANCG et XRCC3. La forme phosphorylée de FANCG ne semble pas interagir avec le complexe I et la mono-ubiquitination de FANCD2 est faiblement diminuée lorsqu'un mutant ne pouvant pas être phosphorylé sur la Ser7 est utilisé. De plus, FANCD2 peut s'associer à ce complexe indépendamment de son ubiquitination. Ce sous-complexe agirait donc de manière indépendante du complexe I.

Le mécanisme d'action précis du complexe ID au niveau de la chromatine pour la réparation des pontages interbrins était peu connu jusqu'à tout récemment. Il semblerait qu'un des rôles importants de FANCD2 serait d'agir comme antagoniste de la protéine Ku70

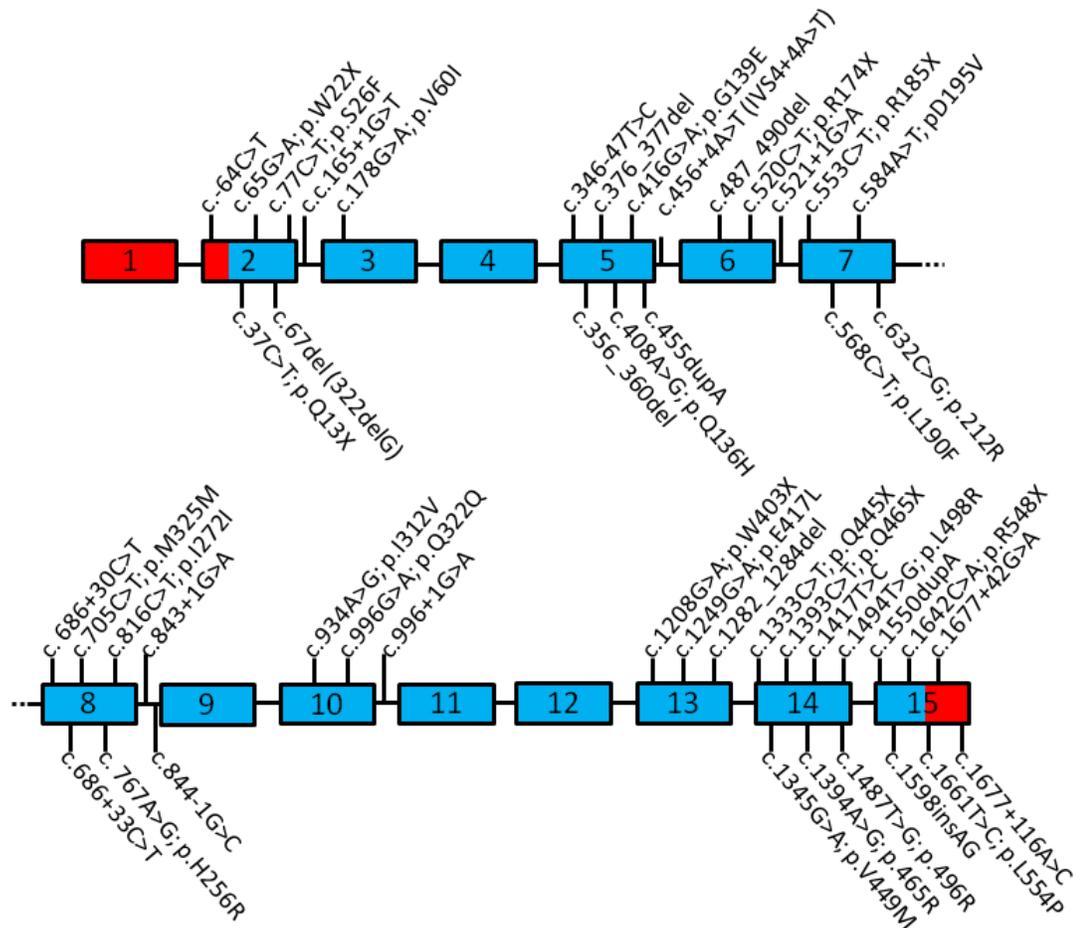
(270). Il permettrait ainsi au bris double brin, essentiel lors de la réparation des pontages interbrins, soit réparé convenablement par recombinaison homologue, et non par le mécanisme de *Non-Homologous End Joining* (270; 271). De plus, FANCD2 agit directement avec la protéine FAN1 (272-274). Bien que le rôle de cette dernière ne soit pas entièrement compris, il semblerait qu'elle soit essentielle pour les étapes finales de réparation par recombinaison homologue et son inactivation mène à un phénotype cellulaire typique des cellules FANC.

### 3. FANCC

#### 3.1. STRUCTURE ET LOCALISATION DU GÈNE *FANCC*

Le gène *FANCC* est composé de 15 exons (NM\_000136). La taille des exons varie entre 53 et 204 nucléotides dans les régions codantes. La séquence codante du gène contient 1677 nucléotides codant pour 558 acides aminés et menant à la production d'une protéine d'un poids moléculaire d'environ 63 kDA. L'exon 1, entièrement non-codant, n'était pas connu lors des analyses initiales du gène. Il y a donc un décalage entre le nom de certaines mutations rapportées et la séquence réelle. Pour rapporter les mutations, la nomenclature proposée a été utilisée et le nom de la mutation le plus fréquemment utilisé est inscrit entre parenthèses pour les mutations les plus fréquentes.

Au moins 47 polymorphismes ont été rapportés dans les régions transcrites de *FANCC* et



**Figure 4:** Mutations rapportées dans les régions codantes du gène *FANCC* et dans les régions introniques en périphérie. Les boîtes représentent les exons et les lignes les introns. En rouge; régions transcrites non traduites. En bleu; région codante.

dans les régions introniques en périphérie (voir figure 4). Vingt-sept variants ont été retrouvés chez des patients AF et ont été rapportés dans la littérature, parmi lesquels seize semblent être délétères (tableau 3). Les mutations c.465+4A>T (IVS4+4A>T) et c.67del (322delG) représentent environ 90% des mutations retrouvées chez les individus AF du sous-groupe de complémentation C (275). c.465+4A>T est généralement associé à un phénotype sévère alors que c.67del est associé à un phénotype moins sévère (276; 277). Le variant p.S26F est considéré comme étant un polymorphisme non-délétère (278-282) mais il est tout de même retrouvé environ quatre fois plus fréquemment chez les cas de LMA sporadiques que chez les contrôles (278; 279).

Plusieurs transcrits alternatifs ont également été rapportés. On note tout d'abord la présence d'un exon 1 alternatif dans la région 5' non-codante ainsi que trois variants dans la région 3' non traduite qui seraient probablement le résultat de l'utilisation de sites de polyadénylation alternatifs (165). Deux autres événements fréquemment rencontrés sont l'épissage de l'exon 7 et de l'exon 14 (respectivement exon 6 et exon 13 (283)) qui conservent le cadre de lecture. Bien que ces deux épissages soient retrouvés en tout temps, aux moins deux mutations sont associées avec l'exclusion constitutive de l'exon 7; p.R174X à la fin de l'exon 6 (284) et p.R185X dans l'exon 7 (283). Bien qu'aucune étude ne l'ait formellement démontré, il est fort probable que la présence d'un codon stop prématuré mène à la dégradation des ARNm dans lesquels l'exon 7 est présent. Pour p.R174X, étant donné que le codon touché chevauche l'exon 6 et l'exon 7, l'épissage de ce dernier permet de changer le codon Stop (UGA) pour un codon Trp (UGG). Les variants p.Q445X et p.Q465X, situés dans l'exon 14, mènent probablement à un résultat équivalent, bien qu'aucune étude ne l'ait démontré. Outre ces épissages, il a été démontré que deux autres mutations induisent un épissage alternatif aberrant de *FANCC*; c.465+4A>T mène à l'exclusion de l'exon 5 (285) et est associé à un phénotype sévère chez les juifs ashkénazes (280) et un phénotype moins sévère chez les Japonais (96) alors que c.996G>A mène à l'exclusion de l'exon 10 (286; 287). De plus, des analyses *in silico* prédisent que le variant c.844-1G>C mènerait à l'exclusion de l'exon 9 (286) et une étude chez la souris a démontré que la perte de cet exon mène à l'absence totale de la protéine *FANCC* (288).

La perte des deux premiers exons codant (exon 2 et 3) a été rapportée chez un patient bien que la cause de cet ARNm aberrant ne soit pas connue (289). Puisque la première méthionine pouvant être utilisée dans ce transcrit se situe au début de l'exon 6, on s'attend à ce que ce variant confère un phénotype sévère. Finalement, une méthionine en position 55 et située dans l'exon 2 peut être utilisée et serait responsable de la forme de FANCC de 50 kDA nommée FRP50 (275; 290). Cette utilisation d'un codon de départ alternatif expliquerait pourquoi les mutations c.67del (322delG) et p.Q13X situées en amont de la méthionine 55 ne causeraient pas un phénotype sévère malgré le fait qu'elles mèneraient potentiellement à la production de protéines sévèrement tronquées (275; 280).

Il semblerait que l'ARNm de *FANCC* se retrouve dans tous les types cellulaires analysés, quoique les niveaux puissent varier grandement d'un type cellulaire à un autre (291). De manière générale, on retrouve une plus grande quantité d'ARNm de *FANCC* dans les cellules progénitrices et les cellules qui se divisent rapidement (292; 293). Les analyses d'embryons de souris à diverses étapes de leur développement a permis de déterminer qu'il y a une bonne corrélation entre l'expression de *FANCC* lors du développement et le phénotype des patients AF (291; 294). En effet, *FANCC* est plus fortement transcrit dans les précurseurs des lignées osseuses et hématopoïétiques (291; 294). Bien que la quantité totale d'ARNm de *FANCC* varie d'un type cellulaire à l'autre, son niveau demeure stable au sein d'une même cellule: l'expression de l'ARNm de *FANCC* ne semble pas être modulée lors du cycle cellulaire (295) , par la concentration en oxygène (296) ou lorsque les cellules sont traitées avec de la MMC, du DEB, des IR, du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de la chaleur, du TGF- $\beta$  ou de l'IFN- $\gamma$  (297). Les niveaux protéiques de FANCC sont par contre modulés tout au long du cycle cellulaire. La quantité de FANCC commence à augmenter en phase S, atteint son niveau maximal lors de la phase G2/M et décline en phase M (250).

Les premières études qui se sont penchées sur la localisation de la protéine FANCC avaient conclu que cette dernière était très fortement (voir même exclusivement) localisée dans la fraction cytoplasmique des cellules (290; 298-300). À ce moment, la majorité des groupes de complémentation étaient encore inconnus et le rôle des protéines FANC était un mystère. Puisque la seule protéine FANC analysée avait une localisation cytoplasmique, il semblait peu probable qu'elle soit directement impliquée dans la réparation des dommages

à l'ADN. De nombreux articles ont également démontré que FANCC pouvait interagir avec diverses protéines dans ce compartiment (153; 154; 301; 302). Par contre, d'autres études ont par la suite démontré que la localisation nucléaire de FANCC était importante pour son rôle dans la protection contre les pontages interbrins (303; 304). L'utilisation de méthodes plus sensibles pour détecter la localisation de FANCC a permis de confirmer qu'une certaine proportion de FANCC se retrouvait bel et bien dans le noyau (305; 304). Finalement, la protéine FANCC co-localise avec la protéine nucléaire FAZF au sein de foci (306).

La protéine FANCC ne possède pas de signal de localisation nucléaire. Des études ont démontré que la présence de FANCC dans le noyau favorise la localisation nucléaire de FANCA et *vice versa* (212; 307). Par contre, c'est la protéine FANCE qui est essentielle et suffisante pour permettre l'accumulation de FANCC dans le noyau (224; 308). Il est tout de même important de mentionner que la localisation cytoplasmique de FANCC est également essentielle pour rétablir une sensibilité normale aux agents causant des pontages interbrins dans l'ADN (300). On ne sait pas encore si une des étapes de la réparation de pontages interbrins nécessite la présence de FANCC dans le cytoplasme ou bien si son rôle dans ce compartiment serait plutôt de diminuer la toxicité des agents pontants (154). Puisque FANCC subit une dégradation protéolytique par le protéasome (295), sa dégradation pourrait être une étape importante dans la réparation de l'ADN.

**Tableau 3:** Variants de *FANCC* retrouvés chez les patients atteints d'anémie de Fanconi rapportés dans la littérature.

Variants	Protéine	Exons/Introns	Refseq	Délétère?
c.37C>T	p.Q13X	2	ND	Oui (309; 280; 281)
c.65G>A	p.W22X	2	ND	Oui (281; 286)
c.67del (322delG)	-	2	-	Oui (165; 290; 280; 286; 287; 275; 277)
c.77C>T	p.S26F	2	rs1800361	Non (280; 281; 278; 279; 282)
C.356_360del	-	5	-	Oui (286)
c.376_377del	-	5	-	Oui (286)
c.408A>G	p.Q136Q	5	rs1800360	Non (281)
c.416G>A	p.G139E	5	rs1800362	Non (280; 281; 285; 278; 279)
c.455dupA	-	5	-	Oui (286; 287)
c.456+4A>T (IVS4+4A>T)	-	5	ND	Oui (290; 280; 281; 285; 275; 276)
c.520C>T	p.R174X	6	ND	Oui (284)
c.553C>T	p.R185X	7	ND	Oui (280; 281; 286; 283)
c.568C>T	p.L190F	7	rs1800364	Non (281)
c.584A>T	p.D195V	7	rs1800365	? (280; 279; 282; 310; 211)
c.632C>G	p.P212R	7	ND	Non (278; 279)
c.686+30C>T	-	7	rs1800363	Non (281; 279)
c.844-1G>C	-	8	ND	Oui (286)
c.934A>G	p.I312V	10	rs1800366	Non (281; 279)
c.996G>A	p.Q322Q	10	ND	Oui (286; 287)
c.1345G>A	p.V449M	14	rs1800367	Non (281; 279; 282)
c.1390C>T	p.E464X	14	ND	Oui (286; 287)
c.1394A>G	p.Q465R	14	rs1800368	Non (281)
c.1494T>G	p.L496R	14	ND	Oui (281)
c.1550dupA	-	15	-	Oui (312)
c.1642C>T	p.R548X	15	ND	Oui (309; 281; 286; 310)
c.1661T>C	p.L554P	15	ND	Oui (165; 313; 314; 310)
c.1677+42G>A	-	15	rs7029888	Non (281)

### 3.2. FANCC, DOMMAGES OXYDATIFS ET APOPTOSE

Il est connu depuis longtemps que les cellules des patients AF prolifèrent mieux en culture en conditions hypoxiques (141-144). Plus récemment, de nombreux liens ont pu être établis entre la protéine FANCC et plusieurs voies impliquées dans la protection contre les agents pouvant causer des dommages oxydatifs. Par exemple, une interaction directe a pu être démontrée entre les acides aminés 8 à 149 de FANCC et le NADPH cytochrome P450 réductase (RED) (154). Cette interaction aurait comme conséquence d'inhiber l'activité de RED et de diminuer la formation de composés réactifs de l'oxygène (154). De plus, les cellules déficientes en FANCC entrent plus facilement en apoptose lorsqu'elles sont exposées à des composés réactifs de l'oxygène (ROS: *Reactive Oxygen Species*) (145; 315). Pour protéger de l'apoptose, FANCC interagit avec la protéine GSTP1 et empêche que cette dernière soit oxydée et donc inactivée par la formation de ponts disulfures (153). Une des fonctions de FANCC dans le cytoplasme serait donc d'agir en tant qu'agent réducteur. D'ailleurs, la sensibilité à l'apoptose dans des cellules FANCC<sup>-/-</sup> peut être fortement diminuée autant par le traitement avec des antioxydants (142; 316) que par la surexpression de la thiorédoxine (140; 157; 317; 318). La concentration élevée en ROS dans les cellules mène à la surproduction de TNF- $\alpha$ , qui pourrait à son tour être associée à l'apoptose (319). L'inverse est également vrai; les dommages oxydatifs sont impliqués autant pour l'apoptose induite par l'exposition à du TNF- $\alpha$  et/ou de l'INF- $\gamma$  (315; 320; 321) que pour celle qui survient suite à un traitement avec des agents pontants (139). Le traitement des cellules déficientes en FANCC avec TNF- $\alpha$  ou de l'INF- $\gamma$  induit en outre une augmentation anormale de la concentration de ROS (320; 321).

Les cellules des patients du sous-groupe de complémentation FANCC sont hypersensibles à l'apoptose induite par l'exposition au TNF- $\alpha$  (320), à l'INF- $\gamma$  (322), ainsi qu'au MIP-1 $\alpha$  (323). En effet, le traitement des cellules hématopoïétiques indifférenciées avec du TNF- $\alpha$  ou de l'INF- $\gamma$  augmente la transcription du récepteur Fas (Fas-R), ce qui aurait pour effet de les sensibiliser à l'apoptose (324). Cette production de Fas-R semble d'ailleurs exacerbée dans les cellules FANCC<sup>-/-</sup> (322; 325). Par contre, la voie classique d'activation de l'apoptose induite par la molécule Fas qui nécessite l'activation de STAT1 est fortement

inactivée dans les cellules FANCC<sup>-/-</sup> (326). FANCC interagit directement avec STAT1 et est nécessaire pour son recrutement au niveau du récepteur de l'IFN- $\gamma$  (301).

Il semblerait donc que ce soit une voie alternative qui soit impliquée. En absence de FANCC, la protéine PKR était constitutivement activée et c'est cette activation qui rend les cellules beaucoup plus sensibles à l'apoptose, surtout lors de l'exposition au TNF- $\alpha$  et à l'IFN- $\gamma$  (326). Dans les cellules sauvages, PKR n'est pas constitutivement activée et lorsque les cellules sont exposées au TNF- $\alpha$  et à l'IFN- $\gamma$ , FANCC va s'associer avec PKR puis va permettre le recrutement d'Hsp70 (327). Cette dernière serait la responsable de l'inactivation de PKR et donc de la résistance aux signaux proapoptotiques induits par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . Pour qu'Hsp70 puisse inhiber PKR, il faut que FANCC se dissocie de PKR et cette étape est dépendante de la présence de FANCA et de FANCG. En effet, dans les cellules FANCA<sup>-/-</sup> et FANCG<sup>-/-</sup>, FANCC est fortement associée à PKR, menant à son activation constitutive (328). p53 aurait également un rôle important dans cette voie, car on retrouve une plus grande quantité de p53 dans les cellules FANCC<sup>-/-</sup> et son inactivation protège contre l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  (329).

De plus, des analyses ont pu démontrer que FANCC agit dans deux voies distinctes pour la réparation des pontages interbrins et pour la protection contre l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  (302). Des mutations dans un domaine conservé de FANCC (S249A et E251A) augmentent spécifiquement la sensibilité des cellules à l'apoptose, en empêchant l'interaction entre FANCC et Hsp70, sans affecter la sensibilité des cellules au traitement avec des agents pontants (302). Les mêmes mutations empêchent également l'interaction avec STAT1 (277). À l'inverse, la mutation 322delG confère une hypersensibilité aux agents pontants et à l'apoptose induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (145), mais pas celle induite par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  (277). Cette mutation est retrouvée chez des patients AF dont le phénotype est moins sévère (277).

En résumé, l'absence de FANCC rend les cellules hypersensibles à de nombreux stimuli de l'apoptose. Les voies menant à la production des ROS ainsi qu'à leur détoxification dans les cellules semblent être intimement liées aux voies de signalisation apoptotiques induites par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . La protéine FANCC ressort donc comme étant un joueur majeur dans ces nombreuses voies, ne serait-ce que de par ses nombreux partenaires d'interaction.

### 3.3. MODÈLES MURINS

Les modèles murins dans lesquels le gène *FANCC* a été inactivé récapitulent seulement une partie du phénotype AF. En effet, bien qu'elles soient hypersensibles aux agents pontants de l'ADN, il n'y a pas présence de défauts congénitaux importants ni de développement de défaillance de la moelle osseuse menant à la pancytopenie, du moins lors de la première année de vie de souris (288; 330). Le nombre de cellules progénitrices dans la moelle osseuse est tout de même plus bas que celui retrouvé pour les souris sauvages (331). Lorsque ces souris sont traitées avec des agents pontants de façon chronique et à des doses qui n'affectent pas les souris sauvages, elles développent une défaillance de la moelle osseuse semblable à celle des patients AF (332). De plus, les souris *FANCC*<sup>-/-</sup> sont également sensibles à l'apoptose induite par le traitement avec de l'IFN- $\gamma$  (333).

Les souris *FANCC*<sup>-/-</sup> qui sont également déficientes pour le gène *Sod1*, impliqué dans la détoxification des ROS, ont une baisse importante des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse et dans la circulation sanguine (334). Ce modèle murin laisse donc croire que l'accumulation de ROS pourrait être en lien avec le phénotype AF, du moins pour le sous-groupe de complémentation C. Les souris *FANCC*<sup>-/-</sup> ont également été croisées avec des souris surexprimant le TNF- $\alpha$  (325). Ce double mutant a un phénotype plus près de ce qui est observé chez l'humain que le simple mutant *fancc*. De plus, chez la souris *FANCC*<sup>-/-</sup>, l'exposition chronique à du TNF- $\alpha$  favorise le développement de leucémies (150).

Pour l'instant, le seul modèle murin qui semble récapituler entièrement les caractéristiques des patients AF est le double mutant *FANCC*<sup>-/-</sup> et *FANCG*<sup>-/-</sup> (335). Il semble donc évident que les protéines du complexe I, ou du moins FANCC et FANCG ont un rôle important dans le phénotype de la maladie qui est indépendant de la voie FANC-BRCA classique. À cet effet, il est également intéressant de mentionner que le gène *FANCC* humain n'est pas capable de compléter entièrement le phénotype observé chez les souris *FANCC*<sup>-/-</sup>: les souris demeurent sensibles aux effets des agents pontants de l'ADN et présentent de l'instabilité chromosomique alors qu'elles ne sont plus hypersensibles aux endotoxines telles que les lipopolysaccharides (336).

### 3.4. INTERACTION ENTRE FANCC ET DES PROTÉINES NON-FANC

En plus de son interaction avec les protéines RED, STAT1, PKR, GSTP1 et Hsp70 mentionnées dans les sections précédentes, FANCC interagit également avec une panoplie d'autres protéines impliquées dans divers mécanismes cellulaires en lien avec la stabilité chromosomique. Par exemple, une étude a permis de déterminer que les résidus 103 à 308 de FANCC sont essentiels pour que l'interaction directe entre FANCC et GRP94 ait lieu (337). En absence de la protéine GRP94, les niveaux protéiques de FANCC sont plus bas qu'à la normale et les cellules sont sensibles à la MMC (337). Cette interaction serait donc importante pour la stabilité de FANCC.

On note également qu'une interaction directe entre FANCC et le facteur de transcription FAZF a pu être démontrée (306). FAZF est homologue à PLZF impliquée dans certains cas de leucémies promyélocytiques aiguës par sa fusion avec le récepteur de l'acide rétinoïque (338). La protéine FAZF aurait un rôle dans la différenciation des cellules hématopoïétiques (339) et des ostéoblastes (340). Cette interaction semble donc pertinente avec une partie du phénotype des patients AF.

Les acides aminés 500 à 558 de FANCC interagissent directement avec la protéine Cdc2 (250). De plus, les niveaux protéiques de FANCC varient au long du cycle cellulaire et cette variation corrèle avec l'activité de Cdc2 (250). Puisque Cdc2 est essentielle pour l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M, cette interaction avec FANCC pourrait expliquer en partie les problèmes de progression du cycle cellulaire observé pour les cellules FANC. Dans les cellules déficientes en FANCC, le traitement avec de petites doses de MMC mènent à l'inactivation persistante de Cdc2 alors que les mêmes doses mènent à une inactivation transitoire dans les cellules sauvages (249). De plus, en phase G2-M, Cdc2 est connue pour phosphoryler la protéine FANCG, menant à son inactivation et à sa localisation en périphérie du noyau pour la phase M (248). Cette interaction entre FANCC et Cdc2 pourrait donc également être importante pour l'inactivation de la voie FANC lors de la phase M, permettant ainsi d'éviter la formation d'intermédiaires de réparation lors de la division cellulaire pouvant potentiellement induire de l'instabilité chromosomique.

La protéine FANCC, ainsi que FANCA et FANCG, co-immunoprécipite avec l'alpha spectrine (341). Cette protéine se retrouve au sein des foci de réparation suite à des

dommages à l'ADN avec des agents créant des pontages interbrins (342). Elle jouerait probablement un rôle d'échafaudage au site de dommage à l'ADN, ce qui permettrait d'accélérer le recrutement des protéines de réparation. En plus des protéines FANC, on retrouve également un grand nombre de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN en association avec l'alpha spectrine: XPR, RPA, TFIIH, HHR23B, ERCC1, XPF et PCNA (341). L'inactivation de l'alpha spectrine par l'utilisation d'ARNi spécifique mène à un phénotype cellulaire semblable à celui observé dans les cellules des patients AF, c'est-à-dire de l'instabilité chromosomique et une hypersensibilité aux agents pontants (343).

Une étude qui a évalué les partenaires d'interaction de diverses protéines FANC à grande échelle a permis de trouver plusieurs partenaires d'interaction de FANCC jamais mentionnés auparavant. On note HOXA10, CA150 et Fte-1 (régulation de la transcription; Zwint-1 (modification de la chromatine); Hsp90 et HSPA8 (réponse au stress); l'inhibiteur d'antizyme (stabilité de la chromatine); FATRX et ATPase6 (métabolisme oxydatif); la sous-unité Delta du complexe adaptine (fonction de transporteur dans le cytoplasme) et; USP14 (modifications secondaires). L'impact physiologique réel de ces interactions n'a pas été analysé dans des études indépendantes. Par contre, elles semblent toutes démontrer que FANCC pourrait avoir un rôle important dans de nombreux mécanismes cellulaires pouvant affecter la stabilité chromosomique.

#### 4. PROBLÉMATIQUE DE L'ÉTUDE PRÉSENTÉE: ANALYSES DU GÈNE CANDIDAT *FANCC*

Comme il a été mentionné dans la section 1, la stratégie à utiliser pour découvrir de nouveaux gènes de susceptibilité varie selon le type de variant qu'on souhaite retrouver. En effet, pour des gènes de forte pénétrance avec une faible fréquence allélique dans la population, il est recommandé de réaliser des études de ségrégation. Par contre, depuis la découverte des gènes *BRCA1* et *BRCA2*, cette méthode n'a permis l'identification que de quelques gènes qui n'expliquent qu'une faible proportion des cas de cancer du sein. À l'inverse, lorsqu'on recherche des gènes de faible pénétrance ayant une fréquence allélique élevée, il est primordial d'utiliser d'énormes cohortes (plus de 10 000 individus) pour faire des études d'associations à l'échelle génomique. Finalement, en ce qui concerne l'étude présentée au Chapitre 1, l'approche du reséquençage de gènes candidats a été favorisée. Cette approche est la plus efficace pour la découverte de gènes de susceptibilité peu fréquents dans la population et conférant une augmentation modérée du risque.

La sélection de la cohorte à analyser est tout particulièrement importante dans ce type d'étude. En effet, des études ont démontré qu'il était possible de réduire considérablement la taille de la cohorte si les individus sélectionnés proviennent de famille à risque élevé (22). L'avantage d'utiliser de telles familles, contrairement à des cas de cancer du sein sélectionnés dans la population en général, est de limiter l'impact des facteurs de risque environnementaux. Les nombreux cas de cancers retrouvés au sein d'une même famille ont donc beaucoup plus de chance d'être expliqués par des facteurs héréditaires.

Dans le cas de cette étude, la sélection des familles repose sur des critères très stringents pour tenter d'enrichir au maximum les facteurs génétiques. Pour faire partie de l'étude, les cas doivent provenir de familles chez lesquelles 1) au moins 3 cas de cancer du sein ont été diagnostiqués avant l'âge de 65 ans, 2) au moins deux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués avant 65 ans si un des cas l'était avant l'âge de 45 ans ou 3) si on retrouve une forte histoire familiale de cancer du sein et/ou de l'ovaire (par exemple: fille, mère et grand-mère) (344). De plus, les cas avaient été préalablement analysés pour vérifier si des mutations délétères pouvaient être présentes dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (33). C'est donc en utilisant ces critères qu'il a été possible de former une cohorte d'environ 100 cas de

provenance canadienne-française à risque élevé, ne faisant pas partie de la même famille et chez lesquelles on ne retrouve pas de mutations dans *BRCA1* ou *BRCA2*. Dans le but de vérifier la fréquence allélique des variants retrouvés chez les cas avec la fréquence allélique dans notre population canadienne-française en général, une cohorte d'environ 100 femmes non atteintes de cancer du sein a été sélectionnée.

Tel que mentionné dans les sections 2 et 3 de ce document, les gènes appartenant à la famille de l'AF sont des candidats intéressants d'une part parce que des mutations bialléliques dans le gène *BRCA2* sont responsables du sous-type D1 de l'AF, mais également parce que de nombreuses interactions directes ont pu être démontrées entre les gènes *BRCA1* et *BRCA2* et les gènes Fanconi, notamment entre *BRCA1* et *FANCA* (345), *BRCA1* et *FANCI/BRIP1* (346), *BRCA2* et *FANCD2* (241), *BRCA2* et *FANCG* (347) ainsi que *BRCA2* et *FANCN/PALB2* (348). En plus d'être un membre essentiel au bon fonctionnement de la voie FANC-BRCA, *FANCC* se démarque des autres protéines FANC par sa localisation cellulaire, qui est très majoritairement cytoplasmique. Au sein de ce compartiment, *FANCC* serait importante pour plusieurs mécanismes cellulaires pouvant potentiellement être impliqués dans l'étiologie des cancers dont la protection contre l'apoptose (326-328), de la production de ROS (154) et la protection contre ces derniers (153). De plus, c'est la seule protéine FANC en amont de la mono-ubiquitination du complexe ID qui a été suggérée comme pouvant augmenter le risque de développer un cancer du sein (349). C'est donc un candidat tout particulièrement intéressant pour la recherche de variants pouvant influencer la susceptibilité de développer un cancer du sein dans la population canadienne-française.

Le séquençage complet des régions codantes devrait permettre l'identification de variants de séquence potentiellement délétères et la comparaison de la fréquence allélique retrouvée chez les cas comparativement à la fréquence allélique de la cohorte de femmes non atteintes devrait permettre de vérifier s'il y a une association entre la présence d'un polymorphisme et l'augmentation ou la diminution du risque de développer un cancer du sein. De plus, étant donné que de nombreuses variations dans l'ARNm de *FANCC* ont été rapportées précédemment dans la littérature (165; 283-287), l'analyse plus poussée de l'ADNc devrait

permettre l'identification de variants d'épissage pouvant potentiellement être associés avec le cancer du sein.

Les objectifs de mon projet de maîtrise étaient donc 1) de répertorier les polymorphismes présents dans les régions codantes de *FANCC* et dans les régions introniques en périphérie chez des femmes atteintes provenant de familles à risque élevé pour le cancer du sein afin de déterminer les effets potentiels sur la fonction de FANCC par des analyses *in silico* et de comparer leurs fréquences par rapport à une cohorte de femmes non atteintes. Il fallait également 2) définir les événements d'épissage alternatif touchant *FANCC* par l'analyse de l'ADNc et tenter d'en évaluer l'impact sur la fonction de la protéine.

# CHAPITRE 1

**Characterization of sequence variations in the *FANCC* gene on breast cancer susceptibility in affected French Canadian women from families with a high risk of breast cancer.**

Charles Joly Beuparlant<sup>1</sup>, Yvan Labrie<sup>1</sup>, Christopher St-Laurent Pedneault<sup>1</sup>, Geneviève Ouellette<sup>1</sup>, INHERIT BRCA<sup>s</sup>\* and Francine Durocher<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Cancer Genomics Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Department of Molecular Medicine, Laval University, Québec, G1V 4G2, Canada;

\*Other members of INHERIT BRCA<sup>s</sup> involved in clinical aspects of this study are listed in the Appendix.

\*\*Corresponding author:

Dr Francine Durocher

Cancer Genomics Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Department of Molecular Medicine, Laval University

2705 Laurier Boulevard, T2-53

Québec City, Québec,

Canada, G1V 4G2

Tel: (418)-654-2296

Fax: (418)-654-2278

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

**Running title:** *FANCC* variants in French Canadian BOC families.

**Keywords:** Breast cancer susceptibility, *FANCC* variants, haplotypes

## Résumé

**OBJECTIFS:** Beaucoup d'attention a été accordée aux gènes de la famille de l'anémie de Fanconi en tant que gènes candidats intéressants pour expliquer la susceptibilité génétique au cancer du sein. En effet, des mutations bialléliques dans le gène *BRCA2* sont responsables du sous-groupe D1 de l'anémie Fanconi, et des mutations dans les gènes *BRIP1/FANCI*, *PALB2/FANCD1* et *RAD51C/FANCD2* sont maintenant reconnues comme étant responsables de l'augmentation de la susceptibilité à développer le cancer du sein. Le but de cette étude est donc d'évaluer la contribution des variations génétiques du gène *FANCC* pour la susceptibilité et l'étiologie du cancer du sein, puisqu'un risque de développer un cancer du sein plus élevé a été rapporté chez les grands-mères des familles porteuses de mutations dans le gène *FANCC*.

**MÉTHODES:** La totalité des régions codantes ainsi que les régions introniques à proximité ont été séquencées dans une cohorte de ~100 femmes canadiennes françaises à risque élevé ayant développé un cancer du sein et chez ~100 femmes non atteintes provenant de la même population pour déterminer la fréquence allélique des variants identifiés. Le séquençage et l'analyse de l'ADNc ont été réalisés pour évaluer l'expression des formes alternatives d'épissage de *FANCC*.

**RÉSULTATS:** Le séquençage a mené à l'identification de 6 variants de séquence: un des variants codant est situé dans l'exon 8, trois sont situés dans les régions introniques et deux dans les régions transcrites non traduites. De plus, au moins trois événements d'épissage distincts ont pu être observés suite au séquençage de l'ADNc; un menant à l'exclusion de l'exon 7 (*FANCCΔ7*), un autre à l'exclusion de l'exon 14 (*FANCCΔ14*) ainsi qu'un troisième, jamais rapporté, qui est causé par l'insertion d'un fragment intronique entre l'exon 4 et l'exon 5. Les deux délétions d'exon ne changent pas le cadre de lecture, contrairement à l'insertion, qui pourrait mener à la production d'une protéine tronquée manquant une partie de l'exon 5 et tous les exons subséquents. Les analyses par RT-PCR ont démontré que *FANCCΔ7* semble être exprimé dans la majorité des tissus testés. *FANCCΔ7* est également présent dans les cellules traitées avec de la puromycine,

démontrant ainsi que ce transcrit ne serait pas affecté par le mécanisme de dégradation des ARNm non-sens.

CONCLUSIONS: Aucune mutation délétère pouvant être associée avec la susceptibilité au cancer du sein n'a pu être clairement identifiée dans le gène *FANCC*. Néanmoins, des analyses au niveau protéique sont en cours pour mieux comprendre l'impact de *FANCCΔ7* sur la localisation de la protéine, sur les interactions protéine/protéine et sur l'efficacité de la réparation de l'ADN suite à des traitements avec des agents qui endommagent l'ADN.

## Abstract

**OBJECTIVE:** Recent attention has been drawn toward the Fanconi Anemia gene family as attractive candidates for breast cancer susceptibility genes. Indeed, biallelic mutations in *BRCA2* are responsible for the subset D1 of Fanconi Anemia, and mutations in both the *PALB2/FANCN* and *BRIP1/FANCF* genes are now known to be responsible for an increase in the risk of developing breast cancer. The goal of this study is thus to evaluate the possible role of *FANCC* genomic variations in breast cancer susceptibility and etiology, as a higher risk of breast cancer has been reported for grandmothers of families carrying a *FANCC* alteration.

**METHODS:** Complete sequencing of the entire coding and flanking intronic regions was performed on a cohort of ~100 high-risk French Canadian women affected with breast cancer and ~100 healthy women from the same population to assess the allele frequency of each identified variant. Sequencing and analysis of cDNA material was also performed to assess the expression of *FANCC* alternative splicing events.

**RESULTS:** The complete sequencing led to the identification of 6 sequence variants: one coding variation located in exon 8, three in intronic sequences and two in untranslated regions. In addition, at least three distinct splicing events were observed following the sequencing of the cDNA; one leading to the skipping of exon 7 (*FANCCΔ7*), another to the skipping of exon 14 (*FANCCΔ14*) and a third one, never reported before, that is caused by the insertion of an intronic fragment between exon 4 and exon 5. While both exon deletions do not alter the open reading frame, the insertion does, and this could result in a truncated protein lacking part of exon 5 as well as all the subsequent exons. The RT-PCR analyses showed that *FANCCΔ7* seems to be expressed in the majority of the samples tested. *FANCCΔ7* is also present in puromycin-treated cells, showing that this transcript does not seem to be subject to nonsense-mediated mRNA decay.

CONCLUSIONS: So far, no *FANCC* deleterious mutations have been identified as to be associated with an increase in breast cancer susceptibility. Nevertheless, analyses at the protein level are underway to better understand the impact of *FANCCΔ7* on the localization of the protein, on protein/protein interactions and on DNA repair efficiency following exposure to DNA damaging agents.

## Introduction

Less than 25% of high risk breast cancer family carries pathogenic mutations in known breast cancer susceptibility genes (1). It is thus obvious that many unknown risk alleles remain to be identified, at least in those families with a clear pattern of inheritance. The remaining susceptibility alleles will most likely cover a wide range of penetrance and frequency in the population. A candidate gene approach targeting genes known to interact with *BRCA1* and *BRCA2* or associated with DNA repair pathways is one of the best ways to identify rare alleles with a moderate to high penetrance.

Fanconi anemia (FA) gene family comprises 13 distinct complementation groups which have been described by cell fusion, cell transduction studies or protein complex purification (FA-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M and -N) (2-15). Each FA cell group presents a defect in a distinct gene which can be characterized by their sensibility to interstrand cross-linking (ICL) agents to determine if two distinct cell lines belong to the same group. It is noteworthy that of the four genes recently associated with an increase susceptibility to breast cancer, four are FA genes: *FANCD1/BRCA2*, *FANCI/BACH1/BRIP1*, *FANCN/PALB2*, and *FANCO/RAD51C* (16-21). Moreover, a recent study conducted with 944 family members being part of the International Fanconi Anemia Registry revealed an increased risk of breast cancer among grandmothers carriers of FANCC mutations (22).

FA proteins not only interact with each other but also work in a network of processes implicated in the maintenance of genome integrity during DNA replication and following some types of DNA damage. Following DNA damage by ionizing radiations (IR) or ICL agents, FANCC protein in association with FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L, -M, FAAP24, and FAAP100 forms a complex which acts as a signaling part to target and regulate FANCD2 accumulation to nuclear foci by monoubiquitination on Lys561 (23-26). Therefore activated FANCD2 associates with chromatin and colocalizes in DNA damage-induced S-phase foci with DNA repair response proteins such as BRCA1, FANCD1/BRCA2, FANCI, RAD51, PCNA and NBS1 (15). In response to ICL damage, this FA/BRCA network activates and coordinates the needed DNA repair mechanisms

namely, homologous recombination (HR), nucleotide excision repair (NER) and translesion DNA synthesis (TLS) repair pathways (15).

FANCC is a crucial component in the upstream FA nuclear core complex. FANCC-deficient cells show a disabled S-phase checkpoint response specific to cross-link damage, and also likely have a defect in an ATR-dependent checkpoint, as demonstrated using HSC536N cells (27). FANCC (localized in both the cytoplasm and nucleus) is implicated in several other cytoplasmic functions such as JAK/STAT and apoptotic signaling (28-32). Although FANCC does not show interactions with FANCD1/BRCA2, many proteins have been shown to interact with FANCC. These include transcription regulators (e.g. HOXA10), heat shock proteins (e.g. HSP90), chromatin-related proteins (e.g. ZWINT1), the cell cycle protein Cdc2, the structural protein Alpha spectrin, cytokin-related proteins (e.g. Stat1), proteins involved in oxidative metabolism (e.g. GSTP1) as well as transporters such as SNX3 and Delta adaptin (33). Moreover FA-C cells display selective inhibition of long replicons which represent replication fork elongation and joining in contrast to short replicons arising from late-firing origins, a feature specific to ICL lesions (34). Moreover, FANCC has been demonstrated to regulate the expression of the DNA Damage Checkpoint protein 1 (MDC1), which is considered as a key checkpoint mediator with BRCA1, 53BP1, CHK2, and NBS1 (35).

Cytogenetic, comparative genomic hybridization and flow-cytometric analyses have revealed a variety of chromosomal aberrations or losses at chr.9q22 in different malignancies including breast cancer (36-39). This relatively broad region (8.71 Mb) includes several putative tumor suppressor genes such as XPA, PHF2, FANCC and PTCH1. A significant correlation between losses of chr.9q22.3 with lymph node metastasis in breast cancer is also reported (40). Particularly for FANCC gene, both deletion and methylation showed a significant association in two subgroups of breast cancer ( $P < 0.002$ ) and Q-PCR analysis revealed also a reduced FANCC mRNA expression (41). The association noted between FANCC alterations and adverse patient survival in either age group suggests it as a prognostic marker (41).

Hence, based on the close relation of *FANCC* and known breast cancer susceptibility genes

(*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1/FANCF* and *PALB2/FANCD1*) in the cell DNA repair pathways and the studies suggesting a possible involvement of *FANCC* alterations in cancer susceptibility, we undertook the analysis of *FANCC* entire coding sequence, intron/exon junctions as well as the proximal promoter region by re-sequencing in a series of 96 breast cancer cases selected from distinct high-risk families from the French Canadian population and 96 unrelated healthy controls of the same origin for sequence variations that could possibly modulate breast cancer risk.

## **Materials and Methods**

### ***Ascertainment of families and genomic DNA extraction***

All 96 non-*BRCA1/2* individuals from high-risk French Canadian breast and ovarian cancer families participating in this study were originally part of a larger interdisciplinary program termed INHERIT BRCAs (42; 43). All participants were at least 18 years of age, mentally capable and had to sign an informed consent form. Ethics committees reviewed the research project at the 7 participating institutions from which the patients were referred. The details regarding selection criteria of the breast cancer cases as well as the experimental and clinical procedures have been described previously (44-46). Lymphocytes from breast cancer individuals were isolated and immortalized as previously described (45; 46) and genomic DNA from BRCAX individuals was isolated using the QIAamp DNA Blood kit (Qiagen, Santa Clara, CA). Genomic DNA from peripheral blood of control individuals was isolated by conventional methods, either phenol-chlorophorm or using Gentra kits (Minneapolis, MN, USA).

### ***PCR amplification and direct sequencing***

The *FANCC* gene (NM\_000136.2) is composed of 15 exons that cover over 210 kb of genomic DNA. PCR amplification of the coding sequences (the exon 1 is non-coding and has not been analyzed), as well as the flanking intronic regions, was performed on breast cancer cases using a set of 14 primers pairs generating PCR products ranging from 193 bp to 587 bp. Primers list and amplification details can be found in Table 1. The PCR products were then sequenced with an ABI3730XL automated sequencer using the Big Dye 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) following the manufacturer's instructions. Sequences analyses were performed using Staden preGAP4 and GAP4 programs (<http://staden.sourceforge.net/>). The presence and frequency of variants identified in the case dataset was confirmed in the healthy individuals control group using the same sequencing conditions. Alternative splice amplification of *FANCC*ins4A and *FANCC*Δ7 was performed on cDNA from BRCAX individuals and human cell lines using the

following primers: FANCCins4A, Forward primer (Durf222): 5'-CCACCCGATTTAATGTGTGCC-3' and specific Reverse primer (Durf1085): 5'-AAGTATATGAGATAATAACACCCGT-3'; FANCC $\Delta$ 7, Forward primer (Durf222): 5'-CCACCCGATTTAATGTGTGCC-3' and specific Reverse primer (Durf1077): 5'-GGAGAGAAATCTTCTTCCGCC-3'.

### ***Variant characterization***

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

### ***LD block and haplotype estimation analysis***

The Haploview software was used to determine linkage disequilibrium (LD) block using all HAPMAP genotyping data covering the FANCC gene. Global haplotype estimations were determined using the PHASE 2.1.1 software (47), which estimates haplotypes and their frequencies with a Bayesian-based algorithm and then uses a permutation test to determine a global value of significance. The program was initially run 5 times with 1000 permutations for both the cases and controls combined. The p-value for case-control comparisons demonstrating a potential significant difference in allelic distribution between breast cancer cases and control individuals was further reduced by running the program with 100 000 permutations in order to verify the accuracy of haplotype estimations.

### ***RNA isolation from cell lines and normal tissue samples***

Total RNA was extracted using TRI Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center inc, Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions as previously described (48) from 1) EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines from the 96 breast cancer cases used for our mutation screening; 2) nine cancer cell lines obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) including, two estrogen receptor (ER)-negative breast cancer cell lines (BT-20 and MDA-MB-231), four ER+ breast cancer cell lines (BT-474, CAMA-1, MCF7 and ZR75) and three prostate cancer cell lines (22RV1, LNCaP, PC3); and 3) the HaCat human skin keratinocyte cell line which was generously supplied by Dr. N.E. Fusenig (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) (49; 50). Total RNA samples from normal tissues were purchased directly either from Stratagene (breast and ovary) (La Jolla, CA, USA), BioChain Institute Inc. (leukocyte) (Hayward, CA, USA), or Clontech (all other normal tissue samples) (Palo Alto, CA, USA). RNA samples were then processed as previously described (48). Thereafter, reverse transcription of 2.5 µg of standardized RNA samples was performed using 250 ng random hexamers and 200 U of SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the supplier's protocol.

## Results

### *Sequence variations in the FANCC gene.*

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

As shown in Table 4A and 4B, the only variant located in the coding sequence (c.816G/A) results in the amino acid change Glu273Lys. The Glu residue is almost completely conserved in distant species (apart from Ala in *Anolis carolinensis*), suggesting that this amino acid is under strong functional constraint or may have a specific role on protein conformation (Table 4A). This amino acid Glu273 is located within a region which is known to bind GRP94 and HSP70 proteins (Figure 1A). The Glu273Lys change is predicted to be not tolerated by SIFT, but evaluated as probably damaging by the PolyPhen program (Table 3B).

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

Linkage disequilibrium block (Haploview software) analyses were performed using HapMap genotyping data (total of 115 SNPs) from the CEPH/CEU cohort. Based on a solid spine of LD algorithm, five LD blocks of 37, 40, 9, 27 and 98 kb were identified (Figure 2). It should be noted that 3 of our variants (SNP 4, 5 and 6) identified in the French Canadian cohort are sub-grouped in the first LD block of 37 kb, with SNP 3 located at the proximity of the 3' end of LD block 1, while the variants (SNPs 1 and 2) from the 5'-part of the gene are located in the largest LD block of 98 kb.

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

Closer examination of the haplotypes being exclusively expressed in breast cancer cases and showing a frequency above 1%, revealed the presence of SNP3, SNP4 and SNP6 in H6, H4-5 and H2, respectively. It should be noted that SNP4 represents the only variant showing a significant difference in allele frequency between both series.

In an attempt to further evaluate the importance of each SNP likely responsible for the significant difference in global haplotype distribution between both series, we performed PHASE analysis using sliding windows with 1000 permutations as well. For the analysis leading to a low p-value of 0.001, an additional analysis was performed with 100 000 permutations in order to reduce this p-value. All these sliding windows analyses performed with 5, 4 or 3 variants result in a significant difference of global haplotype distribution between both series ranging from 0.001 to 0.006 while an additional analysis with 100 000 permutations for three of them leads to p-values of 0.00033, 0.00043 and 0.00045 respectively (Table 5). This suggests that the significance of haplotype distribution most

likely comes from the SNPs located in the 3'-part of the FANCC gene. Particularly, SNP3, SNP4 and SNP6 seem to be involved in this effect.

### ***Identification of FANCC alternative splice forms.***

Analysis of *FANCC* cDNA was also performed in breast cancer cases and highlighted the presence of three distinct alternative splice events (Figure 1B). The first alternative splice form, designed FANCCins4A, involved the insertion of 145 bp of intronic sequence located between exons 4 and 5 and is expected to result in a premature termination of *FANCC* open reading frame 13 amino acids downstream in exon 5 (Figure 1C). The alternative splice form, identified FANCC $\Delta$ 7, involves the skipping of exon 7 which is expected to produce an in-frame deletion of 55 amino acids in the region of the FANCC protein involved in the interaction with HSP70 and GRP74 (Figure 1A and 1D), while these domains of interaction in addition to the one targeted by the CDC2 protein located in the 3'-end of the wild type protein, are almost completely abolished in FANCCins4A protein (Figure 1C). On the other hand, skipping of exon 14 results in a deletion of 68 amino acids in the 3'-part of the wt protein and deletes the first 4 amino acids of the CDC2 interacting domain (data not shown). However, none of the variants identified in our individuals seem potentially involved in these alternative splicing events following *in silico* analyses (data not shown).

Semi-quantitative specific PCR amplification of both splicing events performed in human cell lines are displayed in Figure 1C (FANCCins4A) and 1D (FANCC $\Delta$ 7). While FANCC $\Delta$ 7 mRNA seems to be significantly expressed in all leukemia, breast and ovarian cell lines, FANCCins4A mRNA analysis displayed an obvious variability of expression particularly in breast cancer cell lines (Figure 1C), while this mRNA is not detectable in K562 cell line.

Moreover given that we could not assume that the splice forms described above were not subject to mRNA regulation through nonsense mediated decay (NMD), additional experiments have been performed (data not shown). To verify/detect the presence of NMD, a series of cell lines from breast cancer patients, in which the alternative form of interest

was observed, were treated with puromycin (half of the cells were treated and half were not), an agent known to inhibit NMD. RT-PCR was performed on FANCCins4A and FANCC $\Delta$ 7 using oligonucleotides specific to each spliced form, and clearly these forms do not seem to be subject to NMD (data not shown), as if the observed spliced form were indeed subject to NMD, an increase in the spliced form would be observed.

## Discussion

In order to increase the power of our study aiming at finding genetic variants involved in breast cancer susceptibility, we selected individuals from our cohort of French Canadian non-*BRCA1/2* high-risk breast cancer families (one individual per family). Given that this population is considered as a founder population, this allowed us to increase the likelihood of potentially identifying genetic variants associated with breast cancer (51). The previous identification of *BRCA2/FANCD1*, *PALB2/FANCN* and *BRIP1/FANCI* (18-20) as breast cancer susceptibility genes further strengthens the implication of FA genes in breast cancer susceptibility.

A number of case-control studies investigated the potential association of *FANCC* germline mutations with breast cancer susceptibility. Among the few polymorphisms/mutations not identified in our study, and for which a significant association has been demonstrated, L554P, c.711+4A/T and c.322delG have been observed at a significantly higher rate than expected among heterozygous *FANCC* mutation carrier grandmothers (SIR- 1.7, 95% CI, 1.1-5.2), in a study regrouping 944 subjects (22). However, Tischkowitz and coll. did not find any increase of incidence of overall cancer risk in FA family members (52). Although the statistical power of the study conducted by Barroso *et al.* is limited, they reported an association between rs1045276, located 3' downstream of the *FANCC* gene and poorer survival in breast cancer patients (53). Our results demonstrated an over-representation of the variant c.896+81G/A (OR=2.442, p=0.02) in breast cancer cases which could suggest an association with the disease, however this association remains to be confirmed in larger cohorts.

The variations c.816G/A and c.1677+7C/T are observed exclusively in 4 breast cancer cases, but not the same individuals, therefore supporting that both SNPs are not in strong LD. Moreover, both nucleotide variations are located in two different but adjacent LD blocks as illustrated in Figure 2.

Based on analysis of conservation in multiple species of nucleotides for c.896+81G/A (Table 3), or amino acids for c.816G/A (Table 4), we can conclude that these variants may have an impact on gene function or regulation of its expression. Moreover, although both

amino acids are polar and have a similar hydropathy index (Glu: -3.5 and Lys: -3.9), Glu is acidic while the Lys residue is basic, which could affect the tertiary structure of the protein conformation. In addition, the amino acid change Glu273Lys, located in exon 8, is predicted to be damaging by the PolyPhen software and this variation is comprised within the binding domains of HSP70 and GRP94.

It has been demonstrated that the complex FANCC-HSP70 has an anti-apoptotic role against a variety of environmental factors including oxydative stress, chemotherapeutic agents, radiation, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and both proteins can also suppress double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) activity and caspase 3 activation (31; 54-58). Indeed, this FANCC-HSP70 complex can inhibit the activity of PKR, which possesses a pro-apoptotic action (30). It should be noted that the formation of this complex is dependent of HSP40 and the fully functional FANCC protein is required in the complex for the cytoprotection activity (59). Indeed, the L554P mutation in FANCC retains its ability to interact with HSP70 but renders cells hypersensitive to IFN-  $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , therefore demonstrating the need of a functional FANCC protein (59). On the other hand, GRP94 could protect FANCC protein from degradation given that FANCC has a rapid turnover with a half-life of approximately 45 minutes (60).

The reduction of GRP94 expression in the rat NRL cell line significantly reduces FANCC protein levels, and induces development of MMC sensitivity in this relatively resistant cell line. Indeed, the IVS-4 + 4 A>T mutant (mutation described below), in which a part of the central domain of FANCC is deleted, failed to bind GRP94 (60).

Several spliced variants of FANCC gene have been identified and partially characterized over the last two decades, the most common being the IVS4+4A/T mutation resulting in the deletion of exon 4 (exon 5 when including the non-coding exon 1) (61; 62). The FANCC $\Delta$ 7 spliced variant identified in our breast cancer cases was already known to cause the skipping of exon 6 in two studies (it corresponds to exon 7 here, given that the first cDNA sequences reported in databases did not include the non-coding exon 1) (63; 64). However, these studies associated the skipping of exon 6 with two nonsense mutations which led to translational termination codons, namely R174X and R185X. Therefore it has been

proposed that, as reported for some genes related to diseases such as African cattle goitre (thyroglobulin gene), haemophilia A (factor VIII gene), Marfan syndrome (FBN1 gene) and gyrate atrophy (OAT gene) (65-67), the skipping of exons could maintain transcription and translation of a partially functional protein and thus moderate the disease phenotype. However in our study, no mutation/polymorphism has been identified to be potentially involved in the deletion of exon 7. Of interest, as described above, the skipping of exon 7 leads to the disruption of the binding domains of HSP70 and GRP94 which could affect the full activity of the translated protein, assuming that this protein may be translated given the absence of NMD and that the skipping of this exon represents an in-frame deletion.

Regarding the insertion of the intronic sequence 4A, this spliced mRNA would produce a truncated protein of 119 amino acids lacking most of the functional binding domains of the wild type protein (see Figure 1). Although we could presume that this protein could not have any significant activity, it has been reported that the FANCC mutation delG322 results in the expression of a 50-kD polypeptide which partially corrects MMC sensitivity in FANCC-deficient cell lines (68). Therefore additional experiments are needed to characterize the potential action and the role of this FANCCins4A protein in cell physiology.

On the other hand, skipping of exon 14 appears to be a common alternative splicing event, observed significantly in both FA patients and control individuals, however it has not been established that this aberrant transcript results in a functional protein (63). However, the deletion of exon 14 abrogates the first four amino acids of the CDC2 binding domain and the c-terminal portion has been identified as a key element in the protein activity since a mutation located in exon 15, such as L554P, yields to the loss of activity of the FANCC protein (69) as demonstrated in the HSC536 cell line.

As our sequencing analysis was limited to exonic and proximal intronic regions, we did not identify any variant potentially involved in the regulation of the splice transcripts revealed in our study.

Haplotypes reconstruction from the 6 SNPs detected in both sample sets led to the identification of 8 haplotypes with frequencies ranging from 0.5 to 46% (Table 5). Four

haplotypes (H2, H5, H6 and H7) are found exclusively in the case series while the haplotypes H1, H3 and H4 represent more than 95% of all haplotypes when both series (cases and controls) are combined. In particular, H1 is significantly more represented in the control series ( $p=0.031$ ) which could suggest a protective effect of this haplotype on breast cancer susceptibility. Of interest, H4 seems to be over-represented in breast cancer cases, although this difference is not statistically significant. The global haplotype comparison between both series leads to a significant p-value of 0.003, which suggests a significant difference in haplotype distribution, even though we should be cautious, given the presence of some variants displaying low frequencies.

To further restrict which variant or which portion of the gene seems to provide the significant difference between both sample sets, sliding windows of 3, 4 and 5 polymorphisms were used to generate haplotype comparison between both series. As illustrated in Table 6, additional analyses with 100 000 permutations generate p-values lower than 0.00045 when using windows including SNP 3, 4 and 6. At first glance, it is tempting to speculate that the variants located in the 3'-part of the gene are potentially involved in the difference observed regarding the haplotype distribution. This is supported by the LD block analysis (Figure 2) which locates the variants 3-6 in a relatively confined region in blocks 1 and 2, while the SNPs 1 and 2 are found in the block 5 which encompasses the 5' part of the FANCC gene. Moreover, following LD value calculation of all SNP combinations of Hapmap data covering the FANCC gene, we can observe a perfect  $D'$  value of 1.0 (data not shown) between the polymorphism rs4743056 (located in the proximal region of SNP6) and rs7847194 (close from SNP3). This is the more representative analysis we can perform since SNPs 3 and 6 identified in our study have not been included in Hapmap genotyping data.

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

According to Antoniou and Easton (51), in a study with 100 cases from high-risk families

and 100 healthy controls from the same population, and given a rare allele frequency of 0.10, it could in theory be possible to detect a relative risk of 2. Obviously, given the limited number of individuals included in the present study, one has to be cautious when interpreting such a result. Nonetheless, these preliminary results represent an interesting avenue for further investigations. However, analyses using larger cohorts will definitively be needed to further ascertain the impact of *FANCC* variants or haplotypes on breast cancer susceptibility in French Canadians and other populations.

## **Acknowledgements**

The authors are indebted to the participants and their families for their generosity and providing DNA samples. We would like to thank Dr Martine Dumont, Gilles Leblanc and Martine Tranchant for sample management, mutation screening, and skillful technical assistance as well as Josée Rhéaume for genetic counseling and clinical data management at the Cancer Genomics Laboratory. We thank Damian Labuda and Claudia Moreau at the Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine for providing control DNA samples. We also appreciate advice received from ethics committees. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) through the INHERIT BRCA's research program, the CURE Foundation, the Canadian Breast Cancer Research Alliance (CBCRA) and Fanconi Canada. C.J.B. holds a postgraduate scholarship from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and C.St-L.P. holds a Master's award in the area of Fanconi Anemia from CIHR. F.D. is a recipient of a chercheur-boursier from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and a Research Career Award in the Health Sciences from CIHR/Rx&D Health Research Foundation. J.S. is Chairholder of the Canada Research Chair in Oncogenetics.

## **Appendix**

Other members of INHERIT BRCAAs involved in clinical aspects of this study:

Paul Bessette: Service de gynécologie, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Fleurimont, QC, J1H 5N4, Canada.

Jocelyne Chiquette: Clinique des maladies du sein Deschênes-Fabia, Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, QC, G1S 4L8, Canada.

Rachel Laframboise: Service de médecine génétique, CHUQ, Pavillon CHUL, Québec, QC, G1V 4G2, Canada.

Jean Lépine: Centre Hospitalier régional de Rimouski, Rimouski, QC, G5L 5T1, Canada.

Bernard Lespérance, Roxane Pichette: Service d'hémo-oncologie, Hôpital du Sacré-Cœur, Montréal, QC, H4J 1C5, Canada.

Marie Plante: Service de gynécologie, CHUQ, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec, QC, G1R 2J6, Canada.

Jacques Simard: Cancer Genomics Laboratory, Oncology and Molecular Endocrinology Research Centre, Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Laval University, Québec, Canada.

## References

1. Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat. Genet* 2008 Jan;40 (1):17-22.
2. Thompson E, Dragovic RL, Stephenson S, Eccles DM, Campbell IG, Dobrovic A. A novel duplication polymorphism in the FANCA promoter and its association with breast and ovarian cancer. *BMC Cancer* 2005;5:43.
3. Fei P, Yin J, Wang W. New advances in the DNA damage response network of Fanconi anemia and BRCA proteins. FAAP95 replaces BRCA2 as the true FANCB protein. *Cell Cycle* 2005 Jan;4 (1):80-86.
4. Kitao H, Yamamoto K, Matsushita N, Ohzeki M, Ishiai M, Takata M. Functional interplay between BRCA2/FancD1 and FancC in DNA repair. *J. Biol. Chem* 2006 Jul;281 (30):21312-21320.
5. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 2002 Jul;297 (5581):606-609.
6. Hussain S, Wilson JB, Medhurst AL, Hejna J, Witt E, Ananth S, Davies A, Masson J, Moses R, West SC, de Winter JP, Ashworth A, Jones NJ, Mathew CG. Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum. Mol. Genet* 2004 Jun;13 (12):1241-1248.
7. Gordon SM, Alon N, Buchwald M. FANCC, FANCE, and FANCD2 form a ternary complex essential to the integrity of the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *J. Biol. Chem* 2005 Oct;280 (43):36118-36125.
8. Wang Z, Li M, Lu S, Zhang Y, Wang H. Promoter hypermethylation of FANCF plays an important role in the occurrence of ovarian cancer through disrupting Fanconi anemia-BRCA pathway. *Cancer Biol. Ther* 2006 Mar;5 (3):256-260.
9. Hussain S, Witt E, Huber PAJ, Medhurst AL, Ashworth A, Mathew CG. Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Hum. Mol. Genet* 2003 Oct;12 (19):2503-2510.
10. Sims AE, Spiteri E, Sims RJ, Arita AG, Lach FP, Landers T, Wurm M, Freund M, Neveling K, Hanenberg H, Auerbach AD, Huang TT. FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2007 Jun;14 (6):564-567.
11. Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, Andreassen PR, Cantor SB. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell* 2005 Sep;8 (3):255-265.

12. Meetei AR, Yan Z, Wang W. FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *Cell Cycle* 2004 Feb;3 (2):179-181.
13. Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin M, Joenje H, de Winter JP, Wang W. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat. Genet* 2005 Sep;37 (9):958-963.
14. Tischkowitz M, Xia B, Sabbaghian N, Reis-Filho JS, Hamel N, Li G, van Beers EH, Li L, Khalil T, Quenneville LA, Omeroglu A, Poll A, Lepage P, Wong N, Nederlof PM, Ashworth A, Tonin PN, Narod SA, Livingston DM, Foulkes WD. Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2007 Apr;104 (16):6788-6793.
15. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat. Rev. Genet* 2007 Oct;8 (10):735-748.
16. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 2001 Apr;105 (1):149-160.
17. Cantor S, Drapkin R, Zhang F, Lin Y, Han J, Pamidi S, Livingston DM. The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2004 Feb;101 (8):2357-2362.
18. Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K, North B, McGuffog L, Evans DG, Eccles D, Easton DF, Stratton MR, Rahman N. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat. Genet* 2006 Nov;38 (11):1239-1241.
19. Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, Reid S, Spanova K, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, McGuffog L, Hanks S, Evans DG, Eccles D, Easton DF, Stratton MR. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat. Genet* 2007 Feb;39 (2):165-167.
20. Erkko H, Xia B, Nikkilä J, Schleutker J, Syrjäkoski K, Mannermaa A, Kallioniemi A, Pylkäs K, Karppinen S, Rapakko K, Miron A, Sheng Q, Li G, Mattila H, Bell DW, Haber DA, Grip M, Reiman M, Jukkola-Vuorinen A, Mustonen A, Kere J, Aaltonen LA, Kosma V, Kataja V, Soini Y, Drapkin RI, Livingston DM, Winqvist R. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 2007 Mar;446 (7133):316-319.
21. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, Freund

- M, Lichtner P, Hartmann L, Schaal H, Ramser J, Honisch E, Kubisch C, Wichmann HE, Kast K, Deißler H, Engel C, Müller-Myhsok B, Neveling K, Kiechle M, Mathew CG, Schindler D, Schmutzler RK, Hanenberg H. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene [Internet]. *Nat Genet* 2010 Apr; [cited 2010 Apr 20 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400964>
22. Berwick M, Satagopan JM, Ben-Porat L, Carlson A, Mah K, Henry R, Diotti R, Milton K, Pujara K, Landers T, Dev Batish S, Morales J, Schindler D, Hanenberg H, Hromas R, Levran O, Auerbach AD. Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer. *Cancer Res* 2007 Oct;67 (19):9591-9596.
  23. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol. Cell* 2001 Feb;7 (2):249-262.
  24. Gregory RC, Taniguchi T, D'Andrea AD. Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Semin. Cancer Biol* 2003 Feb;13 (1):77-82.
  25. Nakanishi K, Yang Y, Pierce AJ, Taniguchi T, Digweed M, D'Andrea AD, Wang Z, Jasin M. Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2005 Jan;102 (4):1110-1115.
  26. de Winter JP, Joenje H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat. Res* 2009 Jul;668 (1-2):11-19.
  27. Hirano S, Yamamoto K, Ishiai M, Yamazoe M, Seki M, Matsushita N, Ohzeki M, Yamashita YM, Arakawa H, Buerstedde J, Enomoto T, Takeda S, Thompson LH, Takata M. Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. *EMBO J* 2005 Jan;24 (2):418-427.
  28. Fagerlie SR, Koretsky T, Torok-Storb B, Bagby GC. Impaired type I IFN-induced Jak/STAT signaling in FA-C cells and abnormal CD4+ Th cell subsets in *Fancc*<sup>-/-</sup> mice. *J. Immunol* 2004 Sep;173 (6):3863-3870.
  29. Saadat zadeh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Hong P, Bergmann H, Haneline LS. Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway. *J. Biol. Chem* 2004 Apr;279 (16):16805-16812.
  30. Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Koretsky T, Bagby GC. The anti-apoptotic function of Hsp70 in the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. *J. Biol. Chem* 2002 Dec;277 (51):49638-49643.
  31. Pang Q, Fagerlie S, Christianson TA, Keeble W, Faulkner G, Diaz J, Rathbun RK,

- Bagby GC. The Fanconi anemia protein FANCC binds to and facilitates the activation of STAT1 by gamma interferon and hematopoietic growth factors. *Mol. Cell. Biol* 2000 Jul;20 (13):4724-4735.
32. Brodeur I, Goulet I, Tremblay CS, Charbonneau C, Delisle M, Godin C, Huard C, Khandjian EW, Buchwald M, Lévesque G, Carreau M. Regulation of the Fanconi anemia group C protein through proteolytic modification. *J. Biol. Chem* 2004 Feb;279 (6):4713-4720.
  33. Reuter TY, Medhurst AL, Waisfisz Q, Zhi Y, Herterich S, Hoehn H, Gross HJ, Joenje H, Hoatlin ME, Mathew CG, Huber PAJ. Yeast two-hybrid screens imply involvement of Fanconi anemia proteins in transcription regulation, cell signaling, oxidative metabolism, and cellular transport. *Exp. Cell Res* 2003 Oct;289 (2):211-221.
  34. Phelps RA, Gingras H, Hockenbery DM. Loss of FANCC function is associated with failure to inhibit late firing replication origins after DNA cross-linking. *Exp. Cell Res* 2007 Jul;313 (11):2283-2292.
  35. Salles D, Cabral REC, Pizzatti L, Bisch PM, Paixão JC, de Almeida CEB, Seuánez HN, Cabral-Neto JB. Changes in protein expression due to deleterious mutations in the FA/BRCA pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2007 Dec;364 (4):755-760.
  36. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet* 1997 Apr;15 Spec No:417-474.
  37. Jain AN, Chin K, Børresen-Dale AL, Erikstein BK, Eynstein Lonning P, Kaaresen R, Gray JW. Quantitative analysis of chromosomal CGH in human breast tumors associates copy number abnormalities with p53 status and patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2001 Jul;98 (14):7952-7957.
  38. Naylor TL, Greshock J, Wang Y, Colligon T, Yu QC, Clemmer V, Zaks TZ, Weber BL. High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Breast Cancer Res* 2005;7 (6):R1186-1198.
  39. Korsching E, Packeisen J, Helms MW, Kersting C, Voss R, van Diest PJ, Brandt B, van der Wall E, Boecker W, Bürger H. Deciphering a subgroup of breast carcinomas with putative progression of grade during carcinogenesis revealed by comparative genomic hybridisation (CGH) and immunohistochemistry. *Br. J. Cancer* 2004 Apr;90 (7):1422-1428.
  40. Simoneau M, Aboukassim TO, LaRue H, Rousseau F, Fradet Y. Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene* 1999 Jan;18 (1):157-163.
  41. Sinha S, Singh RK, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK. Alterations in

candidate genes PHF2, FANCC, PTCH1 and XPA at chromosomal 9q22.3 region: pathological significance in early- and late-onset breast carcinoma. *Mol. Cancer* 2008;7:84.

42. Avard D, Bridge P, Bucci LM, Chiquette J, Dorval M, Durocher F, Easton D, Godard B, Goldgar D, Knoppers BM, Laframboise R, Lespérance B, Plante M, Tavtigian SV, Vézina H, Wilson B, Simard J. Partnering in oncogenetic research--the INHERIT BRCA's experience: opportunities and challenges. *Fam. Cancer* 2006;5 (1):3-13.
43. Simard J, Dumont M, Moisan A, Gaborieau V, Malouin H, Durocher F, Chiquette J, Plante M, Avard D, Bessette P, Brousseau C, Dorval M, Godard B, Houde L, Joly Y, Lajoie M, Leblanc G, Lépine J, Lespérance B, Vézina H, Parboosingh J, Pichette R, Provencher L, Rhéaume J, Sinnott D, Samson C, Simard J, Tranchant M, Voyer P, Easton D, Tavtigian SV, Knoppers B, Laframboise R, Bridge P, Goldgar D. Evaluation of BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence, risk prediction models and a multistep testing approach in French-Canadian families with high risk of breast and ovarian cancer. *J. Med. Genet* 2007 Feb;44 (2):107-121.
44. Moisan A, Fortin J, Dumont M, Samson C, Bessette P, Chiquette J, Laframboise R, Lépine J, Lespérance B, Pichette R, Plante M, Provencher L, Voyer P, Goldgar D, Bridge P, Simard J. No Evidence of BRCA1/2 genomic rearrangements in high-risk French-Canadian breast/ovarian cancer families. *Genet. Test* 2006;10 (2):104-115.
45. Durocher F, Labrie Y, Soucy P, Sinilnikova O, Labuda D, Bessette P, Chiquette J, Laframboise R, Lépine J, Lespérance B, Ouellette G, Pichette R, Plante M, Tavtigian SV, Simard J. Mutation analysis and characterization of ATR sequence variants in breast cancer cases from high-risk French Canadian breast/ovarian cancer families. *BMC Cancer* 2006;6:230.
46. Desjardins S, Belleau P, Labrie Y, Ouellette G, Bessette P, Chiquette J, Laframboise R, Lépine J, Lespérance B, Pichette R, Plante M, Durocher F. Genetic variants and haplotype analyses of the ZBRK1/ZNF350 gene in high-risk non BRCA1/2 French Canadian breast and ovarian cancer families. *Int. J. Cancer* 2008 Jan;122 (1):108-116.
47. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet* 2001 Apr;68 (4):978-989.
48. Fortin J, Moisan A, Dumont M, Leblanc G, Labrie Y, Durocher F, Bessette P, Bridge P, Chiquette J, Laframboise R, Lépine J, Lespérance B, Pichette R, Plante M, Provencher L, Voyer P, Simard J. A new alternative splice variant of BRCA1 containing an additional in-frame exon. *Biochim. Biophys. Acta* 2005 Oct;1731 (1):57-65.
49. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte

cell line. *J. Cell Biol* 1988 Mar;106 (3):761-771.

50. Boukamp P, Stanbridge EJ, Foo DY, Cerutti PA, Fusenig NE. c-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential in vivo but lacks correlation with malignancy. *Cancer Res* 1990 May;50 (9):2840-2847.
51. Antoniou AC, Easton DF. Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. *Genet. Epidemiol* 2003 Nov;25 (3):190-202.
52. Tischkowitz M, Easton DF, Ball J, Hodgson SV, Mathew CG. Cancer incidence in relatives of British Fanconi Anaemia patients. *BMC Cancer* 2008;8:257.
53. Barroso E, Pita G, Arias JI, Menendez P, Zamora P, Blanco M, Benitez J, Ribas G. The Fanconi anemia family of genes and its correlation with breast cancer susceptibility and breast cancer features. *Breast Cancer Res. Treat* 2009 Dec;118 (3):655-660.
54. Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* 1998 Nov;17 (21):6124-6134.
55. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J. Biol. Chem* 2000 Aug;275 (33):25665-25671.
56. Melville MW, Tan SL, Wambach M, Song J, Morimoto RI, Katze MG. The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58 (IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity. *J. Biol. Chem* 1999 Feb;274 (6):3797-3803.
57. Pang Q, Keeble W, Diaz J, Christianson TA, Fagerlie S, Rathbun K, Faulkner GR, O'Dwyer M, Bagby GC. Role of double-stranded RNA-dependent protein kinase in mediating hypersensitivity of Fanconi anemia complementation group C cells to interferon gamma, tumor necrosis factor-alpha, and double-stranded RNA. *Blood* 2001 Mar;97 (6):1644-1652.
58. Rathbun RK, Christianson TA, Faulkner GR, Jones G, Keeble W, O'Dwyer M, Bagby GC. Interferon-gamma-induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve caspase 8-dependent activation of caspase 3 family members. *Blood* 2000 Dec;96 (13):4204-4211.
59. Pang Q, Keeble W, Christianson TA, Faulkner GR, Bagby GC. FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *EMBO J* 2001 Aug;20 (16):4478-4489.
60. Hoshino T, Wang J, Devetten MP, Iwata N, Kajigaya S, Wise RJ, Liu JM, Youssoufian

- H. Molecular chaperone GRP94 binds to the Fanconi anemia group C protein and regulates its intracellular expression. *Blood* 1998 Jun;91 (11):4379-4386.
61. Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M. A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nat. Genet* 1993 Jun;4 (2):202-205.
  62. Verlander PC, Lin JD, Udono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG, Auerbach AD. Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *Am. J. Hum. Genet* 1994 Apr;54 (4):595-601.
  63. Gibson RA, Hajianpour A, Murer-Orlando M, Buchwald M, Mathew CG. A nonsense mutation and exon skipping in the Fanconi anaemia group C gene. *Hum. Mol. Genet* 1993 Jun;2 (6):797-799.
  64. Lo Ten Foe JR, Kruyt FA, Zweekhorst MB, Pals G, Gibson RA, Mathew CG, Joenje H, Arwert F. Exon 6 skipping in the Fanconi anemia C gene associated with a nonsense/missense mutation (775C-->T) in exon 5: the first example of a nonsense mutation in one exon causing skipping of another downstream. *Hum. Mutat* 1998;Suppl 1:S25-27.
  65. Ricketts MH, Simons MJ, Parma J, Mercken L, Dong Q, Vassart G. A nonsense mutation causes hereditary goitre in the Afrikaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1987 May;84 (10):3181-3184.
  66. Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F. Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in every one of 28 haemophilia A patients. *Hum. Mol. Genet* 1993 Jan;2 (1):11-17.
  67. Dietz HC, Valle D, Francomano CA, Kendzior RJ, Pyeritz RE, Cutting GR. The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. *Science* 1993 Jan;259 (5095):680-683.
  68. Yamashita T, Wu N, Kupfer G, Corless C, Joenje H, Grompe M, D'Andrea AD. Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood* 1996 May;87 (10):4424-4432.
  69. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 1992 Apr;356 (6372):763-767.

## Figure Legends

### **Figure 1: FANCC interaction domains, *FANCC* splicing and their tissue expression.**

(A) Schematic representation of FANCC interaction domains based on the literature. (B) *FANCC* exon structure and the three splicing variants that could be detected via the cDNA analysis: *FANCCins4a*, *FANCCA17* and *FANCCA14*. (C) and (D) Schematic representation of the putative protein produced by the insertion of exon 4a and the deletion of exon 7, respectively, with an RT-PCR analysis on various cell lines using a set of primers specific for each event.

**Figure 2: LD block analysis.** A total of 115 SNPs from the CEPH/CEU cohort of HapMap was used to identify five LD blocks using a solid spine of LD algorithm (denoted by arrows). SNPs1 to 6 are identified accordingly with their RefSNP accession number, when available.

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

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

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

**Table 2**Observed sequence variations in *FANCC* gene and genotype frequencies in familial breast cancer cases and controls

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

<sup>1</sup> According to the nomenclature of the Human Genome Variation Society<sup>2</sup> As expected under Hardy-Weinberg equilibrium<sup>3</sup> Minor Allele Frequency<sup>4</sup> p-value for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium<sup>5</sup> Odds Ratio (95% confidence interval)

**Table 3**

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

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

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

**Table 4a**


---

 Non-synonymous sequence variants detected in human FANCC and residues found in orthologues
 

---

SNP*	SNP ID**	Amino acid change	<i>Macaca mulatta</i>	<i>Tarsier syrichta</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Loxodonta africana</i>	<i>Monodelphis domestica</i>	<i>Anolis carolinensis</i>
3	c.816G>A	Glu273Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala

---

\* According to Table 2

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

**Table 4b**


---

 Prediction of the amino acid change Glu273Lys on FANCC protein function
 

---

SNP*	SNP ID**	Amino acid change	Location	SIFT	PolyPhen (score difference)
3	c.816G>A	Glu273Lys	Exon 8	Tolerated	Probably damaging

---

\* According to Table 2

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

**Table 5**

Estimated haplotype frequencies observed in French Canadian breast cancer cases and controls

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

\* According to Table 2

\*\*Fisher Exact Test, two-tailed

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

**Table 6**

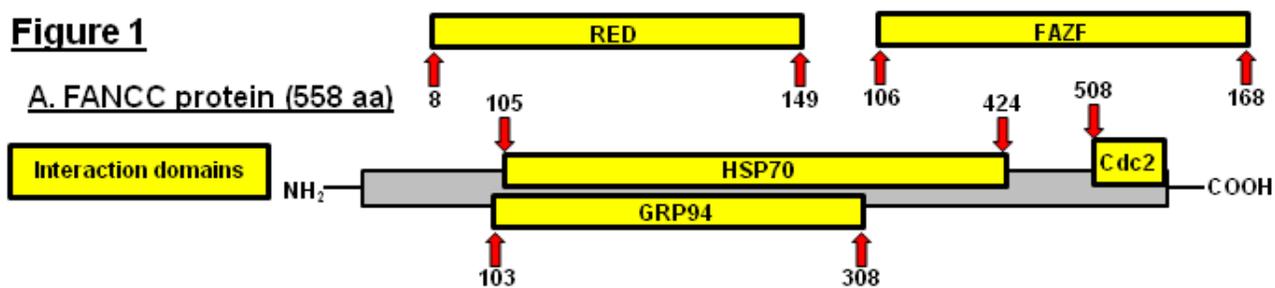
Significativity of PHASE analyses between French Canadian breast cancer cases and controls using sliding windows of SNPs

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

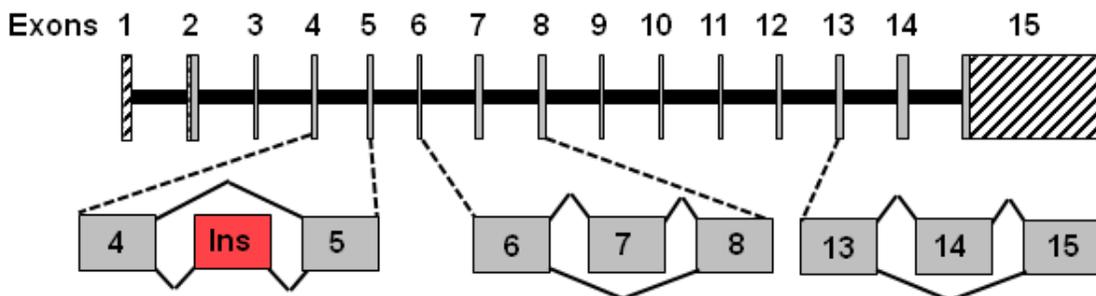
\* According to Table 2

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

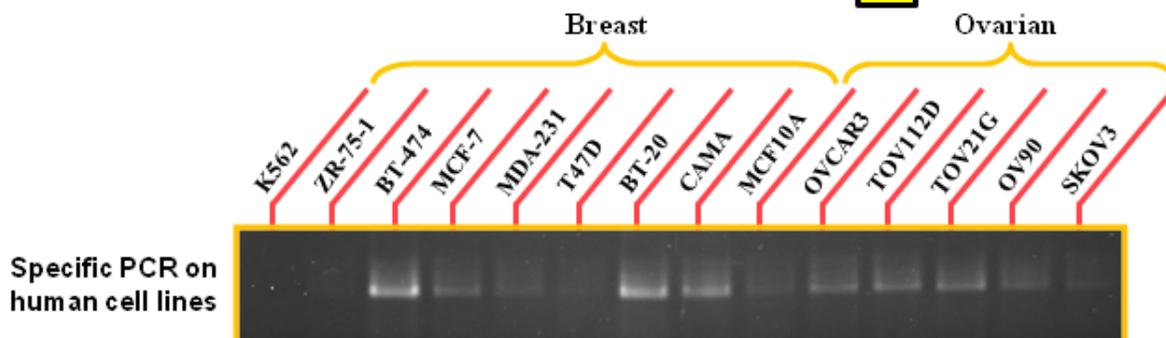
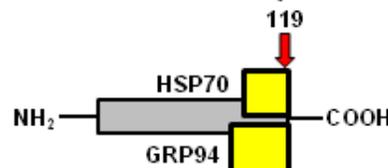
**Figure 1**



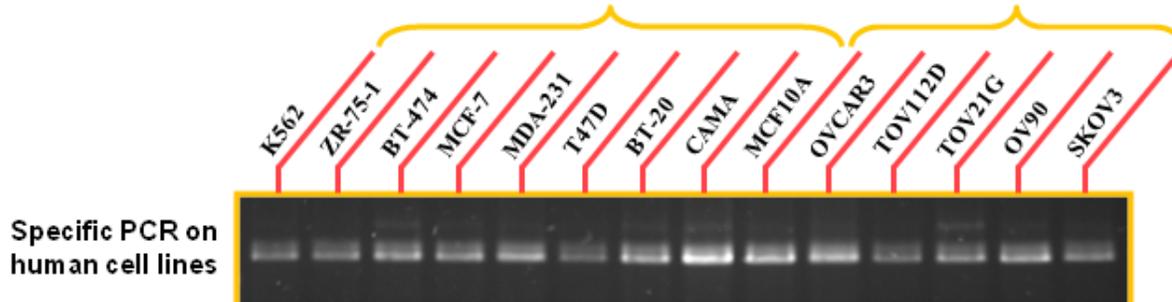
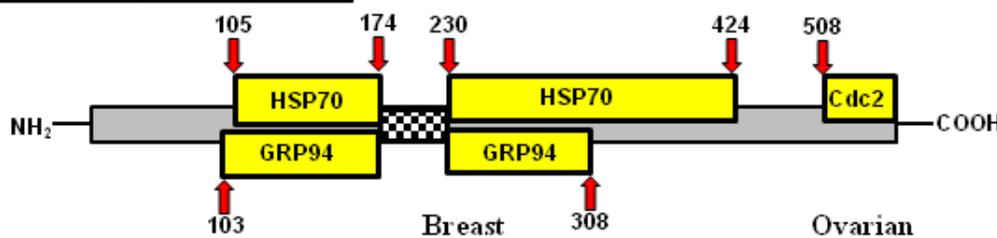
**B. FANCC gene (splicing)**



**C. Predicted FANCCins4A protein (119 aa)**

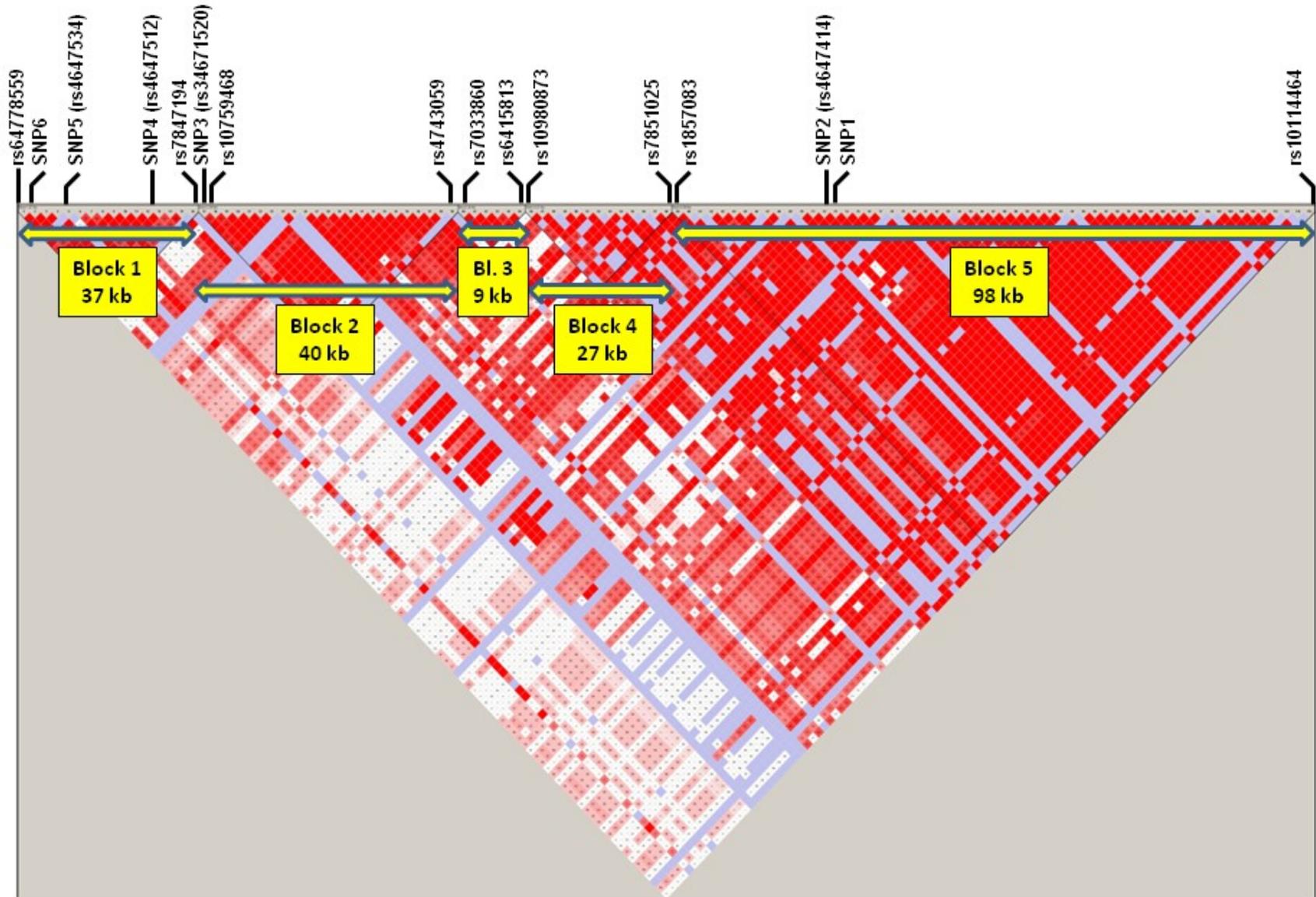


**D. Predicted FANCCA7 protein (503 aa)**



**Figure 2**

**FANCC gene: Chromosome 9 (96900157-97118948)**



## CONCLUSION

Puisqu'il est prédit qu'une proportion importante des cas de cancer du sein est causée par des facteurs génétiques, il est primordial de déterminer quels sont ces facteurs pour mieux discerner les femmes ayant un risque accru de celles ayant un risque normal ou réduit afin d'être en mesure d'offrir les mesures préventives nécessaires pour traiter la maladie tôt dans son développement. Le reséquençage de gènes candidats va demeurer la méthode de choix pour la découverte de nouveaux allèles de susceptibilité de pénétrance modérée peu communs dans la population en général, du moins jusqu'à ce que le coût des technologies de séquençage à très haut débit cessera d'être prohibitif pour l'analyse d'un nombre élevé de patients. Même dans ce cas, il sera difficile d'associer un polymorphisme avec une maladie si ce dernier n'est pas très fréquent, peu pénétrant et qu'il n'a pas un effet délétère facilement identifiable (tel un codon stop prématuré) (27). De plus, puisque de tels polymorphismes sont rares dans la population, il sera très difficile de recruter des cohortes assez grandes pour obtenir le pouvoir statistique nécessaire pour confirmer une association à travers le très grand nombre de polymorphismes obtenus lors de chaque analyse.

Les gènes FANC ont reçu beaucoup d'attention depuis qu'il a été démontré que des mutations bialléliques du gène *BRCA2* peuvent être responsables du sous-type D2 de l'AF. Depuis, au moins trois gènes directement impliqués dans la réparation des pontages interbrins ont été associés à une susceptibilité accrue de développer un cancer du sein: *PALB2/FANCN* (OR=2.3) (350), *BRIP1/FANCJ* (OR=2.0) (37; 346) et *RAD51C* (*FANCO*) (OR= 3.44) (351). Les résultats présentés au chapitre 1 sont également dans cet ordre de grandeur: variants peu fréquents conférant une augmentation modérée du risque de développer un cancer du sein.

De plus, une autre étude a associé des mutations dans le gène *FANCC* avec un risque accru pour le cancer du sein chez les grands-mères des patients AF (349). Il est par contre difficile de comparer directement les résultats de cette étude avec ceux présentés dans ce mémoire. D'une part, la méthode statistique diffère et la méthodologie pour le recrutement de la cohorte à analyser n'est pas la même. Les conclusions sont malgré tout semblables,

c'est-à-dire qu'il semble y avoir une association entre la présence de certains variants de séquence de *FANCC* et une susceptibilité accrue (environ 2.4 fois) de développer un cancer du sein. Dans tous les cas, il serait important de répliquer les résultats dans de plus grandes cohortes.

En plus d'être essentielle pour le fonctionnement de la voie FANC-BRCA, *FANCC* serait également impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires au niveau cytoplasmique qui sont importants pour maintenir la stabilité chromosomique tels que la détoxification des ROS et la protection contre l'apoptose.

L'analyse de *FANCC* dans la population canadienne-française a permis d'identifier deux variants potentiellement intéressants. Tout d'abord, le variant c.896+81G>A est retrouvé plus fréquemment dans notre cohorte de femmes atteintes que dans la cohorte de femmes saines. Par contre, il ne semble pas être le variant causal, car l'épissage alternatif des exons en périphérie n'est pas affecté par sa présence. Puisque les analyses des haplotypes permettent d'obtenir un meilleur seuil de significativité, il serait plausible que c.896+81G>A soit en déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme qui n'aurait pas été analysé au cours de ce projet. Il n'est pas non plus impossible que l'association retrouvée pour ce variant soit un faux positif. Pour vérifier ce point, il serait intéressant de l'étudier dans une plus grande cohorte de la population canadienne-française ou bien dans des cohortes provenant d'une autre population.

L'autre variant intéressant, c.816G>A, mène à un changement d'acide aminé. Comme les deux programmes de prédiction *in silico* donnent des résultats différents, il serait donc intéressant de vérifier réellement son impact au niveau de la protéine. En plus du test classique pour les protéines FANC, c'est-à-dire le test de survie suite à l'exposition à des agents pontants de l'ADN, d'autres tests complémentaires sont possibles. En effet, puisque *FANCC* est une protéine multifonctionnelle (277; 336), il est pertinent de vérifier si des interactions avec des protéines non-FANC (telles que Hsp70, Cdc2 ou GRP94) ont lieu correctement. Ces interactions pourraient être affectées même lorsque la voie FANC-BRCA est fonctionnelle.

Les quatre autres variants se retrouvent dans les régions non-codantes. Leurs fréquences alléliques sont similaires chez les cas de cancer du sein provenant de familles à risque élevé et chez la cohorte de femmes non-atteintes. De plus, ils ne semblent pas avoir d'effets délétères évidents. Ils n'ont donc pas été l'objet d'analyses plus approfondies. Parmi ces 4 variants, deux n'ont jamais été rapportés.

La présence de divers événements d'épissage alternatif qui a pu être identifiée par l'analyse de l'ADNc est tout particulièrement intéressante. Depuis les premiers articles parus sur la protéine FANCC, il semble clair que cette protéine possède un grand nombre d'isoformes. Par contre, leurs impacts sur la fonction de la protéine n'ont jamais été étudiés. Des études récentes sur la protéine FANCL ont permis d'identifier un variant d'épissage, nommé FAVL (352), qui inactive la forme sauvage en la séquestrant dans le cytoplasme et en favorisant sa dégradation par le protéasome, menant ainsi à l'inactivation de la voie FANCC-BRCA et favorisant le développement et la progression tumorale. L'étude des variants d'épissage de FANCC et des autres protéines FANCC pourrait donc s'avérer très pertinente. Dans cette étude, au moins trois formes d'épissage ont été mises en évidence, dont une (*FANCCins4a*) qui n'avait jamais été mentionnée dans la littérature. L'impact des deux autres formes *FANCCΔ7* et *FANCCΔ14* est également inconnu. Bien que l'expression de *FANCCΔ7* semble avoir lieu dans toutes les lignées tumorales analysées, ce n'est pas le cas pour *FANCCins4a* pour lequel l'expression est absente dans certaines lignées.

Les analyses récentes tenant compte des allèles de susceptibilité récemment découverts démontrent qu'ils ne permettent pas encore d'améliorer considérablement les modèles de prédiction du risque de développer un cancer du sein (353). Il reste donc probablement de nombreux autres gènes de susceptibilité à découvrir et on doit s'attendre à ce qu'une portion des allèles associés au cancer du sein ait une faible fréquence allélique et une pénétrance modérée à élevée. Pour le moment, de tels allèles doivent être identifiés par reséquençage de gènes candidats tels que *FANCC*.

Le gène *FANCC* pourrait également être lié au développement de cancer du sein d'une autre manière un peu plus inusitée que ce qui a été présenté dans ce mémoire. En effet, dans l'intron séparant l'exon 1 de l'exon 2 se retrouve un pseudogène. Plus spécifiquement,

l'ARNm du gène *ATMIN* s'y est inséré, probablement par un mécanisme de rétro-transposition (354). On retrouve la totalité de la région codante et une partie de la région transcrite non-traduite en 3' et en 5'. On peut noter la présence de quatre délétions et d'une insertion venant modifier le cadre de lecture. Il est donc peu probable que le pseudogène soit traduit en protéine. La protéine ATMIN serait importante dans la protection contre les dommages oxydatifs (355) et serait également essentielle pour la stabilité de la protéine ATM (356; 357).

Il serait alors intéressant de déterminer si le pseudogène d'*ATMIN* pourrait avoir un rôle semblable à celui identifié très récemment pour le pseudogène de *PTEN* (358). Il a été démontré que le pseudogène de *PTEN* servait à protéger le gène *PTEN* contre la dégradation par le mécanisme d'interférence à l'ARN. Dans certaines tumeurs, le locus du pseudogène de *PTEN* est perdu, ce qui mène à une baisse de l'expression de la copie sauvage et favoriserait ainsi la progression tumorale. Un mécanisme semblable pourrait également être en jeu pour le pseudogène d'*ATMIN*, d'autant plus qu'il a été démontré que le gène *FANCC* était parfois inactivé dans certaines tumeurs (359).

Il semble donc évident que le gène *FANCC* demeure encore un candidat très intéressant dans la recherche de gènes de susceptibilité au cancer du sein.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Coughlin SS, Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol* 2009 Nov;33 (5):315-318.
2. Société Canadienne du Cancer [Internet]. [date unknown];[cited 2010 Jun 2 ] Available from: [http://www.cancer.ca/Canada-wide/About%20cancer/Cancer%20statistics/Canadian%20Cancer%20Statistics.aspx?s\\_c\\_lang=fr-CA](http://www.cancer.ca/Canada-wide/About%20cancer/Cancer%20statistics/Canadian%20Cancer%20Statistics.aspx?s_c_lang=fr-CA)
3. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, Khaled H, Liu M, Martin M, Namer M, O'Shaughnessy JA, Shen ZZ, Albain KS. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin. Breast Cancer* 2005 Dec;6 (5):391-401.
4. Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) [Internet]. 2008;[cited 2010 Jun 2 ] Available from: <http://www.inspq.qc.ca/publications/notice.asp?E=p&NumPublication=885>
5. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001 Oct;358 (9291):1389-1399.
6. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med* 2000 Jul;343 (2):78-85.
7. Peto J, Mack TM. High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. *Nat. Genet* 2000 Dec;26 (4):411-414.
8. Mack TM, Hamilton AS, Press MF, Diep A, Rappaport EB. Heritable breast cancer in twins. *Br. J. Cancer* 2002 Jul;87 (3):294-300.
9. Cui J, Antoniou AC, Dite GS, Southey MC, Venter DJ, Easton DF, Giles GG, McCredie MR, Hopper JL. After BRCA1 and BRCA2--what next? Multifactorial segregation analyses of three-generation, population-based Australian families affected by female breast cancer. *Am. J. Hum. Genet* 2001 Feb;68 (2):420-431.
10. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer--epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000 Sep;321 (7261):624-628.
11. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2001 Mar;2 (3):133-140.

12. Sakorafas GH, Krespis E, Pavlakis G. Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective. *Surg Oncol* 2002 May;10 (4):183-192.
13. Brekelmans CTM. Risk factors and risk reduction of breast and ovarian cancer. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol* 2003 Feb;15 (1):63-68.
14. Singletary SE. Rating the risk factors for breast cancer. *Ann. Surg* 2003 Apr;237 (4):474-482.
15. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J. Cell. Mol. Med* 2005 Mar;9 (1):208-221.
16. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet* 2005 May;365 (9472):1727-1741.
17. Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. *Oncogene* 2006 Sep;25 (43):5832-5836.
18. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett* 2010 Jul;293 (2):133-143.
19. Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Ponder BA, Easton D. Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. *Genet. Epidemiol* 2001 Jul;21 (1):1-18.
20. Antoniou AC, Pharoah PDP, McMullan G, Day NE, Stratton MR, Peto J, Ponder BJ, Easton DF. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br. J. Cancer* 2002 Jan;86 (1):76-83.
21. Pharoah PDP, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BAJ. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat. Genet* 2002 May;31 (1):33-36.
22. Antoniou AC, Easton DF. Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. *Genet. Epidemiol* 2003 Nov;25 (3):190-202.
23. Pharoah PDP, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BAJ. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *N. Engl. J. Med* 2008 Jun;358 (26):2796-2803.
24. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994 Oct;266 (5182):66-71.
25. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S,

- Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995 Dec;378 (6559):789-792.
26. Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988 Sep;48 (18):5358-5362.
  27. Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat. Rev. Genet* 2010 Jun;11 (6):415-425.
  28. Fletcher O, Houlston RS. Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2010 May;10 (5):353-361.
  29. Tonin PN, Mes-Masson AM, Futreal PA, Morgan K, Mahon M, Foulkes WD, Cole DE, Provencher D, Ghadirian P, Narod SA. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian breast and ovarian cancer families. *Am. J. Hum. Genet* 1998 Nov;63 (5):1341-1351.
  30. Tonin PN, Mes-Masson AM, Narod SA, Ghadirian P, Provencher D. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian ovarian cancer cases unselected for family history. *Clin. Genet* 1999 May;55 (5):318-324.
  31. Tonin PN, Perret C, Lambert JA, Paradis AJ, Kantemiroff T, Benoît MH, Martin G, Foulkes WD, Ghadirian P. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in early-onset French Canadian breast cancer cases unselected for family history. *Int. J. Cancer* 2001 May;95 (3):189-193.
  32. Foulkes WD, Ghadirian P, Akbari MR, Hamel N, Giroux S, Sabbaghian N, Darnel A, Royer R, Poll A, Fafard E, Robidoux A, Martin G, Bismar TA, Tischkowitz M, Rousseau F, Narod SA. Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast Cancer Res* 2007;9 (6):R83.
  33. Simard J, Dumont M, Moisan A, Gaborieau V, Malouin H, Durocher F, Chiquette J, Plante M, Avard D, Bessette P, Brousseau C, Dorval M, Godard B, Houde L, Joly Y, Lajoie M, Leblanc G, Lépine J, Lespérance B, Vézina H, Parboosingh J, Pichette R, Provencher L, Rhéaume J, Sinnett D, Samson C, Simard J, Tranchant M, Voyer P, Easton D, Tavtigian SV, Knoppers B, Laframboise R, Bridge P, Goldgar D. Evaluation of BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence, risk prediction models and a multistep testing approach in French-Canadian families with high risk of breast and ovarian cancer. *J. Med. Genet* 2007 Feb;44 (2):107-121.
  34. Novak DJ, Chen LQ, Ghadirian P, Hamel N, Zhang P, Rossiny V, Cardinal G, Robidoux A, Tonin PN, Rousseau F, Narod SA, Foulkes WD. Identification of a novel CHEK2 variant and assessment of its contribution to the risk of breast cancer in

French Canadian women. *BMC Cancer* 2008;8:239.

35. Ghadirian P, Robidoux A, Zhang P, Royer R, Akbari M, Zhang S, Fafard E, Costa M, Martin G, Potvin C, Patocskai E, Larouche N, Younan R, Nassif E, Giroux S, Narod SA, Rousseau F, Foulkes WD. The contribution of founder mutations to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Clin. Genet* 2009 Nov;76 (5):421-426.
36. Easton DF. Cancer risks in A-T heterozygotes. *Int. J. Radiat. Biol* 1994 Dec;66 (6 Suppl):S177-182.
37. Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, Ahmed M, Spanova K, North B, McGuffog L, Evans DG, Eccles D, Easton DF, Stratton MR, Rahman N. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat. Genet* 2006 Nov;38 (11):1239-1241.
38. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, Hollestelle A, Houben M, Crepin E, van Veghel-Plandsoen M, Elstrodt F, van Duijn C, Bartels C, Meijers C, Schutte M, McGuffog L, Thompson D, Easton D, Sodha N, Seal S, Barfoot R, Mangion J, Chang-Claude J, Eccles D, Eeles R, Evans DG, Houlston R, Murday V, Narod S, Peretz T, Peto J, Phelan C, Zhang HX, Szabo C, Devilee P, Goldgar D, Futreal PA, Nathanson KL, Weber B, Rahman N, Stratton MR. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2 (\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat. Genet* 2002 May;31 (1):55-59.
39. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJP, Keller JJ, Westerman AM, Scott RJ, Lim W, Trimbath JD, Giardiello FM, Gruber SB, Offerhaus GJA, de Rooij FWM, Wilson JHP, Hansmann A, Möslein G, Royer-Pokora B, Vogel T, Phillips RKS, Spigelman AD, Houlston RS. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin. Cancer Res* 2006 May;12 (10):3209-3215.
40. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997 Mar;275 (5308):1943-1947.
41. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, Freund M, Lichtner P, Hartmann L, Schaal H, Ramser J, Honisch E, Kubisch C, Wichmann HE, Kast K, Deissler H, Engel C, Müller-Myhsok B, Neveling K, Kiechle M, Mathew CG, Schindler D, Schmutzler RK, Hanenberg H. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat. Genet* 2010 May;42 (5):410-414.
42. Górski B, Debniak T, Masojć B, Mierzejewski M, Medrek K, Cybulski C,

- Jakubowska A, Kurzawski G, Chosia M, Scott R, Lubiński J. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 2003 Sep;106 (3):379-381.
43. Heikkinen K, Karppinen S, Soini Y, Mäkinen M, Winqvist R. Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility. *J. Med. Genet* 2003 Dec;40 (12):e131.
44. Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, Balasubramanian S, Reed MWR, Pooley KA, Scollen S, Baynes C, Ponder BAJ, Chanock S, Lissowska J, Brinton L, Peplonska B, Southey MC, Hopper JL, McCredie MRE, Giles GG, Fletcher O, Johnson N, dos Santos Silva I, Gibson L, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Torres D, Hamann U, Justenhoven C, Brauch H, Chang-Claude J, Kropp S, Risch A, Wang-Gohrke S, Schürmann P, Bogdanova N, Dörk T, Fagerholm R, Aaltonen K, Blomqvist C, Nevanlinna H, Seal S, Renwick A, Stratton MR, Rahman N, Sangrajrang S, Hughes D, Odefrey F, Brennan P, Spurdle AB, Chenevix-Trench G, Beesley J, Mannermaa A, Hartikainen J, Kataja V, Kosma V, Couch FJ, Olson JE, Goode EL, Brooks A, Schmidt MK, Hogervorst FBL, Van't Veer LJ, Kang D, Yoo K, Noh D, Ahn S, Wedrén S, Hall P, Low Y, Liu J, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Sigurdson AJ, Stredrick DL, Alexander BH, Struwing JP, Pharoah PDP, Easton DF. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat. Genet* 2007 Mar;39 (3):352-358.
45. Turnbull C, Ahmed S, Morrison J, Pernet D, Renwick A, Maranian M, Seal S, Ghousaini M, Hines S, Healey CS, Hughes D, Warren-Perry M, Tapper W, Eccles D, Evans DG, Hooning M, Schutte M, van den Ouweland A, Houlston R, Ross G, Langford C, Pharoah PDP, Stratton MR, Dunning AM, Rahman N, Easton DF. Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat. Genet* 2010 Jun;42 (6):504-507.
46. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PDP, Thompson D, Ballinger DG, Struwing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajrang S, Gaborieau V, Odefrey F, Shen C, Wu P, Wang H, Eccles D, Evans DG, Peto J, Fletcher O, Johnson N, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Chenevix-Trench G, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Garcia-Closas M, Brinton L, Chanock S, Lissowska J, Peplonska B, Nevanlinna H, Fagerholm R, Eerola H, Kang D, Yoo K, Noh D, Ahn S, Hunter DJ, Hankinson SE, Cox DG, Hall P, Wedren S, Liu J, Low Y, Bogdanova N, Schürmann P, Dörk T, Tollenaar RAEM, Jacobi CE, Devilee P, Klijn JGM, Sigurdson AJ, Doody MM, Alexander BH, Zhang J, Cox A, Brock IW, MacPherson G, Reed MWR, Couch FJ, Goode EL, Olson JE, Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Uitterlinden A, Rivadeneira F, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Hopper JL, McCredie M, Southey M, Giles GG, Schroen C, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko Y, Spurdle AB, Beesley J, Chen X, Mannermaa A, Kosma V, Kataja V, Hartikainen J, Day NE, Cox DR, Ponder

BAJ. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007 Jun;447 (7148):1087-1093.

47. Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, Wacholder S, Wang Z, Welch R, Hutchinson A, Wang J, Yu K, Chatterjee N, Orr N, Willett WC, Colditz GA, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Hayes RB, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF, Hoover RN, Thomas G, Chanock SJ. A genome-wide association study identifies alleles in *FGFR2* associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat. Genet* 2007 Jul;39 (7):870-874.
48. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Rafnar T, Gudmundsson J, Gudjonsson SA, Masson G, Jakobsdottir M, Thorlacius S, Helgason A, Aben KK, Strobbe LJ, Albers-Akkers MT, Swinkels DW, Henderson BE, Kolonel LN, Le Marchand L, Millastre E, Andres R, Godino J, Garcia-Prats MD, Polo E, Tres A, Mouy M, Saemundsdottir J, Backman VM, Gudmundsson L, Kristjansson K, Bergthorsson JT, Kostic J, Frigge ML, Geller F, Gudbjartsson D, Sigurdsson H, Jonsdottir T, Hrafnkelsson J, Johannsson J, Sveinsson T, Myrdal G, Grimsson HN, Jonsson T, von Holst S, Werelius B, Margolin S, Lindblom A, Mayordomo JI, Haiman CA, Kiemenev LA, Johannsson OT, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat. Genet* 2007 Jul;39 (7):865-869.
49. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, Thorlacius S, Gudjonsson SA, Jonsson GF, Jakobsdottir M, Bergthorsson JT, Gudmundsson J, Aben KK, Strobbe LJ, Swinkels DW, van Engelenburg KCA, Henderson BE, Kolonel LN, Le Marchand L, Millastre E, Andres R, Saez B, Lambea J, Godino J, Polo E, Tres A, Picelli S, Rantala J, Margolin S, Jonsson T, Sigurdsson H, Jonsdottir T, Hrafnkelsson J, Johannsson J, Sveinsson T, Myrdal G, Grimsson HN, Sveinsdottir SG, Alexiusdottir K, Saemundsdottir J, Sigurdsson A, Kostic J, Gudmundsson L, Kristjansson K, Masson G, Fackenthal JD, Adebamowo C, Ogundiran T, Olopade OI, Haiman CA, Lindblom A, Mayordomo JI, Kiemenev LA, Gulcher JR, Rafnar T, Thorsteinsdottir U, Johannsson OT, Kong A, Stefansson K. Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat. Genet* 2008 Jun;40 (6):703-706.
50. Thomas G, Jacobs KB, Kraft P, Yeager M, Wacholder S, Cox DG, Hankinson SE, Hutchinson A, Wang Z, Yu K, Chatterjee N, Garcia-Closas M, Gonzalez-Bosquet J, Prokunina-Olsson L, Orr N, Willett WC, Colditz GA, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Diver R, Prentice R, Jackson R, Kooperberg C, Chlebowski R, Lissowska J, Peplonska B, Brinton LA, Sigurdson A, Doody M, Bhatti P, Alexander BH, Buring J, Lee I, Vatten LJ, Hveem K, Kumle M, Hayes RB, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF, Hoover RN, Chanock SJ, Hunter DJ. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (*RAD51L1*). *Nat. Genet* 2009 May;41 (5):579-584.

51. Long J, Cai Q, Shu X, Qu S, Li C, Zheng Y, Gu K, Wang W, Xiang Y, Cheng J, Chen K, Zhang L, Zheng H, Shen C, Huang C, Hou M, Shen H, Hu Z, Wang F, Deming SL, Kelley MC, Shrubsole MJ, Khoo US, Chan KYK, Chan SY, Haiman CA, Henderson BE, Le Marchand L, Iwasaki M, Kasuga Y, Tsugane S, Matsuo K, Tajima K, Iwata H, Huang B, Shi J, Li G, Wen W, Gao Y, Lu W, Zheng W. Identification of a functional genetic variant at 16q12.1 for breast cancer risk: results from the Asia breast cancer consortium. *PLoS Genet* 2010;6 (6):e1001002.
52. Zheng W, Long J, Gao Y, Li C, Zheng Y, Xiang Y, Wen W, Levy S, Deming SL, Haines JL, Gu K, Fair AM, Cai Q, Lu W, Shu X. Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1. *Nat. Genet* 2009 Mar;41 (3):324-328.
53. Ahmed S, Thomas G, Ghoussaini M, Healey CS, Humphreys MK, Platte R, Morrison J, Maranian M, Pooley KA, Luben R, Eccles D, Evans DG, Fletcher O, Johnson N, dos Santos Silva I, Peto J, Stratton MR, Rahman N, Jacobs K, Prentice R, Anderson GL, Rajkovic A, Curb JD, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Diver WR, Bojesen S, Nordestgaard BG, Flyger H, Dörk T, Schürmann P, Hillemanns P, Karstens JH, Bogdanova NV, Antonenkova NN, Zalutsky IV, Bermisheva M, Fedorova S, Khusnutdinova E, Kang D, Yoo K, Noh DY, Ahn S, Devilee P, van Asperen CJ, Tollenaar RAEM, Seynaeve C, Garcia-Closas M, Lissowska J, Brinton L, Peplonska B, Nevanlinna H, Heikkinen T, Aittomäki K, Blomqvist C, Hopper JL, Southey MC, Smith L, Spurdle AB, Schmidt MK, Broeks A, van Hien RR, Cornelissen S, Milne RL, Ribas G, González-Neira A, Benitez J, Schmutzler RK, Burwinkel B, Bartram CR, Meindl A, Brauch H, Justenhoven C, Hamann U, Chang-Claude J, Hein R, Wang-Gohrke S, Lindblom A, Margolin S, Mannermaa A, Kosma V, Kataja V, Olson JE, Wang X, Fredericksen Z, Giles GG, Severi G, Baglietto L, English DR, Hankinson SE, Cox DG, Kraft P, Vatten LJ, Hveem K, Kumle M, Sigurdson A, Doody M, Bhatti P, Alexander BH, Hooning MJ, van den Ouweland AMW, Oldenburg RA, Schutte M, Hall P, Czene K, Liu J, Li Y, Cox A, Elliott G, Brock I, Reed MWR, Shen C, Yu J, Hsu G, Chen S, Anton-Culver H, Ziogas A, Andrulis IL, Knight JA, Beesley J, Goode EL, Couch F, Chenevix-Trench G, Hoover RN, Ponder BAJ, Hunter DJ, Pharoah PDP, Dunning AM, Chanock SJ, Easton DF. Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat. Genet* 2009 May;41 (5):585-590.
54. Li FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann. Intern. Med* 1969 Oct;71 (4):747-752.
55. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990 Nov;250 (4985):1233-1238.
56. Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugières L, Pagés S, Feunteun J, Bonaïti-

- Pellié C. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J. Med. Genet* 2001 Jan;38 (1):43-47.
57. Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, Caron O, Bressac-de Paillerets B, Berthet P, Dugast C, Bonaïti-Pellié C, Stoppa-Lyonnet D, Frébourg T. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J. Clin. Oncol* 2009 Sep;27 (26):e108-109; author reply e110.
  58. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M, Jones PH, Binchy A, Crowther D. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 1994 Mar;54 (5):1298-1304.
  59. Ruijs MWG, Verhoef S, Rookus MA, Pruntel R, van der Hout AH, Hogervorst FBL, Kluijdt I, Sijmons RH, Aalfs CM, Wagner A, Ausems MGEM, Hoogerbrugge N, van Asperen CJ, Gomez Garcia EB, Meijers-Heijboer H, Ten Kate LP, Menko FH, van 't Veer LJ. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J. Med. Genet* 2010 Jun;47 (6):421-428.
  60. Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999 Dec;286 (5449):2528-2531.
  61. Evans DG, Birch JM, Narod SA. Is CHEK2 a cause of the Li-Fraumeni syndrome? *J. Med. Genet* 2008 Jan;45 (1):63-64.
  62. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet* 1997 May;16 (1):64-67.
  63. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, Lindboe CF, Fryns JP, Sijmons RH, Woods DG, Mariman EC, Padberg GW, Kremer H. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum. Mol. Genet* 1997 Aug;6 (8):1383-1387.
  64. Pilarski R. Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *J Genet Couns* 2009 Feb;18 (1):13-27.
  65. Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, Bodurtha J, Crowe C, Curtis MA, Dasouki M, Dunn T, Feit H, Geraghty MT, Graham JM, Hodgson SV, Hunter A, Korf BR, Manchester D, Miesfeldt S, Murday VA, Nathanson KL, Parisi M, Pober B, Romano C, Eng C. PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a

- single entity with Cowden syndrome. *Hum. Mol. Genet* 1999 Aug;8 (8):1461-1472.
66. Zhou X, Marsh DJ, Morrison CD, Chaudhury AR, Maxwell M, Reifenberger G, Eng C. Germline inactivation of PTEN and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway cause human Lhermitte-Duclos disease in adults. *Am. J. Hum. Genet* 2003 Nov;73 (5):1191-1198.
  67. Butler MG, Dasouki MJ, Zhou X, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, Miles JH, Wang CH, Stratton R, Pilarski R, Eng C. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J. Med. Genet* 2005 Apr;42 (4):318-321.
  68. Haiman CA, Stram DO, Cheng I, Giorgi EE, Pooler L, Penney K, Le Marchand L, Henderson BE, Freedman ML. Common genetic variation at PTEN and risk of sporadic breast and prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2006 May;15 (5):1021-1025.
  69. Peutz JLA. Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentation of skin and mucous membrane. *Ned Tijdschr Geneesk* 1921;10:134-146.
  70. JEGHERS H, McKUSICK VA, KATZ KH. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance. *N. Engl. J. Med* 1949 Dec;241 (26):1031-1036.
  71. Tomlinson IP, Houlston RS. Peutz-Jeghers syndrome. *J. Med. Genet* 1997 Dec;34 (12):1007-1011.
  72. Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, Krush AJ, Yardley JH, Luk GD. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N. Engl. J. Med* 1987 Jun;316 (24):1511-1514.
  73. Spigelman AD, Murday V, Phillips RK. Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome. *Gut* 1989 Nov;30 (11):1588-1590.
  74. Gruber SB, Entius MM, Petersen GM, Laken SJ, Longo PA, Boyer R, Levin AM, Mujumdar UJ, Trent JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR, Polymeropoulos MH, Offerhaus GJ, Giardiello FM. Pathogenesis of adenocarcinoma in Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer Res* 1998 Dec;58 (23):5267-5270.
  75. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000 Dec;119 (6):1447-1453.
  76. Lim W, Hearle N, Shah B, Murday V, Hodgson SV, Lucassen A, Eccles D, Talbot I,

- Neale K, Lim AG, O'Donohue J, Donaldson A, Macdonald RC, Young ID, Robinson MH, Lee PWR, Stoodley BJ, Tomlinson I, Alderson D, Holbrook AG, Vyas S, Swarbrick ET, Lewis AAM, Phillips RKS, Houlston RS. Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *Br. J. Cancer* 2003 Jul;89 (2):308-313.
77. Lim W, Olschwang S, Keller JJ, Westerman AM, Menko FH, Boardman LA, Scott RJ, Trimbath J, Giardiello FM, Gruber SB, Gille JJP, Offerhaus GJA, de Rooij FWM, Wilson JHP, Spigelman AD, Phillips RKS, Houlston RS. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterology* 2004 Jun;126 (7):1788-1794.
78. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, Müller O, Back W, Zimmer M. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat. Genet* 1998 Jan;18 (1):38-43.
79. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Höglund P, Järvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998 Jan;391 (6663):184-187.
80. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995 Jun;268 (5218):1749-1753.
81. Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998 May;93 (3):467-476.
82. Syllaba L, Henner K. Contribution a l'indépendance de l'athetose double idiopathique et congenitale. *Rev Neurol (Paris)* 1926;1:541-562.
83. BODER E, SEDGWICK RP. Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* 1958 Apr;21 (4):526-554.
84. Weemaes CM, Hustinx TW, Scheres JM, van Munster PJ, Bakkeren JA, Taalman RD. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1981 Jul;70 (4):557-564.

85. Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu. Rev. Genet* 1997;31:635-662.
86. Saar K, Chrzanowska KH, Stumm M, Jung M, Nürnberg G, Wienker TF, Seemanová E, Wegner RD, Reis A, Sperling K. The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am. J. Hum. Genet* 1997 Mar;60 (3):605-610.
87. Liu JM, Auerbach AD, Young NS. Fanconi anemia presenting unexpectedly in an adult kindred with no dysmorphic features. *Am. J. Med* 1991 Nov;91 (5):555-557.
88. Porteous ME, Cross I, Burn J. VACTERL with hydrocephalus: one end of the Fanconi anemia spectrum of anomalies? *Am. J. Med. Genet* 1992 Aug;43 (6):1032-1034.
89. Dokal I. The genetics of Fanconi's anaemia. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol* 2000 Sep;13 (3):407-425.
90. Alter BP. Fanconi's anaemia and its variability. *Br. J. Haematol* 1993 Sep;85 (1):9-14.
91. Giri N, Batista DL, Alter BP, Stratakis CA. Endocrine Abnormalities in Patients with Fanconi Anemia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007;92 (7):2624-2631.
92. Giampietro PF, Verlander PC, Davis JG, Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an international Fanconi Anemia Registry Study. *Am. J. Med. Genet* 1997 Jan;68 (1):58-61.
93. Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2009;668 (1-2):4-10.
94. Glanz A, Fraser FC. Spectrum of anomalies in Fanconi anaemia. *British Medical Journal* 1982;19 (6):412.
95. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee ML, others. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. *Blood* 2000;96 (13):4064.
96. Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, Asano S, Nakahata T. The IVS4+ 4 A to T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a severe phenotype in Japanese patients. *Blood* 2000;95 (4):1493.
97. Koc A, Pronk JC, Alikasifoglu M, Joenje H, Altay C. Variable pathogenicity of exon 43del (FAA) in four Fanconi anaemia patients within a consanguineous family. *Br. J. Haematol* 1999 Jan;104 (1):127-130.

98. D'Souza F, Usha MK, Subba Rao SD. Fanconi's anemia in monozygotic twins. *Indian J Pediatr* 2007 Sep;74 (9):859-861.
99. Poole SR, Smith AC, Hays T, McGavran L, Auerbach AD. Monozygotic twin girls with congenital malformations resembling fanconi anemia. *Am. J. Med. Genet* 1992 Apr;42 (6):780-784.
100. Bushkell LL, Kersey JH, Cervenka J. Chromosomal breaks in T and B lymphocytes in Fanconi's anemia. *Clin. Genet* 1976 Jun;9 (6):583-587.
101. Alter BP. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer* 2003 Jan;97 (2):425-440.
102. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003 Feb;101 (4):1249-1256.
103. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* 2003 Feb;101 (3):822-826.
104. Tischkowitz M, Dokal I. Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *Br. J. Haematol* 2004 Jul;126 (2):176-191.
105. Alter BP, Greene MH, Velazquez I, Rosenberg PS. Cancer in Fanconi anemia. *Blood* 2003 Mar;101 (5):2072.
106. Macé G, Briot D, Guervilly J, Rosselli F. [Fanconi anemia: cellular and molecular features]. *Pathol. Biol* 2007 Feb;55 (1):19-28.
107. Shimamura A. Treatment of Hematologic Abnormalities in Fanconi Anemia. In: *Fanconi Anemia Guidelines for Diagnosis and Management, Third Edition*. 2008 p. 49-75.
108. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 1994 Sep;84 (5):1650-1655.
109. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med* 2009 Nov;361 (19):1872-1885.
110. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer Lyon, France; 2008 p. p.88-107.
111. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C.

- Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol* 1982 Jun;51 (2):189-199.
112. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med* 1999 Sep;341 (14):1051-1062.
  113. Lensch MW, Rathbun RK, Olson SB, Jones GR, Bagby GC. Selective pressure as an essential force in molecular evolution of myeloid leukemic clones: a view from the window of Fanconi anemia. *Leukemia* 1999 Nov;13 (11):1784-1789.
  114. Auerbach AD, Allen RG. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet. Cytogenet* 1991 Jan;51 (1):1-12.
  115. Alter BP, Caruso JP, Drachtman RA, Uchida T, Velagaleti GV, Elghetany MT. Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. *Cancer Genet. Cytogenet* 2000 Mar;117 (2):125-131.
  116. Tönnies H, Huber S, Kuhl J, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood* 2003 May;101 (10):3872-3874.
  117. Schultz JC, Shahidi NT. Tumor necrosis factor-alpha overproduction in Fanconi's anemia. *Am. J. Hematol* 1993 Feb;42 (2):196-201.
  118. Rosselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha. *Blood* 1994 Mar;83 (5):1216-1225.
  119. Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Poggi V, Béka'ssy AN, Scimè R, Pistorio A, Pistoia V. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood* 2003 Sep;102 (6):2053-2059.
  120. Young NS. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr Dameshek's riddle, restated. *Blood* 1992 Mar;79 (6):1385-1392.
  121. Alter BP, Joenje H, Oostra AB, Pals G. Fanconi anemia: adult head and neck cancer and hematopoietic mosaicism. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg* 2005 Jul;131 (7):635-639.
  122. Alter BP. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. *Pediatr Transplant* 2005 Dec;9 Suppl 7:81-86.

123. Rosenberg PS, Huang Y, Alter BP. Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi anemia. *Blood* 2004 Jul;104 (2):350-355.
124. Alter BP. Fanconi's anemia and malignancies. *Am. J. Hematol* 1996 Oct;53 (2):99-110.
125. Rosenberg PS, Alter BP, Socié G, Gluckman E. Secular trends in outcomes for Fanconi anemia patients who receive transplants: implications for future studies. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2005 Sep;11 (9):672-679.
126. Rosenberg PS, Socié G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood* 2005 Jan;105 (1):67-73.
127. Guardiola P, Socié G, Li X, Ribaud P, Devergie A, Espérou H, Richard P, Traineau R, Janin A, Gluckman E. Acute graft-versus-host disease in patients with Fanconi anemia or acquired aplastic anemia undergoing bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors: risk factors and influence on outcome. *Blood* 2004 Jan;103 (1):73-77.
128. Velazquez I, Alter BP. Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. *Am. J. Hematol* 2004 Nov;77 (3):257-267.
129. Kaplan MJ, Sabio H, Wanebo HJ, Cantrell RW. Squamous cell carcinoma in the immunosuppressed patient: Fanconi's anemia. *Laryngoscope* 1985 Jul;95 (7 Pt 1):771-775.
130. Schindler D, Hoehn H. Fanconi Anemia. A paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging. In: *Fanconi Anemia. A paradigmatic Disease for the Understanding of Cancer and Aging*. Vol 15. [date unknown] p. pp 59-78.
131. Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Research* 1973;33 (8):1829.
132. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat. Rev. Genet* 2001 Jun;2 (6):446-457.
133. Auerbach AD, Wolman SR. Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature* 1976 Jun;261 (5560):494-496.
134. Ishida R, Buchwald M. Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA-cross-linking and alkylating agents. *Cancer Res* 1982 Oct;42 (10):4000-4006.
135. Auerbach AD. Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc*

136. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* 1989 Feb;73 (2):391-396.
137. Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Rooimans MA, Oostra AB, Veerman AJ, van Weel M, Pauli RM, Shahidi NT, Dokal I, Roberts I, Altay C, Gluckman E, Gibson RA, Mathew CG, Arwert F, Joenje H. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur. J. Hum. Genet* 1997 Jun;5 (3):137-148.
138. Alter B. Diagnostic evaluation of FA. In: *Fanconi Anemia Guidelines for Diagnosis and Management, Third Edition*. 2008 p. 33-48.
139. Clarke AA, Philpott NJ, Gordon-Smith EC, Rutherford TR. The sensitivity of Fanconi anaemia group C cells to apoptosis induced by mitomycin C is due to oxygen radical generation, not DNA crosslinking. *Br. J. Haematol* 1997 Feb;96 (2):240-247.
140. Ruppitsch W, Meisslitzer C, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Overexpression of thioredoxin in Fanconi anemia fibroblasts prevents the cytotoxic and DNA damaging effect of mitomycin C and diepoxybutane. *FEBS Lett* 1998 Jan;422 (1):99-102.
141. Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature* 1981 Mar;290 (5802):142-143.
142. Cohen-Haguenaer O, Péault B, Bauche C, Daniel M, Casal I, Levy V, Dausset J, Boiron M, Auclair C, Gluckman E, Marty M. In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2006 Feb;103 (7):2340-2345.
143. Saito H, Hammond AT, Moses RE. Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells. *Mutat. Res* 1993 Oct;294 (3):255-262.
144. Schindler D, Hoehn H. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am. J. Hum. Genet* 1988 Oct;43 (4):429-435.
145. Saadatzadeh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Hong P, Bergmann H, Haneline LS. Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway. *J. Biol. Chem* 2004 Apr;279 (16):16805-16812.
146. Degan P, Bonassi S, De Caterina M, Korkina LG, Pinto L, Scopacasa F, Zatterale A, Calzone R, Pagano G. In vivo accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families. *Carcinogenesis* 1995 Apr;16 (4):735-741.

147. Zunino A, Degan P, Vigo T, Abbondandolo A. Hydrogen peroxide: effects on DNA, chromosomes, cell cycle and apoptosis induction in Fanconi's anemia cell lines. *Mutagenesis* 2001 May;16 (3):283-288.
148. Ruppitsch W, Meisslitzer C, Weirich-Schwaiger H, Klocker H, Scheidereit C, Schweiger M, Hirsch-Kauffmann M. The role of oxygen metabolism for the pathological phenotype of Fanconi anemia. *Hum. Genet* 1997 Jun;99 (6):710-719.
149. Du W, Adam Z, Rani R, Zhang X, Pang Q. Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. *Antioxid. Redox Signal* 2008 Nov;10 (11):1909-1921.
150. Li J, Sejas DP, Zhang X, Qiu Y, Nattamai KJ, Rani R, Rathbun KR, Geiger H, Williams DA, Bagby GC, Pang Q. TNF-alpha induces leukemic clonal evolution ex vivo in Fanconi anemia group C murine stem cells. *J. Clin. Invest* 2007 Nov;117 (11):3283-3295.
151. Reuter TY, Medhurst AL, Waisfisz Q, Zhi Y, Herterich S, Hoehn H, Gross HJ, Joenje H, Hoatlin ME, Mathew CG, Huber PAJ. Yeast two-hybrid screens imply involvement of Fanconi anemia proteins in transcription regulation, cell signaling, oxidative metabolism, and cellular transport. *Exp. Cell Res* 2003 Oct;289 (2):211-221.
152. Pagano G, Degan P, d'Ischia M, Kelly FJ, Nobili B, Pallardó FV, Youssoufian H, Zatterale A. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur. J. Haematol* 2005 Aug;75 (2):93-100.
153. Cumming RC, Lightfoot J, Beard K, Youssoufian H, O'Brien PJ, Buchwald M. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat. Med* 2001 Jul;7 (7):814-820.
154. Kruyt FA, Hoshino T, Liu JM, Joseph P, Jaiswal AK, Youssoufian H. Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase. *Blood* 1998 Nov;92 (9):3050-3056.
155. Futaki M, Igarashi T, Watanabe S, Kajigaya S, Tatsuguchi A, Wang J, Liu JM. The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 2002 Jan;23 (1):67-72.
156. Mukhopadhyay SS, Leung KS, Hicks MJ, Hastings PJ, Youssoufian H, Plon SE. Defective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia. *J. Cell Biol* 2006 Oct;175 (2):225-235.
157. Kontou M, Adelfalk C, Ramirez MH, Ruppitsch W, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger

- M. Overexpressed thioredoxin compensates Fanconi anemia related chromosomal instability. *Oncogene* 2002 Apr;21 (15):2406-2412.
158. Duckworth-Rysiecki G, Cornish K, Clarke CA, Buchwald M. Identification of two complementation groups in Fanconi anemia. *Somat. Cell Mol. Genet* 1985 Jan;11 (1):35-41.
159. de Winter JP, Joenje H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat. Res* 2009 Jul;668 (1-2):11-19.
160. Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat. Genet* 1992 Jun;1 (3):196-198.
161. Joenje H, Lo ten Foe JR, Oostra AB, van Berkel CG, Rooimans MA, Schroeder-Kurth T, Wegner RD, Gille JJ, Buchwald M, Arwert F. Classification of Fanconi anemia patients by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype. *Blood* 1995 Sep;86 (6):2156-2160.
162. Joenje H, Oostra AB, Wijker M, di Summa FM, van Berkel CG, Rooimans MA, Ebell W, van Weel M, Pronk JC, Buchwald M, Arwert F. Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. *Am. J. Hum. Genet* 1997 Oct;61 (4):940-944.
163. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NFC, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, de Winter JP, Joenje H. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 2004 Apr;103 (7):2498-2503.
164. Singh TR, Bakker ST, Agarwal S, Jansen M, Grassman E, Godthelp BC, Ali AM, Du C, Rooimans MA, Fan Q, Wahengbam K, Steltenpool J, Andreassen PR, Williams DA, Joenje H, de Winter JP, Meetei AR. Impaired FANCD2 monoubiquitination and hypersensitivity to camptothecin uniquely characterize Fanconi anemia complementation group M. *Blood* 2009 Jul;114 (1):174-180.
165. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 1992 Apr;356 (6372):763-767.
166. Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nat. Genet* 1996 Nov;14 (3):324-328.
167. Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DF, Savoia A, Cheng NC, van Berkel CG, Strunk MH, Gille JJ, Pals G, Kruyt FA, Pronk JC, Arwert F, Buchwald M, Joenje H. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat. Genet* 1996 Dec;14 (4):488.
168. de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon

- N, Carreau M, Bender O, Demuth I, Schindler D, Pronk JC, Arwert F, Hoehn H, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat. Genet* 1998 Nov;20 (3):281-283.
169. de Winter JP, Rooimans MA, van Der Weel L, van Berkel CG, Alon N, Bosnoyan-Collins L, de Groot J, Zhi Y, Waisfisz Q, Pronk JC, Arwert F, Mathew CG, Scheper RJ, Hoatlin ME, Buchwald M, Joenje H. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat. Genet* 2000 Jan;24 (1):15-16.
170. de Winter JP, Léveillé F, van Berkel CG, Rooimans MA, van Der Weel L, Steltenpool J, Demuth I, Morgan NV, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Lightfoot J, Leegwater PA, Waisfisz Q, Komatsu K, Arwert F, Pronk JC, Mathew CG, Digweed M, Buchwald M, Joenje H. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am. J. Hum. Genet* 2000 Nov;67 (5):1306-1308.
171. Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, Reifsteck C, Lucas L, Bruun D, Thayer M, Cox B, Olson S, D'Andrea AD, Moses R, Grompe M. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol. Cell* 2001 Feb;7 (2):241-248.
172. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, D'Andrea AD. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 2002 Jul;297 (5581):606-609.
173. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet* 2003 Oct;35 (2):165-170.
174. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat. Genet* 2004 Nov;36 (11):1219-1224.
175. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, Elghalbzouri-Maghrani E, Steltenpool J, Rooimans MA, Pals G, Arwert F, Mathew CG, Zdzienicka MZ, Hiom K, De Winter JP, Joenje H. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat. Genet* 2005 Sep;37 (9):934-935.
176. Levrán O, Attwooll C, Henry RT, Milton KL, Neveling K, Rio P, Batish SD, Kalb R, Velleuer E, Barral S, Ott J, Petrini J, Schindler D, Hanenberg H, Auerbach AD. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet* 2005 Sep;37 (9):931-933.
177. Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, Andreassen PR, Cantor SB. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. *Cancer Cell* 2005 Sep;8 (3):255-265.

178. Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG, Hoatlin M, Joenje H, de Winter JP, Wang W. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat. Genet* 2005 Sep;37 (9):958-963.
179. Dorsman JC, Levitus M, Rockx D, Rooimans MA, Oostra AB, Haitjema A, Bakker ST, Steltenpool J, Schuler D, Mohan S, Schindler D, Arwert F, Pals G, Mathew CG, Waisfisz Q, de Winter JP, Joenje H. Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell. Oncol* 2007;29 (3):211-218.
180. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, Ballif BA, Gygi SP, Hofmann K, D'Andrea AD, Elledge SJ. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* 2007 Apr;129 (2):289-301.
181. Sims AE, Spiteri E, Sims RJ, Arita AG, Lach FP, Landers T, Wurm M, Freund M, Neveling K, Hanenberg H, Auerbach AD, Huang TT. FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2007 Jun;14 (6):564-567.
182. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, Wurm M, Batish SD, Lach FP, Yetgin S, Neitzel H, Ariffin H, Tischkowitz M, Mathew CG, Auerbach AD, Rahman N. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat. Genet* 2007 Feb;39 (2):162-164.
183. Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, de Vries Y, Rooimans MA, Sheng Q, Pals G, Errami A, Gluckman E, Llera J, Wang W, Livingston DM, Joenje H, de Winter JP. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat. Genet* 2007 Feb;39 (2):159-161.
184. Moustacchi E, Papadopoulo D, Diatloff-Zito C, Buchwald M. Two complementation groups of Fanconi's anemia differ in their phenotypic response to a DNA-crosslinking treatment. *Hum. Genet* 1987 Jan;75 (1):45-47.
185. Matsumoto A, Vos JM, Hanawalt PC. Repair analysis of mitomycin C-induced DNA crosslinking in ribosomal RNA genes in lymphoblastoid cells from Fanconi's anemia patients. *Mutat. Res* 1989 May;217 (3):185-192.
186. Rosselli F, Moustacchi E. Cocultivation of Fanconi anemia cells and of mouse lymphoma mutants leads to interspecies complementation of chromosomal hypersensitivity to DNA cross-linking agents. *Hum. Genet* 1990 May;84 (6):517-521.
187. Papadopoulo D, Guillouf C, Mohrenweiser H, Moustacchi E. Hypomutability in

- Fanconi anemia cells is associated with increased deletion frequency at the HPRT locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1990 Nov;87 (21):8383-8387.
188. Hansson J, Keyse SM, Lindahl T, Wood RD. DNA excision repair in cell extracts from human cell lines exhibiting hypersensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer Res* 1991 Jul;51 (13):3384-3390.
  189. Guillouf C, Moustacchi E, Papadopoulo D. HPRT gene expression differs in mutants derived from normal and Fanconi anemia cells: analysis of spontaneous and psoralen-photoinduced mutants. *Somat. Cell Mol. Genet* 1991 Nov;17 (6):591-599.
  190. Lambert MW, Tsongalis GJ, Lambert WC, Hang B, Parrish DD. Defective DNA endonuclease activities in Fanconi's anemia cells, complementation groups A and B. *Mutat. Res* 1992 Jan;273 (1):57-71.
  191. Rosselli F, Sanceau J, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I. Involvement of interleukin-6. *Hum. Genet* 1992 Apr;89 (1):42-48.
  192. Joenje H, Levitus M, Waisfisz Q, D'Andrea A, Garcia-Higuera I, Pearson T, van Berkel CG, Roomans MA, Morgan N, Mathew CG, Arwert F. Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. *Am. J. Hum. Genet* 2000 Sep;67 (3):759-762.
  193. Thompson LH, Jones NJ. Stabilizing and Remodeling the Blocked DNA Replication Fork: Anchoring FANCM and the Fanconi Anemia Damage Response. *Mol Cell* 2010 Mar;37 (6):749-751.
  194. Yan Z, Delannoy M, Ling C, Dae D, Osman F, Muniandy PA, Shen X, Oostra AB, Du H, Steltenpool J, Lin T, Schuster B, Décaillot C, Stasiak A, Stasiak AZ, Stone S, Hoatlin ME, Schindler D, Woodcock CL, Joenje H, Sen R, de Winter JP, Li L, Seidman MM, Whitby MC, Myung K, Constantinou A, Wang W. A Histone-Fold Complex and FANCM Form a Conserved DNA-Remodeling Complex to Maintain Genome Stability. *Mol Cell* 2010 Mar;37 (6):865-878.
  195. Blackford AN, Schwab RA, Niedzwiedz W. A novel ATRIBUTE of FANCM [Internet]. *Cell Cycle* 2010 Apr;9 (8)[cited 2010 Apr 12 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372056>
  196. Huang M, Kim JM, Shiotani B, Yang K, Zou L, D'Andrea AD. The FANCM/FAAP24 complex is required for the DNA interstrand crosslink-induced checkpoint response. *Mol. Cell* 2010 Jul;39 (2):259-268.
  197. Kee Y, D'Andrea AD. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev* 2010 Aug;24 (16):1680-1694.

198. Lestini R, Duan Z, Allers T. The archaeal Xpf/Mus81/FANCM homolog Hef and the Holliday junction resolvase Hjc define alternative pathways that are essential for cell viability in *Haloferax volcanii*. *DNA Repair (Amst.)* 2010 Sep;9 (9):994-1002.
199. Ede C, Rudolph CJ, Lehmann S, Schürer KA, Kramer W. Budding yeast Mph1 promotes sister chromatid interactions by a mechanism involving strand invasion [Internet]. *DNA Repair (Amst.)* 2010 Oct;[cited 2010 Dec 14 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20951099>
200. Vinciguerra P, Godinho SA, Parmar K, Pellman D, D'Andrea AD. Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells. *J. Clin. Invest* 2010 Nov;120 (11):3834-3842.
201. Knoll A, Puchta H. The role of DNA helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants [Internet]. *J. Exp. Bot* 2010 Nov;[cited 2010 Dec 14 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21081662>
202. Chavez A, Agrawal V, Johnson FB. Homologous recombination-dependent rescue of deficiency in the structural maintenance of chromosomes (SMC) 5/6 complex [Internet]. *J. Biol. Chem* 2010 Dec;[cited 2010 Dec 14 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138837>
203. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat. Rev. Genet* 2007 Oct;8 (10):735-748.
204. Kim JM, Kee Y, Gurtan A, D'Andrea AD. Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. *Blood* 2008 May;111 (10):5215-5222.
205. Ciccia A, Ling C, Coulthard R, Yan Z, Xue Y, Meetei AR, Laghmani EH, Joenje H, McDonald N, de Winter JP, Wang W, West SC. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol. Cell* 2007 Feb;25 (3):331-343.
206. Xue Y, Li Y, Guo R, Ling C, Wang W. FANCM of the Fanconi anemia core complex is required for both monoubiquitination and DNA repair. *Hum. Mol. Genet* 2008 Jun;17 (11):1641-1652.
207. Gari K, Décaillet C, Stasiak AZ, Stasiak A, Constantinou A. The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks. *Mol. Cell* 2008 Jan;29 (1):141-148.
208. Nishino T, Komori K, Tsuchiya D, Ishino Y, Morikawa K. Crystal structure and

- functional implications of *Pyrococcus furiosus* hef helicase domain involved in branched DNA processing. *Structure* 2005 Jan;13 (1):143-153.
209. Collis SJ, Ciccia A, Deans AJ, Horejsí Z, Martin JS, Maslen SL, Skehel JM, Elledge SJ, West SC, Boulton SJ. FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. *Mol. Cell* 2008 Nov;32 (3):313-324.
  210. Bakker ST, van de Vrugt HJ, Rooimans MA, Oostra AB, Steltenpool J, Delzenne-Goette E, van der Wal A, van der Valk M, Joenje H, te Riele H, de Winter JP. Fancm-deficient mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M. *Hum. Mol. Genet* 2009 Sep;18 (18):3484-3495.
  211. Rosado IV, Niedzwiedz W, Alpi AF, Patel KJ. The Walker B motif in avian FANCM is required to limit sister chromatid exchanges but is dispensable for DNA crosslink repair. *Nucleic Acids Res* 2009 Jul;37 (13):4360-4370.
  212. Yamashita T, Kupfer GM, Naf D, Suliman A, Joenje H, Asano S, D'Andrea AD. The fanconi anemia pathway requires FAA phosphorylation and FAA/FAC nuclear accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1998 Oct;95 (22):13085-13090.
  213. Collins NB, Wilson JB, Bush T, Thomashevski A, Roberts KJ, Jones NJ, Kupfer GM. ATR-dependent phosphorylation of FANCA on serine 1449 after DNA damage is important for FA pathway function. *Blood* 2009 Mar;113 (10):2181-2190.
  214. Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev* 2004 Aug;18 (16):1958-1963.
  215. Ho GPH, Margossian S, Taniguchi T, D'Andrea AD. Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Mol. Cell. Biol* 2006 Sep;26 (18):7005-7015.
  216. Ishiai M, Kitao H, Smogorzewska A, Tomida J, Kinomura A, Uchida E, Saberi A, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, Tashiro S, Elledge SJ, Takata M. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2008 Nov;15 (11):1138-1146.
  217. Medhurst AL, Laghmani EH, Steltenpool J, Ferrer M, Fontaine C, de Groot J, Rooimans MA, Scheper RJ, Meetei AR, Wang W, Joenje H, de Winter JP. Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway. *Blood* 2006 Sep;108 (6):2072-2080.
  218. Matsushita N, Kitao H, Ishiai M, Nagashima N, Hirano S, Okawa K, Ohta T, Yu DS, McHugh PJ, Hickson ID, Venkitesan AR, Kurumizaka H, Takata M. A FancD2-

- monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. *Mol. Cell* 2005 Sep;19 (6):841-847.
219. Thomashevski A, High AA, Drozd M, Shabanowitz J, Hunt DF, Grant PA, Kupfer GM. The Fanconi anemia core complex forms four complexes of different sizes in different subcellular compartments. *J. Biol. Chem* 2004 Jun;279 (25):26201-26209.
220. Garcia-Higuera I, Kuang Y, Näf D, Wasik J, D'Andrea AD. Fanconi anemia proteins FANCA, FANCC, and FANCG/XRCC9 interact in a functional nuclear complex. *Mol. Cell. Biol* 1999 Jul;19 (7):4866-4873.
221. Waisfisz Q, de Winter JP, Kruyt FA, de Groot J, van der Weel L, Dijkmans LM, Zhi Y, Arwert F, Scheper RJ, Youssoufian H, Hoatlin ME, Joenje H. A physical complex of the Fanconi anemia proteins FANCG/XRCC9 and FANCA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1999 Aug;96 (18):10320-10325.
222. Gordon SM, Buchwald M. Fanconi anemia protein complex: mapping protein interactions in the yeast 2- and 3-hybrid systems. *Blood* 2003 Jul;102 (1):136-141.
223. Ling C, Ishiai M, Ali AM, Medhurst AL, Neveling K, Kalb R, Yan Z, Xue Y, Oostra AB, Auerbach AD, Hoatlin ME, Schindler D, Joenje H, de Winter JP, Takata M, Meetei AR, Wang W. FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. *EMBO J* 2007 Apr;26 (8):2104-2114.
224. Pace P, Johnson M, Tan WM, Mosedale G, Sng C, Hoatlin M, de Winter J, Joenje H, Gergely F, Patel KJ. FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity. *EMBO J* 2002 Jul;21 (13):3414-3423.
225. Medhurst AL, Huber PA, Waisfisz Q, de Winter JP, Mathew CG. Direct interactions of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway. *Hum. Mol. Genet* 2001 Feb;10 (4):423-429.
226. Garcia-Higuera I, Kuang Y, Denham J, D'Andrea AD. The fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex. *Blood* 2000 Nov;96 (9):3224-3230.
227. Léveillé F, Ferrer M, Medhurst AL, Laghmani EH, Rooimans MA, Bier P, Steltenpool J, Titus TA, Postlethwait JH, Hoatlin ME, Joenje H, de Winter JP. The nuclear accumulation of the Fanconi anemia protein FANCE depends on FANCC. *DNA Repair (Amst.)* 2006 May;5 (5):556-565.
228. Léveillé F, Blom E, Medhurst AL, Bier P, Laghmani EH, Johnson M, Rooimans MA, Sobeck A, Waisfisz Q, Arwert F, Patel KJ, Hoatlin ME, Joenje H, de Winter JP. The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein. *J. Biol. Chem* 2004 Sep;279 (38):39421-39430.

229. Mi J, Kupfer GM. The Fanconi anemia core complex associates with chromatin during S phase. *Blood* 2005 Jan;105 (2):759-766.
230. Qiao F, Moss A, Kupfer GM. Fanconi anemia proteins localize to chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. *J. Biol. Chem* 2001 Jun;276 (26):23391-23396.
231. Deans AJ, West SC. FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Mol. Cell* 2009 Dec;36 (6):943-953.
232. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol. Cell* 2001 Feb;7 (2):249-262.
233. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Andreassen PR, Gregory RC, Grompe M, D'Andrea AD. S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51. *Blood* 2002 Oct;100 (7):2414-2420.
234. Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD. Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol. Cell. Biol* 2004 Jul;24 (13):5850-5862.
235. Alpi AF, Pace PE, Babu MM, Patel KJ. Mechanistic insight into site-restricted monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. *Mol. Cell* 2008 Dec;32 (6):767-777.
236. Alpi AF, Patel KJ. Monoubiquitylation in the Fanconi anemia DNA damage response pathway. *DNA Repair (Amst.)* 2009 Apr;8 (4):430-435.
237. Machida YJ, Machida Y, Chen Y, Gurtan AM, Kupfer GM, D'Andrea AD, Dutta A. UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Mol. Cell* 2006 Aug;23 (4):589-596.
238. Alpi A, Langevin F, Mosedale G, Machida YJ, Dutta A, Patel KJ. UBE2T, the Fanconi anemia core complex, and FANCD2 are recruited independently to chromatin: a basis for the regulation of FANCD2 monoubiquitination. *Mol. Cell. Biol* 2007 Dec;27 (24):8421-8430.
239. Montes de Oca R, Andreassen PR, Margossian SP, Gregory RC, Taniguchi T, Wang X, Houghtaling S, Grompe M, D'Andrea AD. Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin. *Blood* 2005 Feb;105 (3):1003-1009.
240. Vandenberg CJ, Gergely F, Ong CY, Pace P, Mallery DL, Hiom K, Patel KJ. BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2. *Mol. Cell* 2003 Jul;12 (1):247-254.

241. Hussain S, Wilson JB, Medhurst AL, Hejna J, Witt E, Ananth S, Davies A, Masson J, Moses R, West SC, de Winter JP, Ashworth A, Jones NJ, Mathew CG. Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum. Mol. Genet* 2004 Jun;13 (12):1241-1248.
242. Bogliolo M, Lyakhovich A, Callén E, Castellà M, Cappelli E, Ramírez MJ, Creus A, Marcos R, Kalb R, Neveling K, Schindler D, Surrallés J. Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J* 2007 Mar;26 (5):1340-1351.
243. Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, New HV, Moreau LA, Stotsky M, Mathew CG, Kastan MB, Weaver DT, D'Andrea AD. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat. Cell Biol* 2002 Dec;4 (12):913-920.
244. Wang W. A major switch for the Fanconi anemia DNA damage-response pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2008 Nov;15 (11):1128-1130.
245. Kee Y, Kim JM, D'Andrea AD, D'Andrea A. Regulated degradation of FANCM in the Fanconi anemia pathway during mitosis. *Genes Dev* 2009 Mar;23 (5):555-560.
246. Gari K, Décaillot C, Delannoy M, Wu L, Constantinou A. Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2008 Oct;105 (42):16107-16112.
247. Mosedale G, Niedzwiedz W, Alpi A, Perrina F, Pereira-Leal JB, Johnson M, Langevin F, Pace P, Patel KJ. The vertebrate Hef ortholog is a component of the Fanconi anemia tumor-suppressor pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2005 Sep;12 (9):763-771.
248. Mi J, Qiao F, Wilson JB, High AA, Schroeder MJ, Stukenberg PT, Moss A, Shabanowitz J, Hunt DF, Jones NJ, Kupfer GM. FANCG is phosphorylated at serines 383 and 387 during mitosis. *Mol. Cell. Biol* 2004 Oct;24 (19):8576-8585.
249. Kruyt FA, Dijkmans LM, Arwert F, Joenje H. Involvement of the Fanconi's anemia protein FAC in a pathway that signals to the cyclin B/cdc2 kinase. *Cancer Res* 1997 Jun;57 (11):2244-2251.
250. Kupfer GM, Yamashita T, Naf D, Suliman A, Asano S, D'Andrea AD. The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinase, cdc2. *Blood* 1997 Aug;90 (3):1047-1054.
251. Wang X, Kennedy RD, Ray K, Stuckert P, Ellenberger T, D'Andrea AD. Chk1-mediated phosphorylation of FANCE is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol. Cell. Biol* 2007 Apr;27 (8):3098-3108.

252. Otsuki T, Nagashima T, Komatsu N, Kirito K, Furukawa Y, Kobayashi Si S, Liu JM, Ozawa K. Phosphorylation of Fanconi anemia protein, FANCA, is regulated by Akt kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2002 Mar;291 (3):628-634.
253. Shen X, Do H, Li Y, Chung W, Tomasz M, de Winter JP, Xia B, Elledge SJ, Wang W, Li L. Recruitment of fanconi anemia and breast cancer proteins to DNA damage sites is differentially governed by replication. *Mol. Cell* 2009 Sep;35 (5):716-723.
254. Xie J, Litman R, Wang S, Peng M, Guillemette S, Rooney T, Cantor SB. Targeting the FANCI-BRCA1 interaction promotes a switch from recombination to poleta-dependent bypass [Internet]. *Oncogene* 2010 Feb;[cited 2010 Mar 25 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173781>
255. Gupta R, Sharma S, Sommers JA, Kenny MK, Cantor SB, Brosh RM. FANCI (BACH1) helicase forms DNA damage inducible foci with replication protein A and interacts physically and functionally with the single-stranded DNA-binding protein. *Blood* 2007 Oct;110 (7):2390-2398.
256. Iftode C, Daniely Y, Borowiec JA. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 1999;34 (3):141-180.
257. Hirsch B, Shimamura A, Moreau L, Baldinger S, Hag-alshiekh M, Bostrom B, Sencer S, D'Andrea AD. Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood. *Blood* 2004 Apr;103 (7):2554-2559.
258. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 2006 Sep;25 (43):5864-5874.
259. Esashi F, Galkin VE, Yu X, Egelman EH, West SC. Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2007 Jun;14 (6):468-474.
260. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, Neveling K, Endt D, Kesterton I, Autore F, Fraternali F, Freund M, Hartmann L, Grimwade D, Roberts RG, Schaal H, Mohammed S, Rahman N, Schindler D, Mathew CG. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder [Internet]. *Nat Genet* 2010 Apr;[cited 2010 Apr 20 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400963>
261. French CA, Masson J, Griffin CS, O'Regan P, West SC, Thacker J. Role of mammalian RAD51L2 (RAD51C) in recombination and genetic stability. *J. Biol. Chem* 2002 May;277 (22):19322-19330.

262. Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica* 2008 Apr;93 (4):511-517.
263. Akkari YM, Bateman RL, Reifsteck CA, Olson SB, Grompe M. DNA replication is required To elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links. *Mol. Cell. Biol* 2000 Nov;20 (21):8283-8289.
264. Akkari YM, Bateman RL, Reifsteck CA, D'Andrea AD, Olson SB, Grompe M. The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase. *Mol. Genet. Metab* 2001 Dec;74 (4):403-412.
265. Thompson LH, Hinz JM. Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights. *Mutat. Res* 2009 Jul;668 (1-2):54-72.
266. Knipscheer P, Räschle M, Smogorzewska A, Enoiu M, Ho TV, Schärer OD, Elledge SJ, Walter JC. The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* 2009 Dec;326 (5960):1698-1701.
267. Niedzwiedz W, Mosedale G, Johnson M, Ong CY, Pace P, Patel KJ. The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. *Mol. Cell* 2004 Aug;15 (4):607-620.
268. Mirchandani KD, McCaffrey RM, D'Andrea AD. The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly. *DNA Repair (Amst.)* 2008 Jun;7 (6):902-911.
269. Wilson JB, Yamamoto K, Marriott AS, Hussain S, Sung P, Hoatlin ME, Mathew CG, Takata M, Thompson LH, Kupfer GM, Jones NJ. FANCG promotes formation of a newly identified protein complex containing BRCA2, FANCD2 and XRCC3. *Oncogene* 2008 Jun;27 (26):3641-3652.
270. Pace P, Mosedale G, Hodskinson M, Rosado IV, Sivasubramaniam M, Patel KJ. Ku70 corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway [Internet]. *Science* 2010 Jun;[cited 2010 Jul 6 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538911>
271. Adamo A, Collis SJ, Adelman CA, Silva N, Horejsi Z, Ward JD, Martinez-Perez E, Boulton SJ, La Volpe A. Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia [Internet]. *Mol Cell* 2010 Jun;[cited 2010 Jul 6 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20598602>
272. Kratz K, Schöpf B, Kaden S, Sendoel A, Eberhard R, Lademann C, Cannavó E, Sartori AA, Hengartner MO, Jiricny J. Deficiency of FANCD2-Associated Nuclease KIAA1018/FAN1 Sensitizes Cells to Interstrand Crosslinking Agents. *Cell* 2010

Jul;142 (1):77-88.

273. Mackay C, Déclais A, Lundin C, Agostinho A, Deans AJ, Macartney TJ, Hofmann K, Gartner A, West SC, Helleday T, Lilley DMJ, Rouse J. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA Repair Nuclease Recruited to DNA Damage by Monoubiquitinated FANCD2. *Cell* 2010 Jul;142 (1):65-76.
274. Smogorzewska A, Desetty R, Saito TT, Schlabach M, Lach FP, Sowa ME, Clark AB, Kunkel TA, Harper JW, Colaiácovo MP, Elledge SJ. A Genetic Screen Identifies FAN1, a Fanconi Anemia-Associated Nuclease Necessary for DNA Interstrand Crosslink Repair. *Mol Cell* 2010 Jul;39 (1):36-47.
275. Yamashita T, Wu N, Kupfer G, Corless C, Joenje H, Grompe M, D'Andrea AD. Clinical variability of Fanconi anemia (type C) results from expression of an amino terminal truncated Fanconi anemia complementation group C polypeptide with partial activity. *Blood* 1996 May;87 (10):4424-4432.
276. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, Altay C, Poole J, Stones D, Kwee ML, van Weel-Sipman M, Havenga C, Morgan N, de Winter J, Digweed M, Savoia A, Pronk J, de Ravel T, Jansen S, Joenje H, Gluckman E, Mathew CG. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood* 2000 Dec;96 (13):4064-4070.
277. Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Diaz J, Faulkner GR, Reifsteck C, Olson S, Bagby GC. The Fanconi anemia complementation group C gene product: structural evidence of multifunctionality. *Blood* 2001 Sep;98 (5):1392-1401.
278. Awan A, Malcolm Taylor G, Gokhale DA, Dearden SP, Will A, Stevens RF, Birch JM, Eden T. Increased frequency of Fanconi anemia group C genetic variants in children with sporadic acute myeloid leukemia. *Blood* 1998 Jun;91 (12):4813-4814.
279. Barber LM, McGrath HEN, Meyer S, Will AM, Birch JM, Eden OB, Taylor GM. Constitutional sequence variation in the Fanconi anaemia group C (FANCC) gene in childhood acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol* 2003 Apr;121 (1):57-62.
280. Verlander PC, Lin JD, Udono MU, Zhang Q, Gibson RA, Mathew CG, Auerbach AD. Mutation analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *Am. J. Hum. Genet* 1994 Apr;54 (4):595-601.
281. Gibson RA, Morgan NV, Goldstein LH, Pearson IC, Kesterton IP, Foot NJ, Jansen S, Havenga C, Pearson T, de Ravel TJ, Cohn RJ, Marques IM, Dokal I, Roberts I, Marsh J, Ball S, Milner RD, Llerena JC, Samochatova E, Mohan SP, Vasudevan P, Birjandi F, Hajianpour A, Murer-Orlando M, Mathew CG. Novel mutations and polymorphisms in the Fanconi anemia group C gene. *Hum. Mutat* 1996;8 (2):140-148.

282. Seal S, Barfoot R, Jayatilake H, Smith P, Renwick A, Bascombe L, McGuffog L, Evans DG, Eccles D, Easton DF, Stratton MR, Rahman N. Evaluation of Fanconi Anemia genes in familial breast cancer predisposition. *Cancer Res* 2003 Dec;63 (24):8596-8599.
283. Gibson RA, Hajianpour A, Murer-Orlando M, Buchwald M, Mathew CG. A nonsense mutation and exon skipping in the Fanconi anaemia group C gene. *Hum. Mol. Genet* 1993 Jun;2 (6):797-799.
284. Lo Ten Foe JR, Kruyt FA, Zweekhorst MB, Pals G, Gibson RA, Mathew CG, Joenje H, Arwert F. Exon 6 skipping in the Fanconi anemia C gene associated with a nonsense/missense mutation (775C-->T) in exon 5: the first example of a nonsense mutation in one exon causing skipping of another downstream. *Hum. Mutat* 1998;Suppl 1:S25-27.
285. Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M. A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nat. Genet* 1993 Jun;4 (2):202-205.
286. Ameziane N, Errami A, Léveillé F, Fontaine C, de Vries Y, van Spaendonk RML, de Winter JP, Pals G, Joenje H. Genetic subtyping of Fanconi anemia by comprehensive mutation screening. *Hum. Mutat* 2008 Jan;29 (1):159-166.
287. Yates J, Keeble W, Pals G, Ameziane N, van Spaendonk R, Olson S, Akkari Y, Pasquini R, Bagby G. Novel inactivating mutations of FANCC in Brazilian patients with Fanconi anemia. *Hum. Mutat* 2006 Feb;27 (2):214.
288. Chen M, Tomkins DJ, Auerbach W, McKerlie C, Youssoufian H, Liu L, Gan O, Carreau M, Auerbach A, Groves T, Guidos CJ, Freedman MH, Cross J, Percy DH, Dick JE, Joyner AL, Buchwald M. Inactivation of Fac in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat. Genet* 1996 Apr;12 (4):448-451.
289. Parker L, dos Santos C, Buchwald M. The delta327 mutation in the Fanconi anemia group C gene generates a novel transcript lacking the first two coding exons. *Hum. Mutat* 1998;Suppl 1:S275-277.
290. Yamashita T, Barber DL, Zhu Y, Wu N, D'Andrea AD. The Fanconi anemia polypeptide FACC is localized to the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994 Jul;91 (14):6712-6716.
291. Wevrick R, Clarke CA, Buchwald M. Cloning and analysis of the murine Fanconi anemia group C cDNA. *Hum. Mol. Genet* 1993 Jun;2 (6):655-662.

292. Brady G, Billia F, Knox J, Hoang T, Kirsch IR, Voura EB, Hawley RG, Cumming R, Buchwald M, Siminovitch K. Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr. Biol* 1995 Aug;5 (8):909-922.
293. Aubé M, Lafrance M, Brodeur I, Delisle M, Carreau M. Fanconi anemia genes are highly expressed in primitive CD34+ hematopoietic cells. *BMC Blood Disord* 2003 Jun;3 (1):1.
294. Krasnoshtein F, Buchwald M. Developmental expression of the Fac gene correlates with congenital defects in Fanconi anemia patients. *Hum. Mol. Genet* 1996 Jan;5 (1):85-93.
295. Heinrich MC, Silvey KV, Stone S, Zigler AJ, Griffith DJ, Montalto M, Chai L, Zhi Y, Hoatlin ME. Posttranscriptional cell cycle-dependent regulation of human FANCC expression. *Blood* 2000 Jun;95 (12):3970-3977.
296. Joenje H, Youssoufian H, Kruyt FA, dos Santos CC, Wevrick R, Buchwald M. Expression of the Fanconi anemia gene FAC in human cell lines: lack of effect of oxygen tension. *Blood Cells Mol. Dis* 1995;21 (3):182-191.
297. Tower PA, Christianson TA, Peters ST, Ostroski ML, Hoatlin ME, Zigler AJ, Heinrich MC, Rathbun RK, Keeble W, Faulkner GR, Bagby GC. Expression of the Fanconi anemia group C gene in hematopoietic cells is not influenced by oxidative stress, cross-linking agents, radiation, heat, or mitotic inhibitory factors. *Exp. Hematol* 1998 Jan;26 (1):19-26.
298. Youssoufian H. Localization of Fanconi anemia C protein to the cytoplasm of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994 Aug;91 (17):7975-7979.
299. Youssoufian H, Auerbach AD, Verlander PC, Steimle V, Mach B. Identification of cytosolic proteins that bind to the Fanconi anemia complementation group C polypeptide in vitro. Evidence for a multimeric complex. *J. Biol. Chem* 1995 Apr;270 (17):9876-9882.
300. Youssoufian H. Cytoplasmic localization of FAC is essential for the correction of a prerepair defect in Fanconi anemia group C cells. *J. Clin. Invest* 1996 May;97 (9):2003-2010.
301. Pang Q, Fagerlie S, Christianson TA, Keeble W, Faulkner G, Diaz J, Rathbun RK, Bagby GC. The Fanconi anemia protein FANCC binds to and facilitates the activation of STAT1 by gamma interferon and hematopoietic growth factors. *Mol. Cell. Biol* 2000 Jul;20 (13):4724-4735.
302. Pang Q, Keeble W, Christianson TA, Faulkner GR, Bagby GC. FANCC interacts with

- Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *EMBO J* 2001 Aug;20 (16):4478-4489.
303. Kupfer GM, Näf D, Suliman A, Pulsipher M, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia proteins, FAA and FAC, interact to form a nuclear complex. *Nat. Genet* 1997 Dec;17 (4):487-490.
  304. Hoatlin ME, Christianson TA, Keeble WW, Hammond AT, Zhi Y, Heinrich MC, Tower PA, Bagby GC. The Fanconi anemia group C gene product is located in both the nucleus and cytoplasm of human cells. *Blood* 1998 Feb;91 (4):1418-1425.
  305. Savoia A, Garcia-Higuera I, D'Andrea AD. Nuclear localization of the Fanconi anemia protein FANCC is required for functional activity. *Blood* 1999 Jun;93 (11):4025-4026.
  306. Hoatlin ME, Zhi Y, Ball H, Silvey K, Melnick A, Stone S, Arai S, Hawe N, Owen G, Zelent A, Licht JD. A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood* 1999 Dec;94 (11):3737-3747.
  307. Näf D, Kupfer GM, Suliman A, Lambert K, D'Andrea AD. Functional activity of the fanconi anemia protein FAA requires FAC binding and nuclear localization. *Mol. Cell. Biol* 1998 Oct;18 (10):5952-5960.
  308. Taniguchi T, D'Andrea AD. The Fanconi anemia protein, FANCE, promotes the nuclear accumulation of FANCC. *Blood* 2002 Oct;100 (7):2457-2462.
  309. Murer-Orlando M, Llerena JC, Birjandi F, Gibson RA, Mathew CG. FACC gene mutations and early prenatal diagnosis of Fanconi's anaemia. *Lancet* 1993 Sep;342 (8872):686.
  310. Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Joenje H, Arwert F. Novel frameshift mutation (1806insA) in exon 14 of the Fanconi anemia C gene, FAC. *Hum. Mutat* 1996;7 (3):264-265.
  311. van der Heijden MS, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003 May;63 (10):2585-2588.
  312. Lo ten Foe JR, Barel MT, Thuss P, Digweed M, Arwert F, Joenje H. Sequence variations in the Fanconi anaemia gene, FAC: pathogenicity of 1806insA and R548X and recognition of D195V as a polymorphic variant. *Hum. Genet* 1996 Nov;98 (5):522-523.
  313. Gavish H, dos Santos CC, Buchwald M. A Leu554-to-Pro substitution completely abolishes the functional complementing activity of the Fanconi anemia (FACC) protein. *Hum. Mol. Genet* 1993 Feb;2 (2):123-126.

314. Youssoufian H, Li Y, Martin ME, Buchwald M. Induction of Fanconi anemia cellular phenotype in human 293 cells by overexpression of a mutant FAC allele. *J. Clin. Invest* 1996 Feb;97 (4):957-962.
315. Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem. Pharmacol* 2004 Feb;67 (3):539-546.
316. Pagano G, Youssoufian H. Fanconi anaemia proteins: major roles in cell protection against oxidative damage. *Bioessays* 2003 Jun;25 (6):589-595.
317. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998 May;17 (9):2596-2606.
318. Kontou M, Will RD, Adelfalk C, Wittig R, Poustka A, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Thioredoxin, a regulator of gene expression. *Oncogene* 2004 Mar;23 (12):2146-2152.
319. Briot D, Macé-Aimé G, Subra F, Rosselli F. Aberrant activation of stress-response pathways leads to TNF-alpha oversecretion in Fanconi anemia. *Blood* 2008 Feb;111 (4):1913-1923.
320. Sejas DP, Rani R, Qiu Y, Zhang X, Fagerlie SR, Nakano H, Williams DA, Pang Q. Inflammatory reactive oxygen species-mediated hemopoietic suppression in Fancc-deficient mice. *J. Immunol* 2007 Apr;178 (8):5277-5287.
321. Pearl-Yafe M, Halperin D, Halevy A, Kalir H, Bielorai B, Fabian I. An oxidative mechanism of interferon induced priming of the Fas pathway in Fanconi anemia cells. *Biochem. Pharmacol* 2003 Mar;65 (5):833-842.
322. Rathbun RK, Faulkner GR, Ostroski MH, Christianson TA, Hughes G, Jones G, Cahn R, Maziarz R, Royle G, Keeble W, Heinrich MC, Grompe M, Tower PA, Bagby GC. Inactivation of the Fanconi anemia group C gene augments interferon-gamma-induced apoptotic responses in hematopoietic cells. *Blood* 1997 Aug;90 (3):974-985.
323. Haneline LS, Broxmeyer HE, Cooper S, Hangoc G, Carreau M, Buchwald M, Clapp DW. Multiple inhibitory cytokines induce deregulated progenitor growth and apoptosis in hematopoietic cells from Fac<sup>-/-</sup> mice. *Blood* 1998 Jun;91 (11):4092-4098.
324. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS. Fas antigen expression on CD34<sup>+</sup> human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 1995 Jun;85 (11):3183-3190.

325. Otsuki T, Nagakura S, Wang J, Bloom M, Grompe M, Liu JM. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and CD95 ligation suppress erythropoiesis in Fanconi anemia C gene knockout mice. *J. Cell. Physiol* 1999 Apr;179 (1):79-86.
326. Pang Q, Keeble W, Diaz J, Christianson TA, Fagerlie S, Rathbun K, Faulkner GR, O'Dwyer M, Bagby GC. Role of double-stranded RNA-dependent protein kinase in mediating hypersensitivity of Fanconi anemia complementation group C cells to interferon gamma, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and double-stranded RNA. *Blood* 2001 Mar;97 (6):1644-1652.
327. Pang Q, Christianson TA, Keeble W, Koretsky T, Bagby GC. The anti-apoptotic function of Hsp70 in the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. *J. Biol. Chem* 2002 Dec;277 (51):49638-49643.
328. Zhang X, Li J, Sejas DP, Rathbun KR, Bagby GC, Pang Q. The Fanconi anemia proteins functionally interact with the protein kinase regulated by RNA (PKR). *J. Biol. Chem* 2004 Oct;279 (42):43910-43919.
329. Freie B, Li X, Ciccone SLM, Nawa K, Cooper S, Vogelweid C, Schantz L, Haneline LS, Orazi A, Broxmeyer HE, Lee S, Clapp DW. Fanconi anemia type C and p53 cooperate in apoptosis and tumorigenesis. *Blood* 2003 Dec;102 (12):4146-4152.
330. Whitney MA, Royle G, Low MJ, Kelly MA, Axthelm MK, Reifsteck C, Olson S, Braun RE, Heinrich MC, Rathbun RK, Bagby GC, Grompe M. Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. *Blood* 1996 Jul;88 (1):49-58.
331. Carreau M, Gan OI, Liu L, Doedens M, Dick JE, Buchwald M. Hematopoietic compartment of Fanconi anemia group C null mice contains fewer lineage-negative CD34+ primitive hematopoietic cells and shows reduced reconstruction ability. *Exp. Hematol* 1999 Nov;27 (11):1667-1674.
332. Carreau M, Gan OI, Liu L, Doedens M, McKerlie C, Dick JE, Buchwald M. Bone marrow failure in the Fanconi anemia group C mouse model after DNA damage. *Blood* 1998 Apr;91 (8):2737-2744.
333. Li X, Yang Y, Yuan J, Hong P, Freie B, Orazi A, Haneline LS, Clapp DW. Continuous in vivo infusion of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) preferentially reduces myeloid progenitor numbers and enhances engraftment of syngeneic wild-type cells in Fanc $c$ <sup>-/-</sup> mice. *Blood* 2004 Aug;104 (4):1204-1209.
334. Hadjur S, Ung K, Wadsworth L, Dimmick J, Rajcan-Separovic E, Scott RW, Buchwald M, Jirik FR. Defective hematopoiesis and hepatic steatosis in mice with

- combined deficiencies of the genes encoding Fancc and Cu/Zn superoxide dismutase. *Blood* 2001 Aug;98 (4):1003-1011.
335. Pulliam-Leath AC, Ciccone SL, Nalepa G, Li X, Si Y, Miravalle L, Smith D, Yuan J, Li J, Anur P, Orazi A, Vance GH, Yang F, Hanenberg H, Bagby GC, Clapp DW. Genetic disruption of both Fancc and Fancg in mice recapitulates the hematopoietic manifestations of Fanconi anemia [Internet]. *Blood* 2010 Jul;[cited 2010 Jul 15 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606166>
336. Hays LE, Keeble WW, Yates JE, Rathbun RK, Koretsky T, Olson SB, Sun Z, Clapp DW, Bagby GC. Human FANCC is hypomorphic in murine Fancc-deficient cells [Internet]. *Blood* 2010 Jun;[cited 2010 Jul 15 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554974>
337. Hoshino T, Wang J, Devetten MP, Iwata N, Kajigaya S, Wise RJ, Liu JM, Youssoufian H. Molecular chaperone GRP94 binds to the Fanconi anemia group C protein and regulates its intracellular expression. *Blood* 1998 Jun;91 (11):4379-4386.
338. McConnell MJ, Licht JD. The PLZF gene of t (11;17)-associated APL. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 2007;313:31-48.
339. Dai M, Chevallier N, Stone S, Heinrich MC, McConnell M, Reuter T, Broxmeyer HE, Licht JD, Lu L, Hoatlin ME. The effects of the Fanconi anemia zinc finger (FAZF) on cell cycle, apoptosis, and proliferation are differentiation stage-specific. *J. Biol. Chem* 2002 Jul;277 (29):26327-26334.
340. Ikeda R, Yoshida K, Inoue I. Identification of FAZF as a novel BMP2-induced transcription factor during osteoblastic differentiation. *J. Cell. Biochem* 2007 May;101 (1):147-154.
341. McMahon LW, Walsh CE, Lambert MW. Human alpha spectrin II and the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCC interact to form a nuclear complex. *J. Biol. Chem* 1999 Nov;274 (46):32904-32908.
342. Sridharan D, Brown M, Lambert WC, McMahon LW, Lambert MW. Nonerythroid alphaII spectrin is required for recruitment of FANCA and XPF to nuclear foci induced by DNA interstrand cross-links. *J. Cell. Sci* 2003 Mar;116 (Pt 5):823-835.
343. McMahon LW, Zhang P, Sridharan DM, Lefferts JA, Lambert MW. Knockdown of alphaII spectrin in normal human cells by siRNA leads to chromosomal instability and decreased DNA interstrand cross-link repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2009 Apr;381 (2):288-293.
344. Durocher F, Labrie Y, Soucy P, Sinilnikova O, Labuda D, Bessette P, Chiquette J, Laframboise R, Lépine J, Lespérance B, Ouellette G, Pichette R, Plante M, Tavtigian

- SV, Simard J. Mutation analysis and characterization of ATR sequence variants in breast cancer cases from high-risk French Canadian breast/ovarian cancer families. *BMC Cancer* 2006;6:230.
345. Folias A, Matkovic M, Bruun D, Reid S, Hejna J, Grompe M, D'Andrea A, Moses R. BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA. *Hum. Mol. Genet* 2002 Oct;11 (21):2591-2597.
346. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 2001 Apr;105 (1):149-160.
347. Hussain S, Witt E, Huber PAJ, Medhurst AL, Ashworth A, Mathew CG. Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Hum. Mol. Genet* 2003 Oct;12 (19):2503-2510.
348. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol. Cell* 2006 Jun;22 (6):719-729.
349. Berwick M, Satagopan JM, Ben-Porat L, Carlson A, Mah K, Henry R, Diotti R, Milton K, Pujara K, Landers T, Dev Batish S, Morales J, Schindler D, Hanenberg H, Hromas R, Levran O, Auerbach AD. Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer. *Cancer Res* 2007 Oct;67 (19):9591-9596.
350. Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, Reid S, Spanova K, Barfoot R, Chagtai T, Jayatilake H, McGuffog L, Hanks S, Evans DG, Eccles D, Easton DF, Stratton MR. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat. Genet* 2007 Feb;39 (2):165-167.
351. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, Freund M, Lichtner P, Hartmann L, Schaal H, Ramser J, Honisch E, Kubisch C, Wichmann HE, Kast K, Deißler H, Engel C, Müller-Myhsok B, Neveling K, Kiechle M, Mathew CG, Schindler D, Schmutzler RK, Hanenberg H. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene [Internet]. *Nat Genet* 2010 Apr;[cited 2010 Apr 20 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400964>
352. Zhang J, Zhao D, Park HK, Wang H, Dyer RB, Liu W, Klee GG, McNiven MA, Tindall DJ, Molina JR, Fei P. FAVL elevation in human tumors disrupts Fanconi anemia pathway signaling and promotes genomic instability and tumor growth [Internet]. *J Clin Invest* 2010 Apr;[cited 2010 Apr 22 ] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20407210>

353. Wacholder S, Hartge P, Prentice R, Garcia-Closas M, Feigelson HS, Diver WR, Thun MJ, Cox DG, Hankinson SE, Kraft P, Rosner B, Berg CD, Brinton LA, Lissowska J, Sherman ME, Chlebowski R, Kooperberg C, Jackson RD, Buckman DW, Hui P, Pfeiffer R, Jacobs KB, Thomas GD, Hoover RN, Gail MH, Chanock SJ, Hunter DJ. Performance of common genetic variants in breast-cancer risk models. *N. Engl. J. Med* 2010 Mar;362 (11):986-993.
354. Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA, Markham AF. Vertebrate pseudogenes. *FEBS Lett* 2000 Feb;468 (2-3):109-114.
355. Kanu N, Penicud K, Hristova M, Wong B, Irvine E, Plattner F, Raivich G, Behrens A. The ATM cofactor ATMIN protects against oxidative stress and accumulation of DNA damage in the aging brain. *J. Biol. Chem* 2010 Dec;285 (49):38534-38542.
356. Kanu N, Behrens A. ATMIN defines an NBS1-independent pathway of ATM signalling. *EMBO J* 2007 Jun;26 (12):2933-2941.
357. Kanu N, Behrens A. ATMINstrating ATM signalling: regulation of ATM by ATMIN. *Cell Cycle* 2008 Nov;7 (22):3483-3486.
358. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 2010 Jun;465 (7301):1033-1038.
359. Palagyi A, Neveling K, Plinninger U, Ziesch A, Targosz B, Denk GU, Ochs S, Rizzani A, Meier D, Thasler WE, Hanenberg H, De Toni EN, Bassermann F, Schafer C, Goke B, Schindler D, Gallmeier E. Genetic inactivation of the Fanconi anemia gene FANCC identified in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 confers sensitivity towards DNA-interstrand crosslinking agents. *Mol Cancer* 2010 May;9 (1):127.