



# **La réparation de l'ADN par la recombinaison homologue et le développement de molécules anticancéreuses**

**Thèse**

**Joris Pauty**

**Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire**

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Joris Pauty, 2015



## Résumé

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. Il est à présent établi que les mutations de l'information génétique des cellules initient et participent à son développement, et que certaines mutations transmises au sein des familles prédisposent à son apparition. C'est le cas notamment des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* qui prédisposent aux cancers du sein et de l'ovaire. Les protéines produites par ces gènes sont directement impliquées dans la protection de l'information génétique puisqu'elles participent à la réparation des cassures se produisant dans le support de cette information : l'ADN. L'ADN peut être endommagé par diverses lésions mais les plus déstabilisatrices de l'information génétique sont les cassures double-brin. Afin de protéger son génome, la cellule possède de nombreux mécanismes de réparation dont la recombinaison homologue qui permet une réparation fidèle, c'est-à-dire sans perte ou modification de l'information génétique, permettant ainsi de prévenir l'apparition du cancer. La recombinaison homologue repose principalement sur l'activité de la protéine RAD51 qui nécessite l'utilisation des médiateurs BRCA2 et PALB2. Tout comme les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, *PALB2* est un gène suppresseur de tumeur et ses mutations ont été associées avec une susceptibilité aux cancers du sein, de l'ovaire et du pancréas. En plus de la chirurgie, le traitement de ces cancers implique la radiothérapie et la chimiothérapie. Celles-ci font l'objet d'intenses recherches afin de proposer de nouveaux traitements plus efficaces avec moins d'effets secondaires. De nouvelles stratégies chimiothérapeutiques ont notamment émergé et on s'oriente à présent vers le développement de traitements personnalisés qui sont basés sur une meilleure connaissance des spécificités moléculaires des tumeurs.

Les travaux présentés dans cette thèse apportent de nouvelles informations concernant le rôle de PALB2 dans la protection du génome lors du stress réplicatif et sur la régulation de ses fonctions par le contrôle de sa localisation cellulaire. Plus précisément, nous montrons que PALB2 et BRCA2 permettent de maintenir la Polymérase  $\eta$  au niveau des fourches de réplication bloquées et stimulent son activité de synthèse de l'ADN pour réinitier la réplication. Grâce à l'analyse de mutations germinales identifiées dans des cancers du sein et de l'ovaire, nous révélons la présence d'une séquence d'export nucléaire qui provoque l'exclusion de PALB2 du noyau vers le cytoplasme. Enfin, nous rapportons le développement d'une nouvelle molécule chimiothérapeutique, SFOM-0046, qui provoque des cassures double-brin de l'ADN en induisant un stress réplicatif et qui potentialise les effets de l'UCN-01, une molécule qui a été étudiée en clinique. Nous proposons l'utilisation de cette nouvelle molécule comme agent d'amélioration de thérapies ciblées existantes ou pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses personnalisées.



# Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières .....	v
Liste des abréviations .....	ix
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xv
Remerciements .....	xix
Avant-Propos .....	xxiii
<b>Chapitre 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1. Introduction .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. La réponse aux cassures double-brin de l'ADN.....</b>	<b>4</b>
1.1.1. La surveillance du génome: les points de contrôle et la détection des cassures .....	4
1.1.1.1. <i>Les acteurs moléculaires des points de contrôle.....</i>	<i>6</i>
1.1.1.2. <i>Le point de contrôle G1/S .....</i>	<i>7</i>
1.1.1.3. <i>Le point de contrôle intra-S.....</i>	<i>8</i>
1.1.1.4. <i>Le point de contrôle G2/M.....</i>	<i>8</i>
1.1.1.5. <i>Le point de contrôle de restauration de la réplication.....</i>	<i>10</i>
1.1.1.6. <i>La détection et la signalisation d'une cassure double-brin .....</i>	<i>10</i>
1.1.2. La réparation des cassures double-brin .....	13
1.1.2.1. <i>La jonction d'extrémités non-homologues : les voies classique et alternative .....</i>	<i>14</i>
1.1.2.2. <i>La recombinaison homologue.....</i>	<i>17</i>
1.1.2.3. <i>L'appariement des extrémités protubérantes simple-brin.....</i>	<i>20</i>
1.1.3. Les maladies associées à un défaut de la réparation de l'ADN .....	21
<b>1.2. Focus sur certains acteurs de la réparation de l'ADN .....</b>	<b>23</b>
1.2.1. La recombinaison RAD51 .....	23
1.2.2. BRCA1 et BRCA2 .....	24
1.2.2.1. <i>BRCA1 .....</i>	<i>24</i>
1.2.2.2. <i>BRCA2 .....</i>	<i>24</i>
1.2.3. PALB2 et les ADN polymérases .....	26
1.2.3.1. <i>Le suppresseur de tumeur PALB2.....</i>	<i>26</i>
1.2.3.2. <i>Les ADN polymérases dans la réparation des dommages à l'ADN .....</i>	<i>26</i>
<b>1.3. Les stratégies thérapeutiques contre le cancer utilisant les cassures double-brin.....</b>	<b>28</b>
1.3.1. Les stratégies thérapeutiques .....	28
1.3.1.1. <i>Les stratégies existantes et leurs perspectives de développement.....</i>	<i>28</i>
1.3.1.2. <i>Le principe de létalité synthétique .....</i>	<i>29</i>
1.3.2. Les agents thérapeutiques conventionnels .....	31
1.3.2.1. <i>La radiothérapie .....</i>	<i>31</i>
1.3.2.2. <i>La chimiothérapie .....</i>	<i>31</i>
1.3.2.3. <i>Les inhibiteurs de topoisomérase .....</i>	<i>31</i>
1.3.3. Les nouvelles classes d'agents thérapeutiques en développement .....	34
1.3.3.1. <i>Les inhibiteurs de PARP.....</i>	<i>34</i>
1.3.3.2. <i>Les inhibiteurs des senseurs des cassures double-brin et du cycle cellulaire .....</i>	<i>35</i>
1.3.3.3. <i>Les inhibiteurs du NHEJ.....</i>	<i>36</i>
1.3.3.4. <i>Les inhibiteurs de la Recombinaison Homologue .....</i>	<i>37</i>
1.3.4. Les limites et perspectives des traitements.....	39
<b>Objectifs .....</b>	<b>41</b>

<b>Chapitre 2</b> .....	<b>43</b>
<b>Chapitre 2. Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer</b> .....	<b>45</b>
Résumé .....	47
Avant-Propos .....	49
Abstract .....	51
<b>2.1. Introduction</b> .....	<b>53</b>
<b>2.2. PALB2: a key player for genome stability</b> .....	<b>54</b>
2.2.1. Brief overview of BRCA2 functions .....	54
2.2.2. Contributions of PALB2 to genome maintenance and HR .....	55
2.2.3. MRG15: another key interactor of PALB2 .....	57
2.2.4. PALB2 is an FA gene .....	57
<b>2.3. PALB2: an important tumour suppressor</b> .....	<b>58</b>
2.3.1. Mutations of <i>PALB2</i> in female and male breast cancer .....	58
2.3.2. Mutations of <i>PALB2</i> in ovarian cancer .....	60
2.3.3. <i>PALB2</i> mutations in pancreatic cancer .....	61
2.3.4. Insights from animal models .....	61
2.3.5. Functional studies of disease-related mutations .....	62
2.3.6. Using PALB2 defect as a therapeutic strategy .....	64
<b>Figures</b> .....	<b>65</b>
<b>References</b> .....	<b>70</b>
<b>Chapitre 3</b> .....	<b>77</b>
<b>Chapitre 3. Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase <math>\eta</math> in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks</b> .....	<b>79</b>
Résumé .....	81
Avant-Propos .....	83
Abstract .....	85
<b>3.1. Introduction</b> .....	<b>87</b>
<b>3.2. Results</b> .....	<b>89</b>
3.2.1. PALB2 and BRCA2 promote the accumulation of Pol $\eta$ at collapsed replication forks. ...	89
3.2.2. Purified PALB2 and BRCA2 stimulate Pol $\eta$ .....	90
3.2.3. Direct interaction between Pol $\eta$ and PALB2 or BRCA2 is required for stimulation of DNA synthesis .....	91
<b>3.3. Discussion</b> .....	<b>92</b>
3.3.1. PALB2 and BRCA2: two important players at blocked DNA replication forks .....	92
3.3.2. More than one polymerase is required for effective HR .....	93
<b>3.4. Conclusion</b> .....	<b>94</b>
<b>Experimental procedures</b> .....	<b>95</b>
<b>Figures</b> .....	<b>97</b>
<b>References</b> .....	<b>104</b>
<b>Supplementary experimental procedures</b> .....	<b>107</b>
<b>Supplementary figures</b> .....	<b>112</b>
<b>Supplemental References</b> .....	<b>125</b>
<b>Chapitre 4</b> .....	<b>127</b>
<b>Chapitre 4. An hidden nuclear export signal revealed by a cancer-causing mutation in PALB2</b> .....	<b>129</b>
Résumé .....	131
Avant-Propos .....	133
Abstract .....	135
<b>4.1. Introduction</b> .....	<b>137</b>

<b>4.2. Results</b> .....	<b>138</b>
4.2.1. PALB2 DNA binding is required to stimulate RAD51 activity.....	138
4.2.2. Mutation leading to a truncation in the WD40-domain induces a cellular mislocalization .....	139
4.2.3. The Q988X cancer-causing mutation also cause cytoplasmic accumulation.....	139
4.2.4. PALB2 WD40 masks a nuclear export sequence.....	140
<b>4.3. Discussion</b> .....	<b>140</b>
<b>Materials and Methods</b> .....	<b>142</b>
<b>Figures</b> .....	<b>144</b>
<b>References</b> .....	<b>148</b>
<b>Supplementary materials and methods</b> .....	<b>150</b>
<b>Supplementary figures</b> .....	<b>155</b>
<b>Chapitre 5</b> .....	<b>163</b>
<b>Chapitre 5. SFOM-0046, a Novel Small-Molecule Drug Activating Selectively the ATR-Chk1 Pathway and Potentiating the Cytocidal Activity of a Chk1 Inhibitor in M21 Melanoma Cells</b> .....	<b>165</b>
Résumé .....	167
Avant-Propos.....	169
Abstract.....	171
5.1. Introduction.....	173
5.2. Materials and Methods .....	174
5.3. Results.....	176
5.4. Discussion.....	178
Figures.....	180
References.....	186
<b>Chapitre 6</b> .....	<b>189</b>
<b>Chapitre 6. Discussion</b> .....	<b>191</b>
<b>6.1. PALB2 et BRCA2 stimulent la polymérase <math>\eta</math> au niveau des fourches de réplication bloquées</b> .....	<b>191</b>
6.1.1. D'autres polymérases pourraient être impliquées dans la synthèse de l'ADN dans la réparation des CDB par RH .....	192
6.1.2. PALB2 et BRCA2 ont un rôle potentiel dans le stress réplicatif, indépendant de la réparation des CDB.....	193
<b>6.2. Une mutation tronquante de PALB2 révèle un NES dans le WD40</b> .....	<b>194</b>
6.2.1. Le fonctionnement de PALB2 pourrait être régulé par son NES.....	195
6.2.2. Le NES de PALB2 pourrait devenir une cible pour le développement de stratégies thérapeutiques .....	197
<b>6.3. Une nouvelle molécule prometteuse pour le traitement de cancers</b> .....	<b>199</b>
6.3.1. SFOM-0046 sensibilise les cellules cancéreuses à l'inhibition de CHK1 par l'UCN-01, dépendamment du statut de p53.....	200
6.3.2. La Topoisomérase I pourrait être la cible thérapeutique de SFOM-0046.....	201
<b>Conclusion</b> .....	<b>203</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>205</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>213</b>





## Liste des abréviations

14-3-3	<i>"14-3-3 protein theta"</i>
3'-OH	groupement hydroxyle à l'extrémité 3'
5'-P	groupement phosphate à l'extrémité 5'
53BP1	<i>"p53-Binding Protein 1"</i>
5FU	5-FluoroUracil
9-1-1	complexe RAD9-RAD1-HUS1
ABL	<i>"Tyrosine-protein kinase ABL1"</i>
ABRAXAS	<i>"BRCA1-A complex subunit Abraxas"</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNdb	ADN double-brin
ADNsb	ADN simple-brin
ADP	Adénosine DiPhosphate
AKT-1	<i>"Serine/threonine-protein kinase akt-1"</i>
alt-NHEJ	<i>"Alternative NHEJ"</i>
APC	<i>"Adenomatous polyposis coli protein"</i>
APE1	<i>"DNA-(Apurinic or Apyrimidinic site) lyase"</i>
APRIN	<i>"Androgen-induced Proliferation INhibitor"</i>
ARN (m)	Acide RiboNucléique (messager)
ATLD	<i>"Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder"</i>
ATM	<i>"Ataxia Telangiectasia Mutated"</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATR	<i>"ATM and RAD3 related"</i>
ATRIP	<i>"ATR-Interacting Protein"</i>
BARD1	<i>"BRCA1-Associated RING Domain protein 1"</i>
BCR	<i>"Breakpoint cluster region protein"</i>
BER	Réparation par excision de base ("Base Excision Repair")
BIR	<i>"Break Induced Réplication"</i>
BLM	<i>"Bloom syndrome Mutated protein"</i>
BRCA1/2	<i>"Breast CAncer 1/2, early onset"</i>
BRCC36	<i>"Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36"</i>
BRCC45	<i>"BRCA1-A complex subunit BRE"</i>
BRCT	<i>"BRCA1 C Terminus domain"</i>
CAM	"ChorioAllantoic Membrane"
CDB	Cassure Double-Brin
CDC	<i>"Cell Division Control"</i>
CDC25 A/B/C	<i>"Cell Division Cycle 25 A/B/C"</i>
cf.	confer (reportez-vous à)
CDK	<i>"Cyclin-Dependent Kinase"</i>
CHK1/CHK2	<i>"CHeckpoint Kinase 1/2"</i>
CRM1	<i>"Chromosome Region Maintenance 1" / Exportine 1 / XPO1</i>
CSB	Cassure Simple-Brin
CtIP	<i>"C-terminal binding protein Interacting Protein"</i>
D-loop	boucle de déplacement ("Displacement-loop")
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DBD	domaine de liaison à l'ADN ("DNA Binding Domain")
DDB1	<i>"DNA Damage-Binding protein 1"</i>
DDR	<i>"DNA Damage Response"</i>
DIDS	acide 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonique
DNA-PKcs	<i>"DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit"</i>
DNA2	<i>"DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2"</i>
DNAPK	gene codant la protéine DNA-PKcs
dNTP	désoxyribonucléotides
DSBR	<i>"Double-Strand Break Repair"</i>
DSS1	<i>"26S proteasome complex subunit DSS1"</i>

E2F	facteur de transcription de la famille E2F
EME1	<i>"Essential Meiotic Endonuclease 1"</i>
EMSA	<i>"Electrophoretic Mobility Shift Assay"</i>
ERCC1	<i>"DNA excision repair protein Excision Repair Cross-Complementation group 1"</i>
EXO1	EXOnucléase 1
FA	Anémie de Fanconi ( <i>"Fanconi Anemia"</i> )
FANC	gène ou protéine Fanconi
G1/G2 (phase)	phase d'intervalle ( <i>"gap"</i> ) 1/2
GDP	Guanosine-5'-Diphosphate
GEN1	<i>"XPG-like endonuclease"</i>
GFP/eGFP	<i>"(enhanced) Green Fluorescent Protein"</i>
GTP	Guanosine-5'-Triphosphate
H2AX	variant d'histone H2A
HDAC	Histone DésACétylase
HEK293T	cellules immortalisées de rein embryonnaire humain exprimant l'antigène T du virus SV40
HeLa	cellules provenant d'un carcinome humain du col utérin
HT1080	cellules provenant d'un fibrosarcome humain
HT29	cellules provenant d'un adénocarcinome colorectal humain
HTC116	cellules provenant d'un carcinome colorectal humain
HU	HydroxyUrée
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (c'est-à-dire)
ICL	pontage interbrin de l'ADN ( <i>"Interstrand CrossLink"</i> )
JH	Jonction de Holliday
kDa	kilodalton
KU70/80	sous-unité 70/80kDa de l'antigène Ku
LIG4	ADN Ligase 4
M21	cellules provenant d'un mélanome humain
MAPK	<i>"Mitogen Activated Protein Kinase"</i>
MCF7	cellules provenant d'un adénocarcinome du sein humain
MDA-MB-231	cellules provenant d'un adénocarcinome du sein humain
MDC1	<i>"Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1"</i>
MERIT40	<i>"Mediator of RAP80 interactions and targeting subunit of 40 kDa"</i>
MMC	Mitomycine C
MMEJ	<i>"Microhomology-Mediated End Joining"</i>
MRE11	<i>"Meiotic REcombination protein 11"</i>
MRN	complexe MRE11-RAD50-NBS1
MUS81	<i>"MMS and UV Sensitive protein 81"</i>
NBS	<i>"Nijmegen Breakage Syndrome"</i>
NBS1	<i>"Nijmegen Breakage Syndrome protein 1"</i>
NCS	NéoCarzinoStatine
NER	Réparation par excision de nucléotide ( <i>"Nucleotide Excision Repair"</i> )
NES	<i>"Nuclear Export Signal/Sequence"</i>
NHEJ	jonction d'extrémités non-homologues ( <i>"Non-Homologous End Joining"</i> )
NLS	<i>"Nuclear Localization Signal/Sequence"</i>
NPC	complexe du pore nucléaire ( <i>"Nuclear Pore Complex"</i> )
p21	<i>"Cyclin-dependent kinase inhibitor 1"</i> (CDK1NA, CIP1)
p27	<i>"Cyclin-dependent kinase inhibitor p27"</i>
p53/TP53	<i>"cellular tumor antigen p53"</i> protéine/gène
PALB2	<i>"Partner and Localizer of BRCA2"</i>
PARP	<i>"Poly(ADP-Ribose) Polymerase"</i>
PARPi	inhibiteur de PARP ( <i>"PARP inhibitors"</i> )
PCNA	<i>"Proliferating Cell Nuclear Antigen"</i>
PCR	<i>"Polymerase Chain Reaction"</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIKK	<i>"PI3K-like Kinase"</i>
Pol	polymérase

PTEN	<i>"Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN"</i>
PUB-SO	composés N-phenyl ureidobenzènesulfonates
RAD	<i>"Role of Radiation"</i>
RAD17	<i>"Cell cycle checkpoint protein RAD17"</i>
RAD50	<i>"DNA repair protein RAD50"</i>
RAD51/52	<i>"DNA repair protein Rad51/52 homolog"</i>
RAD51AP1	<i>"RAD51-Associated Protein 1"</i>
RAD54	<i>"DNA repair and recombination protein RAD54-like"</i>
Ran	<i>"RAs-related Nuclear protein"</i>
RAP80	<i>"BRCA1-A complex subunit Receptor Associated Protein 80"</i>
RB	<i>"RetinoBlastoma associated protein"</i>
RecA	<i>"Recombination protein A"</i>
RecQ	<i>"Recombination protein Q"</i>
RFC	<i>"Replication Factor C"</i>
RH	Recombinaison Homologue
RING	<i>"Really Interesting New Gene domain"</i>
RMI1	<i>"RecQ-mediated genome instability protein 1"</i>
RNF8/168	<i>"RiNg Finger protein 8/168"</i>
RPA	<i>"Replication Protein A"</i>
S (phase)	phase de Synthèse de l'ADN
SCID	Déficit immunitaire combiné sévère ( <i>"Severe Combined Immune Deficiency"</i> )
SDSA	<i>"Synthesis-Dependent Strand Annealing"</i>
shRNA	<i>"short hairpin RNA"</i>
SINE	<i>"Selective Inhibitors of Nuclear Export"</i>
siRNA	<i>"small interfering RNA"</i>
SLX1/SLX4	<i>"Synthetic Lethal of unknown function protein 1/4"</i>
SMC1	<i>"Structural Maintenance of Chromatin 1"</i>
SSA	<i>"Single Strand Annealing"</i>
TEL	<i>"Transcription factor ETV6"</i>
TIP60	<i>"60kDa Tat-Interactive Protein"</i>
TLS	<i>"TransLesion Synthesis"</i>
TOP1/2/3	DNA topoisomerase I, II, III
TOPBP1	<i>"Topoisomerase II-Binding Protein 1"</i>
TOPcc	<i>"Topoisomerase cleavage complex"</i>
U2OS	cellules provenant d'un ostéosarcome humain
UV	Ultraviolet
V(D)J	<i>"Variable (Diversity) and Joining"</i>
vs	versus (par opposition à)
WD40	motif de 40 acides aminés se terminant par W (Tryptophane) et D (Acide Aspartique)
WEE1	<i>"Wee1-like protein kinase"</i>
XAB2	<i>"XPA-Binding protein 2"</i>
XLF	<i>"XRCC4-like Factor"</i>
XPF/XPG	<i>"Xeroderma Pigmentosum, groupe de complementation F/G"</i>
XPV	<i>"Xeroderma Pigmentosum Variant"</i>
XRCC1/2/3/4	<i>"X-ray Repair Cross-Complementing protein group 1/2/3/4"</i>



# Liste des tableaux

## Chapitre 1

Tableau 1. Les acteurs des points de contrôles .....	6
Tableau 2. Les interactions synthétiques létales démontrées .....	30



# Liste des figures

## Chapitres 1 et 6

Figure 1.	La formation des cassures double-brin de l'ADN.....	2
Figure 2.	Le cycle cellulaire et les points de contrôle .....	5
Figure 3.	Les voies moléculaires des points de contrôle de réponse aux dommages à l'ADN.....	9
Figure 4.	Contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN et au stress réplicatif .....	10
Figure 5.	La détection et la signalisation d'une cassure double-brin de l'ADN .....	11
Figure 6.	Les voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN .....	13
Figure 7.	La réparation d'une cassure double-brin par la jonction d'extrémités non-homologues.....	15
Figure 8.	La réparation d'une cassure double-brin par la recombinaison homologue .....	16
Figure 9.	Les structures secondaires de l'ADN se formant au cours de la recombinaison homologue et les mécanismes de leur retrait .....	19
Figure 10.	Les domaines de BRCA1 et BRCA2 .....	25
Figure 11.	Le principe de létalité synthétique dans le contexte du cancer .....	29
Figure 12.	Le fonctionnement de la Topoisomérase I et le mode d'action des inhibiteurs .....	33
Figure 13.	Exemple de stratégie ciblée utilisant l'inhibition des points de contrôle.....	35
Figure 14.	La voie d'export nucléaire utilisant CRM1 .....	195





*À mes parents,  
Puissè-je les rendre aussi fiers que je le suis de les avoir pour parents.*

*À mes grands-parents, ma sœur et mes nièces, qui sont ma force d'avancer.*

*À la mémoire de Denise,  
Ton départ prématuré a laissé un grand vide, mais surtout des souvenirs que nous chérissons précieusement  
et réchauffent nos cœurs quand nous en avons besoin.  
En ta mémoire, puissent mes travaux participer, même en proportion infime, à sauver des vies.*



## Remerciements

*Ces quatre années de doctorat ont été riches en rencontres et je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à mon enrichissement tant sur le plan professionnel que personnel.*

*Premièrement, je veux remercier mon directeur de recherche, Dr Jean-Yves Masson, pour sa confiance et son mentorat. Au fil du temps nous avons développé une relation franche qui a grandement participé à mon développement en tant que scientifique et membre de son équipe. Tout ce que j'ai appris à son contact portera ses fruits encore pour de nombreuses années et tout au long de ma carrière, et je lui en suis infiniment reconnaissant. La confiance qu'il m'a témoigné en pensant à m'impliquer ou en me faisant contribuer à de nombreux projets, m'ont touché, et bien que malheureusement nombreux sont les projets qui n'ont pas abouti, j'espère avoir eu une contribution conséquente à son laboratoire qui lui rende ne serait-ce même qu'une fraction de ce que travailler pour et avec lui m'ont apporté. Merci aussi de la latitude de travail que tu m'as laissé: l'autonomie, le développement de nouvelles technologies et l'implication dans des projets allant du biochimique au patient, ont satisfait mon goût pour la Science et ont permis mon épanouissement, me faisant à présent sentir prêt pour l'étape suivante. De nombreux autres mercis pourraient suivre mais je ne veux pas surcharger la lecture de cette thèse, je résumerais en disant que ce fut un honneur de faire partie de son équipe.*

*Je souhaite également remercier Dr René C.-Gaudreault pour avoir accepté mon implication dans ses projets de recherche. Cette fenêtre ouverte sur le monde des chimistes est une des choses que j'ai le plus chéri au cours de mon doctorat ; elle m'offrait l'ouverture scientifique que je souhaite avoir dans ma future carrière. J'espère avoir également apporté une contribution à son laboratoire et ce n'est pas sans regret que je ne travaillerai plus sur les N-phenyl ureidobenzenesulfonates, chloroethylurées, SFOM et autres noms improbables.*

*Je remercie les collaborateurs qui m'ont accepté au sein de leurs équipes ou sur leur projets. Tout d'abord merci au Dr Sébastien Fortin, ce fut un plaisir d'assister à nos nombreuses réunions de "brainstorming" sur comment le SFOM-0046 pourrait agir et d'aider son équipe à mettre au point certains essais. Merci également au Dr Dimcho Bachvarov ainsi que Magdalena Bachvarova, il m'a toujours été agréable d'aller à leur laboratoire pour utiliser le xCELLigence, quérir ou donner des informations et j'ai grandement apprécié la confiance qu'ils m'ont témoigné lorsqu'ils sollicitaient mon aide. Je remercie aussi Dr Fabrice Fleury, Dre Axelle Renodon-Cornière et Dr Masayuki Takahashi de m'avoir accueilli au sein de leur équipe à Nantes et initié à la biologie structurale ; une fois de plus cela m'a permis de développer mon ouverture scientifique et de découvrir le milieu de la recherche en France. Finalement, je remercie Dre Anne-Marie Mes-Masson et son équipe pour leur aide précieuse dans le développement de la technique des xénogreffes et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur des tissus de patients ; sans cette expérience ma formation de doctorat n'aurait pas été complète.*

*Un merci particulier à Marie-France Côté avec qui collaborer fut un plaisir immense doublé d'un grand enrichissement ; sa bonne humeur, sa sympathie et son professionnalisme en font une collègue idéale avec qui il fait bon collaborer, elle restera une personne clefs de ma formation professionnelle.*

*Je souhaite aussi remercier vivement Dre Isabelle Brodeur pour l'aide à la correction des manuscrits, ses commentaires sur ma thèse, ainsi que son énergie communicative ; nos rencontres ont été rares mais j'en retiens le ton passionné avec lequel elle parle de science et son énergie enthousiasmante.*

*Je suis aussi reconnaissant à toutes les personnes qui ont à un moment contribué significativement à ma formation, en particulier : Émilie Chouinard et l'équipe de l'animalerie pour leur patience et leur aide dans la mise en place de la technique de xénogreffe en souris ; Dr Guy Poirier et Dr Darren Richard ainsi que leurs équipes respectives ; Dr Michel Lebel ; Dre Josée Lavoie ; Dre Amélie Fradet-Turcotte et Dre Guila Delouya.*

*J'en viens à présent à remercier tous les membres actuels de l'équipe, en commençant par celle que je considère comme ma "mentor au bench" : Dre Amélie Rodrigue. Malheureusement nous n'avons pas eu beaucoup de temps pour travailler ensemble mais lorsque ce fut le cas, ce fut un plaisir. Travailler à ses côtés et interagir avec elle ont été des plus enrichissant ; elle fut une personne essentielle de mon doctorat. Merci ensuite à Yan Coulombe qui est sans pareil pour trouver des solutions aux soucis quotidiens auxquels on doit faire face dans un laboratoire et sait comment apporter un peu de détente. Merci à Marie-Christine Carron pour sa bonne compagnie de tous les jours ; elle fut souvent une compagne de salle de culture qui aidait à faire passer les longues heures de travail sous hotte et c'est un plaisir de lui passer le relai pour les xénogreffes. Je suis aussi très reconnaissant envers le reste de l'équipe, en commençant par les garçons : Anthony Couturier, que ce fut un plaisir de former à son arrivée pour ensuite collaborer à son projet prometteur et à qui je dois beaucoup pour son aide en informatique ; Denis Velic, avec qui je suis enthousiaste de développer le FRET et à qui je souhaite une belle réussite dans ce projet que je lui lègue non sans une petite larme ; Dr Hemantha Adhikary, dont la présence calme et discrète est essentielle à l'atmosphère du laboratoire, sans compter ses mots de soutien ; Niraj Joshi, qui à l'inverse est expansif et participe activement à l'ambiance ; et enfin Kenny Dubois, qui me tient compagnie au bench. Merci aux filles : Marie-Michelle Genois qui fut un exemple à bien des égards ; Stéphanie Bérubé, dont la curiosité et le sarcasme m'ont stimulé autant que divertit ; Émilie Dubois, avec qui j'ai ri plus d'une fois, notamment en constatant qu'elle voulait me former à des techniques que je lui avais enseignées, ce fut de plus un plaisir de collaborer à son projet qui me permettait de rester connecté à un monde que je ne faisais qu'effleurer, celui de l'Anémie de Fanconi. Je les remercie tous pour ce qu'ils m'ont apporté.*

*Je tiens à remercier aussi les membres qui ont à présent quitté le laboratoire en commençant par Hélène Launay, Karine Drapeau et Dre Jana Krietsch qui, en plus d'avoir été une aide précieuse d'un point de vue scientifique, ont principalement contribué à me faire sentir accueilli et membre de l'équipe. Je remercie également Dr Rémi Buisson, Dr Ranjan Maity, Dr Julien Vignard, Dr Cyril Charbonnel et Gowsica Ramakrishan qui m'ont chacun apporté quelque chose sur le plan professionnel ou personnel, parfois de manière surprenante.*

*Mes remerciements les plus personnels vont aux Dre Laëtitia Coudert, Dr Xuan Bich Trinh, Dr Zhi Qiang Wang et Sophie Mokas, ainsi que tous mes amis rencontrés ici et ailleurs, dont le soutien et les critiques ont été primordiaux pour me permettre de passer au travers de ces quatre années.*

*Je me dois de souligner la contribution généreuse des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) qui a servi à financer la majeure partie de mes travaux de doctorat, ainsi que celles de la Commission permanente de coopération franco-québécoise (CPCFQ) et de Cancer de l'Ovaire Canada qui prirent la forme de bourses de voyage pour des stages dans des laboratoires d'accueil.*

*J'aimerais terminer en exprimant ma reconnaissance envers les membres du jury, qui se compose du Dr Dimcho Bachvarov, Dr Lionel Berthoux, Dr René C.-Gaudreault, et Dr Jean-Yves Masson, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.*

*Que la lecture de cette thèse vous soit agréable.*



## Avant-Propos

Les travaux présentés dans cette thèse sont le résultat de quatre années d'études réalisées au sein du laboratoire du Dr Jean-Yves Masson. Au cours de ces années, j'ai contribué à titre de premier auteur à la conception de quatre manuscrits, et en tant que troisième auteur, à un manuscrit. Ceux-ci n'auraient naturellement pas vu le jour sans l'aide des coauteurs cités ci-dessous.

Le premier manuscrit, qui constitue le chapitre 2 de cette thèse, est une revue de la littérature sur la protéine PALB2 et fut publié dans la revue *Biochemical Journal* (Pauty J., Rodrigue A., Couturier A., Buisson R., Masson J.-Y. (2014) *Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer*. *Biochemical Journal* 460, 331-342).

L'opportunité m'a été donné de rejoindre le projet portant sur l'étude du rôle de PALB2 dans l'étape de polymérisation de l'ADN lors de la recombinaison homologe (chapitre 3). Ces travaux ont été publiés dans la revue *Cell Reports* (Buisson R., Niraj J., Pauty J., Maity R., Zhao W., Coulombe Y., Sung P., Masson J.-Y. (2013) *Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate Polymerase  $\eta$  in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks*. *Cell reports* 6, 553-564).

Mon premier projet principal portait sur l'étude de l'effet des mutations de *PALB2* sur les fonctions de la protéine. Le manuscrit présentant les résultats de ces travaux est en préparation pour soumission à la revue *Cancer Discovery* en tant que "Research Brief" et est présenté au chapitre 4.

Mon second projet principal était une collaboration avec le laboratoire du Dr Sébastien Fortin et consistait à étudier les propriétés antitumorales de la nouvelle molécule SFOM-0046 (chapitre 5). Le manuscrit a été soumis à la revue *Molecular Cancer Therapeutics*, et est en cours de révision lors de la rédaction de cette thèse.

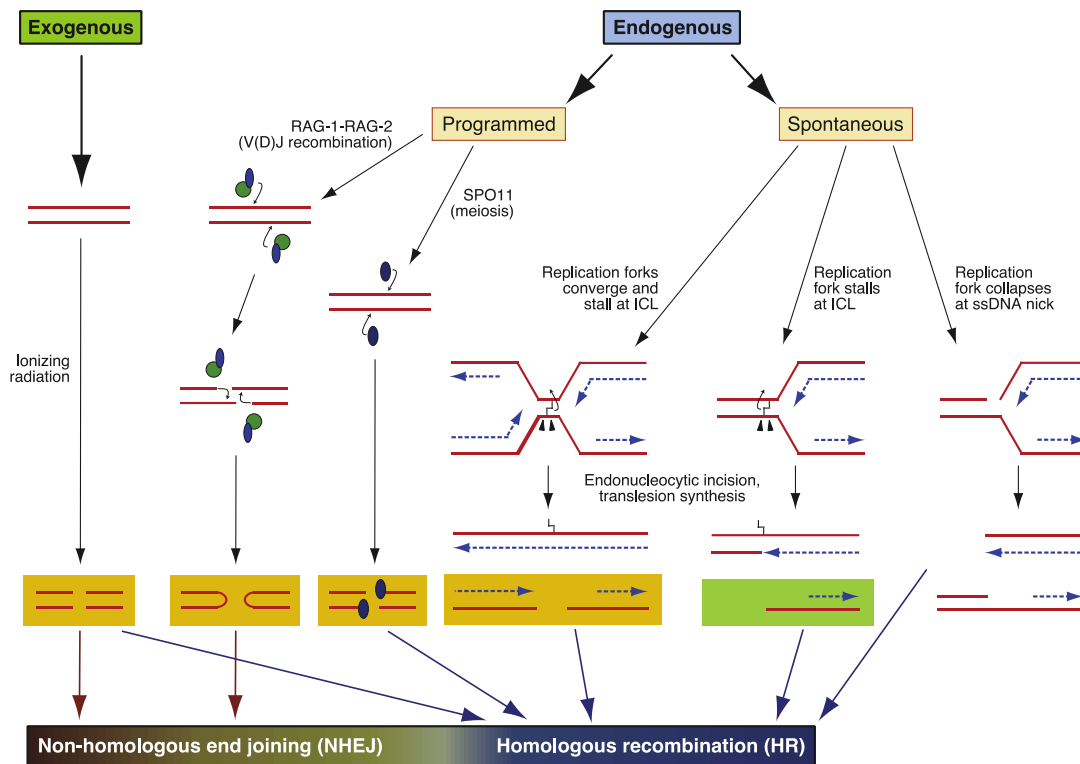
J'ai également participé en tant que co-premier auteur avec les Dr Ranjan Maity et Dre Jana Krietsch, à un article présentant une technique de purification publié dans la revue *JoVE* (Maity R., Pauty J., Krietsch J., Buisson R., Genois M.-M., Masson J.-Y. (2013) *GST-His purification: a two-step affinity purification protocol yielding full-length purified proteins*. *Journal of Visualized Experiments* **80**). L'hyperlien vers cet article est disponible en annexe.

Je souhaite souligner que tout au long de mes études au doctorat, le Dr Jean-Yves Masson m'a honoré de sa confiance en me donnant l'opportunité de participer à plusieurs projets de son laboratoire et de ses collaborateurs, dont je me permets de mentionner certains ici. J'ai ainsi pu m'impliquer dans le projet portant sur l'étude d'APRIN, en développant des modèles cellulaires et de xénotransgreffe en souris, notamment pour tester la réponse à un traitement chimiothérapeutique utilisant les inhibiteurs de PARP. J'ai aussi optimisé et réalisé des immunofluorescences sur tissus de patientes atteintes du cancer de l'ovaire de haut-grade. Dans le cadre de la collaboration avec le Dr Sébastien Fortin (Université Laval), j'ai contribué au développement d'un modèle de xénotransgreffe en souris pour tester l'activité antitumorale de composés chimiques de synthèse. Il est à noter que ces études ne seront pas abordées dans le cadre de cette thèse car elles dévient de mon sujet principal ou sont encore à un niveau préliminaire.





# Chapitre 1



**Figure 1. La formation des cassures double-brin de l'ADN**

*(Adaptée de (Chapman et al., 2012))*

# Chapitre 1. Introduction

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est la molécule à la base du vivant : elle contient l'information nécessaire au développement et au fonctionnement de la cellule, tout en garantissant la transmission de cette information aux générations suivantes, constituant ainsi l'hérédité. L'ensemble de l'information génétique portée par cette molécule constitue le génome et il est donc primordial pour la cellule d'en préserver l'intégrité. Or, celle-ci est soumise à de nombreuses agressions. Il a été estimé que chaque jour une cellule pourrait subir environ cent mille lésions de son ADN, provoquées par des causes endogènes ou exogènes (Hoeijmakers, 2009). L'ADN est constitué de bases azotées, de sucres (désoxyriboses) et de groupements phosphates assemblés en brin qui, en s'associant en pair par complémentarité de bases, forment une double hélice. Il existe différents types de lésions incluant majoritairement des modifications des bases azotées, ainsi que des cassures d'un ou des deux brins de la double hélice. Ce dernier type de lésions est le plus dangereux pour la cellule car il peut entraîner la mort cellulaire ou une instabilité génomique pouvant mener au cancer.

Les causes endogènes pouvant créer les cassures double-brin (CDB) sont : (i) les espèces réactives de l'oxygène générées par le métabolisme même de la cellule (les radicaux libres) ; (ii) l'arrivée d'une fourche de réplication sur une cassure simple-brin (CSB) ou sur une altération de l'ADN qui empêche sa progression ; (iii) un stress mécanique infligé à l'ADN compacté en chromosome. Les causes exogènes peuvent être de deux types : des agents chimiques, telles que les molécules chimiothérapeutiques, ou des agents physiques, comme par exemple les radiations ionisantes. L'effet mortel des cassures double-brin est exploité par de nombreux traitements du cancer, notamment la radiothérapie, qui utilise des radiations ionisantes pour créer directement ou indirectement des cassures double-brin. Toutefois, dans certains cas, ces cassures peuvent être bénéfiques et délibérément induites par la cellule car elles lui permettent d'insérer une variation dans l'information génétique. C'est le cas de la recombinaison V(D)J qui génère une plus grande variété de récepteurs des cellules T et d'immunoglobulines permettant une réponse immunitaire adaptée et efficace, ou encore de mécanismes programmés qui sont activés lors de la méiose et amènent de la diversité génétique dans la descendance lors de la reproduction. (**Figure 1**)

Par cycle cellulaire, jusqu'à cinquante CDB peuvent être formées (Vilenchik and Knudson, 2003). Chaque cassure non ou mal réparée peut engendrer de graves conséquences. L'absence de réparation induit généralement un arrêt permanent du cycle cellulaire ou la mort cellulaire. En revanche, la mauvaise réparation peut avoir des effets plus insidieux en provoquant des remaniements chromosomiques favorisant potentiellement l'instabilité génomique et le processus de carcinogenèse (Jeggo and Lobrich, 2007). Afin de prévenir ces conséquences néfastes pour la cellule ou l'organisme, la cellule a mis en place un système complexe et élaboré de détection, signalisation et de réparation de ce type de dommage.

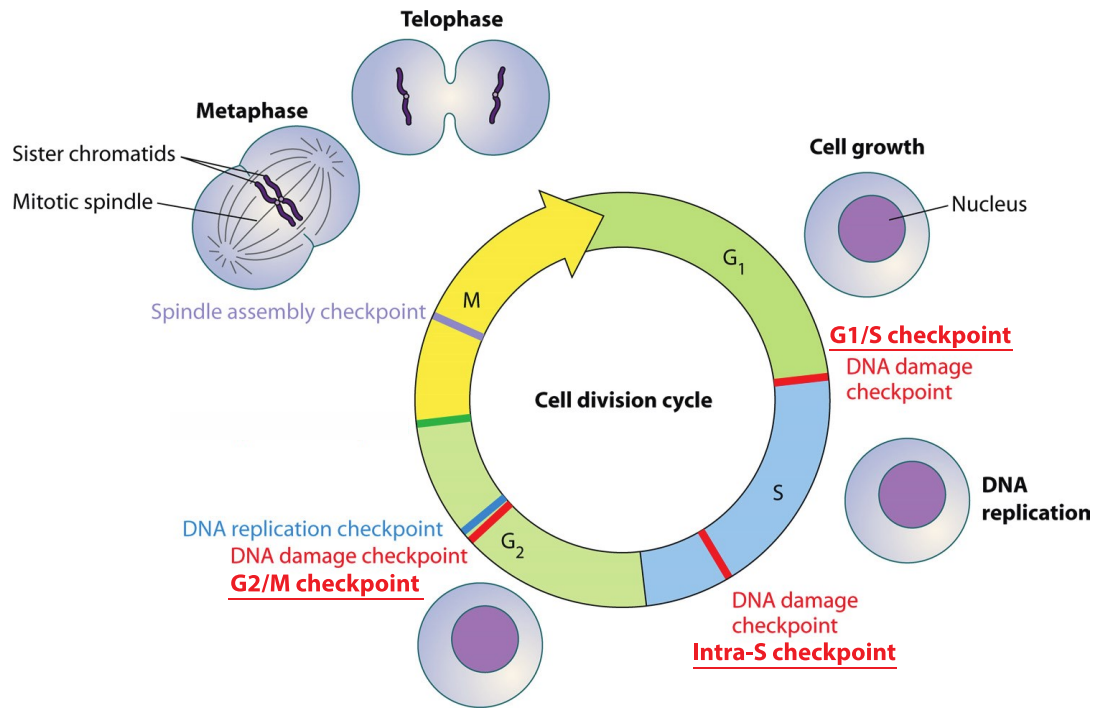
## 1.1. La réponse aux cassures double-brin de l'ADN

— Les cassures double-brin de l'ADN sont le thème central de cette thèse. Cette première section introduit les mécanismes de détection et de réparation des cassures double-brin chez l'Homme. Le système de surveillance, mis en place par la cellule pour détecter les cassures double-brin, sera tout d'abord présenté, en accentuant sur les points de contrôle du cycle cellulaire qui répondent à la présence de dommages à l'ADN. Ces informations prépareront la lecture du chapitre 5. Les mécanismes de réparation des cassures double-brin seront ensuite décrits, pour introduire les chapitres 2,3 et 4. —

En raison des conséquences dramatiques des CDB au niveau cellulaire ou de l'organisme, il est primordial que la cellule répare efficacement ce type de dommage. Pour ce faire, elle a mis en place un réseau de surveillance étroitement lié aux mécanismes des points de contrôle du cycle cellulaire, appelé : la réponse aux dommages à l'ADN (ou DDR pour "DNA Damage Response").

### 1.1.1. La surveillance du génome: les points de contrôle et la détection des cassures

Chaque cellule qui se divise suit un cycle appelé cycle cellulaire. Celui-ci est constitué de 4 phases : (i) la phase G1 (Gap 1) au cours de laquelle la cellule effectue sa fonction et accumule le matériel qui sera nécessaire à l'étape suivante ; (ii) la phase S (Synthèse) est amorcée lorsque la cellule est prête à se diviser, au cours de cette phase elle duplique son ADN par réplication ; (iii) la phase G2 (Gap 2) voit la cellule accumuler le matériel protéique nécessaire pour sa division ; (iv) la mitose est la phase pendant laquelle la cellule se divise, elle compacte son ADN sous forme de chromosomes homologues, perd son enveloppe nucléaire, se divise en deux en répartissant une copie de chaque chromosome dans chaque cellule fille, les cellules filles décondensent alors leur ADN et reforment leur noyau avant d'entrer dans leur phase G1. La progression dans le cycle cellulaire est contrôlée par des points de contrôle, défini à l'origine comme "des voies de régulations biochimiques qui contrôlent la progression du cycle cellulaire pour éviter le début de certaines réactions avant que les précédentes ne soient terminées" (Sancar et al., 2004). Quatre points de contrôle correspondant à cette définition ont été identifiés et trois d'entre eux assurent le contrôle qualité de l'intégrité du génome. En effet, ces trois points de contrôle bloquent la progression du cycle si l'ADN est endommagé : (i) le point de contrôle de la transition G1/S, (ii) le point de contrôle intra-phase-S (ou intra-S), (iii) le point de contrôle de la transition G2/M. Plus récemment, un nouveau point de contrôle répondant plus spécifiquement à un défaut au niveau de la réplication, a été ajouté et est appelé "point de contrôle de réplication". (**Figure 2**)



**Figure 2. Le cycle cellulaire et les points de contrôle**

En rouge sont indiqués les points de contrôle répondant aux dommages à l'ADN. En bleu est indiqué un des blocages du cycle induit par l'activation du point de contrôle répondant au stress réplcatif (cf. 1.1.1.5)

(Modifiée de (Chin and Yeong, 2010))

### 1.1.1.1. Les acteurs moléculaires des points de contrôle

Ce mécanisme de surveillance des dommages à l'ADN repose sur de nombreux partenaires moléculaires conceptuellement regroupés en quatre classes, dépendamment de leur niveau d'intervention dans la voie : les protéines qui détectent les dommages ou "senseurs", les protéines qui aident à la détection et au signalement des dommages ou "médiateurs", les protéines qui transmettent le signal ou "transducteurs", et les protéines actrices de la réponse qui inhibent les transitions de phases ou "effecteurs" (**Tableau 1**). Certaines protéines peuvent toutefois faire partie de plus qu'une de ces catégories ou être partagées par les différents points de contrôle. Ainsi, les points de contrôle G1/S, intra-S et G2/M partagent les mêmes senseurs, mais le rôle d'un senseur particulier sera majeur dans un point de contrôle et mineur dans un autre. De même, les kinases et les phosphatases, qui agissent comme transducteurs de signal, sont communes aux différents points de contrôle.

**Tableau 1. Les acteurs des points de contrôles**

Classe	Protéine
<b>Senseurs</b>	ATM, ATR-ATRIP, RAD17-RFC, RAD9-RAD1-HUS1
<b>Médiateurs</b>	CLASPIN, MDC1, TOPBP1, 53BP1, (BRCA1, H2AX, SMC1)
<b>Transducteurs</b>	CHK1, CHK2
<b>Effecteurs</b>	p53, CDC25

Pour les senseurs, deux groupes de protéines ont été identifiés comme étant spécifiques au système des points de contrôle: ATM ("Ataxia Telangiectasia Mutated") et ATR ("ATM and RAD3 related"), des sérine-thréonine kinases de la famille des PIKK ("Phosphatidylinositol 3-Kinase like Kinase") ; et les complexes RAD17-RFC ("Cell cycle checkpoint protein RAD17" et "Replication Factor C") et 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1). D'une manière générale, on notera que ATM détecte les CDB franches (Shiloh, 2003), tandis que ATR nécessite la présence d'un ADN simple-brin qui peut être produit lors de la réplication de l'ADN ou un traitement aux UV (Shiotani and Zou, 2009).

Les médiateurs, quant à eux, sont capables de s'associer avec les protéines des trois autres catégories, stimulant leur activité kinase et aidant la transmission du signal. Chez l'humain, on trouve dans cette catégorie trois protéines caractérisées par la présence du domaine d'interaction protéine-protéine BRCT ("BRCA1 C Terminus domain") : 53BP1 ("p53 Binding Protein 1"), TOPBP1 ("Topoisomerase II-Binding Protein 1"), et MDC1 ("Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1"). D'autres protéines telles que le variant d'histone H2AX, BRCA1 ("BReast CAncer 1, early onset"), le complexe MRN (Mre11-Rad50-NBS1) et SMC1 ("Structural Maintenance of Chromatin 1"), sont incluses dans cette catégorie mais ne sont pas des médiateurs *bona fide* du fait des rôles directs qu'elles jouent dans d'autres mécanisme dont notamment la réparation en tant que telle.

Les transducteurs regroupent deux kinases qui ont un rôle de signalisation uniquement dans la régulation du cycle cellulaire : CHK1 et CHK2 ("CHeckpoint Kinase 1/2").

Enfin, au niveau des effecteurs, on trouve la protéine p53 qui est un facteur de transcription, responsable de l'expression de nombreux gènes de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Lors de son

activation, p53 permet l'expression de p21 qui s'associe à la kinase CDK2, empêchant la transition G1/S. Parmi les effecteurs, il y a également trois phosphotyrosine phosphatases : CDC25A, -B, et -C ("Cell Division Cycle 25 A/B/C) qui déphosphorylent les kinases cyclines-dépendantes (ou CDK) impliquées dans les transitions de phases. La phosphorylation des CDC25 par les kinases des points de contrôle (ou CHK), permet la liaison de la protéine adaptatrice 14-3-3 qui conduit à l'exclusion des CDC25 du noyau et leur dégradation. Sans CDC25, CDK1 et CDK2 ("Cyclin-Dependent Kinase 1/2") restent phosphorylées, empêchant les transitions G1/S et G2/M. (Iliakis et al., 2003; Nyberg et al., 2002; Sancar et al., 2004).

La quantité de partenaires impliqués révèle un système finement régulé mais complexe. Il est toutefois admis que la voie ATM-CHK2, activée par les CDB, est principalement responsable du point de contrôle G1/S, tandis que la voie ATR-CHK1, activée par l'ADN simple-brin (ADNsb) et le stress réplcatif, régule les points de contrôle intra-S et G2/M. Mais il faut garder à l'esprit que même si ATM et ATR sont activées par des stress différents, leurs voies sont intimement liées car elles partagent de nombreuses cibles. De plus, la présence d'ADNdb qui active ATM, peut conduire à l'activation de mécanismes aboutissant à la formation d'ADNsb et donc l'activation d'ATR. Dès lors, il faut considérer que, bien qu'une voie soit prédominante dans l'activation d'un point de contrôle, il existe une constante communication croisée entre les deux voies, comme nous le verrons dans les sections suivantes (Smith et al., 2010).

#### **1.1.1.2. Le point de contrôle G1/S**

Le point de contrôle de la transition G1/S empêche la cellule de progresser en phase S s'il y a des dommages à l'ADN, en inhibant l'initiation de la réplication. Il peut être activé par deux voies, dépendamment du type de dommage. Si l'ADN présente des CDB causées par des radiations ionisantes ou des agents radiomimétiques, ATM est activé et phosphoryle CHK2 qui phosphoryle alors CDC25A. Si les dommages sont induits par les rayons ultraviolets (ou UV) ou des agents UV-mimétiques, ils sont détectés par RAD17-RFC, le complexe 9-1-1 ainsi que ATR qui phosphoryle alors CHK1, phosphorylant à son tour CDC25A. Dans les deux cas, la phosphorylation de CDC25A provoque son inactivation qui induit rapidement l'arrêt G1/S. En parallèle, p53 est phosphorylée directement sur sa Serine 15 par ATM ou ATR, puis sur sa Serine 20 par CHK1 ou CHK2, provoquant l'inhibition de son export du noyau et de sa dégradation. p53 ainsi stabilisée, s'accumule et active ses gènes cibles dont p21, qui lie et inhibe le complexe CDK2-Cycline E, maintenant ainsi l'arrêt G1/S. p21 lie également le complexe CDK4-Cycline D, l'empêchant ainsi de phosphoryler la protéine RB ("RetinoBlastoma associated protein"). Cette dernière n'étant plus activée, le facteur de transcription E2F, essentiel à la phase S, n'est plus libéré et ne peut donc pas être actif. Cela participe également à maintenir le blocage. Le point de contrôle G1/S repose donc en majorité sur p53. De plus, la voie d'ATR-CHK1 dans ce point de contrôle ne semble pas être, physiologiquement, un déterminant majeur. (Sancar et al., 2004; Smith et al., 2010) (**Figure 3**)

### **1.1.1.3. Le point de contrôle intra-S**

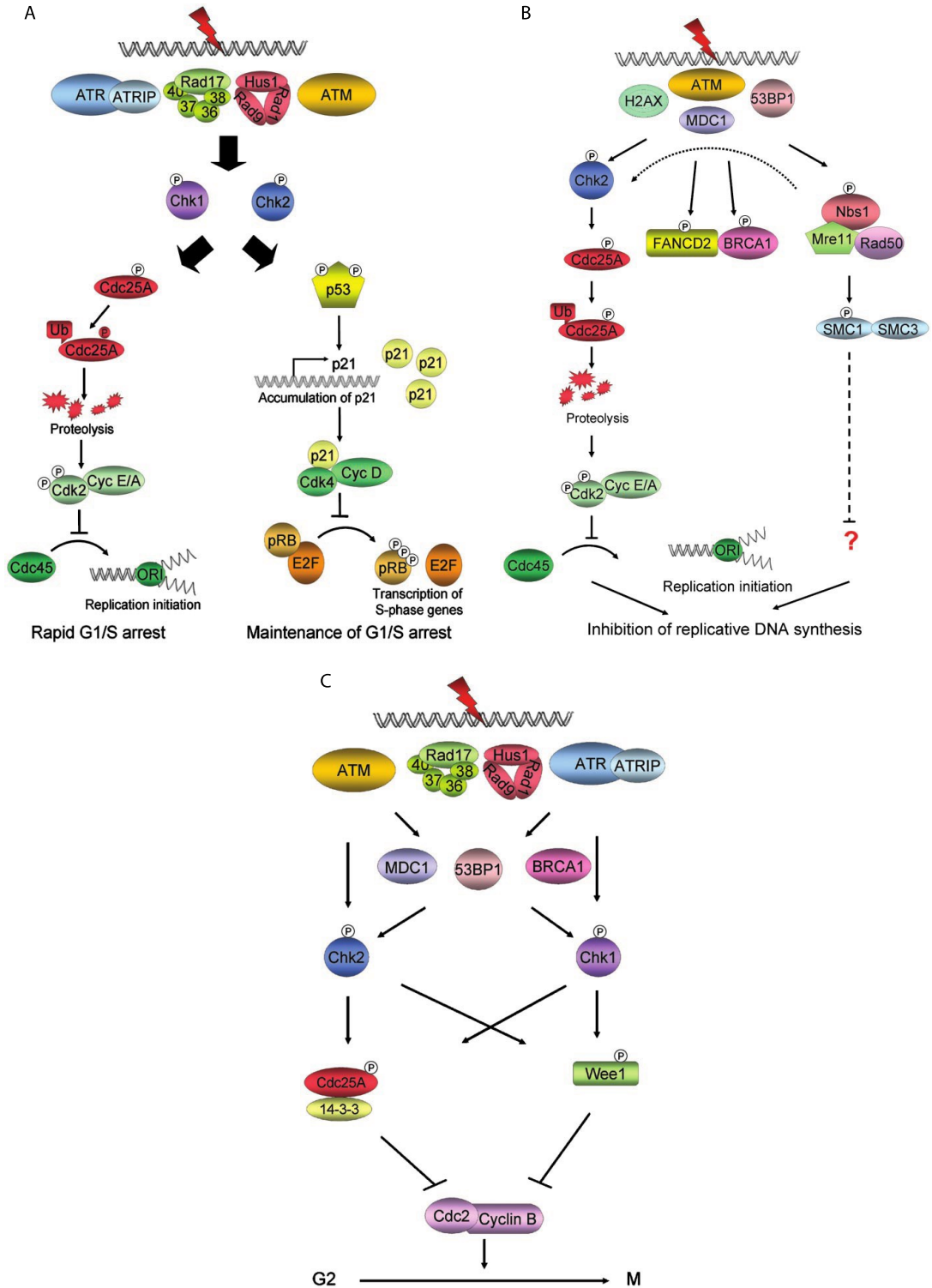
Le point de contrôle intra-S est activé par la présence de dommages qui ont échappé ou se sont produits après le point de contrôle G1/S et qui provoquent un blocage de la fourche de réplication et éventuellement son bris. Si le dommage est une CDB franche ou résultant de la réplication d'un nucléotide manquant dans l'ADN (une "position vide" dans la séquence), ATM, le complexe MRN ainsi que BRCA1 agissent comme senseurs. Dès lors, deux voies sont activées. Premièrement, la voie ATM-CHK2-CDC25A-CDK2 provoque l'arrêt du cycle. Deuxièmement, ATM phosphoryle BRCA1, FANCD2 (protéine D2 de la voie de l'anémie de Fanconi) et NBS1 ("Nijmegen Breakage Syndrome protein 1") qui vont à leur tour phosphoryler la cohésine SMC1, ce qui participe à l'arrêt du cycle et active les systèmes de réparation qui impliquent ces protéines. Dans le cas de dommages provoqués par les UV ou des agents chimiques modifiant les bases, le senseur est ATR en complexe avec ATRIP ("ATR-Interacting Protein"). ATR se lie à l'ADN simple-brin recouvert de RPA ("Replication Protein A") généré lors de la réplication de ce type de dommages ou par les mécanismes de réparation. La voie ATR-CHK1-CDC25A est alors activée menant à l'arrêt du cycle. (Sancar et al., 2004; Smith et al., 2010) (**Figure 3**)

— Dans le cas du stress réplicatif, un autre système de régulation du cycle cellulaire existe et sera présenté à la section 1.1.1.5. —

### **1.1.1.4. Le point de contrôle G2/M**

Le point de contrôle G2/M empêche la cellule d'entrer en mitose s'il y a des dommages. Pour ce point de contrôle, les deux voies ATR et ATM sont activées consécutivement selon le type de dommage. Ainsi, dans le cas de CDB dues aux radiations ionisantes, la voie ATM-CHK2 provoque l'arrêt du cycle, puis la voie ATR-CHK1 maintient cet arrêt. Si les dommages sont causés par les UV, les rôles des voies sont inversés. Dans les deux cas, les voies mènent à l'accumulation de la serine/thréonine kinase WEE1 ("Wee1-like protein kinase") et à l'inhibition des phosphatases CDC25A et CDC25C, via leur dégradation et séquestration par la protéine 14-3-3. Ensemble, ces protéines régulent le complexe mitotique CDK1-Cycline B dont l'activation est alors empêchée, bloquant le cycle cellulaire (Sancar et al., 2004; Smith et al., 2010). Par ailleurs, il a été suggéré l'existence de deux différents types d'arrêt du cycle en G2/M. Le premier, "l'arrêt immédiat en G2", est dépendant d'ATM et concerne les cellules dont les dommages à l'ADN sont induits pendant leur phase G2. Le second, "l'accumulation en G2", est indépendant d'ATM mais dépendant d'ATR-CHK1, et concerne les cellules qui ont réussi à passer au travers de la phase S (Smith et al., 2010). Enfin, il semble que les MAP kinases ("Mitogen Activated Protein Kinase") soient impliquées. Ainsi la MAP kinase p38 $\gamma$  participe également à la réponse aux dommages causés par les radiations ionisantes, alors que p38 $\alpha$  est impliquée lors de dommages dus aux UV (Thornton and Rincon, 2009). (**Figure 3**)

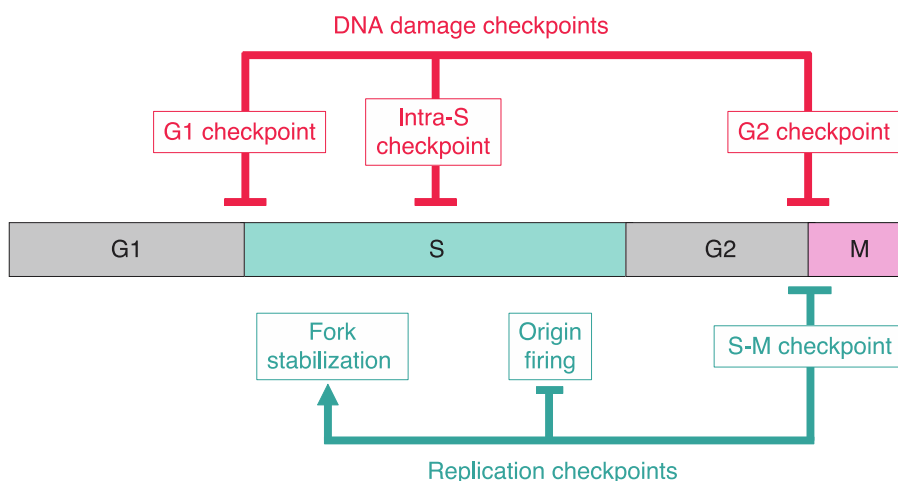




**Figure 3. Les voies moléculaires des points de contrôle de réponse aux dommages à l'ADN**  
**(A)** Le point de contrôle G1/S, **(B)** Le point de contrôle intra-S, **(C)** Le point de contrôle G2/M  
 (Modifiée de (Sançar et al., 2004))

### 1.1.1.5. Le point de contrôle de restauration de la réplication

Lorsque la réplication de l'ADN est bloquée, une réponse de point de contrôle complémentaire est activée (**Figure 4**). Ce point de contrôle consiste en une réponse globale qui vise à stabiliser les fourches de réplication bloquées et empêcher la formation de nouvelles fourches de réplication, en inhibant l'apparition d'origine de réplication tardive. De plus, elle provoque un délai de l'entrée en mitose qui est nommé "point de contrôle S-M". Cette réponse particulière est parfois appelée "point de contrôle de restauration de la réplication". Sur le plan moléculaire, la voie ATR-CHK1 joue le rôle principal dans l'activation de ce point de contrôle, tandis que la voie ATM-CHK2 jouerait un rôle auxiliaire, dans le cas spécifique où des CDB seraient présentes (Smith et al., 2010).



**Figure 4. Contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN et au stress réplicatif**

(Adaptée de (Smith et al., 2010))

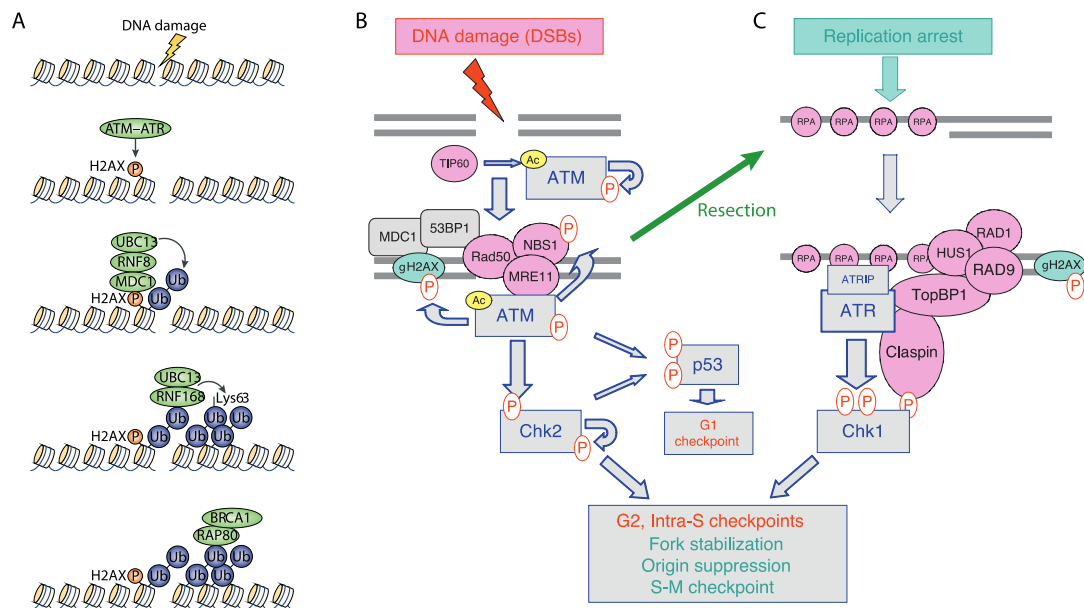
### 1.1.1.6. La détection et la signalisation d'une cassure double-brin

La détection des CDB implique les protéines des points de contrôle qui jouent deux rôles : (i) elles arrêtent ou ralentissent le cycle cellulaire ; (ii) elles activent les mécanismes de réparation.

Ainsi, lorsqu'une CDB est formée, le complexe MRN la détecte et recrute la kinase ATM, menant à la phosphorylation du variant d'histone H2AX (*le mécanisme est détaillé à la Figure 5*). MDC1 reconnaît cette forme phosphorylée de H2AX, appelée  $\gamma$ H2AX, et s'y associe (Cook et al., 2009; Xiao et al., 2009). Elle sert alors de plateforme pour divers partenaires qui permettent de compléter le signal de détection de la CDB et d'activation des voies de réparation. D'une part, MDC1 recrute de nouveaux complexes MRN qui initient une boucle d'amplification propageant la phosphorylation de H2AX sur plusieurs mégabases autour de la CDB. D'autre part, MDC1 permet le recrutement des E3 ubiquitine ligases RNF8 et RNF168 ("RiNg Finger protein 8/168") (Yan and Jetten, 2008) (**Figure 5.A**). La phosphorylation de H2AX et la polyubiquitination des histones permettent le relâchement de la chromatine, ainsi que le recrutement et la rétention des facteurs de signalisation et de réparation des CDB. Parmi eux, les médiateurs 53BP1 et BRCA1 aident ATM à phosphoryler CHK2 pour activer le point de contrôle, mais jouent aussi un rôle direct dans le recrutement des protéines de la réparation. Il est

possible de visualiser l'accumulation de ces partenaires par microscopie sous forme de larges domaines nucléaires appelés "foyers de réparation". Les foyers de  $\gamma$ H2AX sont en particulier utilisés pour visualiser les CDB dans les cellules (Rothkamm and Lobrich, 2003). Il a été estimé qu'un foyer de  $\gamma$ H2AX correspond à une CDB et contiendrait approximativement deux mille molécules phosphorylées du variant d'histone (Rogakou et al., 1999; Scully and Xie, 2013).

L'activation d'ATM et la présence de MRN initient également un premier mécanisme de traitement de la CDB, nommé "résection", qui aboutit à la formation d'ADN simple-brin (ADNsb). L'ADNsb, issu de ces étapes préparatrices ou dû au blocage d'une fourche de réplication, est recouvert par la protéine RPA, qui permet le recrutement de nombreux facteurs aboutissant à l'activation d'ATR (*le mécanisme est détaillé à la Figure 5C*). ATR est donc activée consécutivement à ATM et dépendamment d'ATM et MRE11 (Jazayeri et al., 2006; Myers and Cortez, 2006). Ensemble, ATR et ATM initient la cascade de signalisation qui coordonne la réponse au CDB.



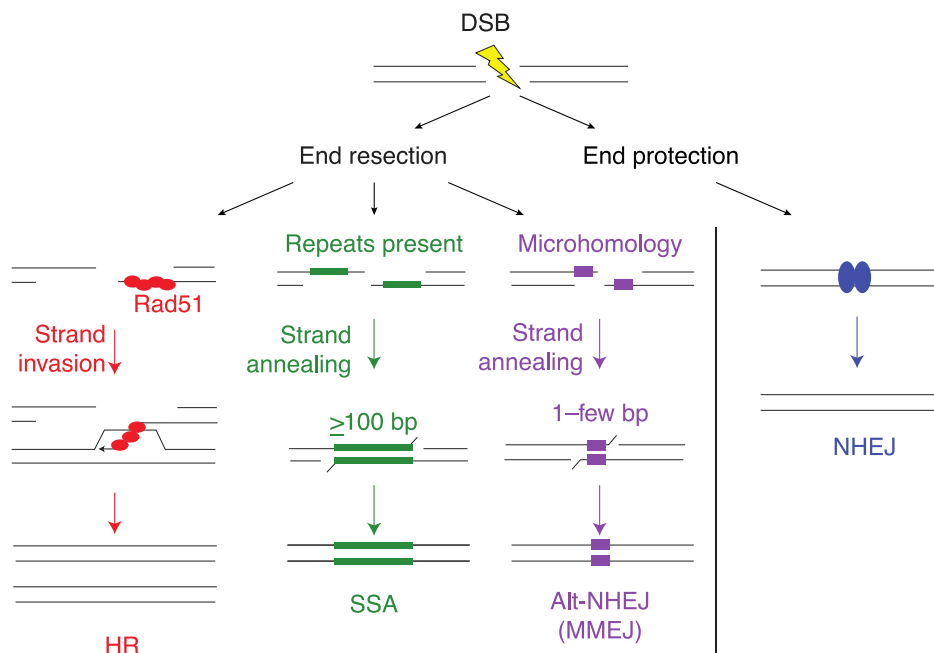
**Figure 5. La détection et la signalisation d'une cassure double-brin de l'ADN**

(A) Une CDB est signalée par la phosphorylation (P) et l'ubiquitination (Ub) du variant d'histone H2AX. RNF8 débute une chaîne d'ubiquitination que RNF168 amplifie, participant au recrutement de BRCA1 via RAP80. (Adaptée de (Huen et al., 2010) (B) Lors d'une CDB, des homodimères inactifs d'ATM s'autophosphorylent en *trans* (sur S367, S1893 ou S1981) menant à leur activation via leur dissociation en monomère. L'acétylation (Ac) par TIP60 pourrait aussi jouer un rôle dans cette activation. Les monomères d'ATM sont ensuite recrutés à la CDB, via le complexe MRN, où ATM phosphoryle plusieurs de ces cibles dont H2AX (sur S139, nommé  $\gamma$ H2AX dans ce modèle) et CHK2 (sur T68). (C) Après la résection des extrémités de la CDB, l'ADNsb exposé est protégé par RPA. ATRIP est alors capable de s'y lier et, étant associée en dimère avec ATR, permet son recrutement au site du dommage. En parallèle, le complexe RAD17-RFC détecte également l'ADNsb et s'y associe permettant le recrutement du complexe 9-1-1. Celui-ci recrute alors le médiateur TOBP1 qui lie le complexe ATR-ATRIP et l'active. ATR phosphoryle Claspin qui recrute CHK1 et permet son activation via sa phosphorylation par ATR (sur S317 et S345). L'activation des points de contrôle résultant de ces voies est détaillée dans les sections 1.1.1.2 à 1.1.1.6. (Modifiée de (Smith et al., 2010))



### 1.1.2. La réparation des cassures double-brin

Lorsqu'une CDB est formée, elle est détectée et signalée pour permettre l'activation du point de contrôle. La cellule stoppe ou ralentit alors sa progression dans le cycle pour permettre de réparer l'ADN. Une fois l'ADN réparé, le point de contrôle est désactivé et la cellule poursuit son cycle. En revanche, si la réparation n'est pas possible, la cellule peut alors activer sa mort programmée. Les CDB peuvent être réparées par plusieurs mécanismes : la jonction d'extrémités non-homologue (ou NHEJ pour "Non-Homologous End Joining"), la recombinaison homologue (RH), et l'appariement des extrémités protubérantes simple brin (ou SSA pour "Single-Strand Annealing"). (**Figure 6**)



**Figure 6. Les voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN**

DSB: cassure double-brin, HR: recombinaison homologue, SSA: appariement des extrémités protubérantes simple-brin, NHEJ: jonction d'extrémités non-homologue, Alt-NHEJ: NHEJ alternatif

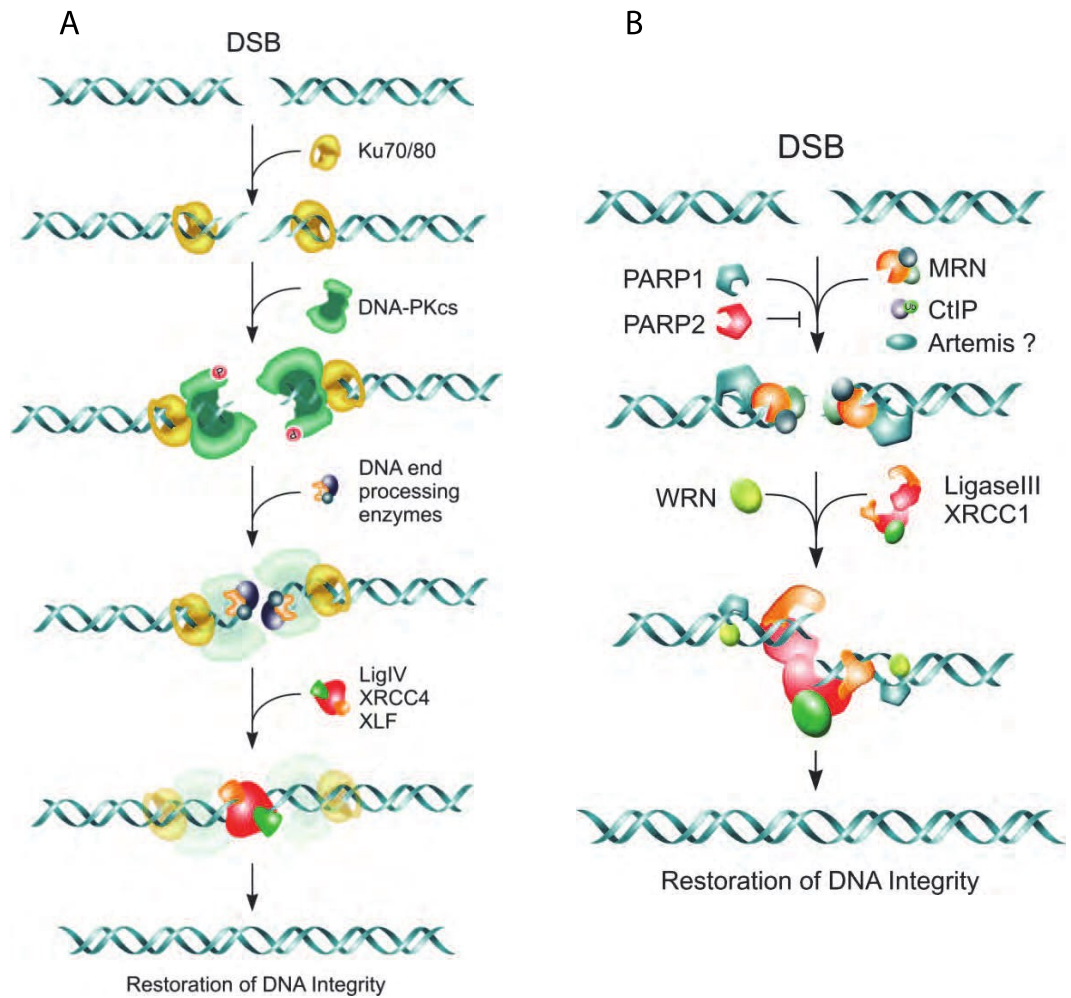
(Modifiée de (Jasin and Rothstein, 2013))

### 1.1.2.1. La jonction d'extrémités non-homologues : les voies classique et alternative

La réparation par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ), consiste en un rattachement direct des deux extrémités de la cassure (**Figure 7**). Ce processus est initié par l'identification de la CDB par l'hétérodimère KU70/80 qui lie chaque extrémité et recrute la sous-unité catalytique de DNA-PK, DNA-PKcs ("DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit"). Celle-ci est un membre de la famille des Phosphoinositide 3-kinases (PI3K) et sa liaison au complexe KU provoque son autophosphorylation ayant pour conséquence son activation. Par la suite, DNA-PKcs régule par phosphorylation différents partenaires impliqués dans le traitement des extrémités et permet le rapprochement, ainsi que l'alignement, des extrémités. Parmi ces partenaires, on trouve sa protéine associée Artémis. Artémis est une exonucléase 5'-3' et une endonucléase qui, dans le cas d'extrémités non-compatibles, dégrade les extrémités pour les rendre compatibles, c'est-à-dire les convertir en extrémités franches ou comportant les groupements 3'-hydroxyle (3'-OH) et 5'-phosphate (5'-P) essentiels pour établir la liaison entre les nucléotides. Les polymérases  $\lambda$  et  $\mu$  peuvent également intervenir en ajoutant les acides nucléiques manquants pour rendre les extrémités compatibles. En transformant les extrémités, le NHEJ est donc potentiellement mutagène car il peut mener à l'ajout ou à la perte d'information génétique. Ultiment, DNA-PKcs recrute le complexe XLF-XRCC4-LIG4 ("XRCC4-like Factor", "X-ray Repair Cross-Complementing protein group 4", ADN Ligase IV) qui réalise la liaison des deux extrémités. Ce mécanisme est également impliqué dans la recombinaison V(D)J. Dès lors, des mutations dans les gènes impliqués sont associées avec des déficits immunitaires graves, telle que l'immunodéficience combinée sévère (ou SCID pour "Severe Combined Immune Deficiency)", mais également une radiosensibilité (O'Driscoll et al., 2004).

L'existence d'un NHEJ alternatif a plus récemment été découverte. Il a été proposé que cette voie servirait de voie de secours dans le cas d'une déficience de la voie classique du NHEJ, lui valant le nom de NHEJ de secours ("BackUp NHEJ"). On la trouve également nommée alt-NHEJ ("Alternative NHEJ") ou "jonction d'extrémités guidée par microhomologie" (ou MMEJ pour "Microhomology-Mediated End Joining") (**Figure 7**). Le mécanisme de cette voie n'est pas encore clairement élucidé. Cependant, le complexe MRN-CtIP ("C-terminal binding protein Interacting Protein") permettrait une résection des extrémités de la CDB menant à la formation d'ADNsb. Ceci révélerait des microhomologies (courtes zones d'homologie de séquence) entre les deux ADNsb de part et d'autres de la cassure, permettant leur hybridation. Les ligases I ou III pourraient alors compléter la réparation (Deriano and Roth, 2013; Lieber, 2010; Lieber et al., 2003).

Parce que le mécanisme du NHEJ implique que les extrémités de la CDB peuvent être altérées, il est considéré comme un mécanisme de réparation pouvant entraîner une modification de l'information génétique. Ainsi, il a été parfois considéré comme "peu fidèle", ce qui est aujourd'hui discuté (Betermier et al., 2014).



**Figure 7. La réparation d'une cassure double-brin par la jonction d'extrémités non-homologues**  
**(A)** La voie classique; **(B)** La voie alternative (*Adaptée de (Mladenov and Iliakis, 2011)*)

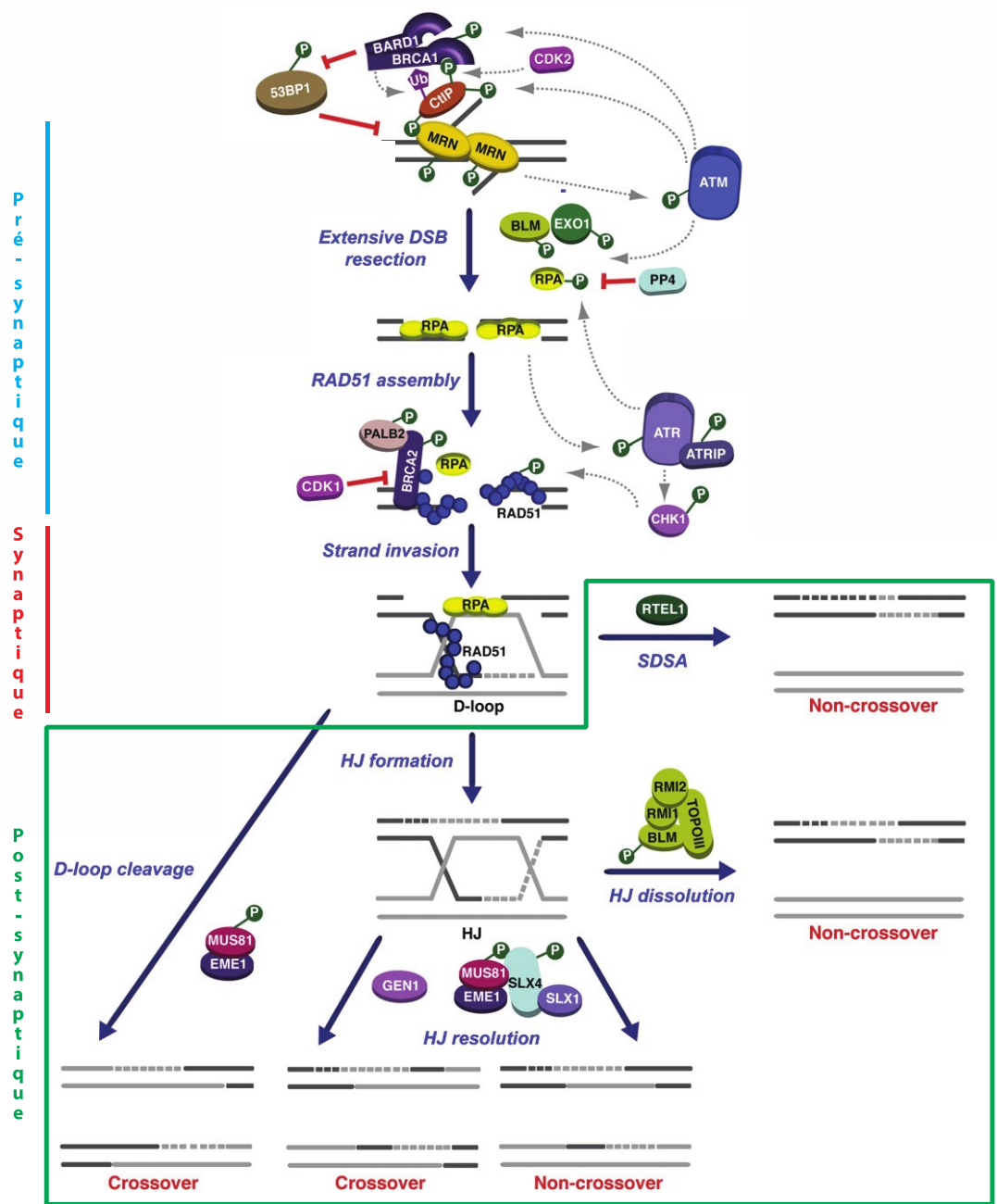


Figure 8. La réparation d'une cassure double-brin par la recombinaison homologue (Modifiée de (Ciccia and Elledge, 2010))



### 1.1.2.2. La recombinaison homologue

La réparation par recombinaison homologue (RH) est le second principal mécanisme de réparation des CDB mais il est prépondérant dès la fin de la phase S et pendant la phase G2 du cycle cellulaire (Rothkamm et al., 2003). Ceci est dû au fait que son fonctionnement nécessite la présence d'une copie intacte de l'ADN brisé et donc que la réplication ait eu lieu. En effet, la réparation par RH consiste à trouver la région homologue à celle brisée afin de recopier l'information génétique pour combler la CDB. Ce mécanisme repose sur l'activité recombinase de la protéine RAD51 ("DNA repair protein Rad51 homolog") qui requiert de nombreux partenaires. La RH comprend trois étapes : une phase pré-synaptique, une phase synaptique, et une phase post-synaptique. (**Figure 8**)

#### - La phase pré-synaptique:

Lors de la première étape dite phase pré-synaptique, la CDB est signalée (*cf.* 1.1.1.6) et résectée, c'est-à-dire que l'ADN est dégradé dans le sens 5' vers 3' formant ainsi des ADN simple-brin à chaque extrémité de la CDB. Ce processus prépare en fait la CDB pour les étapes suivantes qui nécessitent la présence d'extrémités simple-brin 3'-OH protubérantes. D'une manière générale, cette phase requiert la présence d'hélicases pour ouvrir la double hélice de l'ADN, et de nucléases pour réaliser la résection des brins de 5' vers 3'. Les modèles les plus récents suggèrent une résection en deux étapes. Premièrement, l'ADN subit une résection limitée impliquant les protéines MRE11 et CtIP. Deuxièmement, la résection peut être poursuivie sur une plus longue distance par deux voies, l'une impliquant l'exonucléase 1 (EXO1), et l'autre utilisant le complexe BLM-RMI1-TOP3 (l'hélicase "Bloom syndrome Mutated protein", sa protéine associée RMI1 ("RecQ-mediated genome instability protein 1"), et la DNA topoisomérase III  $\alpha$  (TOP3)) avec l'endonucléase DNA2. (Huertas, 2010; Symington, 2014). L'ADNsb ainsi formé, est immédiatement recouvert et protégé par la protéine RPA qui empêche également la formation de structure secondaire. Le complexe RPA-ADN permet alors l'activation d'ATR qui coopère avec ATM pour activer le point de contrôle (*cf.* 1.1.1.6). Une autre fonction de ce complexe est de permettre le recrutement et l'activation de la protéine clef de cette voie de réparation : la recombinase RAD51. Pour être active, RAD51 a besoin de former un filament nucléoprotéique hélicoïdale autour de l'ADNsb, étape réalisée par nucléation. Toutefois la présence de RPA sur l'ADNsb inhibe ce processus qui nécessite donc l'aide de médiateurs de la recombinaison. Ces médiateurs sont définis comme des protéines : (i) liant l'ADNsb, (ii) interagissant physiquement avec RAD51 et (iii) facilitant son recrutement et sa nucléation via le déplacement de RPA (Sung et al., 2003). À l'heure actuelle, deux protéines ont été identifiées comme médiateurs de la recombinaison homologue chez l'Homme: BRCA2 ("BRCAst CAncer 2, early onset") (Jensen et al., 2010) et PALB2 ("Partner And Localizer of BRCA2") (Buisson et al., 2010; Dray et al., 2010). La protéine Rad52 de levure a été rapportée comme médiateur (Sung et al., 2003) mais son homologue humain n'a pas démontré une telle activité dans des analyses biochimiques (Jensen et al., 2010), bien que des analyses cellulaires le suggèrent (Feng et al., 2011; Lok et al., 2013). Cinq autres protéines ont été identifiées comme contribuant également au recrutement de RAD51 sans toutefois être à ce jour établies comme médiateurs, il s'agit des paralogues de RAD51 : RAD51-B, RAD51-C, RAD51-D, XRCC2 et XRCC3. (Rodrigue et al., 2013; Rodrigue et al., 2006; Suwaki et al., 2011; Takata et al., 2001).

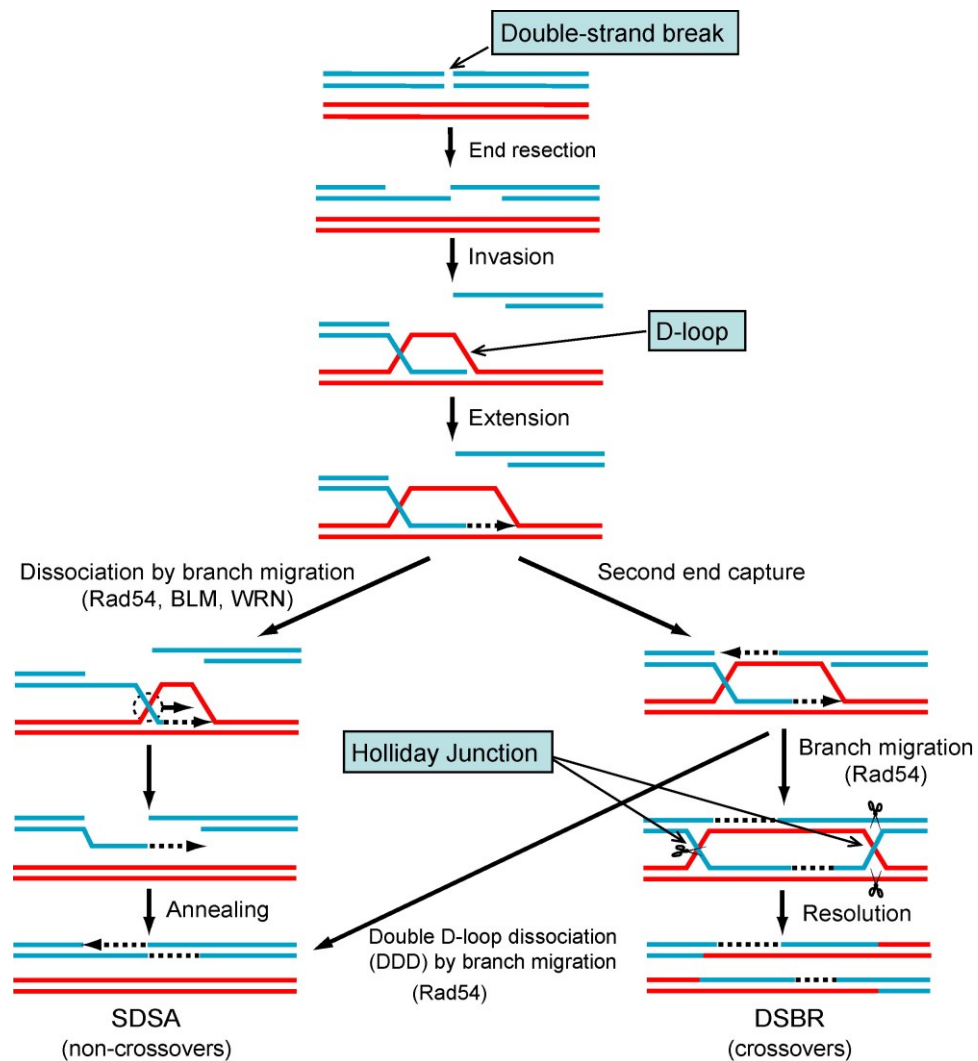
- La phase synaptique:

La fin de l'assemblage du filament pré-synaptique de RAD51 annonce le début de la seconde phase, appelée synaptique. Lors de cette phase, le filament de RAD51 associé à l'ADNsb, rejoint l'ADNdb de la chromatide sœur issue de la réplication, et effectue une recherche d'homologie de séquence. Lorsque celle-ci est trouvée, RAD51 catalyse l'invasion de l'ADNsb dans l'ADNdb en séparant les deux brins et associant l'ADNsb provenant de la cassure avec son complémentaire intact. La structure de l'ADN ainsi formée est appelée une boucle de déplacement (ou D-loop pour "Displacement loop"). Les protéines RAD54 ("DNA repair and recombination protein RAD54-like") et RAD51AP1 ("RAD51-Associated Protein") jouent également un rôle dans la formation et la stabilisation de cette boucle (Mazin et al., 2003; Modesti et al., 2007).

- La phase post-synaptique:

Une fois l'ADN brisé associé à son complémentaire intact, les ADN polymérases vont recopier l'information perdue. C'est alors le début de la troisième et dernière étape : la phase post-synaptique.

En parallèle ou consécutivement à cette synthèse de l'ADN, les structures secondaires de l'ADN s'étant formées au cours du procédé de réparation sont retirées, permettant de terminer la réparation. Deux mécanismes ont été proposés (Iyama and Wilson, 2013; Li and Heyer, 2008). Le premier est l'hybridation de brin dépendant de la synthèse (ou SDSA pour "Synthesis-Dependent Strand Annealing"). — *Ce mécanisme est détaillé à la Figure 9* — Le second mécanisme est celui du DSBR ("Double-Strand Break Repair") qui propose que la D-loop s'agrandisse jusqu'à permettre la capture de la seconde extrémité 3'-OH de la CDB. Celle-ci s'hybride alors sur le second brin de l'ADN intact de la chromatide sœur et subit également une élongation par les ADN polymérases. Les deux extrémités de la CDB sont ensuite rattachées, mais restent hybridées à l'ADN de la chromatide sœur ce qui forme alors deux structures cruciformes connues sous le nom de Jonction de Holliday (JH) (**Figure 9**). Il est indispensable que ces jonctions soient clivées, ou "résolues", pour permettre la séparation des deux molécules d'ADN et ultimement, la ségrégation des chromosomes. Pour ce faire, des protéines ayant une activité nucléase structure-spécifique existent et sont nommées "résolvases". Ces protéines coupent symétriquement les JH sur les brins de même polarité. Les produits formés peuvent être directement rattachés et donner lieu, éventuellement, à de l'échange de matériel génétique entre les deux chromatides ; cet échange est alors nommé "crossover". Chez les eucaryotes, GEN1 ("XPG-like endonuclease") et le complexe SLX4-SLX1 ("Synthetic Lethal of unknown function protein 1/4") ont été identifiés comme résolvases. D'autres protéines ont été proposées pour leur rôle dans la résolution des JH. Ainsi l'endonucléase MUS81 ("MMS and UV Sensitive protein 81") avec son partenaire EME1 ("Essential Meiotic Endonuclease 1") fut la première candidate à être envisagée, mais il est à présent proposé qu'elle pourrait plutôt agir sur des structures intermédiaires se formant au cours de la résolution des JH (Svendsen and Harper, 2010). Il a aussi été démontré que le complexe BLM-RMI1-TOP3 peut enlever les JH, mais on parle dans ce cas de "dissolution". Dans ce mécanisme, l'activité hélicase de BLM est utilisée pour faire migrer et converger les JH l'une contre l'autre, TOP3 permet alors de relâcher les brins complémentaires. Dans ce cas il n'y a pas de crossover possible, c'est à dire qu'il n'y a aucun échange entre l'ADN originellement brisé et celui ayant servi comme matrice pour la réparation (Svendsen and Harper, 2010; Swiec and Costa, 2014).



**Figure 9. Les structures secondaires de l'ADN se formant au cours de la recombinaison homologue et les mécanismes de leur retrait**

**(À gauche: SDSA)** L'hybridation de brin dépendant de la synthèse débute par le désassemblage de la D-loop qui provoque l'exclusion du brin envahissant. Celui-ci peut alors s'hybrider avec la seconde extrémité 3'-OH de la CDB grâce à une séquence homologue qui a été récupérée par la synthèse d'ADN. Une seconde synthèse d'ADN se produit alors à partir de la seconde extrémité de la CDB en utilisant comme matrice le brin récupéré. Les brins sont ensuite rattachés aboutissant à un ADNdb intact, ne présentant aucun échange de matériel génétique avec l'ADNdb homologue ("non-crossovers").

**(À droite: DSBR)** La réparation de CDB (DSBR, Double-Strand Break Repair) est détaillée dans le texte.

(Adaptée de (Mazin et al., 2010))

Comme la réparation par RH se base sur le recopiage de l'information génétique sur un ADN homologue, elle permet de conserver fidèlement cette information et d'éviter les pertes, contribuant ainsi à une plus grande stabilité du génome.

### **1.1.2.3. L'appariement des extrémités protubérantes simple-brin**

La réparation des CDB par appariement des extrémités protubérantes simple-brin (ou SSA pour Single-Strand Annealing) est un mécanisme conceptuellement simple mais qui nécessite la présence de séquences homologues de part et d'autre de la CDB. (**Figure 6**)

Le SSA est un mécanisme de réparation alternatif à la RH et en partage de ce fait les premières étapes, à savoir : la résection des extrémités de la cassure. Suivant ces étapes préparatoires, la protéine RAD52 ("DNA repair protein Rad52 homolog") s'associe aux ADNsb exposés (Van Dyck et al., 1999), protégés par RPA. Si des séquences homologues ont été révélées par la résection, RAD52 réalise leur hybridation (Grimme et al., 2010; Reddy et al., 1997). Les extrémités sont ensuite transformées pour permettre la ligation. Par exemple, dans le cas où des séquences non homologues seraient présentes en 3' des séquences hybridées, elles seront dégradées par le complexe endonucléase ERCC1-XPF ("DNA excision repair protein Excision Repair Cross-Complementation group 1", "Xeroderma Pigmentosum, groupe de complementation F") (Al-Minawi et al., 2008). Ces modifications des extrémités provoquent une altération de l'information génétique.

La réparation par SSA permet donc une réparation rapide qui ne nécessite pas de chromatide sœur, mais agit au détriment de la stabilité du génome, contrairement à la RH.

### 1.1.3. Les maladies associées à un défaut de la réparation de l'ADN

Un défaut de ce système de surveillance et de protection du génome contre les CDB, à quelque niveau que ce soit, est souvent associé à un syndrome ou une maladie génétique. Ces maladies sont le plus souvent à transmission autosomique récessive et présentent des symptômes communs (McKinnon and Caldecott, 2007).

Ainsi, des mutations dans les gènes codant les protéines MRE11 et NBS1 qui font partie du complexe MRN, sont associées respectivement aux syndromes de Nimègue (ou Nijmegen Breakage Syndrome) et ATLD (Ataxia Telangiectasia Like Disorder). Les patients affectés par le syndrome de Nimègue présente une petite taille, une microcéphalie, des difformités du visage et sont sujets à des infections notamment pulmonaires, en plus d'avoir une susceptibilité accrue de développer un cancer. Le syndrome ATLD ressemble, comme son nom l'indique, à l'ataxie télangiectasie, ou syndrome de Louis-Bar; une maladie neurodégénérative affectant certaines parties du cerveau mais aussi caractérisée par un déficit immunitaire, une sensibilité aux rayons ionisants (radiosensibilité), un développement de télangiectasies (dilatation des vaisseaux sanguins proche de la surface de la peau) et également une augmentation du risque de cancer. L'ataxie télangiectasie est provoquée par des mutations du gène de la kinase ATM (Taylor et al., 2004). Cette kinase, ainsi que la kinase ATR, sont essentielles à la signalisation des CDB et l'activation des voies de réparation. Des mutations du gène d'ATR causent d'ailleurs le syndrome de Seckel, caractérisé également par une microcéphalie, un retard mental et certaines difformités du visage (O'Driscoll et al., 2004).

D'autres maladies proviennent de mutations touchant directement les gènes impliqués dans la réparation. C'est le cas du syndrome de Bloom qui est associé à des mutations de BLM (Ellis and German, 1996). Les patients atteints de ce syndrome présentent également un retard de croissance, des difformités du visage, une peau sensible aux UVs avec notamment un développement de télangiectasies, une immunodéficience modérée et une prédisposition au cancer. Dans certains cas les patients ont également un retard d'apprentissage ainsi qu'une fertilité diminuée pour les femmes ou une stérilité pour les hommes. Le syndrome de Bloom partage de nombreuses caractéristiques avec l'Anémie de Fanconi (FA) (Kupfer, 2013). En effet, cette maladie peut aussi être associée avec un retard de croissance, des difformités du visage, ainsi que des difficultés d'apprentissage ou une fertilité affectée. Les patients atteints de FA peuvent également présenter des anomalies squelettiques, en particulier au niveau des bras et des mains. Toutefois, l'Anémie de Fanconi est caractérisée par le développement de problèmes sanguins, notamment dus à une insuffisance médullaire (Bone Marrow Failure syndrome), et une prédisposition au cancer, dont des leucémies, des cancers gynécologiques ou de la cavité buccale. Cette maladie est due à des mutations dans l'un des 16 gènes impliqués dans la voie de Fanconi, une voie de réparation de l'ADN spécialisée dans la réparation des ponts inter-brin (ou ICL pour Interstrand CrossLink) et qui implique la formation d'une CDB au cours du procédé de réparation. Parmi ces gènes on trouve notamment les gènes BRCA2 (FANCD1) et PALB2 (FANCN) qui sont des médiateurs de la réparation des CDB par recombinaison homologue (*cf. 1.1.2.2*).

D'une manière générale, les mutations dans les gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN et en particulier des CDB sont associées à une susceptibilité accrue de développer un cancer — *Nous le verrons également dans la section 1.2.* —



## 1.2. Focus sur certains acteurs de la réparation de l'ADN

— Dans cette section, un supplément d'information concernant les protéines dont il est particulièrement question au chapitre 2,3 et 4, est apporté. —

### 1.2.1. La recombinaison RAD51

La réparation par recombinaison homologue implique de nombreux partenaires mais repose principalement sur la protéine RAD51.

Le gène *RAD51* (pour "DNA repair protein Rad51 homolog 1") se situe sur le chromosome 15q15.1 et code pour une protéine nucléaire de 339 acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 37 kDa. La protéine RAD51 est au cœur de la recombinaison homologue par sa fonction de recombinaison : (i) elle permet la recherche d'homologie à une séquence d'ADNsb dans un ADNdb, et (ii) l'échange de brin, c'est-à-dire l'association de cet ADNsb avec le brin complémentaire au détriment du brin initialement apparié (Murayama et al., 2008).

RAD51 lie l'ADNsb en s'oligomérisant autour, formant ainsi un filament hélicoïdal comptant six monomères pour compléter un tour de l'hélice d'ADN, ce qui correspond à trois nucléotides liés par monomère. (Yu et al., 2001) L'assemblage des monomères nécessite la fixation d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP). Toutefois, RAD51 possède une activité ATPasique qui mène au désassemblage du filament une fois la molécule d'ATP hydrolysée. Les monomères perdent ensuite l'adénosine diphosphate (ADP) et peuvent alors fixer une nouvelle molécule d'ATP, régénérant le filament. La régulation de l'ATP dans l'environnement de RAD51 contrôle donc son activité. Il a été démontré que la présence de magnésium ( $Mg^{2+}$ ) stimule l'activité d'hydrolyse de l'ATP mais ralentit la dissociation de l'ADP du monomère de RAD51, bloquant ainsi RAD51 en forme monomérique inactive. À l'inverse, la présence de calcium ( $Ca^{2+}$ ) inhibe l'activité d'hydrolyse, possiblement en induisant un changement de conformation de RAD51, ce qui stabilise le filament et promeut ainsi l'activité de recombinaison (Bugreev and Mazin, 2004; Fornander et al., 2012).

Structurellement, la partie N-terminale de RAD51 contient un domaine de liaison à l'ADN (Aihara et al., 1999). Il a été suggéré qu'il serait constitué de deux boucles L1 et L2 responsables de l'interaction avec l'ADNsb et db respectivement (Reymer et al., 2009). Dans sa partie C-terminale, les motifs Walker A et Walker B qui sont impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, sont conservés, ce qui est une caractéristique de la famille des recombinaisons (Miller et al., 2004).

## 1.2.2. BRCA1 et BRCA2

La fonction de recombinaison de RAD51 est étroitement associée aux deux suppresseurs de tumeur : BRCA1 et BRCA2.

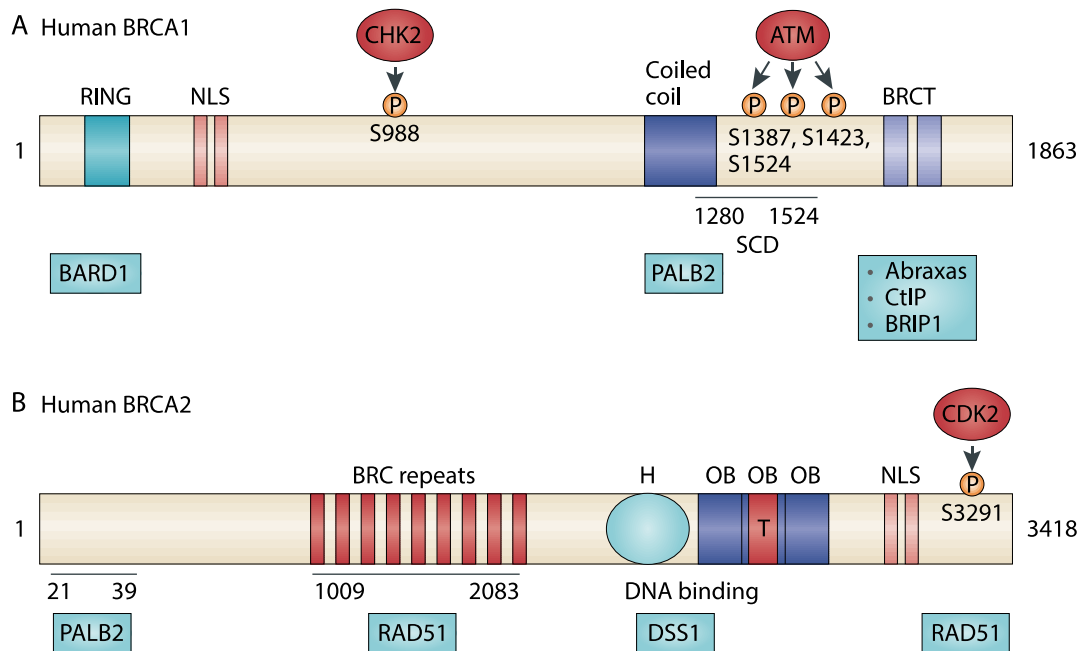
### 1.2.2.1. BRCA1

Le gène *BRCA1* (pour "Breast Cancer 1, early onset") a été le premier gène identifié comme gène de susceptibilité au cancer du sein (Hall et al., 1990; Miki et al., 1994). Il se situe sur le chromosome 17q21 et code pour une protéine nucléaire de 1862 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 208 kDa. La protéine BRCA1 possède plusieurs domaines dont certaines fonctions sont aujourd'hui connues (**Figure 10**). Ainsi, son extrémité N-terminale présente un domaine RING impliqué dans son activité d'E3 ubiquitine ligase et son interaction avec la protéine BARD1 dont dépend cette activité. Au centre, se trouve un domaine "coiled-coil". Ce type de domaine est connu pour permettre les interactions entre protéines permettant notamment à BRCA1 de s'associer à PALB2. Enfin, son extrémité C-terminale est constituée d'un domaine BRCT qui est impliqué dans l'interaction avec des protéines phosphorylées en réponse aux dommages à l'ADN, telles que CtIP, BRIP1(FANCI) et ATRXAS. BRCA1 possède différentes fonctions selon les partenaires auxquels elle s'associe. Ainsi, le complexe BRCA1-BARD1 ("core complex") a une activité d'ubiquitine ligase et contrôle l'amplification des centrosomes (Brodie and Henderson, 2012). Le complexe BRCA1-A : BRCA1-ATRAXAS-RAP80-BRCC36-BRCC45-MERIT40, permet la localisation de BRCA1 au niveau de la CDB, et joue un rôle dans le point de contrôle G2/M. Lorsque BRCA1 interagit avec BRIP1(FANCI) et TOPBP1, formant le complexe BRCA1-B, elle est impliquée dans la réplication et est nécessaire pour la progression en phase S. Associée avec CtIP et MRN, constituant le complexe BRCA1-C, elle permet l'initiation de la résection de l'ADN au niveau de la CDB (cf. 1.1.1.6) et agit sur le point de contrôle G2/M. Enfin, BRCA1 s'associe à PALB2 pour l'activer et permettre sa localisation avec BRCA2 et RAD51 au niveau de la CDB. BRCA1 est donc un lien entre la détection de la CDB et sa réparation par RH (Huen et al., 2010; Roy et al., 2012). Plus récemment, il a été rapporté que BRCA1 et PALB2 réguleraient la transcription des gènes des voies de régulation des facteurs de croissance et de réponse à l'inflammation, suggérant un nouvel aspect de leur fonction de suppresseur de tumeur (Gardini et al., 2014).

### 1.2.2.2. BRCA2

Le gène *BRCA2* (pour "Breast Cancer 2, early onset") fut le second gène identifié de susceptibilité au cancer du sein (Wooster et al., 1995; Wooster et al., 1994). Le risque de cancer conféré par des mutations de ce gène a été estimé à 55% pour le cancer du sein et 16.5% pour celui de l'ovaire, à l'âge de 70 ans. Dans le cas de BRCA1, ces risques atteignent 60% pour les deux cancers (Mavaddat et al., 2013). Les fonctions connues de la protéine BRCA2 (**Figure 10**) sont essentiellement dans la réparation par RH (Roy et al., 2012), c'est en effet un médiateur établi de la RH (Jensen et al., 2010). Toutefois, il a été proposé qu'elle puisse aussi jouer un rôle dans la régulation de la duplication des centrosomes (Wang et al., 2011). — *Ses fonctions dans le contexte de la RH sont détaillées dans une revue de littérature présentée au chapitre 2.* —





**Figure 10. Les domaines de BRCA1 et BRCA2**

Les noms des protéines dans les encadrés bleus indiquent les domaines où ces protéines interagissent avec BRCA1 ou BRCA2.

**(A)** Représentation des domaines de BRCA1 et des sites connus de modifications post-traductionnelles. RING (Really Interesting New Gene finger domain) : domaine à doigt de Zinc ; NLS (Nuclear Localization Sequence) : séquence de localisation nucléaire ; Coiled-coil : domaine constitué d'hélice  $\alpha$  enroulées entre elles ; SCD : domaine riche en motifs SQ/TQ ciblant de phosphorylation ; BRCT (BRCA1 C terminus) : domaine C terminal de BRCA1, motif connu pour agir en tant que site de liaison aux protéines phosphorylées

**(B)** Représentation des domaines de BRCA2 et des sites connus de modifications post-traductionnelles. BRC : motif particulier répété constituant un domaine ; H : domaine hélicoïdal ; OB (Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding-fold domain) : domaine de liaison d'oligonucléotides/oligosaccharides en forme de tonneau  $\beta$  ; T (Tower domain) : domaines constitués d'hélices  $\alpha$ .

(Adaptée de (Roy et al., 2012))

### 1.2.3. PALB2 et les ADN polymérase

PALB2 (pour "Partner and Localizer of BRCA2") a initialement été découverte comme une protéine partenaire essentielle au fonctionnement de BRCA2 dans la RH (Xia et al., 2006). PALB2 est à présent établi comme un médiateur de la recombinaison homologe (Buisson et al., 2010; Dray et al., 2010) et l'identification de nouveaux partenaires (Ma et al., 2012; Sy et al., 2009) laisse entrevoir des rôles à différents niveaux dans la protection du génome, notamment au niveau de la polymérisation de l'ADN.

#### 1.2.3.1. Le suppresseur de tumeur PALB2

Le gène *PALB2* a été rapidement établi comme un suppresseur de tumeur dont les mutations confèrent une susceptibilité aux cancers du sein et du pancréas (Jones et al., 2009; Rahman et al., 2007). Par la suite, ce gène a été associé à d'autres cancers dont celui de l'ovaire (Dansonka-Mieszkowska et al., 2010). Une étude récente sur l'estimation du risque de cancer du sein familial conféré par des mutations de ce gène, suggère que *PALB2* serait le troisième gène de susceptibilité au cancer du sein, rejoignant *BRCA1* et *BRCA2* (Antoniou et al., 2014). En effet, cette étude portant sur un grand nombre de familles de différentes nationalités et ethnies, conclut que des mutations menant à des protéines tronquées confèrent une augmentation du risque de cancer du sein de 8 à 9 fois chez les femmes de moins de 40 ans. Cette augmentation du risque diminue avec l'âge mais reste élevée, puisque les femmes de plus de 60 ans ayant des mutations de *PALB2* présentent toujours un risque 5 fois plus élevé de développer un cancer du sein. Les auteurs suggèrent ainsi que le risque conféré par des mutations de *PALB2* rejoint celui de *BRCA2* justifiant de tester pour ce gène les femmes susceptibles de développer un cancer du sein. — *Les fonctions et les partenaires de PALB2 dans la réparation des CDB, ainsi que son implication dans le cancer, font l'objet du chapitre 2.* —

Dans le contexte particulier du stress réplicatif tel que le blocage d'une fourche de réplication, il a récemment été rapporté que la phosphorylation de RPA participe au recrutement de *PALB2* (Murphy et al., 2014). De plus, nous avons montré que *PALB2* aide à initier l'étape de polymérisation de l'ADN en permettant le maintien et la stimulation de la polymérase  $\eta$  au niveau de la fourche de réplication (Buisson et al., 2014).

— *Ceci sera présenté au chapitre 3.* —

#### 1.2.3.2. Les ADN polymérase dans la réparation des dommages à l'ADN

Chez l'humain, il existerait 14 ADN polymérase (Loeb and Monnat, 2008). Les ADN polymérase sont définies par leur fonction de synthèse de l'ADN, c'est-à-dire d'ajouter bout à bout des nucléotides en établissant des liens phosphodiester. En se basant sur un brin d'ADN, elles reproduisent l'information et ainsi synthétiser le brin complémentaire, permettant la réplication de l'ADN. Elles sont donc caractérisées par leur fidélité qui évalue leur capacité à reproduire l'ADN sans insérer d'erreur. Leur fidélité est dans certains cas accrue par une activité exonucléasique qui permet la correction des erreurs de nucléotides, c'est la propriété de "relecture". La majeure partie de la synthèse de l'ADN de la cellule est effectuée par cinq ADN polymérase (Pol) canoniques, également appelées "classiques": Pol  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , et  $\gamma$ . Pol  $\alpha$  est connue pour initier la réplication de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire ; ce sont ensuite les Pol  $\delta$  et  $\epsilon$  qui la poursuivent et synthétisent respectivement les brins tardifs

et précoces de l'ADN. Pol  $\gamma$  est une polymérase qui est importée dans les mitochondries où elle effectue ses fonctions de maintenance de l'ADN mitochondriale. Enfin, la Pol  $\beta$  est impliquée dans la réparation des modifications de bases de l'ADN par le système d'excision de base (ou BER pour Base Excision Repair).

Dans le cas de dommages à l'ADN, les ADN polymérases classiques peuvent être bloquées. Or, une pause dans la réplication de l'ADN, voire un arrêt, a des conséquences désastreuses pour la cellule. Des polymérases permettant de poursuivre la synthèse malgré la présence d'un dommage ont été découvertes ; ces polymérases sont appelées : Polymérases Translésionnelles (ou TLS pour TransLesion Synthesis). Aujourd'hui, la famille de polymérases Y, réunit les polymérases TLS connues, c'est-à-dire : Pol  $\eta$ ,  $\kappa$ ,  $\iota$ , et REV1. Elles sont caractérisées par leur capacité à recopier l'ADN au travers d'une lésion, une faible processivité, et une absence d'activité de relecture associée à un haut taux d'erreur lorsqu'elles copient de l'ADN non-endommagé. Chacune des quatre polymérases de la famille Y répond à un type particulier de lésion impliquant majoritairement des modifications de bases (sites abasiques, lésions dues aux benzopyrène et UV). Bien que ne faisant pas partie de la famille Y, Pol  $\zeta$  est considérée comme une polymérase TLS. Pol  $\zeta$ , formée de 2 sous-unités : REV3 et REV7, est peu caractérisée chez l'humain. Basée sur les études chez la levure, le modèle de la synthèse translésionnelle de l'ADN implique une première étape qui utilise une polymérase TLS de la famille Y pour franchir le dommage en insérant un nucléotide en face de celui-ci, puis une seconde étape qui prolonge la synthèse en utilisant une autre polymérase. Il est proposé que Pol  $\zeta$  réalise cette seconde étape et que REV1 régule le changement de polymérase (Sharma et al., 2013). Pol  $\zeta$  est aussi considéré comme une polymérase TLS impliquée dans la voie de réparation de Fanconi, en particulier, elle effectuerait la synthèse au niveau du pont interbrin, en coopération avec REV1 (Kim and D'Andrea, 2012). Pol  $\nu$  ne fait pas non plus partie de la famille Y mais est aussi impliquée dans la synthèse translésionnelle au niveau des ICL par la voie de Fanconi (Zietlow et al., 2009). Pol  $\kappa$ ,  $\theta$  et  $\zeta$  jouent un rôle dans la synthèse translésionnelle des dommages dus au stress oxydant (Yoon et al., 2014).

En parallèle des polymérases TLS, d'autres polymérases participeraient à la réparation des dommages. Ainsi Pol  $\beta$  et  $\lambda$  sont impliquées dans le BER (Braithwaite et al., 2010) tandis que Pol  $\lambda$  et  $\mu$  participent au NHEJ (Lee et al., 2004; Mahajan et al., 2002).

Concernant la réparation par recombinaison homologue, peu de choses sont connues sur l'étape de synthèse de la phase post-synaptique. Des analyses *in vitro* ont suggéré que Pol  $\varepsilon$  pourrait jouer un rôle dans la réparation par RH des délétions d'une à une centaine de paires de base de l'ADN (Jessberger et al., 1993). Une déficience de Pol  $\zeta$  est associée avec une sensibilité aux CDB en particulier dans le cas de radiations ionisantes et Pol  $\zeta$  est impliquée, avec REV1, dans la réparation des CDB par RH (Sharma et al., 2012). Pour la réparation des ICL, Pol  $\nu$  interviendrait dans l'étape de RH, en parallèle de son rôle dans la synthèse translésionnelle (Moldovan et al., 2010). Dans le contexte d'une fourche de réplication bloquée, il a été proposé que Pol  $\eta$  pourrait agir à deux niveaux : soit en tant que polymérase TLS qui aide à la progression de la fourche de réplication malgré le dommage ; soit, si le blocage de la fourche de réplication a provoqué une CDB, en tant que polymérase initiant la synthèse d'ADN lors de la phase post-synaptique de la réparation par RH (McIlwraith et al., 2005). — *L'interaction de Pol  $\eta$  avec les protéines de la RH PALB2 et BRCA2, fera l'objet du chapitre 3.* —

## 1.3. Les stratégies thérapeutiques contre le cancer utilisant les cassures double-brin

— *Un objectif de mon doctorat était de proposer une nouvelle molécule pour le développement de traitements anticancéreux, basés sur les CDB de l'ADN. Cette section présente donc brièvement les stratégies thérapeutiques contre le cancer, ainsi que les agents actuellement en cours d'utilisation ou de développement, qui utilisent les CDB.* —

La plupart des cellules cancéreuses prolifèrent plus rapidement que les cellules saines. Les thérapies anticancéreuses utilisent cette caractéristique en exposant l'organisme à des traitements tuant les cellules mais qui auront un effet plus important sur les cellules prolifératives. L'activation de la mort cellulaire via l'arrêt du cycle cellulaire, peut être ciblée directement en inhibant le fuseau mitotique (par exemple en utilisant les taxanes ou les vinca-alcaloïdes) ou en modifiant les signaux de régulation du cycle cellulaire à l'aide d'hormones, d'anticorps ou de molécules inhibant ces signaux. Toutefois, la stratégie la plus employée est celle consistant à endommager l'ADN ce qui provoque l'arrêt du cycle immédiatement ou lors de la réplication.

### 1.3.1. Les stratégies thérapeutiques

#### 1.3.1.1. Les stratégies existantes et leurs perspectives de développement

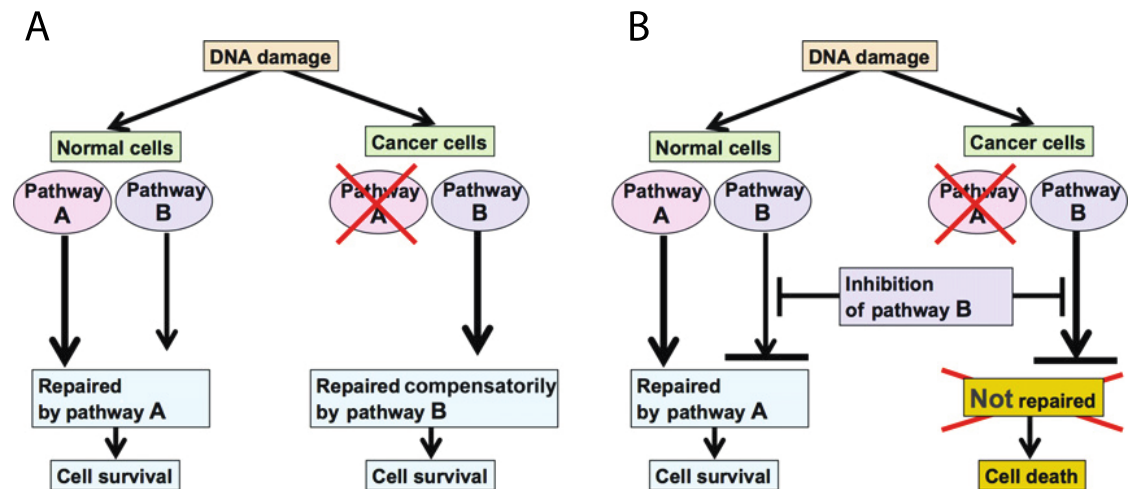
Les traitements les plus courants pour le cancer, en dehors de la chirurgie, sont les radio- et chimiothérapies qui endommagent l'ADN. Bien que ces thérapies soient limitées par la toxicité liée à la dose que reçoivent les tissus sains environnant la tumeur, elles sont efficaces car les tumeurs ont souvent une réponse aux dommages à l'ADN qui est altérée, ce qui leur confère un avantage prolifératif lors du développement initial du cancer, mais devient un désavantage lors de l'utilisation d'un traitement qui endommage l'ADN. Toutefois, les voies de réparations peuvent aussi être à l'origine de résistance ou participer au maintien du phénotype cancéreux. La manière dont les voies de réparation de l'ADN sont affectées dans les cellules tumorales offre donc des opportunités de stratégies thérapeutiques intéressantes.

Les stratégies présentement étudiées suivent deux concepts : (i) si une voie de réparation confère une protection aux cellules tumorales, la cibler permet de sensibiliser les cellules aux traitements ; ce premier concept mène au développement de molécule capables de potentialiser l'effet des traitements conventionnels et donc d'être utilisées en combinaison ; (ii) si une voie est affectée dans les cellules cancéreuses mais ne provoque pas leur mort car une voie de secours est activée, inhiber cette voie de secours tuera spécifiquement les cellules cancéreuses ; ce second concept repose sur le principe de létalité synthétique et mène au développement de molécules pouvant être utilisées seules, c'est-à-dire en tant que "simple agent".

Comme ces thérapies utilisent les connaissances des bases moléculaires de la tumeur pour tuer spécifiquement ou préférentiellement les cellules tumorales, on les appelle des thérapies ciblées. Ces thérapies consistent essentiellement au développement de molécules inhibitrices des protéines de la réparation de l'ADN et certaines ont déjà atteint le stade des études cliniques. — *Ceci sera présenté à la section 1.3.3* —.

### 1.3.1.2. Le principe de létalité synthétique

Dans le contexte des thérapies contre le cancer utilisant les dommages à l'ADN, le principe de létalité synthétique repose sur le fait que la défaillance concomitante de deux voies de réparation complémentaires mène à la mort cellulaire, tandis que la défaillance d'une seule de ces voies n'est pas létale (**Figure 11**). Ce principe a été particulièrement étudié dans le cas des mutations des gènes de la RH, *BRCA1* et *BRCA2*, avec l'inhibition des Poly(ADP-Ribose) Polymérase (ou PARP), protéines notamment impliquées dans le BER. Il a ensuite été proposé que la létalité de cette combinaison puisse être utilisée pour traiter les cancers présentant des mutations germinales ou acquises dans la voie de réparation par RH. Ce défaut de réparation par RH qui n'est pas dû à des mutations dans un gène BRCA mais qui mène aux mêmes conséquences, est appelé effet "BRCAness". De nombreuses interactions synthétiques létales, dont certaines sont basées sur le "BRCAness", ont depuis été rapportées à partir de l'utilisation d'inhibiteurs ou de siRNA sur des cellules, des souris "knock-out", ou lors d'études cliniques (**Tableau 2**).



**Figure 11. Le principe de létalité synthétique dans le contexte du cancer**

(A) Une cellule normale utilise la voie de réparation A pour réparer les dommages à son ADN et survivre. La cellule cancéreuse, déficiente pour la voie A, utilise la voie de secours B, pour survivre. (B) L'inhibition de la voie B n'affecte pas la cellule normale ; en revanche, la cellule cancéreuse est dépendante de cette voie pour survivre, son inhibition entraîne donc la mort cellulaire. (Adaptée de (Hosoya and Miyagawa, 2014))

Ainsi, l'inhibition des PARP est synthétique létale avec des défauts : (i) de la signalisation des CDB et du cycle cellulaire au niveau d'ATM, ATR, MRE11, NBS1, CHK1, CHK2, RPA ; (ii) du NHEJ au niveau de ARTEMIS, LIG4 ; (iii) de la voie de Fanconi et de la RH au niveau de BRCA1, BRCA2, PALB2, FANCA, FANCD2, FANCC, RAD54, APRIN ; (iv) des protéines impliquées dans la progression au travers des fourches bloquées de réplication ou de transcription telles que PCNA ("Proliferating Cell Nuclear Antigen"), DDB1 ("DNA Damage-Binding protein 1"), XAB2 ("XPA-Binding protein 2") (Abbotts et al., 2014; Brough et al., 2012; Hosoya and Miyagawa, 2014). Deux autres combinaisons létales ont été proposées entre les inhibiteurs de PARP (ou PARPi) et RAD51D ou PTEN ("Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase") (Abbotts et al., 2014). La combinaison avec PTEN semble particulièrement intéressante car les

mutations de PTEN sont associées à un retard de la réparation des CDB qui passe par un défaut de la RH au niveau de MRE11, RAD51 ou des paralogues de RAD51, donnant une explication plausible à l'interaction synthétique létal observée avec les inhibiteurs de PARP.

Les inhibitions d'ATM ou de DNA-PKcs sont également synthétiques létales avec une diminution du niveau de XRCC1 ("X-ray Repair Cross-Complementing protein group 1"), une protéine de la voie de réparation BER. L'inhibition d'ATM est aussi synthétique létale avec une déficience d'APE1 ("DNA-(A)purinic or Apyrimidinic site lyase", également impliquée dans le BER), et réciproquement : l'inhibition d'APE1 avec une déficience d'ATM, ou BRCA2, provoque la mort cellulaire. D'une manière générale, l'inhibition d'APE1 semble provoquer la mort cellulaire à cause de l'environnement acide de la tumeur qui provoque une diminution de la RH au profit du BER (Abbotts et al., 2014).

Enfin, un défaut de RAD52 est synthétique létal avec des altérations de la RH au niveau de BRCA1, BRCA2 ou PALB2, et un tel effet a également été identifié dans les cellules de poulet avec une diminution du niveau du paraglogue de RAD51 : XRCC3 (Feng et al., 2011; Lok et al., 2013; Lok and Powell, 2012). Concernant les défauts de la RH, il a également été rapporté une interaction synthétique létale entre un défaut ou une inhibition de RAD51, avec l'inhibition d'ATR et CHK1 (Krajewska et al., 2014).

**Tableau 2. Les interactions synthétiques létales démontrées**

Déficience / inhibition	Interaction synthétique létale
<b>ATM</b>	APE1, PARP, XRCC1
<b>BRCA2</b>	APE1, ATM, PARP
<b>DNA-PKcs</b>	XRCC1
<b>PARP</b>	- signalisation des CDB et du cycle cellulaire : ATM, ATR, CHK1, CHK2, MRE11, NBS1, RPA - réparation de l'ADN par le NHEJ : ARTEMIS, LIG4 - réparation de l'ADN par la voie de Fanconi et la RH : APRIN, BRCA1, BRCA2, FANCA, FANCC, FANCD2, PALB2, PTEN, RAD54 - progression de la réplication ou de la transcription : DDB1, PCNA, XAB2
<b>RAD51</b>	ATR, CHK1
<b>RAD52</b>	BRCA1, BRCA2, PALB2, (XRCC3)

Les thérapies en développement qui veulent utiliser ces interactions synthétiques létales consistent donc à utiliser des molécules capables d'inhiber spécifiquement une protéine clef d'une voie de réparation. L'inhibition de cette protéine provoquera la mort des cellules qui présentent une défaillance endogène de la voie de réparation alternative. Ces thérapies utilisent les connaissances des fondements moléculaires de la tumeur du patient, pour lui proposer un traitement adapté, c'est à dire capable de tuer efficacement ses cellules tumorales en limitant la toxicité. En ce sens, ces thérapies sont dites "personnalisées".

## 1.3.2. Les agents thérapeutiques conventionnels

### 1.3.2.1. La radiothérapie

Les radiations ionisantes et les agents radiomimétiques, telles que la néocarzinostatine, provoquent des CDB, indépendamment de la réplication et qui peuvent tuer des cellules non répliquatives (Helleday et al., 2008). La radiothérapie utilise les radiations ionisantes pour créer un grand nombre de CDB qui, ne pouvant pas être réparées, entraînent la mort cellulaire via l'activation des points de contrôle. Deux types de radiations ionisantes sont utilisés ou à l'étude pour les traitements par radiothérapie : les radiations de photons (rayons X et  $\gamma$ ) et les radiations de particules chargées (électron, protons, ions lourds, particules  $\alpha$  et  $\beta$ ) (Schulz-Ertner et al., 2006). Dans les deux cas, les radiations sont capables de créer des CDB soit directement, soit indirectement en provoquant la radiolyse de l'eau qui génère des radicaux libres qui endommagent l'ADN.

### 1.3.2.2. La chimiothérapie

Les agents chimiothérapeutiques conventionnels interfèrent majoritairement avec la fourche de réplication via différents mécanismes. La famille des agents alkylants, tels que les sels de platine (cisplatine, oxaliplatine,...) ou les moutardes azotées (ifosfamide, melphalan,...), provoquent la formation de ponts interbrins de l'ADN qui bloquent la fourche de réplication. Parfois c'est la synthèse de l'ADN qui est ciblée : son inhibition perturbe la réplication provoquant la formation de CSB et CDB. L'aphidicoline, par exemple, inhibe les ADN polymérases, tandis que l'hydroxyurée (HU) inhibe la ribonucléotide réductase provoquant un manque de nucléotides (dNTP) qui sont nécessaires à la synthèse de l'ADN. Les antimétabolites, tel que le 5-fluorouracile (5FU) ou les thiopurines, sont des molécules ressemblant aux dNTP ou à leurs précurseurs, mais qui inhibent les voies de métabolisation des nucléotides, menant là encore, à un manque de dNTP pour la réplication. Une autre manière d'interférer avec la réplication est de cibler les topoisomérases qui permettent de relâcher les contraintes physiques mises sur l'ADN au cours de la réplication. Pour ce faire les topoisomérases coupent un ou les deux brins de l'ADN avant de permettre leur religation. Les inhibiteurs de topoisomérase empêchent cette religation donnant lieu à des CDB persistantes, directement ou lors du passage de la fourche de réplication (Helleday et al., 2008). — *Les inhibiteurs de topoisomérase seront présentés dans la section suivante et discutés au chapitre 6.*

### 1.3.2.3. Les inhibiteurs de topoisomérase

Les inhibiteurs de topoisomérase sont extrêmement spécifiques et peuvent donc être envisagés comme des thérapies ciblées. Les inhibiteurs utilisés en cliniques et qui ciblent la Topoisomérase I (TOP1) n'affectent pas la Topoisomérases II (TOP2) et inversement. Le mécanisme d'action de ces inhibiteurs a été la première démonstration du concept d'empoisonnement d'enzyme, plutôt que d'inhibition. En effet, ils ne provoquent aucune inhibition catalytique mais bloquent la protéine sur l'ADN au cours de sa fonction, lorsqu'elle est liée de manière covalente à l'ADN, formant des complexes de clivages TOP-ADN (nommés TOPcc). L'empoisonnement de la Topoisomérase bloque donc les TOPcc et empêche ainsi la religation des ADN, ce qui produit : une CSB dans le cas des TOP1cc (TOPcc formés par TOP1), ou une CDB pour les TOP2cc (TOPcc formés par TOP2) (**Figure 12**). Ce mécanisme implique que la toxicité des inhibiteurs dépend des niveaux et de l'activité de la

Topoisomérase ciblée. — Ce modèle d'empoisonnement d'enzyme a également été proposé pour les inhibiteurs de PARP comme il le sera vu à la section 1.3.3.1.

- Les inhibiteurs de la Topoisomérase I (TOP1) :

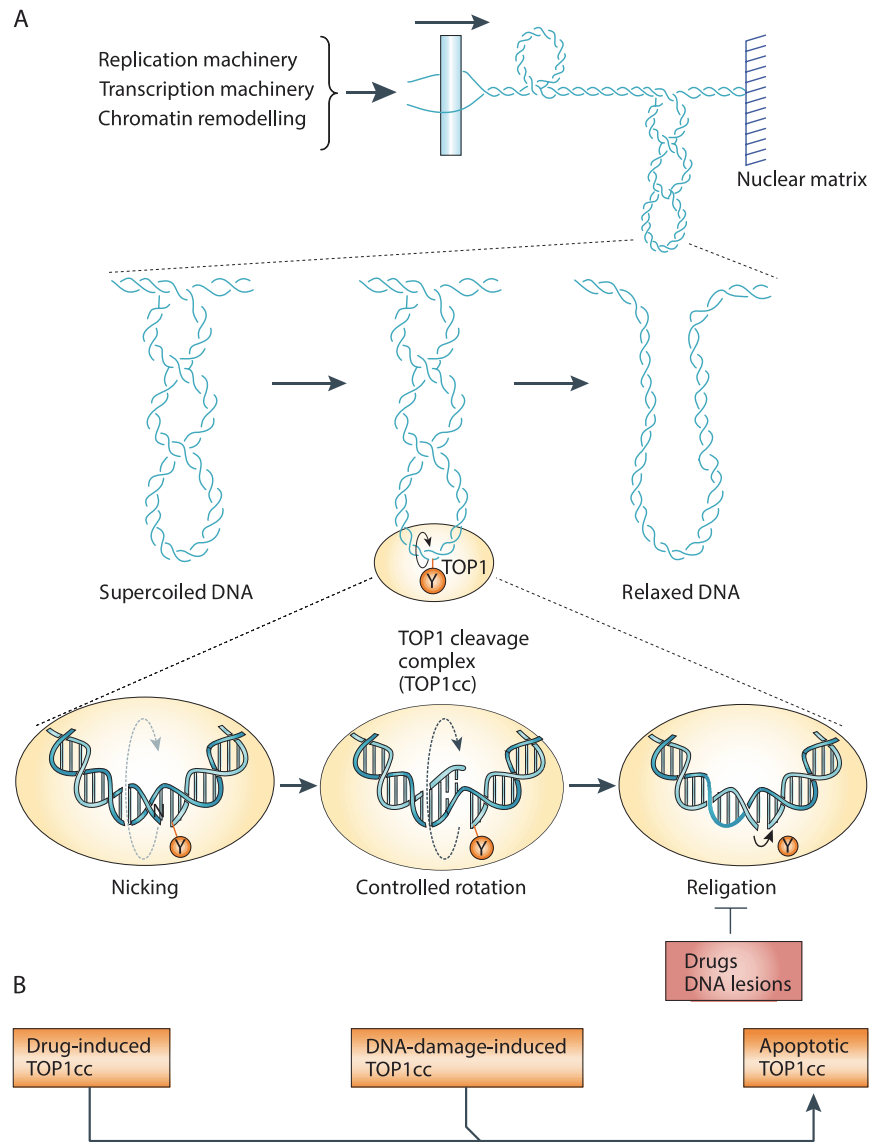
— De nombreuses molécules inhibant la Topoisomérase I ont été développées dont certaines ont atteint les études cliniques. Ces molécules sont notamment répertoriées dans des revues de littératures suivantes (Khadka and Cho, 2013; Pommier, 2006). Seules celles actuellement utilisées pour des traitements, ou qui sont en cours d'études cliniques, sont ici présentées. —

Le premier inhibiteur de TOP1 découvert fut la camptothécine, un alcaloïde naturel dont la toxicité empêche son utilisation thérapeutique. Il existe toutefois plusieurs inhibiteurs de TOP1 dérivé de la camptothécine, utilisé en clinique : le topotecan est utilisé pour le cancer de l'ovaire et le cancer récurrent du poumon à petites cellules ; l'irinotecan sert au traitement des cancers gastro-intestinaux. Ces deux molécules sont aussi utilisées pour les glioblastomes, les sarcomes, et cancers du col de l'utérus. Toutefois leur utilisation est limitée par : (i) leur toxicité, (ii) leur instabilité chimique *in vivo* menant à leur rapide inactivation ou séquestration par l'albumine sérique, (iii) et leur rejet des cellules par les transporteurs de drogue à efflux. Pour dépasser ces limites, des modifications chimiques ont été introduites et l'étririnecan pegol (NKT-102) est en cours d'étude clinique phase III pour les cancers de l'ovaire, du sein et du colon. En parallèle, deux familles d'inhibiteurs non-basés sur la camptothécine, sont en développement clinique de phase I : les indénoisoquinolines - indotecan (LMP400) et indimitecan (LMP776) ; et la molécule Genz-644283 (SAR402674). (Pommier, 2013)

- Les inhibiteurs de la Topoisomérase II (TOP2) :

Concernant la Topoisomérase II, son empoisonnement peut mener à deux types de complexes : les TOP2cc qui comme les TOP1cc produisent une CSB, et les TOP2cc-concertés qui coupent les deux-brins de l'ADN et forment donc une CDB. L'anthracycline daunorubicine (ou daunomycine) fut historiquement la première molécule ciblant TOP2 identifiée et est toujours utilisée dans le traitement des leucémies aigües. La doxorubicine, une autre anthracycline, est plus largement utilisée en première ligne dans les cancers du sein, de la vessie et de la thyroïde, ainsi que les sarcomes des tissus mous et des os, les lymphomes hodgkinien ou non, et le myélome multiple. L'épirubicine, un isomère actif mais moins toxique que la doxorubicine, est utilisée dans les cancers du sein, de l'œsophage et gastrique. La limitation majeure des anthracyclines est qu'elles agissent aussi comme intercalant de l'ADN, provoquant une baisse d'efficacité de la capture des TOP2cc lors de l'augmentation des doses. De plus, elles génèrent des intermédiaires réactifs de l'oxygène. Toutefois, elles présentent des propriétés différentes des autres poisons de TOP2 qui participent à leur efficacité : (i) elles sont hautement spécifique des TOP2cc ; (ii) la plupart des TOP2cc bloqués sont concertés et donc associés à des CDB ; (iii) la réparation des TOP2cc après retrait de l'inhibiteur est lente.





**Figure 12. Le fonctionnement de la Topoisomérase I et le mode d'action de ses inhibiteurs**

**(A)** Au cours de la réplication, la Topoisomérase I relâche l'ADN super-enroulé, en coupant un brin de l'ADN via son association par liaison covalente, permettant à ce brin de tourner autour du complexe TOP1-ADN (TOP1cc). Une fois les tensions de l'ADN dissipées, TOP1 maintient les deux extrémités de la coupure alignées et permet la religation en détachant sa liaison covalente à l'ADN. **(B)** Les inhibiteurs de TOP1 empêchent la religation en stabilisant les TOP1cc. Ceci peut aussi être provoqué par des dommages à l'ADN et se produit lors de l'apoptose. (Adaptée de (Pommier, 2006))

L'anthracenedione mitoxantrone est un analogue synthétique des anthracyclines, dont la cardiotoxicité est réduite grâce à une diminution de la production de dérivés réactifs de l'oxygène. Elle est utilisée en première ligne pour les traitements des leucémies aiguës de l'enfant et de l'adulte, et en seconde ligne pour les cancers du sein, de la prostate et du sang.

L'étoposide est très utilisé en chimiothérapie des tumeurs solides dont celles du poumon à petites cellules, des testicules, des cellules germinales, endocrines, ainsi que les ostéosarcomes, les sarcomes d'Ewing, les neuroblastomes et les sarcomes de Kaposi. L'étoposide a plusieurs particularités : (i) c'est l'inhibiteur de TOP2 le plus spécifique utilisé en clinique ; (ii) elle n'agit pas comme intercalant de l'ADN donc il n'y a pas de limite de dose dans la capture des TOP2cc ; (iii) elle capture un grand nombre de TOP2cc ; (iv) les TOP2cc bloqués ne sont pas concertés donc sont associés à une CSB ; (v) les TOP2cc sont rapidement réversibles lors du retrait de la molécule ; (vi) l'étoposide capture aussi bien TOP2 $\alpha$  que  $\beta$  contrairement aux anthracyclines qui ciblent plutôt TOP2 $\alpha$ .

Enfin, quatre molécules sont en développement clinique : F14512, le vosaroxin, C-1311 et XK469. Et il existe deux réels inhibiteurs de l'activité catalytique de TOP2 : le dexrazoxane (ICRF-187) qui est uniquement utilisé comme modulateur de la cardiotoxicité des anthracyclines ; et le merbarone qui sert aux études cellulaires et mécanistiques. Il a été plus récemment suggéré que l'acide salicylique pourrait agir également comme un tel inhibiteur. (Pommier, 2013)

### **1.3.3. Les nouvelles classes d'agents thérapeutiques en développement**

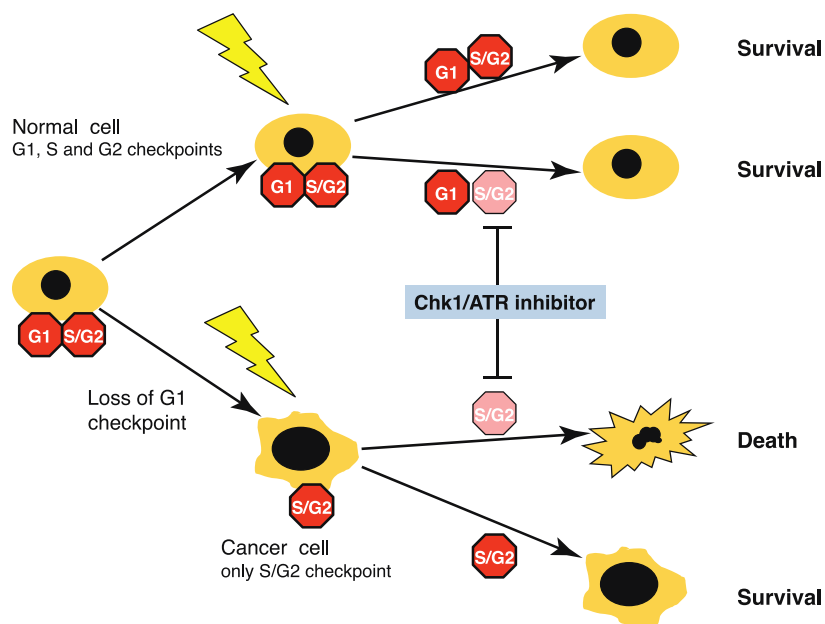
#### **1.3.3.1. Les inhibiteurs de PARP**

Les molécules les plus étudiées pour de nouveaux traitements contre le cancer, sont des inhibiteurs de l'activité des PARP (PARPi). A l'origine, ces inhibiteurs furent proposés pour induire une inhibition du BER et de la réparation des CSB, provoquant l'accumulation de dommages et la formation de CDB lors de leur réplication. Toutefois, le mécanisme par lequel les PARPi provoquent la mort cellulaire est toujours à l'étude et avec la progression des connaissances sur les multiples fonctions des PARPs, d'autres modèles ont vu le jour dont celui de l'empoisonnement enzymatique. Dans ce modèle, les PARPi provoquent le blocage des PARP sur l'ADN. Lors de la réplication, la fourche est alors bloquée menant à la formation des CDB. *Les fonctions des PARPs, ainsi que les différents PARPi existants et les potentiels mécanismes d'action ont fait l'objet de nombreuses revues de littérature* (Beck et al., 2014; De Lorenzo et al., 2013; Krietsch et al., 2013; Lupo and Trusolino, 2014).

L'utilisation des PARPi a été étudiée en priorité en combinaison avec des agents de dommage à l'ADN afin de potentialiser leurs effets (Hosoya and Miyagawa, 2014; Lupo and Trusolino, 2014). En accord avec le concept de la létalité synthétique, une combinaison de PARPi avec un inhibiteur du BER (inhibiteur d'APE1), est aussi en étude clinique. Toutefois, le plein potentiel de la létalité synthétique avec les PARPi est exploité dans les études les utilisant comme simple agent dans le traitement de cancers déficients pour une voie de réparation (*cf.* 1.3.1.2).

### 1.3.3.2. Les inhibiteurs des senseurs des cassures double-brin et du cycle cellulaire

Une autre stratégie intéressante cible la réponse précoce aux dommages à l'ADN, en particulier au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire. Cette stratégie consiste à empêcher les cellules cancéreuses de réparer les dommages créés par les agents thérapeutiques conventionnels (cf. 1.3.2.2), en entravant la signalisation des CDB ou l'arrêt du cycle cellulaire (**Figure 13**). Les inhibiteurs des senseurs des CDB ou du cycle cellulaire cherchent donc plutôt à potentialiser l'effet d'autres traitements et sont le plus souvent utilisés en combinaison.



**Figure 13. Exemple de stratégie ciblée utilisant l'inhibition des points de contrôle**

Une cellule normale peut devenir cancéreuse suite à la perte de son point de contrôle G1/S. L'induction de dommages à l'ADN, combinée à l'inhibition du point de contrôle intra-S ou G2/M, via l'inhibition d'ATR-CHK1, permet d'induire spécifiquement la mort de la cellule ayant perdu son point de contrôle G1/S. Les autres cellules survivent. (Adaptée de (Chen et al., 2012))

#### - Les inhibiteurs d'ATM, ATR et du complexe MRN:

Dans un souci de développer des molécules sensibilisant les cellules cancéreuses à la radio- ou la chimiothérapie, ATM, ATR et MRN furent choisies comme cibles. KU55933, le premier inhibiteur d'ATM, inhibe la phosphorylation d'ATM activée par les radiations et sensibilise les cellules cancéreuses à celles-ci, ainsi qu'aux inhibiteurs de topoisomérase. KU60019, un analogue amélioré de KU55933, radiosensibilise notamment les cellules de gliomes humains. En ce qui concerne MRN, deux inhibiteurs sont à l'étude : le telomelysin et le mirin, qui préviennent l'activité exonucléase de MRE11 sans affecter ATM. Toutefois, tous ces agents n'ont pas encore été évalués en essai clinique.

Concernant les inhibiteurs d'ATR, à ce jour aucune molécule spécifique n'a été identifiée, mais certaines tel le curcumin, sont connus pour l'inhiber parmi d'autres cibles. Le schisandrin B a également une activité d'inhibition d'ATR mais affecte aussi ATM. NU6027 et VE-821 ont aussi été proposé pour inhiber ATR et ont montré des effets de sensibilisation des cellules à différents agents endommageant l'ADN. (Hosoya and Miyagawa, 2014)

- Les inhibiteurs de CHK1, CHK2 et CDC25:

UCN-01 (ou staurosporine) fut le premier inhibiteur à entrer en essais cliniques pour ses effets d'inhibition des points de contrôle via CHK1, mais les études ont été arrêtées car il présentait une toxicité et un manque d'efficacité qu'il soit utilisé seul ou en combinaison (Chen et al., 2012; Hosoya and Miyagawa, 2014). D'autres inhibiteurs avec une spécificité accrue (dont le XL844 et l'AZD7762) ont atteints les essais cliniques mais n'ont pas démontré une bonne réponse. L'inhibiteur SCH900776, spécifique de CHK1, a été utilisé en essai clinique de phase I en combinaison avec la cytarabine (un agent conventionnel de chimiothérapie des leucémies) pour le traitement de la leucémie aigüe, et il induisit une réponse partielle en combinaison avec la gemcitabine (un antimétabolite utilisé en chimiothérapie) pour le traitement des tumeurs solides. Les inhibiteurs LY2603618 - spécifique de CHK1, et LY2606368 - affectant CHK1 et CHK2, sont en cours d'études cliniques. Des inhibiteurs de CDC25 sont également en développement et certains ont atteint les études cliniques. (Hosoya and Miyagawa, 2014)

**1.3.3.3. Les inhibiteurs du NHEJ**

Les CDB peuvent être réparées par le NHEJ ou la RH. Dans le cas d'une déficience de la RH, le NHEJ peut donc servir de voie de secours et c'est aussi le mécanisme de réparation des CDB prépondérant en phase G1. Développer des inhibiteurs de cette voie ouvre alors la perspective de pouvoir sensibiliser des cellules tumorales qui seraient peu prolifératives ou déficientes en RH, aux traitements endommageant l'ADN.

- Les inhibiteurs de DNA-PK (ciblant le NHEJ):

Les inhibiteurs de DNA-PK - dont NU7026 et NU7441, sensibilisent fortement les cellules aux radiations ionisantes et aux agents endommageant l'ADN. Le principal obstacle à l'utilisation de ces inhibiteurs est que leur efficacité dépend de la différence d'expression de DNA-PK entre les cellules saines et cancéreuses, car ils présentent une forte toxicité dans les cellules normales. CC-115 est toutefois en cours d'essai clinique et KU-0060648 a montré une capacité à accroître l'effet de la doxorubicine et de l'étoposide (Hosoya and Miyagawa, 2014).

- Les inhibiteurs des DNA ligases (ciblant le NHEJ et l'alt-NHEJ):

Les DNA ligases jouent un rôle essentiel dans la réparation des DCB par le NHEJ (cf. 1.1.2.1). SCR7 est un inhibiteur de la DNA ligase IV qui augmente l'effet antitumoral d'agents créant des CDB. L67 est un inhibiteur des DNA ligases I et III $\alpha$  qui pourrait bénéficier aux traitements des cancers présentant une augmentation des niveaux de alt-NHEJ, telles que les cellules de Leucémie Myéloïde Chronique présentant la

fusion BCR-ABL ("Breakpoint cluster region protein", "Tyrosine-protein kinase ABL1"). Des études ont en effet montré une hypersensibilité de cette lignée à un traitement combinant L67 et PARPi.

#### **1.3.3.4. Les inhibiteurs de la Recombinaison Homologue**

La RH est un facteur clef dans la réponse aux traitements conventionnels du cancer qui utilisent les CDB pour provoquer la mort cellulaire. Une RH trop efficace confère ainsi une résistance aux cellules tumorales, tandis que des déficiences de cette voie de réparation sont connues pour sensibiliser les cellules, comme dans le cas des mutations de *BRCA1/2* et du "BRCAness". Dès lors, cibler cette voie pour l'inhiber semble une stratégie prometteuse tant pour sensibiliser les cellules tumorales aux traitements conventionnels que pour exploiter les interactions synthétiques létales.

##### - Les inhibiteurs des tyrosines kinases régulant la RH:

Les fusions oncogéniques de plusieurs tyrosines kinases, telles que BCR-ABL et TEL-ABL, sont connues pour provoquer une augmentation du niveau d'expression ou de la phosphorylation de RAD51. Ceci conduit à l'idée de développer des inhibiteurs de tyrosine kinase pour sensibiliser les cellules cancéreuses aux agents de dommages à l'ADN. Ainsi, l'inhibiteur de kinase imatinib, sensibilise les cellules cancéreuses aux agents pontant et aux radiations ionisantes, et l'inhibition concomitante de RAD51 a permis de contrer la résistance à l'imatinib des cellules de leucémie myéloïde chronique (Hosoya and Miyagawa, 2014).

##### - Les inhibiteurs de RAD51:

De par son rôle central dans la RH, RAD51 est une cible thérapeutique de choix pour l'inhibition de cette voie de réparation. De nombreuses molécules ciblant RAD51 via différents mécanismes sont en cours d'étude.

La première classe de molécule inhibe l'activité de RAD51. Ainsi, le metatungstate a été montré pour se lier à RAD51 mais son activité inhibitrice n'a été démontrée que sur l'homologue de RAD51 exprimé chez l'Archeobactérie MvRadA. Le DIDS (acide 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonique) est en revanche capable d'inhiber la liaison à l'ADN de RAD51 *in vitro*. L'halaquinone inhibe spécifiquement la liaison de RAD51 à l'ADNdb et réduit les foyers de RAD51 dans les cellules humaines exposées à des radiations ionisantes. Les composés A04, A10 et B02 (ainsi que ses dérivés) sont des inhibiteurs de RAD51. B02 présente une plus grande spécificité pour la RAD51 humaine et il a été démontré qu'il inhibe la réparation des CDB par RH, ainsi que sensibilise les cellules aux agents pontants de l'ADN : cisplatine et mitomycine C. Les composés A13, A30 et A79 ont aussi montré une capacité d'inhibition de RAD51 dans des études biochimiques (Martinez et al., 2010). Le composé RI-1 a été identifié comme un inhibiteur spécifique de RAD51 qui est notamment capable d'inhiber la RH dans les cellules U2OS (ostéosarcome). De plus un effet synergique de ce composé avec la mitomycine C a été observé dans les cellules U2OS, HeLa (cancer du col de l'utérus) et MCF-7 (cancer du sein) (Renodon-Cornière et al., 2013). Enfin, il a été démontré que le domaine BRC4 de BRCA2 est capable d'interagir avec RAD51 et que ce domaine, dans son ensemble ou une séquence de 28 acides aminés qu'il contient, peut être utilisé pour empêcher la nucléation de RAD51 en bloquant les domaines d'interaction entre les monomères (Chen

et al., 1999; Davies et al., 2001; Nomme et al., 2008; Pellegrini et al., 2002). Deux molécules, IBR1 et IBR2, ont été développées et sont capables de détruire l'interaction des monomères. Dans des cellules MCF-7 irradiées, l'IBR2 réduit la formation de foyers de RAD51 et accélère la dégradation de la protéine, suggérant que ces composés peuvent inhiber la RH et potentialiser l'effet des chimiothérapies provoquant des CDB (Renodon-Cornière et al., 2013).

Une autre stratégie consiste à moduler l'expression de RAD51. Ainsi, il a été observé que l'antimétabolite méthotrexate inhibe la formation des foyers de RAD51 après irradiation d'une lignée cellulaire d'ostéosarcome humain (HOS). Cette inhibition corrèle avec une diminution du niveau d'expression de RAD51, alors que les niveaux de BRCA2 et RAD52 ne sont pas affectés. Le mécanisme de cette régulation négative n'est en revanche pas connu. L'Acide phenylhydroxamique (PCI-24781, un inhibiteur d'Histone DésACétylase (HDAC) utilisé pour son activité antitumorale) diminue le niveau d'expression de RAD51 dans les cellules HTC116 (cancer colorectal). Dans des cellules irradiées, le traitement au PCI-24781 induit une complète inhibition des foyers de RAD51 avec une baisse d'expression de BRCA1, BRCA2 et RAD51. Il a été aussi proposé que ce composé active le clivage de RAD51 par la caspase-3, participant à augmenter l'effet inhibiteur. Enfin, la prodigiosine est un pigment bactérien qui provoque une augmentation des CDB, supposément via l'inhibition des TOP1 et 2. Il a été rapporté que cette molécule induit une baisse du niveau de RAD51 dans des lignées de cancer du sein (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D, A549) et du colon (HCT116). Cette diminution semble indépendante de p53 ce qui permettrait son utilisation dans le cas de cancer déficient en p53 contrairement aux molécules flavopiridole et roscovitine qui ont un effet similaire. (Renodon-Cornière et al., 2013)

D'autres cibles qui affectent indirectement RAD51 sont à l'étude. La kinase AKT-1 ("Serine/threonine-protein kinase akt-1") a été proposée car son activation provoque la phosphorylation de BRCA1 sur deux sites dans une région proche de son NLS, or il a été rapporté que des mutations de ces sites provoquent la rétention de BRCA1 et RAD51 dans le cytoplasme. Ainsi un activateur de la phosphorylation de AKT-1, tel que le methylglyoxal, pourrait être utilisé pour inhiber la RH. Plus récemment, la spironolactone a montré la capacité d'inhiber la formation des foyers de RAD51 qui corrèle avec une sensibilisation des cellules aux PARPi et agents faisant des ponts interbrins de l'ADN, ainsi qu'une réduction de la croissance tumorale de xéno greffe chez la souris (Shahar et al., 2014).

Enfin, le composé RS-1 a démontré une activité stimulatrice de RAD51 en favorisant sa liaison à l'ADNsb et la stabilité du filament. Son application pourrait être envisagée pour protéger les cellules saines (Renodon-Cornière et al., 2013).

### 1.3.4. Les limites et perspectives des traitements

Les traitements conventionnels qui se basent sur les CDB, sont principalement limités par leur toxicité sur les cellules saines. L'enjeu des nouvelles thérapies est donc d'augmenter l'index thérapeutique des traitements, c'est-à-dire leur spécificité pour les cellules tumorales tout en préservant les cellules saines. Les thérapies personnalisées qui reposent sur une meilleure connaissance des bases moléculaires de la tumeur du patient, répondent à ce besoin de spécificité et d'efficacité tout en limitant la toxicité.

Malheureusement, bien que toujours au stade d'étude clinique, le développement de résistance à ces nouveaux inhibiteurs a déjà commencé à être rapporté. Toutefois, les connaissances moléculaires des tumeurs permettent aussi d'expliquer ces résistances et d'envisager des alternatives pour y pallier. Par exemple, le développement d'une résistance aux PARPi ciblant les cancers mutés dans *BRCA1/2* a pu être expliqué par la restauration du cadre de lecture original (Dhillon et al., 2011; Sakai et al., 2009). Dans ce contexte, un traitement combinant cette fois des inhibiteurs de PARP et de la RH pourrait être alors efficace. D'autres mécanismes de résistance impliquent la perte de 53BP1 et l'augmentation de l'expression de pompes à efflux de type P-glycoprotéine (Hosoya and Miyagawa, 2014).

Il est donc nécessaire de développer des biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements qui permettraient une identification rapide et fiable des patients pouvant bénéficier des thérapies utilisant les voies de réparation de l'ADN. Par exemple, l'expression aberrante d'une protéine de la réponse à un type de dommage spécifique, devrait être un biomarqueur de résistance ou de réponse favorable aux thérapies qui induisent ce type de dommage. Ainsi, il a été montré que l'expression de RAD51 peut servir de marqueur de la résistance au cisplatine dans le "Cancer du Poumon Non à Petites Cellules" (CPNPC), ce qui s'explique par le rôle de RAD51 dans la réparation des ponts interbrins induits par le cisplatine (Hosoya and Miyagawa, 2014). L'analyse des foyers  $\gamma$ H2AX et RAD51 dans les cellules cancéreuses extraites d'ascites de patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire, permet de prédire la sensibilité des cellules tumorales à un traitement aux PARPi. Enfin, la signature de gènes de "BRCAness" permet la prédiction de la réponse du cancer du sein triple négatif et du cancer épithélial de l'ovaire aux anthracyclines et aux agents platines respectivement (Abbotts et al., 2014).

Le développement de thérapies ciblées personnalisées s'accompagne donc de plusieurs défis ; mais l'existence d'interactions synthétiques létales ainsi que le grand nombre de partenaires impliqués dans la réparation de l'ADN offrent de nombreuses alternatives de cibles thérapeutiques, de biomarqueurs prédictifs ou dans la conception des traitements.





## Objectifs

L'étude du maintien de l'intégrité du génome par la réparation de l'ADN est un domaine d'intérêt croissant, notamment car en apportant une meilleure compréhension de nombreuses maladies génétique et du cancer, elle permet le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

*BRCA1* et *BRCA2* sont, par exemple, connus depuis les années 1990 comme gènes de susceptibilité au cancer du sein. Leurs fonctions essentielles dans la protection du génome ont été depuis mises en évidence et continuent de l'être, justifiant l'utilisation des inhibiteurs de PARP dans le traitement de cancers présentant des mutations de ces gènes. La découverte que PALB2 fait le lien entre les deux protéines BRCA, a soulevé beaucoup de questions, dont celle de savoir pourquoi la cellule a développé un système utilisant deux protéines de haut poids moléculaire montrant des activités biochimiques similaires : PALB2 et BRCA2. Il a été estimé que la majorité du stock de BRCA2 de la cellule est associée avec PALB2 ; en revanche, environ la moitié du stock de PALB2 serait indépendante de BRCA2 (Xia et al., 2006). De plus, la découverte de nombreuses protéines interagissant avec PALB2, dont certaines ne sont pas impliquées dans la RH, suggère que PALB2 aurait de multiples fonctions dans la protection du génome.

De là, mes travaux de doctorat ont eu pour principal objectif de mieux comprendre le fonctionnement de la recombinaison homologue, en particulier au niveau de PALB2, et comment ces connaissances peuvent permettre d'améliorer les traitements des cancers. Pour cela, mes travaux se sont orientés vers trois objectifs:

### 1- Mieux comprendre la réparation des cassures double-brin par la recombinaison homologue

Dans le cadre de cet objectif, j'ai participé à un projet qui étudiait l'étape de synthèse de l'ADN au cours de la phase post-synaptique de la RH et le rôle que PALB2 et BRCA2 y jouait.

— Cette étude est présentée au chapitre 3. —

### 2- Préciser les conséquences fonctionnelles de mutations d'une protéine de la recombinaison homologue

Pour cet objectif, j'ai analysé les propriétés biochimiques et cellulaires de protéines tronquées de PALB2, conséquences de mutations germinales associées au développement des cancers du sein et de l'ovaire.

— Les résultats de ces travaux constituent le chapitre 4. —

### 3- Proposer une nouvelle molécule utilisant les cassures double-brin pour le traitement de cancer

Cet objectif consistait à mettre à profit les connaissances des systèmes de réponse au dommage de l'ADN, pour comprendre le mécanisme d'action d'une molécule nouvellement synthétisée, et proposer son utilisation dans le développement de thérapies anticancéreuses.

— Ce projet fait l'objet du chapitre 5. —



## Chapitre 2



## **Chapitre 2. Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer**

Joris Pauty<sup>(1)(2)</sup>, Amélie Rodrigue<sup>(1)(2)</sup>, Anthony Couturier<sup>(1)(2)</sup>, Rémi Buisson<sup>(3)</sup> and Jean-Yves Masson<sup>(1) (2) (4)</sup>

(1) Genome Stability Laboratory, CHU de Québec Research Center, HDQ Pavilion, Oncology Axis, 9 McMahon, Québec City, QC G1R 2J6, Canada

(2) Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Laval University, Québec City, QC G1V 0A6, Canada

(3) Present address: Massachusetts General Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02129, USA

(4) FRQS Chercheur National. To whom correspondence should be addressed:

(tel. +1-418-525-4444 ext 15154; fax. +1-418-691-5439; e-mail. Jean-Yves.Masson@fmed.ulaval.ca)



## Résumé

PALB2 ("Partner and Localizer of BRCA2") a émergé comme un joueur clef de la maintenance de l'intégrité du génome. Les mutations bialléliques de *PALB2* causent l'Anémie de Fanconi (FA) de sous-type FA-N, un syndrome hérité sévère, marqué par le développement de malformations physiques, un défaut de la moelle osseuse et une susceptibilité aux cancers pédiatriques. Les mutations monoalléliques quant à elles, prédisposent aux cancers du sein, de l'ovaire et du pancréas. Le rôle de suppresseur de tumeur de PALB2 a été intimement lié à sa capacité à promouvoir la réparation des CDB de l'ADN par la RH. Parce que PALB2 est impliquée dans la RH, FA et la susceptibilité au cancer, comprendre ses fonctions est devenu l'objet de plusieurs études. Cette revue présente une synthèse de ces études et discute de la contribution de PALB2 dans ces voies. Nous fournissons également une description moléculaire des mutations associées avec FA ou le cancer.





## Avant-Propos

Au cours de mon doctorat, mon projet principal a nécessité que je me tienne en constante veille quant aux dernières découvertes concernant aussi bien le fonctionnement de PALB2, que ses mutations identifiées dans les cancers et autres maladies, ou encore les traitements en cours de développement utilisant les déficiences en PALB2.

Le fruit de cette veille bibliographique a permis la rédaction d'un manuscrit publié dans la revue scientifique *Biochemical Journal* en 2014 (l'hyperlien vers la version publiée de cet article est disponible en annexe 1). J'ai pris part à la rédaction du manuscrit, sa correction, ainsi que réalisé les figures.



## Abstract

PALB2 [partner and localizer of BRCA2 (breast cancer early-onset 2)] has emerged as a key player in the maintenance of genome integrity. Biallelic mutations in *PALB2* cause FA (Fanconi's anaemia) subtype FA-N, a devastating inherited disorder marked by developmental abnormalities, bone marrow failure, and childhood cancer susceptibility, whereas monoallelic mutations predispose to breast, ovarian and pancreatic cancer. The tumour suppressor role of PALB2 has been intimately linked to its ability to promote HR (homologous recombination)-mediated repair of DNA double-strand breaks. Because PALB2 lies at the crossroads between FA, HR and cancer susceptibility, understanding its function has become the primary focus of several studies. The present review discusses a current synthesis of the contribution of PALB2 to these pathways. We also provide a molecular description of FA- or cancer-associated *PALB2* mutations.



## 2.1. Introduction

Human cells are under constant attack by endogenous or exogenous agents that induce tens of thousands of instances of DNA damage each day [1]. Genome integrity is directly threatened by these lesions, which must be identified and eliminated quickly. Cells have thus developed fine-tuned signalling and repair mechanisms for resolving these harmful injuries and ensuring DNA fidelity. Of all the DNA insults, DNA DSBs (double-strand breaks) and ICLs (interstrand cross-links) are the most toxic and challenging to repair because they affect both strands of DNA. Failure to repair DSBs and ICLs can lead to genome rearrangements and contribute to carcinogenesis.

DSBs can arise from exogenous sources, such as ionizing radiation, radiomimetic drugs and cancer chemotherapeutics, or from endogenous sources including ROS (reactive oxygen species) generated during cellular metabolism, collapsed replication forks, and nucleases during programmed genome rearrangements in lymphocytes and germ cells [2, 3]. HR (homologous recombination) is a major pathway for DSB repair, as is NHEJ (non-homologous end-joining). DSB repair by NHEJ takes place throughout the cell cycle via direct rejoining of the two broken extremities, and is potentially mutagenic as it can introduce deletions and insertions. In contrast, HR is active primarily in S/G2-phase, during which it relies on the sequence homology of an intact sister chromatid for faithful DNA repair and is preferred over NHEJ [2, 4]. HR also repair DSBs produced by stalled or collapsed replication forks or created during ICL processing [5, 6].

ICLs can be introduced by exogenous agents such as DEB (diepoxybutane), CDDP (cisplatin) and MMC (mitomycin C), but can also be produced endogenously by aldehydes and by-products of different metabolic pathways such as lipid peroxidation [7]. ICLs covalently link both strands of a DNA duplex, thereby blocking replication and ultimately leading to DSB formation in the repair process. Their complexity requires the sequential intervention of several repair enzymes that belong to distinct pathways, including nucleotide excision repair, translesion synthesis and HR [6]. The FA (Fanconi's anaemia) pathway ensures the fine co-ordination of these repair activities [8]. *PALB2* [partner and localizer of BRCA2 (breast cancer early-onset 2)] (*FANCN*) belongs, together with *BRCA2* (*FANCD1*), *BRIP1/BACH1* (*FANCI*) and *RAD51C* (*FANCO*) to a small subset of genes that are key players in both the HR and FA pathways. When mutated, these genes are associated with FA and breast/ovarian cancer, establishing a fascinating linkage between these two pathways and cancer predisposition. In the present review, we provide an overview of the molecular mechanisms that underlie the tumour suppressor function of PALB2. We also discuss the known cancer-associated mutations of PALB2.

## 2.2. PALB2: a key player for genome stability

HR is important for DSB repair in the late S- and G2-phases of the cell cycle. By using the sister chromatid as a template, HR allows the faithful recovery of genetic information [9]. The mechanism involves 3'-ssDNA tails generated by resection of DSBs [10] that are bound initially by RPA (replication protein A) complexes to protect ssDNA and trigger ATR (ataxia telangiectasia- and Rad3-related)-dependent checkpoint signalling [11]. The RAD51 recombinase is a key player to initiate genetic recombination between sister chromatids in S-phase, to allow the invasion of 3'-ssDNA tails into duplex DNA. RAD51 forms nucleoprotein filaments around the DNA, a structure required for DNA invasion [12-14]. In order for the presynaptic filament to assemble, RAD51 must first displace RPA [15]. For this, RAD51 relies on the activity of mediators, such as BRCA2, PALB2 and RAD51 paralogues. Among these, BRCA2 is the best characterized [15].

### 2.2.1. Brief overview of BRCA2 functions

The *BRCA2* gene, localized on the human chromosome 13q12-q13 [16], was identified as a breast cancer susceptibility gene in 1995 [17]. Mutation of this gene has been shown to be responsible for 5-7% of breast cancers, as well as a factor increasing the susceptibility to develop ovarian, prostate or pancreatic cancers. A monoallelic mutation in a patient confers a 50% risk of developing a cancer before the age of 50 and an 80% risk before 70 [18, 19]. A biallelic inactivation of *BRCA2* leads to FA, a rare genetic disorder caused by mutation in the genes regulating the repair of DNA ICLs [6]. The human BRCA2 protein is a large protein of 3148 amino acids (384 kDa) essential for HR repair [9, 19], as BRCA2-deficient cells harbour a decrease of 80-90% of their HR activity [20]. One of the major roles of BRCA2 is to help to direct the RAD51 recombinase to DSB sites in the nucleus via direct interaction [21-24]. It has been shown in BRCA2-deficient cells that RAD51 could no longer localize to DSBs [21, 25]. BRCA2 is known to bind ssDNA and dsDNA as well, but with a weaker affinity [26, 27]. The DNA-binding domain of BRCA2 is important for the recruitment of RAD51 at DSBs [28, 29]. The structure of this domain has been resolved by X-ray crystallography and comprises five domains: an HD (helix domain), three OB (oligonucleotide-binding) domains (OB1, OB2 and OB3) that bind ssDNA, and a Tower domain containing HTH (helix-turn-helix) sub-domains, which confers the dsDNA-binding activity [26]. The HD and OB1 domains interact also with the DSS1 protein known to be important for BRCA2 stability [26]. The purification of BRCA2 by the Kowalczykowski, Heyer and West teams led to a better understanding of its role as a mediator of HR repair [30-32]. These studies have shown four distinct functions for BRCA2: (i) it stimulates RAD51 filament formation on an ssDNA protected by RPA; (ii) it prevents RAD51 filament formation occurring on dsDNA; (iii) it inhibits the dissociation of RAD51 filaments by preventing ATP hydrolysis; and (iv) it stimulates RAD51 filament activity of strand exchange between homologous sequences [30-32].

## 2.2.2. Contributions of PALB2 to genome maintenance and HR

The FLJ21816/LOC79728 protein was identified in 2006 by Xia et al. [33] as a major BRCA2-interacting protein. It was subsequently named PALB2, for 'partner and localizer of BRCA2'. The *PALB2* gene is located on chromosome 16p12.2 and consists of 13 exons, which encode a protein of 1186 amino acids (131 kDa) [34]. The first level of control by which PALB2 may protect the genome is through reducing the burden of oxidative stress (**Figure 1**). Indeed, an interesting interactor of PALB2 is KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), a cysteine-rich oxidative stress sensor, establishing PALB2 as a regulator of cellular redox homeostasis [35]. NRF2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) is an important transcription factor activating the expression of a large number of ARE (antioxidant-response element)-containing genes. Under normal conditions, KEAP1 binds to NRF2 and functions as an E3 ubiquitin ligase that targets NRF2 for degradation. Upon oxidative stress, KEAP1 is modified on its cysteine residues, leading to a conformational change that disrupts its binding to NRF2. An extensive domain mapping and bioinformatics analysis identified the KEAP1-binding site on PALB2. Interestingly, PALB2 carries a seven-amino-acid motif (LDEETGE) that is highly conserved across mammalian species. This motif is in part identical to the ETGE motif of NRF2 that binds KEAP1. Hence, PALB2 enhances NRF2 function by impeding the KEAP1-NRF2 interaction in the nucleus. Consistent with this, depletion of PALB2 leads to increased ROS levels and down-regulation of a subset of NRF2 target genes. FA cells are generally hypersensitive to oxidative stress; it will therefore be interesting to see whether PALB2 plays an important role in regulating the oxidative stress response in FA cells [35].

PALB2 is a nuclear protein, associated with chromatin, which favours the subnuclear localization of BRCA2 and RAD51. PALB2 forms ionizing radiation-induced foci that co-localize with BRCA2,  $\gamma$ -H2AX and BRCA1. Importantly, depletion of PALB2 abrogated significantly the efficiency of HR using the I-SceI system [33]. PALB2 deficiency leads to the concomitant loss of BRCA2 and RAD51 localization to DSBs, again highlighting an important function in DSB repair [33]. We have shown that purified PALB2 binds ssDNA and D-loop structures preferentially and interacts directly with RAD51. Similar to BRCA2, PALB2 stimulates RAD51 filament formation on a ssDNA protected by RPA and stimulates ssDNA invasion confirming its function as an HR mediator [36, 37] (**Figure 1**).

The protein domains of PALB2 are very intriguing (**Figure 2**). First, PALB2 binds BRCA1 through its coiled-coil N-terminal domain [38-41]. The coiled-coil domain also promotes PALB2 dimerization [41]. The importance of this domain is illustrated by the observation that its absence increases cell sensitivity to DNA-damaging agents in a manner similar to PALB2 deficiency. The formation of the BRCA1-PALB2 complex, through the coiled-coil domain, is thus essential for recruitment and filament formation by RAD51 at DNA DSBs [40, 42]. The coiled-coil domain is also required for the self-interaction of PALB2. Our data suggest a model where, in the absence of DNA damage, PALB2 is dimeric and poorly active. After DNA damage, PALB2 dissociates and interacts with BRCA1 to allow PALB2 localization and HR activation [41]. The regulation of PALB2 dimerization after DNA damage to promote BRCA1 interaction is still misunderstood.

Secondly, PALB2 interacts with BRCA2 through a seven-bladed WD40-type region [33, 43]. PALB2 truncations leading to loss of the WD40 domain cause a profound deficiency in HR, as the interaction with BRCA2

is lost. Overexpression of the PALB2 WD40 domain leads to blockage of HR induced by both DSBs and nicks, and sensitizes cells to the PARP [poly(ADP-ribose) polymerase] inhibitor AZD2281 (also named olaparib) [44]. The mechanism whereby HR is reduced following expression of PALB2 WD40 might be via competitive disruption of the normal PALB2–BRCA2 interaction. Interestingly, this dominant-negative disruption by PALB2 WD40 expression leads to compensation, revealing a nick-induced mutagenic NHEJ pathway that is detected only when the HR machinery is blocked [44]. Furthermore, the WD40 domain of PALB2 seems to be an important regulatory platform. By using MS to identify proteins that co-purified with His<sub>6</sub>-FLAG-RAD51C, Park et al. [45] identified BRCA2 and PALB2 as interacting proteins. It was shown that RAD51C binds directly to the WD40 domain of PALB2. The PALB2 missense mutations/variants p.Leu939Trp, p.Thr1030Ile and p.Leu1143Pro, found in breast cancer patients, were analysed for RAD51C binding. Although binding was not disrupted completely, the p.Leu1143Pro mutant exhibited decreased binding to RAD51C and BRCA2, both *in vitro* and in human cells. We have found recently that the WD40 region also binds Pol $\eta$  (polymerase  $\eta$ ), which has consequences for the proper functioning of the later stages of HR [46]. An important function of HR is to find a template for DNA synthesis from the resected ends. BRCA2 and Pol $\eta$  co-localize at stalled or collapsed replication forks after hydroxyurea treatment. Moreover, PALB2 and BRCA2 interact with Pol $\eta$  and are required to sustain the recruitment of Pol $\eta$  at blocked replication forks. PALB2 and BRCA2 stimulate Pol $\eta$ -dependent DNA synthesis on D-loop substrates. Hence PALB2 and BRCA2 play crucial roles in the initiation of recombination-associated DNA synthesis by Pol $\eta$ -mediated DNA repair [46]. However, Pol $\eta$  is not involved in the repair of DSBs that are not associated with DNA replication, suggesting that other polymerases are involved to extend D-loop structures. Further investigation will be necessary to know whether PALB2 and BRCA2 are also able to regulate the activity of other DNA polymerases.

Thirdly, Bleuyard et al. [47] identified a ChAM (chromatin-association motif) in PALB2 that mediates its chromatin association in both unperturbed and damaged cells. This domain represents an evolutionarily conserved motif in PALB2. Cellular fractionation following expression of a GFP–ChAM fusion construct in HEK (human embryonic kidney)-293T cells revealed that ChAM is bound extensively to chromatin. PALB2 and PALB2 $\Delta$ ChAM bound DNA in a similar manner, suggesting that ChAM mediates chromatin association independently from PALB2 DNA-binding activity. Interestingly, ChAM deletion decreased PALB2 and RAD51 accumulation at DSB sites and led to hypersensitivity to MMC, highlighting the importance of this region in PALB2 regulation.

Siaud et al. [28] investigated the structure and function of the multiple and complex domains of BRCA2. To do this, they created chimaeric BRCA2 peptides, termed mini-BRCA2s. They found that mutations that disrupt DNA binding in the BRCA2 DNA-binding domain significantly reduce or abolish HR when PALB2 binding is absent. However, deletion of the entire DNA-binding domain has little impact on HR when PALB2 binding is present, suggesting that PALB2 can deliver BRCA2 to chromatin, and confirming that the PALB2 interaction domain is essential to deliver BRCA2 to DSBs.



### 2.2.3. MRG15: another key interactor of PALB2

A new partner called MRG15 has been identified for PALB2 using immunoprecipitation followed by a MS analysis [48, 49]. MRG15 interacts with the middle part of PALB2 (amino acids 611-764) and seems to be important for PALB2 localization at DSBs. The MRG15 protein is a member of the HAT (histone acetyltransferase) complex Tip60 [50], but also a subunit of the HDAC (histone deacetylase) complex SIN3b/Rpd3s [51, 52]. The MRG15 protein has an N-terminal chromodomain (chromatin organisation modifier) usually found in proteins associated with chromatin modifications and remodelling, which specifically binds the di- or tri-methylated Lys<sup>36</sup> of histone H3 [53]. MRG15 has a well-established role in transcriptional regulation [54, 55], but several studies suggest it also has a role in DSB repair. First, MRG15-deficient mouse embryonic fibroblasts are more sensitive to irradiation than wild-type cells, and  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 foci formation is delayed [56]. It has been suggested that MRG15, through its MRG domain, interacts with H2B ubiquitylated on Lys<sup>123</sup>, an epigenetic mark found at DSB sites and important for chromatin relaxation and recruitment of DNA repair proteins [57-60]. MRG15 also regulates the acetylation of histone H4 (H4K16), which is essential for DSB signalling and repair by activating ATM [60, 61]. Finally, a decrease of approximately 50-60% in HR in MRG15-deficient cells is observed [48]. Taken together, these observations suggest an early role for MRG15 in DSB signalling. However, the interaction with PALB2 implies a later and more direct role in DNA repair. The exact function of MRG15 in this step still needs to be investigated.

These seminal discoveries set the scene for further exploration of whether PALB2, similar to BRCA2, is mutated in other diseases and contributes to tumour suppression.

### 2.2.4. PALB2 is an FA gene

Shortly after its discovery, *PALB2* was found to be biallelically mutated in eight undesigned cases of FA with a family history of breast cancer and in one additional case study by Xia et al. [62]. All patients developed early childhood malignancies with clinical features reminiscent of the FANCD1 group explained by BRCA2 mutations. At the cellular level, phenotypes of PALB2 deficiency included a lack of chromatin-bound BRCA2 and, similar to BRCA2 deficiency, spontaneous chromosome breakage, hypersensitivity to cross-linking agents and impaired formation of RAD51 foci. From these studies, *PALB2* has been known as the gene underlying the N-subtype of FA. In 2013, Serra et al. [63] identified a new patient harbouring a PALB2/FANCN mutation and showing a severe phenotype of FA. Interestingly, *FANCN* was linked to FA-N when biallelically mutated, and to breast/ovarian cancer when monoallelically mutated, linking the FA and HR pathways to breast/ovarian cancer susceptibility. This was one of the key observations suggesting that PALB2 could function in later stages of HR in the ICL repair pathway.

## 2.3. PALB2: an important tumour suppressor

Mutations in *BRCA1* and *BRCA2* represent a well-established cause of human familial breast and ovarian cancer. However, they account for only 20–30% of all familial breast cancer cases. Given its crucial roles in HR and the FA pathways, the *BRCA2*-interacting partner *PALB2* has recently become a valuable candidate in genetic screening and so emerged as a cancer susceptibility gene worldwide. To date, mutations in *PALB2* have been associated with FA, following biallelic mutation [62, 64], and with several cancers, including familial breast [65], pancreatic [66] and ovarian cancer [67], with monoallelic mutations. Nowadays, population-based studies have established that *PALB2* mutations, albeit rare, are predominantly associated with familial cancer, with some of them conveying substantially higher breast cancer risks that are comparable with those reported for *BRCA2* mutations [65, 68-71]. In the last section of the present review, we describe the mutations of *PALB2* found in various cancers.

### 2.3.1. Mutations of *PALB2* in female and male breast cancer

Numerous truncating mutations of *PALB2* (we estimate 48 on a protein scale and 49 on a DNA scale) have been found in breast cancer cases without *BRCA2* or *BRCA1* mutations (**Figure 2 and Table 1**). Their frequency seems higher, at between 0.6% [67] and 4.8% [72], in patients with a strong history of familial breast cancer when studies were carried out on various populations (British, French Canadian, Finnish, Spanish, Chinese, Italian, Polish, Australian, German, Russian, Ashkenazi Jewish, Northern European, Caucasian and Danish). When studies looked at unselected cases, the frequency decreased to between 0.4% [73] and 2% [74]. Most studies now agree that mutations in *PALB2* occur with low frequency in familial breast cancer, with a higher incidence within defined subpopulations.

In a U.K. population study, Rahman et al. [65] found a truncating mutation frequency of 6.7% in families with male and female breast cancer compared with 1% in families with only female cases. They also estimated that mutations in *PALB2* conferred an increased risk of breast cancer of 2.3-fold for women under 50 years of age and 1.9-fold for older women [65]. In the same year, Erkkö et al. [70] identified a *PALB2* founder mutation (c.1592delT) among Finnish breast cancer families, elevating the risk of developing breast cancer by 4-fold compared with controls. They reported a mutation frequency of 0.9% in unselected cases compared with 2.7% in family breast cancer cases [70]. In 2008, Erkkö et al. [75] estimated the hazard ratio of the c.1592delT mutation and found a 6.1-fold increased risk equivalent to a 40% risk of having breast cancer before 70 years of age. They then evaluated that this risk decreased by 4.2% each year (from 7.5-fold at 30 years old to 2.0-fold at 60 years old), thus supporting the previous evaluation of Rahman et al. [65]. In the U.S.A., Casadei et al. [76] studied familial breast cancer patients of Ashkenazi Jewish descent or unselected for any specific ancestry. In the latter population, they found a truncating mutation frequency of 3.4% and reported the increased breast cancer risk to be 2.3-fold by 55 years of age and 3.4-fold by 85 years of age. The increased risk was even higher, 5.3-fold, in a study conducted by Tishkowitz et al. [77] on Danish and American populations. That study was, however, limited by a small sample size.

In summary, three studies (Rahman et al. [65], Erko et al. [75], Casadei et al. [76]) have estimated the increased risk of breast cancer conferred by *PALB2* mutations to be approximately 2-fold by the age of 55 years. However, they differ in the assessment of this increase before and after this age. This might suggest that the mutations have different consequences on genomic stability, thus leading to different levels of risk. So far, only two studies (Garcia et al. [69] and Casadei et al. [76]) have identified loss of heterozygosity of *PALB2* in breast cancer tumours. To our knowledge, no other studies have reported this alteration in breast [67, 70, 71, 78] or ovarian [79] tumours.

In a 2009 screen of breast cancer families unselected for male breast cancer, Garcia et al. [69] found a novel mutation, c.1056\_1057delGA (p.Lys353Ilefs\*7), in a Spanish family that included one male breast cancer case, for a mutation frequency of 1%. This frequency was increased to 9% when they looked at families with both male and female breast cancers (11 cases) specifically, suggesting that mutations in *PALB2* might confer a higher risk of male breast cancer. However, no obvious *PALB2* mutation was found by Blanco et al. [80] out of 131 Spanish breast/ovarian cancer families with at least one male breast cancer case. Instead, they found one large rearrangement [c.2587-?\_3201 +?del(exon 7-11)] in one breast cancer patient, accounting for a frequency of 0.75% in this subpopulation. In The Netherlands, Adank et al. [81] identified the mutation c.509\_510delGA (already identified in breast and ovarian cancer, p.Arg170Ilefs\*14) in one male breast cancer patient among 110 (0.9%) cases with a family history of ovarian, pancreatic or female or male breast cancer. Remarkably, this patient also had melanoma. An American study by Ding et al. [82] reported one male breast cancer patient among 97 carrying a mutation causing the protein variant p.Tyr1183\* (c.3549C>G); this patient also suffered from melanoma. Interestingly, the same mutation had already been reported in a female breast cancer patient with melanoma [65]. This mutation had also been described in FA [64]. Ding et al. [82] also identified a non-truncating mutation predicted to be pathogenic in another male breast cancer case and therefore proposed that the frequency of deleterious *PALB2* mutation was between 1 and 2% in male breast cancer.

Focusing on male patients, mutations of *PALB2* have also been investigated in prostate cancer. To date, only one mutation (c.1592delT; p.Leu531Cysfs\*30) has been found [83], this mutation being known to be a founder mutation of the Finnish population and associated with a high risk of developing breast cancer (hazard ratio estimated at 6.1-fold by Erko et al. [70]).

From these studies, it seems that *PALB2* mutations in male breast cancer occur with a frequency (0.75–1%) that is actually close to that for unselected female breast cancer (0.4–2%). However, one should bear in mind that the rarity of male breast cancer makes it difficult to generate any conclusive evaluation of this frequency. These studies also highlighted a possible role for *PALB2* mutations in prostate and skin cancer.

### 2.3.2. Mutations of *PALB2* in ovarian cancer

Several teams have investigated the presence of *PALB2* mutations in ovarian cancer while analysing breast cancer mutations. Garcia et al. [69] found the mutation c.1056-1057delGA (p.Lys353Ilefs\*7) in one Spanish family with cases of breast and ovarian cancer. In Italy, Balia et al. [78] identified the mutation c.1317delG (p.Phe440Leufs\*12) in 1.05% of families with a similar history. The study of Bogdanova et al. [84] included two cases with a personal history of ovarian cancer, but the previously identified mutations were not found. Similar observations were reported by Wong-Brown et al. [85] for two Australian cases of ovarian cancer. Nonetheless, the mutation c.3113G>A (p.Trp1038\* and two other spliced forms deleted for exon 10) was identified in a patient with a family history of breast and ovarian cancer. Another rare truncating mutation that could be linked to ovarian cancer, c.1479delC (p.Thr494Leufs\*67), was found subsequently in the same conditions by Zheng et al. [86] in unselected African Americans. The following year, Teo et al. [87] reidentified the c.3113G>A mutation in 0.92% of their Australian patients at high risk of breast and/or ovarian cancer.

When teams looked only at ovarian cancer cases, only a few mutations were discovered. Dansonka-Mieskowska et al. [67] found the mutation c.509\_510delGA (p.Arg170Ilefs\*14) in 0.6% of ovarian cancer cases vs 0.08% in controls in the Polish population. Walsh et al. [88] identified two mutations in ovarian cancer cases: c.757\_758delCT (p.Leu253Ilefs\*3), also known in FA [64] and breast cancer [76], and c.1050delAACA (p.Thr351Argfs\*4), which was also later described in breast cancer [89]. Tischkowitz et al. [79] found one carrier of the c.2323C>T mutation (p.Gln775\*) in 491 French Canadian women with ovarian cancer or low malignant potential tumours. However, this mutation had been identified previously in French Canadian breast cancer patients [90] with a frequency of 0.56% in unselected cases and 2% in cases selected based on family history. In their study, Tischkowitz et al. [79] also re-identified the c.2323C>T mutation in 2.1% of families with hereditary breast cancer. The Russian population study by Prokofyeva et al. [91] identified the truncating mutation c.172\_175delTTGT (p.Gln60Argfs\*7) (with a frequency of 0.4%), which they also found in two breast cancer cases. The same mutation had been reported previously in pancreatic cancer. More recently, in a large-scale exome-wide analysis performed to identify germline and somatic mutations in 429 ovarian cancer from woman with diverse ethnic origins, five truncating mutations were found in *PALB2*, four of them being germline mutations and including one never reported before : c.2167delT (p.Met723Valfs\*21) [92].

In summary, nine truncating mutations of *PALB2*, eight recurrent notably in breast cancer, have been found so far in ovarian cancer cases (**Table 1**). Four other mutations have been identified in cases with breast and ovarian cancer family history: c.1056-1057delGA (Garcia et al. [69]), c.1479delC (Zheng et al. [86]), c.1517delG (Balia et al. [78]), c.3113G>A (Wong et al. [92a] ; Teo et al. [87]).

### 2.3.3. *PALB2* mutations in pancreatic cancer

A few years ago, the *PALB2* gene has been identified as a susceptibility gene for FPC (familial pancreatic cancer), ranking second after *BRCA2* [66]. The Jones group identified distinct *PALB2*-truncating mutations in three out of 96 (3.1%) American patients with FPC: c.172-175delTTGT, also found in breast and ovarian cancer and identified later by Villaroel et al. [93], and c.3116delA described previously in breast cancer patients, and c.3256C>T. The patient harbouring the c.172-175delTTGT mutation also presented a somatic mutation in his tumour at a canonical splice site for exon 10 (IVS10+2C>T). This same mutation (c.172\_175delTTGT with biallelic inactivation through IVS10+2C>T) was later identified in tumours of a male pancreatic cancer patient with a family history of pancreatic cancer [93]. In a larger screen of pancreatic cancer cases (254 individuals), Tischkowitz et al. [94] reported a large deletion (del from exon 12 - 2.7 kb to exon 13 + 1.8 kb) in one pancreatic cancer patient who had been diagnosed initially with breast cancer.

In 2010, Slater et al. [95] identified truncating mutations in three out of 81 (3.7%) European pancreatic cancer families, each of which had a breast cancer history. Of the three mutations, one had already been reported in FPC families by Jones et al. [66] (c.3116delA; p.Asn1039Ilefs\*2), another was associated with breast cancer occurrence (c.1240C>T; p.Arg414\*) and a new mutation (c.508\_509delAG; p.Arg170Ilefs\*14) was predicted to lead to the production of a protein similar to the product of another mutation reported in breast and ovarian cancer: c.509\_510delGA.

Peterlongo et al. [72] succeeded in finding one mutation (c.1314delA; p.Phe440Leufs\*12, which is already known in breast cancer) in a patient who had developed multiple cancers, one of which was pancreatic. They also identified three mutations [c.72delG (p.Arg26Glu\*7), c.1027C>T (p.Gln343\*) and c.3497delG (p.Tyr1183\*)] in breast cancer families with at least one case of pancreatic cancer. In similar families, Hofstatter et al. [96] found the mutation c.2962C>T (p.Gln988\*) and again c.3549C>G (p.Tyr1183\*), which is already known in FA [64] and breast cancer [65] respectively.

In summary, seven mutations conferring an increased risk of pancreatic cancer have been identified, but only two appear so far to be pancreatic cancer-specific, i.e. c.508\_509delAG and c.3256C>T, and only one leads to a unique variant protein (c.3256C>T; p.Arg1086\*). It is also interesting to note that only two large rearrangements have been found. A study by Blanco et al. [80] on breast and ovarian cancer families with male breast cancer cases reported c.2587-?\_3201 +?del(exons 7-11) and Tischkowitz et al. [94] found, in pancreatic cancer patients, c.del from exon 12 - 2.7 kb to exon 13 + 1.8 kb.

### 2.3.4. Insights from animal models

Previous attempts in mouse modeling *PALB2*-associated breast cancer have shown that biallelic deletion of *Palb2*, by gene trap technology or exon deletion, is not compatible with life and leads to embryonic lethality between E8.5 (embryonic day 8.5) and E12.5, with growth retardation and severe morphological abnormalities from E7.5 [97-99]. This lethality is believed to result from increased apoptosis, unlike that caused by *Brca1* or *Brca2* deletion, which has been attributed mainly to hypoproliferation [98]. Interestingly, *p21* expression level was increased 6-fold in *Palb2*-knockout mice, whereas levels of *Brca1*, *Brca2*, *Rad51* and *Trp53* were

normal [97]. The embryonic lethality could be slightly delayed by the co-deletion of *Trp53* or *p21*, but not rescued [98, 99]. Heterozygous animals, however, were revealed to be viable, fertile and presented no developmental retardation or abnormality, providing an avenue to study tumour development subsequent to *Palb2* mutations *in vivo*. Common to previous reports, the *Palb2*<sup>+/-</sup> mice showed no spontaneous tumour phenotype [97, 98]. The cross of *Palb2* heterozygous mice with *Trp53*-knockout mutants had no effect on tumour development. A reduction in *Palb2* mRNA levels was confirmed in the progeny, suggesting against *Palb2* being a haploinsufficient tumour suppressor [98, 100]. Interestingly, analysis of mice heterozygous for *Palb2* and *Brca2* deletion revealed no genetic interaction between these genes in development and tumorigenesis, as mice were viable, fertile and did not harbour predisposition to spontaneous tumours [98].

In 2013, Bowman-Colin et al. [99] generated a breast cancer model in which *Palb2* and *Trp53* were co-deleted in the mouse mammary gland. Breast tumours developed faster in *Palb2/Trp53* double conditional mice than in *Trp53*-null mice ( $t^{1/2}$  = 192 days compared with 320 days), with a latency similar to those observed for deletion of *Brca1* or *Brca2* on such *Trp53* mutant background. As described for *BRCA1* and *BRCA2* mutant cancers, *PALB2* tumours were found to be defective in RAD51 focus formation, in agreement with the known role of *PALB2* in HR-mediated DSB repair. However, several genomic features distinguished *Palb2/Trp53* breast tumours from *Brca1/Trp53* and *Brca2/Trp53*, suggesting that *PALB2* exerts functions that are non-overlapping with those of the *BRCA* proteins. Of note, no haploinsufficiency was detected with this model either and heterozygosity did not impair RAD51 foci formation, suggestive of an intact *PALB2* HR function. Moreover, the strategy used in this model to target the *Palb2* gene (deleting exon 2 and 3) comes with the possibility of producing a protein that is truncated before the WD40 repeat domain and therefore has lost its *BRCA2*-interacting domain [99].

Taken together, these studies indicate that *PALB2* is essential for early embryonic development in mice and might not be a haploinsufficient tumour suppressor. Interestingly, they also raised the question of whether truncated *PALB2* could retain some activity in HR, independently of its interaction with *BRCA2*.

### 2.3.5. Functional studies of disease-related mutations

Important clues to a better understanding of how heterozygous truncating mutations in *PALB2* can lead to cancer have been provided by functional studies. Noteworthy are the mutations c.229delT, c.1592delT and c.2521delA, which have been introduced into *PALB2* cDNA, resulting in the expression of truncated proteins (p.Cys77Valfs\*100, p.Leu531Cysfs\*30 and p.Thr841Glnfs\*10 respectively), with markedly reduced *BRCA2*-binding capacity [70];[71]. Consistent with this, expression of any of these three mutants failed to rescue HR in cells depleted of *PALB2* by RNAi, or the sensitivity to MMC of *PALB2*-deficient cells, suggesting a *PALB2* functional inactivation. Owing to the low incidence of loss of heterozygosity in *PALB2* mutation carriers, it has been suggested that *PALB2* is likely to contribute to carcinogenesis through haploinsufficiency and/or a dominant-negative effect [79]. The possibility of a dominant-negative effect has been ruled out for the c.229delT mutation, whereas c.1592delT proved to be a true loss-of-function mutation [70,71].

Similar studies were performed with the mutation c.1653T>A (p.Tyr551\*) first identified in a FA patient [62] and then in a breast cancer patient [76]. Xia et al. [62] demonstrated that EUFA1341 lymphoblasts from an FA patient carrying the c.1653T>A mutation harboured a decreased level of BRCA2. EUFA1341 fibroblasts presented a mislocalization of BRCA2, compromised RAD51 foci formation and a higher sensitivity to MMC treatment. Complementation of these cells with a vector overexpressing PALB2-Tyr551\* failed to rescue the sensitivity, in contrast with the overexpression of a PALB2 exon-4-deleted protein identified in reverted EUFA1341. This latter result suggests that a PALB2 with a large internal deletion can be functional, whereas a PALB2 with its C-terminal part deleted is not. In 2013, Park et al. [45] showed that p.Tyr551\* did not interact with BRCA2 or RAD51C, and was deficient in its interaction with RAD51. Interestingly, the team also reported that cancer-related missense mutations affecting the WD40 domain also showed compromised interaction with BRCA2, RAD51 and RAD51C [45]. Taken together, these results illustrate the importance of the WD40 domain and its integrity.

Studies on lymphoblastoid cell lines derived from heterozygous *PALB2* c.1592delT mutation carriers have highlighted the hypersensitivity of the cells to MMC and, more recently, defects in DNA replication and damage response that could drive cancer development [83, 101]. These defects are manifested by aberrant DNA replication dynamics, increased ATR kinase protein levels and G2/M-phase checkpoint maintenance problems associated with genomic instability. As in most cases, the analysis conducted by Nikkilä et al. [101] revealed no loss of heterozygosity in *PALB2* breast tumours. Mutation carrier cells harboured a decreased level of PALB2 with detectable levels of the highly unstable truncated protein product (10% of full-length PALB2), consistent with a fraction of the mutant transcript being able to escape to NMD (nonsense-mediated decay).

These findings by Nikkilä et al. [101] were in line with a mechanism in which the haploinsufficiency of *PALB2*, in combination with a possible dominant-negative effect of the c.1592delT truncated protein product, could drive tumorigenesis without requiring loss of heterozygosity. Supporting this idea, several other teams found that mutation in *PALB2* led to transcripts only partially subjected to NMD. Casadei et al. [76] had previously shown, by studying transcripts from patients carrying the c.3113G>A mutation, that this mutation leads to three kinds of transcripts: one with an in-frame 117-bp deletion (56%), one with an out-of-frame 31 bp deletion (40%), and one with an immediate stop codon at position 1038 (4%, p.Trp1038\*). Teo et al. [87] also found that c.3113G>A produced the two same altered splicing transcripts, both leading to a deletion of exon 10 (p.Gly1028fs\*3 and p.Gly1000\_Gly1038del), but did not identify the transcripts leading to p.Trp1038\*. However, they found two other mutations (c.1947insA and c.2982insT) that produced transcripts also targeted by NMD, but still harbouring expression of the final protein. The data of Nikkilä et al. [101] were, however, in conflict with previous studies in *Palb2*-knockout mice showing that *PALB2* might not be a haploinsufficient tumour suppressor, leaving some doubts as to the exact mechanism of PALB2-driven tumorigenesis. It should also be considered that the negative effect or the loss of function of truncated PALB2 could actually be due to as yet uncovered functions of PALB2 (chromatin remodelling, ROS regulation, etc).

### 2.3.6. Using PALB2 defect as a therapeutic strategy

Depletion of PALB2 using siRNA has been reported to sensitize cells to various inhibitors of PARP, such as olaparib, veliparib, rucaparib and BMN673 [36, 102], through a synthetic lethal effect. Some of these drugs have already reached Phase II or III of clinical trials for *BRCA1/2* ovarian cancer. PARP inhibitors thus represent a potentially promising therapy in the context of *PALB2*-mutated cancers. This underscores the need for *PALB2* genetic testing so that all candidate patients can benefit from such targeted therapies.

The concept of synthetic lethality (**Figure 3**), based on PALB2, could be also used with RAD52. In light of this, Powell and co-workers investigated whether depletion of RAD52 could possess synthetic lethality as with other HR genes [103]. Control experiments revealed little impact on cell growth and plating efficiency for RAD52-depleted cells. Strikingly, when combined with BRCA2, BRCA1 and PALB2, a severe reduction in plating efficiency was observed [103, 104]. Loss of RAD52 led to a reduction in radiation-induced RAD51 foci formation and DSB-induced HR in the absence of BRCA2. In the light of this work, inhibition of RAD52 could be an alternative synthetic lethal strategy in PALB2-deficient cells.

How could *PALB2* mutations lead to cancer development? It was reported recently that heterozygous mutations in *PALB2* cause DNA replication and damage response defects. Using a DNA fibre assay technique, it was found that *PALB2* haploinsufficiency causes excessive origin firing and a shorter distance between consecutive replication forks. Moreover, PALB2 affected ATR levels and the DNA replication stress response. *PALB2* mutation carrier cell lines also show elevated ATR protein (but not phosphorylation) levels, and the majority of these lines display an aberrant Chk1-/Chk2-mediated DNA damage response. Elevated chromosome instability is observed in primary blood lymphocytes of *PALB2* mutation carriers, indicating that the described mechanisms of genome destabilization operate also at the organism level. These data explain how germline defects in PALB2 connect to cancer development and hereditary predisposition to the disease [101]. Clearly, there are many more facets of PALB2 waiting to be revealed in the future.

### Acknowledgements

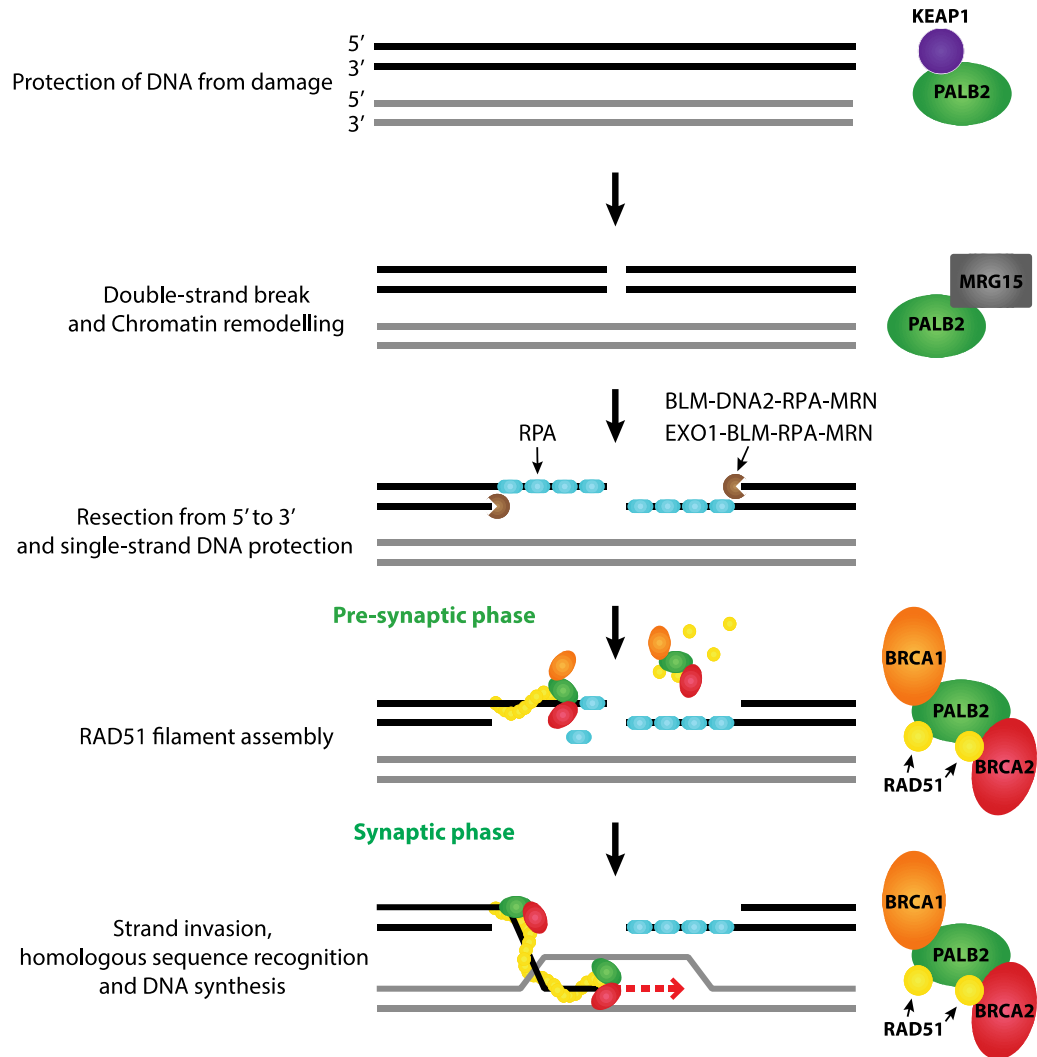
We thank Isabelle Brodeur and Helen Rothnie for comments on this paper. J.-Y.M. is a FRQS (Fonds de Recherche du Québec, Santé) Chercheur National Investigator.

### Funding

This work was supported by the CIHR (Canadian Institutes of Health Research) (to J.-Y.M.).



## Figures



**Figure 1. Role of PALB2 in HR**

First, through interaction with KEAP1, PALB2 participates in the protection against DNA damage. The interaction with KEAP1 is also preserved after DNA damage. Secondly, PALB2 interacts with MRG15 which may promote chromatin remodelling. MRG15 is also important for the recruitment of PALB2 after DNA resection. Thirdly, RAD51-mediated D-loop formation is stimulated by the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex.

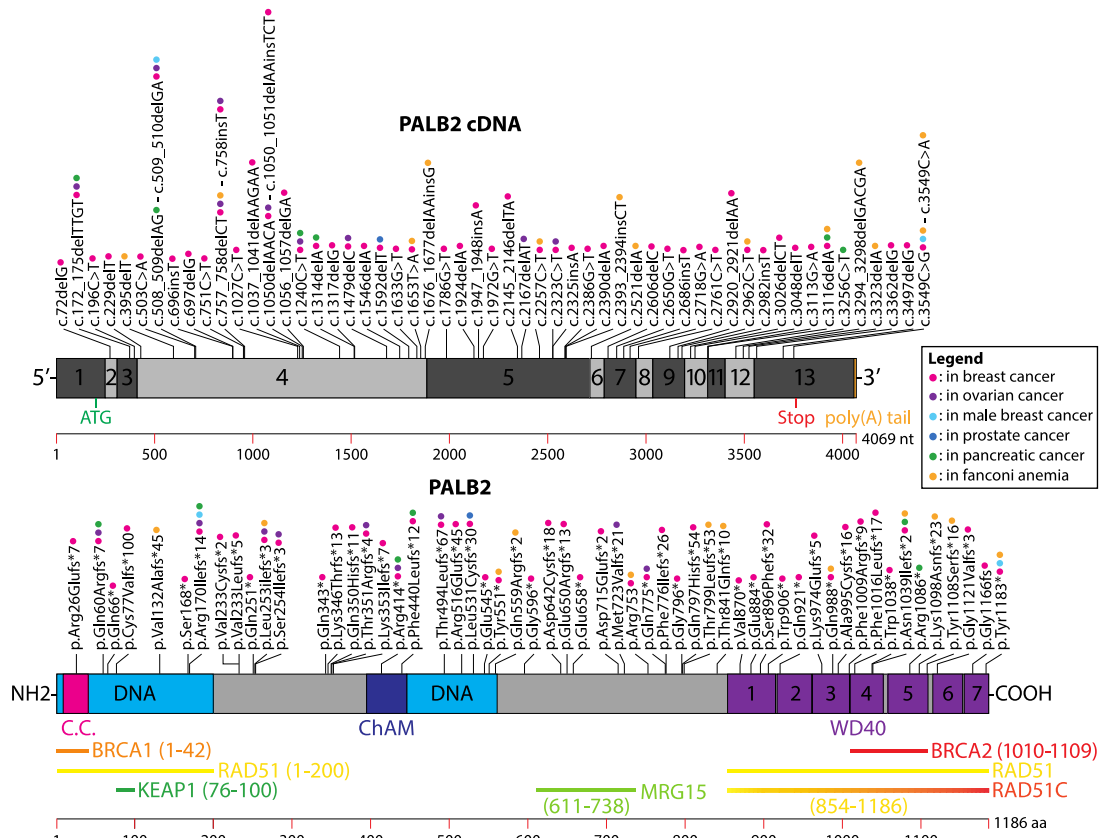
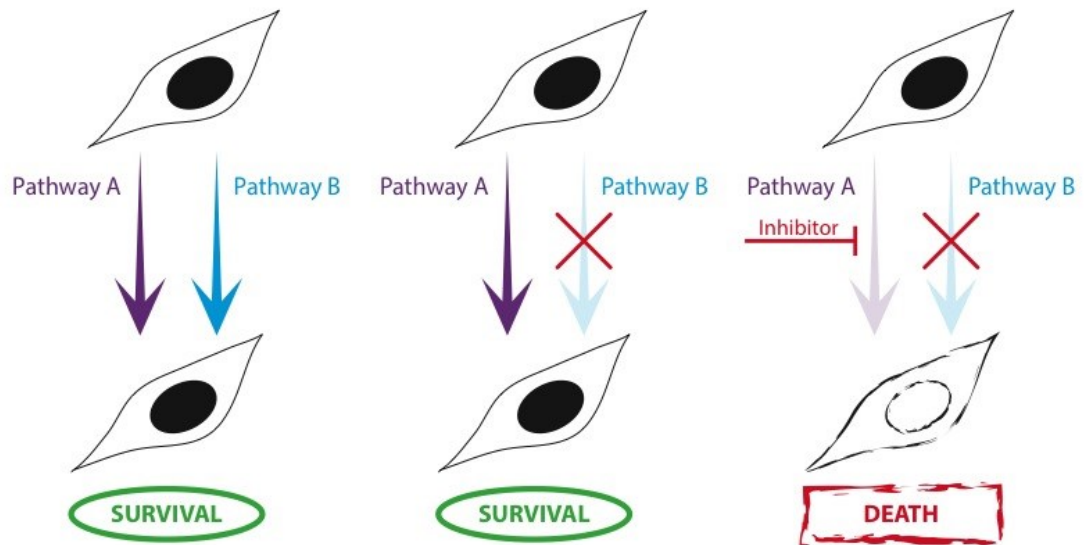


Figure 2. Schematic representation of PALB2 mutations in exons or assigned domains of PALB2



**Figure 3. Synthetic lethal strategy as a targeted cancer therapy**

Defect of one cellular pathway (pathway B) is not lethal for a cell, but the inhibition of a second pathway (pathway A) in this pathway-B-defective cell leads to cell death.

**Table 1. PALB2 truncating mutations found in cancer and Fanconi's anemia patients**

Mutations that alter the splicing are indicated in italics. Mutations that are also found in male breast cancer are indicated in bold.

DNA	Protein	Reference(s)
<b>Breast cancer</b>		
c.48+ 1G> C		[105]
c.172.175delTTGT	p.Gln60Argfs*7	[76,91,105,106]
c.196G> T	p.Gln66*	[76,92a]
c.229delT	p.Cys77Valfs*100	[71]
c.503G> A	p.Ser168*	[105]
c.509_510delGA	p.Arg170Ilefs*14	[67,76,81,84,107]
c.696insT	p.Val233Cysfs*2	[106]
c.697delG	p.Val233Leufs*5	[74]
c.751G> T	p.Gln251*	[68,89]
c.757.758delCT	p.Leu253Ilefs*3	[76]
c.758insT	p.Ser254Ilefs*3	[85,86,108]
c.1027G> T	p.Gln343*	[109]
c.103Z.1041delAAGAA	p.Lys346Thr*13	[89]
c.105Q.1051delAAinsTCT	p.Gln350Hisfs*11	[68,89]
c.1050delAACA	p.Thr351Argfs*4	[89]
c.1056.1057delGA	p.Lys353Ilefs*7	[69]
c.1240G> T	p.Arg414*	[76,84,105]
c.1317delG	p.Phe440Leufs*12	[78]
c.1479delC	p.Thr494Leufs*67	[86]
c.1546delA	p.Arg516Gluufs*45	[107]
c.1592delT	p.Leu531Cysfs*30	[70,71,111]
c.1633G> T	p.Glu545*	[84,107]
c.1653F> A	p.Tyr551*	[76]
c.1786G> T	p.Gly596*	[107]
c.1924delA	p.Asp642Cysfs*18	[107]
c.194Z.1948insA	p.Glu650Argfs*13	[87]
c.1972G> T	p.Glu658*	[106]
c.2145.2146delTA	p.Asp715Gluufs*2	[105]
c.2257G> T	p.Arg753*	[105,112]
c.2323G> T	p.Gln775*	[79,90]
c.2325insA	p.Phe776Ilefs*26	[106]
c.2386G> T	p.Gly796*	[65,76,106,107]
c.2390delA	p.Gln797Hisfs*54	[85]
c.2559G> T	p.Gly853fs*21	[76]
c.2606delC	p.Val870*	[89]
c.2650G> T	p.Glu884*	[107]
c.2686insT	p.Ser896Phefs*32	[76]
c.2718G> A	p.Trp906*	[76]
c.2761G> T	p.Gln921*	[84]
c.2835- 1G> C		[76,77]
c.2962G> T	p.Gln988*	[105]
c.2982insT	p.Ala995Cysfs*16	[65]
c.3026delCT	p.Phe1009Argfs*9	[76]
c.3048delT	p.Phe1016Leufs*17	[86]
c.3113G> A	p.Trp1038* and two altered spliced forms (p.Gly1028fs*2 and p.9991038del)	[65,69,73,76,77,92a,107]
c.3113+ 5G> C	<i>r.2835-3113del/279/p.Ala946fs</i>	[107]
c.3116delA	p.Asn1039Ilefs*2	[65,69]
c.3202+ 1G> C		[77]
c.3362delG	p.Gly1121Valfs*3	[106]
c.3549C> G	p.Tyr1183*	[65,69,77,82,107]
<b>Breast cancer cases in families with pancreatic cancer</b>		
c.72delG	p.Arg26Gluufs*7	[72]
c.1027G> T	p.Gln343*	[72]
c.1314delA	p.Phe440Leufs*12	[72]
c.292Q.2921delAA	p.Lys974Gluufs*5	[72]
c.2962G> T	p.Gln988*	[96]
c.3497delG	p.Gly1166fs	[72]
c.3549G> G	p.Tyr1183*	[96]
<b>Pancreatic cancer</b>		
c.172.175delTTGT	p.Gln60Argfs*7	[66]
c.508.509delAG	p.Arg170Ilefs*14	[95]
c.1240G> T	p.Arg414*	[95]
c.1314delA	p.Phe440Leufs*12	[96]
c.2515- 1G> T		[66]
c.3116delA	p.Asn1039Ilefs*2	[66]

**Table 1. (continued)**

DNA	Protein	Reference(s)
c.3201.3561del	p.Met1067-Ser1186del	[94,110]
c.3256G>T	p.Arg1086*	[66]
Ovarian cancer		
c.172.175delTTGT	p.Gln60Argfs*7	[76,91]
c.509.510delGA	p.Arg170Ilefs*14	[67]
c.757.758delCT	p.Leu253Ilefs*3	[88]
c.758insT	p.Ser254Ilefs*3	[92]
c.1050delAAACA	p.Thr351Argfs*4	[88]
c.1240G>T	p.Arg414*	[92]
c.1479delC	p.Thr494Leufs*67	[92]
c.2167delAT	p.Met723Valfs*21	[92]
c.2323G>T	p.Gln775*	[77]
Prostate cancer		
c.1592delT	p.Leu531Cysfs*30	[83]
Fanconi's anaemia		
c.395delT	p.Val132Alafs*45	[64]
c.757-758delCT	p.Leu253Ilefs*3	[64]
c.1653F>A	p.Tyr551*	[62]
c.1676-1677delAAinsG	p.Gln559Argfs*2	[63]
c.2257G>T	p.Arg753*	[64]
c.2393.2394insCT	p.Thr799Leufs*53	[64]
c.2521delA	p.Thr841Glnfs*10	[64]
c.2962G>T	p.Gln988*	[64]
c.3113T>5G>C	r.2835-3113del279/p.Ala946fs	[64]
c.3116delA	p.Asn1039Ilefs*2	[64]
c.3294.3298delGACGA	p.Lys1098Asnfs*23	[64]
c.3323delA	p.Tyr1108Serfs*16	[64]
c.3350T>4A>G	r.3350insGCAG/p.Phe118fs	[64]
c.3549G>G	p.Tyr1183*	[64]
c.3549G>A	p.Tyr1183*	[64]

## References

- 1 Lindahl, T. and Barnes, D. E. (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **65**, 127-133
- 2 Shrivastav, M., De Haro, L. P. and Nickoloff, J. A. (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* **18**, 134-147
- 3 Polo, S. E. and Jackson, S. P. (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.* **25**, 409-433
- 4 Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y. and Takeda, S. (2006) Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst).* **5**, 1021-1029
- 5 Arnaudeau, C., Lundin, C. and Helleday, T. (2001) DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **307**, 1235-1245
- 6 Moldovan, G. L. and D'Andrea, A. D. (2009) How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet.* **43**, 223-249
- 7 Kee, Y. and D'Andrea, A. D. (2010) Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev.* **24**, 1680-1694
- 8 Garner, E. and Smogorzewska, A. (2011) Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway. *FEBS Lett.* **585**, 2853-2860
- 9 Moynahan, M. E. and Jasin, M. (2010) Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**, 196-207
- 10 Nimmonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J. L., Wyman, C., Modrich, P. and Kowalczykowski, S. C. (2011) BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* **25**, 350-362
- 11 Marechal, A. and Zou, L. (2013) DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**
- 12 West, S. C. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**, 435-445
- 13 Conway, A. B., Lynch, T. W., Zhang, Y., Fortin, G. S., Fung, C. W., Symington, L. S. and Rice, P. A. (2004) Crystal structure of a Rad51 filament. *Nat Struct Mol Biol.* **11**, 791-796
- 14 Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A. and Egelman, E. H. (1993) Similarity of the yeast Rad51 filament to the bacterial RecA filament. *Science.* **259**, 1896-1899
- 15 San Filippo, J., Sung, P. and Klein, H. (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem.* **77**, 229-257
- 16 Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D. and et al. (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* **265**, 2088-2090
- 17 Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. and Micklem, G. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789-792
- 18 Foulkes, W. D. (2008) Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med.* **359**, 2143-2153
- 19 Roy, R., Chun, J. and Powell, S. N. (2012) BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer.* **12**, 68-78
- 20 Moynahan, M. E., Pierce, A. J. and Jasin, M. (2001) BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Molec. Cell.* **7**, 263-272
- 21 Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, S. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P. and Bradley, A. (1997) Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature.* **386**, 804-810
- 22 Chen, J. J., Silver, D. P., Walpita, D., Cantor, S. B., Gazdar, A. F., Tomlinson, G., Couch, F. J., Weber, B. L., Ashley, T., Livingston, D. M. and Scully, R. (1998) Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol. Cell.* **2**, 317-328
- 23 Marmorstein, L. Y., Ouchi, T. and Aaronson, S. A. (1998) The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and Rad51. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13869-13874

- 24 Davies, A. A., Masson, J. Y., Mcllwraith, M. J., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A. R. and West, S. C. (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell*. **7**, 273-282
- 25 Yuan, S.-S. F., Lee, S.-Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G. E. and Lee, E. Y. (1999) BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res*. **59**, 3547-3551
- 26 Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N. H., Zheng, N., Chen, P. L., Lee, W. H. and Pavletich, N. P. (2002) BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*. **297**, 1837-1848
- 27 San Filippo, J., Chi, P., Sehorn, M. G., Etkin, J., Krejci, L. and Sung, P. (2006) Recombination mediator and Rad51 targeting activities of a human BRCA2 polypeptide. *J Biol Chem*. **281**, 11649-11657
- 28 Siaud, N., Barbera, M. A., Egashira, A., Lam, I., Christ, N., Schlacher, K., Xia, B. and Jasin, M. (2011) Plasticity of BRCA2 function in homologous recombination: genetic interactions of the PALB2 and DNA binding domains. *PLoS genetics*. **7**, e1002409
- 29 Saeki, H., Siaud, N., Christ, N., Wiegant, W. W., van Buul, P. P., Han, M., Zdzienicka, M. Z., Stark, J. M. and Jasin, M. (2006) Suppression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 8768-8773
- 30 Jensen, R. B., Carreira, A. and Kowalczykowski, S. C. (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*. **467**, 678-683
- 31 Liu, J., Doty, T., Gibson, B. and Heyer, W. D. (2010) Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*. **17**, 1260-1262
- 32 Thorslund, T., Mcllwraith, M. J., Compton, S. A., Lekomtsev, S., Petronczki, M., Griffith, J. D. and West, S. C. (2010) The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*. **17**, 1263-1265
- 33 Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F. J. and Livingston, D. M. (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell*. **22**, 719-729
- 34 Tischkowitz, M. and Xia, B. (2010) PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia. *Cancer Res*. **70**, 7353-7359
- 35 Ma, J., Cai, H., Wu, T., Sobhian, B., Huo, Y., Alcivar, A., Mehta, M., Cheung, K. L., Ganesan, S., Kong, A. N., Zhang, D. D. and Xia, B. (2012) PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. *Mol Cell Biol*. **32**, 1506-1517
- 36 Buisson, R., Dion-Cote, A. M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Xia, B. and Masson, J. Y. (2010) Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*. **17**, 1247-1254
- 37 Dray, E., Etkin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G. J., Hammel, M., Yu, X., Galkin, V. E., Liu, D., Tsai, M. S., Sy, S. M., Schild, D., Egelman, E., Chen, J. and Sung, P. (2010) Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nat Struct Mol Biol*. **17**, 1255-1259
- 38 Sy, S. M., Huen, M. S., Zhu, Y. and Chen, J. (2009) PALB2 Regulates Recombinational Repair through Chromatin Association and Oligomerization. *J Biol Chem*. **284**, 18302-18310
- 39 Zhang, F., Fan, Q., Ren, K. and Andreassen, P. R. (2009) PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res*. **7**, 1110-1118
- 40 Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B. and Yu, X. (2009) PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol*. **19**, 524-529
- 41 Buisson, R. and Masson, J. Y. (2012) PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. **40**, 10312-10323
- 42 Sy, S. M., Huen, M. S. and Chen, J. (2009) PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**, 7155-7160
- 43 Oliver, A. W., Swift, S., Lord, C. J., Ashworth, A. and Pearl, L. H. (2009) Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep*
- 44 Metzger, M. J., Stoddard, B. L. and Monnat, R. J., Jr. (2013) PARP-mediated repair, homologous recombination, and back-up non-homologous end joining-like repair of single-strand nicks. *DNA Repair (Amst)*. **12**, 529-534
- 45 Park, J. Y., Singh, T. R., Nassar, N., Zhang, F., Freund, M., Hanenberg, H., Meetei, A. R. and Andreassen, P. R. (2013) Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*

- 46 Buisson, R., Niraj, J., Pauty, J., Maity, R., Zhao, W., Coulombe, Y., Sung, P. and Masson, J. Y. (2014) Breast Cancer Proteins PALB2 and BRCA2 Stimulate Polymerase eta in Recombination-Associated DNA Synthesis at Blocked Replication Forks. *Cell Rep*
- 47 Bleuyard, J. Y., Buisson, R., Masson, J. Y. and Esashi, F. (2012) ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair. *EMBO Rep.* **13**, 135-141
- 48 Hayakawa, T., Zhang, F., Hayakawa, N., Ohtani, Y., Shinmyozu, K., Nakayama, J. and Andreassen, P. R. (2010) MRG15 binds directly to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks. *J Cell Sci.* **123**, 1124-1130
- 49 Sy, S. M., Huen, M. S. and Chen, J. (2009) MRG15 is a novel PALB2 interacting factor involved in homologous recombination. *J Biol Chem*
- 50 Doyon, Y. and Cote, J. (2004) The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev.* **14**, 147-154
- 51 Yochum, G. S. and Ayer, D. E. (2002) Role for the mortality factors MORF4, MRGX, and MRG15 in transcriptional repression via associations with Pf1, mSin3A, and Transducin-Like Enhancer of Split. *Mol Cell Biol.* **22**, 7868-7876
- 52 Hayakawa, T., Ohtani, Y., Hayakawa, N., Shinmyozu, K., Saito, M., Ishikawa, F. and Nakayama, J. (2007) RBP2 is an MRG15 complex component and down-regulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation. *Genes Cells.* **12**, 811-826
- 53 Zhang, P., Du, J., Sun, B., Dong, X., Xu, G., Zhou, J., Huang, Q., Liu, Q., Hao, Q. and Ding, J. (2006) Structure of human MRG15 chromo domain and its binding to Lys36-methylated histone H3. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6621-6628
- 54 Carrozza, M. J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S. K., Lee, K. K., Shia, W. J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M. P. and Workman, J. L. (2005) Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell.* **123**, 581-592
- 55 Pardo, P. S., Leung, J. K., Lucchesi, J. C. and Pereira-Smith, O. M. (2002) MRG15, a novel chromodomain protein, is present in two distinct multiprotein complexes involved in transcriptional activation. *J Biol Chem.* **277**, 50860-50866
- 56 Garcia, S. N., Kirtane, B. M., Podlitsky, A. J., Pereira-Smith, O. M. and Tominaga, K. (2007) Mrg15 null and heterozygous mouse embryonic fibroblasts exhibit DNA-repair defects post exposure to gamma ionizing radiation. *FEBS Lett.* **581**, 5275-5281
- 57 Fierz, B., Chatterjee, C., McGinty, R. K., Bar-Dagan, M., Raleigh, D. P. and Muir, T. W. (2011) Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nat Chem Biol.* **7**, 113-119
- 58 Moyal, L., Lerenthal, Y., Gana-Weisz, M., Mass, G., So, S., Wang, S. Y., Eppink, B., Chung, Y. M., Shalev, G., Shema, E., Shkedy, D., Smorodinsky, N. I., van Vliet, N., Kuster, B., Mann, M., Ciechanover, A., Dahm-Daphi, J., Kanaar, R., Hu, M. C., Chen, D. J., Oren, M. and Shiloh, Y. (2011) Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell.* **41**, 529-542
- 59 Nakamura, K., Kato, A., Kobayashi, J., Yanagihara, H., Sakamoto, S., Oliveira, D. V., Shimada, M., Tauchi, H., Suzuki, H., Tashiro, S., Zou, L. and Komatsu, K. (2011) Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Mol Cell.* **41**, 515-528
- 60 Wu, J., Chen, Y., Lu, L. Y., Wu, Y., Paulsen, M. T., Ljungman, M., Ferguson, D. O. and Yu, X. (2011) Chfr and RNF8 synergistically regulate ATM activation. *Nat Struct Mol Biol.* **18**, 761-768
- 61 Rea, S., Xouri, G. and Akhtar, A. (2007) Males absent on the first (MOF): from flies to humans. *Oncogene.* **26**, 5385-5394
- 62 Xia, B., Dorsman, J. C., Ameziane, N., de Vries, Y., Rooimans, M. A., Sheng, Q., Pals, G., Errami, A., Gluckman, E., Llera, J., Wang, W., Livingston, D. M., Joenje, H. and de Winter, J. P. (2007) Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet.* **39**, 159-161
- 63 Serra, A., Eirich, K., Winkler, A. K., Mrasek, K., Gohring, G., Barbi, G., Cario, H., Schlegelberger, B., Pokora, B., Liehr, T., Leriche, C., Henne-Bruns, D., Barth, T. F. and Schindler, D. (2012) Shared Copy Number Variation in Simultaneous Nephroblastoma and Neuroblastoma due to Fanconi Anemia. *Mol Syndromol.* **3**, 120-130
- 64 Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., Wurm, M., Batish, S. D., Lach, F. P., Yetgin, S., Neitzel, H., Ariffin, H., Tischkowitz, M., Mathew, C. G., Auerbach, A. D. and Rahman, N. (2007) Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet.* **39**, 162-164



- 65 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, D. G., Eccles, D., Breast Cancer Susceptibility, C., Easton, D. F. and Stratton, M. R. (2007) PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet.* **39**, 165-167
- 66 Jones, S., Hruban, R. H., Kamiyama, M., Borges, M., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Palmisano, E., Brune, K., Jaffee, E. M., Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Parmigiani, G., Kern, S. E., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Eshleman, J. R., Goggins, M. and Klein, A. P. (2009) Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science.* **324**, 217
- 67 Dansonka-Mieszkowska, A., Kluska, A., Moes, J., Dabrowska, M., Nowakowska, D., Niwinska, A., Derlatka, P., Cendrowski, K. and Kupryjanczyk, J. (2010) A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. *BMC Med Genet.* **11**, 20
- 68 Cao, A. Y., Huang, J., Hu, Z., Li, W. F., Ma, Z. L., Tang, L. L., Zhang, B., Su, F. X., Zhou, J., Di, G. H., Shen, K. W., Wu, J., Lu, J. S., Luo, J. M., Yuan, W. T., Shen, Z. Z., Huang, W. and Shao, Z. M. (2009) The prevalence of PALB2 germline mutations in BRCA1/BRCA2 negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives. *Breast Cancer Res Treat.* **114**, 457-462
- 69 Garcia, M. J., Fernandez, V., Osorio, A., Barroso, A., Lloret, G., Lazaro, C., Blanco, I., Caldes, T., de la Hoya, M., Ramon, Y. C. T., Alonso, C., Tejada, M. I., San Roman, C., Robles-Diaz, L., Urioste, M. and Benitez, J. (2009) Analysis of FANCB and FANCN/PALB2 fanconi anemia genes in BRCA1/2-negative Spanish breast cancer families. *Breast Cancer Res Treat.* **113**, 545-551
- 70 Erkkö, H., Xia, B., Nikkila, J., Schleutker, J., Syrjäkoski, K., Mannermaa, A., Kallioniemi, A., Pylkas, K., Karppinen, S. M., Rapakko, K., Miron, A., Sheng, Q., Li, G., Mattila, H., Bell, D. W., Haber, D. A., Grip, M., Reiman, M., Jukkola-Vuorinen, A., Mustonen, A., Kere, J., Aaltonen, L. A., Kosma, V. M., Kataja, V., Soini, Y., Drapkin, R. I., Livingston, D. M. and Winqvist, R. (2007) A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature.* **446**, 316-319
- 71 Tischkowitz, M., Xia, B., Sabbaghian, N., Reis-Filho, J. S., Hamel, N., Li, G., van Beers, E. H., Li, L., Khalil, T., Quenneville, L. A., Omeroglu, A., Poll, A., Lepage, P., Wong, N., Nederlof, P. M., Ashworth, A., Tonin, P. N., Narod, S. A., Livingston, D. M. and Foulkes, W. D. (2007) Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 6788-6793
- 72 Peterlongo, P., Catucci, I., Pasquini, G., Verderio, P., Peissel, B., Barile, M., Varesco, L., Riboni, M., Fortuzzi, S., Manoukian, S. and Radice, P. (2011) PALB2 germline mutations in familial breast cancer cases with personal and family history of pancreatic cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **126**, 825-828
- 73 Southey, M. C., Teo, Z. L., Dowty, J. G., Odefrey, F. A., Park, D. J., Tischkowitz, M., Sabbaghian, N., Apicella, C., Byrnes, G. B., Winship, I., Baglietto, L., Giles, G. G., Goldgar, D. E., Foulkes, W. D., Hopper, J. L. and kConFab for the Breast Cancer Family, R. (2010) A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R109
- 74 Sluiter, M., Mew, S. and van Rensburg, E. J. (2009) PALB2 sequence variants in young South African breast cancer patients. *Fam Cancer.* **8**, 347-353
- 75 Erkkö, H., Dowty, J. G., Nikkila, J., Syrjäkoski, K., Mannermaa, A., Pylkas, K., Southey, M. C., Holli, K., Kallioniemi, A., Jukkola-Vuorinen, A., Kataja, V., Kosma, V. M., Xia, B., Livingston, D. M., Winqvist, R. and Hopper, J. L. (2008) Penetrance analysis of the PALB2 c.1592delT founder mutation. *Clin Cancer Res.* **14**, 4667-4671
- 76 Casadei, S., Norquist, B. M., Walsh, T., Stray, S., Mandell, J. B., Lee, M. K., Stamatoyannopoulos, J. A. and King, M. C. (2011) Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer. *Cancer Res.* **71**, 2222-2229
- 77 Tischkowitz, M., Capanu, M., Sabbaghian, N., Li, L., Liang, X., Vallee, M. P., Tavtigian, S. V., Concannon, P., Foulkes, W. D., Bernstein, L., Group, W. S. C., Bernstein, J. L. and Begg, C. B. (2012) Rare germline mutations in PALB2 and breast cancer risk: a population-based study. *Hum Mutat.* **33**, 674-680
- 78 Balia, C., Sensi, E., Lombardi, G., Roncella, M., Bevilacqua, G. and Caligo, M. A. (2010) PALB2: a novel inactivating mutation in an Italian breast cancer family. *Fam Cancer.* **9**, 531-536
- 79 Tischkowitz, M., Sabbaghian, N., Hamel, N., Pouchet, C., Foulkes, W. D., Mes-Masson, A. M., Provencher, D. M. and Tonin, P. N. (2013) Contribution of the PALB2 c.2323C>T [p.Q775X] founder mutation in well-defined breast and/or ovarian cancer families and unselected ovarian cancer cases of French Canadian descent. *BMC Med Genet.* **14**, 5
- 80 Blanco, A., de la Hoya, M., Balmana, J., Ramon y Cajal, T., Teule, A., Miramar, M. D., Esteban, E., Infante, M., Benitez, J., Torres, A., Tejada, M. I., Brunet, J., Grana, B., Balbin, M., Perez-Segura, P., Osorio, A., Velasco, E. A., Chirivella, I., Calvo, M. T., Feliubadalo, L., Lasa, A., Diez, O., Carracedo, A.,

- Caldes, T. and Vega, A. (2012) Detection of a large rearrangement in PALB2 in Spanish breast cancer families with male breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **132**, 307-315
- 81 Adank, M. A., van Mil, S. E., Gille, J. J., Waisfisz, Q. and Meijers-Heijboer, H. (2011) PALB2 analysis in BRCA2-like families. *Breast Cancer Res Treat.* **127**, 357-362
- 82 Ding, Y. C., Steele, L., Kuan, C. J., Greilac, S. and Neuhausen, S. L. (2011) Mutations in BRCA2 and PALB2 in male breast cancer cases from the United States. *Breast Cancer Res Treat.* **126**, 771-778
- 83 Pakkanen, S., Wahlfors, T., Siltanen, S., Patrikainen, M., Matikainen, M. P., Tammela, T. L. and Schleutker, J. (2009) PALB2 variants in hereditary and unselected Finnish prostate cancer cases. *J Negat Results Biomed.* **8**, 12
- 84 Bogdanova, N., Sokolenko, A. P., Iyevleva, A. G., Aбыsheva, S. N., Blaut, M., Bremer, M., Christiansen, H., Rave-Frank, M., Dork, T. and Imyanитov, E. N. (2011) PALB2 mutations in German and Russian patients with bilateral breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **126**, 545-550
- 85 Wong-Brown, M. W., Avery-Kiejda, K. A., Bowden, N. A. and Scott, R. J. (2013) Low prevalence of germline PALB2 mutations in Australian triple-negative breast cancer. *Int J Cancer*
- 86 Zheng, Y., Zhang, J., Niu, Q., Huo, D. and Olopade, O. I. (2012) Novel germline PALB2 truncating mutations in African American breast cancer patients. *Cancer.* **118**, 1362-1370
- 87 Teo, Z. L., Park, D. J., Provenzano, E., Chatfield, C. A., Odefrey, F. A., Nguyen-Dumont, T., kConFab, Dowty, J. G., Hopper, J. L., Winship, I., Goldgar, D. E. and Southey, M. C. (2013) Prevalence of PALB2 mutations in Australasian multiple-case breast cancer families. *Breast Cancer Res.* **15**, R17
- 88 Walsh, T., Casadei, S., Lee, M. K., Pennil, C. C., Nord, A. S., Thornton, A. M., Roeb, W., Agnew, K. J., Stray, S. M., Wickramanayake, A., Norquist, B., Pennington, K. P., Garcia, R. L., King, M. C. and Swisher, E. M. (2011) Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 18032-18037
- 89 Phuah, S. Y., Lee, S. Y., Kang, P., Kang, I. N., Yoon, S. Y., Thong, M. K., Hartman, M., Sng, J. H., Yip, C. H., Taib, N. A. and Teo, S. H. (2013) Prevalence of PALB2 mutations in breast cancer patients in multi-ethnic Asian population in Malaysia and Singapore. *PLoS One.* **8**, e73638
- 90 Foulkes, W. D., Ghadirian, P., Akbari, M. R., Hamel, N., Giroux, S., Sabbaghian, N., Darnel, A., Royer, R., Poll, A., Fafard, E., Robidoux, A., Martin, G., Bismar, T. A., Tischkowitz, M., Rousseau, F. and Narod, S. A. (2007) Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast Cancer Res.* **9**, R83
- 91 Prokofyeva, D., Bogdanova, N., Bermisheva, M., Zinnatullina, G., Hillemanns, P., Khusnutdinova, E. and Dork, T. (2012) Rare occurrence of PALB2 mutations in ovarian cancer patients from the Volga-Ural region. *Clin Genet.* **82**, 100-101
- 92 Kanchi, K. L., Johnson, K. J., Lu, C., McLellan, M. D., Leiserson, M. D., Wendl, M. C., Zhang, Q., Koboldt, D. C., Xie, M., Kandoth, C., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Larson, D. E., Schmidt, H. K., Miller, C. A., Fulton, R. S., Spellman, P. T., Mardis, E. R., Druley, T. E., Graubert, T. A., Goodfellow, P. J., Raphael, B. J., Wilson, R. K. and Ding, L. (2014) Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nat Commun.* **5**, 3156
- 92a Wong, M.W., Nordfors, C., Mossman, D., Pecenetelovska, G., Avery-Kiejda, K.A., Talseth-Palmer, B., Bowden, N.A. and Scott, R.J. (2011) BRIP1, PALB2, and RAD51C mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **127**, 853-859
- 93 Villarroel, M. C., Rajeshkumar, N. V., Garrido-Laguna, I., De Jesus-Acosta, A., Jones, S., Maitra, A., Hruban, R. H., Eshleman, J. R., Klein, A., Laheru, D., Donehower, R. and Hidalgo, M. (2011) Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* **10**, 3-8
- 94 Tischkowitz, M. D., Sabbaghian, N., Hamel, N., Borgida, A., Rosner, C., Taherian, N., Srivastava, A., Holter, S., Rothenmund, H., Ghadirian, P., Foulkes, W. D. and Gallinger, S. (2009) Analysis of the gene coding for the BRCA2-interacting protein PALB2 in familial and sporadic pancreatic cancer. *Gastroenterology.* **137**, 1183-1186
- 95 Slater, E. P., Langer, P., Niemczyk, E., Strauch, K., Butler, J., Habbe, N., Neoptolemos, J. P., Greenhalf, W. and Bartsch, D. K. (2010) PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families. *Clin Genet.* **78**, 490-494
- 96 Hofstatter, E. W., Domchek, S. M., Miron, A., Garber, J., Wang, M., Compneschi, K., Boghossian, L., Miron, P. L., Nathanson, K. L. and Tung, N. (2011) PALB2 mutations in familial breast and pancreatic cancer. *Fam Cancer.* **10**, 225-231

- 97 Rantakari, P., Nikkila, J., Jokela, H., Ola, R., Pylkas, K., Lagerbohm, H., Sainio, K., Poutanen, M. and Winqvist, R. (2010) Inactivation of Palb2 gene leads to mesoderm differentiation defect and early embryonic lethality in mice. *Hum Mol Genet.* **19**, 3021-3029
- 98 Bouwman, P., Drost, R., Klijn, C., Pieterse, M., van der Gulden, H., Song, J. Y., Szuhai, K. and Jonkers, J. (2011) Loss of p53 partially rescues embryonic development of Palb2 knockout mice but does not foster haploinsufficiency of Palb2 in tumour suppression. *J Pathol.* **224**, 10-21
- 99 Bowman-Colin, C., Xia, B., Bunting, S., Klijn, C., Drost, R., Bouwman, P., Fineman, L., Chen, X., Culhane, A. C., Cai, H., Rodig, S. J., Bronson, R. T., Jonkers, J., Nussenzweig, A., Kanellopoulou, C. and Livingston, D. M. (2013) Palb2 synergizes with Trp53 to suppress mammary tumor formation in a model of inherited breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 8632-8637
- 100 Tischkowitz, M. and Winqvist, R. (2011) Using mouse models to investigate the biological and physiological consequences of defects in the Fanconi anaemia/breast cancer DNA repair signalling pathway. *J Pathol.* **224**, 301-305
- 101 Nikkila, J., Parpys, A. C., Pylkas, K., Bose, M., Huo, Y., Borgmann, K., Rapakko, K., Nieminen, P., Xia, B., Pospiech, H. and Winqvist, R. (2013) Heterozygous mutations in PALB2 cause DNA replication and damage response defects. *Nat Commun.* **4**, 2578
- 102 Shen, Y., Rehman, F. L., Feng, Y., Boshuizen, J., Bajrami, I., Elliott, R., Wang, B., Lord, C. J., Post, L. E. and Ashworth, A. (2013) BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clin Cancer Res*
- 103 Feng, Z., Scott, S. P., Bussen, W., Sharma, G. G., Guo, G., Pandita, T. K. and Powell, S. N. (2011) Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 686-691
- 104 Lok, B. H., Carley, A. C., Tchang, B. and Powell, S. N. (2013) RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination. *Oncogene.* **32**, 3552-3558
- 105 Hellebrand, H., Sutter, C., Honisch, E., Gross, E., Wappenschmidt, B., Schem, C., Deissler, H., Ditsch, N., Gress, V., Kiechle, M., *et al.* (2011) Germline mutations in the PALB2 gene are population specific and occur with low frequencies in familial breast cancer. *Hum. Mutat.* **32**, E2176-E2188.
- 106 Castera, L., Krieger, S., Rousselin, A., Legros, A., Baumann, J.J., Bruet, O., Brault, B., Fouillet, R., Goardon, N., Letac, O., *et al.* (2014) Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur. J. Hum. Genet.*, doi:10.1038/ejhg.2014.16
- 107 Fernandes, P.H., Saam, J., Peterson, J., Hughes, E., Kaldate, R., Cummings, S., Theisen, A., Chen, S., Trost, J., and Roa, B.B. (2014) Comprehensive sequencing of PALB2 in patients with breast cancer suggests PALB2 mutations explain a subset of hereditary breast cancer. *Cancer* **120**, 963-967
- 108 Pern, F., Bogdanova, N., Schurmann, P., Lin, M., Ay, A., Länger, F., Hillemanns, P., Christiansen, H., Park-Simon, T.W., and Dörk, T. (2012) Mutation analysis of BRCA1, BRCA2, PALB2 and BRD7 in a hospital-based series of German patients with triple-negative breast cancer. *PloS ONE* **7**, e47993.
- 109 Catucci, I., Peterlongo, P., Ciceri, S., Colombo, M., Pasquini, G., Barile, M., Bonanni, B., Verderio, P., Pizzamiglio, S., Foglia, C., *et al.* (2014) PALB2 sequencing in Italian familial breast cancer cases reveals a high-risk mutation recurrent in the province of Bergamo. *Genet. Med.*, doi:10.1038/gim.2014.13
- 110 Southey, M.C., Teo, Z.L., and Winship, I. (2013) PALB2 and breast cancer: ready for clinical translation! *Appl. Clin. Genet.* **6**, 43-52
- 111 Heikkinen, T., Kärkkäinen, H., Aaltonen, K., Milne, R.L., Heikkilä, P., Aittomäki, K., Blomqvist, C., and Nevanlinna, H. (2009) The breast cancer susceptibility mutation PALB2 1592delT is associated with an aggressive tumor phenotype. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3214-3222
- 112 Papi, L., Putignano, A.L., Congregati, C., Piaceri, I., Zanna, I., Sera, F., Morrone, D., Genuardi, M., and Palli, D. (2010) A PALB2 germline mutation associated with hereditary breast cancer in Italy. *Fam. Cancer* **9**, 181-185



# Chapitre 3



# Chapitre 3. Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase $\eta$ in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks

Rémi Buisson<sup>(1)(3)</sup>, Joshi Niraj<sup>(1)</sup>, Joris Pauty<sup>(1)</sup>, Ranjan Maity<sup>(1)</sup>, Weixing Zhao<sup>(2)</sup>, Yan Coulombe<sup>(1)</sup>, Patrick Sung<sup>(2)</sup>  
and Jean-Yves Masson<sup>(1)\*</sup>

(1) Genome Stability Laboratory, Laval University Cancer Research Center, Hôtel-Dieu de Québec (Centre Hospitalier Universitaire de Québec), Québec city (Québec), G1R 2J6, Canada.

(2) Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06520-8024, USA.

(3) Current address: Massachusetts General Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Charlestown, MA 02129, USA.

\* Correspondence should be addressed to Jean-Yves.Masson@crhdq.ulaval.ca

**Running title:** Recombination mediators stimulate polymerase  $\eta$

**Key words:** PALB2, BRCA2, polymerase  $\eta$ , DNA replication and homologous recombination.





## Résumé

Une fonction envisagée de la recombinaison homologe est de trouver une matrice pour la synthèse d'ADN à partir du 3'-OH de la molécule résectée qui apparaît au cours de la réparation des cassures double-brin au niveau des fourches de réplication bloquées ou brisées. En revanche, peu de chose sont connues quant au lien entre la synthèse de l'ADN et la recombinaison homologe dans les cellules des eucaryotes supérieurs. Dans cette étude, nous révélons de nouvelles fonctions pour les protéines du cancer du sein BRCA2 et PALB2, au niveau des fourches de réplication bloquées. Nous montrons également un rôle de ces protéines dans la stimulation de la polymérase  $\eta$  (Pol $\eta$ ) à initier la synthèse d'ADN. Tout d'abord, PALB2, BRCA2 et Pol  $\eta$  colocalisent aux fourches de réplication bloquées ou brisées après un traitement à l'hydroxyurée. De plus, PALB2 et BRCA2 interagissent avec Pol  $\eta$  et sont requises pour maintenir Pol  $\eta$  aux fourches de réplication bloquées. Enfin, *in vitro*, PALB2 et BRCA2 stimulent la synthèse de l'ADN dépendante de Pol  $\eta$  dans un substrat en forme de D-loop. Ainsi, nous concluons que PALB2 et BRCA2, en plus de leur fonction dans la formation des D-loop, jouent un rôle crucial dans l'initiation de la synthèse d'ADN associée à la recombinaison et la réparation de l'ADN par Pol  $\eta$ .



## Avant-Propos

Au cours de mon doctorat, je me suis joint à un projet portant sur l'identification du rôle de PALB2 dans les étapes plus tardives de la RH, à savoir la synthèse de l'ADN. Ce projet était principalement mené par Rémi Buisson qui a réalisé la plupart des analyses avec l'aide de Niraj Joshi, Ranjan Maity, Yan Coulombe, ainsi que notre collaborateur Dr Patrick Sung et son étudiant Weixing Zhao. Ma contribution à ce projet a été dans la mise en place de techniques et l'acquisition de données permettant de répondre aux commentaires des pairs évaluant le manuscrit.

Ces travaux ont donné lieu à la publication d'un article dans la revue scientifique *Cell Report* (l'hyperlien vers la version publiée de cet article est disponible en annexe 2). J'ai pris part à sa correction ainsi que réalisé le montage des figures présentant les données que j'ai recueillies.



## Abstract

One envisioned function of homologous recombination (HR) is to find a template for DNA synthesis from the resected 3'-OH molecules that occur during double-strand break (DSB) repair at broken or stalled replication forks. However, the interplay between DNA synthesis and HR remains poorly understood in higher eukaryotic cells. Here, we reveal new functions for breast cancer proteins BRCA2 and PALB2 at blocked replication forks and show a role for these proteins in stimulating polymerase eta (Pol $\eta$ ) to initiate DNA synthesis. PALB2, BRCA2 and Pol $\eta$  co-localize at stalled or collapsed replication forks after hydroxyurea treatment. Moreover, PALB2 and BRCA2 interact with Pol $\eta$ , and are required to sustain the recruitment of Pol $\eta$  at blocked replication forks. PALB2 and BRCA2 stimulate Pol $\eta$ -dependent DNA synthesis on D-loop substrates. We conclude that PALB2 and BRCA2, in addition to their functions in D-loop formation, play crucial roles in the initiation of recombination-associated DNA synthesis by Pol $\eta$ -mediated DNA repair.



### 3.1. Introduction

Faithful DNA replication is essential to prevent accumulation of mutations and to maintain genome integrity. Replication forks are vulnerable to unrepaired DNA damage or secondary structures, which can lead to fork stalling or collapse. A stalled replication fork can be arrested but still has the ability to restart. In contrast, a collapsed replication fork leads the generation of replication-dependent DNA double-strand breaks (DSBs), triggering the recruitment of DSB repair machineries. Tumor suppressor proteins PALB2 (Partner and localizer of BRCA2) and BRCA2 (breast cancer type 2 susceptibility protein) are essential for active homologous recombination (HR) repair, the main mechanism of error-free homology-directed repair of DNA DSBs in mammalian cells (Xia et al., 2006). The central activity of HR is performed by RAD51 using resected DNA DSBs to invade a homologous double-strand DNA to form a displacement loop (D-loop). Defects in HR cause genomic instability and promote accumulation of cancer-promoting mutations. PALB2 and BRCA2 mutations have been associated with predisposition to breast and pancreatic cancer (Roy et al., 2012), and PALB2- or BRCA2-deficient cells are sensitive to PARP inhibitors (Bryant et al., 2005; Buisson et al., 2010). Furthermore, PALB2 (FANCN) and BRCA2 (FANCD1) are mutated in a subgroup of Fanconi Anemia (Howlett et al., 2002; Xia et al., 2007) an inherited genomic instability disorder caused by mutations in genes regulating replication-dependent removal of interstrand DNA crosslinks (Moldovan and D'Andrea, 2009).

PALB2 links BRCA1 and BRCA2 to promote efficient DNA repair by HR (Sy et al., 2009a; Xia et al., 2006; Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2009b). In the absence of PALB2, the recruitment of BRCA2 and RAD51 to DSBs is defective (Xia et al., 2007; Xia et al., 2006). PALB2 interacts with BRCA1 via its N-terminal coiled-coil domain (Buisson and Masson, 2012; Sy et al., 2009b; Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2009b) and with BRCA2 via its WD40 domain (in C-terminal) (Xia et al., 2007). The coiled-coil domain is also important for the self-interaction of PALB2. In the presence of DNA damage, PALB2 dissociates and interacts with BRCA1 to allow PALB2 localization and HR activation (Buisson and Masson, 2012). A third domain, named ChAM (Chromatin-Association Motif), is located at the center of the protein (395 to 446 amino acid) and is required for PALB2 chromatin localization (Bleuyard et al., 2012). Recently, we have shown that purified PALB2 binds D-loops preferentially and interacts directly with RAD51 to stimulate strand invasion (Buisson et al., 2010; Dray et al., 2010). At the same time, the Kowalczykowski, Heyer, and West laboratories reported the purification of full length BRCA2. Human BRCA2 promotes RAD51 filament assembly on single-strand DNA, which stimulates RAD51-mediated DNA strand exchange (Jensen et al., 2010; Liu et al., 2010; Thorslund et al., 2010).

Following D-loop formation by RAD51, the 3'tail single-stranded DNA is used as a primer for extension by polymerases. The polymerases  $\delta$ ,  $\eta$ ,  $\upsilon$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\kappa$  and REV1 have all been shown to be involved in HR although their exact functions remain unclear. Currently, only polymerases  $\delta$ ,  $\eta$  and  $\kappa$  are known to extend a D-loop structure after RAD51 single-strand DNA invasion (Li et al., 2013; McIlwraith et al., 2005; Sebesta et al., 2011; Sebesta et al., 2013; Sneed et al., 2013). In yeast, genetic evidence has shown clearly that polymerase  $\delta$  is important for HR and gene conversion (Holmes and Haber, 1999; Maloisel et al., 2008) but these results have not

yet been confirmed in human cells. Moreover, it has been recently shown that the subunit p12 of Pol $\delta$  is degraded in S-phase by the CRL4<sup>cdt2</sup> complex after replicative-associated DNA damage (Terai et al., 2013; Zhang et al., 2013). These results suggest that, in human cells, polymerase  $\delta$  could not be essential for stalled and collapsed replication forks repair. However, further investigations will be necessary to better understand the regulation of Pol $\delta$  after DNA damage and the biological significance of this observation. In DT40 cells, Pol $\eta$ -deficient cells showed a significant decrease in the frequency of both Ig gene conversion and HR-dependent repair of I-SceI-induced DSBs when compared to wild-type cells (Kawamoto et al., 2005). Interestingly, in human cells, overexpression of Pol $\eta$  and  $\kappa$  leads to an increase in HR frequency (Sebesta et al., 2013) while absence of Pol $\eta$  slightly decreases HR (Moldovan et al., 2010). Deletion of both Pol  $\eta$  and  $\kappa$  leads to a 50% decrease in HR frequency (Sebesta et al., 2013) suggesting a cooperation mechanism between these polymerases.

We hypothesized that different polymerases could be involved in recombination-associated DNA synthesis. In this study, we focused on Pol $\eta$  in order to better define its function in HR. Pol $\eta$  has been shown to co-localize and interact with RAD51 (Kannouche et al., 2001; McIlwraith et al., 2005), and several studies have shown that, contrary to Pol $\delta$  and  $\kappa$ , Pol $\eta$  activity for D-loop extension does not require the loading of PCNA and RFC (Li et al., 2013; McIlwraith et al., 2005; Sebesta et al., 2011; Sebesta et al., 2013; Sneed et al., 2013). These results suggest that pol $\eta$  activity could be regulated by other factors.

In humans, the deletion of Pol $\eta$  leads to Xeroderma pigmentosum variant (XPV), which is associated with an increase risk of skin cancer induced by UV radiation (Johnson et al., 1999; Masutani et al., 1999). Pol $\eta$  is a member of the Y-family DNA polymerases (with Pol $\iota$ , Pol $\kappa$  and REV1) that specialize in performing DNA damage bypass repairs involving TT-cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) (Masutani et al., 1999), 8-oxoguanine (8-oxoG) (Haracska et al., 2000b) or O<sup>6</sup>-methylguanine (me<sup>6</sup>G) (Haracska et al., 2000a). These DNA lesions can cause collapsed replication forks, impeding lesion bypass by replicative DNA polymerases (Pol $\epsilon$  and Pol $\delta$ ). Although the biological role of Pol $\eta$  in UV-induced DNA damage repair is well understood, very little is known about the regulation of Pol $\eta$  activity during HR repair.

In this study, we show that Pol $\eta$  interacts directly with PALB2 and BRCA2 at DSBs induced by collapsed replication forks. We show that PALB2 and BRCA2 are important for (i) Pol $\eta$  localization to collapsed replication forks, and (ii) Pol $\eta$ -dependent DNA synthesis for D-loop extension. Our results establish PALB2 and BRCA2 as key regulators of the extension step after strand invasion at replication-dependent DSBs.



## 3.2. Results

### 3.2.1. PALB2 and BRCA2 promote the accumulation of Pol $\eta$ at collapsed replication forks.

To better define the function and the regulation of Pol $\eta$  at DSBs, we focused on the localization and recruitment of Pol $\eta$  with other HR proteins in the presence of replication fork stalling agents such as hydroxyurea (HU), aphidicolin or mitomycin C (MMC). These drugs cause collapsed replication forks after prolonged exposure (Petermann et al., 2010). First, we confirmed previously published reports showing that Pol $\eta$ -deficient cells present a defect in repairing DSBs (de Feraudy et al., 2007; Kawamoto et al., 2005; Moldovan et al., 2010; Sebesta et al., 2013). We used XPV cells (Pol $\eta$ -deficient cell line) complemented or not with  $\epsilon$ GFP-Pol $\eta$ . After MMC treatment, Pol $\eta$ -deficient XPV cells showed a stronger accumulation of DSBs compared to Pol $\eta$ -complemented XPV cells 24-48 hours after release into fresh medium (Fig. 1A). As a control, we also showed that these Pol $\eta$ -complemented XPV cells rescued UV sensitivity (Suppl. Fig. 1A). Next, we scrutinized the localization of Pol $\eta$  at blocked replication forks. We confirmed that Pol $\eta$  forms foci after MMC, HU, and aphidicolin treatment (Suppl. Fig. 1B). Furthermore, PALB2, BRCA2, RAD51, PCNA, RPA and/or  $\gamma$ -H2AX co-localized with Pol $\eta$  at DSBs induced by collapsed replication forks in HeLa or Pol $\eta$ - $\epsilon$ GFP-complemented XPV cells (Fig. 1A, 1B and Suppl. Fig. 1C-D). We used HU and aphidicolin rather than MMC because it is very difficult to observe PALB2 and BRCA2 foci after MMC treatment owing to their smaller size. To prove that the localisation of Pol $\eta$  is happening at collapsed replication forks, we observed that about 70 % of cells observed displayed a co-localization between Pol $\eta$  and the DSB marker RAD51 (Suppl. Fig. 1E). Nevertheless, the exact percentage of forks that are broken may be smaller as RAD51 is also localized to stalled forks that are not broken (Petermann et al., 2010). In contrast,  $\gamma$ -irradiation-induced Pol $\eta$  foci formation was very limited, confirming previous observations (Kannouche et al., 2001), and the few foci observed did not co-localize with PALB2, RAD51 or  $\gamma$ -H2AX (Fig. 1C, Suppl. Fig. 1F), suggesting a role for Pol $\eta$  in DSB repair uniquely at blocked replication forks. Next, we wondered whether Pol $\eta$  localization at collapsed replication forks is affected by HR proteins. We used siRNAs against PALB2 or BRCA2, two key regulators of RAD51 and HR activity, in Pol $\eta$ - $\epsilon$ GFP-complemented XPV cells (Suppl. Fig. 1G). In PALB2 or BRCA2 knockdowns, Pol $\eta$  was still recruited to DSBs; however, we observed a significant decrease in the intensity of Pol $\eta$  foci (quantified in Fig. 2), suggesting that PALB2 and BRCA2 are important for Pol $\eta$  accumulation at replication-dependent DNA DSBs (see also Suppl. Fig. 1H).

These results show that PALB2 and BRCA2 are required for the accumulation of Pol $\eta$  at DSBs triggered by collapsed replication forks, and provide evidence that PALB2 and BRCA2 could be important for Pol $\eta$  activity.

### 3.2.2. Purified PALB2 and BRCA2 stimulate Pol $\eta$

A key step in HR is the formation of a D-loop structure, characterized by the invasion of a single-strand DNA (ssDNA) into a homologous duplex DNA. We purified human BRCA2 (Fig. 3A), Pol $\eta$  (Fig. 3B), and PALB2 (Buisson et al., 2010) in order to see whether both PALB2 and BRCA2 could directly affect the DNA polymerization activity of Pol $\eta$ . First, we confirmed the ability of Pol $\eta$  to promote DNA synthesis on a D-loop substrate (Suppl. Fig. 2A). A control reaction showed that, at 2 nM Pol $\eta$ , only a few synthesis products were detected below 48 nucleotides, while DNA synthesis was complete for some of the events (60 nt) (Fig. 3C, lane 2). Then, when Pol $\eta$  was supplemented with increasing concentrations of purified PALB2, a strong stimulation of Pol $\eta$ -dependent DNA synthesis was observed, leading to intermediate- and full-length DNA products (lanes 3–6). As PALB2 is a major partner of BRCA2, it was important to test whether BRCA2 could also stimulate Pol $\eta$ . Purified BRCA2 also stimulated Pol $\eta$ , although less efficiently than PALB2. Because BRCA2 purification is technically difficult, we also used a functional BRCA2 chimera protein (termed piccolo BRCA2 or piBRCA2) to test Pol $\eta$  stimulation with a higher concentration of protein. We have shown previously that piBRCA2 has very similar properties to full length BRCA2 as it stimulates RAD51 D-loop formation and the accumulation of RAD51 on chromatin (Buisson et al., 2010). piBRCA2 enhanced Pol $\eta$  activity (Suppl. Fig. 2B). Time-course experiments revealed that DNA was synthesized progressively over a 30 minute-period (Suppl. Fig. 2C-D).

To confirm the specificity of PALB2/BRCA2 stimulation of Pol $\eta$ , several controls were performed. First, we used *E. coli* DNA polymerase I Klenow fragment (3'-5' exo-) (Suppl. Fig. 3A). PALB2 or piBRCA2 failed to stimulate Klenow polymerase; indeed, its activity was inhibited (Fig. 4A and suppl. Fig. 3B). Second, unlike PALB2 and BRCA2, BRCA1 did not enhance Pol $\eta$  activity (Suppl. Fig. 3C), although BRCA1 is necessary for their recruitment to DSBs. Third, in *E. coli*, the single-strand binding protein, SSB, recruits DNA polymerase V (Pol $\eta$  homolog) to the primer end of RecA-coated DNA for DNA synthesis (Arad et al., 2008). Unlike what was observed in bacteria, human RPA protein did not activate Pol $\eta$  (Suppl. Fig. 3D). We then used a BRCA2 homologue from *Leishmania infantum*, which bears the DNA binding domain BRC7 and BRC8-like repeats. Like hBRCA2, LiBRCA2 stimulates LiRAD51 in recombination assays (Genois et al., 2012). Importantly, LiBRCA2 failed to stimulate human Pol $\eta$ , suggesting that the observed stimulation is specific for human BRCA2 protein (Fig. 4B). In addition, RAD52 was not able to enhance Pol $\eta$ -mediated DNA synthesis, suggesting that a DNA annealing activity is not required (Suppl. Fig. 3E).

To further demonstrate that PALB2 and BRCA2 stimulate Pol $\eta$  DNA synthesis, we used a D-loop substrate more similar to those found in eukaryotes in vivo. The D-loop DNA substrate was purified from a RAD51-mediated D-loop assay (Suppl. Fig. 4A). Using this substrate, Pol $\eta$  extended the invaded ssDNA only poorly (Fig. 4C, lane 2). However, the addition of PALB2 (cf. lanes 2 and 3-5), BRCA2 (Fig. 4D, cf. lanes 2 and 3-4), or piBRCA2 (Suppl. Fig. 4B) increased Pol $\eta$ -mediated DNA synthesis. We removed RAD51 during the D-loop purification step to be sure that DNA synthesis was not stimulated artificially by increased D-loop formation due to RAD51 (enhanced by the presence of PALB2/BRCA2). Experiments showed that Pol $\eta$  is activated rapidly in the

presence of PALB2 or piBRCA2 (Fig. 4C, Suppl. Fig. 4B) but that extension ceased after addition of 50-100 nucleotides. Topological constraints severely affect DNA synthesis (Li et al., 2009). Adding topoisomerase I at a concentration that transformed supercoiled plasmids into relaxed plasmids (Suppl. Fig. 4C) did not affect Pol $\eta$ /PALB2 or Pol $\eta$ /piBRCA2 DNA extension, suggesting that halted DNA synthesis is not caused by a topological constraint (Suppl. Fig. 4D-E).

Our data suggests that PALB2 and BRCA2 target Pol $\eta$  at the 3'-terminus for DNA synthesis. We used a primer accessibility assay to monitor whether PALB2 and BRCA2 bind the 3'-end of the primer within the D-loop structure. In this assay, PALB2 or piBRCA2 are bound to the D-loop substrate, followed by the addition of *E. coli* exonuclease III (Exo III) to excise the primer terminus in the 3'-5' direction. Control reactions showed that Exo III degraded the 5'-labelled primer (Suppl. Fig. 5A-B, lane 2). However, when PALB2 or piBRCA2 were added before Exo III, a region of 10 nucleotides from the 3'-end was protected from degradation (Suppl. Fig. 5A-B). Hence, once bound to the D-loop substrate, our results suggest that PALB2 and BRCA2 bind the 3'-end of D-loop substrates to initiate DNA synthesis by Pol $\eta$ .

### **3.2.3. Direct interaction between Pol $\eta$ and PALB2 or BRCA2 is required for stimulation of DNA synthesis**

As suggested by the co-localization of PALB2 and BRCA2 with Pol $\eta$  in immunofluorescence studies, we found that Pol $\eta$  co-immunoprecipitated with endogenous PALB2 or BRCA2 in XPV-complemented cells (Fig. 5A,B). We also detected a complex between endogenous Pol $\eta$ , BRCA2 and PALB2 in untreated and HU-treated U2OS cells (Suppl. Fig. 5C). Moreover, the stimulatory effect of PALB2 and BRCA2 on Pol $\eta$  suggested that these proteins could interact directly. To map the interaction regions between Pol $\eta$  and both PALB2 and BRCA2, we used a series of non-overlapping glutathione S-transferase (GST) fusion proteins (designated PALB2 P2-T1 to P2-T5, and BRCA2 B2-T1 to B2-T9; Fig. 5C,D) to define the regions of PALB2 and BRCA2 that interact with Pol $\eta$ . GST pull-down assays revealed that Pol $\eta$  binds the WD40 domain of PALB2 (residues 853-1186) (Fig. 5E) and truncation 4 of BRCA2 (residues 1338-1781) containing the BRC3, BRC4 and BRC5 domains (Fig. 5F). In addition, we found that both purified PALB2 and piBRCA2 bind Pol $\eta$  directly (Fig. 5G). Since the purification scheme of these proteins include a benzonase treatment, we infer that this interaction is not DNA mediated. As piBRCA2 bears the BRC3/4 domain and interacts directly with Pol $\eta$ , we purified a smaller GST fragment of truncation 4 with only BRC3/4. GST-BRC3/4 still interacts with Pol $\eta$  with the same affinity as truncation 4 of BRCA2 (Fig. 5H).

We next examined whether the Pol $\eta$  interaction domains within PALB2 or BRCA2 were important for Pol $\eta$  stimulation. We purified PALB2<sup>Q775X</sup>—a mutant of PALB2 with a nonsense codon just before the WD40 domain (Suppl. Fig. 6A-B). This mutant was found among French-Canadian women with breast cancer (Foulkes et al., 2007). Since it bears intact DNA binding domains, PALB2<sup>Q775X</sup> binds DNA similarly to full-length PALB2 (Suppl. Fig. 6C). Remarkably, PALB2<sup>Q775X</sup> completely lost its ability to enhance Pol $\eta$  DNA synthesis and extend

D-loop oligonucleotide substrates (Fig. 6A, Suppl. Fig. 6D) or purified D-loops (Suppl. Fig. 6E). Similar experiments were also performed with piBRCA2 and BRCA2. We deleted the BRC3/4 domain from the piBRCA2 chimera or full-length BRCA2 (Suppl. Fig. 6F-J and 7A-C). Unlike piBRCA2 or BRCA2, piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup> or BRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup> failed to enhance Polη DNA synthesis (Fig. 6B-D, Suppl. Fig. 6I-J) while both proteins displayed similar DNA binding properties (Suppl. Fig. 6H and 7C). These results show that the WD40 domain of PALB2 and the BRC3/4 repeat of BRCA2 are crucial for DNA synthesis by Polη.

Next, we tested whether disruption of the Polη interaction domains in PALB2 and BRCA2 affected Polη foci formation in vivo after HU treatment. First, consistent with our previous data, the interaction between PALB2 and Polη was lost with a C-terminal truncation mutation containing the WD40 domain (PALB2<sup>Q775X</sup>, Suppl. Fig. 7D), while deletion of BRC3/4 in piBRCA2 abrogated the interaction with Polη (Suppl. Fig. 7E). These siRNA-resistant constructs, along with wild-type controls, were used to complement siPALB2 and siBRCA2 cells, respectively. Polη foci formation was severely affected in siPALB2 and siBRCA2 cells transfected with PALB2<sup>Q775X</sup> or piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup>, compared to wild-type constructs (Fig. 7A-B-C and Suppl. Fig. 7F). These results show that the WD40 domain of PALB2 and the BRC3/4 repeat of BRCA2 are important for Polη foci formation at broken replication forks.

### 3.3. Discussion

Replicative DNA polymerases are often stalled by DNA lesions, and the replication blockage is released by translesion DNA synthesis and HR. How these processes are intertwined is poorly understood in higher eukaryotic cells. Our data reveal novel roles for BRCA2 and PALB2 in coordinating the DNA synthesis step of HR during the repair of replication forks.

#### 3.3.1. PALB2 and BRCA2: two important players at blocked DNA replication forks

Our results show that PALB2 and BRCA2 are important for the proper localization of Polη to DSBs at replication forks and to enhance its activity for D-loop extension. Recent studies ascribe a new role to BRCA2/PALB2 tumor suppressors at broken replication forks. Unlike collapsed replication forks, which require active HR for repair (Petermann et al., 2010), RAD51 promotes replication restart independently of HR at stalled replication forks. At stalled replication forks, a possible model is that helicases such WRN, BLM or SMARCAL1 facilitate fork regression into a « Chicken Foot » structure, which is protected against MRE11 degradation by the BRCA pathway (Hashimoto et al., 2010; Petermann and Helleday, 2010; Schlacher et al., 2011; Schlacher et al., 2012). The BRCA pathway achieves this function by promoting RAD51 nucleoprotein filament formation and stabilization at stalled forks (Schlacher et al., 2012). The double-stranded end of the chicken foot structure is used by RAD51 and its mediators to promote strand invasion and D-loop formation. In contrast, prolonged replication blocks, caused mainly by a failure to restart, lead to collapsed replication forks and DSB formation. DSBs are generated by the MUS81-EME1 complex and then are repaired by RAD51-mediated HR. In both mechanisms,

DNA synthesis is required and Pol $\eta$  action would benefit from the presence of PALB2 and BRCA2 proteins after strand invasion.

We show that both PALB2 and BRCA2 bind the 3'-end of the invading strand in the D-loop structure. Since PALB2 and BRCA2 interact with Pol $\eta$ , our data suggest that they target DNA Pol $\eta$  to the end of the invading strand, in addition to their role in stimulating RAD51 during strand invasion. We initially planned to study the function of PALB2 or BRCA2 in the presence of RAD51 in terms of their Pol $\eta$  stimulation activities. However, this is extremely difficult as one cannot distinguish between the RAD51 invasion activity promoted by PALB2/BRCA2 and the pol $\eta$  elongation activity stimulated by PALB2/BRCA2, as elongation is possible only after DNA invasion has occurred. Hence, we purified D-loop structures in order to monitor PALB2/BRCA2 activity at the elongation step without interference by RAD51. After D-loop formation, RAD51 may be an obstacle to the initiation of the elongation step in making the 3'-OH end inaccessible to DNA polymerases. RAD54 is able to eliminate RAD51 at the dsDNA and thereby release the 3'-OH (Solinger et al., 2002). Indeed, in yeast, in the absence of RAD54, Pol $\eta$  and  $\delta$  are unable to extend the D-loop structures formed by RAD51 (Li et al., 2009).

### **3.3.2. More than one polymerase is required for effective HR**

We have shown that Pol $\eta$  is stimulated by BRCA2 and PALB2—two regulators of RAD51 at stalled or collapsed replication forks—which is similar to what is observed in prokaryotic cells. In *E. coli*, DNA polymerase V, the prokaryotic homolog of Pol $\eta$ , catalyzes DNA synthesis on a TLS substrate in the presence of RecA (RAD51 homolog in *E. coli*) (Pham et al., 2002; Schlacher et al., 2005). While our data suggest that Pol $\eta$ -dependent DNA synthesis is enhanced specifically by BRCA2 and PALB2, we do not exclude the possibility that other DNA polymerases could be stimulated by BRCA2 and PALB2. The human genome encodes at least 13 nuclear DNA polymerases (Lange et al., 2011). Several polymerases have been identified as being important for DSB repair by HR. *S. cerevisiae* Pol $\delta$  affects gene conversion tract length during mitotic recombination from site-specific DSBs (Maloisel et al., 2008), and both PCNA-associated DNA Pol $\delta$  and  $\epsilon$  are important for gene conversion (Holmes and Haber, 1999). Polymerases  $\zeta$ ,  $\nu$ , and REV1 have been shown to be involved in DSB repair and their knockdown in human cells causes a significant decrease of HR (Moldovan et al., 2010; Sharma et al., 2012). In human cells, Pol $\delta$  and Pol $\eta$  and Pol $\kappa$  are the only polymerases known able to extend a D-loop structure (Li et al., 2013; McIlwraith et al., 2005; Sebesta et al., 2011; Sebesta et al., 2013; Sneed et al., 2013). The exact function of all these polymerases in DSB repair is still poorly understood and several polymerases might replace each other when required. Indeed, a recent report shows that only the double depletion of Pol $\eta$  and Pol $\kappa$  affects HR significantly (Sebesta et al., 2013). Another possibility could be that these polymerases are involved in different alternative DSB repair pathways. For instance, the DSBR (double-strand break repair) pathway is characterized by a second-end capture and double Holliday junction formation leading to crossover or non-crossover products, whereas SDSA (synthesis-dependent strand-annealing) is characterized by displacement of the extended D-loop by BLM helicase with annealing with the second extremity of the break leading to only non-crossover products (Krejci et al., 2012; Moynahan and Jasin, 2010). We hypothesize that, depending on the pathway used, different polymerases could be involved. This is consistent with recent work showing that expression of an inactive Pol $\eta$

led to an increase of sister chromatid exchange (Bergoglio et al., 2013)—a similar phenotype to that observed in BLM deficient cells—suggesting that Pol $\eta$  could be more important in the SDSA pathway. Furthermore, Pol $\delta$  has been shown to be more processive than Pol $\eta$  when extending D-loop structures (Li et al., 2009; Sebesta et al., 2013; Sneed et al., 2013). We hypothesize that Pol $\eta$  will be necessary only for short extension or for the initiation of D-loop extension, and is then substituted by Pol $\delta$  for the generation of longer track length. In this regard, it is important to note that Pol $\eta$  is a low fidelity DNA polymerase. Thus, enabling extended DNA synthesis by Pol $\eta$  could lead to enhanced mutagenesis and genomic instability. Finally, we showed that Pol $\eta$  does not localize to DSBs provoked by IR treatment, confirming previous results (Kannouche et al., 2001). For this reason, we think that polymerase  $\delta$  or  $\kappa$  could be the major players in D-loop extension at DSBs not associated with a replication fork. Further work will be needed to clearly understand the interplay between all these polymerases and whether PALB2 and BRCA2 are also important for their regulation. The regulation of these polymerases during repair DNA synthesis might also be different depending on species, as PALB2 and BRCA2 are absent in yeast. Hence, binding to BRCA2 and PALB2 might control the proper use of polymerases in a temporal and DNA damage-specific manner in human cells.

### 3.4. Conclusion

Previous studies on BRCA2 and PALB2 clearly established these proteins as essential regulators of HR through RAD51 regulation. Our findings show that PALB2 and BRCA2 are important both for polymerase  $\eta$  localization and DNA polymerization activity, leading us to propose a new mechanistic function for these HR mediator proteins. The effect of the PALB2 Q775X mutant on DNA synthesis was revealing, as this mutation is associated with breast cancer (Foulkes et al., 2007). The deleterious effect of this mutation might be related to the inability to interact with both Pol $\eta$  and BRCA2. The Q775X mutation might interfere with replication restart, as in the absence of the WD40 region of PALB2, cells are sensitive to replication stress by MMC treatment (Tischkowitz et al., 2007). As a result, PALB2-deficient cells undergo genome rearrangement and instability as DSBs are not properly repaired. Altogether, our results suggest that the defects observed in BRCA2- and PALB2-deficient or mutated cells, are related not only to RAD51-dependent strand invasion, but also to a deficiency in DNA synthesis.

### Acknowledgements

We thank Elliot Drobetsky for XPV and complemented XPV cell lines, Bing Xia for providing the PALB2 antibody, and Mark Baker for discussions. We also thank Lee Zou, Helen Rothnie and Isabelle Brodeur for helpful comments on the manuscript, Eric Paquet for bioinformatic analyses and Marie-Michelle Genois for purified *L1*BRCA2. R.B. was a FQNRT doctoral scholar, and J.-Y.M. is a FRQS Chercheur National. This work was supported by NIH grant ES015252 (to P.S.) and the CIHR (to J.-Y.M.).

## Experimental procedures

### Pulse-field gel electrophoresis

Cells were treated with mitomycin C (6  $\mu$ M) for 1h and released for 0 h, 12 h, 24 h, 36 h or 48 h or treated with HU (2mM) and released for 6 h, 12h, 24h and 36 h. Cells were harvested after trypsinization and 1 % agarose plugs containing 500 000 cells were prepared with a CHEF-disposable plug mold (Bio-Rad). The cells were lysed by incubation of the plugs in 1 mg/mL proteinase K, 100 mM EDTA, 0.2 % sodium deoxycholate, 1 % sodium lauryl sarcosine for 48 h at 37°C and then washed three time for 1 hour with 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA. The plugs were loaded onto a 0.9 % agarose gel, and electrophoresis was performed during 24 hours with two block pulse linear program (Block1 : 0,1 s at 30 s, 5.8 V/cm, 14 °C, angle 120°, TBE 0.5X, 12 h Block 2: 0,1 s at 5 s, 3.6 V/cm, 14 °C, angle 110°, TBE 0.5X, 12 h) in a CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis Systems (BioRad). The DNA was stained with SYBR Gold (Molecular Probes) and visualized using a Typhoon 9200 scanner (Amersham Pharmacia Biotech).

### Protein purification

PALB2, RAD51, RAD52, RPA and Pol $\eta$  were purified as described (Baumann et al., 1997; Buisson et al., 2010; Buisson and Masson, 2012; Henricksen et al., 1994; Masutani et al., 1999; Van Dyck et al., 1998). BRCA1 was obtained from Active motif. Exonuclease III, Topoisomerase I and Klenow were purchased from NEB. PiBRCA2 or piBRCA2<sup>ABRC3/4</sup> were purified from baculovirus-infected Sf9 cells. 1 L of Sf9 insect cells were infected with PiBRCA2 or piBRCA2<sup>ABRC3/4</sup> baculoviruses for 3 days at 27°C. The cell pellet was resuspended in 40 mL of Flag buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1mM DTT, 0.25% Triton X-100 and 10% glycerol) containing protease inhibitors (Roche). The suspension was lysed using a Dounce homogenizer (10 strokes), sonicated three times 30 seconds (50% output), and then homogenized a second time. 15 U/ml of Benzonase and MgCl<sub>2</sub> (1 mM) were added for 1 h at 4°C and insoluble material was removed by centrifugation (35,000 rpm for 40 minutes). Then, 300  $\mu$ L of M2 anti-Flag affinity gel (Invitrogen) was added to the soluble extract for 3 hours at 4°C. Then, the beads were washed two times with washing buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1mM DTT, 0.25% Triton X-100 and 10% glycerol) and incubated 30 min with washing buffer (5 mM ATP and 15 mM MgCl<sub>2</sub>). After two additional washes with Flag buffer without EDTA and DTT, proteins were eluted twice in 1 volume of beads with Flag buffer and 500  $\mu$ g/ml of 3X-Flag peptide for 45 min at 4°C. The eluted proteins were pooled and added in 5 ml of Talon buffer (20 mM NaHPO<sub>4</sub> pH 7.4, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 0,02 % Triton, 5 mM Imidazole). Then, 300 $\mu$ L of Talon resin (Clontech) was added and incubated for 2 hours at 4°C. The talon resin was washed three times with Talon buffer. Proteins were eluted with talon buffer containing 500 mM imidazole and dialysed in storage buffer (20 mM Tris-Acetate, pH 8.0, 200 mM KOAc, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT).

BRCA2 or BRCA2<sup>ABRC3/4</sup> were purified from baculovirus-infected Sf9 cells. 1 L of Sf9 insect cells were infected with BRCA2 or BRCA2<sup>ABRC3/4</sup> baculoviruses for 3 days at 27°C. The cell pellet was resuspended in 40 mL of Flag buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1mM DTT, 0.02% Triton X-100 and 10%

glycerol) containing protease inhibitors (Roche). The suspension was lysed using a Dounce homogenizer (10 strokes), sonicated three times 30 seconds (50% output), and then homogenized a second time. 15 U/ml of Benzonase and MgCl<sub>2</sub> (1 mM) were added for 1 h at 4°C and insoluble material was removed by centrifugation (35,000 rpm for 40 minutes). Then, 500 µL of GFP-Trap-A beads (Chromotek) was added to the soluble extract for 3 hours at 4°C. Then, the beads were washed two times with washing buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1mM DTT, 0.02% Triton X-100 and 10% glycerol) and incubated 30 min with washing buffer and 5 mM ATP and 15 mM MgCl<sub>2</sub>. After two additional washes with Flag buffer, beads are resuspended in 1.5 mL of Flag buffer containing 500 U of TEV protease (Invitrogen) and incubated for 14 hours. After the elution, the supernatant was added in 250 µL of M2 anti-Flag affinity gel (Invitrogen) in 10 mL of Flag buffer and incubated during 2 hours at 4°C. Then, the beads were washed two times with washing buffer. After two additional washes with Flag buffer proteins were eluted twice in 1 volume of beads with Flag buffer and 500 µg/ml of 3X-Flag peptide (Invitrogen) for 2 hours at 4°C. Each elution were dialyzed separately in storage buffer (20 mM Tris-Acetate, pH 8.0, 200 mM KOAc, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT).

#### **DNA synthesis assays of synthetic D-loop**

Reactions (10 µl) containing <sup>32</sup>P-labelled synthetic D-loop (500 nM in nucleotides) were incubated with the indicated proteins in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM KOAc, 0.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 nM dNTP, 1 mM DTT and 100 µg/ml BSA for 5 min at 37°C followed by the addition of Polη (2nM) or Klenow (0.25, 0.5 and 2.5 µU). After 20 min incubation at 37°C, reactions were deproteinized with proteinase K (2 µg/µl) for 20 min at 37°C. Formamide was added to a final concentration of 60% (v/v) and the samples loaded on a 8% denaturing acrylamide (7M Urea), 1X TBE gel, run at 75 W, dried and visualized by autoradiography.

#### **Purification of D-loop probe**

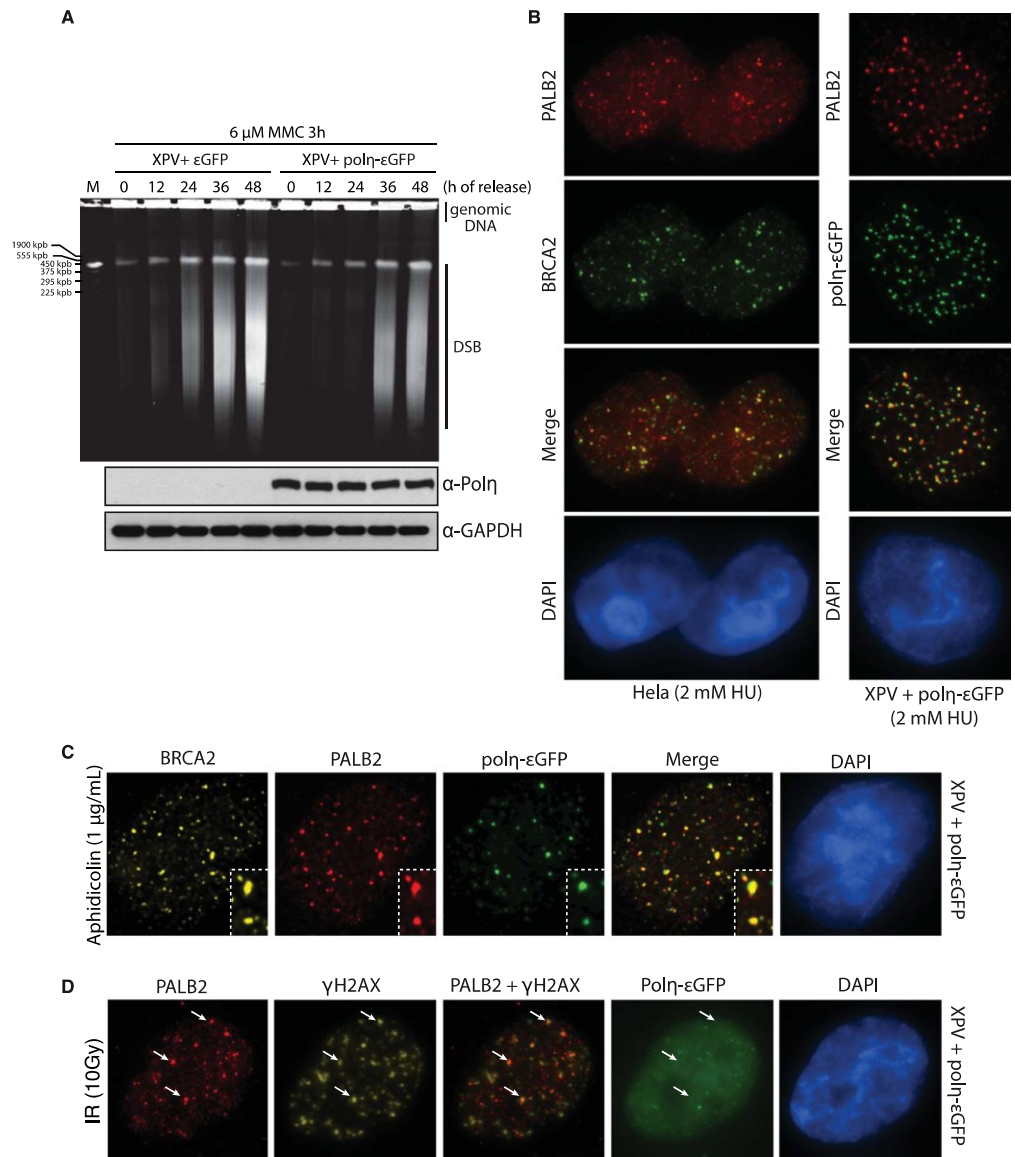
A <sup>32</sup>P-labeled 50-mer oligonucleotide substrate (2 µM nucleotides) was incubated for 5 minutes with 700 nM of RAD51 in 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM KOAc, 2.5 µM CaCl<sub>2</sub>, 300 µM EDTA, 1mM DTT, 2mM ATP and 100 µg/ml BSA. CsCl-purified pPB4.3 replicative form I DNA (600 µM) was added, the reaction was incubated for 15 min and deproteinized with proteinase K (2 µg/µl) for 20 min at 37°C. D-loop structure was separated from 50-mer ssDNA on 0.8% agarose gel (1X TBE) for 2 hours at 65V and purified by electroelution. The purified D-loop DNA was dialysed for 1 h in water and concentrated by speed vac.

#### **DNA synthesis assays of purified D-loop**

Reactions (10 µl) containing <sup>32</sup>P-labelled purified D-loop (30 nM) were incubated with the indicated proteins in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM KOAc, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 nM dNTP, 1 mM DTT and 100 µg/ml BSA for 5 min at 37°C following by addition of Polη (2 nM). After 20 min incubation at 37°C, reactions were deproteinized with proteinase K (2 µg/ µl) for 20 min at 37°C. Then 10 mM EDTA and 3 µL of alkaline gel-loading buffer (300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 18% Ficoll) were added to the reactions. The samples were loaded on a 0.8% denaturing agarose gel (50 mM NaOH and 1 mM EDTA), run at 3.5 V/cm for 2 hours, neutralized in 7% TCA for 30 min, dried onto DE81 filter paper and visualized by autoradiography.

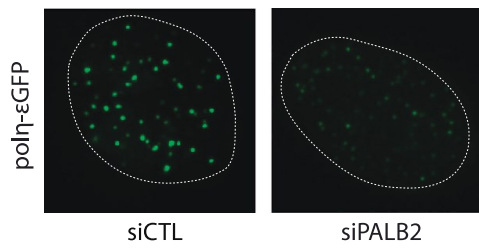
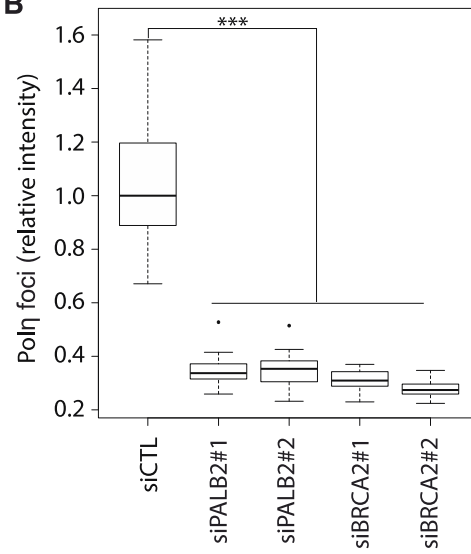


# Figures



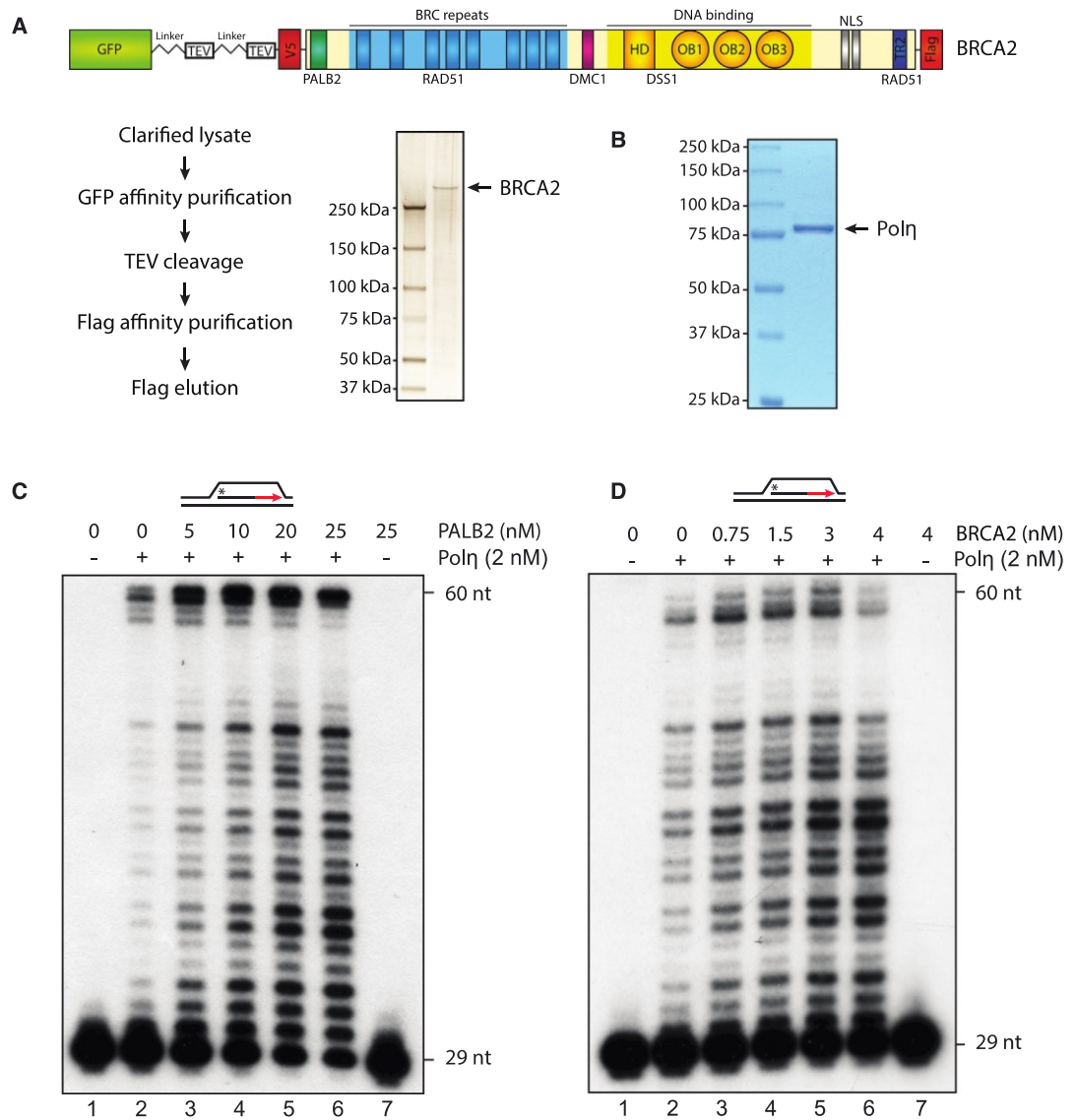
**Figure 1. Pol $\eta$ , PALB2 and BRCA2 recruitment at replication dependent DNA double-strand breaks.**

(A) Pulsed-field gel electrophoresis was used to visualize double-strand break (DSB) formation in XPV cells complemented with  $\epsilon$ GFP or Pol $\eta$ - $\epsilon$ GFP, after treatment with 6  $\mu$ M MMC for 3h and release for the times indicated. (B) Co-localization of PALB2 and BRCA2 or PALB2 and Pol $\eta$ - $\epsilon$ GFP at DSBs induced by HU. DNA was counterstained with DAPI. (C-D) Immunofluorescence staining of the indicated DNA repair proteins at DSBs induced by aphidicolin or IR treatment in XPV cells complemented with Pol $\eta$ - $\epsilon$ GFP. DNA was counterstained with DAPI. The white arrows indicate co-localization of PALB2 and  $\gamma$ -H2AX.

**A****B**

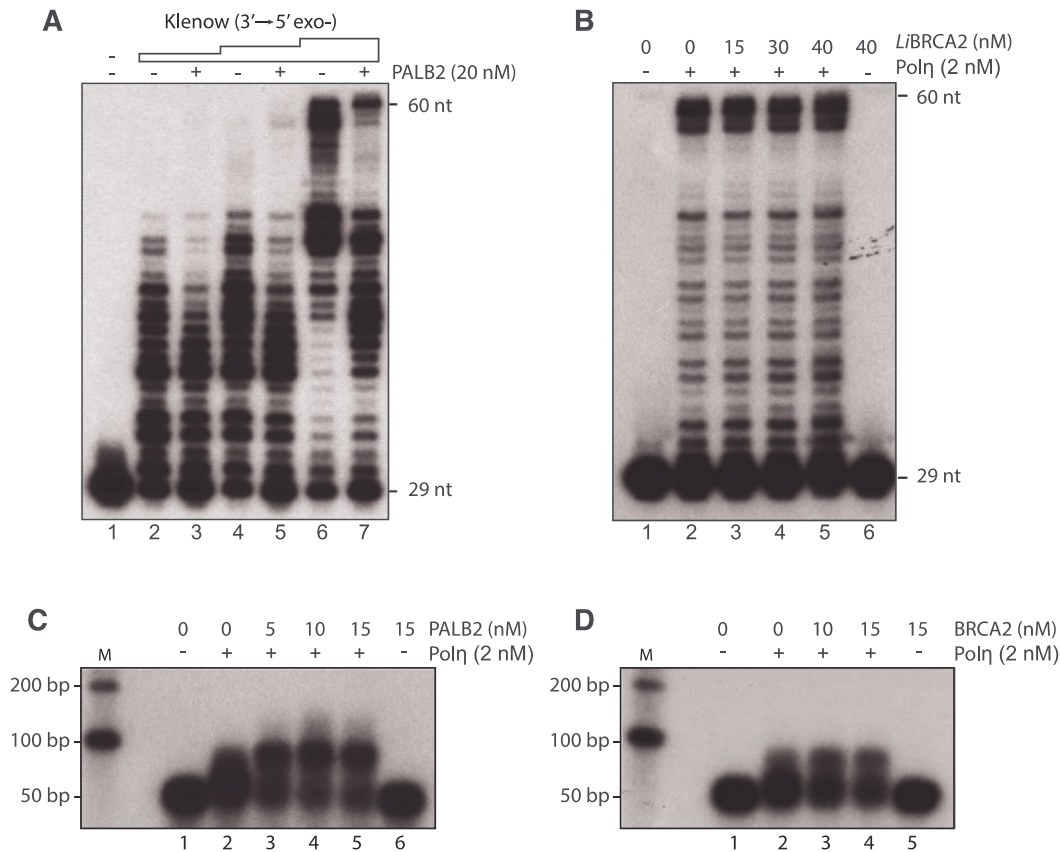
**Figure 2. Knockdown of PALB2 or BRCA2 decreases Polη foci formation.**

(A) A representative example of Polη-εGFP foci intensity in cells transfected with a control siRNA or PALB2 siRNA. (B) Quantification of Polη-εGFP foci intensity induced by HU treatment in control, PALB2 or BRCA2 knockdowns. \*\*\*  $P < 0.001$ . The median is represented by a black line.



**Figure 3. PALB2 and BRCA2 stimulate D-loop extension by Polymerase  $\eta$ .**

SDS-PAGE of purified human BRCA2 (A), or Pol $\eta$  (B), 1  $\mu$ g) stained by silver stain or Coomassie blue, respectively. (C-D)  $^{32}$ P-labeled D-loop was incubated with Pol $\eta$  (2 nM) with the indicated amounts of purified PALB2 or BRCA2. DNA synthesis products were analyzed by denaturing PAGE.



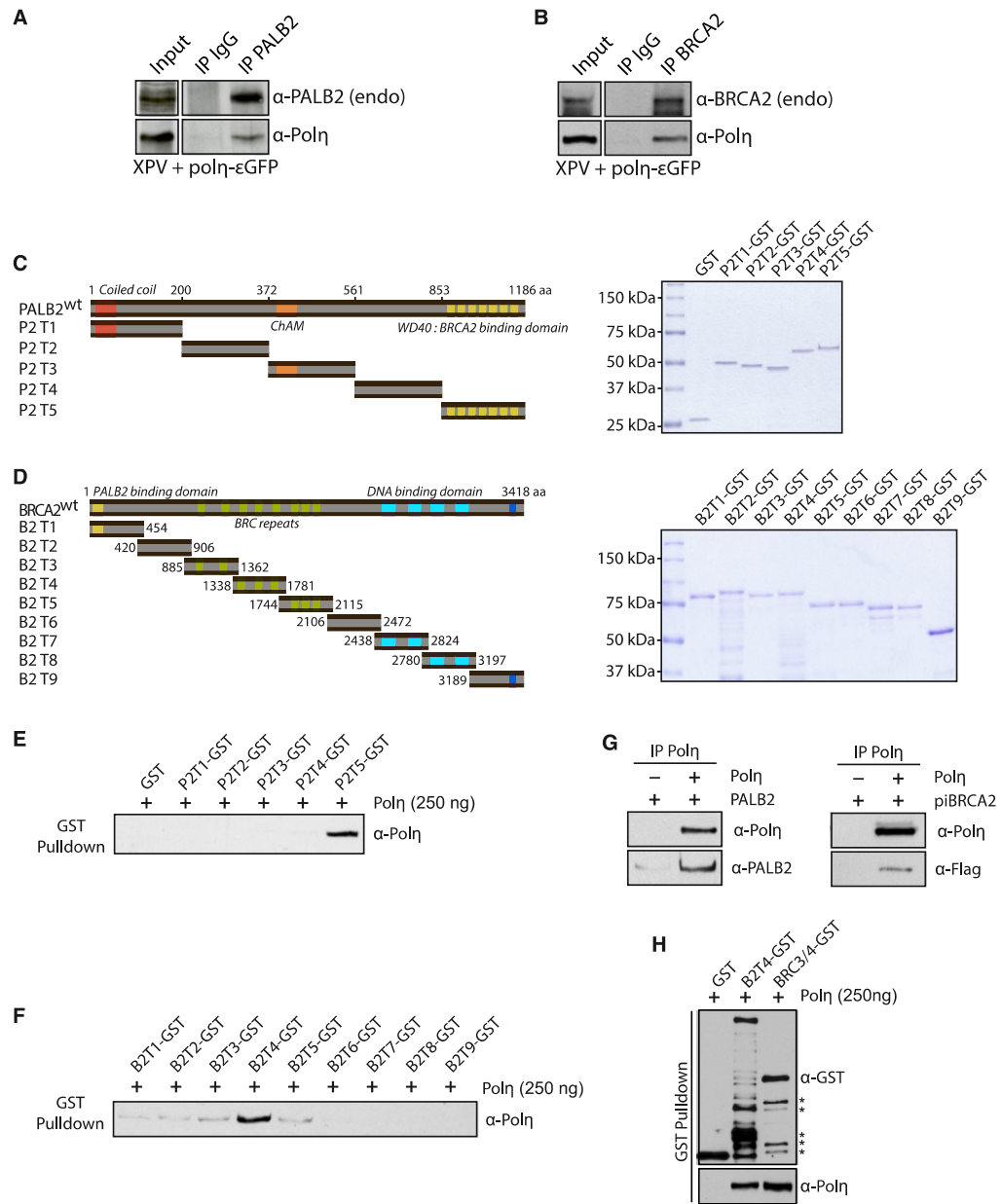
**Figure 4.**

**(A) Klenow DNA polymerase activity is not enhanced by PALB2.** D-loop substrate was incubated with PALB2 (20 nM) followed by the addition of Klenow polymerase (0.25, 0.5 and 2.5  $\mu$ U). DNA synthesis products were analyzed by denaturing PAGE.

**(B) *Leishmania infantum* BRCA2 does not stimulate Polη.**

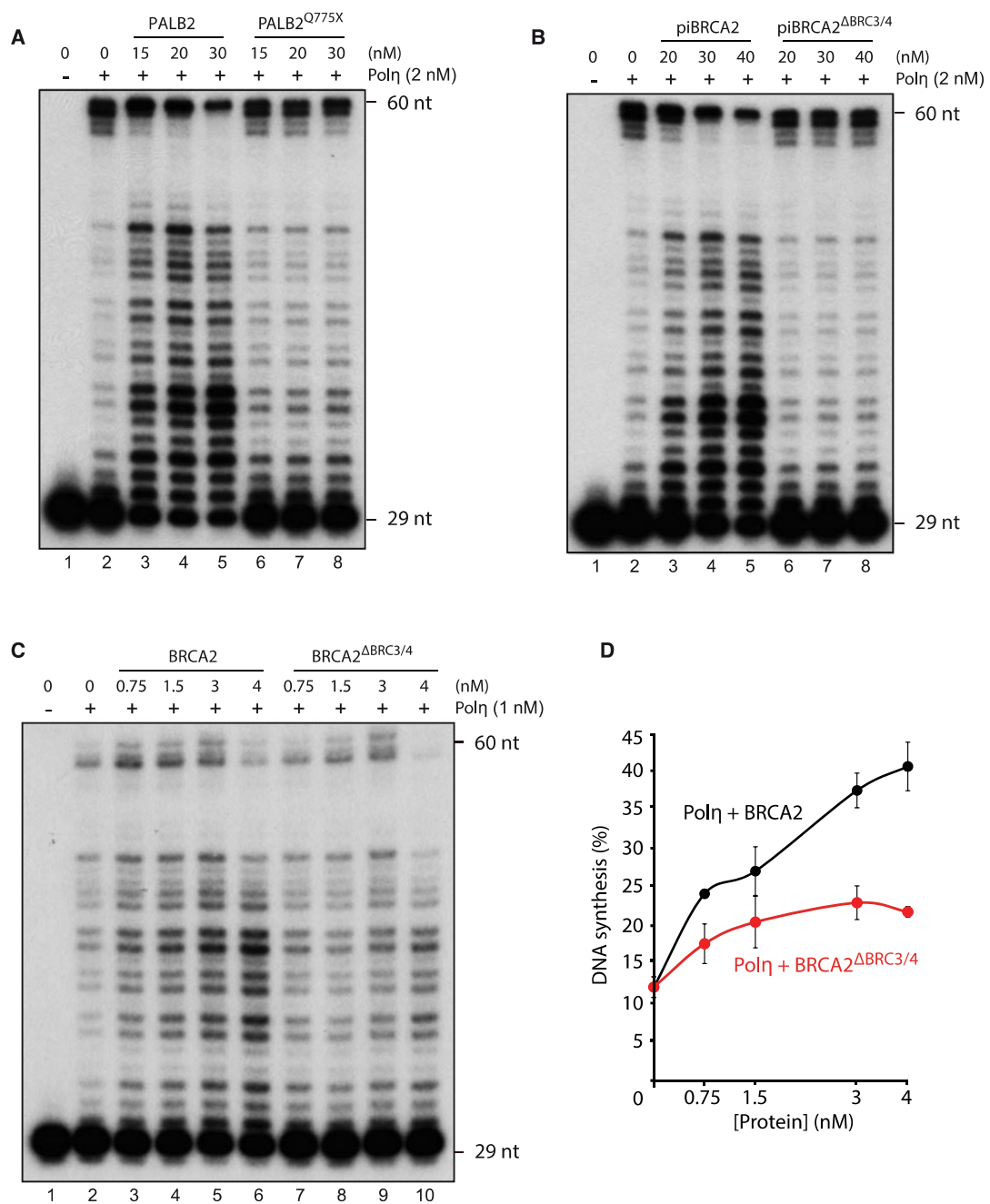
$^{32}$ P-labeled D-loop was incubated with the indicated amounts of *L*/BRCA2 prior to the addition of Polη (2 nM). DNA synthesis products were analyzed by denaturing PAGE.

**(C-D) PALB2 and BRCA2 stimulate D-loop extension by Polη.** Purified D-loop substrate was incubated with increasing concentrations of PALB2 or BRCA2 following by addition of Polη. DNA synthesis products were analyzed by alkaline gel electrophoresis.



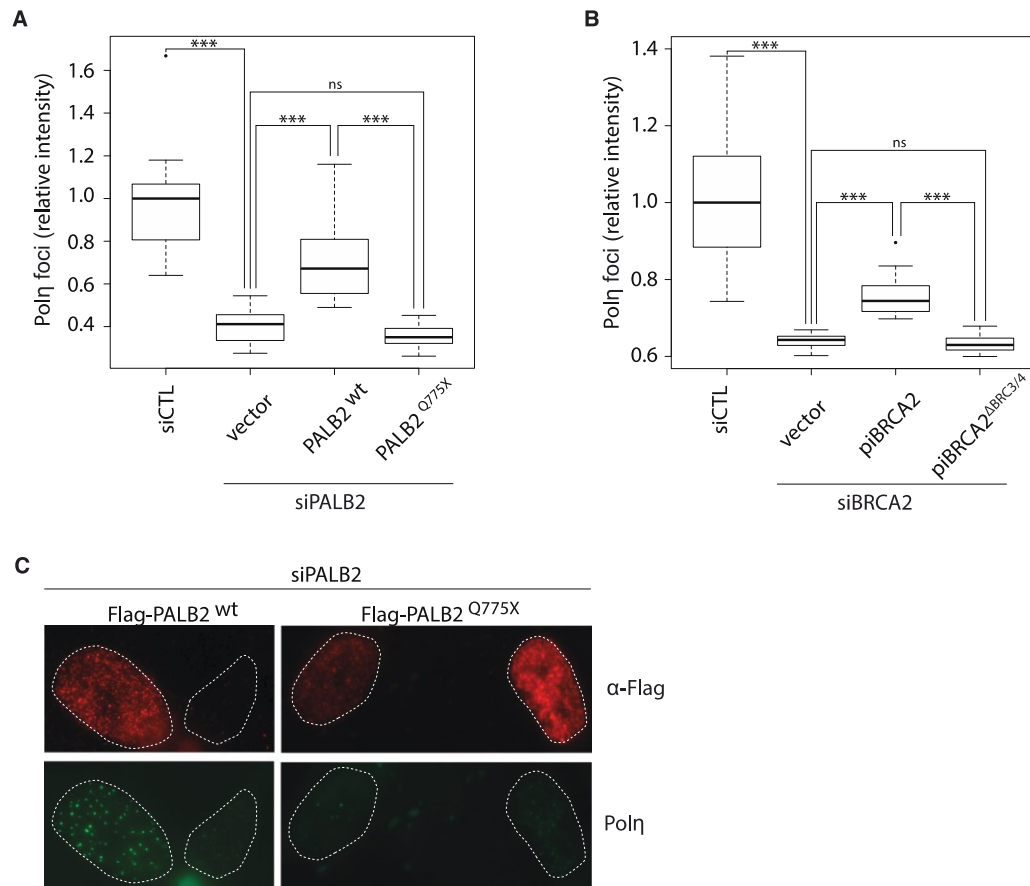
**Figure 5. PALB2 and BRCA2 interact directly with Pol $\eta$ .**

(A) Cell extracts from complemented XPV cells were subjected to immunoprecipitation with anti-PALB2 or (B) anti-BRCA2 antibodies. Immunoprecipitated proteins were detected by Western Blotting with the indicated antibodies. (C) Left: Scheme of the PALB2 or (D) BRCA2 deletion variants fused to GST. Right: SDS-PAGE of the corresponding purified proteins. (E) GST alone or GST-PALB2 truncation (P2T1 to P2T5) were incubated with Pol $\eta$  followed by GST pulldown and detection of Pol $\eta$  by Western blotting. (F) GST alone or GST-BRCA2 truncations (B2T1 to B2T9) were incubated with Pol $\eta$ , followed by GST pulldown. The beads were washed and bound proteins were eluted with Laemmli buffer, and revealed by western blotting with the antibodies indicated. The input for PALB2 or BRCA2 truncations are shown in (C) and (D). (G-H) Co-immunoprecipitation of purified PALB2, piBRCA2, B2T4 or BRC3/4 and Pol $\eta$ . Asterisk: degradation products.



**Figure 6. Polη interactions domains within PALB2 or piBRCA2 are essential for Polη stimulation.**

(A-B-C) <sup>32</sup>P-labeled D-loop oligonucleotides was first incubated with indicated concentrations of PALB2, piBRCA2 with/without the Polη interacting domains following by the addition of Polη. DNA synthesis products were analyzed by denaturing PAGE. (D) quantification of the results shown in (C).



**Figure 7. Deletion of Pol $\eta$  interaction domains in PALB2 and piBRCA2 affect polymerase  $\eta$  foci formation.** (A) quantification of Pol $\eta$ - $\epsilon$ GFP foci intensity induced by HU treatment in control, and siPALB2 knockdowns complemented with vector alone, wild-type PALB2, or PALB2<sup>Q775X</sup>. (B) Quantification of Pol $\eta$ - $\epsilon$ GFP foci intensity induced by HU treatment in control, and siBRCA2 knockdowns complemented with vector alone, wild-type piBRCA2, or piBRCA2 <sup>$\Delta$ BRC3/4</sup>. \*\*\*  $P < 0.001$ , *ns* not significant between the identified groups. The median is represented by a black line. (C) Representative images of Figure 7A. XPV complemented cells knockdown for PALB2, and complemented with Flag-PALB2 wild-type, and Flag-PALB2<sup>Q775X</sup> were subjected for immunofluorescence against Pol $\eta$  (green) or anti-Flag antibodies to discriminate transfected cells. siRNA PALB2 resistant constructs were used.

## References

- Arad, G., Hendel, A., Urbanke, C., Curth, U., and Livneh, Z. (2008). Single-stranded DNA-binding protein recruits DNA polymerase V to primer termini on RecA-coated DNA. *J Biol Chem* 283, 8274-8282.
- Baumann, P., Benson, F.E., Hajibagheri, N., and West, S.C. (1997). Purification of human Rad51 protein by selective spermidine precipitation. *Mut. Res. DNA Repair* 384, 65-72.
- Bergoglio, V., Boyer, A.S., Walsh, E., Naim, V., Legube, G., Lee, M.Y., Rey, L., Rosselli, F., Cazaux, C., Eckert, K.A., *et al.* (2013). DNA synthesis by Pol eta promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *The Journal of cell biology* 201, 395-408.
- Bleuyard, J.Y., Buisson, R., Masson, J.Y., and Esashi, F. (2012). ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair. *EMBO Rep* 13, 135-141.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913-917.
- Buisson, R., Dion-Cote, A.M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Xia, B., and Masson, J.Y. (2010). Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1247-1254.
- Buisson, R., and Masson, J.Y. (2012). PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic acids research*.
- de Feraudy, S., Limoli, C.L., Giedzinski, E., Karentz, D., Marti, T.M., Feeney, L., and Cleaver, J.E. (2007). Pol eta is required for DNA replication during nucleotide deprivation by hydroxyurea. *Oncogene* 26, 5713-5721.
- Dray, E., Etchin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G.J., Hammel, M., Yu, X., Galkin, V.E., Liu, D., Tsai, M.S., *et al.* (2010). Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1255-1259.
- Foulkes, W.D., Ghadirian, P., Akbari, M.R., Hamel, N., Giroux, S., Sabbaghian, N., Darnel, A., Royer, R., Poll, A., Fafard, E., *et al.* (2007). Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast Cancer Res* 9, R83.
- Genois, M.M., Mukherjee, A., Ubeda, J.M., Buisson, R., Paquet, E., Roy, G., Plourde, M., Coulombe, Y., Ouellette, M., and Masson, J.Y. (2012). Interactions between BRCA2 and RAD51 for promoting homologous recombination in *Leishmania infantum*. *Nucleic acids research*.
- Haracska, L., Prakash, S., and Prakash, L. (2000a). Replication past O(6)-methylguanine by yeast and human DNA polymerase eta. *Molecular and cellular biology* 20, 8001-8007.
- Haracska, L., Yu, S.L., Johnson, R.E., Prakash, L., and Prakash, S. (2000b). Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase eta. *Nature genetics* 25, 458-461.
- Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M., and Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nature structural & molecular biology* 17, 1305-1311.
- Henricksen, L.A., Umbricht, C.B., and Wold, M.S. (1994). Recombinant replication protein A: Expression, complex formation, and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 269, 11121-11132.
- Holmes, A.M., and Haber, J.E. (1999). Double-strand break repair in yeast requires both leading and lagging strand DNA polymerases. *Cell* 96, 415-424.
- Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., *et al.* (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297, 606-609.
- Jensen, R.B., Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467, 678-683.
- Johnson, R.E., Kondratik, C.M., Prakash, S., and Prakash, L. (1999). hRAD30 mutations in the variant form of Xeroderma pigmentosum. *Science* 285, 263-265.
- Kannouche, P., Broughton, B.C., Volker, M., Hanaoka, F., Mullenders, L.H., and Lehmann, A.R. (2001). Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes & development* 15, 158-172.
- Kawamoto, T., Araki, K., Sonoda, E., Yamashita, Y.M., Harada, K., Kikuchi, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Nozaki, K., Hashimoto, N., *et al.* (2005). Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. *Molecular cell* 20, 793-799.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., and Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic acids research*.



- Lange, S.S., Takata, K., and Wood, R.D. (2011). DNA polymerases and cancer. *Nature reviews. Cancer* 11, 96-110.
- Li, J., Holzschu, D.L., and Sugiyama, T. (2013). PCNA is efficiently loaded on the DNA recombination intermediate to modulate polymerase delta, eta, and zeta activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7672-7677.
- Li, X., Stith, C.M., Burgers, P.M., and Heyer, W.D. (2009). PCNA is required for initiation of recombination-associated DNA synthesis by DNA polymerase delta. *Molecular cell* 36, 704-713.
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., and Heyer, W.D. (2010). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1260-1262.
- Maloisel, L., Fabre, F., and Gangloff, S. (2008). DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. *Molecular and cellular biology* 28, 1373-1382.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. (1999). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature* 399, 700-704.
- McIlwraith, M.J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., and West, S.C. (2005). Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell* 20, 783-792.
- Moldovan, G.L., and D'Andrea, A.D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 43, 223-249.
- Moldovan, G.L., Madhavan, M.V., Mirchandani, K.D., McCaffrey, R.M., Vinciguerra, P., and D'Andrea, A.D. (2010). DNA polymerase POLN participates in cross-link repair and homologous recombination. *Mol Cell Biol* 30, 1088-1096.
- Moynahan, M.E., and Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 196-207.
- Petermann, E., and Helleday, T. (2010). Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 683-687.
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell* 37, 492-502.
- Pham, P., Seitz, E.M., Saveliev, S., Shen, X., Woodgate, R., Cox, M.M., and Goodman, M.F. (2002). Two distinct modes of RecA action are required for DNA polymerase V-catalyzed translesion synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11061-11066.
- Roy, R., Chun, J., and Powell, S.N. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 12, 68-78.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., and Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* 145, 529-542.
- Schlacher, K., Leslie, K., Wyman, C., Woodgate, R., Cox, M.M., and Goodman, M.F. (2005). DNA polymerase V and RecA protein, a minimal mutasome. *Molecular cell* 17, 561-572.
- Schlacher, K., Wu, H., and Jasin, M. (2012). A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer cell* 22, 106-116.
- Sebesta, M., Burkovics, P., Haracska, L., and Krejci, L. (2011). Reconstitution of DNA repair synthesis in vitro and the role of polymerase and helicase activities. *DNA repair* 10, 567-576.
- Sebesta, M., Burkovics, P., Juhasz, S., Zhang, S., Szabo, J.E., Lee, M.Y., Haracska, L., and Krejci, L. (2013). Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. *DNA repair*.
- Sharma, S., Hicks, J.K., Chute, C.L., Brennan, J.R., Ahn, J.Y., Glover, T.W., and Canman, C.E. (2012). REV1 and polymerase zeta facilitate homologous recombination repair. *Nucleic acids research* 40, 682-691.
- Sneeden, J.L., Grossi, S.M., Tappin, I., Hurwitz, J., and Heyer, W.D. (2013). Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic acids research*.
- Solinger, J.A., Kiianitsa, K., and Heyer, W.D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Molecular cell* 10, 1175-1188.
- Sy, S.M., Huen, M.S., and Chen, J. (2009a). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7155-7160.
- Sy, S.M., Huen, M.S., Zhu, Y., and Chen, J. (2009b). PALB2 Regulates Recombinational Repair through Chromatin Association and Oligomerization. *J Biol Chem* 284, 18302-18310.

- Terai, K., Shibata, E., Abbas, T., and Dutta, A. (2013). Degradation of p12 Subunit by CRL4Cdt2 E3 Ligase Inhibits Fork Progression after DNA Damage. *J Biol Chem* 288, 30509-30514.
- Thorslund, T., McIlwraith, M.J., Compton, S.A., Lekontsev, S., Petronczki, M., Griffith, J.D., and West, S.C. (2010). The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1263-1265.
- Tischkowitz, M., Xia, B., Sabbaghian, N., Reis-Filho, J.S., Hamel, N., Li, G., van Beers, E.H., Li, L., Khalil, T., Quenneville, L.A., *et al.* (2007). Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6788-6793.
- Van Dyck, E., Hajibagheri, N.M.A., Stasiak, A., and West, S.C. (1998). Visualisation of human Rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. *J. Mol. Biol.* 284, 1027-1038.
- Xia, B., Dorsman, J.C., Ameziane, N., de Vries, Y., Rooimans, M.A., Sheng, Q., Pals, G., Errami, A., Gluckman, E., Llera, J., *et al.* (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet* 39, 159-161.
- Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J., and Livingston, D.M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* 22, 719-729.
- Zhang, F., Fan, Q., Ren, K., and Andreassen, P.R. (2009a). PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res* 7, 1110-1118.
- Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., and Yu, X. (2009b). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol* 19, 524-529.
- Zhang, S., Zhao, H., Darzynkiewicz, Z., Zhou, P., Zhang, Z., Lee, E.Y., and Lee, M.Y. (2013). A Novel Function of CRL4Cdt2: Regulation of the subunit structure of DNA polymerase delta in response to DNA damage and during the S-phase. *J Biol Chem* 288, 29550-29561.

## Supplementary experimental procedures

### DNA constructs, oligonucleotides, and siRNAs

BRCA2 was cloned in a modified pFASTBAC vector containing GFP and FLAG Tags.

The siRNAs used for PALB2 are: GGAAAGAGCCGGUUGUAAA or CUUAGAAGAGGACCUUAAU and for BRCA2: GAAGAAUGCAGGUUUAAUA or CAGACAAGCUCAAAGGUAA. In complementation experiments, siRNA resistant DNA constructs were used.

### Cell culture and survival assays

XPV cells complemented with Pol $\eta$ -GFP were kindly provided by Dr. E.A. Drobetsky. XPV cells were maintained in DMEM supplemented with 15 % Fetal Bovine Serum and 1 % penicillin/streptomycin.

For survival assays 80-90%-confluent 10cm plates of XPV cells complemented with  $\epsilon$ GFP or Pol $\eta$ - $\epsilon$ GFP, were washed once and covered with 10 ml of PBS. Cells were then exposed to increasing dose of UV (1,2,3,4 or 5 J/m<sup>2</sup>) using a UVC500/UV Crosslinker (Hofer), harvested immediately and counted. 5000 cells/well were plated in 96-wells plate and allowed to grow at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, in dark for 50 hours. MTT assay was performed using the MTT Cell Proliferation Assay kit of ATCC bioproducts.

### Antibodies

Commercial antibodies used were anti-PALB2 polyclonal antibody (Bethyl), anti-PALB2 polyclonal antibody (Novus), anti-BRCA2 monoclonal antibody (OP95, Calbiochem), anti-POLH monoclonal antibody (Santa Cruz, B-7) and anti-POLH polyclonal antibody (Santa Cruz and Bethyl), anti-RAD51 monoclonal antibody (14B4, Novus), anti-RAD51 polyclonal antibody (Santa Cruz), anti-RPA polyclonal antibody (Bethyl), anti-Histidine (Clontech), anti-Flag monoclonal antibody (Sigma), anti-PCNA monoclonal antibody (PC10, Santa-Cruz), anti-gamma H2AX (Cell signaling). The rabbit polyclonal anti-GST antibody was generated by immunizing rabbits with recombinant GST which was purified from *Escherichia coli*. For immunofluorescence, rabbit polyclonal anti-PALB2 antibody was generated by immunizing rabbits as previously described (Xia et al., 2006).

### Immunofluorescence studies

XPV cells complemented with Pol $\eta$ -GFP treated with 2 mM of HU or 1  $\mu$ g/ml of aphidicolin for 16-18 h, were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 10 min, washed with TBS and fixed with cold methanol (-20°C) for 5 min. Next, cells were permeabilized with PBS containing 0.2% Triton X-100 for 5 min and washed three times 5 min with TBS. Then, cells were quenched with 0.1% Sodium Borohydride for 5 min, washed once with TBS, blocked in PBS containing 10% goat serum and 1% BSA for 1 h and incubated with the primary antibody diluted in PBS 1% BSA for 2 h at room temperature. Coverslips were washed three times for 10 min with TBS before 1 h incubation with the appropriate secondary antibody conjugated to a fluorophore. Cells were rinsed again three times for 10 min with TBS. Coverslips were mounted onto slides with PBS-glycerol (90%) containing 1 mg/ml paraphenylenediamine and 0.2 mg/ml of 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Immunofluorescence with PCNA antibody was performed as described (Kannouche et al., 2001).

To monitor RAD51 foci formation, the following protocol was used. XPV cells complemented with Pol $\eta$ - $\epsilon$ GFP (either untreated or treated with 2 mM of HU for 16–18 h) were plated on poly-L-lysine treated glass coverslips. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 10 min, washed with TBS and fixed with cold methanol (–20°C) for 5 min. Cells were permeabilized with PBS containing 0.2% Triton X-100 for 5 min and washed three times 5 min each with TBS. Then, cells were quenched with 0.1% Sodium Borohydride for 5 min, washed once with TBS, blocked in PBS containing 10% goat serum and 1% BSA for 1 h and incubated with a RAD51 monoclonal antibody (Novus Biologicals) diluted in PBS-1% BSA for 2h at room temperature. Coverslips were washed three times for 10 min with TBS before 1 h incubation with goat anti-mouse secondary antibody conjugated to a fluorophore (Alexa Fluor 568, Invitrogen). Cells were washed three time for 10 min with TBS. Coverslips were mounted onto glass slides with ProLong Gold antifade reagent containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (Life technologies) and processed for fluorescence microscopy.

### **Purification of GST-fusions**

Protein truncations fused to GST were purified from 1 liter of BL21(DE3) RP (Stratagene), grown at 37°C in Luria broth medium supplemented with 100  $\mu$ g/ml ampicillin, and 25  $\mu$ g/mL chloramphenicol. At OD<sub>600</sub> = 0.4, 0.1 mM IPTG was added to the culture and incubated at 15°C overnight for 16 hours. Cells were centrifuged (5000 rpm, 15 minutes) and the cell pellet was resuspended in 40 mL of GST buffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 297 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM EDTA and 1 mM DTT) containing protease inhibitors (Roche). The suspension was lysed using a Dounce homogenizer (10 strokes), sonicated three times 30 seconds (50% output), and then homogenized a second time. Insoluble material was removed by centrifugation (35,000 rpm for 40 minutes). 2 ml of Glutathione Sepharose (GE Healthcare) was added to the supernatant and incubated for 2 hours at 4°C. Then, beads were washed three times with GST washing buffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM EDTA and 1 mM DTT) and incubated 30 min in GST washing buffer supplemented with 5mM ATP and 15 mM MgCl<sub>2</sub>. Proteins were eluted with GST buffer containing 25 mM Glutathione, and dialysed in storage buffer (20 mM Tris-Acetate, pH 8.0, 200 mM KOAc, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT and 10% glycerol) and stored at -80°C.

### **Co-immunoprecipitations and GST pull-downs**

XPV cells complemented with Pol $\eta$ -GFP were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5 % NP-40) containing protease and phosphatase inhibitors (PMSF (1 mM), aprotinin (0.019 TIU/mL), leupeptin (1  $\mu$ g/ml), NaF (5 mM) and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1 mM)). Cells were then incubated for 30 min on ice and lysed by sonication (two times 10 seconds, 50% output). Insoluble material was removed by high-speed centrifugation (14 000 rpm, 30 min at 4°C) and each immunoprecipitation was carried out using soluble protein extract (3000 mg) in 1 ml lysis buffer. The samples were first incubated for 1.5 hour at 4°C with the indicated antibodies. Protein complexes were then pulled down with 20  $\mu$ L of protein A/G sepharose beads (Pierce) for an hour. Immunoprecipitates were washed four times in lysis buffer and visualized by Western blotting using the indicated antibodies.

Immunoprecipitation from purified proteins were performed as follows. Purified PALB2 or BRCA2 and Pol $\eta$  were incubated in 100  $\mu$ l of IPR buffer 20 mM Tris-Acetate pH 8.0, 125 mM KOAc, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP40, 10% glycerol, 0.1 mg/ml BSA, 1mM DTT for 30 minutes at 37°C. 1  $\mu$ g antibodies were added for 1 hour at 4°C followed by the addition of protein A/G sepharose beads (Pierce) for 20 minutes. Immunoprecipitates were washed four times in IPR buffer and visualized by Western blotting using the indicated antibodies.

GST-pulldown assays using 1  $\mu$ g GST alone or GST-truncations (250 ng) were performed in 500  $\mu$ L of GSTB buffer (20 mM KPO<sub>4</sub> pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% NP40, 1 mM DTT, 200 mM KCl, 1 mg/ml BSA). GST or GST-truncations were incubated with Pol $\eta$  (250 ng) for 30 min at room temperature and Glutathione Sepharose beads (GE Healthcare) were added for 20 minutes. Complexes were washed four times with GSTB buffer without BSA. Proteins were visualized by Western blotting using the indicated antibodies.

Co-immunoprecipitation of Pol $\eta$  with PALB2 was performed from baculovirus-infected cells. Briefly, Sf9 cells were co-infected with PALB2-GST-His or PALB2-Q775X-GST-His with Pol $\eta$  baculovirus. 48 hrs post-infection, cells were harvested for immunoprecipitation and lysed by sonication in 1ml of GST lysis buffer (250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 1mM DTT in PBS1X supplemented with protease inhibitors). Insoluble material was cleared by high-speed centrifugation. Prewashed GST beads were incubated with .1mg/ml BSA for 1 hr at 4°C and then the soluble lysate was incubated with pre-coated GST beads for 1 hr at 4°C. Complexes were washed 4 times with GST lysis buffer and visualized by Western blotting by using anti-histidine monoclonal or Pol $\eta$  polyclonal antibody.

Immunoprecipitation from endogenous proteins were performed as follows. U2OS cells, untreated or treated with 2mM of HU for 18h, were lysed in IP150 buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% NP40 supplemented with PMSF, aprotinin, leupeptin, NaF (5mM) and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM) for 30 min on ice followed by 3x10sec of sonication (40% output). Cell extracts were then incubated for 6 hours at 4°C, respectively, with anti-pol $\eta$  antibody (Bethyl, PolH Antibody), followed by the addition of protein A/G sepharose beads (Pierce) for 45 minutes. Immunoprecipitates were washed four times in IP150 buffer, eluted in Laemmli buffer 2X and visualized by Western blotting using the indicated antibodies.

### **DNA binding assays**

Reactions (10  $\mu$ l) contained <sup>32</sup>P-labelled DNA oligonucleotides (25 nM in nucleotides of each substrate) and PALB2 or PALB2<sup>Q775X</sup> were incubated in binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 60 mM KOAc, 1 mM DTT and 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> BSA). Reaction mixtures were incubated at 37°C for 15 minutes, followed by 15 minutes of fixation in 0.2% glutaraldehyde. Reactions were analyzed by electrophoresis through a 8% TBE1X/acrylamide gel, run at 150V, dried onto DE81 filter paper, and visualized by autoradiography.

### **Exonuclease III protection**

Reactions (10  $\mu$ l) containing <sup>32</sup>P-labelled synthetic D-loop (500 nM) were incubated with indicated proteins in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 60 mM KOAc, 0.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 nM dNTP, 1 mM DTT and 100  $\mu$ g/ml BSA for 5 min at 37°C following by addition of exonuclease III (50  $\mu$ U, NEB). After 20 min incubation at 37°C, reactions were deproteinized with proteinase K (2  $\mu$ g/ $\mu$ l) for 20 min at 37°C. Formamide was added to a

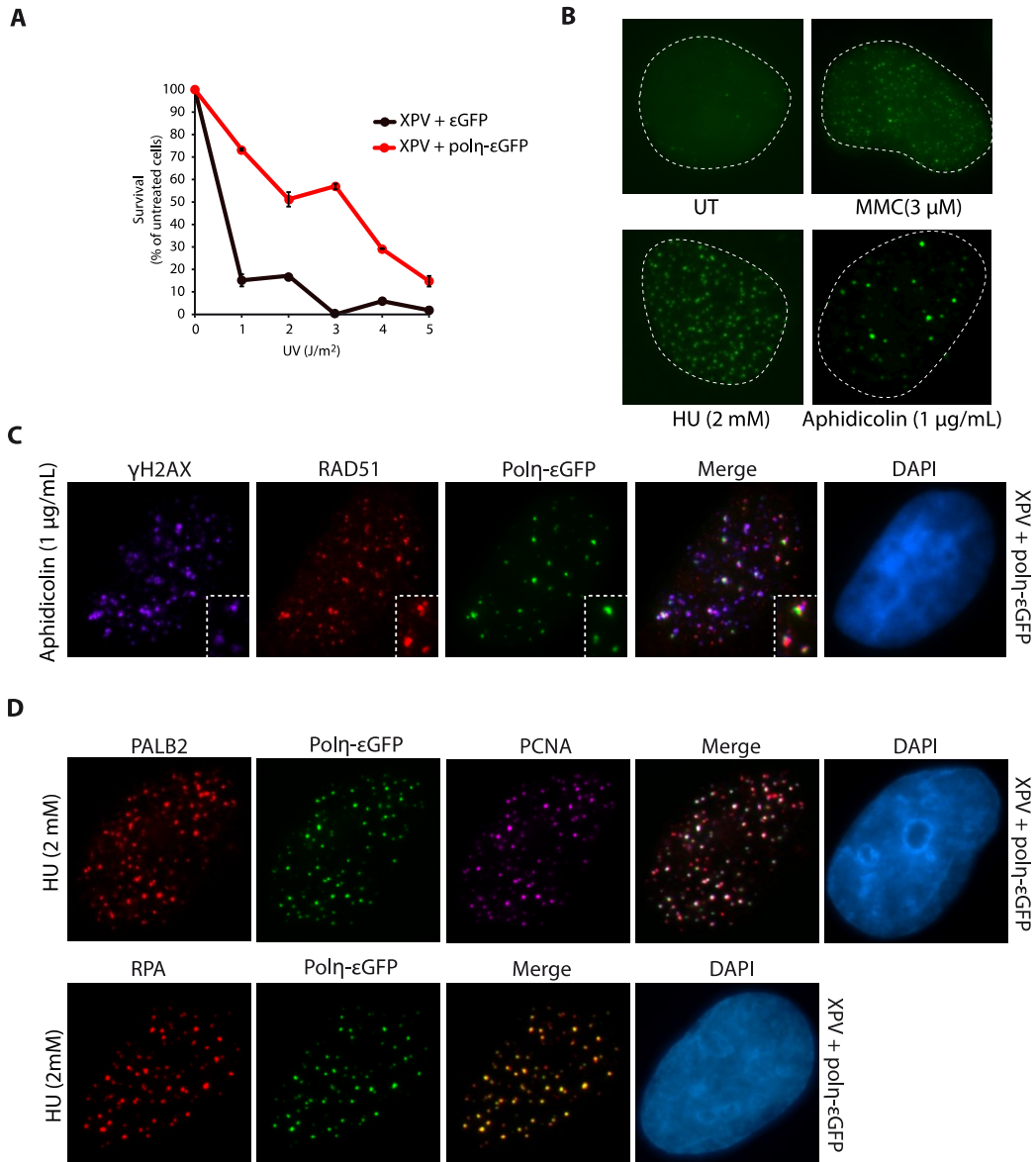
final concentration of 60% (v/v) and the samples loaded on a 8% denaturing acrylamide (7M Urea), 1X TBE gel, runned at 75W, dried and visualized by autoradiography.

**Table I. Oligonucleotides used in this study**

<b>Name</b>	<b>Oligonucleotide(s) used</b>
ssDNA	JYM 925
dsDNA	JYM 925 + 945
D-loop	JYM 1396 + 1395 + 1745
ssDNA for D-loop	JYM 697

<b>N°</b>	<b>DNA sequence</b>
JYM 925	GGGTGAACCTGCAGGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGT
JYM 945	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACATTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC
JYM 1395	GCCAGGGACGGGGTGAACCTGCAGGTGGGCGGCTGCTCATCGTAGGTTAGTATCGACCTATT GGTAGAATTCGG CAGCGTCATGCGACGGC
JYM 1396	GCCGTCGCATGACGCTGCCGAATTCTACCACGCTACTAGGGTGCCTTGCTAGGACATCTTGC CCACCTGCAGGT TCACCCCGTCCCTGGC
JYM 1745	AAGATGTCCTAGCAAGGCACCCTAGTAGC
JYM 697	CTTGTCTTTAAATGGAGACTGTAAGCTTATCGATTTGAACCCGGGGTA

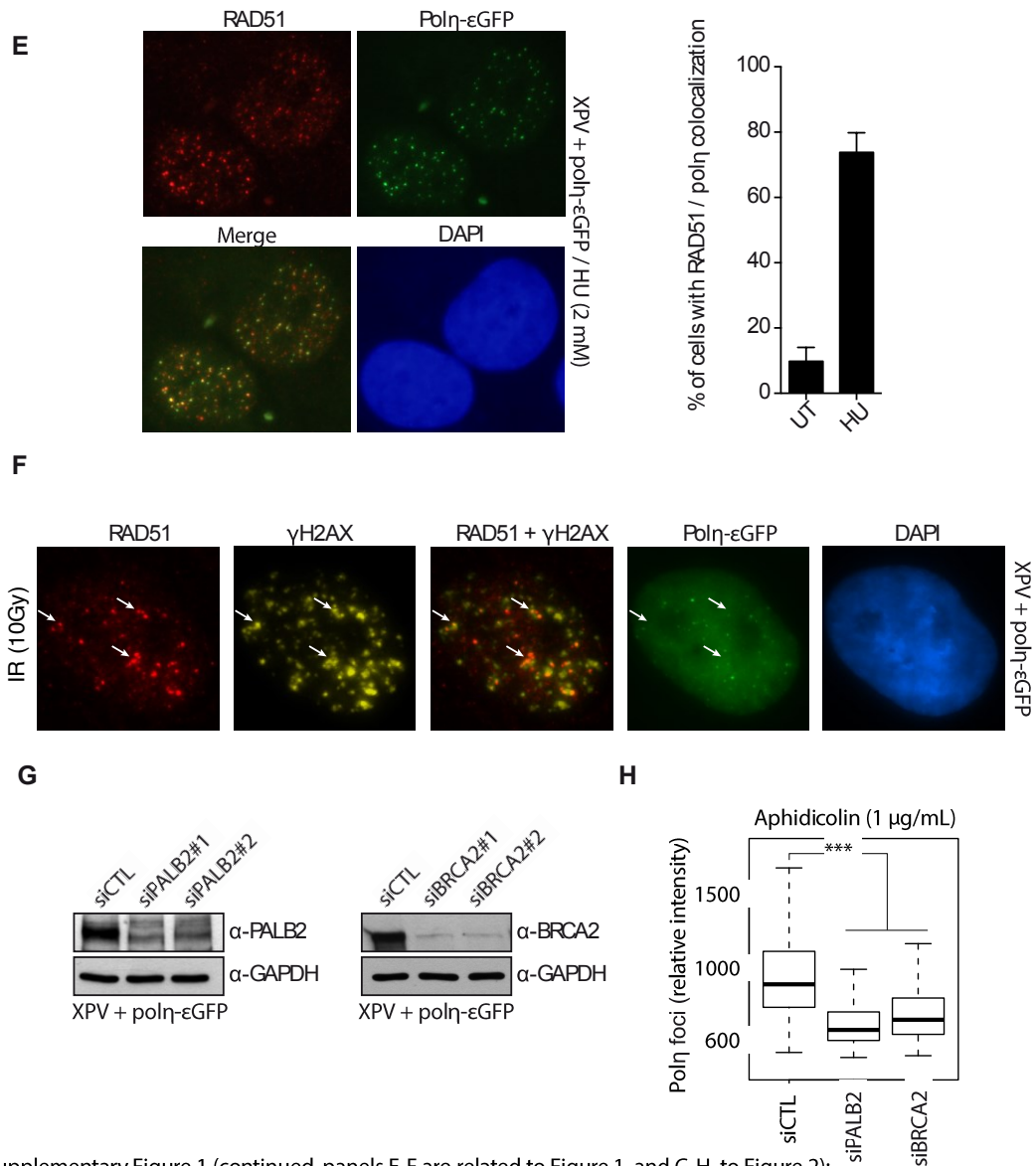
## Supplementary figures



Supplementary Figure 1 (related to Figure 1):

(A) XPV cells complemented with Polη-εGFP are more resistant to UV exposure. MTT assay on XPV cells complemented with εGFP or Polη-εGFP, 50h after UV exposure with the indicated doses. (B) Representative examples of cell with Polη-εGFP foci in the absence (UT: untreated) or treated with the indicated DNA damage drugs. (C-D) Immunofluorescence staining of the indicated DNA repair proteins at DSBs induced by aphidicolin or HU treatment in XPV cells complemented with Polη-εGFP. DNA was counterstained with DAPI.





Supplementary Figure 1 (continued, panels E-F are related to Figure 1, and G-H to Figure 2):

(E) Right: Example of co-localization between RAD51 and Polη. Left: Percentage of cells displaying Polη and RAD51

co-localization after HU treatment. (F) Immunofluorescence staining of the indicated DNA repair proteins at DSBs

induced by Irradiation (IR) in XPV cells complemented with Polη-εGFP. The arrows indicate a co-localization

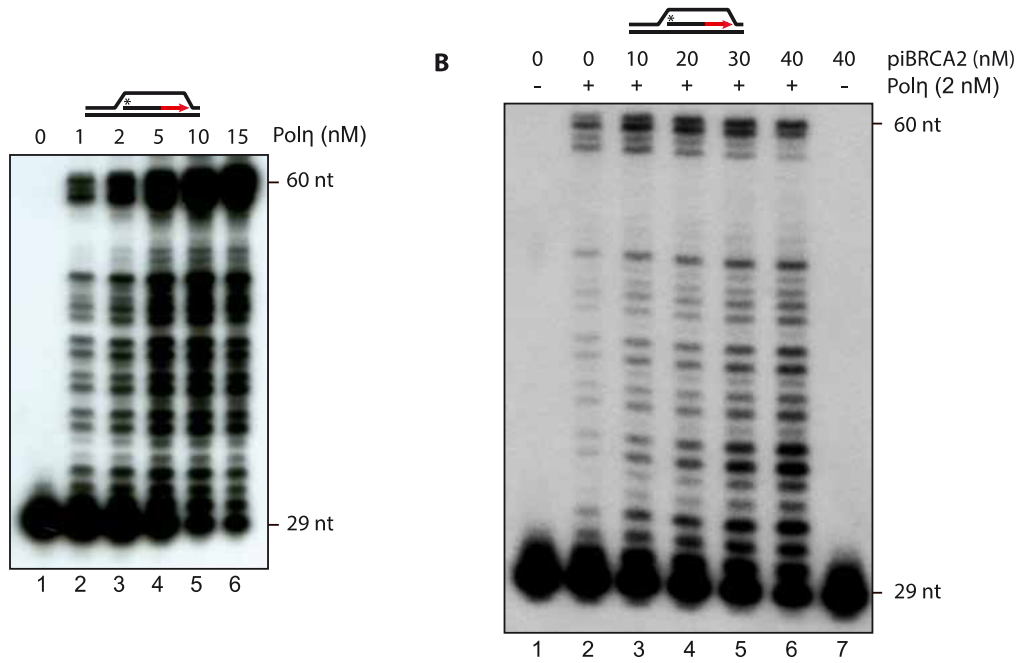
between RAD51 and γH2AX foci. DNA was counterstained with DAPI. (G) Representative knockdowns of PALB2

and BRCA2 using two different siRNAs compared to a control siRNA. Whole cell extracts were blotted with anti-PALB2

or anti-BRCA2 and anti-GAPDH, as a loading control.

(H) Quantification of Polη-εGFP foci intensity induced by an aphidicolin treatment in PALB2 or BRCA2 knockdowns.

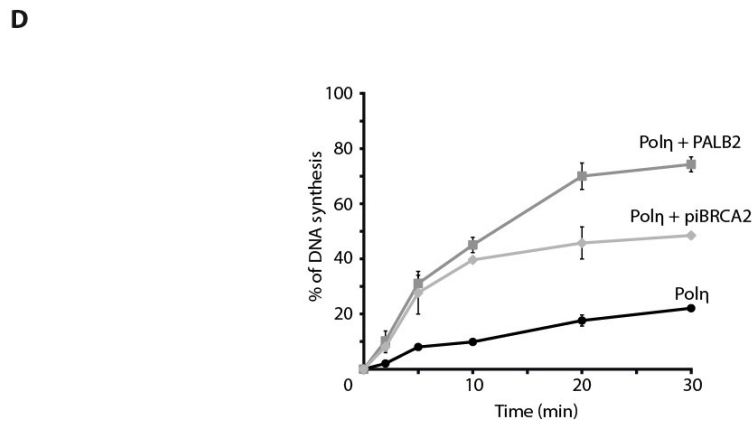
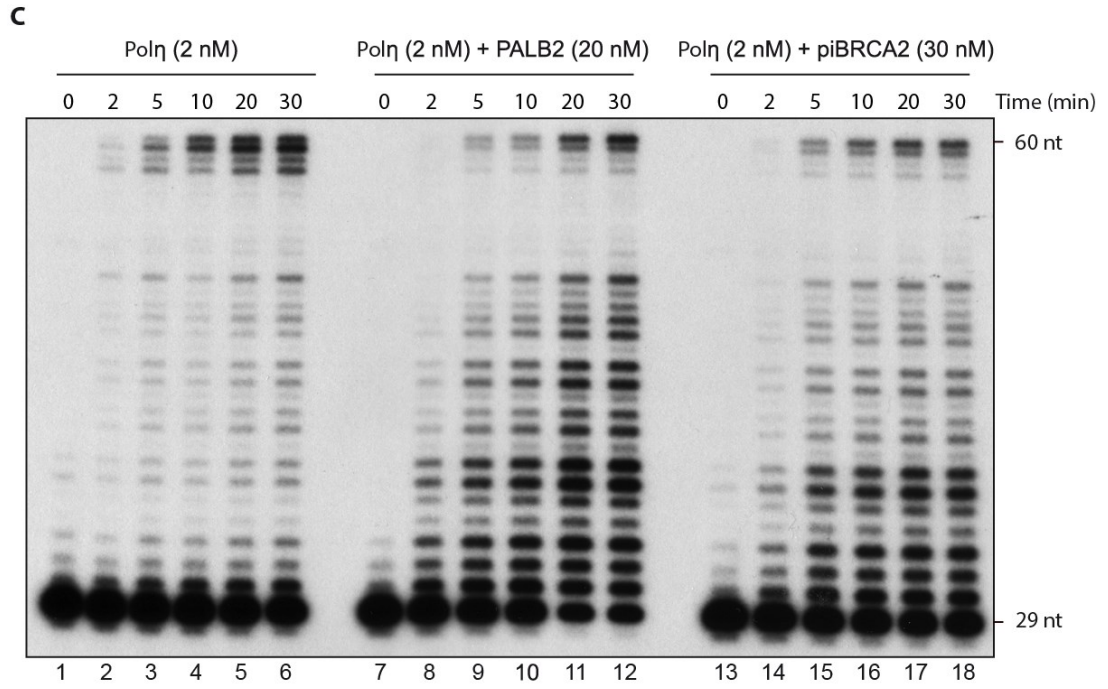
The p-value is inferior to 0.001 (\*\*\*). The median is represented by a black line.



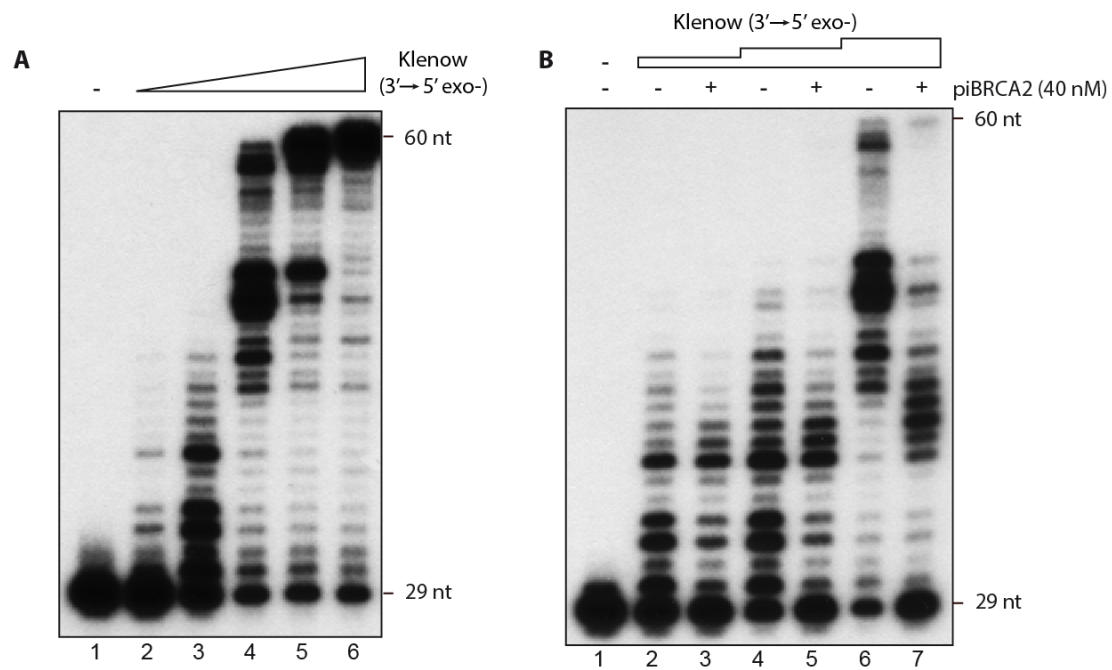
Supplementary Figure 2 (related to Figure 3):

(A) <sup>32</sup>P-labeled D-loop was incubated with increasing concentrations of Polη.

(B) D-loop substrate was incubated with increasing concentrations of piBRCA2 following by addition of Polη. DNA synthesis products were analyzed by denaturing PAGE.



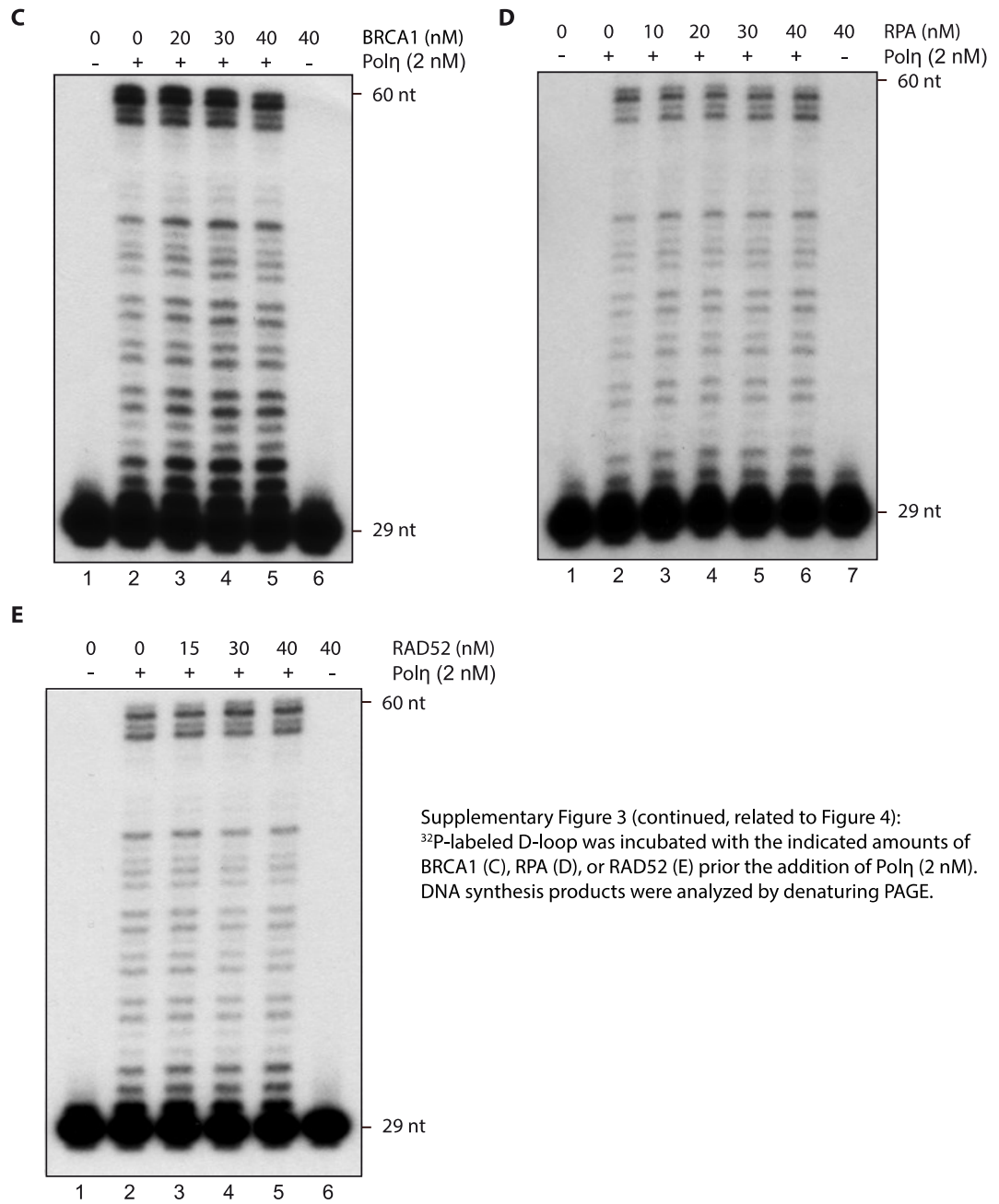
Supplementary Figure 2 (continued, related to Figure 3):  
 (C) Time-course experiment of Polη stimulation by PALB2 or piBRCA2. DNA synthesis products were analyzed by denaturing PAGE.  
 (D) Quantification of the results.

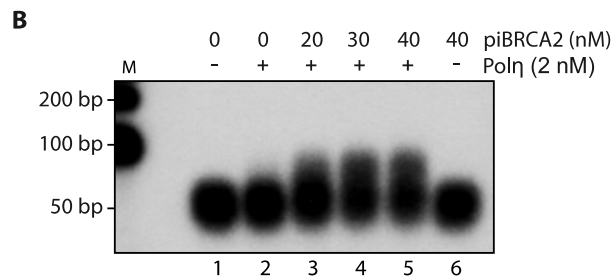
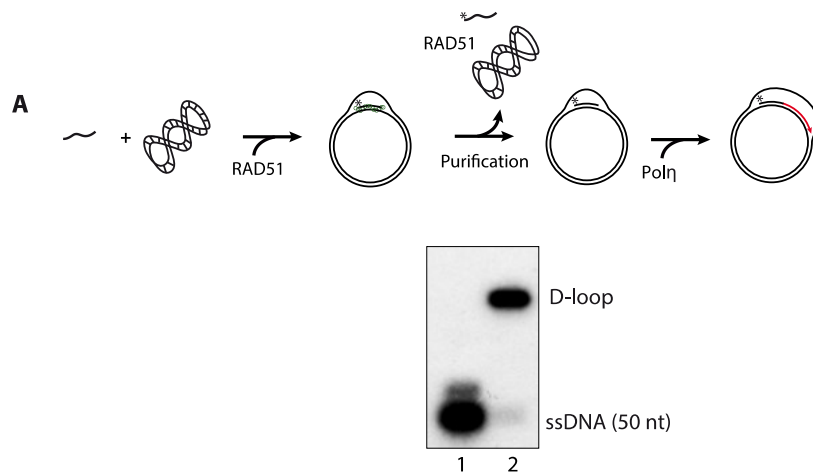


Supplementary Figure 3 (related to Figure 4):

(A)  $^{32}\text{P}$ -labeled D-loop was incubated with increasing amount of Klenow polymerase (0.1, 0.5, 2.5, 5 and 10  $\mu\text{U}$ ).

(B) D-loop substrate was incubated with piBRCA2 (40 nM) followed by the addition of Klenow polymerase (0.25, 0.5 and 2.5  $\mu\text{U}$ ). DNA synthesis products were analyzed by denaturing PAGE.

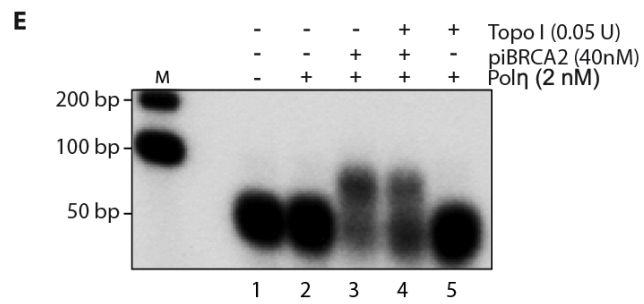
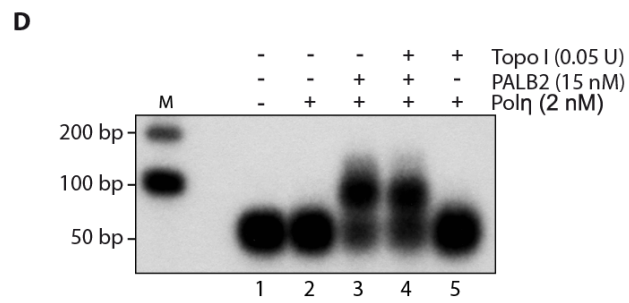
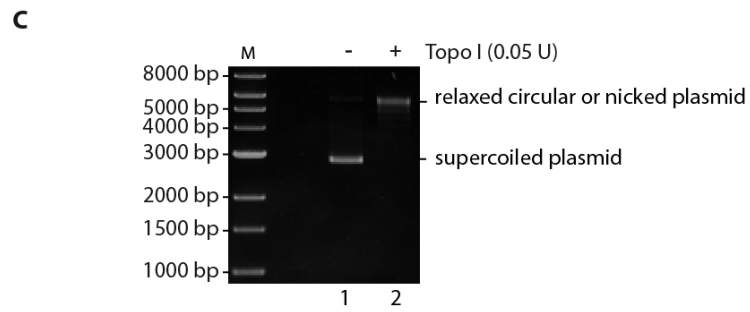




Supplementary Figure 4 (related to Figure 4):

(A) Top: Scheme of D-loop purification and DNA synthesis assay strategy. Bottom: Result of the purification of the D-loop substrate. Lane 1: Radiolabeled oligonucleotide alone. Lane 2: Radiolabeled oligonucleotide incorporated in a supercoiled plasmid by the RAD51 recombinase, deproteinized, and purified to recover the D-loop DNA.

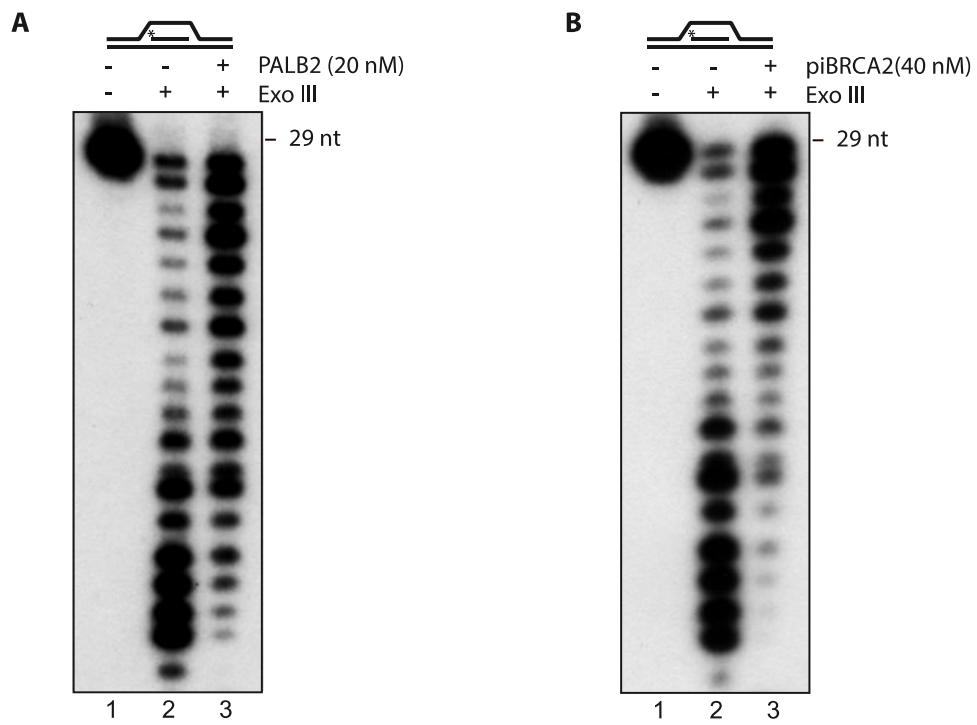
(B) Purified D-loop substrate was incubated with increasing concentrations of piBRCA2 following by an addition of Polη. DNA synthesis products were analyzed by alkaline gel electrophoresis.



Supplementary Figure 4 (continued, related to Figure 4):

(C) Topoisomerase I activity in Polη reaction conditions. Lane 1: supercoiled plasmid. Lane 2: plasmid topology modification in presence of Topo I.

(D-E) Effect of Topoisomerase I activity on Polη mediated extension of D-loop in the presence of PALB2 or piBRCA2.

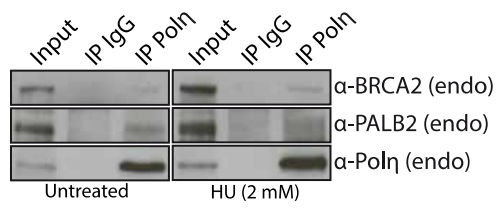


Supplementary Figure 5 (related to Figure 4):

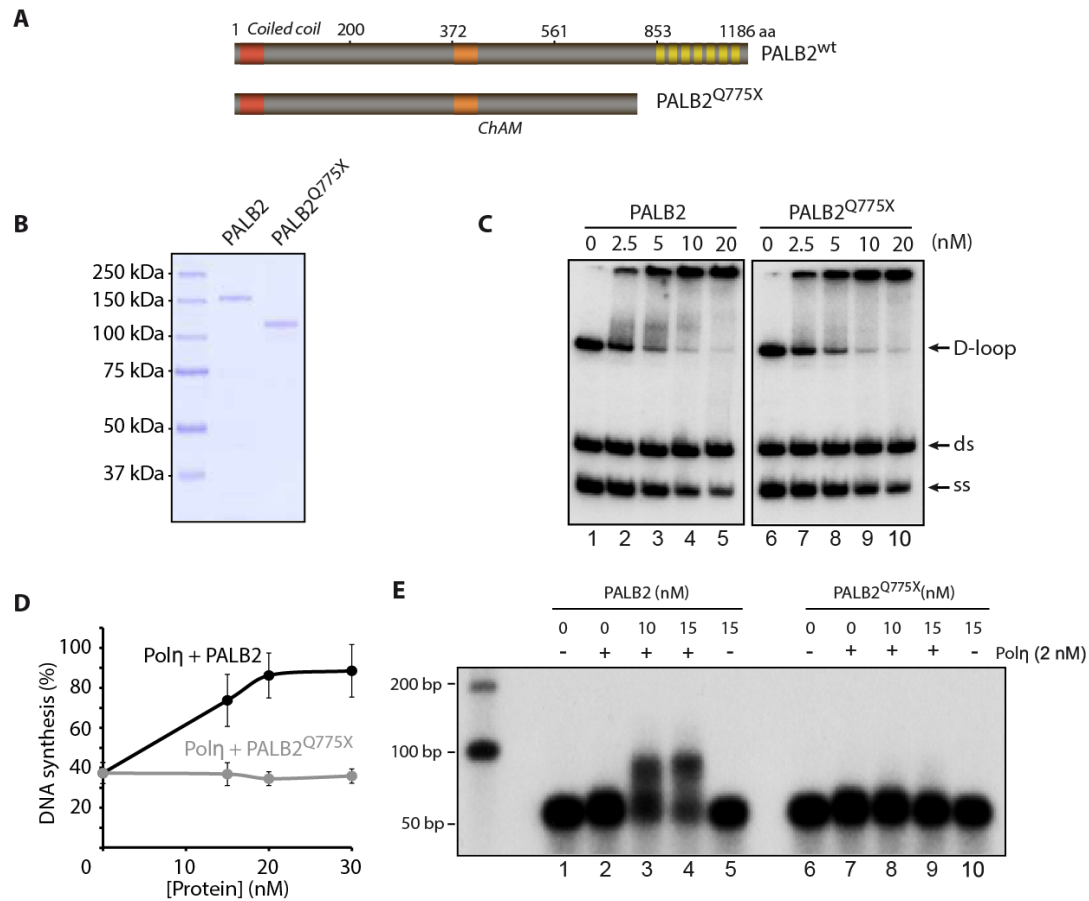
<sup>32</sup>P-labeled D-loop was incubated with (A) PALB2 or (B) piBRCA2 and exonuclease III (Exo III). DNA synthesis products were analyzed by denaturing PAGE.



C



Supplementary Figure 5 (continued, related to Figure 5):  
(C) Cell extracts from untreated or HU-treated U2OS cells (2 mM, 18 hours), were subjected to immunoprecipitation with anti-Polη antibody (Bethyl). Immunoprecipitated proteins were detected by Western Blotting with the indicated antibodies.



Supplementary Figure 6 (related to Figure 6):

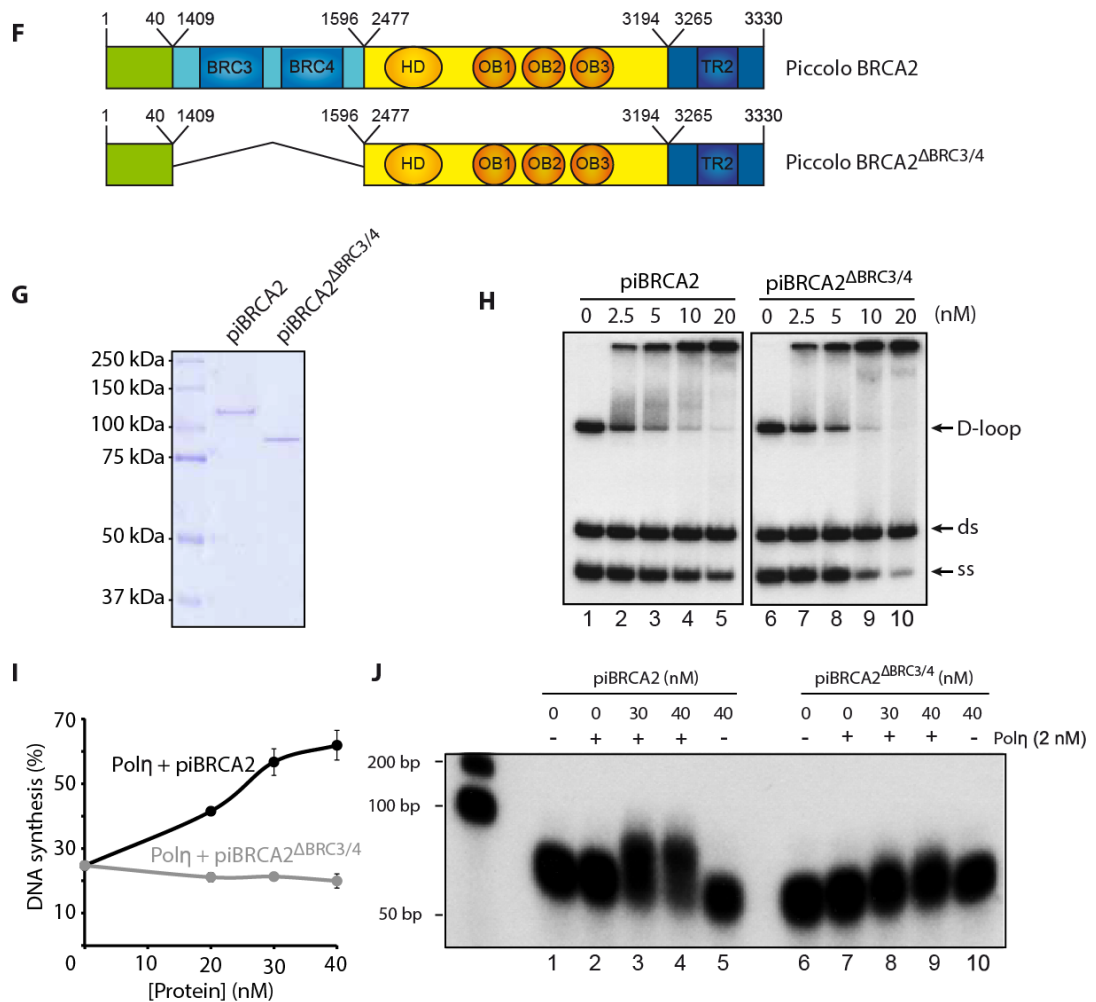
(A) Schematic representation of PALB2 and PALB2<sup>Q775X</sup>.

(B) SDS-PAGE of purified PALB2 and PALB2<sup>Q775X</sup> proteins (250 ng) stained by Coomassie blue.

(C) Purified PALB2 or PALB2<sup>Q775X</sup> bind D-loops preferentially with the same affinity. Competitions electrophoresis mobility shift assays were performed with indicated proteins (2.5- 20 nM) and D-loop, dsDNA (ds), and ssDNA (ss) (25 nM nucleotides of each substrate) and loaded on a 8% acrylamide gel.

(D) Quantification of DNA extension with purified PALB2 or PALB2<sup>Q775X</sup> and Polη shown in Figure 6A.

(E) Purified D-loop substrate was incubated with increasing concentrations of purified PALB2 or PALB2<sup>Q775X</sup> followed by an addition of Polη. DNA synthesis products were analyzed by alkaline gel electrophoresis.



Supplementary Figure 6 (continued, related to Figure 6):

(F) Schematic representation of piBRCA2 and piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup>.

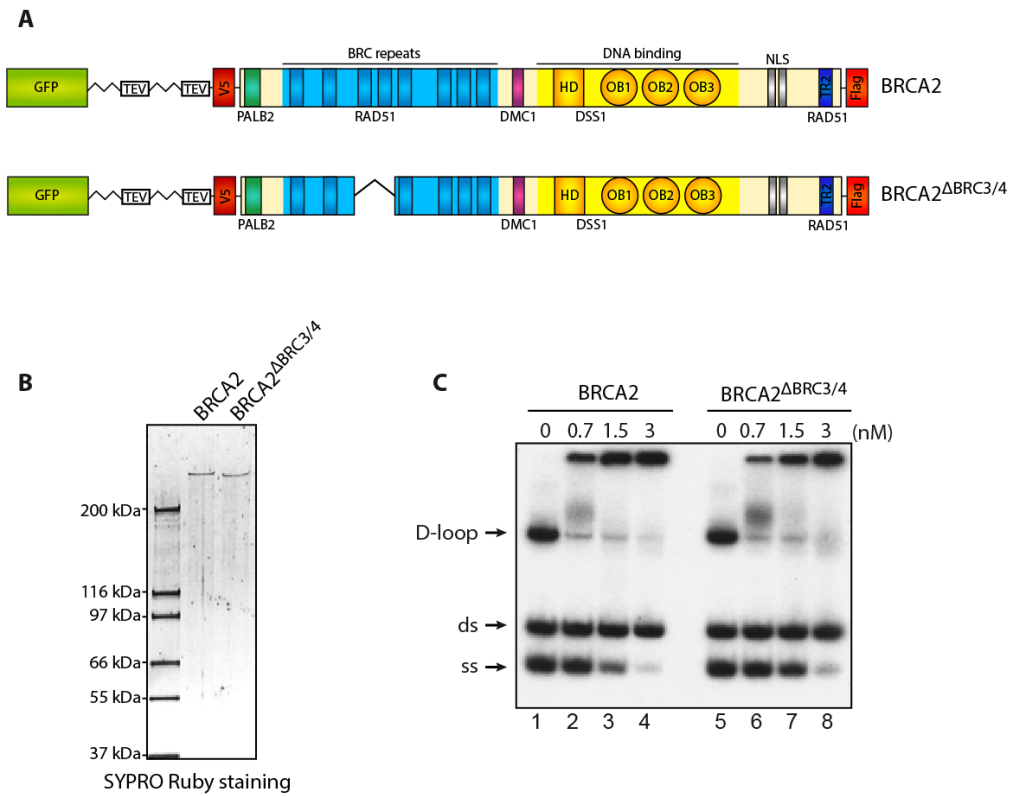
(G) SDS-PAGE of purified piBRCA2 and piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup> proteins (250 ng) stained by Coomassie blue.

(H) Purified piBRCA2 and piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup> bind D-loops preferentially with the same affinity.

Competition electrophoresis mobility shift assays were performed with indicated proteins (2.5-20nM) and D-loop, dsDNA (ds), and ssDNA (ss) (25 nM nucleotides of each substrate) on a 8% acrylamide gel.

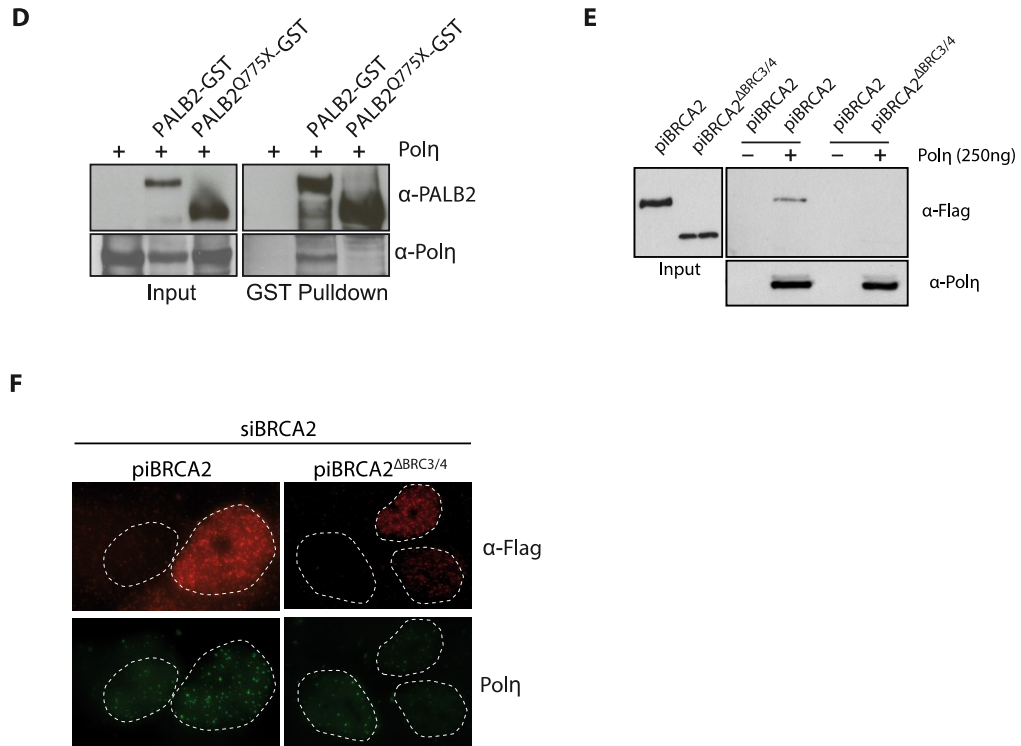
(I) Quantification of DNA extension with purified piBRCA2 and piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup> and Polη, as shown in Figure 6B.

(J) Purified D-loop substrate was incubated with increasing concentrations of purified piBRCA2 or piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup> followed by an addition of Polη. DNA synthesis products were analyzed by alkaline gel electrophoresis.



Supplementary Figure 7 (related to Figure 6):

(A) Schematic representation of BRCA2 and BRCA2 $\Delta$ BRC3/4. (B) SYPRO Ruby staining of purified BRCA2 and BRCA2 $\Delta$ BRC3/4 proteins. (C) Purified BRCA2 and BRCA2 $\Delta$ BRC3/4 bind D-loops preferentially with the same affinity. Competition electrophoresis mobility shift assays were performed with indicated proteins (2.5- 20 nM) and D-loop, dsDNA (ds), and ssDNA (ss) (25 nM nucleotides of each substrate) on a 8% acrylamide gel.



Supplementary Figure 7 (continued, related to Figure 7):

(D) PALB2<sup>Q775X</sup>-GST fail to interact with Polη. Sf9 cells were infected the indicated PALB2 baculoviruses followed by pull-down and western blotting with anti-His or anti- Polη.

(E) piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup> fail to interact with Polη. Purified Flag-piBRCA2 and Flag-piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup> were incubated with Polη followed by immunoprecipitation with Polη. Proteins were detected with anti- Polη or anti-FLAG.

(F) Representative images of Figure 7B. XPV complemented cells knockdown for BRCA2, and complemented with Flag-piBRCA2 wild-type, and Flag-piBRCA2<sup>ΔBRC3/4</sup> were subjected for immunofluorescence against Polη (green) or anti-Flag antibodies to discriminate transfected cells. siRNA BRCA2 resistant constructs were used.

## Supplemental References

Kannouche, P., Broughton, B.C., Volker, M., Hanaoka, F., Mullenders, L.H., and Lehmann, A.R. (2001). Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev* 15, 158-172.

Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J., and Livingston, D.M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* 22, 719-729.



# Chapitre 4





# Chapitre 4. An hidden nuclear export signal revealed by a cancer-causing mutation in PALB2

Joris Pauty<sup>(1,2,3)</sup>, Amélie Rodrigue<sup>(3)</sup>, Yan Coulombe and Jean-Yves Masson<sup>(1,2,3)</sup>

<sup>(1)</sup> Genome Stability Laboratory, CHU de Québec Research Center, HDQ Pavilion, Oncology Axis, 9 McMahon, Québec City, QC G1R 2J6, Canada

<sup>(2)</sup> Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Laval University, Québec City, QC G1V 0A6, Canada

<sup>(3)</sup> To whom correspondence should be addressed.

Corresponding author: Jean-Yves Masson

tel.: +1-418-525-4444 ext 15154

fax.: +1-418-691-5439

e-mail: jean-yves.masson@fmed.ulaval.ca

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Grant Support

JYM is a FRQS chercheur national investigator. This work was supported by the CIHR.

**Keywords:** *PALB2, cancer, genome instability*



## Résumé

Il a été récemment rapporté que des mutations germinales de *PALB2* augmentent le risque de cancer du sein de 8 à 9 fois. Ainsi, *PALB2* peut aujourd'hui être considérée aussi importante que *BRCA2* dans le développement de cancer. Jusqu'à présent, il a été difficile de prédire les conséquences fonctionnelles des mutations de *PALB2* car certaines mutations, qui mènent à des protéines tronquées tardivement dans la séquence protéique, sont associées à des phénotype cancéreux plus agressifs que pour des troncations se produisant tôt dans la séquence. Dans cette étude, nous avons caractérisé les conséquences fonctionnelles des mutation : c.509\_510delGA (p.Arg170Ilefs\*14), c.1592delT (p.Leu531Cysfs\*30), c.2323C>T (p.Gln775\*) et c.3113G>A (p.Trp1038\*). Nous montrons que les deux domaines de liaisons à l'ADN doivent être intacts pour une liaison à l'ADN efficace et qu'un domaine WD40 préservé est essentiel pour une bonne stimulation de l'activité de recombinaison de RAD51. Notre étude révèle aussi un nouveau mécanisme dans lequel la localisation de *PALB2* au noyau de la cellule est contrôlée par le masquage d'un NES dans le domaine WD40. Des mutations dans la région WD40 pourraient mener à un phénotype cancéreux plus agressif dû au fait que la protéine est relocalisée au cytoplasme. Nos résultats lient la translocation nucléocytoplasmique du suppresseur de tumeur *PALB2* à la formation du cancer.



## Avant-Propos

Au début de mon doctorat, le laboratoire du Dr Jean-Yves Masson venait de démontrer que PALB2 est un médiateur de la RH et qu'une déficience de PALB2 sensibilise les cellules à un traitement ciblé utilisant les PARPi. Bien que les mutations de *PALB2* étaient déjà associées à une susceptibilité accrue aux cancers du sein et de l'ovaire, peu de choses étaient connues sur leurs effets sur les fonctions de la protéine. Ces fonctions étant mieux caractérisées *in vitro* et *in vivo*, il devenait possible d'étudier l'impact des mutations à différentes échelles, notamment biochimique et cellulaire. Lors du début de mon doctorat, la purification de la protéine PALB2, ainsi que du mutant PALB2 Q775X, avait été optimisée par Anne-Marie Côté-Dion et Rémi Buisson. Avec l'aide de Ranjan Maity, j'ai tout de même dû poursuivre l'optimisation notamment pour obtenir des protéines plus stables en quantité plus importante. Le protocole à partir duquel j'ai réalisé mes optimisations, a donné lieu à une publication, à laquelle j'ai participé, dans la revue *JoVE* (l'hyperlien vers cet article est disponible en annexe 3). Une fois les protéines PALB2 purifiées, j'ai utilisé différents essais biochimiques établis dans le laboratoire pour caractériser les différences fonctionnelles entre les formes mutantes et la protéine de type sauvage. En parallèle, j'ai analysé *in situ* les caractéristiques des formes mutantes et j'ai été assisté pour ce faire, par Amélie Rodrigue et Yan Coulombe. La découverte de la relocalisation d'un des mutants m'a amené à mettre en place les techniques pour identifier et valider le NES.

Le manuscrit présentant les résultats de ces travaux est en préparation et est présenté dans ce chapitre. Il fera l'objet d'une soumission à la revue scientifique *Cancer Discovery* (en tant que "Research Brief"). J'ai pris part à sa rédaction ainsi que réalisé le montage des figures.



## Abstract

It has recently been reported that mutations in PALB2 increase the risk of breast cancer by 8-9 fold [1]. Thus, PALB2 can now be seen as important as BRCA2 in the development of cancer. To date, it has been difficult to predict the functional consequences of PALB2 mutations as some truncating mutations encoding a longer PALB2 protein, lead to a more aggressive phenotype. Here, we have characterized the functional consequence of PALB2 mutations: c.509\_510delGA (p.Arg170Ilefs\*14) [2], c.1592delT (p.Leu531Cysfs\*30) [3], c.2323C>T (p.Gln775\*) [4] and c.3113G>A (p.Trp1038\*) [5], called, to simplify the reading : R170fs, L531fs, Q775X and W1038X, respectively. We show that both intact PALB2 DNA binding domains are required for efficient DNA binding and that a preserved WD40 is essential for an efficient stimulation of RAD51-recombinase activity. Our studies also reveal an unreported mechanism wherein the localization of PALB2 to the cell nucleus is governed by the masking of NES within its WD40 domain. Mutation in PALB2 in the WD40 region may lead to a more aggressive phenotype as the protein produced is confined in the cytoplasm. Our results link the nucleocytoplasmic translocation of the PALB2 tumor suppressor to cancer formation.





## 4.1. Introduction

Breast and ovarian cancers are amongst the most common and lethal malignancies in women worldwide. Mutations of the *BRCA1* (Breast Cancer 1, early onset) or *BRCA2* (Breast Cancer 2, early onset) genes have been associated with an increased risk of breast cancer and ovarian cancer - ranging from 55 to 85% and 10 to 45%, respectively. However, mutations in those two genes might account for only 5-10% of the hereditary breast cancer and 15% of hereditary ovarian cancer [6, 7]. Although these genes play a major role in breast and ovarian cancer susceptibility, all inherited cases cannot be explained only by their mutation [8]. *BRCA1* and *BRCA2* genes are involved in a common pathway of DNA repair: homologous recombination, an error-free mechanism that relies on the recombinase activity of the RAD51 protein and leads to the repair of double-strand breaks during the S and G2 phases of the cell cycle. Recent studies have linked several other genes involved in this pathway, such as *PALB2* (Partner and Localizer of BRCA2), to breast or ovarian cancer development [9].

*PALB2* codes for a protein essential for BRCA2 intranuclear localization and function in DNA repair [10], as well as being the link between BRCA2 and BRCA1 [11]. As *PALB2* interacts directly with RAD51 and helps it to overcome RPA inhibition, *PALB2* has been known to be a RAD51 mediator [12, 13]. *PALB2* is a nuclear protein of 1186 amino acids with a molecular weight of 130 kDa. Several functional domains of *PALB2* have been mapped and characterized (**Suppl. Fig. 1A**). The N-terminus harbours a coiled-coil domain that allows: (i) physical interaction with BRCA1 [11]; (ii) the dimerization of wild-type *PALB2* [14, 15]; (iii) interaction with RAD51 [12, 13]. The *PALB2* amino-acid sequence ends with a WD40 repeated-containing domain, a  $\beta$ -propeller [16] known to be a second RAD51-interacting domain [12] as well as a BRCA2 interacting domain [16]. *PALB2* has also been shown to interact with several other partners involved in DNA repair: RAD51C, XRCC3 [17], Pol  $\eta$  [18], the chromodomain protein MRG15 [19], and oxidative stress sensing protein KEAP1 [20]. Furthermore, two DNA binding domains have also been identified [12], one close to the coiled-coil domain and a second in the middle region of *PALB2* [12]. A small domain involved in chromatin anchorage has been located in front of the second DNA binding domain [21]. Several cancer-causing mutations have been identified in *PALB2* gene, that predispose to breast [22] and pancreatic cancer [23], as well as being implicated in the development of ovarian cancer. Some of these mutations have been predicted to lead to the expression of truncated proteins [24].

In this study, we propose a novel and original approach to characterize *PALB2* biochemical and cellular functions by using truncating *PALB2* mutations found in breast or ovarian cancer patients. We selected four mutations according to the position of the truncation (**Suppl. Fig. 1A**), in order to study the effects of truncations all along the protein: c.509\_510delGA (p.Arg170Ilefs\*14) [2], c.1592delT (p.Leu531Cysfs\*30) [3], c.2323C>T (p.Gln775\*) [4] and c.3113G>A (p.Trp1038\*) [5]. We have purified these *PALB2* mutants and compared their biochemical properties to the full-length protein. We show that both intact DNA binding domains are required for efficient DNA binding and that a preserved WD40 is essential for optimal stimulation of RAD51-recombinase activity. Inserting these mutations into the cDNA of *PALB2* in a mammalian cell expression vector led to the expression of truncated forms of *PALB2*. We show that the shortest mutant fails to localize at DNA damage sites, while the longest mutant, thus the closest to the wild-type protein, presents a localization defect. This finding allowed us to map a Nuclear Export Sequence, hidden in the wild-type protein but exposed as soon as a

truncation occurs into the WD40 domain. Our results explain why a truncation in PALB2 could have a more severe effect than a loss of function.

## 4.2. Results

### 4.2.1. PALB2 DNA binding is required to stimulate RAD51 activity

Cancer-associated mutations in human BRCA2 occur throughout its sequence while some mutations lead to strong differences in cancer aggressivity. Here, we proposed a systematic approach to characterize PALB2 biochemical functions using PALB2 mutants designed on truncating mutations found in breast or ovarian cancer patients. We selected four mutations allowing us to study the effects of truncations all along the protein (**Suppl. Fig. 1A**): c.509\_510delGA (p.Arg170Ilefs\*14) [2], c.1592delT (p.Leu531Cysfs\*30) [3], c.2323C>T (p.Gln775\*) [4] and c.3113G>A (p.Trp1038\*) [5], named, to simplify the reading : R170fs, L531fs, Q775X and W1038X, respectively. We previously reported that PALB2 contains two distinct DNA binding domains (DBD) (**Suppl. Fig. 1A**) allowing PALB2 to bind several DNA substrates such as single-stranded (ss), double-stranded (ds), Holliday junction (HJ), replication fork (splayed-arms, SA) and preferentially to Displacement loop (D-loop) DNAs. Moreover, PALB2 stimulates RAD51-mediated D-loop formation [12, 13]. To investigate the biochemical properties of PALB2 R170fs, L531fs, Q775X and W1038X, we first purified the proteins to homogeneity (**Suppl. Fig. 1B**). Our hypothesis was that Q775X and W1038X, which both contain intact DBD, and L531fs, which bears a frame-shift close to the end of the second DBD, should all bind DNA substrates in a similar way to PALB2. R170fs is a truncated form of PALB2 that harbours a frame-shift altering the end of the first DBD; we were thus expecting that it would be impaired in DNA binding. Consistent with our predictions, Q775X, W1038X as well as L531fs were able to bind the same DNA substrates as wild-type PALB2 (wt) with some differences, however. L531fs and W1038X bound less SA than PALB2 wt or Q775X (15-20% of binding vs. 40-50% for 6nM of protein, **Suppl. Fig. 2**); these three mutants also bound less D-loop (50 to 85% vs. 90% for 12nM of protein). Finally, L531fs bound less HJ at low concentration of protein (20 vs. 50-60% for 6nM of protein). In these experimental conditions, R170fs weakly bound DNA substrates and only for the highest concentration used, suggesting that the loss of the second DBD affected the affinity for DNA (**Suppl. Fig. 2**). It is known that PALB2 has a preference for D-loop substrates when gel mobility shifts assays are performed using a mixture of DNA substrates. In competition experiments, all proteins bound preferentially the D-loop substrate, except of PALB2 R170fs, which did not bind DNA in these conditions (**Suppl. Fig. 3**). These results indicate that the second DBD is critical for PALB2 DNA binding properties and suggest that any truncations occurring in the second DBD might have an effect on PALB2 DNA binding properties.

PALB2 stimulates RAD51-mediated strand invasion of a single-stranded DNA into a supercoiled plasmid to form a D-loop structure [12, 13]. We used this assay to assess whether PALB2 mutants were able to stimulate RAD51. Based on the structure of PALB2 (**Suppl. Fig. 1A**), all mutants still contain at least one RAD51 binding domain. In the conditions tested, at 12nM, PALB2 stimulated RAD51 activity by approximately 7-fold (**Suppl. Fig. 4**). As expected, L531fs, Q775X and W1038X were still able to stimulate D-loop formation but with less efficiency. Surprisingly, R170fs failed to stimulate RAD51 although it still contains the first RAD51 interaction domain. This result, suggests that the stimulation of RAD51 by PALB2 requires efficient DNA binding ability.

#### 4.2.2. Mutation leading to a truncation in the WD40-domain induces a cellular mislocalization

The fact that PALB2 W1038X was still proficient in D-loop formation, but yet, create a very aggressive phenotype, led us to investigate other mechanisms explaining this observation. PALB2 has been shown to interact with BRCA1 to help relocating BRCA2 to DNA damage sites [11]. To assess if the PALB2 mutants were able to localize at DNA damage sites, we performed IF on cells pretreated or not with neocarzinostatin, a radiomimetic DNA damaging agent. Spontaneous or induced DNA damage was visualized using the phosphorylation of the histone variant H2AX on Ser139 ( $\gamma$ H2AX), a widely used DNA double-strand breaks (DSB) marker. PALB2, as well as L531fs, Q775X and W1038X mutants, were able to form foci in the nucleus (**Suppl. Fig. 5**). These foci co-localized with  $\gamma$ H2AX suggesting the localization of PALB2 proteins at DSBs. On the contrary, R170fs presented a diffuse signal in the nucleus and failed to form foci even in the presence of neocarzinostatin. This is consistent with the loss of DNA binding ability but also R170fs do not bear a Chromatin-Associated Motif (ChAM) [21]. Interestingly, we observed that W1038X was able to form nuclear foci, but this was in a minority of cells. In fact, later analysis revealed that most of the cells displayed majoritary a cytoplasmic distribution of W1038X, even following treatment with neocarzinostatin (**Suppl. Fig. 6A**).

PALB2 is known to anchor BRCA2 to nuclear structures, however, how it is entering the nucleus is poorly understood. We investigated the cellular localization by over-expressing a Flag-tagged version of each mutant in HEK293T cells followed by immunofluorescence analysis. R170fs, L531fs and Q775X were found mainly localized in nucleus as the wild-type protein. However, W1038X was as well detected in the cytoplasm (**Fig. 1**). Indeed, 4 cases were observed: (i) PALB2-Flag was detected in nucleus, (ii) PALB2-Flag signal was stronger in nucleus but also detected in cytoplasm, (iii) PALB2-Flag signal was stronger in the cytoplasm but also detected in nucleus, and (iv) PALB2-Flag was cytoplasmic (**Suppl. Fig. 6B**). The proportion of cells showing a strong Flag signal in the cytoplasm was greater for the W1038X protein (**Fig. 1B**). To confirm the cytoplasmic localization of W1038X, fractionation analysis was performed using HEK293T cells stably expressing a shRNA targeting PALB2 (**Fig. 1C**). All mutant proteins were detected at chromatin but mainly W1038X was found in cytosolic fraction (**Fig. 1D**), thus confirming our immunofluorescence results.

#### 4.2.3. The Q988X cancer-causing mutation also cause cytoplasmic accumulation

We hypothesized that the mislocalization encountered for W1038X, could apply also for any truncations occurring in the WD40-repeat domain. PALB2 Q988X (c.2962C>T, p.Gln988\*) is a mutation found in breast cancer and Fanconi Anemia patients [25, 26]. PALB2 Q988X displayed the same mislocalization pattern observed for W1038X (**Fig. 2A**). We further confirmed by performing immunofluorescence on several arbitrary truncations in the WD40 of PALB2 (**Fig. 2B**). Interestingly, when the WD40 domain was completely deleted (truncation at amino acid 852), the protein was located, in the major proportion, back to the nucleus as for the wild-type protein. This last observation suggested that a sequence in the WD40 caused the mislocalization of WD40-truncated forms of PALB2 and was located between amino acids 852 and 987.

#### 4.2.4. PALB2 WD40 masks a nuclear export sequence

Cytoplasmic accumulation can be governed by nuclear export signals (NES). Because WD40-deleted protein was nuclear and that longer truncations than W1038X failed to recover the localization of truncated proteins to the nucleus (**Fig. 2B**), the hypothesis of a nuclear localization signal (NLS) located in C-terminal part of PALB2 was excluded. Hence, we searched for the existence of a NES within the WD40 domain using NetNES 1.1 Server and ValidNESs (**Suppl. Fig. 7**). Analysis of common predictions led us to identify a putative NES located in the WD40 domain, between the amino acids 932 and 941. In order to test whether the sequence 928-VYNLVCV~~ALGNLE~~IREIR-945 can act as a NES, it was fused to eGFP and cellular localization of the fused protein was monitored by IF. While eGFP alone harboured often a stronger signal in the nucleus, eGFP- putative PALB2 NES fusion was found in the cytoplasm validating that this sequence works as a NES (**Fig. 3A - left panel**). To assess if it could be an Exportin1/CRM1-mediated NES, analysis of the eGFP-fusion protein localization was also performed in presence of leptomycin B, a CRM1-specific inhibitor. It revealed that following CRM1 inhibition, eGFP-PALB2 NES fusion became nuclear. This infers that nuclear exclusion of PALB2 Q988X and W1038X is a CRM1-dependent pathway (**Fig. 3A - right panel**). This was further confirmed by co-immunoprecipitation. CRM1 interacted with eGFP-PALB2 NES and eGFP-BRCA2 NES (as a positive control), while control experiments with eGFP failed to do so (**Fig. 3B**).

### 4.3. Discussion

The nuclear export driven by CRM1 interactions is a known regulation mechanism of DNA damage response proteins. It has been notably described for p53 [27], BRCA1 [28, 29], and more recently for RAD51 and BRCA2 [30]. Aberrant cellular localization of proteins is a common feature of cancerous cells to inactivate the functions of tumor suppressor proteins. High levels of CRM1 have been detected in various cancers and leads relocalization to cytoplasm of nuclear proteins such as p53, BRCA1 and ATM [31]. Germline or sporadic mutations are another way that cancer cells use to impair nuclear export regulation. Truncation of the tumor suppressor APC (Adenomatous Polyposis Coli) is an early step in colorectal cancer progression. APC harbours five NES, most of them lost by truncations, however, the N-terminus NES remains and holds the strongest signal. It was previously shown that the level of cytoplasmic APC increases in colon polyps in accordance with the transition to a malignant phenotype [32]. In the case of BRCA2, it has been reported that a breast-cancer-associated germline mutation, BRCA2 D2723H (c.Asp2723His), impairs the cellular localization of BRCA2 through disruption of its interaction with DSS1. Furthermore, DSS1 hides a NES sequence, located between position 2686 and 2696. Loss of DSS1 interaction leads to unmasking of this NES and the export of BRCA2 from nucleus through CRM1 interaction. The authors also reported that RAD51 harbors a NES sequence in its interacting domain with BRCA2 that can be hidden by BRCA2-RAD51 interaction. They proposed that both, BRCA2 and RAD51 NESs, can be hidden by a complex formation with DSS1, allowing the nuclear maintenance of BRCA2 and RAD51. Because misfolding of the interacting domains would lead to a defect in complex formation and the unmasking of NESs, this nuclear export regulation could act as a quality control of functional BRCA2-

DSS1-RAD51 complex [30]. Interestingly, no clinical features associated with profound defects in DNA repair were reported for patients heterozygous for BRCA2 D2723H; however, those patients were at risk of developing early onset cancers. This suggests that cancer susceptibility can be explained by a cumulative effect on genome stability. In addition, mutant forms of BRCA2 lacking the DBD, including the NES, are still nuclear and were partially functional as they supported HR. The authors of the study surmised that the maintenance of a partially functional truncated BRCA2 in nucleus could induce subtle defects in HR that explain the cumulative effect [30].

In our study, we report that cancer-associated truncating mutations, which occur within the WD40 domain of PALB2, induce a mislocalization of the resulting protein. Although the mutant protein W1038X showed mislocalization, it was able to stimulate RAD51-mediated D-loop formation *in vitro*, suggesting that W1038X retained some functionality. We identified a NES sequence at the beginning of the WD40 domain that can interact with CRM1. We suggest that truncations of the WD40 domain lead to misfolding of this domain, resulting in the unmasking of the NES (**Fig. 4**). From another hand, the mutant forms of PALB2 that are completely deleted for their WD40 domain, although they localize into nucleus, are less functional especially when their DNA binding domains are impaired. However, proteins truncated in their WD40-domain could remain partially functional, and induce slight changes in HR. Cumulative effect would explain the cancer susceptibility associated to those mutants. W1038X confers a risk of breast cancer of 50% by age of 50 years [5], while cumulative risk of all mutations in PALB2 has been recently estimated to confer a risk of 14% by the same age [1]. Although the protein W1038X is only a minor product of the splicing-variant-causing mutation c.3113G>T, we suggest that the cumulative risk of mutant forms of PALB2 truncated in their WD40 domain could be similar due to the similitude observed in the mislocalization phenotype. We did not rule out the hypothesis that PALB2 NES is unmasked due to a loss of interaction with a partner. Following that hypothesis, two models can be drawn from our results: (i) the loss of interaction is due to a misfolded WD40 domain; (ii) the interacting protein hiding the NES binds between amino acid 1162 and 1186 of PALB2. This second assumption is based on the mislocalization phenotype observed even with a protein truncated in position 1162, suggesting that the partner was still unable to bind. Structural data explains how a protein that binds at the end of the WD40 domain can hide a sequence located at its start, since both extremities are physically close in the  $\beta$ -propeller [33]. Partners already known to interact with PALB2 through its WD40 domain include: BRCA2, Pol  $\eta$ , RAD51, RAD51C and XRCC2 [12, 13, 17, 18, 33].

In conclusion, we reveal a novel mode of regulation of PALB2 function through its nuclear localization control, mediated by its interaction with CRM1. Further research include to verify if PALB2 NES is masked by a protein-protein interaction and to identify this partner. Interestingly, NES predictions in PALB2 also revealed two other putative NES around positions 609 and 677 (**Suppl. Fig. 7**) that could be interesting to investigate. Remarkably, targeting PALB2 nuclear export might open the door to a new therapeutic strategy for sensitizing tumor cells to DNA damaging agents.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Dr. Isabelle Brodeur for critical reading the manuscript.

## Materials and Methods

### **Western Blotting:**

The antibodies used for immunodetection by western blot were: PALB2 Antibody Rabbit pAb (A301-246A, Bethyl), Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse (F3165, Sigma), GAPDH Antibody Mouse mAb (10R-G109a, Fitzgerald), Anti-Histone H3 antibody - Nuclear Loading Control and ChIP Grade (ab1791, Abcam), CRM1 Purified Mouse Anti-Human Exportin-1 (611832, BD Biosciences), Anti-GFP Mouse (11814460001, Roche).

### **Immunofluorescence studies:**

Localization of PALB2 mutants were visualized by performing immunofluorescence against the Flag-tag: Cells were fixed by 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS1X for 15 minutes at room temperature, washed with TBS1X, and fixed a second time with cold methanol for 5 minutes at -20°C; permeabilization was then performed by incubating the cells for 5min with PBS 0.2% Triton X-100 at room temperature; after three 5min-washes with TBS1X, cells were quenched using 0.1% (w/v) Sodium Borohydride in PBS (5min incubation); cells were washed once with TBS1X before performing the blocking step by incubating them for 45min with blocking buffer (PBS, 10% (v/v) goat serum, 1% (w/v) BSA) ; cells were then incubated at room temperature for 2h with the primary antibody (Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse, F3165, Sigma) diluted 1:500 in blocking buffer ; after three 5min-washes with TBS1X, coverslips were incubated at room temperature for 45min, in dark, with the secondary antibody conjugated to a fluorophore (Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, A11004, Life Technologies) diluted 1:800 in TBS1X 1% (w/v) BSA; coverslips were washed three times 5min with TBS1X and mounted onto slides using ProLong® Gold Antifade Mountant (P36931, Life Technologies) ; result was visualized using an epifluorescence microscope.

### **Establishment of PALB2-depleted and control cell lines:**

Lentiviruses carrying shRNA constructs were used in order to create cell lines stably expressing shRNA scramble or targeting PALB2 mRNA. To produce the lentiviruses, 30-40%-confluent 10 cm culture dishes of HEK293T were transfected with 5µg of pMD2G, 15µg of psPAX2 and 20µg of pLKO.1 carrying shRNA targeting PALB2 mRNA (targeted sequence: 5'-GATGCACATTGATGATTCTTA-3') or control (Sigma), using calcium-phosphate method; chloroquine was however not used and Ca-PO<sub>4</sub>/DNA precipitates were incubated onto cells overnight instead. 24 hours later, media were harvested and filtered onto a 0.22µM filter. To establish the stable cell lines, 1.5mL of lentivirus were added onto 30-40%-confluent 10 cm culture dishes of HEK293T for a total media volume of 3mL; 10ng/mL of polybrene were added to the media and cells were incubated overnight at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Media was then replaced by 10mL of fresh media containing 1µg/mL puromycin. Once the selection completed, cells were harvested and the knockdown efficiency was estimated through western-blot analysis.

**Fractionation:**

For each conditions, 3 millions of HEK293T cells stably expressing shRNA targeting PALB2, were resuspended in 200 $\mu$ L of Buffer A (10mM HEPES pH7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.34M Sucrose, 10% Glycerol, 0.1% Triton X-100, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1/1000 Leupeptin, 5mM NAF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1/500 Aprotinine, complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) and incubated on ice for 5 min. Following, centrifugation (1300g at 4°C for 4min) to separate nucleus (pellet) from cytoplasmic (supernatants) fractions; the latter were centrifuged one more time at maximum speed for 15min at 4° and 160 $\mu$ L of the supernatants, corresponding to cytosolic extracts, were added to 40 $\mu$ L of Laemmli 5X. Nuclear fractions were washed twice with 900 $\mu$ L of buffer A, three times with 500 $\mu$ L of buffer A and resuspended in 200 $\mu$ L of buffer B (3mM EDTA, 0.2mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1/1000 Leupeptin, 5mM NAF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1/500 Aprotinin). After a 30-minutes incubation on ice, centrifugation (1700 g, 4 minutes at 4°C) was used to separate chromatin (pellet) from nuclear soluble fraction (supernatant); 160 $\mu$ L of nuclear soluble fractions were added to 40 $\mu$ L of Laemmli 5X. Chromatin fractions were washed four times with 500 $\mu$ L of Buffer B and resuspended in 160 $\mu$ L of the same buffer prior to addition of 40 $\mu$ L of Laemmli 5X; sample were then sonicated on ice for 30 seconds (20-40% amplitude) and boiled at 95°C for 10 minutes.

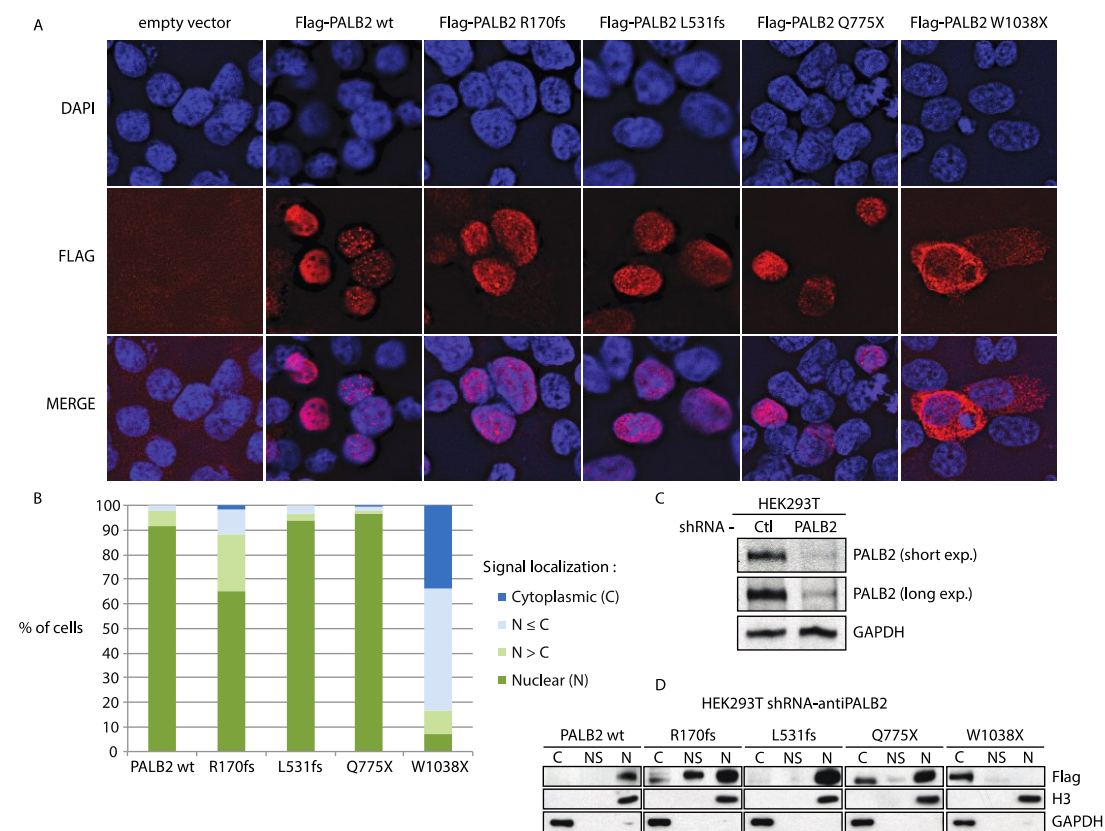
**NES analysis:**

The predicted NES sequence was cloned in frame in C-terminal end of an eGFP into pEGFP-C1 vector using complementary oligos JYM3212/JYM3213 annealed together. HEK293T cells were then, processed as described in the transfection paragraph. 24h following transfection cells were treated for 3h with 20ng/mL of Leptomycin B (L2913, Sigma) or vehicle (70% Methanol). Cells were then fixed with 4% (w/v) Paraformaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature and washed with PBS1X. Coverslips were then, mounted onto slides using ProLong® Gold Antifade Mountant (P36931, Life Technologies); results were visualized using an epifluorescence microscope.

**Immunoprecipitations of GFP:**

HEK293T were seeded into 10 cm cell culture dishes and transfected with 15 $\mu$ g of peGFP C1 - PALB2 828-945 or empty vectors (2 dishes by condition), using CaPO<sub>4</sub> method. 48h later, cells were harvested and processed using immunoprecipitation lysis buffer (IP buffer) as previously described [30]. Total amount of proteins in supernatants was quantified by Bradford assay. 2mg were precleared by 20 min incubation with 30 $\mu$ L of Protein A/G Ultralink® Resin (53133, Thermo Scientific) at 4°C. Supernatant were further incubated with 2 $\mu$ g of Anti-GFP Mouse antibody (11814460001, Roche) and 30 $\mu$ L of fresh resin, at 4°C overnight. Beads were then washed four times with 1mL of IP buffer, once with 1 mL of PBS, and resuspended in 50 $\mu$ L of blue sample buffer (125mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1mg/mL Bromophenol blue, 100mM DTT, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol) prior to boiling at 95°C for 5 minutes.

## Figures



**Figure 1. Cellular localization of PALB2 mutant proteins**

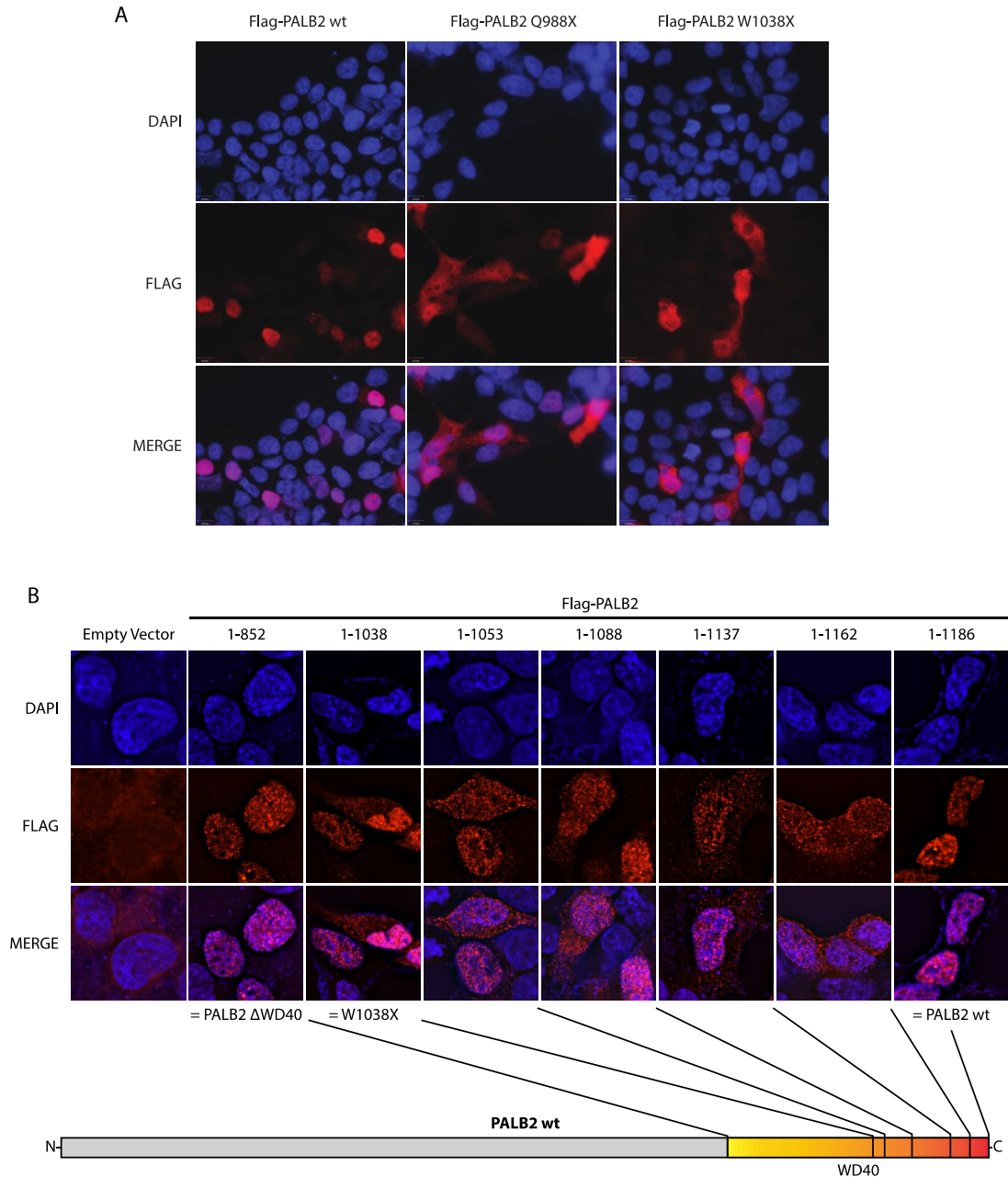
**(A)** Immunofluorescence of mutant forms of Flag-tagged PALB2 expressed in HEK293T cells. DAPI (blue), anti-Flag (red), and the merge picture are shown. All mutants except W1038X were mainly nuclear.

**(B)** Quantification of the cytoplasmic and nuclear accumulation of PALB2 mutants from the immunofluorescence analysis.

**(C)** Knockdown of endogenous PALB2 in HEK293T cells by expressing a shRNA against PALB2.

**(D)** Analysis of the cellular localization of PALB2 mutant forms by cellular fractionation of HEK293T shRNA-antiPALB2 cells. The cytoplasmic (C), nuclear soluble (NS) and chromatin (N) fractions are shown. Blots against the GAPDH and histone H3 proteins are shown as controls.

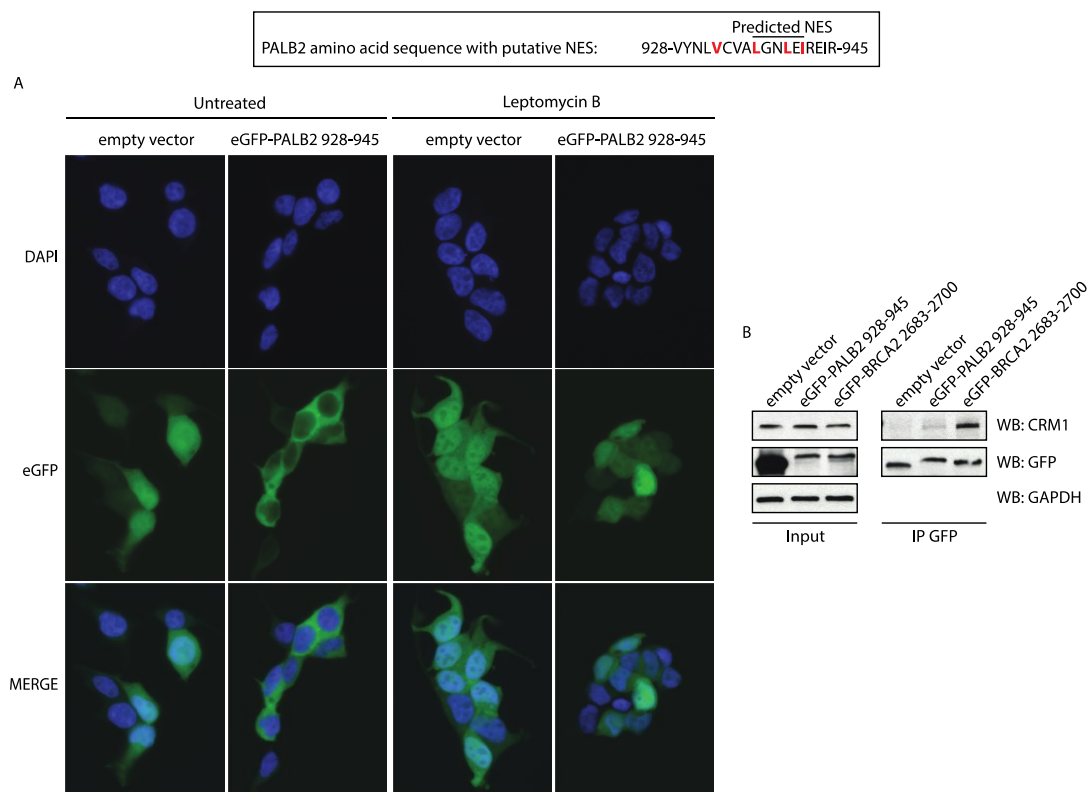




**Figure 2. Cellular localization of WD40-mutant PALB2 and WD40-truncated variant proteins**

**(A)** Immunofluorescence of Flag-tagged PALB2 wt, Q988X (c.2962C>T) and W1038X (c.3113G>A) expressed in HEK293T cells. Both mutant forms present a similar mislocalization. DAPI (blue), anti-Flag (red), and the merge picture are shown.

**(B)** Immunofluorescence of Flag-tagged PALB2 proteins truncated in the WD40-domain - as indicated on the schematic representation, expressed in HEK293T cells. PALB2 1-852 corresponds to a complete deletion of the WD40 domain, while PALB2 1-1186 corresponds to the wild-type protein. PALB2 1-1038 corresponds to the protein predicted to be produced by the mutation c.3113G>A. All proteins truncated between position 1038 and 1162 present a similar mislocalization. DAPI (blue), anti-Flag (red), and the merge picture are shown.



**Figure 3. A sequence contained in PALB2 WD40-domain acts as a CRM1-dependent nuclear export signal.**

**(A) Top:** The sequence predicted as a NES by ValidNESs is underlined. The hydrophobic amino acids that could constitute a NES are highlighted in red. **Bottom:** Immunofluorescence analysis of eGFP alone or fused to the NES sequence (amino acids 928-945), expressed in HEK293T cells. The analysis was performed with or without the CRM1-inhibitor leptomycin B. DAPI (blue), anti-Flag (red), and the merge picture are shown.

**(B)** Co-immunoprecipitation, from HEK293T cells, of endogenous CRM1 with eGFP alone or fused to the putative NES of PALB2, or to BRCA2 NES (as a positive control).

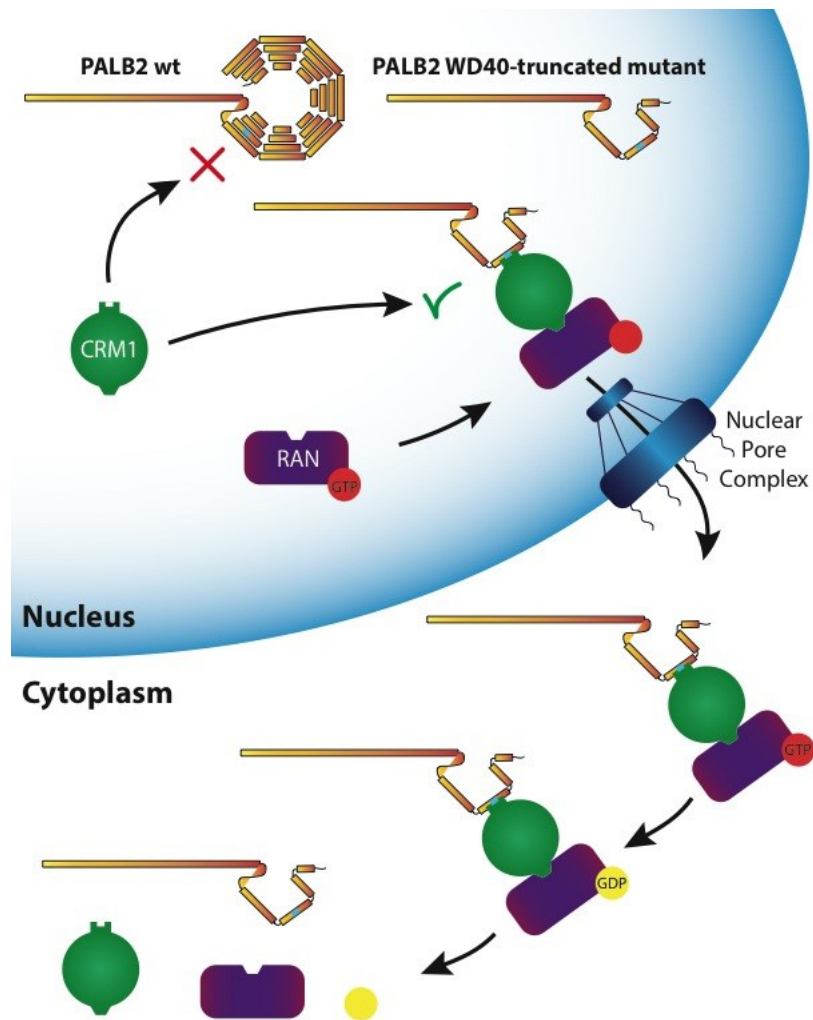


Figure 4. CRM1-mediated nuclear export model of PALB2 proteins truncated in the WD40-domain

## References

1. Antoniou, A.C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkas, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leeneer, K., Fostira, F., et al. (2014). Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *The New England journal of medicine* 371, 497-506.
2. Dansonka-Mieszkowska, A., Kluska, A., Moes, J., Dabrowska, M., Nowakowska, D., Niwinska, A., Derlatka, P., Cendrowski, K., and Kupryjanczyk, J. (2010). A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. *BMC medical genetics* 11, 20.
3. Erkkö, H., Xia, B., Nikkila, J., Schleutker, J., Syrjäkoski, K., Mannermaa, A., Kallioniemi, A., Pylkas, K., Karppinen, S.M., Rapakko, K., et al. (2007). A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 446, 316-319.
4. Foulkes, W.D., Ghadirian, P., Akbari, M.R., Hamel, N., Giroux, S., Sabbaghian, N., Darnel, A., Royer, R., Poll, A., Fafard, E., et al. (2007). Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast cancer research : BCR* 9, R83.
5. Southey, M.C., Teo, Z.L., Dowty, J.G., Odefrey, F.A., Park, D.J., Tischkowitz, M., Sabbaghian, N., Apicella, C., Byrnes, G.B., Winship, I., et al. (2010). A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 12, R109.
6. Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D.T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., et al. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American journal of human genetics* 62, 676-689.
7. Stratton, M.R., and Rahman, N. (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature genetics* 40, 17-22.
8. Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., et al. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72, 1117-1130.
9. Tischkowitz, M., Xia, B., Sabbaghian, N., Reis-Filho, J.S., Hamel, N., Li, G., van Beers, E.H., Li, L., Khalil, T., Quenneville, L.A., et al. (2007). Analysis of PALB2/FANCD1-associated breast cancer families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6788-6793.
10. Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J., and Livingston, D.M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular cell* 22, 719-729.
11. Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., and Yu, X. (2009). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Current biology : CB* 19, 524-529.
12. Buisson, R., Dion-Cote, A.M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Xia, B., and Masson, J.Y. (2010). Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nature structural & molecular biology* 17, 1247-1254.
13. Dray, E., Etchin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G.J., Hammel, M., Yu, X., Galkin, V.E., Liu, D., Tsai, M.S., et al. (2010). Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nature structural & molecular biology* 17, 1255-1259.
14. Buisson, R., and Masson, J.Y. (2012). PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic acids research* 40, 10312-10323.
15. Sy, S.M., Huen, M.S., Zhu, Y., and Chen, J. (2009). PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization. *The Journal of biological chemistry* 284, 18302-18310.
16. Oliver, A.W., Swift, S., Lord, C.J., Ashworth, A., and Pearl, L.H. (2009). Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep.*
17. Park, J.Y., Singh, T.R., Nassar, N., Zhang, F., Freund, M., Hanenberg, H., Meetei, A.R., and Andreassen, P.R. (2013). Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*.
18. Buisson, R., Niraj, J., Pauty, J., Maity, R., Zhao, W., Coulombe, Y., Sung, P., and Masson, J.Y. (2014). Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase eta in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks. *Cell reports* 6, 553-564.
19. Sy, S.M., Huen, M.S., and Chen, J. (2009). MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination. *The Journal of biological chemistry* 284, 21127-21131.

20. Ma, J., Cai, H., Wu, T., Sobhian, B., Huo, Y., Alcivar, A., Mehta, M., Cheung, K.L., Ganesan, S., Kong, A.N., et al. (2012). PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. *Molecular and cellular biology* 32, 1506-1517.
21. Bleuyard, J.Y., Buisson, R., Masson, J.Y., and Esashi, F. (2012). ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair. *EMBO reports* 13, 135-141.
22. Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., et al. (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 39, 165-167.
23. Jones, S., Hruban, R.H., Kamiyama, M., Borges, M., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Palmisano, E., Brune, K., Jaffee, E.M., et al. (2009). Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 324, 217.
24. Pauty, J., Rodrigue, A., Couturier, A., Buisson, R., and Masson, J.Y. (2014). Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer. *The Biochemical journal* 461, 539.
25. Hellebrand, H., Sutter, C., Honisch, E., Gross, E., Wappenschmidt, B., Schem, C., Deissler, H., Ditsch, N., Gress, V., Kiechle, M., et al. (2011). Germline mutations in the PALB2 gene are population specific and occur with low frequencies in familial breast cancer. *Human mutation* 32, E2176-2188.
26. Hofstatter, E.W., Domchek, S.M., Miron, A., Garber, J., Wang, M., Componeschi, K., Boghossian, L., Miron, P.L., Nathanson, K.L., and Tung, N. (2011). PALB2 mutations in familial breast and pancreatic cancer. *Familial cancer* 10, 225-231.
27. Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *The EMBO journal* 18, 1660-1672.
28. Brodie, K.M., and Henderson, B.R. (2012). Characterization of BRCA1 protein targeting, dynamics, and function at the centrosome: a role for the nuclear export signal, CRM1, and Aurora A kinase. *The Journal of biological chemistry* 287, 7701-7716.
29. Fabbro, M., Rodriguez, J.A., Baer, R., and Henderson, B.R. (2002). BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *The Journal of biological chemistry* 277, 21315-21324.
30. Jeyasekharan, A.D., Liu, Y., Hattori, H., Pisupati, V., Jonsdottir, A.B., Rajendra, E., Lee, M., Sundaramoorthy, E., Schlachter, S., Kaminski, C.F., et al. (2013). A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nature structural & molecular biology* 20, 1191-1198.
31. Mendonca, J., Sharma, A., Kim, H.S., Hammers, H., Meeker, A., De Marzo, A., Carducci, M., Kauffman, M., Shacham, S., and Kachhap, S. (2014). Selective inhibitors of nuclear export (SINE) as novel therapeutics for prostate cancer. *Oncotarget* 5, 6102-6112.
32. Nguyen, K.T., Holloway, M.P., and Altura, R.A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *International journal of biochemistry and molecular biology* 3, 137-151.
33. Oliver, A.W., Swift, S., Lord, C.J., Ashworth, A., and Pearl, L.H. (2009). Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO reports* 10, 990-996.
34. Maity, R., Pauty, J., Krietsch, J., Buisson, R., Genois, M.M., and Masson, J.Y. (2013). GST-His purification: a two-step affinity purification protocol yielding full-length purified proteins. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e50320.

## Supplementary materials and methods

### **DNA constructs:**

PALB2 mutant DNA constructs were obtained by inserting point mutations: c.509\_510delGA (R170fs), c.1592delT (L531fs), c.2323C>T (Q775X) and c.3113G>A (W1038X), using PCR mutagenesis (QuickChange II technology - Agilent Technologies), into the PALB2 cDNA previously cloned with a N-ter Flag-tag in pcDNA3 vector (Life Technologies). All those constructs, including PALB2 wt, were further submitted to PCR mutagenesis in order to make them be resistant to the shRNA TRCN0000167822 (Sigma) used in this study. For the mutant Q988X, PCR mutagenesis was performed to insert the point mutation c.2962C>T directly into pcDNA3-Flag PALB2 wt shRNA-resistant. To create truncations of the WD40-domain of PALB2, only DNA sequences coding for the desired amino acid sequences were cloned from the pcDNA3-Flag PALB2 wt shRNA-resistant using InFusion cloning system (Clontech).

For protein purification, DNA sequences coding the amino acid sequence of PALB2 variant proteins, including the mutations and induced frame-shift, were first cloned from the sequences obtained in pcDNA3 following the first directed mutagenesis, using the TOPO blunt-end cloning system (Life Technologies). In that process, the N-ter Flag-tag was removed and one was inserted in C-ter. cDNAs were further cloned into pFastBac-GST-10xHis, a derivative of pFASTBAC1 (Invitrogen) with GST-/His-tags [34]. Due to difficulties observed in the cloning of W1038X, the InFusion cloning system (Clontech) was used to directly clone the sequence, coding for the amino acids of W1038X, from pcDNA3 to pFastBac-GST-10xHis. Q775X had been previously cloned as described [12].

### **Purification:**

RAD51 was purified as described [12]. The PALB2 mutant proteins were purified from Sf9 insect cells infected for 4 days by a baculovirus as described [34].

### **Electromobility Shift Assays (EMSA):**

PALB2 mutant proteins were incubated for 15 minutes at 37°C in a reaction mix (10µL) containing <sup>32</sup>P-labeled DNA (100nM nucleotides) in binding buffer (25mM MOPS pH 7, 40mM KCl, 0.2% Tween-20 and 2mM DTT). Proteins bound to DNA were then fixed in presence of 0.2% (v/v) glutaraldehyde and incubated for 15min at 37°C. Reaction products were analyzed by electrophoresis through a 0.8% TAE1X/agarose gel migrated at 65V for 1h30 at room temperature. Gels were then dried onto DE81 filter paper, visualized by autoradiography and quantification was performed using a FUJI phosphorimager and MultiGauge software on at least 2 independent experiments.

Competition assays were performed in the same conditions but using a mix of five <sup>32</sup>P-labeled DNA probes (20nM of each substrate). Reaction products were analyzed as for EMSA but performing the electrophoresis through a 8% TBE1X/acrylamide gel runned at 150V for 2h at room temperature.

***D-loop Assay:***

D-loop assay was performed in reaction buffer (25mM MOPS pH 7, 100µg/mL Bovin Serum Albumin (BSA), 190µM CaCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 1mM DTT) containing <sup>32</sup>P-labeled single-stranded DNA JYM1413 (1µM nucleotides) having a sequence homologous to the plasmid pPB4.3 replicative form I. RAD51 was first incubated for 5min at 37°C in the reaction mix, followed by the addition of PALB2 mutants for 5 minutes. Caesium Chloride-purified pPB4.3 replicative form I DNA (300µM) was then added and the reaction mix (10µL) and incubated for 15min. The reaction was then stopped by additional 20min incubation after adding one fifth of stopping buffer (10mg/mL proteinase K, 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 100mM Tris-Cl pH 7.5, 100mM MgCl<sub>2</sub>). DNA products were analyzed in agarose gel as described for EMSA.

***Transfection:***

For immunofluorescence, HEK293T cells were plated onto coverslips previously treated with poly-lysine D in 6-well plates. At 30-40% of confluency, cells were transfected with 5µg using calcium phosphate method. Briefly, Ca-PO<sub>4</sub>/DNA precipitates were obtained by incubating for 20min at room temperature, 5µg of DNA with 125mM CaCl<sub>2</sub> and HBS1X; precipitates were added onto cells in presence of 25µM of Chloroquine; after 6 hours of incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, cells were gently washed with PBS and fresh media was added; cells were then allowed to grow for 48h.

For immunoprecipitation, 30-40% confluent 10 cm culture dishes of HEK293T cells were transfected with 15µg of DNA using the same method.

***Immunofluorescence in presence of DNA damage:***

IF of PALB2 mutants following DNA damage were performed as described in the main text but cells were treated, prior to fixation, with 50ng/mL neocarzinostatin for 30min, released then for 4h. In addition of Flag antibody, γH2AX antibody (Phospho-Histone H2AX (Ser139) Antibody, Rabbit, #2577, Cell Signaling) diluted 1:100 was used and detected using the Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody as secondary antibody (A11034, Life Technologies).

**Supplementary Table 1. Oligonucleotides used in this study**

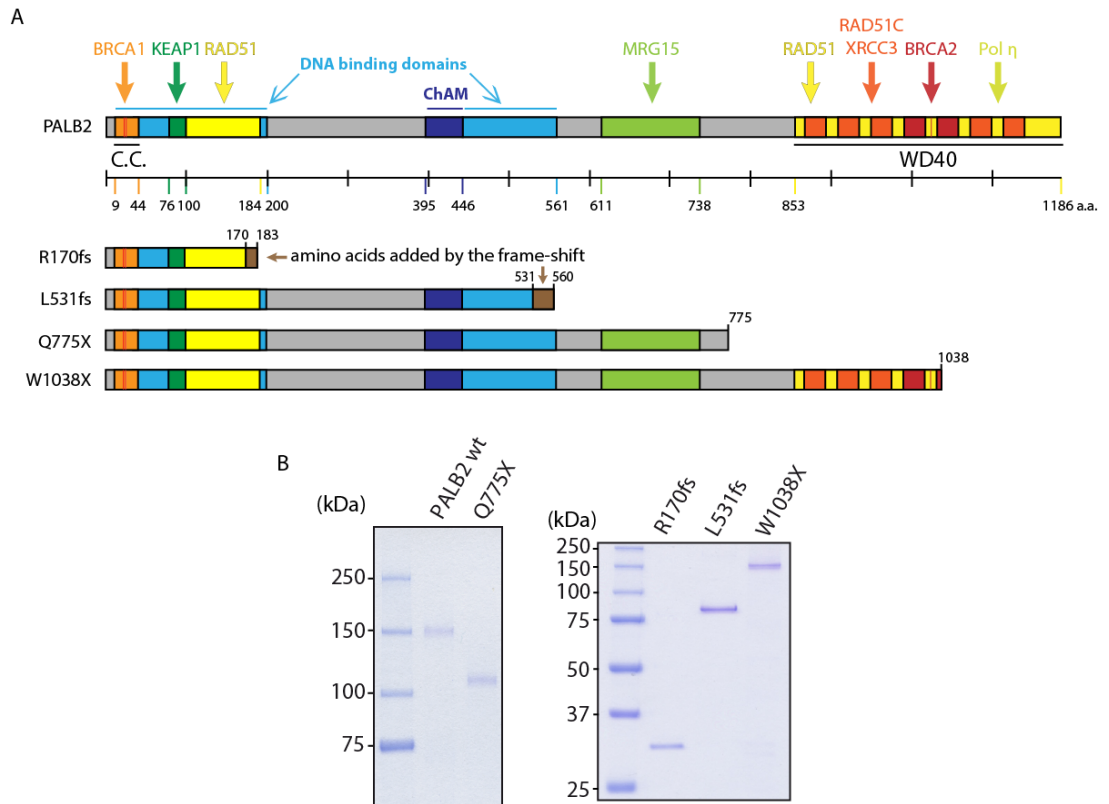
name	Sequence	use	length
<b>Directed mutagenesis to insert cancer-associated mutations in PAL2 cDNA</b>			
JYM1935	ACTGTGTCTTTGGCACTGATTCATTGT CTGGGAAAAGACTAAAGGAACA	Mutagenesis PALB2 - R170fs Fwd	
JYM1936	TGTTCCCTTTAGTCTTTTCCAGACAATGAGT GAATCAGTGCCAAAGACACAGT	Mutagenesis PALB2 - R170fs Rev	
JYM1937	AGCATCAGATCATTGTGAACCACTTTGCCA ACTTCTAGCCTGTCGATTGTTAACAGGT	Mutagenesis PALB2 - L531fs Fwd	
JYM1938	ACCTGTAAACAATCGACAGGCTAGAAGTTG GCAAAGTGGTTCACAATGATCTGATGCT	Mutagenesis PALB2 - L531fs Rev	
JYM2934	CTCAGTCTGTCTTGCCAGTGATACTAAATAA TTCGACAGTTCAGGCAGCCCAGCAAAC	Mutagenesis PALB2 - Q775X Fwd	
JYM2935	GTTTTGCTGGGCTGCCTGAACTGTCAATT ATTTAGTATCACTGGCAAGACAGACTGAG	Mutagenesis PALB2 - Q775X Rev	
JYM3071	GTTAGTAGCAGTGGGACCCTTTCTGATCAA TAAGTAGAAGTCATGACGTTTGCAGAAGA	Mutagenesis PALB2 - Q988X Fwd	
JYM3072	TCTTCTGCAAACGTCATGACTTCTACTTATT GATCAGAAAGGGTCCCCTGCTACTAAC	Mutagenesis PALB2 - Q988X Rev	
JYM1939	CTACTATTATGAACAACATTGTTATTTAGAA TTTTAAAACCTGGTCAACTCCTGAAAAAG	Mutagenesis PALB2 - W1038X Fwd	
JYM1940	CTTTTTCAGGAGTTGACCAGTTTTTAAATTC TAAATAACAATGTTGTTTATAATAGTAG	Mutagenesis PALB2 - W1038X Rev	
<b>Directed mutagenesis to confer resistance to PALB2 mRNA against shRNA 167822</b>			
JYM2404	CTGGTCAACTCCTGAAAAAGATGCACATCG ACGACTCTTACCAAGCTTCAGTCTGTCAC	Mutagenesis for resistance to shRNA of PALB2 Fwd	
JYM2405	GTGACAGACTGAAGCTTGGATAGAGTCGTC GATGTGCATCTTTTTCAGGAGTTGACCAG	Mutagenesis for resistance to shRNA of PALB2 Rev	
<b>InFusion cloning of WD40-domain truncations</b>			
JYM2839	GGAGACCCAAGCTTGGTACCATGGATTACA AGGATGACGA	PALB2 Fwd	
JYM2998	CGTTACTAGTGGATCCCTATGGGTTTATGC TATCAGAAG	PALB2 1-852 Rev = P852X/ $\Delta$ WD40	
JYM 2840	CGTTACTAGTGGATCCCTAAATAACAATGTT GTTCA	PALB2 1-1038 Rev = W1038X	
JYM 2841	CGTTACTAGTGGATCCCTAATCAATGTGCA TCTTTTTCA	PALB2 1-1053 Rev = D1053X	
JYM2936	CGTTACTAGTGGATCCCTAAGGGCTTCGCA ACGACTCAC	PALB2 1-1088 Rev = V1088X	
JYM2961	CGTTACTAGTGGATCCCTAATTGTTCCAG AAGTCAAGA	PALB2 1-1137 Rev = A1138X	
JYM2997	CGTTACTAGTGGATCCCTAACAAAAGACCA ATGTTGGT	PALB2 1-1162 Rev = V1162X	
<b>Cloning of NES sequence in peGFP C1</b>			
JYM3212	CGTGTATAATCTCGTGTGTGTAGCTTTGGG AAATTTGGAAATCAGAGAGATCAGGTGAG	PALB2 928-945 Fwd	
JYM3213	GATCCTCACCTGATCTCTCTGATTTCCAAAT TTCCCAAAGCTACACACACGAGATTATACA CGGTAC	PALB2 928-945 Rev	
JYM3214	CTCCGCAAAAACACTTGTTCTCTGTGTTTCT GACATAATTTTCATTGAGCGCAAATATATGAG	BRCA2 2683-2700 Fwd	
JYM3215	GATCCTCATATATTTGCGCTCAATGAAATTA TGTCAGAAACACAGAGAACAAGTGTTTTTG CGGAGGTAC	BRCA2 2683-2700 Rev	



<b>Cloning of PALB2 mutants in pFastBac-GST-10xHis</b>			
JYM2005	GGTACCAGATGGACGAGCCTCCCGGGAAG	PALB2 Fwd	
JYM2062	GCGGCCGCCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTGATTTCTTCTGTTCC	R170fs Flag Rev	
JYM2063	GCGGCCGCCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTTGAATAAATAATTTTTCG	L531fs Flag Rev	
JYM2159	CCAGGGGCCCTGGGGTACCAGATGGACGAGCCTCCCGGGAAG	InFusion pFB PALB2 Fwd	
JYM2160	GCGAGCTCTGCGGCCCTTATCGTCGTCATCCTTGAATC	InFusion pFB PALB2 W1038X Flag Rev	
<b>Oligonucleotides for probes for EMSA and D-loop assays</b>			
JYM925	GGTGAACCTGCAGGTGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTCAAGCTTTATGCCGT	single-strand DNA (radiolabeled)	60
JYM945	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACATTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC	double-strand DNA	60
JYM926	ACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCAGCGACGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC	Holliday junction / Splayed-arms	60
JYM927	ACGGCATAAAGCTTGACGATTACATTGCTCATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCG	Holliday junction	60
JYM928	CGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTTCGCTGGCACTGGTAGAATTCGGCAGCGT	Holliday junction	60
JYM1395	GCCAGGGACGGGTGAACCTGCAGGTGGGCGGCTGCTCATCGTAGGTTAGTATCGACCTATTGGTAGAATTCGGCAGCGTCATGCGACGGC	D-loop	91
JYM1396	GCCGTGCGATGACGCTGCCGAATTCTACCA CGCTACTAGGGTGCCTTGCTAGGACATCTT TGCCACCTGCAGGTTACCCCGTCCCTG GC	D-loop	91
JYM1745	AAGATGTCCTAGCAAGGCACCCTAGTAGC	D-loop (radiolabeled)	29
JYM1413	GGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCTCTAGACTCGAGGAATTCGGTACCCCGG GTTCGAAATCGATAAGCTTACAGTCTCCATT TAAAGGACAAG	probe for D-loop assay (radiolabeled)	100
<b>shRNA targeting PALB2 mRNA</b>			
TRCN0000167822	CCGGGATGCACATTGATGATTCTTACTCGAGTAAGAATCATCAATGTGCATCTTTTTG	sequence of shRNA	



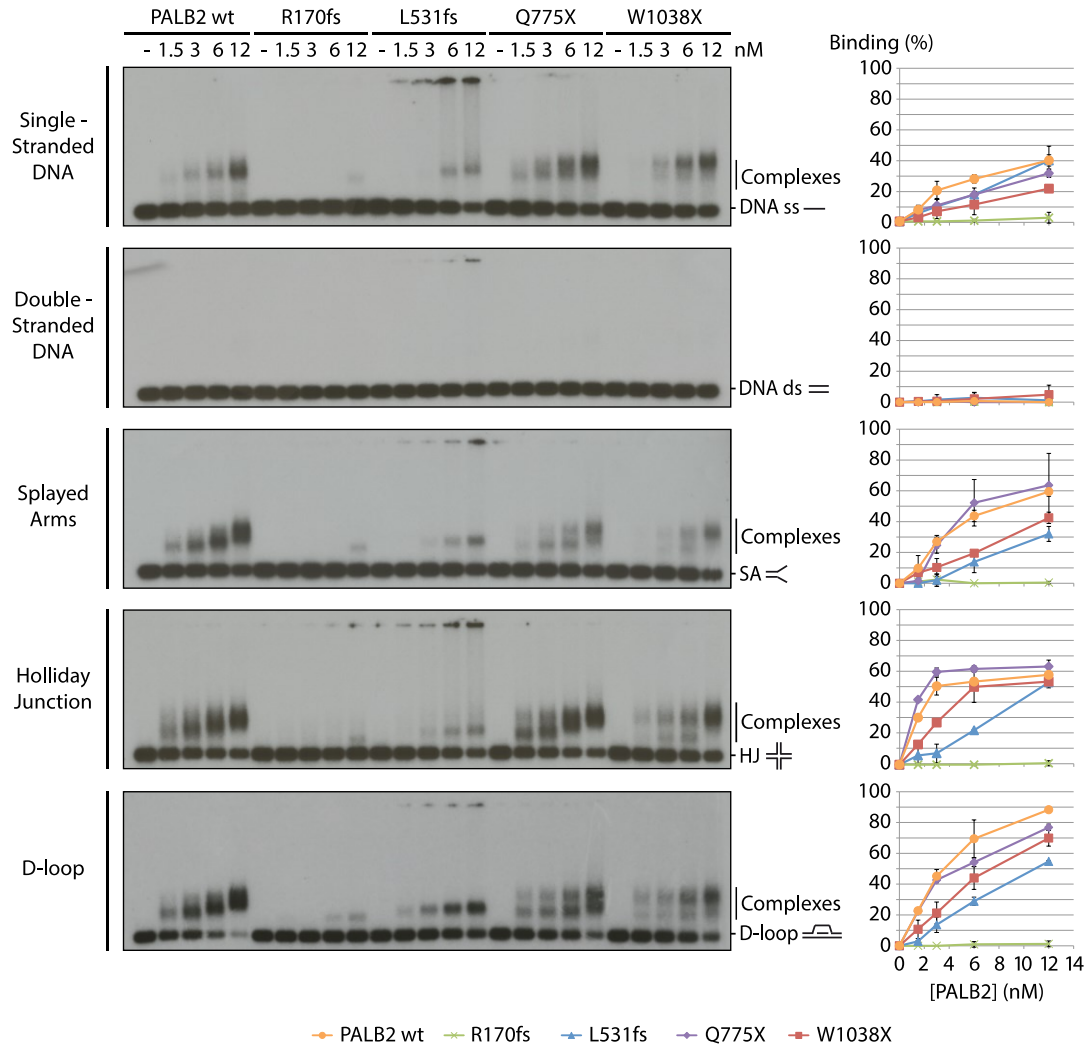
## Supplementary figures



**Figure Supplemental 1. PALB2 wild-type and mutant proteins**

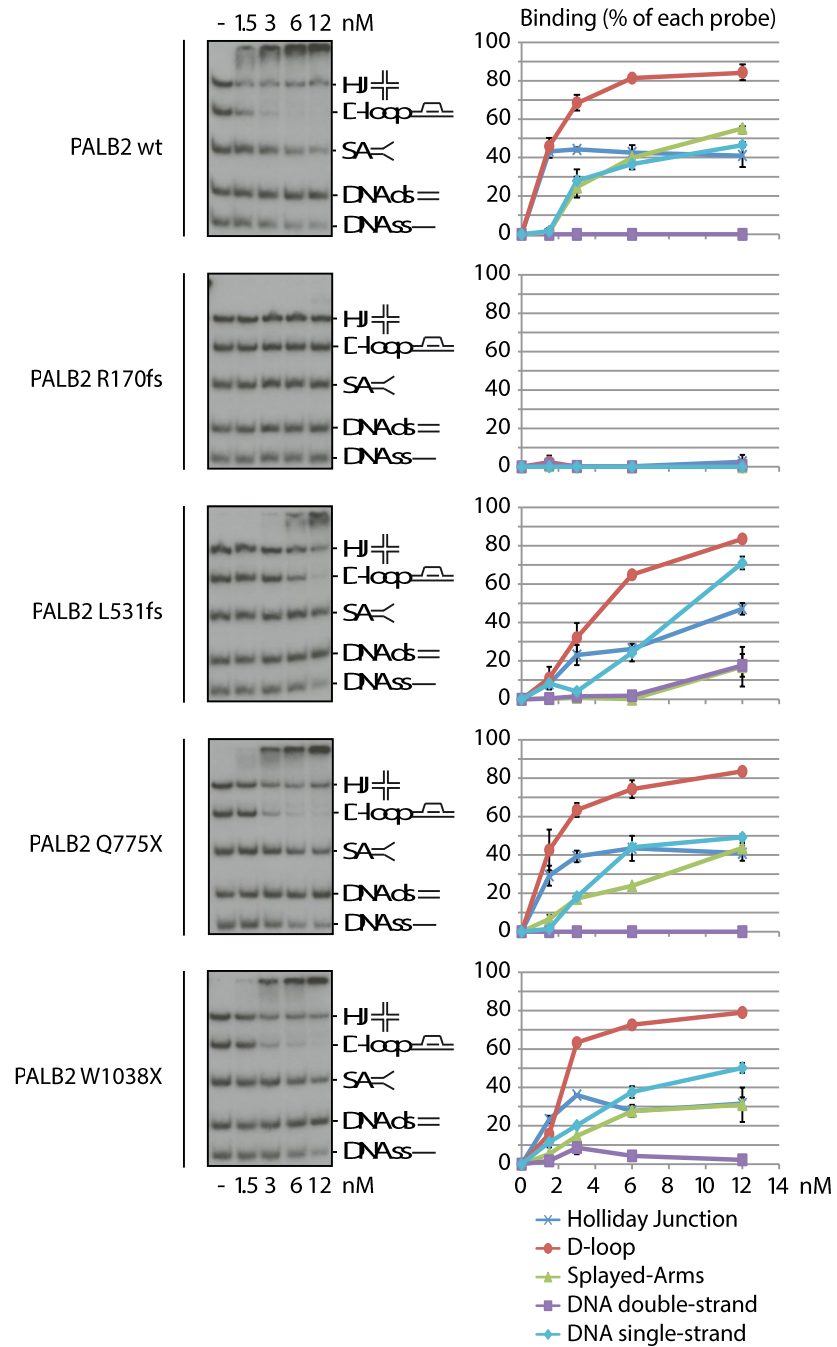
**(A)** Schematic representation of PALB2 domains and domains predicted to remain in truncated variant proteins analyzed in this study. C.C.: coiled-coil domain, this domain also allows dimerization of PALB2 ; WD40 : WD40-repeat domain.

**(B)** Purified wild-type (wt) and truncated variants of PALB2 protein (250ng of protein separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue).



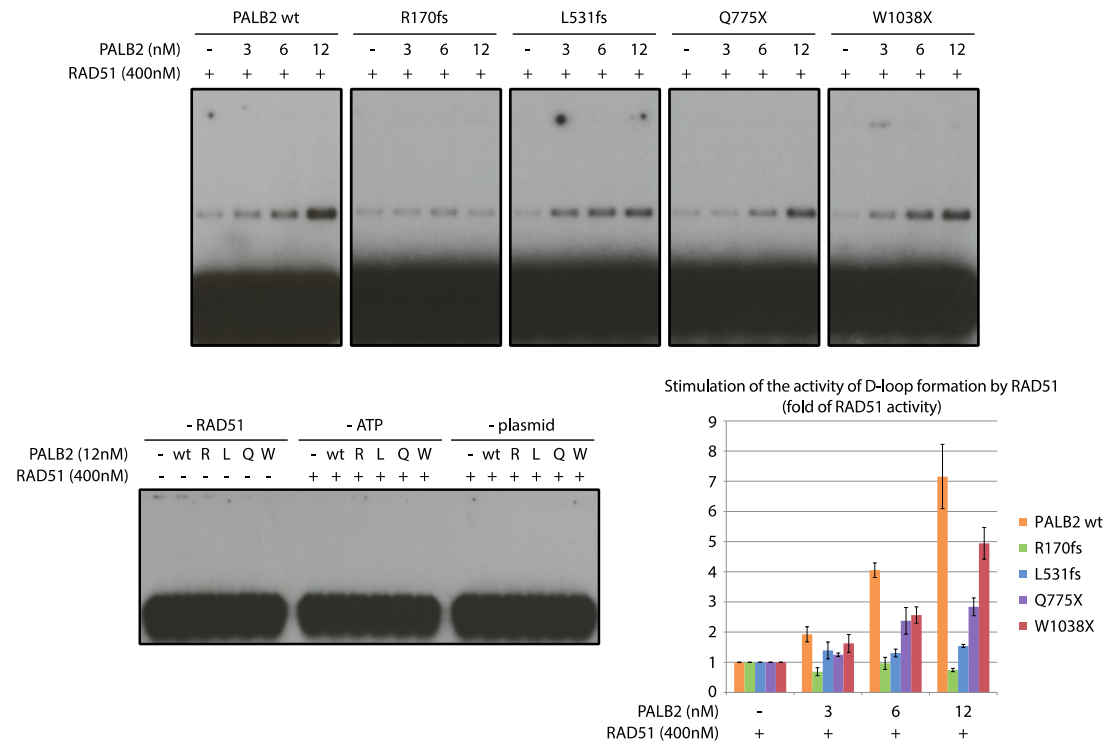
**Figure Supplemental 2. DNA binding of PALB2 mutant proteins**

Analysis of the DNA binding ability of PALB2 wild-type and mutant proteins. EMSAs were performed on five types of radiolabeled DNA structures as shown.



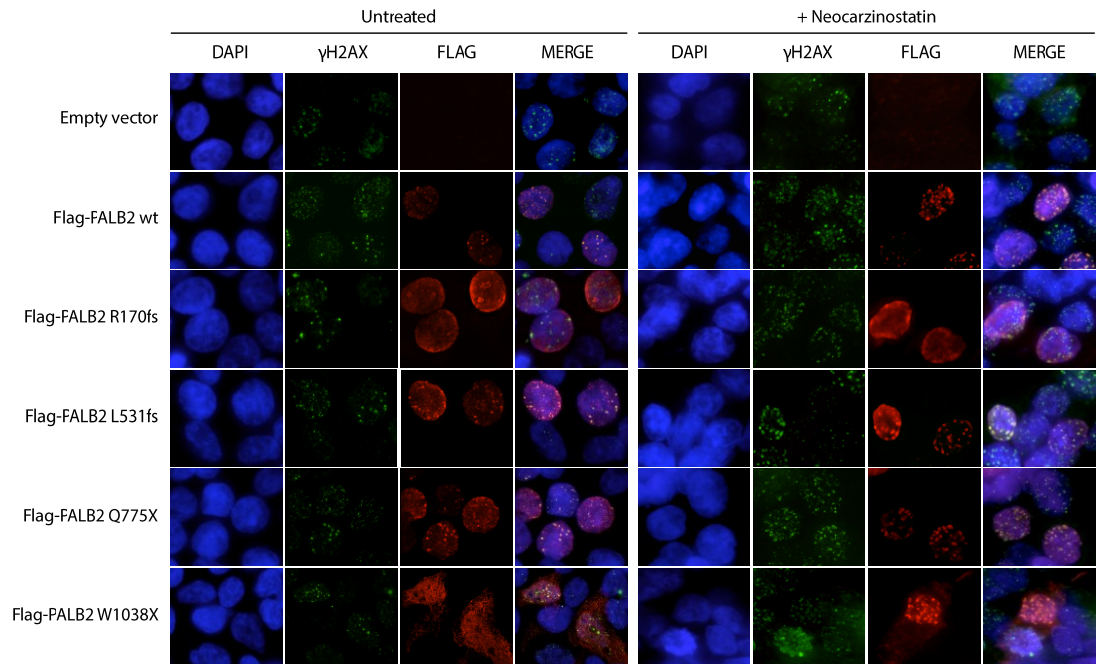
**Figure Supplemental 3. DNA structure-specific binding of PALB2 mutant proteins**

Analysis of the preference of PALB2 wild-type (wt) and mutant proteins to bind specific DNA structures. EMSAs were performed using five substrates of radiolabeled DNA structure altogether.



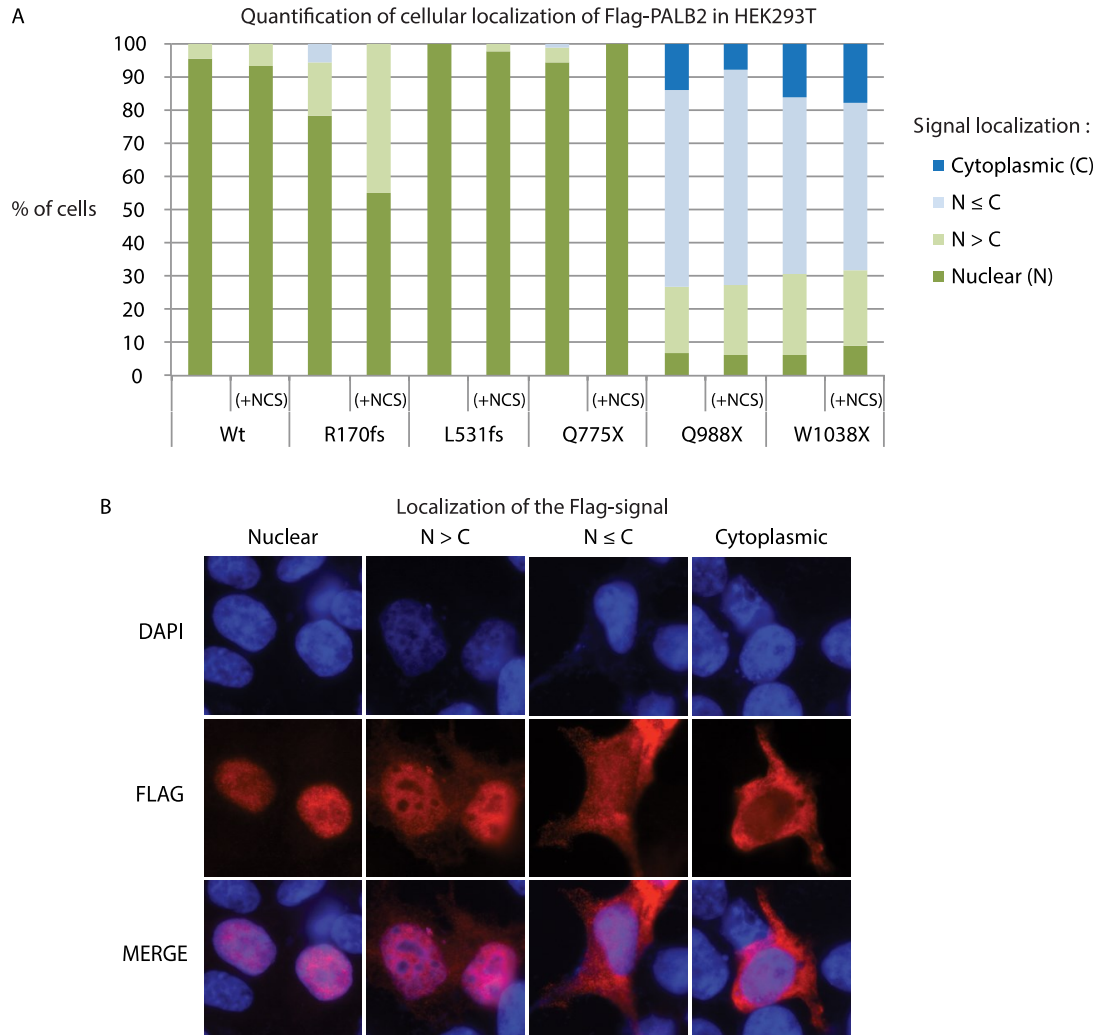
**Figure Supplemental 4. Stimulation of RAD51-mediated D-loop formation by PALB2 mutant proteins**

Analysis of the ability of PALB2 wild-type (wt) and mutant proteins to stimulate D-loop formation mediated by RAD51 and quantification of the results. The bottom left panel presents control experiments: D-loop formation is dependent of RAD51, ATP and plasmid.



**Figure Supplemental 5. Localization of PALB2 mutant proteins to double-strand breaks induced by neocarzinostatin in HEK293T cells**

Flag-tagged PALB2 wild-type (wt) and mutant proteins (in red) relocate at endogenous (left panel) or induced (right panel) DSBs that are indicated by  $\gamma$ H2AX staining (green). R170fs failed to relocate.



**Figure Supplemental 6. Cellular localization of PALB2 mutant proteins**

**(A)** Quantification of immunofluorescence showing the cellular localization of Flag-tagged PALB2 wild-type (wt) and mutant proteins with or without DNA damage induction by the radiomimetic neocarzinostatin (NCS). N : nuclear, C : cytoplasmic.

**(B)** Representative views of immunofluorescence showing the different localization patterns observed for WD40-truncated mutant of PALB2. These four patterns were used for the quantifications.



Prediction from ValidNESs		Prediction from NetNES 1.1 server				
<b>Prediction at the protein level:</b> 0.53		<b>#Seq-Pos-Residue</b>	<b>ANN</b>	<b>HMM</b>	<b>NES</b>	<b>Predicted</b>
<b>Prediction at the site level:</b>		-----				
<b>Putative site (Probability)</b>		Sequence-26-R	0.514	0.019	0.315	-
671-LEEDLIV-677 (0.72)		Sequence-176-L	0.466	0.010	0.230	-
604-LSFLSI-609 (0.42)		Sequence-204-S	0.476	0.030	0.264	-
603-LLSFLSI-609 (0.33)		Sequence-222-L	0.537	0.004	0.200	-
<b>936-LGNLEI-941 (0.3)</b>		Sequence-538-I	0.654	0.007	0.286	-
763-LKDSVCL-769 (0.26)		<u>Sequence-600-L</u>	0.722	0.160	0.407	-
600-LKQLLSF-606 (0.25) <b>in green:</b> sequence predicted		Sequence-601-K	0.088	0.158	0.009	-
698-LSSSILL-704 (0.23) to be a NES with a score >0.3		Sequence-602-Q	0.110	0.158	0.015	-
17-LKEKLAFL-23 (0.21) <b>in blue:</b> sequence predicted in		Sequence-603-L	0.185	0.160	0.034	-
429-IQSHLDV-435 (0.11) WD40 domain of PALB2		Sequence-604-L	0.141	0.162	0.041	-
966-IKAVLGL-972 (0.1) <b>in orange:</b> best candidate for a		Sequence-605-S	0.131	0.162	0.052	-
619-FGPLKL-624 (0.09) NES in WD40 domain of PALB2		<b>Sequence-609-I</b>	0.849	0.162	0.515	Yes
919-VLQIVPV-925 (0.08)		Sequence-624-L	0.911	0.007	0.312	-
1089-VFQLIV-1094 (0.07)		Sequence-668-M	0.134	0.472	0.200	-
989-VEVMTF-994 (0.07)		Sequence-669-E	0.111	0.471	0.208	-
928-VYNLVCV-934 (0.07)		Sequence-670-D	0.088	0.471	0.194	-
1069-LLFIVL-1074 (0.06)		Sequence-671-L	0.136	0.472	0.207	-
1089-VFQLIVI-1095 (0.06)		Sequence-672-E	0.076	0.467	0.197	-
1101-LSVGVML-1107 (0.06)		Sequence-673-E	0.271	0.467	0.230	-
78-VYDKLHI-84 (0.06)		Sequence-674-D	0.078	0.467	0.219	-
1090-FQLIVI-1095 (0.06)		Sequence-675-L	0.242	0.467	0.245	-
931-LVCVAL-936 (0.05)		Sequence-676-I	0.391	0.260	0.099	-
920-LQIVPV-925 (0.05)		<b>Sequence-677-V</b>	0.418	0.255	0.551	Yes
1067-MGLLFI-1072 (0.05)		<u>Sequence-678-L</u>	0.533	0.078	0.475	-
1067-MGLLFIV-1073 (0.05)		Sequence-708-L	0.569	0.000	0.179	-
283-FTSPVSL-289 (0.04)		Sequence-906-W	0.520	0.000	0.127	-
1031-IMNNIVI-1037 (0.04)		<b>Sequence-941-I</b>	0.895	0.110	0.413	-
398-VPEGLLF-404 (0.04)		Sequence-977-L	0.467	0.001	0.191	-
1139-IWDL-1144 (0.04)		Sequence-1031-I	0.807	0.000	0.276	-
278-LKNIRF-283 (0.04)		Sequence-1074-L	0.496	0.001	0.245	-
609-ITDFQL-614 (0.03)		Sequence-1076-H	0.520	0.000	0.321	-
1032-MNNIVI-1037 (0.03)		Sequence-1144-L	0.703	0.012	0.275	-
1046-LKKMHI-1051 (0.03)						
1045-LLKMMHI-1051 (0.03)						
917-VPVLQI-922 (0.02)						
914-FAEVPV-919 (0.02)						
813-IESFTF-818 (0.02)						
*NESsential score at the protein level indicates how likely the given protein contains a NES and ranges from 0 to 1						
*NESsential score of each putative site indicates the probability to be a functional NES and ranges from 0 to 1						
		<b>in red:</b> amino acid predicted to be part of a NES				
		<b>in green:</b> amino acid with a score >0.4 to be part of a NES				
		<b>underlined:</b> amino acid that could be in a NES in the WD40 domain of PALB2				

**Figure Supplemental 7. Results of NES prediction by ValidNESs and NetNES 1.1 server**

**(Left)** ValidNES predicted 3 NES with a probability higher than 0.3 : one between amino acids 671 and 677, one between 603 and 609, and one between 936 and 941. The latter one is located in the WD40 domain of PALB2.

**(Right)** NetNES 1.1 server evaluates the probability of each residue to be part of a NES (score in NES column). When several following residues have a score with the last one having a high score, it predicts a NES. To simplify the reading, only the amino acids that showed a NES score are presented here. In PALB2, NetNES 1.1 server predicted two NES between amino acids 601 and 609, and between 668 and 677, but none in WD40-domain. However the Isoleucin in position 941 showed a high NES score, correlating with the ValidNES result.



# Chapitre 5



## Chapitre 5. SFOM-0046, a Novel Small-Molecule Drug Activating Selectively the ATR-Chk1 Pathway and Potentiating the Cytocidal Activity of a Chk1 Inhibitor in M21 Melanoma Cells

Joris Pauty<sup>1,2</sup>, Marie-France Côté<sup>3</sup>, Jean-Yves Masson<sup>1,2</sup>, Sébastien Fortin<sup>3,4</sup>

- <sup>1</sup> Genome Stability Laboratory, CHU de Quebec Research Center, Oncology Axis, Hôtel-Dieu-de-Québec, 9 McMahon, Quebec City, QC, G1R 2J6, Canada
- <sup>2</sup> Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, G1V 0A6, Canada
- <sup>3</sup> CHU de Quebec Research Center, Oncology Axis, Hôpital Saint-François d'Assise, 10 de l'Espinay, Quebec City, QC, G1L 3L5, Canada
- <sup>4</sup> Faculty of Pharmacy, Laval University, Quebec City, QC, G1V 0A6, Canada

**Corresponding Author:** Sébastien Fortin, Faculty of Pharmacy, Laval University, Quebec City, QC, G1V 0A6, Canada. Phone: +1-418-525-4444 ext. 52364; Fax: +1-418-525-4372; E-mail: [sebastien.fortin@pha.ulaval.ca](mailto:sebastien.fortin@pha.ulaval.ca)

**Running title:** SFOM-0046 Induces ATR-Chk1 Pathway and Potentiates UCN-01

**Keywords:** *N*-phenyl ureidobenzenesulfonates, SFOM-0046, DNA damage response, DNA replication, DNA double-strand breaks.



## Résumé

Dans une étude sur de nouveaux agents antimétaboliques, nous avons découvert une famille unique d'agents anticancéreux nommés les *N*-phenyl ureidobenzenesulfonates (PUB-SO). Les PUB-SO bloquent la progression du cycle cellulaire en phase S et causent des cassures double-brin de l'ADN qui sont identifiées par la phosphorylation de H2AX. Afin de comprendre le mécanisme par lequel les PUB-SO génèrent des cassures double-brin, nous avons évalué la réponse aux dommages à l'ADN des cellules HT29 et M21, au 2-ethylphenyl 4-(3-ethylureido)benzenesulfonate (SFOM-0046) en analysant ses effets sur les voies de signalisation ATR-CHK1 et ATM-CHK2. SFOM-0046 bloque le cycle cellulaire en phase S, cause des cassures double-brin et active spécifiquement la voie ATR-CHK1 dans les lignées cellulaires étudiées, alors qu'il n'active pas la voie ATM-CHK2. Par immunofluorescence, analyse du cycle cellulaire et essai de survie, nous montrons que la combinaison de l'inhibiteur de CHK1, 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), et SFOM-0046 fournit une preuve de concept que les PUB-SO peuvent potentialiser la cytotoxicité d'agents anticancéreux. De plus, SFOM-0046 exhibe une activité antitumorale dose-dépendante dans un essai de xénogreffe de cellules tumorales HT-1080 sur la membrane chorioallantoïde d'œuf de poulets, avec une faible voire très faible toxicité sur les embryons à toutes les concentrations testées. Ensemble, nos résultats mettent en lumière SFOM-0046 comme étant une molécule prometteuse en chimiothérapie.





## Avant-Propos

Le Dr Jean-Yves Masson m'a donné l'occasion de rejoindre l'exaltant projet de développement de molécules chimiothérapeutiques du Dr Sébastien Fortin. Son équipe avait rapporté la synthèse de nouveaux composés démontrant des propriétés antitumorales qui demandaient à être caractérisées. Pour ces travaux, en plus de participer aux réflexions sur l'orientation du projet et les analyses à effectuer, j'ai aidé Marie-France Côté à développer les techniques nécessaires à cette étude. J'ai également contribué à l'acquisition de données notamment en montrant que la molécule SFOM-0046 est capable de potentialiser les effets d'UCN-01.

Les résultats de cette étude ont donné lieu à la soumission d'un manuscrit qui a été accepté en révision par la revue scientifique *Molecular Cancer Therapeutics*. J'ai pris part à sa rédaction, ainsi que le montage des figures.



## Abstract

In recent structure-activity relationship studies on new antimitotics, we discovered a unique family of anticancer agents named *N*-phenyl ureidobenzenesulfonates (PUB-SOs). PUB-SOs block the cell cycle progression in S-phase and cause DNA double-strand breaks as confirmed by the phosphorylation of H2AX. To investigate the mechanisms by which PUB-SOs generate double-strand breaks, we have evaluated the DNA damage response of HT29 and M21 cells to 2-ethylphenyl 4-(3-ethylureido)benzenesulfonate (SFOM-0046) by assessing its effect on the ATR-Chk1 and ATM-Chk2 signaling pathways. SFOM-0046 blocks the cell cycle progression in S-phase, causes DNA double-strand breaks and selectively activates the ATR-Chk1 pathway in all cell lines studied while it does not activate the ATM-Chk2 pathway. Using immunofluorescence, cell cycle analysis and cell survival assays, we showed that the combination of the Chk1 inhibitor 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) and SFOM-0046 provides a proof-of concept that PUB-SOs can synergize the cytotoxicity of relevant anticancer drugs. In addition, SFOM-0046 exhibits a dose-dependent antitumor activity in a chorioallantoic membrane of chicken eggs assay and low to very low systemic toxicity on the chick embryos at all concentration tested. Altogether, our results highlight SFOM-0046 as a very promising drug in cancer chemotherapy.



## 5.1. Introduction

DNA damage response is a crucial and natural function to maintain the genome integrity in all eukaryotic cells (1). DNA damage response is also complex signaling networks and transduction pathways involving proteins and enzymes that sense DNA damage and DNA replication blocks, and that coordinates many cellular processes including activation of DNA repair, damage tolerance pathways, transcriptional responses, DNA damage checkpoints and apoptosis (2). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and Rad3-related (ATR) kinases are members of the PI-3 family of serine-threonine kinases. Both proteins are playing key roles in the DNA damage response by bridging signals from the damage sensors to the signaling repair networks (3). Activation of ATM or/and ATR kinases leads to the phosphorylation of downstream effectors including Chk2 for ATM (ATM-Chk2 pathway), Chk1 for ATR (ATR-Chk1 pathway) and histone H2AX (4, 5). Phosphorylation of Chk2 and Chk1 are key kinases involved in the cell cycle checkpoints and the arrest of the cell cycle while phosphorylation of histone H2AX into  $\gamma$ H2AX by ATR and ATM is crucial for recruiting and maintaining downstream effectors and repair proteins to sites of DNA damage. Moreover, the phosphorylation of H2AX is considered a hallmark of the quantity of DNA double-strand breaks generated (6). Although ATM and ATR partially play overlapping, additive and cooperative roles in DNA damage response, they play also distinct roles in the DNA repair mechanisms (7). ATM is mostly responsible to respond to DNA double-strand breaks as well as disruption of the chromatin structure while ATR responds primarily to single-stranded DNA induced by UV damage and stalled replication forks (8). Of note, single-stranded DNA breaks are converted into DNA double-strand breaks during DNA replication when replicative DNA polymerases encounter single-strand nicks.

We recently uncovered a new class compounds designated as *N*-phenyl ureidobenzenesulfonates (PUB-SOs) that are exhibiting antiproliferative activity in the micromolar range on several tumor cell lines notably M21 skin melanoma, estrogen-dependent MCF-7 breast adenocarcinoma and HT29 colon adenocarcinoma (9). They blocked the cell cycle progression in S-phase on Jurkat cells and induce histone H2AX phosphorylation ( $\gamma$ H2AX) in M21 cells, indicating that these new agents induce DNA double-strand breaks. The screening of our PUB-SOs chemolibrary for antitumor and antiangiogenic activity on HT-1080 fibrosarcoma cells grafted onto chick chorioallantoic membranes (CAM assay) identified 2-ethylphenyl 4-(3-ethylureido)benzenesulfonate (SFOM-0046) as a promising new anticancer drug (Fig. 1A). Interestingly, the molecular structure of SFOM-0046 is devoid of elements allowing spontaneous DNA alkylation or DNA intercalation. Consequently, it is unable to induce direct DNA double-strand breaks comparatively to its 2-tolyl 4-[3-(2-chloroethyl)ureido]benzenesulfonate (SFOM-0004) alkylating counterpart. SFOM-0004 bearing an electrophilic 2-chloroethyl amino group instead of an ethyl amino group confers to the molecule potent alkylating properties. In this study, we investigated the properties of SFOM-0046 on the DNA damage response on M21 and HT29 cells. Having established that SFOM-0046 targets the ATR pathway we also assessed the synergistic cytotoxic effect of SFOM-0046 combined to 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), a Chk1 inhibitor. Finally, we have investigated the antitumoral properties of SFOM-0046 on CAM assay with different concentrations.

## 5.2. Materials and Methods

### Reagents and chemicals

All drugs were dissolved in DMSO at the concentration of 40 mM to make stock solutions. To avoid cytotoxicity, the final concentration of DMSO in the culture medium was maintained under 0.2 % (v/v). SFOM-0046 and -0004 were prepared as published previously (9). Cisplatin, UCN-01 and DMSO were purchased from Sigma/Aldrich Chemicals (St-Louis, MI). The antibodies pATR (ser428), pATM (ser1981), pp53 (ser15), pChk1 (ser317), pChk2 (thr68) were purchased from Cell Signaling Technology (New England Biolabs Ltd, ON). Anti-ATR was obtained from Genetex (Irvine, CA) and anti-phospho histone H2AX from Millipore (ser139, clone JBW301) (Billerica, MA). All other chemicals were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA), Roche Diagnostic Corporation (Indianapolis, IN) and Sigma/Aldrich Chemicals (St-Louis, MI).

### Cells and cell culture

Human skin melanoma M21 cells were provided by Dr. David A. Cheresch (U. California in San Diego, CA). HT29 and HT-1080 cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, Va). Cell lines were maintained at 37°C in a moisture-saturated atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub> and were cultured in DMEM containing NaHCO<sub>3</sub> (2.2 g/L), glucose (4.5 g/L) and glutamine (292 µg/mL), supplemented with 5% bovine calf serum (Hyclone, Utah). The cell lines have not been recently tested and reauthenticated.

### Cell cycle analysis

M21, HT29 and HT-1080 cells were seeded at  $2 \times 10^5$  cells per well in 6-well plates overnight and incubated at different concentrations of either SFOM-0046, -0004 and cisplatin for 24 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. DMSO was used as control. To assess the potentiation effect of UCN-01, the cells were incubated with 3 µM of SFOM-0046 with or without 100 nM of UCN-01 for 24 h at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Cells were trypsinized, floating and adherent cells were pooled and washed with PBS, resuspended in 250 µL of PBS and fixed by addition of 750 µL ice-cold anhydrous ethanol. Cells were centrifuged for 5 min and pellets were resuspended in PBS containing (2 µg/mL) DAPI. Cell cycle distribution was analyzed using an Epics ESP flow cytometer (Coulter Corporation, Miami, FL).

### Fluorescence microscopy

M21 and HT29 cells were seeded at  $1.5 \times 10^5$  cells per well in 6-well plates that contained 22-mm glass coverslips coated with fibronectin (5 µg/mL) and incubated overnight at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were incubated at 6 µM with SFOM-0046 or -0004 or 30 µM of cisplatin for 24 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. For the potentiation effect of UCN-01, the cells were incubated with 3 µM of SFOM-0046 and 100 nM of UCN-01 for 24 h at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. DMSO was used as negative control. Afterward, the cells were fixed with PBS containing 3.7% formaldehyde for 10 min, permeabilized with 0.1 % saponin and blocked with 3% BSA (w/v) in PBS. For the detection of γH2AX, the cells were incubated 2 h at room temperature with the mouse anti-phospho histone H2AX (1:4000) in the blocking buffer. The cells were washed with PBS containing 0.05 % Tween 20™ and incubated 1 h at room temperature into the blocking buffer containing anti-mouse IgG Alexa-494 (1:1000) (Molecular Probes, Eugene, OR) and 4',6-

diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:3000) to stain the nuclei. Cells were mounted with anti-fade reagent (DakoCytomation, Carpinteria). The quantitation of the cells displaying higher than 10  $\gamma$ H2AX foci was assessed using an Olympus BX51 microscope. Images were captured as 8-bit tagged image file format files with a Q imaging RETIGA EX1 digital camera driven by Image Pro Express software.

### **Western blot analysis**

M21, HT29 and HT-1080 cells were seeded in 60 mm petri dishes at  $7 \times 10^5$  cells per dish and incubated overnight at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were incubated at escalating concentrations of SFOM-0046 or cisplatin for 24 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. DMSO was used as control. Thereafter, medium was removed by aspiration and cells were washed in ice-cold PBS, and harvested in Laemmli 1 x buffer (4.6% SDS; 20% glycerol; 125 mM Tris pH 6.8 and 5%  $\beta$ -mercaptoethanol). The protein concentration was determined using the Lowry method. Twenty micrograms of proteins were subjected to electrophoresis using 10% bisacrylamide gels or NuPage 3-8% Tris-acetate gels (Novex, Invitrogen). Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane and incubated with 5% non-fat dry milk and TBST (TBS, pH 7.4 and 0.1 % Tween-20™) for 1 h at room temperature and then with antibodies pATR (ser428, 1:1000), pATM (ser1981, 1:1000), pp53 (ser15, 1:1000), pChk1 (ser317, 1:1000), pChk2 (thr68, 1:1000). Membranes were washed with TBST and incubated in presence of 1:5000 peroxidase-conjugated immunoglobulins in TBST for 1 h at room temperature. After washing the membranes with TBST, detection of the immunoblot was carried out using an enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagent kit. Anti  $\beta$ -actin-HRP (1:10000) (Santa Cruz Biotechnology, CA) was used as control of the protein amount on the gels.

### **MTT assay**

M21 and HT29 cells were seeded in 96-well microtiter plates (Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base) at  $1 \times 10^3$  and  $4 \times 10^3$  cells per well, respectively, in 100 $\mu$ L of medium. Plates were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Medium was replaced with medium containing escalating concentrations of drugs and the plates were incubated for 96 h. Afterwards, 10  $\mu$ L 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (Thiazol Blue Tetrazolium Bromide 98% - M2128 - SIGMA) (5 mg/mL in water) were added to the wells. Four hours later, 100  $\mu$ L of the solubilization solution (10% sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0.01 M HCl) was added and the precipitates were allowed to solubilize overnight at room temperature in dark. The optical density was read using a Infinite® F50 / Robotic – Absorbance microplate readers (TECAN) at 550 nm. The experiments were performed three times in triplicate.

### **CAM assay**

On day-0, freshly fertilized chicken eggs purchased from Couvoirs Victoriaville (Victoriaville, Quebec, Canada) were incubated for 10 days in a Pro-FI egg incubator (Lyon Electric, Chula Vista, CA) fitted with an automatic egg turner before being transferred to a Roll-X static incubator for the rest of the incubation period. Eggs were kept at 37°C in a 60% relative humidity atmosphere for the entire incubation period. A hole was drilled on the side of the egg using a hobby drill (Dremel, Racine, WI), and a negative pressure was applied to create a

new air sac. A window was opened in that new air sac and was covered with transparent adhesive tape to prevent contamination. A freshly prepared HT-1080 cell suspension (40  $\mu$ L,  $3.5 \times 10^5$  cells/egg) was applied directly on the freshly exposed CAM tissue. On day-11, drugs dissolved in DMSO (40 mM) were extemporaneously diluted at the required concentrations in the excipient (Cremophor® EL/99% ethanol/PBS, 1/1/14 v/v). The drug solution (100  $\mu$ L) was injected into a vein under the CAM. Each experimental group contained 10–12 eggs that were incubated until day-17. Embryos were then euthanized by cooling at 4°C for at least 4 h. Tumors were collected, and tumor wet weight was recorded. The number of dead embryos and signs of toxicity from the different groups were also recorded.

### 5.3. Results

We first investigated the effect of the two new PUB-SOs on cell cycle progression using flow cytometry in HT29 colon adenocarcinoma, human melanoma M21, and HT1080 fibrocarcinoma cell lines differing by their origin. M21, HT29 and HT-1080 cells were treated with DMSO, cisplatin as a positive control, SFOM-0004 or SFOM-0046 for 24h prior to flow cytometry analysis (Fig. 1B). When the M21, HT29 and HT-1080 cell lines were treated with DMSO, the majority of cells were in G0/G1-phase while only approximately 15% of cells were in S-phase. Treatment with cisplatin, an alkylating agent generating DNA adducts that interferes with DNA replication, led to an enhancement in S-phase arrest. The percentage of S-phase cells in M21, HT29 and HT-1080 cells increased to 21%, 30% and 32%, respectively. When treated with SFOM-0004 or SFOM-0046, the S-phase populations of M21 and HT-1080 increased similarly to cells treated with cisplatin. In the case of HT29, the S-phase population increased to about 45% for both PUB-SOs treatments versus 30% when treated with cisplatin. Moreover, the G2/M population was not affected much when compared to the cisplatin treatment (57% for the cisplatin treatment, 26% for the SFOM-0004, 14% for the SFOM-0046 and 22% for the DMSO). Altogether, these results indicate that treatment with SFOM-0046 and SFOM-0004 leads to a specific accumulation of cells in S-phase. S-phase arrest is a common phenotype of cells treated with DNA damaging agents (10). Hence, we tested the possibility that the S-phase accumulation by SFOM-0046 could be due to DNA damage. To assess this question we performed immunofluorescence to detect the phosphorylation of the histone variant  $\gamma$ H2AX. Following the induction of DNA double-strand breaks, this histone variant is phosphorylated on Ser139 (11, 12). M21 cells were treated with SFOM-0046, SFOM-0004, cisplatin or DMSO for 24h, followed by immunofluorescence staining of  $\gamma$ H2AX. Compared to cells treated only with DMSO, where only few  $\gamma$ H2AX foci could be observed, treatment with the three drugs induced the formation of a high number of foci (Fig. 2A). The difference in foci formation was estimated by counting the number of foci by cell (Fig. 2B). Following DMSO treatment, only 10% of cells were harboring more than 10  $\gamma$ H2AX. When treated with SFOM-0046, SFOM-0004 or cisplatin, this proportion increased by approximately 7-8 fold. These results show that SFOM-0046 and SFOM-0004 as well as cisplatin treatments lead to the formation of DNA double-strand breaks.

The latter results suggested that SFOM-0046 treatment induced DNA damage leading to cell cycle arrest specifically in S-phase. In order to identify which DNA damage checkpoint was responsible for the S-phase arrest, M21 and HT29 cells were treated with DMSO or increasing concentration of SFOM-0046 or cisplatin for



24h. Whole cell extracts were then performed and analyzed by immunoblotting to detect the phosphorylated forms of ATR, ATM, Chk1, Chk2 and p53, corresponding to their activated forms in the DNA damage checkpoint pathways. Following the cisplatin treatment in M21, the phosphorylation of ATM, as well as Chk1 (ser317) and Chk2 (thr68), were detected. Interestingly, Chk2 phosphorylation was stronger for the lower dose of cisplatin, suggesting that cells have undergone repair rather than apoptosis. The same pattern was observed in the HT29 cells for Chk1 and Chk2 but not ATM. When treated with SFOM-0046, no phosphorylation of ATM or Chk2 was observed in both cell lines; however, ATR, as well as Chk1, were phosphorylated. Moreover, the phosphorylation of ATR appeared to be dose-dependent. The activation of Chk1 and Chk2 are specifically mediated by the phosphorylation by ATR and ATM, respectively. While the G2/M checkpoint uses, entirely or partially, the two pathways to activate and maintain cell cycle arrest, a DNA replication checkpoint preferentially activates the ATR pathway (13). The specific activation of ATR and Chk1 argues that SFOM-0046 activates the replication checkpoint by causing DNA replication arrest. The phosphorylation of p53 was also analyzed to confirm the status of p53 in our cells lines. In HT29, p53 was phosphorylated, even more strongly following cisplatin treatment. However, no phosphorylation of p53 was observed in M21.

Our results suggested that the increase of cells in S-phase caused by the SFOM-0046 treatment might have been specifically due to an activation of the replication checkpoint. Thus, the induction of double-strand breaks by SFOM-0046 could originate from a replicative stress. We therefore hypothesized that removing the SFOM-0046-dependent S-phase checkpoint by adding another inhibitor might be a useful therapeutic strategy to increase the number of cells entering into apoptosis due to excess of DNA damage. To assess this question, we used the Chk1 inhibitor UCN-01 with and without SFOM-0046 and monitored the accumulation of DNA double-strand breaks as well as cell cycle distribution of HT29 and M21 cells. Specifically, M21 and HT29 cells were treated with 3 $\mu$ M of SFOM-0046 for 24h with or without 100 nM UCN-01. Cells were also challenged using UCN-01 alone as a control. Remarkably, immunofluorescence staining against  $\gamma$ H2AX revealed that the drug combination increased drastically the number of cells harboring DNA double-strand breaks in both cell lines compared to the use of the drugs as single agents (Fig. 4A and C). In HT29, the treatment with 3  $\mu$ M of SFOM-0046 increased the S-phase population from 15% to 27% (Fig. 4B). The UCN-01 treatment alone induced a slight increase of the number of cells in S-phase (20%). However, this was less important than SFOM-0046 treatment alone (27% of S-phase cells). Interestingly, when the drug combination was applied, the S-phase population decreased to 22% while the G2/M population increased to 50% in comparison to 23% for SFOM-0046 alone. These results infer that the replication-checkpoint was abrogated but that the G2/M checkpoint was activated, probably by activation of p53 as evidenced by immunoblot analysis (Fig. 3). Despite the activation of this second checkpoint, a slight increase in the subG1 population could be noticed (from 2% with UCN-01 to 4% with the combination).

The cell cycle analysis of M21 cells showed that the population of cells in S-phase increased from 16% to 21% when treated with 3  $\mu$ M of SFOM-0046 (Fig. 4D). The exposure to UCN-01 alone affected the G2/M population (from 21% for DMSO to 12% for UCN-01) while increasing the subG1 population from 2% to 5%. When treated with the drug combination, the cell population in S-phase returned to the amount observed with DMSO. However, the population in G2/M did not increase to reach the value observed with DMSO or UCN-01

treatment. Instead, the subG1 population increased from 5% for the UCN-01 alone to 13% for the SFOM-0046/UCN-01 combination, suggesting an increase in cell death. In order to corroborate the results obtained in immunofluorescence, immunoblot and cell cycle analysis, we assessed cell viability of HT29 and M21 cells treated with escalating concentration of SFOM-0046 and UCN-01 for 96 h. The MTT assay on HT29 and M21 cells revealed that the combination of SFOM-0046 and UCN-01 compared to agents used alone synergize the activity in p53-deficient M21 cells while it does not improve the antiproliferative activity on p53-proficient HT29 cells (Fig. 5A, B and C). As shown in Fig. 5B, a combination of 100 nM of UCN-01 and 1.5  $\mu$ M of SFOM-0046 lead to a significant decrease of M21 cell survival. Altogether, these results confirmed the potential use of SFOM-0046 as a therapeutic agent against cancer cell proliferation in combination with UCN-01 in a p53-deficient background.

Since *in vitro* cancer cell lines showed sensitivity to SFOM-0046 ( $IC_{50}$  of 2.5  $\mu$ M), we assessed its potential and dose-response in a more complex cancer model, the chick chorioallantoic membrane assay (CAM assay). While the excipient (Cremophor® EL/99% ethanol/PBS, 1/1/14 v/v) did not affect the tumor growth, it slightly increased the embryos lethality (from 6% to 10%). The treatment with 10  $\mu$ g/egg of cisplatin restrained the size of the tumor to 50% of the control, without increasing the number of dead embryos (5%) (Fig. 6). When treated with 3  $\mu$ g/egg of SFOM-0046, the tumor size decreased to 85% of the control-tumor size. The tumor size dropped to 82% of the control-tumor size with 10  $\mu$ g, and 53% with 30  $\mu$ g/egg of SFOM-0046, succeeding thus, to limit the tumor growth similarly to cisplatin. The SFOM-0046 treatment showed an increase in embryos mortality but this increase was less or identical to the one caused by the excipient alone (10%, 7% and 9% for 3, 10 and 30  $\mu$ g/egg of SFOM-0046, respectively). The SFOM-0046 showed thus, the capacity of inhibiting *in ovo* tumor growth.

## 5.4. Discussion

Drugs impacting DNA replication are amongst the most useful anticancer agents used in clinic (14-16). We previously reported the development of new compounds showing antiproliferative activity characterized by an increase of DNA double-strand breaks and a S-phase cell-cycle arrest (9). In this study, we further investigated the mechanisms by which the prototypical SFOM-0046, is able to inhibit the growth of tumor cells. UCN-01 is an investigational agent that exhibits antitumor activity by perturbing the cancer cell cycle progression. For many years, it was identified as a very promising drug. It was found to be effective in combination with cisplatin (17). However, although well tolerated, UCN-01 as a single agent did not have sufficient clinical activity to warrant further study in refractory melanoma (18). Hence, the finding of new drugs that can be used in combination with UCN-01, is a key step to achieve efficient chemotherapy.

Having this in mind, we identified SFOM-0046, as a new S-phase blocking agent. The molecular mechanism by which DNA replication is stalled, is still unclear. However, we can exclude the possibility of a direct nucleophilic attack of the drug on DNA. Because of the presence of an ethylurea substituent on the aromatic ring A, an ethyl group on aromatic ring B, and a sulfonate bridge between the two aromatic rings, the molecular structure of SFOM-0046 does not allow a direct DNA alkylation or DNA intercalation mechanism. Indeed, the later

mechanisms are attributed to molecular structures that generate electrophilic species, unstable leaving group or planar structures. Since SFOM-0046 induces replicative stress, which leads to an accumulation of DNA double-strand breaks and activates a replication checkpoint, the therapeutic target of SFOM-0046 might thus, be involved in the DNA replication processes including inhibition of enzyme such as thymidylate synthase, DNA polymerase, DNA helicase and topoisomerase I and II. This hypothesis is also supported by the fact that UCN-01 has already confirmed the potentiation of the lethality of drugs involved in the DNA replication processes notably thymidylate synthase and topoisomerase I inhibitors (19, 20).

We have shown that the ATR-Chk1 pathway, not ATM, is specifically activated following treatment with SFOM-0046. UCN-01 is a Chk1 inhibitor, but not a Chk2 inhibitor (21). It also displays inhibitory effects on other protein kinases such as PKC isoforms and PDK-1 (22). Hence, we also do not exclude the possibility that it affects other pathways as well (23). A combined treatment of SFOM-0046 and UCN-01 in M21 skin cancer cells induced less survival than both drug used separately. Interestingly, such combination effect was not observed when HT29 cells were used. Those two cell lines differ by their p53 status. Indeed, M21 cells are p53-deficient unlike HT29 cells. It has been previously reported that UCN-01 used on p53-deficient cells showed significant clinical efficacy (24) but our results suggest that this effect might be greater if used in combination with SFOM-0046. The strategy of simultaneously inhibiting survival signaling pathways such as DNA repair and cell cycle checkpoints has also been shown for the ERK1/2 and PI3K pathways (25).

In order to investigate the potential of SFOM-0046 in a more complex cancer model, we performed an *in vivo* dose-response assay on Human fibrosarcoma HT-1080 tumors grafted onto chick chorioallantoic membrane (CAM assay). Interestingly, SFOM-0046 did not induce significant systemic toxicity toward chick embryos. Remarkably, we found that 30 µg of SFOM-0046 per egg reduced tumor size significantly by up to 53% of the control tumor size. SFOM-0046 exhibited antitumor activity similar to cisplatin, an effective alkylating agent widely used in clinic notably against lung, head and neck cancers (26). This result demonstrates that SFOM-0046 can be a promising compound in a clinical setting.

### **Acknowledgments**

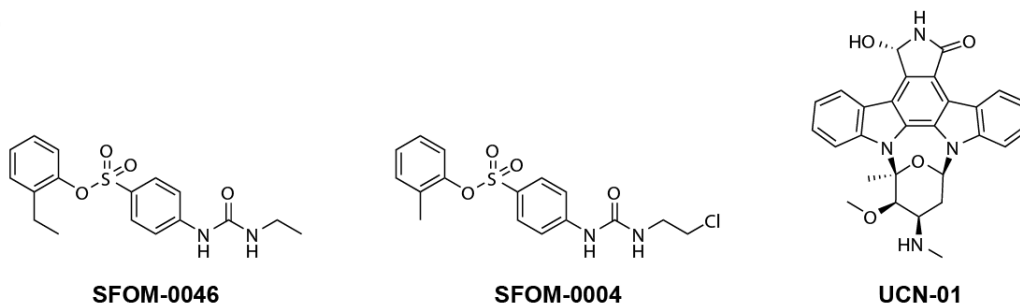
We would like to thank Mr. Yan Coulombe, Mr. Jacques Lacroix and Dr. Isabelle Brodeur for technical help and critical reading of the manuscript, respectively.

### **Grant Support**

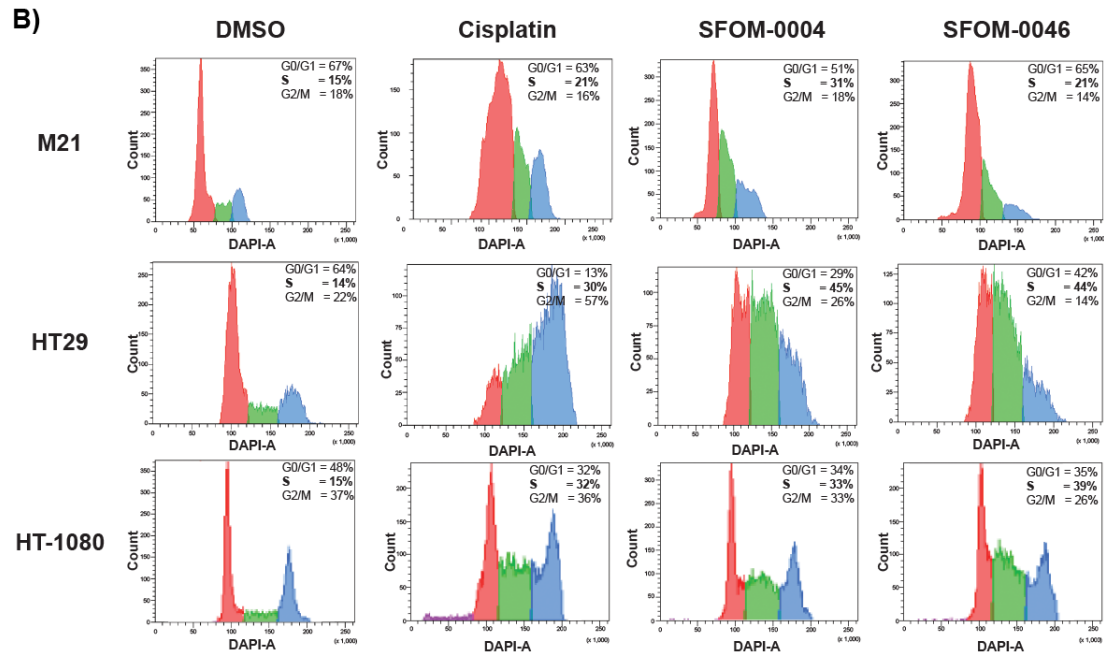
This research was supported by the start-up fund of CHU de Quebec Research Center (SF) and Canadian Institutes of Health Research (JYM).

## Figures

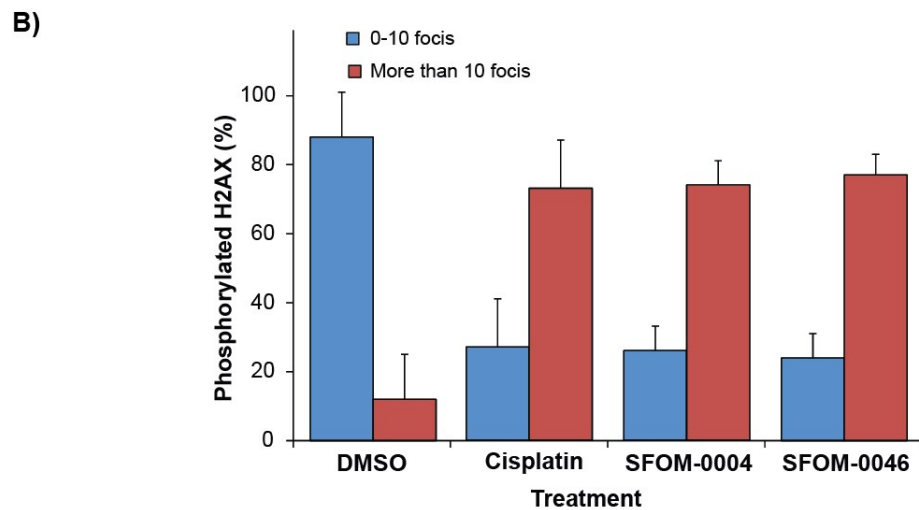
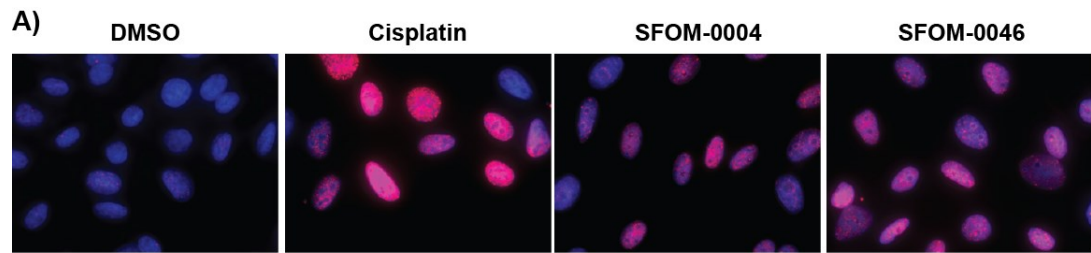
A)



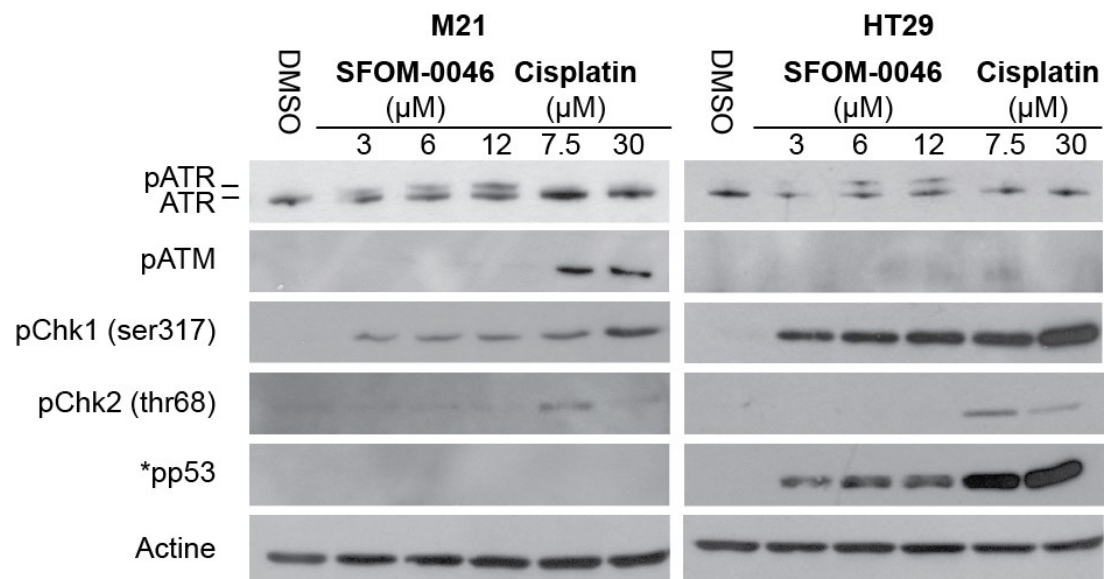
B)



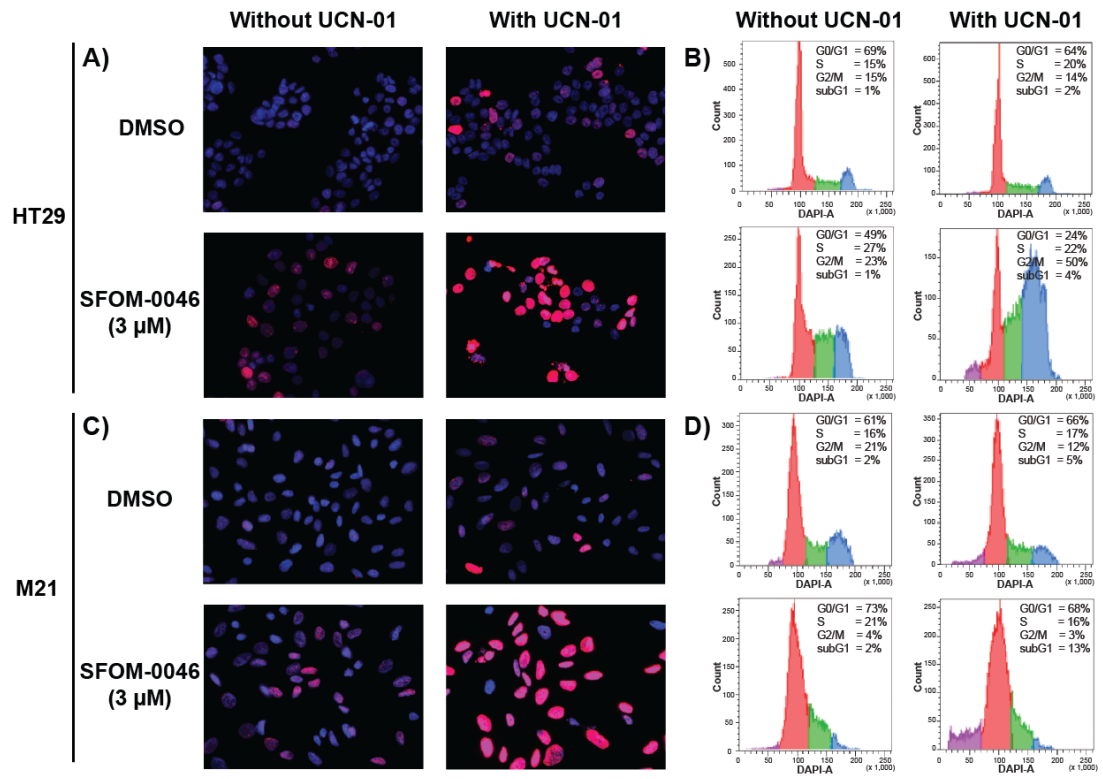
**Figure 1.** A) Chemical structure of SFOM-0046, SFOM-0004 and UCN-01. B) Effect on the cell cycle progression of M21, HT29 and HT-1080 cells treated with DMSO, cisplatin (15  $\mu$ M), SFOM-0004 (6  $\mu$ M), SFOM-0046 (6  $\mu$ M) and after 24 h of treatment. The cell cycle was evaluated using DAPI staining (2  $\mu$ g/mL) with flow cytometry analysis.



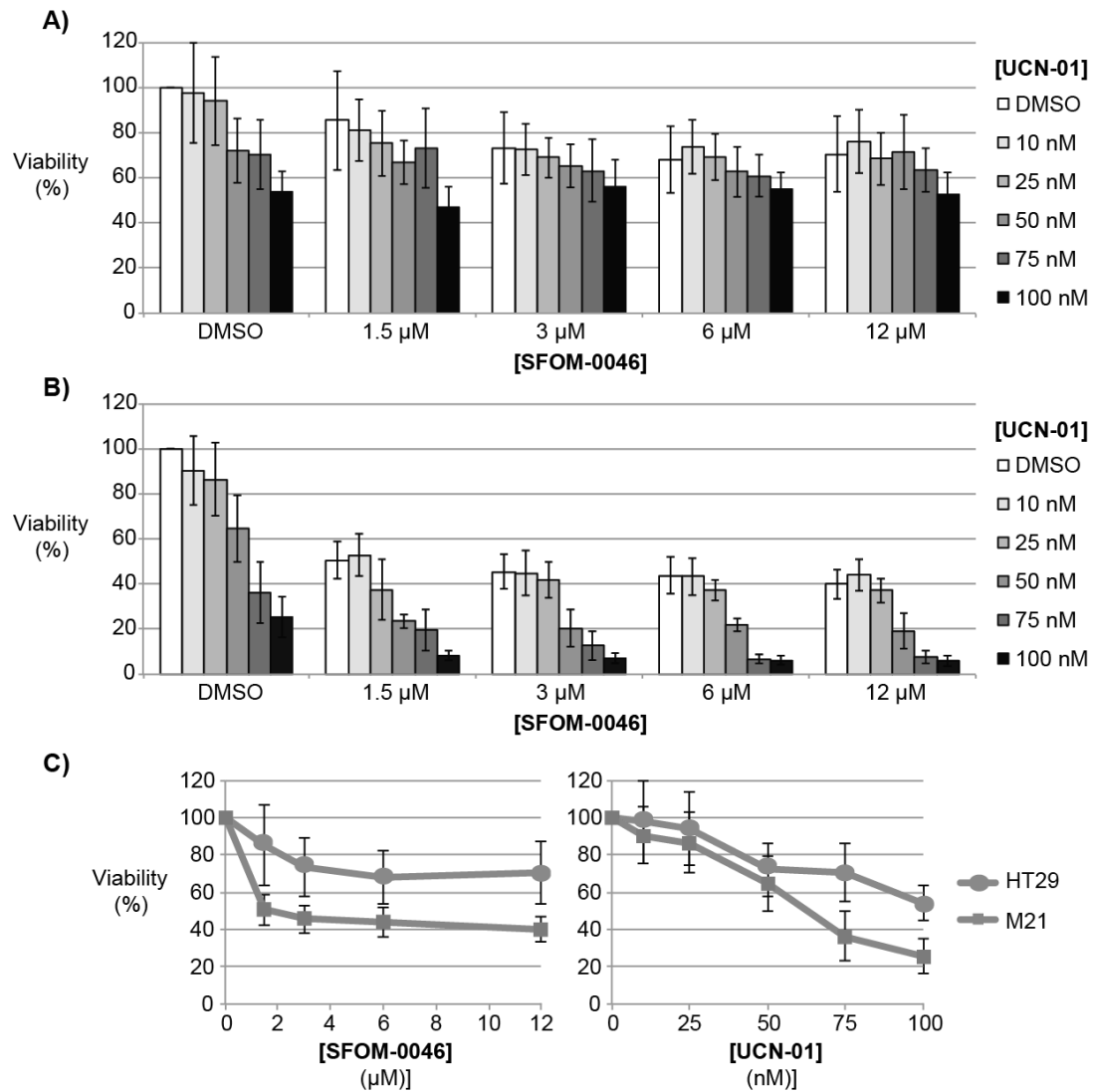
**Figure 2.** A) Effect of DMSO, cisplatin (30  $\mu$ M), SFOM-0004 (6  $\mu$ M) and SFOM-0046 (6  $\mu$ M) on the phosphorylation of H2AX into  $\gamma$ H2AX after 24 h of treatment in M21 cells. B) Quantification of the number of cells displaying less and more than 10  $\gamma$ H2AX foci values are average percentages  $\pm$  s.e.m from three independent experiments, with 80-160 cells counted per experiments.



**Figure 3.** Dose dependent activation of DNA damage response of ATR-Chk1 and ATM-Chk2 pathways of SFOM-0046 and cisplatin on M21 and HT29 cells after 24 h of treatments. M21 cells are p53 deficient.

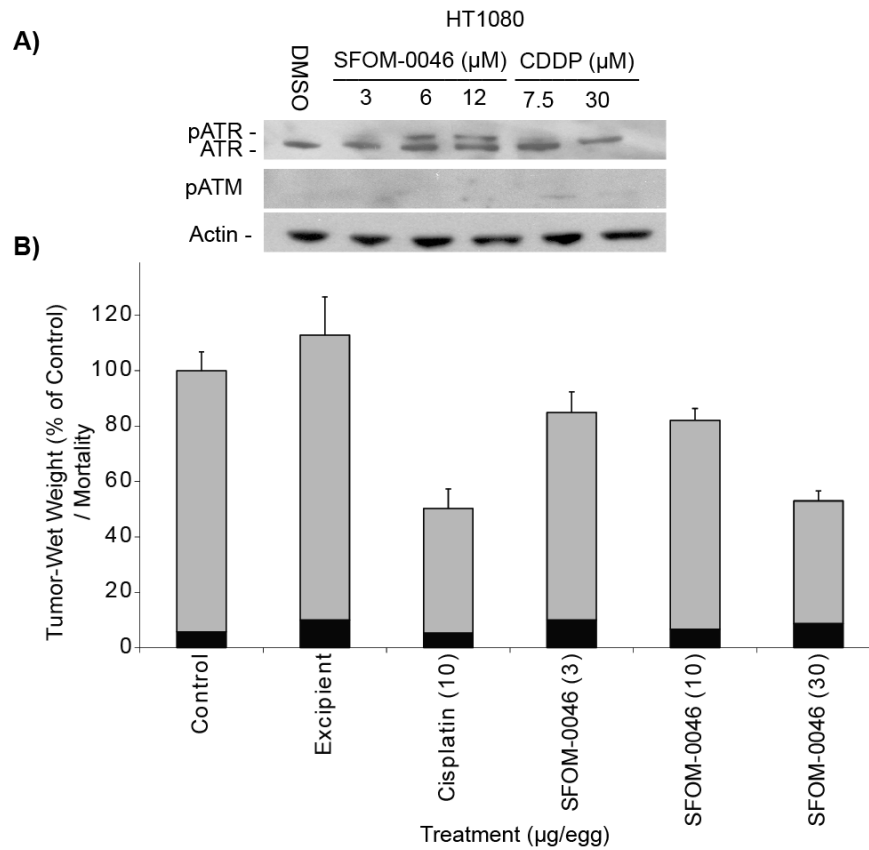


**Figure 4.** Effect of SFOM-0046 after 24 h of treatment with or without UCN-01 (100 nM) on the phosphorylation of histone H2AX in A) HT29 and C) M21 cells. Effect of SFOM-0046 after 24 h of treatments with or without UCN-01 at 100 nM on cell cycle progression in B) HT29 and D) M21 cells.



**Figure 5.** Cells viability of A) HT29 and B) M21 cells treated with SFOM-0046 and escalating concentrations of UCN-01. C) Viability of HT29 and M21 cells treated with escalating concentrations of SFOM-0046 and UCN-01.





**Figure 6.** A) Dose dependent activation ATR and ATM phosphorylation of SFOM-0046 and cisplatin on HT-1080 cells after 24 h of treatments. B) Effect of SFOM-0046 and cisplatin on the growth of HT1080 tumors and their toxicity on chick embryos in the CAM assay. Gray bars represent the percentage of wet weight of tumors treated with or without excipient. Black bars represent the percentage of chick embryo mortality.

## References

1. C. Friedberg E, C. Walker G, Siede W. DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, DC. 1995.
2. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-9.
3. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 2007;316:1160-6.
4. Chen P, Luo C, Deng Y, Ryan K, Register J, Margosiak S, et al. The 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1: implications for Chk1 regulation. *Cell* 2000;100:681-92.
5. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 1998;282:1893-7.
6. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, et al. γH2AX and cancer. *Nature Rev Cancer* 2008;8:957-67.
7. Culligan KM, Robertson CE, Foreman J, Doerner P, Britt AB. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J* 2006;48:947-61.
8. Marechal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5.
9. Turcotte V, Fortin S, Vevey F, Coulombe Y, Lacroix J, Cote MF, et al. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of novel substituted *N*-phenyl ureidobenzenesulfonate derivatives blocking cell cycle progression in S-phase and inducing DNA double-strand breaks. *J Med Chem* 2012;55:6194-208.
10. Willis N, Rhind N. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell division* 2009;4:13.
11. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 2000;275:9390-5.
12. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1999;146:905-16.
13. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85.
14. Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine* 2007;2:567-83.
15. Florea AM, Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 2011;3:1351-71.
16. Yount G, Yang Y, Wong B, Wang HJ, Yang LX. A novel camptothecin analog with enhanced antitumor activity. *Anticancer Res* 2007;27:3173-8.
17. Lee SI, Brown MK, Eastman A. Comparison of the efficacy of 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) and other staurosporine analogs to abrogate cisplatin-induced cell cycle arrest in human breast cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1713-21.
18. Li T, Christensen SD, Frankel PH, Margolin KA, Agarwala SS, Luu T, et al. A phase II study of cell cycle inhibitor UCN-01 in patients with metastatic melanoma: a California Cancer Consortium trial. *Invest New Drugs* 2012;30:741-8.
19. Tse AN, Schwartz GK. Potentiation of cytotoxicity of topoisomerase I poison by concurrent and sequential treatment with the checkpoint inhibitor UCN-01 involves disparate mechanisms resulting in either p53-independent clonogenic suppression or p53-dependent mitotic catastrophe. *Cancer Res* 2004;64:6635-44.
20. Kortmanský J, Shah MA, Kaubisch A, Weyerbacher A, Yi S, Tong W, et al. Phase I trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor and protein kinase C inhibitor 7-hydroxystaurosporine in combination with Fluorouracil in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2005;23:1875-84.
21. Carlessi L, Buscemi G, Larson G, Hong Z, Wu JZ, Delia D. Biochemical and cellular characterization of VRX0466617, a novel and selective inhibitor for the checkpoint kinase Chk2. *Mol Cancer Ther* 2007;6:935-44.
22. Komander D, Kular GS, Bain J, Elliott M, Alessi DR, Van Aalten DM. Structural basis for UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) specificity and PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) inhibition. *Biochem J* 2003;375(Pt 2):255-62.
23. Dent P, Tang Y, Yacoub A, Dai Y, Fisher PB, Grant S. CHK1 inhibitors in combination chemotherapy: thinking beyond the cell cycle. *Mol Interventions* 2011;11:133-40.

24. Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer cell* 2007;11:175-89.
25. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature Med* 2008;14:1351-6.
26. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* 1999;17:409-22.



# Chapitre 6



## Chapitre 6. Discussion

### 6.1. PALB2 et BRCA2 stimulent la polymérase $\eta$ au niveau des fourches de réplication bloquées

Il a été précédemment démontré que PALB2 et BRCA2 agissent en tant que médiateur de la RH, montrant ainsi leurs rôles essentiels dans les phases pré-synaptique et synaptique de la RH (*cf. chapitre 2*). De nombreuses études s'intéressent à présent à la phase post-synaptique. Elles cherchent en particulier à comprendre comment, une fois l'information génétique récupérée, la réparation est terminée et comment sont retirées les structures secondaires de l'ADN qui se sont formées au cours de ce processus. Toutefois, au début de mon doctorat, il y avait un manque d'information concernant l'initiation de la phase post-synaptique, c'est à dire comment est réalisée la synthèse de l'ADN une fois que RAD51 a permis d'associer le brin d'ADN brisé avec son homologue dans la chromatide sœur.

Parmi les polymérases existant chez l'humain, seules les polymérases  $\delta$ ,  $\eta$  et  $\kappa$  ont démontré la capacité de polymériser l'ADN dans une structure en D-loop. En se basant sur des éléments de littérature décrits au chapitre 3, nous avons sélectionné la polymérase  $\eta$  comme la meilleure candidate pour réaliser cette fonction dans le contexte de la RH. Nous avons observé *in situ* une colocalisation de cette polymérase avec  $\gamma$ H2AX, PCNA, RPA, RAD51, ainsi que PALB2 et BRCA2. Toutefois, cette colocalisation se produisait uniquement lors de l'utilisation de molécules qui provoquent un blocage des fourches de réplication. De plus, la colocalisation avec RAD51, marquant dans ces conditions les CDB issues des blocages des fourches de réplication, n'était que de 70%. Notre étude situe donc l'action de Pol  $\eta$  dans la réparation des fourches de réplication bloquées ou brisées. Dans ce contexte particulier, nous avons également validé que le maintien de Pol  $\eta$  au site du dommage était dépendant de PALB2 et BRCA2, puisque leur délétion par interférence par ARN provoqua une diminution d'intensité des foyers de Pol  $\eta$ .

Nous avons alors démontré *in vitro* que l'activité d'élongation de Pol  $\eta$  dans un substrat d'ADN en forme de D-loop, était stimulée par PALB2 et BRCA2. Cette stimulation est vraisemblablement réalisée grâce à une interaction directe avec ces partenaires. Pol  $\eta$  interagit avec le domaine WD40 en extrémité C-terminale de PALB2, et avec les motifs BRC3 et BRC4 de BRCA2. Il a également été rapporté que RAD51 promeut la réinitiation de la réplication au niveau des fourches de réplication bloquées, et ce, indépendamment de la RH. D'après les résultats de notre étude, nous proposons donc un premier modèle dans lequel une fourche de réplication bloquée est convertie en structure dite en "patte de poulet" par l'hybridation d'une partie des deux brins d'ADN néo-synthétisés. RAD51 peut alors être recrutée via PALB2 et BRCA2, et former une D-loop entre l'ADN néo-synthétisé et l'ADNdb en amont de la fourche de réplication. La synthèse de l'ADN est alors effectuée par Pol  $\eta$ , stimulée par PALB2 et BRCA2, permettant le redémarrage d'une nouvelle fourche de réplication. Dans un second modèle complémentaire, la fourche de réplication se brise à cause de son arrêt prolongé, menant à la formation d'une CDB réparée par RH, faisant donc intervenir RAD51, PALB2 et BRCA2. Dans ce contexte Pol  $\eta$  permet alors l'initiation de la synthèse de l'ADN lors de la phase post-synaptique.

### 6.1.1.D'autres polymérases pourraient être impliquées dans la synthèse de l'ADN dans la réparation des CDB par RH

Pol  $\eta$  est une polymérase translésionnelle connue pour sa faible fidélité, en particulier lors du recopiage d'un ADN non endommagé par une modification de base ou un pontage intra-brin (Suarez et al., 2014). L'étape de synthèse d'ADN dans la RH est l'étape la plus importante après la recherche d'homologie, puisque le recopiage de l'information perdue est la base de la fidélité de ce mécanisme de réparation. Une polymérase pouvant introduire des erreurs semble donc inadaptée. D'ailleurs, notre étude suggère un rôle de Pol  $\eta$  dans la restauration des fourches de réplication bloquées, mais pas nécessairement brisées, donc potentiellement en l'absence de CDB. Il est probable que la fonction de Pol  $\eta$  dans l'extension de D-loop, se limite à une synthèse de courte distance qui permet uniquement l'initiation de l'étape de synthèse, probablement poursuivie par une polymérase plus fidèle, telle que Pol  $\delta$ , rejoignant le modèle classique du fonctionnement des polymérases TLS (cf. 1.2.3.2).

D'autres polymérases pourraient donc assurer la fonction de polymérisation de l'ADN dans la RH qui se produit au niveau de CDB. Pol  $\kappa$ , peut être considérée pour ce rôle, puisque sa capacité à synthétiser l'ADN dans des structures en D-loop a aussi été démontrée (cf. chapitre 3). Pol  $\delta$  est aussi une candidate intéressante, car il a été rapporté qu'elle est capable de faire l'étape de synthèse dans un contexte de RH particulier : la réparation par BIR ("Break Induced Réplication"). Ce mécanisme permet de réparer les extrémités d'ADN qui se forment lors du bris d'une fourche de réplication et qui ressemblent à une CDB qui aurait perdu une des deux extrémités (Wilson et al., 2013). Enfin, il a été rapporté que la déplétion de Pol  $\zeta$  dans des cellules humaines, diminue la RH de manière similaire à la déplétion d'une protéine de la voie de Fanconi. Dans cette voie, en plus de son rôle de polymérase TLS (cf. 1.2.3.2), elle participerait à la synthèse lors des étapes de RH, en combinaison avec REV1. D'autre part, la déplétion de Pol  $\nu$  a montré des effets similaires qui suggèrent également son implication (Sharma et al., 2013).

On remarque toutefois que l'étude des polymérases potentiellement impliquées dans la RH est le plus souvent associée à un contexte de stress réplcatif. Un des enjeux de ce genre d'étude pour le futur, sera donc de parvenir à développer un modèle permettant d'étudier la synthèse d'ADN au niveau de CDB, se produisant indépendamment du blocage des fourches de réplication. Dans ce contexte l'étude des polymérases REV1 et  $\zeta$  pourrait être privilégiée puisque celles-ci ont été associées à la polymérisation qui se produit après traitement par des radiations ionisantes, contrairement à Pol  $\eta$  ((Sharma et al., 2013) et chapitre 3).



### **6.1.2. PALB2 et BRCA2 ont un rôle potentiel dans le stress réplicatif, indépendant de la réparation des CDB**

Dans une autre perspective, il a été rapporté que la fidélité des polymérases pouvait être modulée par leur interaction avec d'autres protéines, dont RPA et PCNA ((Maga et al., 2007; Suarez et al., 2014). En particulier, il semble que RPA améliore sensiblement la fidélité de Pol  $\eta$  dans le recopiage d'un ADN intact, mais ce résultat demande à être confirmé (Suarez et al., 2014). Une étude récente propose qu'au niveau des fourches de réplication bloquées, ATR et CDK phosphorylent RPA. RPA phosphorylée marque ainsi les fourches de réplication anormales et recrute PALB2 et BRCA2 pour stabiliser la fourche. Le départ de ces deux protéines permet la reprise de la progression des fourches (Murphy et al., 2014). Il a aussi été montré que BRCA1/2 et RAD51 fonctionnent dans le stress réplicatif en empêchant la dégradation par MRE11 de l'ADN néo-synthétisé (Schlacher et al., 2011; Schlacher et al., 2012). Enfin, nous avons montré que PALB2 et BRCA2 interagissent avec Pol  $\eta$  et participent à son maintien au niveau des fourches de réplication bloquées. Ensemble, ces résultats suggèrent un modèle dans lequel une fourche de réplication bloquée provoque le recrutement de RPA pour protéger l'ADNsb, suivi de l'activation d'ATR et CDK qui phosphorylent RPA. RPA phosphorylée permet ensuite le recrutement de Pol  $\eta$ , ainsi que de PALB2 et BRCA2. Ces dernières stimulent la synthèse de l'ADN par Pol  $\eta$ , mais pourraient également moduler sa fidélité permettant ainsi une restauration fidèle de la réplication. Il serait intéressant d'étudier si le recrutement de Pol  $\eta$  dépend de RPA, et si sa fidélité dans le recopiage d'un ADN non-endommagé peut être modulée par PALB2 et/ou BRCA2.

En conclusion, dans le contexte des fourches de réplication bloquées, les acteurs de la RH : RAD51, BRCA1/2 et PALB2, pourraient participer à la protection du génome via Pol  $\eta$ , et indépendamment de la formation d'une CDB et d'un rôle de réparation. Toutefois, plus d'études seront nécessaires pour valider cette hypothèse.

D'un point de vue thérapeutique, il a été montré que la suppression de l'expression des polymérases TLS est associée à une sensibilisation des cellules tumorales aux traitements anticancéreux. Il a été suggéré que combiner une inhibition de ces polymérases avec celle de la voie ATR-CHK1, pourrait augmenter un tel effet. L'inhibition des polymérases TLS est probablement une bonne stratégie dans le cas de cancer montrant une trop forte activité TLS. Toutefois, inhiber directement une polymérase TLS semble une stratégie potentiellement hautement mutagénique pour les cellules saines environnant la tumeur, ou les cellules tumorales elle-même ; ceci pourrait participer à accroître le phénotype cancéreux sans induire la mort escomptée (phénomène d'hypermutation). En particulier, l'absence de Pol  $\eta$  ou  $\zeta$  est associé au développement de tumeurs, notamment par l'augmentation de l'instabilité génomique (Sharma et al., 2013). En revanche, une stratégie ciblée intéressante à étudier est l'inhibition des partenaires régulant les fonctions des polymérases TLS au sein de mécanismes spécifiques. Cette stratégie présente aussi un intérêt pour l'étude fonctionnelle des polymérases dans les différentes voies de réparation.

## 6.2. Une mutation tronquante de PALB2 révèle un NES dans le WD40

*PALB2* est un gène suppresseur de tumeur qui, s'il est muté, confère une susceptibilité aux cancers du pancréas, du sein et de l'ovaire. De nombreuses études se sont concentrées sur l'estimation du risque de cancer associé aux mutations de *PALB2*, mais rares sont les études qui ont analysé les conséquences des mutations sur les fonctions de la protéine (— *Les résultats de ces études sont présentés au chapitre 2* —). Dans le cas de *PALB2*, il semble que les mutations germinales associées aux cancers soient principalement, mais pas exclusivement, des mutations tronquantes. Nous en avons sélectionnés quatre qui mènent à des troncations à différents niveaux de la protéine, permettant d'étudier l'effet de la perte de différents domaines, ainsi que de pouvoir comparer les différences entre une troncation provoquant la perte d'une faible vs une grande portion de la protéine.

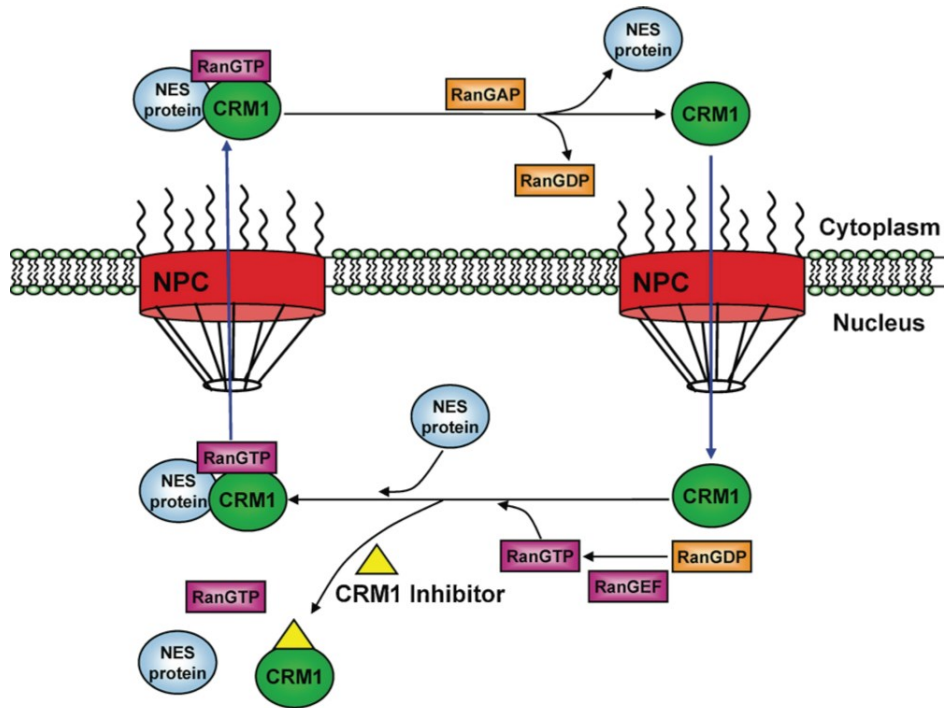
Par des analyses biochimiques, nous avons montré que la troncation, même partielle, du domaine C-terminal, affecte *PALB2* dans son rôle de stimulation de *RAD51* à former des D-loop et que, plus la protéine est tronquée tôt dans sa séquence, plus l'altération de cette fonction est sévère. De plus, la protéine mutante L531fs, tronquée dans son deuxième site de liaison à l'ADN, présente une liaison à l'ADN altérée. Nous proposons donc que la liaison à l'ADN de *PALB2*, en particulier la spécificité de substrat, participe à la fonction de stimulation de la formation des D-loop par *RAD51* et que le second domaine d'interaction avec *RAD51*, le domaine WD40 C-terminal, doit être intact pour permettre une stimulation complète.

Nos études *in situ* ont révélé que les formes mutantes Q988X et W1038X présentent un défaut de localisation cellulaire. D'une manière générale, nous avons constaté que des troncations au niveau du domaine WD40 provoquent une relocalisation partielle de la protéine. Ainsi, *PALB2*, essentiellement nucléaire, est également visualisée dans le cytoplasme lorsqu'elle est tronquée dans son WD40, mais est à nouveau nucléaire, lors de la délétion complète de ce domaine. Nous avons démontré que cette exclusion du noyau est due à la présence d'une séquence NES dans la région 928-945 (position exacte de la séquence consensus: 932-941) permettant la liaison de CRM1 (pour Chromosome ReGion Maintenance 1 / Exportine 1 / XPO1). En effet, la fusion d'une eGFP avec la séquence 928-945 de *PALB2* provoque sa localisation uniquement au cytoplasme, ce qui peut être contré par l'inhibition spécifique de CRM1 à l'aide la leptomycine B.

Dès lors, nous proposons qu'une mutation provoquant une troncation dans le WD40 de *PALB2*, entre les positions 941 et 1186, mène à un défaut de structure du domaine qui expose alors la séquence 932-941. Cette séquence est alors reconnue comme un NES par CRM1 qui s'y lie et provoque l'exclusion de la protéine tronquée vers le cytoplasme. Ainsi, une protéine semblant partiellement fonctionnelle en étude biochimique, pourrait mener au cancer par : (i) un effet d'haploinsuffisance dû à son exclusion du noyau ; (ii) des effets néfastes de sa présence dans le cytoplasme ; ou (iii) de faibles changements dans la RH provoquant une instabilité à force d'accumulation. Cette dernière hypothèse a d'ailleurs été proposée dans le cas d'une mutation de *BRCA2* et sera discutée aux sections suivantes (Jeyasekharan et al., 2013).

### 6.2.1. Le fonctionnement de PALB2 pourrait être régulé par son NES

Toutes les protéines de plus de 40kDa utilisent le complexe du pore nucléaire pour entrer ou sortir du noyau (Nguyen et al., 2012; Turner et al., 2014). L'importation au noyau d'une protéine est dirigée grâce à la présence de séquences de localisation nucléaire (NLS) qui permettent l'interaction avec les importines  $\alpha$  et  $\beta$ . La principale voie d'exportation, quant à elle, utilise CRM1, une protéine réceptrice de transport qui lie les protéines à exporter au niveau d'une séquence peptidique hydrophobe constituant un signal d'export nucléaire (NES) (**Figure 14**). La structure cristalline de CRM1 a révélé qu'elle utilise une pochette hydrophobe dont la structure est fixe, pour toutes ses interactions avec les protéines qu'elle exporte, nommées alors "cargos". Les peptides contenant les NES sont donc forcés à s'adapter à la conformation de la pochette hydrophobe de CRM1, suggérant de possibles différences d'affinité due aux structures de ces peptides. De plus, l'affinité de CRM1 pour les NES, varie selon l'espace entre les acides aminés hydrophobes de la séquence consensus du NES (Henderson and Eleftheriou, 2000). En fait, une affinité faible semble importante pour un désassemblage efficace du complexe d'export, une fois dans le cytoplasme. C'est l'association coopérative de la RanGTP et du cargo avec CRM1, qui augmente son affinité pour le NES et la RanGTP, de cinq cent à mille fois. (Nguyen et al., 2012; Turner et al., 2014)



**Figure 14. La voie d'export nucléaire utilisant CRM1**

Le complexe d'export nucléaire est un hétéro-trimère, constitué de la protéine à exporter - appelée cargo, de CRM1 et de la protéine RanGTP. Le gradient de concentration en RanGTP entre le noyau et le cytoplasme, fournit l'énergie nécessaire au franchissement du complexe du pore nucléaire (ou NPC pour "Nuclear Pore Complex"). Une fois dans le cytoplasme, l'hydrolyse de GTP en GDP par une RanGAP, provoque la dissociation du trimère d'export nucléaire et la libération de la protéine cargo dans le cytoplasme. CRM1 et RanGDP sont recyclés au noyau. (*Adaptée de (Turner et al., 2012)*)

La régulation de l'export nucléaire via les NES et l'interaction avec CRM1, est un mécanisme permettant le contrôle des fonctions des protéines de la réponse aux dommages à l'ADN (*cf. section 4.3 - chapitre 4*). Dans notre étude, nous concluons en posant l'hypothèse que la révélation du NES du WD40 de PALB2 puisse aussi être due à la perte de l'interaction avec un partenaire. Le NES de PALB2 pourrait alors être un système de régulation de sa fonction dans lequel, par exemple, la perte d'interaction avec un partenaire, induite par une modification post-traductionnelle, indique la fin des fonctions de PALB2 et son envoi au protéasome. Cibler l'interaction responsable de la dissimulation du NES et du maintien de PALB2 dans le noyau, pourrait alors être une stratégie pour sensibiliser les cellules cancéreuses à des agents endommageant l'ADN. Il serait intéressant d'identifier les protéines interagissant avec PALB2 via le WD40, et de vérifier si la perte d'interaction de PALB2 avec ces protéines, amène à un phénotype de relocalisation au cytoplasme. Cela pourrait être fait par spectrométrie de masse, suivi d'un criblage ciblé par interférence par ARN ou de mutations du domaine d'interaction. Certaines protéines sont déjà connues pour interagir avec PALB2 au niveau du WD40 et pourrait donc servir à un premier criblage (*cf. section 4.3 - chapitre 4*).

Le NES de PALB2 pourrait également être un système de contrôle-qualité, comme il l'a été proposé pour BRCA2 et RAD51 (Jeyasekharan et al., 2013). En effet, tout comme pour BRCA2 et APC (*cf. section 4.3 - chapitre 4*), notre étude suggère que les mutants tronqués dans le WD40 sont partiellement fonctionnels et présents dans le noyau, pouvant donc mener à de subtiles modifications de la RH et ainsi provoquer un risque cumulatif de cancer. D'ailleurs, la mutation menant à W1038X est associée avec un haut risque de cancer du sein précoce (49% de risque à 50 ans (Southey et al., 2010)). La régulation de la présence au noyau de PALB2 par son NES permettrait donc d'éliminer ces protéines partiellement fonctionnelles pour limiter l'instabilité génomique qu'elles provoquent. W1038X est toutefois un cas particulier, puisqu'il a été montré que c.3113G>A est une mutation provoquant un épissage alternatif, et que la protéine W1038X est un produit minoritaire, dû à un probable ciblage de l'ARN messenger (ARNm) par le système de dégradation des ARNm non-sens (ou NMD, pour Nonsense-Mediated Decay). De nombreuses autres mutations ont été identifiées dans le domaine WD40 (*cf. chapitre 2*) et pourraient conférer un risque cumulatif similaire à c.3113G>A. Il serait donc intéressant d'estimer le risque cumulatif de cancer du sein pour d'autres mutations tronquantes du WD40, et le comparer au risque cumulatif général pour les mutations de PALB2, estimé récemment à 14% à 50ans (Antoniou et al., 2014).

Par ailleurs, les domaines à motifs répétés WD40 sont présents dans plusieurs protéines. Il est alors possible d'envisager que ce mécanisme d'exclusion du noyau, impliquant un NES révélé par une mutation du domaine WD40, soit récurrent dans cette famille de protéines.

### 6.2.2. Le NES de PALB2 pourrait devenir une cible pour le développement de stratégies thérapeutiques

Il a été montré que dans de nombreux cancers, CRM1 est dérégulée ou les suppresseurs de tumeurs sont relocalisés (*cf. section 4.3 - chapitre 4*). Ceci justifia le développement de traitements ciblant l'export nucléaire via l'inhibition de CRM1 et certaines molécules ont atteint les études cliniques. C'est notamment le cas de l'électocine, plus connue sous le nom de leptomycine B, qui est le premier inhibiteur spécifique de CRM1 découvert. Malheureusement cet inhibiteur échoua en essai clinique et fut arrêté à cause de sa toxicité. Depuis, plusieurs agents sont en développement dont une nouvelle classe d'inhibiteurs spécifiques de l'export nucléaire, appelés "composés KPT" (KaryoPharm Therapeutics) ou SINE (pour Selective Inhibitors of Nuclear Export). Le selinexor (KPT-330) fut notamment testé en clinique et présenta une activité antitumorale, en particulier dans le cas de cancers avancés du sang et des tumeurs solides du cancer colorectal. Il réussit également à stabiliser la maladie dans des cas de cancer du col de l'utérus et de sarcome du stroma endométrial. En dehors de ces études, les inhibiteurs de CRM1 ont montré une activité en tant qu'agents utilisés seuls, dans divers modèles de xénogreffe chez la souris. Il semble toutefois que ces inhibiteurs soient plus efficaces pour sensibiliser ou contrer des résistances des cellules cancéreuses à divers agents chimiothérapeutiques, dont certains endommageant l'ADN, tels que des agents alkylants (melphalan, les sels de platines - cisplatine et oxaliplatine) ou des inhibiteurs de topoisomérase (irinotecan, topotecan, doxorubicine, daunorubicine). Ainsi, un essai clinique utilisant notamment une combinaison de selinexor avec l'inhibiteur de TOP2 - la doxorubicine, est prévu pour traiter des cas de récurrence de myélomes ou de myélomes réfractaires aux traitements. Les inhibiteurs de l'export nucléaire ciblent donc principalement CRM1, mais il a été proposé et démontré la possibilité d'inhiber spécifiquement l'export d'une protéine via l'utilisation d'un inhibiteur ciblant son NES. (Turner et al., 2014)

Dans le cas de PALB2, de nombreuses mutations tronquantes du WD40 ont été identifiées et associées au développement des cancers du sein et du pancréas (*cf. chapitre 2*). Pour ces mutants, en plus des hypothèses discutées précédemment, il est possible d'envisager que la susceptibilité au cancer provienne d'une conséquence inconnue de la présence de PALB2 dans le cytoplasme. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'analyse des souris knock-out a montré que PALB2 ne serait pas un suppresseur de tumeur haploinsuffisant (*cf. chapitre 2*). Dans cette hypothèse, inhiber l'exportation du noyau de ces mutants, en utilisant par exemple des peptides bloquant le NES de PALB2, pourrait être une stratégie de prévention de l'apparition du cancer chez les patients à risque. Dans le cas d'une tumeur établie, empêcher cette conséquence de la présence cytoplasmique de PALB2 pourrait permettre de limiter la croissance tumorale. Une étude plus approfondie est donc nécessaire pour vérifier cette hypothèse et la caractérisation de cet effet cytoplasmique sera alors nécessaire pour comprendre son rôle dans la carcinogenèse ou la progression tumorale.

Si toutefois la susceptibilité au cancer provient d'un effet d'haploinsuffisance dû la relocalisation au cytoplasme de la forme mutante de PALB2, inhiber l'export de ce mutant pourrait participer à rendre le génome des cellules plus stable. Deux conséquences sont alors envisageables : (i) une amélioration du traitement des tumeurs par des agents endommageant l'ADN grâce à une limitation de l'apparition de résistance ; (ii) une

protection des cellules saines environnantes via l'amélioration de leur réparation par la RH. Il est possible d'argumenter que l'amélioration du système de réparation confèrera aussi une protection aux cellules tumorales. Cela fait d'ailleurs partie du modèle de développement du cancer qui propose que l'instabilité génétique initie le cancer, mais que la stabilisation subséquente du génome cancéreux permet le maintien des avantages acquis et ainsi, le développement tumoral. Toutefois, dans ce contexte, il est possible d'envisager que la tumeur aura acquis d'autres défauts de réparation qui lui confèreront une plus grande sensibilité à des thérapies ciblées. Prévenir son hypermutation participera donc à maintenir cette différence et à augmenter l'index thérapeutique des traitements ciblant l'ADN.

Mieux caractériser les effets des mutants qui présentent un défaut de localisation, permettra donc d'anticiper les effets de leur séquestration forcée au noyau et ainsi de proposer un développement de stratégies thérapeutiques adéquates.

### 6.3. Une nouvelle molécule prometteuse pour le traitement de cancers

Les agents chimiothérapeutiques créant des cassures de l'ADN sont parmi les plus utilisés en clinique, toutefois leur usage est limité par leur toxicité et l'apparition de résistances, entretenant un besoin de développer de nouvelles molécules. *Le troisième objectif de cette thèse était donc de proposer de nouveaux traitements utilisant les CDB pour tuer les cellules cancéreuses.*

L'équipe du Dr Sébastien Fortin, conjointement avec l'équipe du Dr Jean-Yves Masson, avait précédemment rapporté la synthèse d'une nouvelle classe de molécules chimiques, les N-phenyl ureidobenzenesulfonates (PUB-SO), présentant une capacité antitumorale dans un modèle de tumeurs greffées sur la membrane chorioallantoïde d'œufs de poulet (technique CAM). Cette propriété antiproliférative est associée à la formation de CDB et un arrêt du cycle cellulaire en phase S (Turcotte et al., 2012). Ces molécules étaient donc des candidates idéales pour le troisième objectif de cette thèse.

Un criblage par l'essai CAM des molécules de la classe des PUB-SO a permis de sélectionner la molécule SFOM-0046 comme la candidate la plus prometteuse. Dans le but de proposer son utilisation pour le développement de thérapies du cancer, nous nous sommes intéressés à comprendre ses effets. Sa capacité à arrêter le cycle en phase S et à provoquer la formation de CDB a été vérifiée par cytométrie en flux et immunofluorescence. Dans ces deux analyses, SFOM-0046 montra des effets similaires à un traitement utilisant le cisplatine, un agent pontant de l'ADN. En revanche, l'analyse des acteurs des points de contrôle associés aux dommages à l'ADN, a révélé un mécanisme différent. Ainsi, alors que le cisplatine active ATM, CHK1 et CHK2, le traitement avec SFOM-0046 cible spécifiquement la voie ATR-CHK1. Ce résultat suggère que SFOM-0046 induit plutôt un stress répliatif qui active la voie ATR-CHK1, tandis que le cisplatine provoque des dommages à l'ADN. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de CHK1, UCN-01 (7-hydroxystaurosporine), a permis d'étayer cette hypothèse. En effet, inhiber CHK1 lors du traitement avec le cisplatine n'a pas affranchi le blocage en phase S, ce qui supporte l'idée que la voie ATM-CHK2 est activée, répondant à la présence de dommages à l'ADN. En revanche, l'inhibition de CHK1 lors du traitement avec SFOM-0046 a provoqué une progression du cycle au delà de la phase S qui fut accompagnée d'une augmentation de la quantité des CDB. De plus, tandis que les cellules de cancer de colon HT29 ont montré un blocage en G2/M, les cellules de mélanome M21 ont poursuivi la progression de leur cycle cellulaire en présentant une augmentation de la proportion de cellules en sub-G1. Cette dernière observation suggère que cette proportion de cellules M21 est morte par apoptose. En essai de viabilité, les M21 ont révélé une sensibilité accrue à la combinaison SFOM-0046/UCN-01 en comparaison de l'utilisation de chaque molécule indépendamment. Enfin, grâce à l'essai CAM, nous avons démontré que l'utilisation du SFOM-0046 est possible *in vivo* et montre une activité antitumorale sur des cellules de fibrosarcome, les HT1080.

### **6.3.1.SFOM-0046 sensibilise les cellules cancéreuses à l'inhibition de CHK1 par l'UCN-01, dépendamment du statut de p53.**

En essai de viabilité, la combinaison SFOM-0046 avec UCN-01 provoque une plus forte mortalité des cellules de mélanome M21 par rapport à l'utilisation de chaque agent seul. En revanche, cet effet n'a pas été observé avec les cellules de cancer de colon, HT29.

La principale différence entre les M21 et les HT29 réside dans le statut du suppresseur de tumeur p53. En effet, au cours de nos analyses, nous avons observé que p53 n'était pas activée par le traitement au cisplatine dans les M21, mais était activée dans les HT29. Il existe une abondante littérature documentant la relation entre le statut de p53 et l'effet d'une défaillance ou de l'inhibition de la voie ATR-CHK1 sur la sensibilité aux agents endommageant l'ADN. Toutefois, les données peuvent être contradictoires, en particulier lors de l'usage d'UCN-01, et il a été aussi bien reporté une dépendance qu'une indépendance au statut de p53. Il a été postulé que la perte du point de contrôle G1/S, via la déficience de p53, serait à l'origine de la sensibilité aux inhibiteurs de la voie ATR-CHK1 (**Figure 13**). De plus, il a été rapporté que l'inactivation des points de contrôle ciblés par CHK1, pouvait être dépendante du statut de p53. Il a été aussi proposé que lorsque CHK1 est inhibé et que des dommages à l'ADN sont induits, les cellules p53-proficientes activent leur point de contrôle via p53 mais sont incapables de ré-entrer dans le cycle cellulaire, pouvant ultimement mourir par sénescence. Enfin, il a été montré que CHK1 a un rôle dans la stabilisation des fourches de réplication durant l'arrêt en phase S et donc un rôle direct dans la réparation de l'ADN. (Chen et al., 2012; Zenvirt et al., 2010).

En prenant tout cela en considération, il est possible de proposer que dans notre étude, SFOM-0046 induit un stress au niveau des fourches de réplication provoquant l'activation de CHK1, d'une part pour son rôle dans le point de contrôle, d'autre part, pour son rôle dans la stabilisation des fourches de réplication bloquées. Par la suite, UCN-01 en inactivant CHK1 provoque l'inhibition du point de contrôle et l'accumulation des conversions des fourches de réplication bloquées en CDB. Les HT29 sont alors capables d'activer leur point de contrôle G2/M via p53 et survivent ainsi à la combinaison UCN-01/SFOM-0046, contrairement au M21. Suivant cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser le statut de sénescence des HT29.

L'UCN-01 est un inhibiteur du cycle cellulaire qui a atteint les essais cliniques de phase II, mais son étude en essais cliniques fut arrêtée notamment à cause de sa toxicité. L'utilisation du SFOM-0046 en combinaison avec UCN-01 dans le cadre d'une thérapie, pourrait donc permettre de maintenir ou augmenter les effets d'UCN-01, tout en utilisant des doses plus faibles, limitant ainsi sa toxicité. Il est raisonnable d'envisager l'utilisation du SFOM-0046 pour le développement de thérapies, puisque nous avons démontré que cette molécule est capable de limiter la croissance de tumeurs issues de xénogreffe de cellule de fibrosarcome (HT-1080). SFOM-0046 pourrait aussi être utilisé comme outil pour l'étude du cycle cellulaire, en particulier les différences entre les points de contrôle intra-S et réplicatif.

Par ailleurs, l'effet observé de la combinaison SFOM-0046/UCN-01 suggère un potentiel mécanisme d'action pour le SFOM-0046. En effet, il a été précédemment rapporté qu'UCN-01 présente un synergisme avec l'inhibiteur de Topoisomérase I, la camptothécine.



### 6.3.2. La Topoisomérase I pourrait être la cible thérapeutique de SFOM-0046

Au cours de la réplication, la Topoisomérase I (TOP1) relâche l'ADN super-enroulé, en coupant un brin de l'ADN. Une fois les tensions de l'ADN dissipées, TOP1 maintient les deux extrémités de la coupure alignées et permet la religation (**Figure 12**). Cette activité de religation est contrariée par les inhibiteurs de TOP1, telle que la camptothécine, et la collision des fourches de réplication sur ces dommages est le premier mécanisme de toxicité de ces inhibiteurs, via la conversion de la CSB en CDB. Toutefois la camptothécine ne tue pas plus de 50% des cellules en moins d'une heure d'exposition, alors que les inhibiteurs de TOP2 tuent 90%, même en l'absence de réplication. De plus les effets des inhibiteurs de TOP1 sont réversibles. La camptothécine et ses dérivés ne sont donc pas curatifs comme simple agent. Il a été cependant rapporté que certaines altérations génétiques sensibilisent les cellules aux inhibiteurs de TOP1, dont notamment des mutations de : *ATM*, *ATR*, *BLM*, *BRCA1/2*, *CHK1/2*, *DNAPK*, *H2AX*, *NBS1*, *RAD51C*, *TP53*, *XRCC2* et *XRCC3*. Dès lors, l'idée est venue de cibler le cycle cellulaire en combinant les inhibiteurs des points de contrôle et de TOP1. La preuve de concept a été amenée par la combinaison de l'UCN-01 avec la camptothécine. Toutefois, ce synergisme a été difficile à évaluer lors des études cliniques car l'UCN-01 présentait une mauvaise pharmacocinétique. Une alternative proposée est l'utilisation des PARPi car leur effet synergique avec la camptothécine est connu, et il a été montré que l'AG-14361 augmente l'effet antitumoral de l'irinotecan dans un modèle de souris. (Chen et al., 2012; Pommier, 2006)

La molécule SFOM-0046 présente des caractéristiques similaires à celles des inhibiteurs de TOP1, à savoir : (i) induction d'un stress réplicatif ; (ii) effet réversible si la drogue est retirée ; (iii) effet limité sur la mortalité des cellules. En effet, un traitement au SFOM-0046 des cellules HT29 ou M21 provoque la formation de CDB et un arrêt du cycle cellulaire en phase S, associée à l'activation de ATR et CHK1, suggérant que les CDB sont issues d'un stress réplicatif. De plus, lorsque SFOM-0046 est retirée du milieu de culture, les cellules sont capables de reprendre leur progression dans le cycle cellulaire, montrant également une réduction du nombre de foyers  $\gamma$ H2AX, ce qui traduit une réparation efficace des CDB et donc un effet réversible (*données non présentées*). Enfin, l'exposition des HT29 et M21 à des doses croissantes de SFOM-0046 provoque une baisse de viabilité ; toutefois, les traitements n'ont pas permis d'obtenir plus de 60% de baisse de viabilité, montrant un effet indépendant de la dose au-delà d'un certain seuil (*cf. chapitre 5 - Figure 5*). Ces similitudes, ainsi que la synergie observée entre UCN-01 et SFOM-0046, suggèrent qu'une des cibles thérapeutiques de SFOM-0046 peut être TOP1. Les résultats préliminaires d'un essai enzymatique de l'activité de TOP1 purifiée, ont révélé que SFOM-0046 est capable d'inhiber l'ouverture d'un plasmide super-enroulé d'une manière comparable à la camptothécine (*données non présentées*). Les mécanismes d'action similaires aux agents alkylants ayant été écartés (*cf. chapitre 5*), la perte de l'ouverture de l'ADN super-enroulé est donc vraisemblablement due à l'inhibition de la TOP1.

Une fois que l'effet d'inhibition de TOP1 sera confirmé, la molécule SFOM-0046 pourra rejoindre les inhibiteurs de TOP1 en développement, offrant une nouvelle alternative aux trois classes d'inhibiteurs déjà à l'étude (les camptothécines, les indolocarbazoles et les indenoisoquinolines). En plus d'UCN-01, d'autres inhibiteurs de la voie ATR-CHK1 sont en cours de développement et pourraient être testés en combinaison avec SFOM-0046 (cf. 1.3.3.2). Il serait aussi intéressant de voir si SFOM-0046 est synergique avec les PARPi. Comme nous avons montré que SFOM-0046 est capable de limiter la croissance tumorale de cellule de fibrosarcome *in ovo*, et que les PARPi sont déjà utilisés en essai clinique, l'étude de la combinaison de ces deux molécules pourrait être réalisée avec un modèle de xénogreffe en souris, et semble prometteuse pour atteindre rapidement les études précliniques. SFOM-0046 devra toutefois se démarquer des molécules disponibles pour pouvoir atteindre un jour son utilisation en clinique, mais la synthèse de dérivés pourrait permettre d'atteindre cet objectif.

## Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse permettent de préciser le rôle de PALB2 dans la RH au niveau des fourches de réplication. Ils suggèrent également un nouveau mécanisme de la régulation de PALB2, par le contrôle de sa présence au noyau, et dont l'altération participe à la carcinogenèse. Finalement, ils rapportent le développement d'une nouvelle molécule comme agent chimiothérapeutique prometteur, induisant des CDB via un stress réplicatif. Ensemble, ces études mettent en lumière de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques pour le traitement de cancer, notamment par l'utilisation des CDB formées lors d'un stress réplicatif. Ces travaux ouvrent donc la voie à de nouvelles perspectives de recherche.

Premièrement, il sera intéressant de poursuivre l'étude de la relation entre la RH et la réparation des fourches de réplication bloquées. Plusieurs modèles ont été proposés dans la littérature et nos travaux illustrent un peu plus, comment les partenaires de la RH, PALB2, BRCA2 et RAD51, sont impliqués. Plus d'études sont nécessaires pour comprendre s'il existe des différences entre la RH se produisant au niveau des CDB vs au niveau des fourches de réplication. Quels sont les mécanismes orientant les protéines impliquées vers l'une ou l'autre voie, seront alors une question à approfondir.

Deuxièmement, la découverte d'un NES dans le domaine WD40 de PALB2 soulève la question de son rôle. Il sera notamment intéressant de comprendre s'il s'agit d'un mécanisme de régulation de la fonction de PALB2. L'expertise du laboratoire dans l'étude de PALB2, ainsi que les outils et techniques développés au cours de mon doctorat, rendent la réalisation de cette étude possible à moyen terme.

Troisièmement, documenter les effets d'une mauvaise localisation cellulaire de PALB2 sur le phénotype cellulaire, fournira de précieuses informations sur le rôle des mutations de PALB2 dans la susceptibilité au cancer. Plus généralement, en complément des études génétiques de prédisposition au cancer, il est nécessaire de caractériser les effets fonctionnels des mutations identifiées dans les gènes de la réparation de l'ADN. Ce genre d'étude est important, car il y a de plus en plus de preuves, comme notre étude le suggère, qu'une mutation d'un gène peut avoir des conséquences différentes selon la position de la troncation induite au niveau de la protéine. Ainsi, un traitement pouvant être adapté à un patient muté dans un gène, pourrait être inadapté pour un second patient muté dans le même gène mais à une position différente. Connaître les conséquences des mutations des gènes de la réparation de l'ADN, permettra le développement de thérapies personnalisées plus efficaces et adaptées. Dans ce contexte, le Dr Detlev Schindler (Université de Wuerzburg) s'est montré intéressé par mes travaux et a demandé notre aide pour comprendre les effets de la mutation de *PALB2* c.1676\_1677delAAinsG au niveau des fonctions biochimiques de la protéine associée PALB2 p.Gln559Argfs\*2.

Enfin, concernant le développement de thérapies, nos travaux et la littérature montrent que PALB2 est impliqué à de nombreux niveaux de la protection de la stabilité du génome. Son implication dans la réparation des fourches de réplication laisse entrevoir que des cellules déficientes en PALB2 seraient sensibilisées aux traitements ciblant la réplication, comme les inhibiteurs de topoisomérase. Une perspective intéressante de nos travaux est alors de tester la sensibilité des cellules déficientes en PALB2 à la molécule SFOM-0046. Par ailleurs, une cible thérapeutique en train d'émerger est RAD52. Elle est en particulier intéressante car sa seule délétion n'est pas létale pour les cellules, mais elle est au cœur des interactions synthétiques létales avec plusieurs

acteurs majeurs de la RH, dont PALB2 (*cf.* 1.3.1.2). Il serait donc intéressant de mettre au point des inhibiteurs spécifiques de RAD52 pour le développement de traitements qui devraient présenter un fort index thérapeutique. Dans cette perspective, nous disposons d'une banque de molécules chimiques grâce à la collaboration avec le Dr Sébastien Fortin et j'ai purifié la protéine RAD52, ce qui permettrait de débiter cette étude.

# Bibliographie

## Site Internet:

Genetics Home Reference, <http://ghr.nlm.nih.gov>

## Livres:

Emil Mladenov and George Iliakis (2011). The Pathways of Double-Strand Break Repair, DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors, Dr. Francesca Storici (Ed.), ISBN: 978-953-307-649-2, InTech, DOI: 10.5772/24572. Available from: <http://www.intechopen.com/books/dna-repair-on-the-pathways-to-fixing-dna-damage-and-errors/the-pathways-of-double-strand-break-repair>

Axelle Renodon-Cornière, Pierre Weigel, Magali Le Breton and Fabrice Fleury (2013). New Potential Therapeutic Approaches by Targeting Rad51- Dependent Homologous Recombination, New Research Directions in DNA Repair, Prof. Clark Chen (Ed.), ISBN: 978-953-51-1114-6, InTech, DOI: 10.5772/53973. Available from: <http://www.intechopen.com/books/new-research-directions-in-dna-repair/new-potential-therapeutic-approaches-by-targeting-rad51-dependent-homologous-recombination>

## Articles:

Abbotts, R., Thompson, N., and Madhusudan, S. (2014). DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. *Cancer management and research* 6, 77-92.

Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., and Shibata, T. (1999). The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *Journal of molecular biology* 290, 495-504.

Al-Minawi, A.Z., Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2008). The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. *Nucleic acids research* 36, 1-9.

Antoniou, A.C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkas, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leeneer, K., Fostira, F., *et al.* (2014). Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *The New England journal of medicine* 371, 497-506.

Beck, C., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2014). Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: Focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Experimental cell research*.

Betermier, M., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2014). Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS genetics* 10, e1004086.

Braithwaite, E.K., Kedar, P.S., Stumpo, D.J., Bertocci, B., Freedman, J.H., Samson, L.D., and Wilson, S.H. (2010). DNA polymerases beta and lambda mediate overlapping and independent roles in base excision repair in mouse embryonic fibroblasts. *PloS one* 5, e12229.

Brodie, K.M., and Henderson, B.R. (2012). Characterization of BRCA1 protein targeting, dynamics, and function at the centrosome: a role for the nuclear export signal, CRM1, and Aurora A kinase. *The Journal of biological chemistry* 287, 7701-7716.

Brough, R., Bajrami, I., Vatcheva, R., Natrajan, R., Reis-Filho, J.S., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). APRIN is a cell cycle specific BRCA2-interacting protein required for genome integrity and a predictor of outcome after chemotherapy in breast cancer. *The EMBO journal* 31, 1160-1176.

- Bugreev, D.V., and Mazin, A.V. (2004). Ca<sup>2+</sup> activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9988-9993.
- Buisson, R., Dion-Cote, A.M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Xia, B., and Masson, J.Y. (2010). Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nature structural & molecular biology* 17, 1247-1254.
- Buisson, R., Niraj, J., Pauty, J., Maity, R., Zhao, W., Coulombe, Y., Sung, P., and Masson, J.Y. (2014). Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase eta in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks. *Cell reports* 6, 553-564.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell* 47, 497-510.
- Chen, C.F., Chen, P.L., Zhong, Q., Sharp, Z.D., and Lee, W.H. (1999). Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G(2)/M checkpoint control. *The Journal of biological chemistry* 274, 32931-32935.
- Chen, T., Stephens, P.A., Middleton, F.K., and Curtin, N.J. (2012). Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug discovery today* 17, 194-202.
- Chin, C.F., and Yeong, F.M. (2010). Safeguarding entry into mitosis: the antephasis checkpoint. *Molecular and cellular biology* 30, 22-32.
- Ciccio, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* 40, 179-204.
- Cook, P.J., Ju, B.G., Teleso, F., Wang, X., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* 458, 591-596.
- Dansonka-Mieszkowska, A., Kluska, A., Moes, J., Dabrowska, M., Nowakowska, D., Niwinska, A., Derlatka, P., Cendrowski, K., and Kupryjanczyk, J. (2010). A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. *BMC medical genetics* 11, 20.
- Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R., and West, S.C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Molecular cell* 7, 273-282.
- De Lorenzo, S.B., Patel, A.G., Hurley, R.M., and Kaufmann, S.H. (2013). The Elephant and the Blind Men: Making Sense of PARP Inhibitors in Homologous Recombination Deficient Tumor Cells. *Frontiers in oncology* 3, 228.
- Deriano, L., and Roth, D.B. (2013). Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annual review of genetics* 47, 433-455.
- Dhillon, K.K., Swisher, E.M., and Taniguchi, T. (2011). Secondary mutations of BRCA1/2 and drug resistance. *Cancer science* 102, 663-669.
- Dray, E., Etchin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G.J., Hammel, M., Yu, X., Galkin, V.E., Liu, D., Tsai, M.S., *et al.* (2010). Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nature structural & molecular biology* 17, 1255-1259.
- Ellis, N.A., and German, J. (1996). Molecular genetics of Bloom's syndrome. *Human molecular genetics* 5 Spec No, 1457-1463.
- Feng, Z., Scott, S.P., Bussen, W., Sharma, G.G., Guo, G., Pandita, T.K., and Powell, S.N. (2011). Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 686-691.
- Fornander, L.H., Frykholm, K., Reymer, A., Renodon-Corniere, A., Takahashi, M., and Norden, B. (2012). Ca<sup>2+</sup> improves organization of single-stranded DNA bases in human Rad51 filament, explaining stimulatory effect on gene recombination. *Nucleic acids research* 40, 4904-4913.
- Gardini, A., Baillat, D., Cesaroni, M., and Shiekhhattar, R. (2014). Genome-wide analysis reveals a role for BRCA1 and PALB2 in transcriptional co-activation. *The EMBO journal* 33, 890-905.
- Grimme, J.M., Honda, M., Wright, R., Okuno, Y., Rothenberg, E., Mazin, A.V., Ha, T., and Spies, M. (2010). Human Rad52 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing via two hRad52-ssDNA complexes. *Nucleic acids research* 38, 2917-2930.

- Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B., and King, M.C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250, 1684-1689.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R.A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 8, 193-204.
- Henderson, B.R., and Eleftheriou, A. (2000). A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Experimental cell research* 256, 213-224.
- Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine* 361, 1475-1485.
- Hosoya, N., and Miyagawa, K. (2014). Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer science* 105, 370-388.
- Huen, M.S., Sy, S.M., and Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 138-148.
- Huertas, P. (2010). DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nature structural & molecular biology* 17, 11-16.
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., and Wang, H. (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22, 5834-5847.
- Iyama, T., and Wilson, D.M., 3rd (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair* 12, 620-636.
- Jasin, M., and Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a012740.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature cell biology* 8, 37-45.
- Jeggo, P.A., and Lobrich, M. (2007). DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene* 26, 7717-7719.
- Jensen, R.B., Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467, 678-683.
- Jessberger, R., Podust, V., Hubscher, U., and Berg, P. (1993). A mammalian protein complex that repairs double-strand breaks and deletions by recombination. *The Journal of biological chemistry* 268, 15070-15079.
- Jeyasekharan, A.D., Liu, Y., Hattori, H., Pisupati, V., Jonsdottir, A.B., Rajendra, E., Lee, M., Sundaramoorthy, E., Schlachter, S., Kaminski, C.F., *et al.* (2013). A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nature structural & molecular biology* 20, 1191-1198.
- Jones, S., Hruban, R.H., Kamiyama, M., Borges, M., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Palmisano, E., Brune, K., Jaffee, E.M., *et al.* (2009). Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 324, 217.
- Khadka, D.B., and Cho, W.J. (2013). Topoisomerase inhibitors as anticancer agents: a patent update. *Expert opinion on therapeutic patents* 23, 1033-1056.
- Kim, H., and D'Andrea, A.D. (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes & development* 26, 1393-1408.
- Krajewska, M., Fehrmann, R.S., Schoonen, P.M., Labib, S., de Vries, E.G., Franke, L., and van Vugt, M.A. (2014). ATR inhibition preferentially targets homologous recombination-deficient tumor cells. *Oncogene*.
- Krietsch, J., Rouleau, M., Pic, E., Ethier, C., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Masson, J.Y., Poirier, G.G., and Gagne, J.P. (2013). Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Molecular aspects of medicine* 34, 1066-1087.
- Kupfer, G.M. (2013). Fanconi anemia: a signal transduction and DNA repair pathway. *The Yale journal of biology and medicine* 86, 491-497.
- Lee, J.W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wang, Z., and Povirk, L.F. (2004). Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for

- nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *The Journal of biological chemistry* 279, 805-811.
- Li, X., and Heyer, W.D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research* 18, 99-113.
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry* 79, 181-211.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 712-720.
- Loeb, L.A., and Monnat, R.J., Jr. (2008). DNA polymerases and human disease. *Nature reviews Genetics* 9, 594-604.
- Lok, B.H., Carley, A.C., Tchang, B., and Powell, S.N. (2013). RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination. *Oncogene* 32, 3552-3558.
- Lok, B.H., and Powell, S.N. (2012). Molecular pathways: understanding the role of Rad52 in homologous recombination for therapeutic advancement. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 6400-6406.
- Lupo, B., and Trusolino, L. (2014). Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation in cancer: Old and new paradigms revisited. *Biochimica et biophysica acta* 1846, 201-215.
- Ma, J., Cai, H., Wu, T., Sobhian, B., Huo, Y., Alcivar, A., Mehta, M., Cheung, K.L., Ganesan, S., Kong, A.N., *et al.* (2012). PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function. *Molecular and cellular biology* 32, 1506-1517.
- Maga, G., Villani, G., Crespan, E., Wimmer, U., Ferrari, E., Bertocci, B., and Hubscher, U. (2007). 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature* 447, 606-608.
- Mahajan, K.N., Nick McElhinny, S.A., Mitchell, B.S., and Ramsden, D.A. (2002). Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 22, 5194-5202.
- Martinez, S.F., Renodon-Corniere, A., Nomme, J., Eveillard, D., Fleury, F., Takahashi, M., and Weigel, P. (2010). Targeting human Rad51 by specific DNA aptamers induces inhibition of homologous recombination. *Biochimie* 92, 1832-1838.
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., Evans, D.G., Izatt, L., Eeles, R.A., Adlard, J., *et al.* (2013). Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *Journal of the National Cancer Institute* 105, 812-822.
- Mazin, A.V., Alexeev, A.A., and Kowalczykowski, S.C. (2003). A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *The Journal of biological chemistry* 278, 14029-14036.
- Mazin, A.V., Mazina, O.M., Bugreev, D.V., and Rossi, M.J. (2010). Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA repair* 9, 286-302.
- McIlwraith, M.J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., and West, S.C. (2005). Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Molecular cell* 20, 783-792.
- McKinnon, P.J., and Caldecott, K.W. (2007). DNA strand break repair and human genetic disease. *Annual review of genomics and human genetics* 8, 37-55.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., *et al.* (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.
- Miller, K.A., Sawicka, D., Barsky, D., and Albala, J.S. (2004). Domain mapping of the Rad51 paralog protein complexes. *Nucleic acids research* 32, 169-178.
- Mladenov, E., and Iliakis, G. (2011). The Pathways of Double-Strand Break Repair. In *DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*, D.F. Storici, ed. (InTech).



- Modesti, M., Budzowska, M., Baldeyron, C., Demmers, J.A., Ghirlando, R., and Kanaar, R. (2007). RAD51AP1 is a structure-specific DNA binding protein that stimulates joint molecule formation during RAD51-mediated homologous recombination. *Molecular cell* 28, 468-481.
- Moldovan, G.L., Madhavan, M.V., Mirchandani, K.D., McCaffrey, R.M., Vinciguerra, P., and D'Andrea, A.D. (2010). DNA polymerase POLN participates in cross-link repair and homologous recombination. *Molecular and cellular biology* 30, 1088-1096.
- Murayama, Y., Kurokawa, Y., Mayanagi, K., and Iwasaki, H. (2008). Formation and branch migration of Holliday junctions mediated by eukaryotic recombinases. *Nature* 451, 1018-1021.
- Murphy, A.K., Fitzgerald, M., Ro, T., Kim, J.H., Rabinowitsch, A.I., Chowdhury, D., Schildkraut, C.L., and Borowiec, J.A. (2014). Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery. *The Journal of cell biology*.
- Myers, J.S., and Cortez, D. (2006). Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *The Journal of biological chemistry* 281, 9346-9350.
- Nguyen, K.T., Holloway, M.P., and Altura, R.A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *International journal of biochemistry and molecular biology* 3, 137-151.
- Nomme, J., Takizawa, Y., Martinez, S.F., Renodon-Corniere, A., Fleury, F., Weigel, P., Yamamoto, K., Kurumizaka, H., and Takahashi, M. (2008). Inhibition of filament formation of human Rad51 protein by a small peptide derived from the BRC-motif of the BRCA2 protein. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 13, 471-481.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics* 36, 617-656.
- O'Driscoll, M., Gennery, A.R., Seidel, J., Concannon, P., and Jeggo, P.A. (2004). An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA repair* 3, 1227-1235.
- Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., and Venkataraman, A.R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 420, 287-293.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature reviews Cancer* 6, 789-802.
- Pommier, Y. (2013). Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS chemical biology* 8, 82-95.
- Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., et al. (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature genetics* 39, 165-167.
- Reddy, G., Golub, E.I., and Radding, C.M. (1997). Human Rad52 protein promotes single-strand DNA annealing followed by branch migration. *Mutation research* 377, 53-59.
- Renodon-Cornière, A., Weigel, P., Le Breton, M., and Fleury, F. (2013). New Potential Therapeutic Approaches by Targeting Rad51- Dependent Homologous Recombination. In *New Research Directions in DNA Repair*, P.C. Chen, ed. ( InTech).
- Reymer, A., Frykholm, K., Morimatsu, K., Takahashi, M., and Norden, B. (2009). Structure of human Rad51 protein filament from molecular modeling and site-specific linear dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13248-13253.
- Rodrigue, A., Coulombe, Y., Jacquet, K., Gagne, J.P., Roques, C., Gobeil, S., Poirier, G., and Masson, J.Y. (2013). The RAD51 paralogs ensure cellular protection against mitotic defects and aneuploidy. *Journal of cell science* 126, 348-359.
- Rodrigue, A., Lafrance, M., Gauthier, M.C., McDonald, D., Hendzel, M., West, S.C., Jasin, M., and Masson, J.Y. (2006). Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *The EMBO journal* 25, 222-231.

- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology* 146, 905-916.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H., and Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology* 23, 5706-5715.
- Rothkamm, K., and Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5057-5062.
- Roy, R., Chun, J., and Powell, S.N. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature reviews Cancer* 12, 68-78.
- Sakai, W., Swisher, E.M., Jacquemont, C., Chandramohan, K.V., Couch, F.J., Langdon, S.P., Wurz, K., Higgins, J., Villegas, E., and Taniguchi, T. (2009). Functional restoration of BRCA2 protein by secondary BRCA2 mutations in BRCA2-mutated ovarian carcinoma. *Cancer research* 69, 6381-6386.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* 73, 39-85.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., and Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* 145, 529-542.
- Schlacher, K., Wu, H., and Jasin, M. (2012). A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer cell* 22, 106-116.
- Schulz-Ertner, D., Jakel, O., and Schlegel, W. (2006). Radiation therapy with charged particles. *Seminars in radiation oncology* 16, 249-259.
- Scully, R., and Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation research* 750, 5-14.
- Shahar, O.D., Kalousi, A., Eini, L., Fisher, B., Weiss, A., Darr, J., Mazina, O., Bramson, S., Kupiec, M., Eden, A., *et al.* (2014). A high-throughput chemical screen with FDA approved drugs reveals that the antihypertensive drug Spironolactone impairs cancer cell survival by inhibiting homology directed repair. *Nucleic acids research* 42, 5689-5701.
- Sharma, S., Helchowski, C.M., and Canman, C.E. (2013). The roles of DNA polymerase zeta and the Y family DNA polymerases in promoting or preventing genome instability. *Mutation research* 743-744, 97-110.
- Sharma, S., Hicks, J.K., Chute, C.L., Brennan, J.R., Ahn, J.Y., Glover, T.W., and Canman, C.E. (2012). REV1 and polymerase zeta facilitate homologous recombination repair. *Nucleic acids research* 40, 682-691.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer* 3, 155-168.
- Shiotani, B., and Zou, L. (2009). Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Molecular cell* 33, 547-558.
- Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research* 108, 73-112.
- Southey, M.C., Teo, Z.L., Dowty, J.G., Odefrey, F.A., Park, D.J., Tischkowitz, M., Sabbaghian, N., Apicella, C., Byrnes, G.B., Winship, I., *et al.* (2010). A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 12, R109.
- Suarez, S.C., Toffton, S.M., and McCulloch, S.D. (2014). Biochemical analysis of DNA polymerase eta fidelity in the presence of replication protein A. *PLoS one* 9, e97382.
- Sung, P., Krejci, L., Van Komen, S., and Sehorn, M.G. (2003). Rad51 recombinase and recombination mediators. *The Journal of biological chemistry* 278, 42729-42732.
- Suwaki, N., Klare, K., and Tarsounas, M. (2011). RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Seminars in cell & developmental biology* 22, 898-905.

- Svendsen, J.M., and Harper, J.W. (2010). GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution. *Genes & development* 24, 521-536.
- Swuec, P., and Costa, A. (2014). Molecular mechanism of double Holliday junction dissolution. *Cell & bioscience* 4, 36.
- Sy, S.M., Huen, M.S., and Chen, J. (2009). MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination. *The Journal of biological chemistry* 284, 21127-21131.
- Symington, L.S. (2014). End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L.H., and Takeda, S. (2001). Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Molecular and cellular biology* 21, 2858-2866.
- Taylor, A.M., Groom, A., and Byrd, P.J. (2004). Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA repair* 3, 1219-1225.
- Thornton, T.M., and Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *International journal of biological sciences* 5, 44-51.
- Turcotte, V., Fortin, S., Vevey, F., Coulombe, Y., Lacroix, J., Cote, M.F., Masson, J.Y., and R, C.G. (2012). Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of novel substituted N-phenyl ureidobenzenesulfonate derivatives blocking cell cycle progression in S-phase and inducing DNA double-strand breaks. *Journal of medicinal chemistry* 55, 6194-6208.
- Turner, J.G., Dawson, J., Cubitt, C.L., Baz, R., and Sullivan, D.M. (2014). Inhibition of CRM1-dependent nuclear export sensitizes malignant cells to cytotoxic and targeted agents. *Seminars in cancer biology* 27, 62-73.
- Turner, J.G., Dawson, J., and Sullivan, D.M. (2012). Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochemical pharmacology* 83, 1021-1032.
- Van Dyck, E., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. (1999). Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 398, 728-731.
- Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12871-12876.
- Wang, H.F., Takenaka, K., Nakanishi, A., and Miki, Y. (2011). BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with the Rho effector kinase ROCK2. *Cancer research* 71, 68-77.
- Wilson, M.A., Kwon, Y., Xu, Y., Chung, W.H., Chi, P., Niu, H., Mayle, R., Chen, X., Malkova, A., Sung, P., *et al.* (2013). Pif1 helicase and Poldelta promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature* 502, 393-396.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789-792.
- Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., *et al.* (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265, 2088-2090.
- Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J., and Livingston, D.M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular cell* 22, 719-729.
- Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S.H., Fabrizio, L.A., Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K., *et al.* (2009). WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* 457, 57-62.
- Yan, J., and Jetten, A.M. (2008). RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. *Cancer letters* 271, 179-190.

- Yoon, J.H., Roy Choudhury, J., Park, J., Prakash, S., and Prakash, L. (2014). A role for DNA polymerase theta in promoting replication through oxidative DNA lesion, thymine glycol, in human cells. *The Journal of biological chemistry* 289, 13177-13185.
- Yu, X., Jacobs, S.A., West, S.C., Ogawa, T., and Egelman, E.H. (2001). Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8419-8424.
- Zenvirt, S., Kravchenko-Balasha, N., and Levitzki, A. (2010). Status of p53 in human cancer cells does not predict efficacy of CHK1 kinase inhibitors combined with chemotherapeutic agents. *Oncogene* 29, 6149-6159.
- Zietlow, L., Smith, L.A., Bessho, M., and Bessho, T. (2009). Evidence for the involvement of human DNA polymerase N in the repair of DNA interstrand cross-links. *Biochemistry* 48, 11817-11824.

## Annexes

**Annexe 1.** *Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer*, Biochemical Journal (2014)

Hyperlien : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24870022>

**Annexe 2.** *Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase  $\eta$  in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks*, Cell Reports (2014)

Hyperlien : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24485656>

**Annexe 3.** *GST-His purification: A Two-step Affinity Purification Protocol Yielding Fulllength Purified Proteins*, Journal of Visualized Experiments (2013)

Hyperlien : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24193370>