

Thèse de Doctorat

Denis VELIC

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Aspects moléculaires et cellulaires*

Spécialité : *Biochimie, biologie moléculaire*

Unité de recherche : *UMR 6286 UFIP – Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines*

Soutenue le *22 juin 2016*

Thèse N° :

Elaboration et Analyse de Molécules Inhibitrices de la Réparation de l'ADN par Recombinaison Homologue

JURY

Rapporteurs :

Jacques HUOT, Professeur Universitaire, Université Laval de Québec
Bernard LOPEZ, Directeur de Recherche, Université Paris Sud

Examineurs :

Fabrice FLEURY, Professeur Universitaire, Université de Nantes
Jean-Yves MASSON, Professeur Universitaire, Université Laval de Québec

Invité(s) :

Isabelle CORRE, Chargée de Recherche, CNRS Nantes

Directeur de Thèse :

Fabrice FLEURY, Professeur Universitaire, Université de Nantes

Co-directeur de Thèse :

Jean-Yves MASSON, Professeur Universitaire, Université Laval de Québec

Résumé

Les cellules humaines sont soumises à des stress induisant des cassures double-brin de l'ADN (CDB). Ces CDB sont réparées notamment par la recombinaison homologe, impliquant les protéines RAD51 et RAD52. Une stratégie thérapeutique émergente est de développer des molécules inhibant RAD51 ou RAD52 afin d'accentuer l'instabilité génétique et la mort de la cellule cancéreuse. En effet, dans certains cancers, l'activité de RAD51 est dérégulée promouvant la prolifération tumorale. Il existe plusieurs molécules inhibitrices de RAD51 et nous nous sommes intéressés au DIDS dont le mode d'action n'a pas encore été déterminé. Concernant RAD52, une létalité synthétique a été montrée lorsque celle-ci est inactivée dans des cellules déficientes en *BRCA1*, *BRCA2* ou *PALB2*, trois gènes mutés dans de nombreux cancers. Récemment, trois types de molécules inhibitrices de RAD52 ont été mis en évidence.

Nous avons tout d'abord étudié l'impact du DIDS ainsi que des molécules dérivées afin de comprendre le mécanisme mis en jeu. Nous avons montré que le DIDS, ainsi que ses dérivés inhibent la liaison de RAD51 à l'ADN. Ces molécules empêchent la formation du nucléofilament entraînant une diminution du nombre de foyers RAD51.

Nous avons développé une méthode de criblage par fluorescence pour évaluer l'effet d'une banque de 696 molécules sur la capacité de RAD52 à hybrider deux ADNsb. Deux molécules capables d'inhiber la fonction d'hybridation de RAD52 ont été mises au jour. *In vivo*, elles entraînent une diminution de la survie de cellules déficientes en *PALB2*.

La recherche et le développement de nouveaux inhibiteurs de RAD51 et RAD52 constituent des stratégies thérapeutiques d'avenir.

Abstract

Human cells are subjected to stress inducing DNA double-strand breaks (DSB). DSB are repaired in particular by homologous recombination, involving RAD51 and RAD52 proteins. An emerging therapeutic strategy is to develop RAD51 or RAD52 inhibitors that promote genetic instability and induce cancer cell death. In some cancers, the activity of RAD51 is deregulated promoting tumor proliferation. There are several RAD51 inhibitors and we focused on DIDS, whose mechanism of action has not been yet determined. Concerning RAD52, a synthetic lethality has been shown when its gene is inactivated in *BRCA1*, *BRCA2* or *PALB2* deficient cells, those genes being mutated in various cancers. Recently, three types of molecules inhibiting RAD52 were highlighted.

We studied the impact of DIDS and its derivatives to understand the mechanism involved in the inhibition. We showed that DIDS and its derivatives inhibit RAD51 DNA binding function. These molecules prevent the formation of nucleofilament leading to a decrease in RAD51 foci formation.

We have developed a fluorescent method of screening to evaluate the effect of a library of 696 molecules on the RAD52 ability to hybridize two ssDNA. Two molecules were able to inhibit the RAD52 hybridization function. *In vivo*, they induce a decrease in *PALB2* deficient cell survival.

Research and development of new RAD51 and RAD52 inhibitors represent promising therapeutic strategies.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vi
Liste des figures.....	x
Liste des abbréviations	xii
Remerciements	xix
Avant-propos	xxiii
Chapitre 1 - Introduction	4
1. Les dommages à l'ADN et les voies de réparation des cassures double-brin	4
1.1. Les facteurs exogènes.....	4
1.2. Les facteurs endogènes.....	4
1.3. L'utilisation de facteurs inducteurs de CDB	5
1.4. Les principales voies de réparation de l'ADN.....	7
1.5. Détection de la cassure double-brin et initiation de la réparation	11
2. Deux protéines au cœur de la RH : RAD51 et RAD52	22
2.1. RAD51 ou la protéine centrale de la recombinaison homologue	22
2.2. RAD52, une protéine de la recombinaison homologue qui révèle peu à peu son importance	36
3. Le cancer, les traitements associés et les liens avec la recombinaison homologue.....	39
3.1. Les traitements thérapeutiques ciblant le cancer	40
3.2. La disponibilité du médicament	40
3.3. La létalité synthétique.....	40
3.4. L'inhibition de RAD51.....	42
3.5. Parmi les inhibiteurs de RAD51, le DIDS.....	43
3.6. Un point sur les inhibiteurs connus de RAD52	45
Chapitre 2 – DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer	52
1. Introduction	56
2. The ATM and ATR Kinases.....	58
2.1. Dual ATM/ATR Inhibitors.....	59
2.2. Selective ATM Inhibitors	60
2.3. Selective ATR Inhibitors.....	62
3. The Chk1 Kinase	65
3.1. Roles of Chk1 in the DNA Damage Response.....	65

3.2. Phosphorylation of Chk1	65
3.3. Targeting Chk1 as a Novel Strategy in Cancer Therapy	66
3.4. Inhibitors of Chk1	66
4. The Chk2 Kinase	69
4.1. PV1019 ([7-Nitro-1H-Indole-2-Carboxylic Acid {(4-[1-(Guanidinohydrazono)-Ethyl]-Phenyl}-Amide)	70
4.2. CCT241533	70
4.3. 2-(4-(4-Chlorophenoxy)Phenyl)-1H-Benzimidazole-5-Carboxamide Hydrate/BML277/C3742.....	71
4.4. Debromohymenialdisine and Analogues.....	71
4.5. VRX0466617.....	71
5. The Poly(ADP) Ribose Polymerase	72
5.1. Talazoparib (BMN 673; BioMarin Pharmaceutical Inc., Novato, CA, USA).....	74
5.2. Veliparib (ABT-888; AbbVie Inc., North Chicago, IL, USA).....	75
5.3. Rucaparib (AG-014699; Clovis Oncology, Boulder, CO, USA)	75
5.4. Niraparib (MK-4827; Tesaro Inc., Waltham, MA, USA)	76
5.5. INO-1001 (Selleck Chemicals, Euromedex, France)	76
5.6. E7016 (Eisai Co., Ltd; Tokyo, Japan)	76
5.7. CEP-9722 (Cephalon, Inc.; Frazer, PA, USA).....	77
5.8. PARP Trapping: Mechanism of Action of PARP Inhibitors.....	77
6. The MRE11-RAD50-NBS1 Complex.....	80
6.1. Mirin.....	82
6.2. PFM39, PFM01 and PFM03	83
7. The RAD51 Protein, a Central HR Protein	84
7.1. DIDS.....	84
7.2. Halenaquinone/Xestoquinone.....	85
7.3. B02 and Derivatives	85
7.4. RI-1 and RI-2.....	86
7.5. IBR2 and IBR120	87
8. The RAD52 Protein.....	88
9. The Non-Homologous End-Joining (NHEJ) Proteins	89
9.1. Selective DNA-PK Inhibitors.....	91
9.2. Nucleotide-Based Inhibitors of DNA-PK.....	95
9.3. Ku70/Ku80 Inhibitors.....	96
9.4. DNA Ligase IV Inhibitors	96
9.5. XRCC4 Inhibitors.....	97
9.6. Alt-NHEJ Inhibitors	97
10. Conclusions	98

Chapitre 3 – Investigation of the Interaction of RAD51 Inhibitor DIDS with Human and Bovine Serum Albumins. Optical Spectroscopy and IsoThermal Calorimetry Approaches.	124
1. Introduction	129
2. Results and Discussion.....	130
2.1. Effect of solvent polarity on the physico-chemical proprieties of DIDS.	130
2.2. Evidence of the interaction of DIDS with human and bovine serum albumin.	130
2.3. Identification of structural determinants of DIDS involved in the interaction	131
2.4. Localization of DIDS binding site in HSA.....	132
3. Conclusion.....	134
4. Materials and Methods	135
4.1. Chemicals and proteins.....	135
4.2. UV-Visible spectroscopy.....	135
4.3. Fluorescence spectroscopy	135
4.4. Isothermal titration calorimetry (ITC).....	135
4.5. Circular Dichroism measurements	136
Chapitre 4 – Analyse de l’impact du DIDS et de ses dérivés sur RAD51 (manuscrit en préparation) 152	
1. Introduction	153
2. Matériel et méthodes	154
2.1. Production RAD51 et RAD52.....	154
2.2. Production du plasmide surenroulé	154
2.3. Test de D-loop	154
2.4. Etude de la liaison à l’ADNsb	155
2.5. Test d’hybridation	155
2.6. Immunofluorescence	155
2.7. Test d’efficacité de la RH.....	156
2.8. Western-blot	157
2.9. Cytométrie en flux.....	157
2.10. Test de survie.....	157
3. Résultats	157
3.1. Le DIDS et ses dérivés N3 et NAc inhibent l’association RAD51-ADNsb.....	158
3.2. Le DIDS et les dérivés N3 et NAc inhibent la formation de la D-loop par RAD51	160
3.3. Le DIDS et les dérivés N3 et NAc empêchent également la formation des foyers RAD51	160
3.4. L’impact du DIDS sur l’efficacité de la recombinaison homologe intracellulaire.....	162
3.5. Le DIDS et les dérivés N3 et NAc inhibent également l’hybridation par RAD52.....	163
3.6. Le DIDS et les dérivés N3 et NAc n’ont pas d’effet dans la cellule sur RAD52	165
4. Discussion	165
5. Conclusion.....	167

Chapitre 5 – Recherche de nouveaux inhibiteurs de RAD52 (résultats préliminaires)	171
1. Introduction	172
2. Matériel et méthodes	173
2.1. ADNsb fluorescents.....	173
2.2. Production et purification de RAD52.....	173
2.3. Banque de molécules.....	173
2.4. Test d'hybridation par fluorescence	174
2.5. Test de survie cellulaire.....	174
3. Résultats	174
3.1. Mise en place de la méthode de criblage.....	174
3.2. Deux molécules ont un effet sur la fonction d'hybridation de RAD52	175
3.3. Les deux molécules diminuent la survie cellulaire des cellules EUFA1341.....	176
4. Discussion	177
5. Conclusion.....	178
Chapitre 6 - Discussion	183
1. Les thérapies anticancéreuses et l'évolution des stratégies	183
1.1. Des premières observations aux premiers traitements.....	183
1.2. Les traitements actuels pour lutter contre le cancer.....	184
1.3. Les inhibiteurs de kinase dans le traitement contre le cancer.....	186
1.4. Le traitement des cancers en ciblant les protéines de la réparation de l'ADN	187
2. Etude de l'interaction entre le DIDS et les albumines sériques.....	190
2.1. Caractérisation de l'interaction entre le DIDS et les albumines sériques.....	190
2.2. Localisation du site de liaison du DIDS sur l'ASH.....	192
2.3. La biodisponibilité du médicament	193
3. L'inhibition de RAD51 par le DIDS et les dérivés	195
3.1. Le DIDS comme inhibiteur de RAD51	195
3.2. Confirmation de l'inhibition et détermination des groupements associés à l'inhibition .	195
4. L'inhibition de RAD52 par SL52.....	197
4.1. La recherche d'inhibiteurs de RAD52.....	197
4.2. La mise en évidence de deux molécules inhibitrices.....	198
Conclusion.....	201
Références	204
Annexes.....	232
Annexe 1 – Investigations sur la réponse aux dommages de l'ADN vis-à-vis de SFOM-0046, une nouvelle petite molécule induisant des cassures doublee-brin	234

Liste des figures

Figure 1 - Les différents agents inducteurs de lésions à l'ADN et leurs conséquences pour la cellule.	6
Figure 2 - Les principales voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN.....	10
Figure 3 - Détection et signalisation de la cassure double-brin.	12
Figure 4 - Mode d'activation d'ATR dans la signalisation des CDB.....	13
Figure 5 - Les voies de NHEJ canonique et alternative.	16
Figure 6 - Les différentes étapes de la recombinaison homologe et les structures de l'ADN associées.	19
Figure 7 - Réparation des CDB par l'hybridation simple-brin.	22
Figure 8 - Conservation des domaines de RAD51 à travers l'évolution.	24
Figure 9 - Domaines de la protéine RAD51 humaine.	27
Figure 10 - Modèle de recherche d'homologie par RAD51.	31
Figure 11 - Domaines de la protéine RAD52 humaine.	38
Figure 12 - Modèle structural de l'anneau de RAD52 complexé à l'ADNsb et l'ADNdb.	38
Figure 13 - RAD52 s'auto-associe pour former des structures en anneau.	39
Figure 14 – Fonctions et phénotypes des protéines BRCA2 et RAD52 dans différents organismes.....	39
Figure 15 - Principe de létalité synthétique.....	42
Figure 16 - Structure chimique du DIDS.	44
Figure 17 – Structures chimiques du DIDS et de ses dérivés.	158
Figure 18 – Effet du DIDS et de ses dérivés sur la liaison de RAD51 à l'ADNsb et sur la formation de la D-loop.	159
Figure 19 – Effet du DIDS et de ses dérivés sur la formation des foyers de RAD51 et γ -H2AX après induction de CDB par la néocarzinostatine.	161
Figure 20 - Expression d'I-SceI taggé HA après transfection dans des cellules RG37.....	162
Figure 21- Evaluation de l'efficacité de la RH dans des cellules transfectées avec I-SceI en présence du DIDS ou du dérivé N3.....	163
Figure 22 – Principe de la méthode de mesure par fluorescence pour évaluer la fonction d'hybridation de RAD52.....	164
Figure 23 – Effet du DIDS et de ses dérivés sur la fonction d'hybridation de RAD52.....	164
Figure 24 – Impact du DIDS et de ses dérivés sur la viabilité de cellules déficientes en <i>PALB2</i>	165
Figure 25 - Effet de l'hybridation entre les deux ADNsb en absence et en présence de RAD52.	175
Figure 26 - Effet des molécules SL52-1 et SL52-2 sur l'hybridation d'ADNsb par RAD52.	175
Figure 27 - Structures des molécules SL52-1 et SL52-2.....	176
Figure 28 - Impact des molécules SL52-1 et SL52-2 sur la survie cellulaire de cellules déficientes en <i>PALB2</i>	176

Liste des abbréviations

53BP1 : *tumor suppressor p53-binding protein 1*

9-1-1 : complexe RAD9-RAD1-HUS1

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNdb : ADN double-brin

ADNsb : ADN simple-brin

APB : *ALT-associated PML bodies*

APE1 : *apurinic-apurymidinic endonuclease 1*

ARN : acide ribonucléique

ASB : Albumine Sérique Bovine (ou BSA, pour *Bovine Serum Albumin*)

ASH : Albumine Sérique Humaine (ou HSA, pour *Human Serum Albumin*)

ATM : *ataxia telangiectasia mutated*

ATP : adénosine-5'-triphosphate

ATR : *ataxia telangiectasia and Rad3 related*

ATRIP : *ATR interacting protein*

BER : *base excision repair* ou réparation par excision de base (REB)

BLM : *Bloom syndrom protein*

Brc-2 : *BRCa homolog (tumor suppressor gene Brca1)*

BRCA1 : *Breast cancer type 1 susceptibility protein*

BRCA2 : *Breast cancer type 2 susceptibility protein*

BRCT : *BRCA1 C-terminus domain*

Brh2 : *Rad51-associated protein Brh2*

c-Abl : *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*

CDB : cassure double-brin

CHK1 : *checkpoint kinase 1*

CHK2 : *checkpoint kinase 2*

CtIP : *C-terminal binding protein interacting protein*

DIDS : Acide 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbènedisulfonique

D-loop : *displacement-loop* ou boucle de déplacement

DMC1 : *meiotic recombination protein DMC1/LIM15 homolog*

DNA2 : *DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2*

DNA-PK : *DNA-dependent protein kinase*

DNA-PKcs : *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*

DRO : *dérivé réactif de l'oxygène*

DSBR : *double-strand break repair*

DSS1 : *26S proteasome complex subunit DSS1*

EGR1 : *early growth response protein 1*

EPR : *Enhanced Permeability and Retention*

ERCC1 : *DNA excision repair protein ERCC-1*

EXO1 : *exonuclease 1*

FA : *Fanconi anemia* ou *anémie de Fanconi (AF)*

FANCA/B/C/D2/E/F/G/I/M : *Fanconi anemia group A/B/C/D2/E/F/G/I/M protein*

FANCL : *E3 ubiquitin-protein ligase FANCL*

FDA : *Food and Drug Administration* ou *Agence Américaine des produits alimentaires et médicamenteux*

GEN1 : *flap endonuclease GEN homolog 1*

H2AX : *histone H2AX*

HhH : *Helix-hairpin-Helix motif* ou *motif hélice-boucle-hélice*

ICL : *intercrossed link* ou *pontage interbrin*

Ku70 : *X-ray repair cross-complementing protein 6*

Ku80 : *X-ray repair cross-complementing protein 5*

NCS : *néocarzinostatine*

NES : *nuclear export signal/sequence* pour *signal/séquence d'exportation nucléaire*

NLS : *nuclear localization signal/sequence* pour *signal/séquence de localisation nucléaire*

NHEJ : *non-homologous end joining* ou *jonction des extrémités non-homologues*

MDC1 : *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*

MMR : *mismatch repair* ou *réparation des mésappariements (RM)*

MRE11 : *double-strand break repair protein MRE11A*

NBS1 : *Nijmegen breakage syndrom protein 1*

NER : *nucleotide excision repair* ou réparation par excision de nucléotide (REN)

PALB2 : *partner and localizer of BRCA2*

PARP : *poly [ADP-ribose] polymerase 1*

PCNA : *proliferating cell nuclear antigen*

PM : *polymerization motif* ou motif de polymérisation (PM)

PNPK : *polynucleotide kinase/phosphatase*

PTIP : *PAX-interacting protein 1*

RAD17 : *cell cycle checkpoint protein RAD17*

RAD18 : *E3 ubiquitin-protein ligase RAD18*

RAD50 : *DNA repair protein RAD50*

RAD51 : *DNA repair protein RAD51 homolog 1*

RAD51-AP1 : *RAD51-associated protein 1*

RAD51B/C/D : *DNA repair protein RAD51 homolog 2/3/4*

RAD52 : *DNA repair protein RAD52 homolog*

RAD54 : *DNA repair and recombination protein RAD54-like*

RadA : *DNA repair and recombination protein RadA*

RAP80 : *BRCA1-A complex subunit RAP80*

RecA : *DNA recombination protein RecA*

RFC : *replication factor C*

RH : *recombinaison homologue (homologous recombination)*

RIF1 : *telomerase-associated protein RIF1*

RMI : *RecQ-mediated genome instability protein 1*

RNF8/RNF168/RNF169 : *E3 ubiquitin-protein ligase RNF8/RNF168/RNF169*

RPA : *replication protein A*

SDSA : *synthesis-dependent strand annealing*

SLX1/4 : *structure-specific endonuclease subunit SLX1/SLX4*

SSA : *single-strand annealing* ou hybridation simple-brin (HSB)

STAT5 : *signal transducer and activator of transcription 5*

SWS1 : *Zinc-finger SWIM domain-containing protein 1*

SWSAP1 : *SWS1-associated protein 1*

TDP1 : *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*

TFIIH : *transcription factor II human*

Top3 α : *DNA-topoisomerase 3-alpha*

TOPBP1 : *DNA-topoisomerase 2-binding protein*

UV : rayonnement ultraviolet

V(D)J : *variable (diversity) and variability*

VEGF : *vascular endothelium growth factor* ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

WRN : *Werner syndrom ATP-dependent helicase*

XLJ : *XRCC4-like factor / non-homologous end-joining factor 1 / Cernunos*

XPA/C/F/G : *DNA repair protein complementing XP-A/C/F/G cells*

XRCC1/2/3/4 : *X-ray repair cross-complementing protein 1/2/3/4*

*« Le succès, c'est aller d'échec en échec
sans perdre son enthousiasme »*

Winston Churchill

Remerciements

Ces années de doctorat que j'ai vécues à travers une cotutelle entre la France et le Québec ont été très enrichissantes. Cela n'aura pas été possible sans la contribution de plusieurs personnes qui m'ont accompagné dans mon épanouissement aussi bien personnel que professionnel.

La réalisation de ce projet a été possible grâce à l'entente de mes deux directeurs de recherche passionnés par leurs travaux qui m'ont ouvert grand leurs portes, les Pr Fabrice Fleury et Pr Jean-Yves Masson.

Je tenais tout d'abord à remercier Fabrice de m'avoir offert la possibilité d'effectuer ces trois années de thèse. Après avoir séjourné dans le laboratoire durant mon stage de Master 1, je te remercie de m'avoir fait confiance pour prendre ce projet en main et de m'avoir donné l'opportunité de prendre part à l'aventure d'une thèse en cotutelle. Ton enthousiasme, la liberté que tu m'as laissée pour diriger le projet m'ont aidé dans mon épanouissement scientifique et également personnel.

Je souhaite également remercier Jean-Yves de m'avoir fait confiance, malgré la distance, au début de ma thèse. J'ai énormément appris avec toi que ce soit d'un point de vue humain, par ta générosité, ton écoute et ton attention, mais également d'un point de vue scientifique pour ta rigueur, tes connaissances et ton envie de faire progresser tes étudiants. Ton envie de m'impliquer dans la vie du laboratoire, de développer mes projets, de collaborer avec les autres étudiants, d'initier de nouveaux projets encore inexplorés dans l'équipe ont participé à mon épanouissement.

Je ne doute pas que l'apport de mes deux directeurs de recherche me sera très précieuse dans mon avenir professionnel, un grand merci à vous deux.

Je souhaite également remercier le Dr Sébastien Fortin pour m'avoir impliqué dans les différents projets liant son laboratoire à celui de Jean-Yves. Les discussions scientifiques sur la chimie m'ont beaucoup apporté et sa bonhomie a été très agréable à chaque rencontre.

Le bon déroulement de ces trois années de thèse n'a été possible que par la présence de personnes très plaisantes au sein des deux laboratoires dans lesquels j'ai séjourné. Je tiens tout d'abord à remercier les directeurs des deux laboratoires de m'avoir accueilli en leur sein, le

Dr Charles Tellier au sein de l'UFIP et le Dr Serge Rivest au sein du centre de recherche du CHU de Québec.

Je veux remercier les membres du laboratoire de l'UFIP que j'ai côtoyé plus ou moins longtemps et qui ont été des partenaires de travail très agréables. Je pense ainsi à Damien pour son humour parfois douteux mais toujours vif, Nizar pour son implication dans mes débuts au laboratoire et sa ressemblance frappante avec Faudel, Magali qui m'a encadré pendant mon stage de Master 1 et m'a enseigné les bases fondamentales de la biologie moléculaire. Je tiens également à remercier Sébastien que je n'ai pas eu le temps de côtoyer assez longtemps mais qui m'aura légué des résultats très précieux pour l'initiation de ma thèse. Merci également à Cathy pour sa disponibilité et sa gentillesse, à Pierre pour sa bonhomie, Milena pour sa bonté et dont l'aide a été très précieuse dans les derniers mois de ma thèse, Gwennina pour sa joie de vivre permanente, Emmanuelle pour son aide dans les expériences et son opiniâtreté, Houda pour sa vivacité d'esprit et sa gaieté, Yvonnick pour sa disponibilité et Carine dont le travail est essentiel au bon fonctionnement du laboratoire.

Plusieurs personnes se sont succédées dans le laboratoire et je veux leur adresser un remerciement. Je pense à Rodolphe, Emmanuelle et Anaïs que j'ai pu côtoyé pendant une partie de ma thèse.

Un doctorat n'est pas de tout repos, et la présence de mes deux collègues doctorants dans le bureau aura été une vraie bouffée d'air frais. J'adresse un grand merci à celui qui m'a fait m'intéresser à l'enseignement, m'a accompagné à la paillasse, m'a initié aux joies de la chasse au frelon et pour qui j'ai une grande estime de l'humour, le co-directeur du comité de la blague : Brendan. Ce fut un plaisir de partager ces années avec toi. Je veux également remercier le meilleur doctorant-stagiaire tout droit venu de Charente armé de ses poches et ses chocolatinnes (et raisintines), l'expert de la vidéo dans le foot et de l'OM, M. Florian Lafond. Cela a été un bonheur de te connaître et de partager le bureau et les soirées en ta compagnie.

Je tiens également à remercier toutes les étudiants et personnels que j'ai pu côtoyé durant ma thèse. Je pense ainsi à Mat(T)ieu le ténébreux (ou Julien, je ne sais plus), Nadège, Swapnil, Magalie, Johann I, Benoît, Iyanar, David, Vala, Stan, Johann II, Samir, Nader, Maxime et Kévin avec qui j'ai passé d'inoubliables moments aussi bien dans l'enceinte du laboratoire qu'à l'extérieur.

Je souhaite tout particulièrement adresser mes remerciements à deux personnes qui ont été très précieuses pour moi durant ces trois années. Je remercie Marine (ma collègue de cotutelle) de m'avoir accompagné tout au long de ces trois années, d'avoir partagé d'inoubliables moments (ainsi qu'un sac) au laboratoire ou à l'extérieur. Je tiens ensuite à remercier Simon qui m'accompagne depuis trop longtemps dans les aventures de la vie, et cela malgré la distance. Je te suis grandement reconnaissant d'être un ami fidèle au-delà du fait d'avoir été un excellent collègue doctorant.

Je souhaite adresser mes remerciements aux membres du centre de recherche à Québec, que ce soit les personnes qui s'occupent de toute la logistique et à l'organisation nécessaire au bon fonctionnement du centre mais également les collègues scientifiques dont les travaux restent des sources de réflexion perpétuelles.

Je veux adresser des remerciements particuliers à tous les membres de l'équipe du Dr Jean-Yves Masson qui m'ont accueilli les bras ouverts. Je tiens à saluer tout particulièrement les piliers de l'équipe, à savoir Yan, l'homme à tout faire qui a toujours une solution à chaque problème, Amélie et sa gentillesse mêlée à une grande rigueur scientifique ainsi que Marie-Christine pour son enthousiasme à la bench et sa bonté sans faille. Je veux adresser des remerciements particuliers à Joris qui m'a aidé à m'acclimater à mon arrivée et m'a accompagné au lancement de mes projets. Je souhaite également porter une attention particulière à Tony et Niraj, les deux frères siamois du laboratoire. Cela a été un grand plaisir que de partager du temps avec vous aussi bien pour la science que pour les sorties. De plus, l'abnégation de Marie-Michelle, la vivacité d'esprit d'Emilie, la maturité d'Hemanta, la joie de vivre de Stéphanie sont d'innombrables sources d'inspiration. Je veux également remercier Kenny avec qui j'ai partagé tant de journées en radioactivité à réaliser des tests d'annealing, Mariline, Anne-Marie, Maripier et Bassem que je n'ai côtoyé malheureusement que trop peu de temps.

Mes travaux de doctorat ont été possibles grâce à l'aide financière proposée par la Ligue contre le Cancer 44, la région Pays de la Loire (à travers le projet CIMATH2) et l'Institut de Recherche en Santé du Canada (IRSC). Je tiens à remercier tous ces organismes. Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à l'égard du Dr Bernard Lopez, du Dr Jacques Huot ainsi que du Dr Isabelle Corre pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Plus personnellement, je souhaite adresser mes plus profonds remerciements aux membres de ma famille. Je suis très reconnaissant du soutien indéfectible de mes parents, Nikola et Dragica, ainsi que de mon frère, Nenad, et de ma sœur, Sara.

Avant-propos

L'acide désoxyribonucléique (ADN) constitue le fondement d'un être vivant et contient l'information génétique nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. Etant donné son importance pour un organisme unicellulaire autant que pour un organisme supérieur, le maintien de son intégrité requiert une importance particulière. En effet, il a été estimé qu'une cellule pouvait subir environ 100 000 lésions par jour sur son ADN¹. Ainsi, des stress exogènes ou endogènes peuvent induire différents types de dommages comme la modification de bases azotées, l'induction d'une liaison inter- ou intra-brin ou encore l'induction de cassures simple- ou double-brin ; cette dernière étant la plus néfaste pour la cellule, pouvant la mener à sa mort. Les principaux stress exogènes générant des cassures double-brin sont les molécules chimiques, notamment certaines utilisées comme agents chimiothérapeutiques, et également les rayonnements (UV, radiations ionisantes, ...). Les stress exogènes induisant des cassures double-brin (CDB) peuvent être des erreurs lors de la réplication, un stress mécanique ou encore les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO ou ROS pour *Reactive Oxygen Species*).

Cependant, la cellule a mis en place des systèmes permettant de réparer ces lésions double-brin, et notamment les voies de réparation par recombinaison homologue (RH) et non-homologue (NHEJ).

De nombreux traitements anticancéreux visent à induire des cassures double-brin dans l'ADN des cellules tumorales afin de les éliminer mais ces thérapies peuvent se heurter à des phénotypes chimio ou radio-résistants générés par une capacité de réparation de l'ADN efficace de certaines tumeurs. Dans ce contexte, de nombreuses études mettent en avant la possibilité de sensibiliser ces cellules résistantes par le développement de molécules capables d'inhiber l'action de protéines de réparation à l'origine de ces résistances.

Parmi les protéines de la réparation par RH, les protéines RAD51 et RAD52 sont apparues comme des cibles potentielles pour améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses. Ainsi la surexpression de la protéine RAD51 dans certains cancers est apparue comme un élément favorisant la survie cellulaire et pouvant mener à un phénomène de résistance. En effet, après induction de CDB, une cellule surexprimant RAD51 est capable de survivre^{2,3}, et, à l'inverse, en diminuant l'expression de RAD51 en complément d'un traitement anticancéreux, cela entraîne une diminution de la survie cellulaire⁴⁻⁶.

Le manuscrit s'articule en six grands chapitres. Le premier chapitre constitue une introduction et se focalise sur les principaux mécanismes impliqués dans la réparation des CDB de l'ADN et sur les deux protéines clefs de la RH, RAD51 et RAD52. Le second chapitre fait un état des lieux des inhibiteurs des protéines de la réparation connus. Dans le troisième chapitre, nous aborderons les effets de l'inhibiteur DIDS et de ses dérivés sur la protéine HSA, protéine la plus abondante dans le sang. Dans une quatrième partie, nous verrons les effets du DIDS et de ses molécules dérivées sur RAD51 à travers des tests biochimiques et cellulaires. Dans la cinquième partie, nous analyserons les résultats préliminaires du criblage d'une banque de molécule sur l'activité de RAD52. Enfin, dans un sixième chapitre, nous discuterons des résultats obtenus et de leur place dans les avancées scientifiques récentes pour la lutte contre le cancer.

Chapitre 1

Chapitre 1 - Introduction

1. Les dommages à l'ADN et les voies de réparation des cassures double-brin

La cellule est constamment soumise à des stress endogènes ou exogènes pouvant altérer l'intégrité de son génome. On sait ainsi que chaque jour, une cellule du corps humain peut subir des dizaines de milliers de lésions dans son ADN ⁷. Ces facteurs inducteurs de dommages ont été décrits dans la littérature et certains sont mêmes utilisés en clinique ou encore dans les laboratoires pour en étudier la réponse des systèmes de réparation à l'échelle de la cellule ou de l'animal.

1.1. Les facteurs exogènes

Il existe deux grands types de facteurs exogènes générateurs de lésions à l'ADN : les agents chimiques et les agents physiques.

Parmi ces derniers, on peut citer notamment les rayonnements UV et les radiations ionisantes, capables de modifier les bases azotées de l'ADN, de créer des liens inter- ou intra-brins ou d'induire directement des cassures double-brin dans l'ADN ^{8,9}.

Parmi les agents chimiques, on peut citer certaines molécules, comme la camptothécine, capables d'inhiber les topoisomérases de type 1 lors de la réplication et d'induire des cassures simple-brin, qui lorsqu'elles ne sont pas réparées peuvent devenir, par rupture de liaisons phospho-diester sur les deux brins de l'ADN, des cassures double-brin. D'autres molécules, comme la doxorubicine ou la cisplatine, peuvent induire la formation de DRO qui directement ou indirectement génèrent la formation de CDB ¹⁰, la cisplatine induisant également des pontages interbrins.

1.2. Les facteurs endogènes

La cellule est également capable d'induire ses propres CDB afin d'initier un mécanisme essentiel. C'est le cas, par exemple, lors de la recombinaison méiotique initiée par l'action de la protéine Spo11 capable de créer des CDB, lors du phénomène de recombinaison V(D)J permettant une diversité dans la production de récepteurs des cellules T (TCR) et d'immunoglobulines ou encore par l'action d'enzymes comme la meganucléase I-SceI ^{11,12}.

La réplication de l'ADN constitue également une cause non négligeable d'induction de CDB. En effet, les polymérases impliquées dans la réplication peuvent être responsables de

l'ajout d'une mauvaise base générant des mésappariements dans la séquence nucléotidique de l'ADN résultant. Ces mauvais appariements de bases peuvent être source de CDB s'ils ne sont pas réparés. Un autre phénomène durant la réplication est le blocage de la fourche de réplication, causé par exemple par un mésappariement ou un pontage interbrin, pouvant aboutir à la génération de CDB ¹³.

Des petites molécules, résultats du métabolisme cellulaire, peuvent aussi causer des dommages à l'ADN. C'est le cas des dérivés réactifs de l'oxygène, ou DRO, issus du catabolisme oxydatif de la cellule. Les principaux DRO sont l'anion superoxyde $\bullet\text{O}_2^-$, le peroxyde $\bullet\text{O}_2^{-2}$ et le radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$. Ces molécules sont capables d'interagir directement avec l'ADN et d'induire la création de pontage entre les bases de l'ADN, de les modifier et de générer des sites abasiques ¹⁴.

1.3. L'utilisation de facteurs inducteurs de CDB

La génération de cassures double-brin est également un phénomène exploité dans les thérapies cliniques. Ainsi, les radiations ionisantes sont fréquemment utilisées afin d'induire des CDB directement ou indirectement par la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), après radiolyse de l'eau ¹⁵.

Parmi les molécules anti-cancéreuses les plus couramment utilisées en laboratoire, on peut citer la néocarzinostatine (NCS), la doxorubicine, la mitomycine C ou encore l'étoposide. La néocarzinostatine est ce que l'on appelle un radiomimétique, tout comme la doxorubicine également, c'est-à-dire qu'elle est capable d'induire des CDB par l'intermédiaire des DRO ¹⁶. La mitomycine C agit différemment en induisant aussi bien un pontage intra-brin entre une base G et une base C, qu'inter-brin (ICL) entre deux bases G voisines. Si ces adduits ne sont pas réparés, notamment les ICL, cela peut bloquer la transcription et la réplication de l'ADN et entraîner la formation de CDB ¹⁷. L'étoposide agit différemment de ces dernières molécules en se liant au complexe ADN-topoisomérase de type II, empêchant ainsi la religation de l'ADN et entraînant la formation de CDB ¹⁸. De manière intéressante, il est possible d'induire des CDB dans la cellule via l'expression de la méganucléase I-Sce1, une enzyme reconnaissant une séquence de 18pb artificiellement intégré dans le génome d'un modèle cellulaire ^{19,20}.

Des systèmes basés sur des protéines génératrices de CDB ont également été développés dans les laboratoires, c'est le cas de nucléases à doigt de zinc modifiées ²¹, par les TALENs ²² ou encore par le mécanisme CRISPR/Cas9 ²³.

Les modifications de la structure de l'ADN que sont les CDB sont extrêmement nocives pour la cellule si elles ne sont pas réparées. Ainsi, cette dernière possède des points de contrôle durant le cycle cellulaire permettant de vérifier l'état de l'ADN et de ralentir le cycle afin de réparer l'ADN endommagé ²⁴. Pour ce faire, la cellule possède plusieurs mécanismes adaptés à chaque type de lésion nucléaire. Il existe ainsi des systèmes pour réparer des mésappariements, des pontages intra- ou interbrin, des modifications de base, des sites abasiques, des lésions simple-brin ou double-brin (Figure 1).

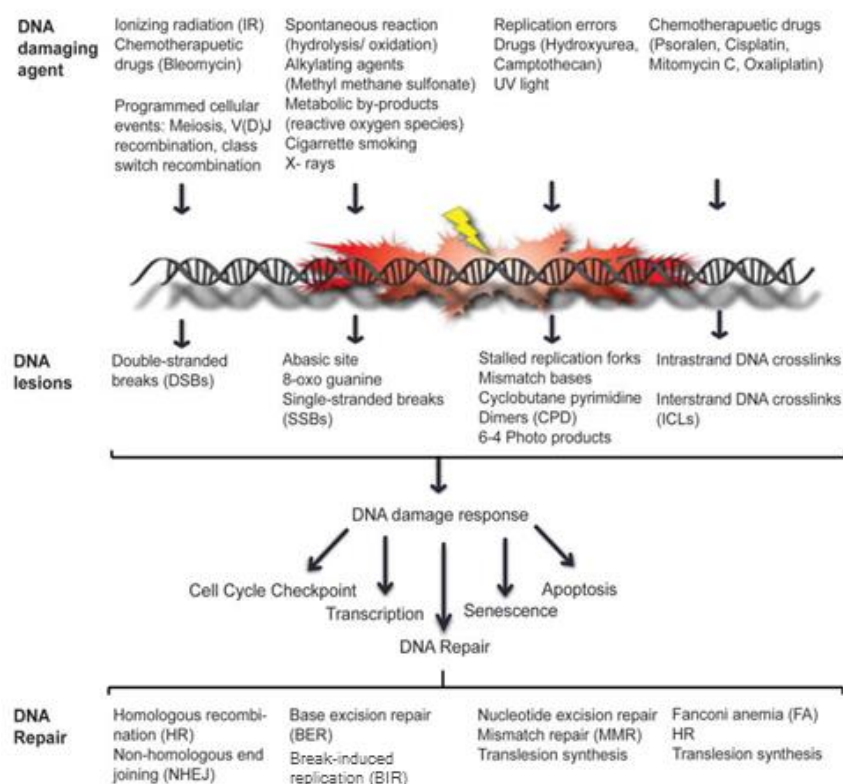


Figure 1 - Les différents agents inducteurs de lésions à l'ADN et leurs conséquences pour la cellule.

De multiples agents endogènes ou exogènes peuvent créer des lésions à l'ADN. Ces dommages peuvent être la perte d'une base dans la séquence d'ADN et aboutir à la création d'un site abasique, l'arrêt de la fourche de réplication, des dimères de cyclobutane, des photoproduits (6-4), des mésappariements, des pontages intra- et interbrins, des cassures simple-brin ou encore des cassures double-brin. Après détection de la lésion, la réponse aux dommages à l'ADN se met en place et active des processus cellulaires tels que les points de contrôle du cycle, la transcription, la sénescence, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Différentes voies sont utilisées selon le type de dommage (Adapté de ⁴²⁰).

Dans la suite du manuscrit, nous allons voir brièvement quels sont les principaux mécanismes de réparation de l'ADN avant de nous intéresser plus en détail aux deux grands mécanismes de réparation des cassures double-brin (Figure 2).

1.4. Les principales voies de réparation de l'ADN

Comme dit précédemment, chaque type de lésion est réparé spécifiquement par un des mécanismes que possède la cellule. Ces mécanismes demandent la coordination de plusieurs protéines qui, parfois, interviennent dans plusieurs de ces mécanismes, complexifiant ainsi la réparation des dommages à l'ADN

1.4.1. La réparation par excision de base (REB ou BER-Base Excision Repair)

La réparation par excision de base est initiée en présence de modification d'une base azotée (oxydation, alkylation, déamination). Selon le type de lésion, une des 11 ADN glycosylases, spécifiques de la lésion à réparer, va reconnaître le dommage et enlever la base altérée afin de générer un site abasique (site AP). L'endonucléase APE1 clive ensuite la liaison phosphodiester au niveau du site abasique. Une ADN polymérase vient ajouter la base complémentaire correspondante puis une ligase permet la ligation du brin réparé. Il existe deux types de REB, le *short-patch* lorsqu'un seul nucléotide est remplacé et le *long patch* lorsqu'entre 2 et 10 nucléotides sont synthétisés ²⁵.

1.4.2. La réparation par excision de nucléotide (REN ou NER-Nucleotide Excision Repair)

La réparation par excision de nucléotide permet de réparer les adduits, à savoir surtout les dimères de thymine et les 6,4-photoproduits, générés après irradiation aux UV. Le dommage est repéré par XPC, qui permet le recrutement d'une machinerie protéique dont la protéine centrale est TFIIH. D'autres protéines comme XPA, XPG et RPA participent à l'ouverture de la zone lésée et au maintien de la structure d'ADN liée au complexe TFIIH. Les protéines ERCC1 et XPF permettent l'excision d'environ 20 à 30 nucléotides autour de la zone lésée. Des polymérases, accompagnées notamment par PCNA, viennent ensuite synthétiser la séquence manquante par complémentarité de base avec la région intacte. Une ligase fait la jonction pour reconstituer le squelette phosphate du brin d'ADN nouvellement synthétisé. Il existe deux types de REN, la GG-NER (*Global Genomic-NER*) et la TC-NER (*Transcription Coupled-NER*) se différenciant par le mode de détection du dommage, les étapes suivantes du processus étant identiques ^{26,27}.

1.4.3. La réparation des mésappariements (RM ou MMR-Mismatch Repair)

La réparation des mésappariements, comme son nom l'indique, permet d'enlever les mésappariements apparus lors de la réplication, malgré la fidélité des polymérase. La zone à réparer est reconnue par un des deux hétérodimères, hMutS α , qui reconnaît des mésappariements entre bases ou des insertions/délétions d'une ou deux paires de base, et hMutS β , qui reconnaît des mésappariements et des insertions/délétions plus grandes. L'hétérodimère permet le recrutement d'un autre hétérodimère hMutL α , hMutL β ou hMutL γ , selon que hMLH1 se soit associé à hPMS2, hPMS1 ou hMLH3 respectivement. La présence de RPC et PCNA associée à l'action de hMutH, qui crée une coupure simple brin (ou *nick*) en amont de la zone endommagée permet l'excision de plusieurs bases par EXO1. L'ADN polymérase δ synthétise la séquence manquante et la ligase LIG1 vient reconstituer le squelette phosphate²⁸.

1.4.4. La voie de l'anémie de Fanconi (AF ou FA-Fanconi Anemia)

L'anémie de Fanconi est une pathologie caractérisée par une instabilité chromosomique résultant en des anomalies du développement, une insuffisance médullaire et une plus grande susceptibilité au cancer. Cette pathologie est liée à une mutation dans un des 17 gènes décrits comme appartenant à la voie de Fanconi, participant à la réparation des pontages interbrins (ICL). Elle est caractérisée par l'action du complexe FANCI/FANCD2 et de leur état d'ubiquitylation ainsi que par la présence d'un complexe constitué de 8 protéines FANC (FANCA/B/C/E/F/G/L/M) et de protéines accessoires FAAP20, FAAP24 et FAAP100, complexe prénommé *FA core*. L'activation de ce complexe s'effectue via l'action d'ATR après que le pontage interbrin ait été détecté. Le complexe ERCC1-XPF serait également recruté, ainsi que SLX4, participant ainsi à l'excision de la zone endommagée et à la création d'une cassure double-brin. Cette situation est résolue ultérieurement, notamment par l'action de polymérase translésionnelles (TLS) et de l'action conjointe de certaines protéines de l'AF avec des protéines de la RH²⁹.

1.4.5. Les voies de recombinaison homologue (RH) et de jonction des extrémités non-homologues (NHEJ)

Il existe deux voies principales pour réparer les CDB. La voie NHEJ utilise l'hétérodimère Ku70/80 recruté au site de cassure et permet l'arrivée de DNA-PKcs et son activation. DNA-PKcs va ainsi maintenir le site de cassure ouvert et recruter des enzymes comme PNPk, TDP1 et Artemis. XLF, XRCC4 et DNA ligase IV participent ensuite à la ligation des extrémités³⁰. La voie RH qui, contrairement à la NHEJ se déroulant tout au long du cycle cellulaire, prend place durant les phases S et G2. Elle nécessite l'intervention de protéines telles BLM, CtIP, le complexe MRN, DNA2 et EXO1 pour générer des extrémités 3'-sortantes sur lesquelles va se lier RPA afin de les protéger. La protéine centrale de la RH, RAD51, est ensuite recrutée à la cassure avec l'intervention de BRCA1, BRCA2, RAD52, PALB2 et les paralogues de RAD51. RAD51 forme un nucléofilament en se polymérisant autour d'un ADNsb et cherche une homologie avec une séquence complémentaire dans le génome afin de former une boucle de déplacement ou D-loop. La synthèse d'ADN pour réparer la cassure est ensuite initiée par dissociation d'un des brins utilisés pour l'invasion (SDSA) ou par formation de jonctions de Holliday résolues soit par des résolvas ou par le complexe BLM-RMI-Top3.

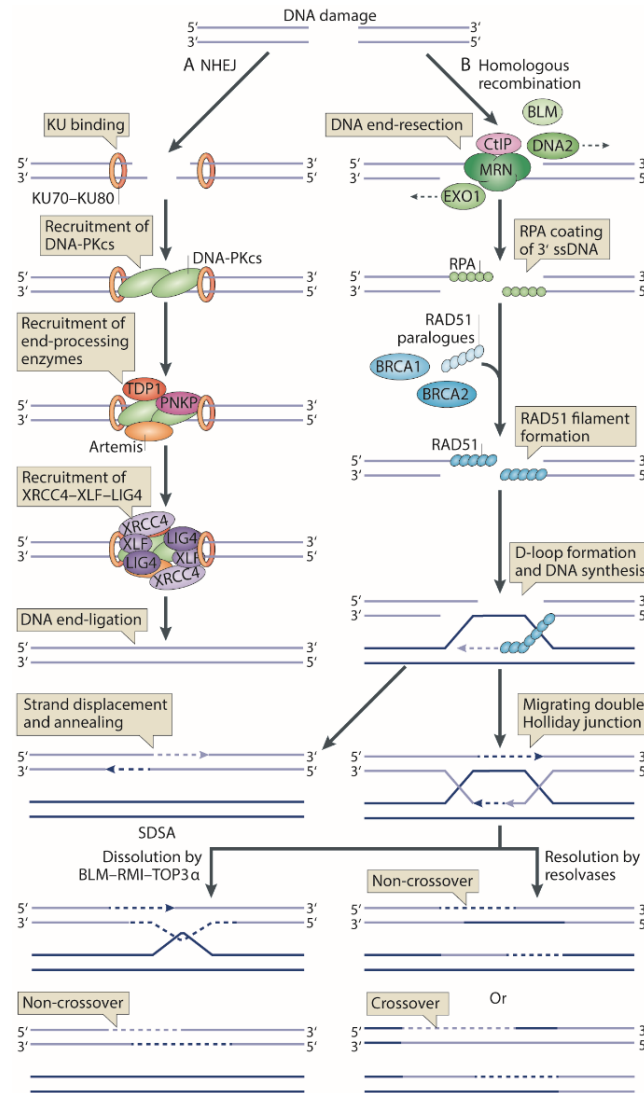


Figure 2 - Les principales voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN.

Il existe deux voies principales pour réparer les CDB. La voie NHEJ (A) utilise les extrémités issues de la cassure qui sont ensuite modifiées par ajout ou retrait de bases. Ce processus implique notamment l'hétérodimère Ku70/80, DNA-PKcs et Artemis. Les extrémités ainsi générées sont ensuite liées entre elles par l'action de XRCC4, XLF et la DNA ligase IV. La RH (B) implique d'autres protéines, comme le complexe MRN et CtIP, nécessaires à l'initiation de la résection, notamment par l'action d'EXO1. La protéine RPA participe au maintien des structures d'ADNsb générées. Le complexe formé par BRCA1, BRCA2 et PALB2, ainsi que les paralogues de RAD51, permettent le recrutement de RAD51 au site de lésion. RAD51 exerce ensuite son activité de recombinase afin de réaliser l'échange de brins. Des résolvases participent à la résolution de la cassure et à la génération de deux ADNdb intactes. (Adapté de ⁴²¹)

1.5. Détection de la cassure double-brin et initiation de la réparation

1.5.1. Détection et signalisation de la cassure double-brin

En présence d'une CDB, le complexe MRN, constitué des protéines MRE11, RAD50 et NBS1, est capable de la détecter et de recruter la kinase ATM au site de cassure ³¹ (Figure 3). Dans des conditions normales, ATM existe sous forme d'un dimère inactif, puis s'autophosphoryle sur son résidu sérine 1981, aboutissant ainsi à la perte de sa structure dimérique et à son activation ³².

ATM va ensuite recruter et activer le variant d'histone H2AX, appelé γ -H2AX lorsqu'il est phosphorylé sur la Sérine 139 ³³, ce qui entraîne le recrutement de MDC1 par association directe avec γ -H2AX ³⁴. MDC1 joue un rôle central dans la signalisation de la cassure, puisqu'il va permettre l'amplification du signal en recrutant plusieurs monomères de H2AX tout autour de la cassure, aboutissant à la formation de foyers de γ -H2AX, dénomination employée pour décrire l'accumulation d'une protéine au niveau de la cassure. L'action de MDC1 et la phosphorylation de H2AX au niveau de la cassure est importante puisque cela permet de relâcher la chromatine, d'amener de nombreux facteurs de signalisation (dont le complexe MRN) et de les garder proche de la cassure ^{35,36}. Le regroupement des facteurs au niveau de la cassure génère la formation de grandes structures protéiques appelées foyers de réparation. Ils peuvent être observés par microscopie et constituent des marqueurs de l'activation des voies de réparation. Parmi les foyers les plus souvent étudiés, il y a les foyers de γ -H2AX que l'on considère comme un marqueur pertinent de la présence de cassure double-brin dans la cellule. Une étude a également montré qu'un foyer de γ -H2AX correspond à une CDB et qu'elle contient environ 200 molécules de γ -H2AX ³⁵.

Des ubiquitine ligases E3, RNF8 et RNF168, sont également recrutés au site de cassure par l'intermédiaire de MDC1 ³⁷⁻⁴². Ces enzymes polyubiquitinylent les histones ^{43,44}, permettant le relâchement de la chromatine afin d'augmenter l'accessibilité au site de dommage et le recrutement et la rétention de facteurs comme BRCA1 et 53BP1 ^{37,40-42,44-46}.

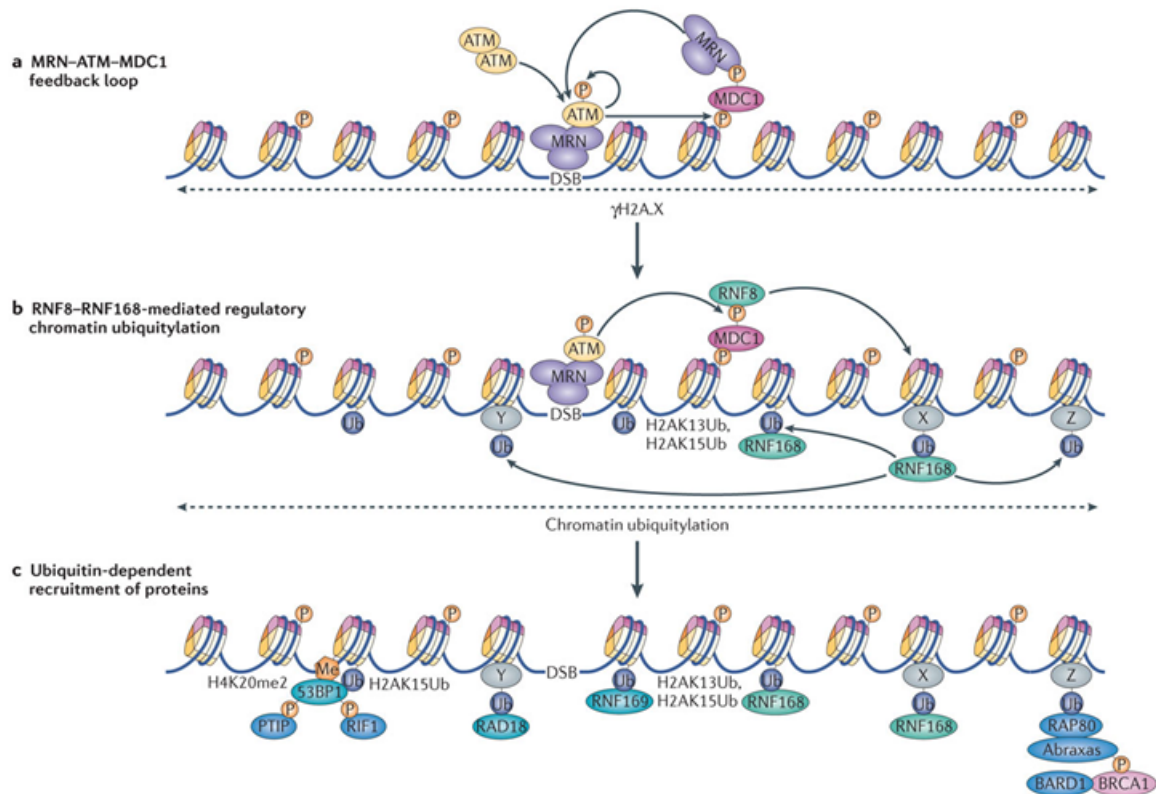


Figure 3 - Détection et signalisation de la cassure double-brin.

(a) La cassure double-brin est détectée par le complexe MRN qui recrute à la cassure les monomères d'ATM autophosphorylés actifs. ATM phosphoryle ensuite H2AX, un variant de l'histone H2A, sur la Sérine 139. La phosphorylation de H2AX induit une amplification du signal via MDC1 en recrutant de nouveaux complexes MRN au site de cassure. (b) Une autre cible phosphorylée par ATM est MDC1, sur ses motifs TQXF, ensuite reconnus par RNF8. RNF8 et RNF168 induisent ensuite une cascade de signalisation en ubiquitylant l'histone H2A sur les Lys13 et Lys15. RNF168 est également capable de s'auto-ubiquityler en s'associant à H2A ubiquitylé. (c) D'autres protéines, comme RNF169, RAD18 ou RAP80, vont ensuite assurer la suite de la cascade. 53BP1 joue également un rôle dans la transduction du signal en s'associant aux histones diméthylés (H4K20me2) et ubiquitylés (H2AK15) et en activant d'autres protéines de la signalisation comme PTIP et RIF1. (Adapté de ⁴²²)

A la différence d'ATM, ATR (Ataxia-telangiectasia and Rad3 related) ne change pas de conformation en présence de dommages à l'ADN. ATR existe ainsi sous la forme d'un complexe avec un cofacteur, ATRIP (ATR-interacting protein) et permet de reconnaître les cassures simple-brin de l'ADN, générées notamment par des radiations ionisantes, ou également de manière plus naturelle lors de la réplication, au niveau des fourches ⁴⁷⁻⁴⁹. L'activation d'ATR est effective via l'action de RPA, capable de recouvrir une extrémité simple-brin de l'ADN. ATRIP se lie à RPA au niveau de l'extrémité d'ADN recouverte par RPA, permettant le recrutement d'ATR et son activation à la cassure. Cette activation d'ATR est également possible par l'arrivée et le chargement au niveau de la lésion du complexe RAD9-

RAD1-HUS1 (aussi prénommé « 9-1-1 »), précédée par la présence du complexe RAD17-RFC. C'est ensuite TOPBP1 qui est recruté à la cassure, se lie au complexe ATR-ATRIP, aboutissant à la phosphorylation de CHK1 et d'autres partenaires d'ATR ⁵⁰.

Concernant les cassures double-brin de l'ADN, ATR est également impliqué, mais dans des phases plus tardives de la signalisation, après l'activation d'ATM ⁵¹⁻⁵³ (Figure 4).

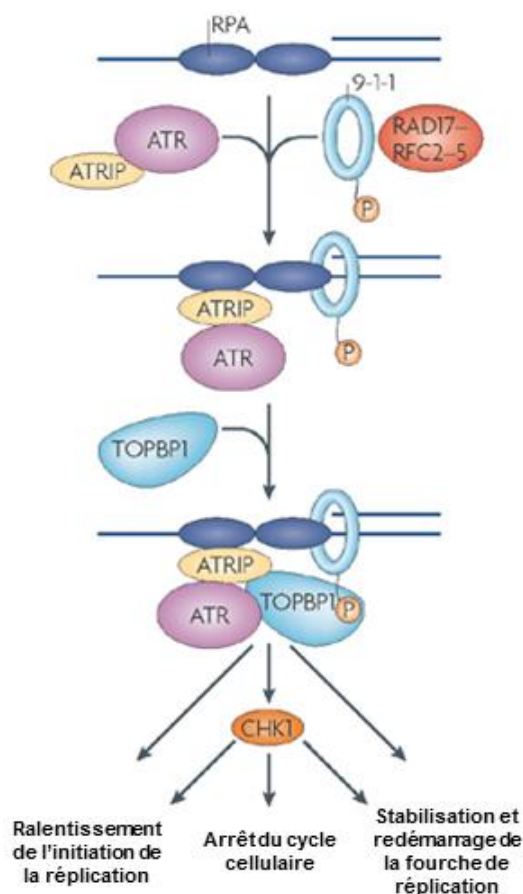


Figure 4 - Mode d'activation d'ATR dans la signalisation des CDB.

En présence d'une CDB, deux complexes sont recrutés, le premier composé de RAD9, RAD1 et HUS1 (correspondant à « 9-1-1 » sur le schéma) et le second comprenant ATR et ATRIP. La protéine RPA présente sur l'extrémité 3'-sortantes lie le complexe ATR-ATRIP via une liaison directe avec cette dernière protéine. RPA permet également de diriger RPC afin de charger le complexe RAD9-RAD1-HUS1 sur l'ADN. Une fois ce complexe fixé à l'ADN, c'est la protéine TOPBP1 qui vient s'associer à RAD9. Cette interaction est réalisée via une interaction entre les domaines BRCT situés sur TOPBP1 et la queue phosphorylée située sur la partie C-ter de RAD9. Dans cette configuration, TOPBP1 active ATR dépendamment d'ATRIP, ce qui permet à ATR de phosphoryler plusieurs de ses effecteurs, dont CHK1. En présence de dommages à l'ADN, ATR va permettre un ralentissement de l'initiation de la réplication, favoriser un arrêt du cycle cellulaire et participer à la stabilisation et au redémarrage de la fourche de réplication. (Adapté de ⁵⁰)

ATM et ATR constituent des plaques tournantes dans la détection, la signalisation et l'activation de nombreux facteurs. Ces deux protéines phosphorylent plusieurs dizaines de protéines afin d'assurer une réponse aux CDB et une réparation efficace.

1.5.2. Le choix de réparer par la RH ou la NHEJ

Pour ce qui concerne les cassures double-brin de l'ADN, la cellule utilise deux mécanismes majeurs : la réparation par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ pour *Non-Homologous End Joining*) et la réparation par recombinaison homologue (RH). Il existe également une troisième voie appelée l'hybridation simple-brin (ou SSA pour « Single-Strand Annealing »). Le choix de la voie de réparation est principalement lié à la phase cellulaire dans laquelle se trouve la cellule. Le choix de la voie de réparation est réalisé durant la signalisation de la cassure.

Le choix est surtout médié par les protéines 53BP1 et CtIP, qui pour la première favoriserait la NHEJ ⁵⁴, alors que la seconde agirait en faveur de la RH ⁵⁵. BRCA1, via son interaction avec CtIP et le complexe MRN seraient également importante dans ce choix. Le complexe MRN, via son activité endonucléasique favoriserait la résection, et contribuerait à la promotion de la RH ⁵⁶. BRCA1 est ainsi capable de lier la protéine RAP80, ce qui a pour effet de diminuer l'effet de la RH. Lorsque l'on déplete des cellules en *Rap80*, le recrutement de CtIP et de Mre11 est stimulé au site de cassure, aboutissant à une stimulation de la résection ⁵⁷. Dans cette optique, la compétition entre RAP80 et CtIP pour se lier à BRCA1 jouerait un rôle important dans le choix entre RH et NHEJ.

Par la suite, nous allons décrire le déroulement des deux grandes voies de réparations des CDB que sont la RH et la NHEJ. La voie d'hybridation simple-brin sera également présentée.

1.5.3. La réparation des cassures double-brin par la jonction d'extrémités non-homologues

Les cassures double-brin sont plus difficiles à réparer que les lésions simple-brin de l'ADN, la cassure impliquant un seul des deux brins dans le deuxième cas. La cellule possède deux voies majeures pour réparer ces lésions, soit en ligant directement les deux extrémités lésées par la voie NHEJ, soit en utilisant l'ADN homologue à la région lésée par RH.

A la différence de la RH qui prend place durant les phases S et G2 et qui utilise une séquence d'ADN homologue à la séquence à réparer, la NHEJ permet la réparation des CDB tout au long du cycle cellulaire chez l'humain et peut entraîner une perte d'information. Malgré la perte d'information qu'elle peut entraîner, la NHEJ reste importante pour la cellule puisqu'elle permet une réparation rapide des dommages et assure une certaine stabilité dans le

génomique. Il existe deux types de voies de réparation par NHEJ : la c-NHEJ (NHEJ canonique ou *canonical NHEJ*) et l'a-NHEJ (NHEJ alternative ou *alternative NHEJ*) (Figure 5).

1.5.3.1. *La NHEJ canonique ou c-NHEJ*

La c-NHEJ, souvent simplement dénommée NHEJ, débute par le recrutement de l'hétérodimère Ku70-Ku80 au site de la cassure, qui va permettre de stabiliser le site du dommage et servir de plateforme aux autres protéines de la NHEJ pour s'arrimer à la CDB³⁰. L'hétérodimère Ku70-K80 recrute ensuite la sous-unité catalytique DNA-PKcs. DNA-PKcs appartient, tout comme ATM et ATR, à la famille des PI3K, et est capable d'autophosphorylation pour pouvoir être actif. DNA-PKcs phosphorylent d'autres substrats protéiques afin de rapprocher les extrémités de la cassure et les préparer pour la suite du processus, mais sa seule cible connue *in vivo*, hormis DNA-PKcs lui-même, est Artemis⁵⁸. Artemis est une 5'-3' exonucléase possédant une activité endonucléasique. Son rôle est notamment de faciliter l'alignement des extrémités non compatibles⁵⁹. Ku recrute également les facteurs XRCC4, XLF et DNA ligase IV pour lier les extrémités traitées^{60,61}.

1.5.3.2. *La NHEJ alternative ou a-NHEJ*

Plus récemment, une voie alternative à la NHEJ (appelée « a-NHEJ », « alt-NHEJ » ou également « jonction d'extrémités médiée par micro-homologie ») a été mise en évidence. Le mécanisme de cette voie n'est pas encore clair, cependant, les complexes MRN et CtIP seraient impliqués dans la résection des extrémités de la cassure afin de générer des extrémités simple-brin. Ces extrémités sortantes de part et d'autre de la cassure seraient ensuite hybridées par micro-homologie de quelques nucléotides notamment grâce à l'action de XRCC1, DNA ligase I et III⁶²⁻⁶⁵. PARP jouerait également un rôle dans le processus, via une compétition avec les protéines Ku70 et Ku80 pour lier l'ADN issu de la cassure, favorisant ainsi la réparation de l'ADN par l'a-NHEJ au détriment de la c-NHEJ⁶⁶.

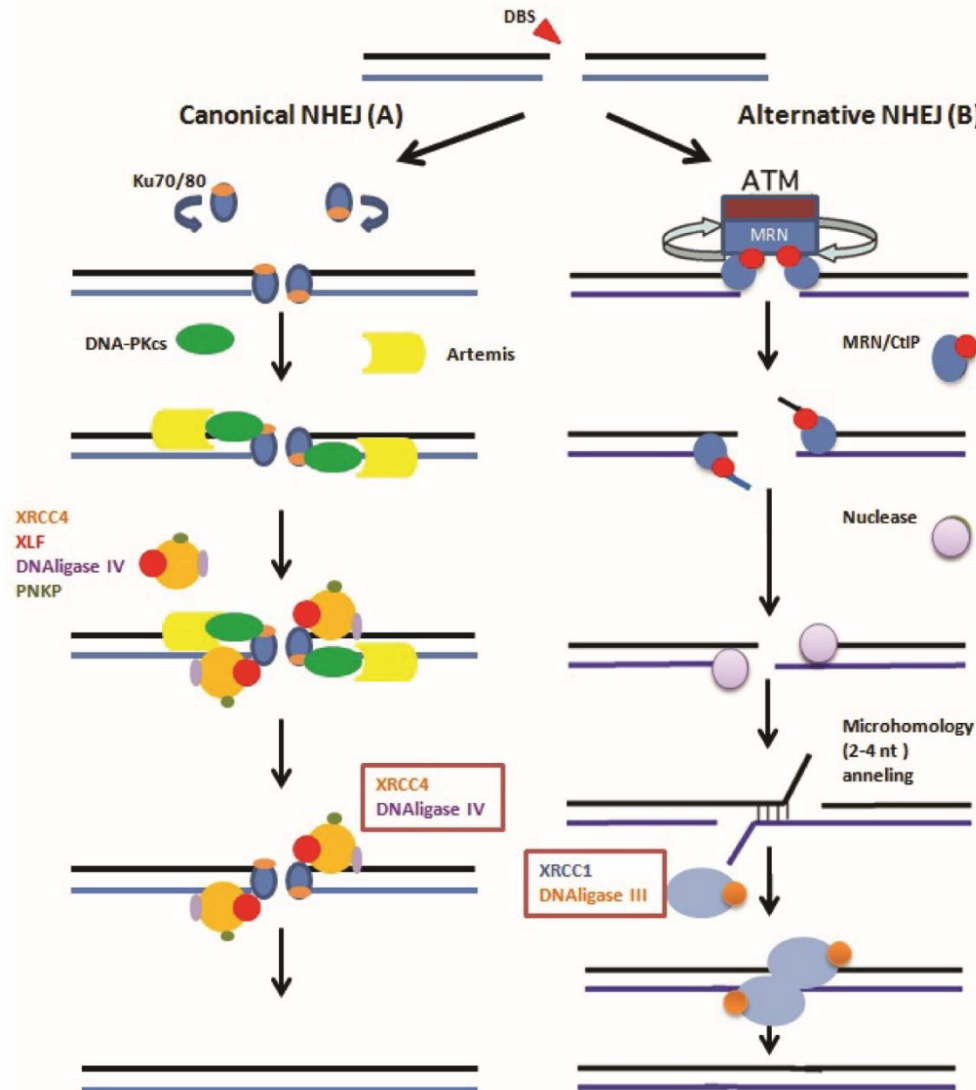


Figure 5 - Les voies de NHEJ canonique et alternative.

(A) La voie canonique de la NHEJ permet de lier deux extrémités de la CDB. L'hétérodimère Ku70-Ku80 est recruté au site de cassure et permet l'arrivée de DNA-PKcs. Le complexe ainsi formé phosphoryle divers substrats protéiques via l'activité kinase de DNA-PKcs et recrute le complexe XRCC4-XLF-DNA ligase IV nécessaire au traitement de la cassure et à la ligation des brins. (B) La voie alternative de la NHEJ, moins bien décrite, est indépendante de l'hétérodimère Ku70-Ku80. Elle dépendrait d'ATM et du complexe MRN ainsi que de CtIP afin d'initier la résection des extrémités de la cassure. Des nucléases seraient également impliquées. Les brins issus de la résection sont ensuite hybridés grâce à des séquences de micro-homologie de part et d'autre de la cassure. (Adapté de ⁴²³)

1.5.4. La réparation des cassures double-brin par la recombinaison homologue

La deuxième voie majeure de réparation des CDB est la recombinaison homologue. Elle prend place durant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Cela s'explique par le fait que la recombinaison homologue nécessite la présence d'une copie d'ADN intacte et homologue à la zone lésée, ce qui est possible après la réplication. La RH se décompose en trois phases : la phase pré-synaptique, la phase synaptique et la phase post-synaptique (Figure 6).

1.5.4.1. La phase pré-synaptique

La première phase de la recombinaison homologue débute par la détection de la cassure et la résection des extrémités de la cassure. La résection engendre la création d'extrémités 3'-sortantes. Les principaux modèles récents proposés tendent à décrire deux étapes dans la résection de l'ADN. La première consiste en l'action de deux protéines, CtIP et MRN qui résectent l'ADN sur une courte distance. Lors de la deuxième étape, deux voies sont possibles, une première utilisant EXO1 et une seconde via le complexe BLM-RMI1-TOP3 et l'endonucléase DNA2. Quelle que soit la voie empruntée, cela aboutit à une résection sur une plus grande distance des extrémités de la zone lésée ^{67,68}. La protéine RPA est impliquée dans ce phénomène de résection en stabilisant les structures d'ADNsb et en empêchant la formation de structures secondaires de l'ADN ⁶⁹. RPA permet également l'initiation du point de contrôle en activant ATR menant ensuite à l'activation d'ATM. RPA joue également un rôle dans le recrutement de RAD51, la protéine centrale de la recombinaison homologue en inhibant l'arrivée de la protéine sur l'ADNsb.

Afin d'initier la réparation, cette inhibition doit être levée, et c'est le rôle de plusieurs protéines appelés médiateurs de RAD51, qui ont pour principal rôle d'aider RAD51 à se fixer à l'ADN au niveau de la cassure, puis de stimuler son activité par la suite. Les deux médiateurs de RAD51 sont BRCA2 et PALB2. Ces deux protéines forment un complexe avec la protéine BRCA1 afin d'amener RAD51 au niveau de la cassure ⁷⁰⁻⁷³.

Chez certains organismes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une autre protéine joue un rôle primordial dans la phase pré-synaptique : Rad52. Ces organismes n'exprimant pas d'orthologues à BRCA2, c'est Rad52 qui possède les fonctions allouées à cette dernière et prend ainsi le titre de médiateur ⁷⁴⁻⁷⁷. Chez l'homme, le rôle que joue RAD52 dans le recrutement de RAD51 demande à être clarifier, et sa fonction principale reste l'hybridation de deux brins d'ADN ⁷⁸.

Cinq autres protéines sont impliquées dans le recrutement de RAD51 à la cassure, ce sont les paralogues de RAD51 : RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3 ⁷⁹⁻⁸³.

Il a été montré récemment qu'une autre protéine appelée DSS1 jouerait un rôle dans le recrutement de RAD51. Très étudiée chez le champignon parasite *Ustilago maydis*, DSS1 est capable de lier Brh2, un orthologue de BRCA2, et de l'aider à se lier à l'ADN, facilitant ainsi le recrutement et la liaison de Rad51 à l'ADN ^{84,85}. Chez les mammifères, DSS1 est également capable d'aider BRCA2 et RAD51 à s'associer à l'ADN ⁸⁶⁻⁸⁸. Le mode d'action de DSS1 dans la formation du complexe RAD51-BRCA2-ADN n'est pas encore clair, mais des preuves récentes suggèrent que DSS1 lierait RPA en mimant la structure de l'ADN, permettant ainsi de

libérer l'ADNsb recouvert par RPA au niveau de la cassure. L'ADN deviendrait ainsi accessible pour l'arrivée de RAD51 et la formation du nucléofilament ⁸⁹.

1.5.4.2. La phase synaptique

A la fin de la phase pré-synaptique, l'ADNsb issu de la résection est recouvert de RAD51, formant le filament pré-synaptique. Ainsi, ce dernier s'associe à l'ADNdb de la chromatide issu de la réplication par homologie de séquence, la recherche d'homologie constituant une des fonctions de RAD51. Cette association nécessite l'ouverture de la structure d'ADNdb matrice et son invasion par le nucléofilament, aboutissant à la formation d'une structure constituée de trois brins d'ADN appelée boucle de déplacement (ou D-loop pour « Displacement loop »). Durant cette phase, deux protéines participent à la formation de la D-loop, RAD54 et RAD51-AP1 ^{90,91}.

1.5.4.3. La phase post-synaptique

La phase synaptique aboutit à la formation de la structure en D-loop de l'ADN, qui sert de base à la dernière étape de la recombinaison homologue, la phase post-synaptique. Durant cette phase, les polymérases synthétisent l'ADN à recopier au niveau de la cassure. Cette synthèse d'ADN génère des structures secondaires d'ADN qui sont résolues de deux manières différentes : par la voie d'hybridation de brin dépendant de la synthèse (ou SDSA pour « Synthesis-Dependent Strand Annealing ») ou par la voie DSBR (pour « Double-Strand Break Repair ») ⁹²⁻⁹⁴. Dans le premier modèle, celui de la SDSA, la structure en D-loop est éliminée, libérant ainsi le brin d'ADN envahissant. Celui-ci est réassocié, par homologie de séquence, à la seconde extrémité protubérante issue de la cassure. Ensuite, l'ADN est synthétisé au niveau de la cassure en utilisant le brin d'ADN récupéré comme matrice. La liaison entre les brins se fait et aboutit à la formation de deux ADNdb sans échange de matériel génétique. Dans le second modèle de DSBR, la présence de la D-loop associée à la synthèse d'ADN par les ADN polymérases engendrent la formation d'une structure d'ADN appelée jonction de Holliday. Dans ce modèle, la structure en D-loop est conservée et même étendue durant la synthèse d'ADN par les ADN polymérases jusqu'à la capture de la seconde extrémité d'ADN libre de la cassure. Cette dernière sert ensuite d'amorce à la synthèse d'ADN. Cette élongation de l'ADN aboutit à la création de la jonction de Holliday, structure en croix, formée par quatre brins d'ADN. Ces structures nécessitent d'être éliminées de l'ADN afin d'obtenir deux ADNdb intacts. Pour ce faire, il existe des nucléases capables de reconnaître les jonctions de Holliday

et de les abolir, ce sont les résolvases. Actuellement, GEN1⁹⁵ et le complexe SLX1/SLX4^{96,97} ont été identifiés et classés comme des résolvases chez les eucaryotes. Des hélicases, comme les protéines WRN et BLM de la famille des hélicases RecQ, interviennent également dans le processus^{98,99}. A la différence de la voie SDSA, ce modèle-ci peut mener à un échange d'information génétique (« crossing-over ») entre les deux matrices d'ADNdb.

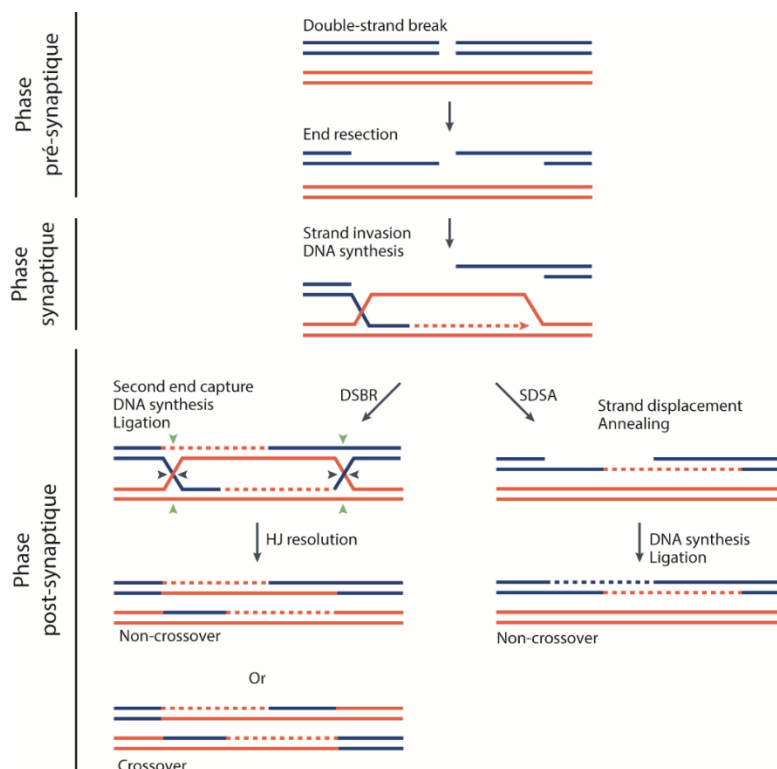


Figure 6 - Les différentes étapes de la recombinaison homologue et les structures de l'ADN associées.

La recombinaison homologue se décompose en trois phases. Une fois la cassure détectée, une étape de résection de l'ADN aboutit à la création d'extrémités 3'-sortantes de part et d'autre de la cassure, c'est la phase pré-synaptique. Une des extrémités ainsi formées envahit la matrice d'ADNdb complémentaire à la zone lésée. Cette étape est appelée phase synaptique et aboutit à la formation d'une structure d'ADN triple brin appelée boucle de déplacement (D-loop, *displacement-loop*). La réparation de la cassure est ensuite effective durant la troisième et dernière phase de la recombinaison homologue : la phase post-synaptique. Deux voies de résolution existent : la réparation des CDB (DSBR) et l'hybridation de brins dépendant de la synthèse (SDSA). La DSBR nécessite la capture de la seconde extrémité 3'-sortante de la cassure suite à l'agrandissement de la D-loop aboutissant à la formation de jonctions de Holliday. Ces structures sont résolues pour aboutir à la formation de deux ADNdb avec ou sans crossover. La SDSA débute par le désassemblage de la D-loop, libérant ainsi l'extrémité 3'-sortante utilisée pour l'invasion. Ce brin d'ADN s'associe avec la seconde extrémité sortante de la cassure par homologie. Une synthèse d'ADN est ensuite nécessaire afin de combler la région lésée et former un ADNdb intact sans échange d'ADN avec l'ADNdb matrice. (Adapté de⁴²⁴)

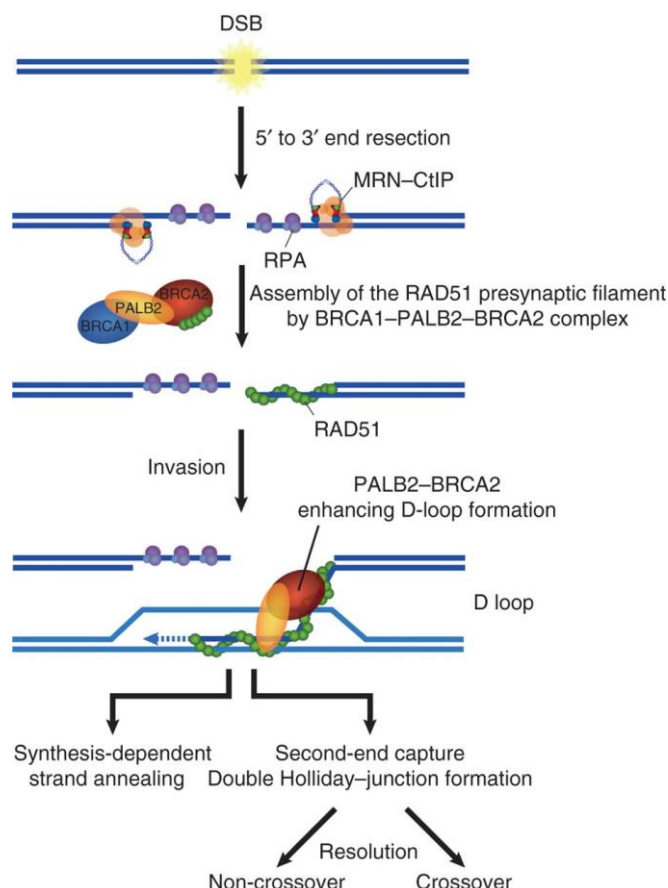


Figure 7 – Les principales protéines associées aux différentes étapes de la recombinaison homologue.

Plusieurs protéines sont associées au processus de recombinaison homologue. Les complexes MRN et CtIP sont impliqués dans la signalisation de la cassure et permettent la résection du site de cassure afin de générer des extrémités d'ADN 3'-sortantes. Ces extrémités sont recouvertes par la protéine RPA, dans le but de les protéger contre la formation de structures d'ADN non souhaitées. Le complexe formé par BRCA1, BRCA2 et PALB2 participe à l'arrivée de RAD51 au site de cassure et à l'association de la protéine à l'ADN, tout en stimulant la fonction de RAD51. Des résolvases sont associées à la résolution des jonctions de Holliday. (Tiré de ²⁴⁵)

1.5.5. La réparation des cassures double-brin par l'hybridation simple-brin (HSB ou SSA)

Alternativement aux deux grandes voies de réparation des CDB, il existe l'hybridation simple-brin (HSB ou SSA). Cette voie de réparation est décomposée en 4 étapes. La première étape est partagée avec la RH, à savoir une étape de résection résultant en deux extrémités 3'-sortantes. De part et d'autre de ces extrémités, il peut exister des séquences répétées qui vont servir de matrice à l'hybridation entre ces deux séquences homologues, ceci correspondant à la seconde étape du processus. L'étape suivante est une nouvelle résection des extrémités 3'-sortantes présentes au-delà des séquences de micro-homologie. Enfin, une dernière étape de ligation permet de lier entre eux les brins d'ADN et de reformer une séquence d'ADNdb sans cassure (Figure 7).

A la différence de la levure où l'hybridation simple-brin est bien caractérisée^{100–102}, cette voie de réparation est beaucoup moins comprise chez les mammifères. La réparation débute par la résection des extrémités de la cassure, cette étape étant médiée par les mêmes composants que pour la RH. La résection s'étend jusqu'aux séquences de micro-homologie qui entourent la zone lésée. Tout comme pour la RH, RPA joue un rôle important puisque la protéine se lie à l'ADNsb afin de stabiliser la structure simple-brin, empêcher une hybridation aléatoire et permettre l'arrivée de RAD52. C'est en effet RAD52 qui joue le rôle central de ce processus¹⁰³ puisqu'il permet l'hybridation entre les deux séquences micro-homologues^{77,104–106}.

RAD52 possède un domaine de liaison à l'ADN et une activité d'hybridation simple-brin qui lui permettent de s'associer à l'ADN recouvert par RPA et d'hybrider les deux séquences micro-homologues. RAD52 s'associe pour former un anneau de 7 sous-unités qui lie l'ADNsb au niveau de la cassure. L'ADNsb se retrouve niché dans le sillon que forme l'anneau, le squelette phosphate étant alors exposé vers l'extérieur^{107,108}. Dans cette conformation, l'association entre deux brins d'ADN est possible. Ainsi, deux heptamères de RAD52 serait impliqués, *in vivo*, pour assurer l'association des deux séquences homologues. Les intermédiaires et les produits de l'hybridation simple-brin ont été observés par microscopie électronique et montrent clairement la présence de plusieurs anneaux de RAD52 au niveau des zones lésées¹⁰⁹. L'hybridation des deux séquences micro-homologues induit l'exclusion des séquences 3'-sortantes initialement générées par la résection. Ces structures sont ensuite clivées par l'endonuclease ERCC1/XPF, aussi impliquée dans la réparation par la voie REN et dans la réparation des pontages inter-brins^{110–112}. Le rôle d'ERCC1 dans l'hybridation simple-brin a été confirmé dans une étude sur des cellules de hamster pour lesquelles, une déficience en ERCC1 entraîne des réarrangements au niveau d'un locus avec des séquences répétées en tandem de l'adénine phosphoribosyltransférase (APRT) qui stimule la SSA¹¹⁰. Un indice supplémentaire ajoutant du poids à l'implication d'ERCC1/XPF dans la SSA, est le fait qu'ERCC1/XPF forme un complexe stable avec RAD52 stimulant l'activité de l'endonuclease¹¹³. La dernière étape de l'hybridation simple-brin consiste en la ligation des brins d'ADN. La ligase responsable n'a pas encore été identifiée, mais il pourrait s'agir de la DNA ligase III, que l'on retrouve impliquée dans d'autres processus, notamment dans le REB (*short-patch BER*) et également la réparation des cassures simple-brin (*Single-Strand Break Repair* ou SSBR)^{114–116}.

La réparation par hybridation simple-brin est un mode de réparation rapide mais entraîne, cependant, une perte d'information.

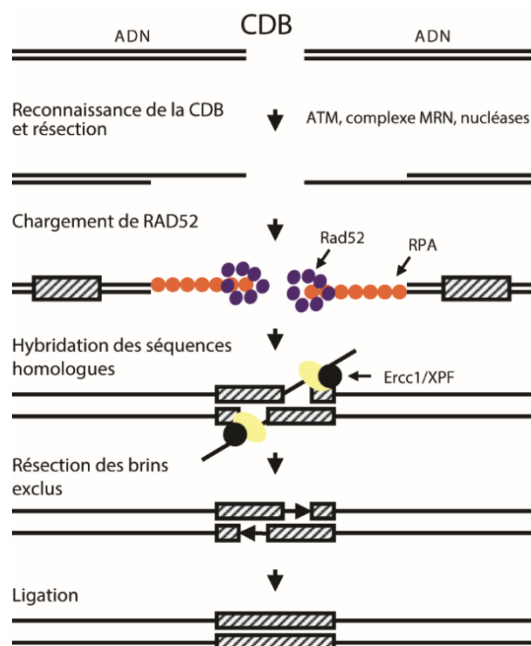


Figure 8 - Réparation des CDB par l'hybridation simple-brin.

La réparation des CDB par l'hybridation simple-brin se décompose en quatre grandes phases. La première étape correspond à une résection des extrémités de la cassure afin de générer des extrémités 3'-sortantes. Cette étape est commune avec la RH. Dans un second temps, RPA vient recouvrir les structures d'ADNsb générées précédemment pour stabiliser ces structures et empêcher une hybridation non désirée. Puis RAD52 est recrutée à la cassure et va permettre l'hybridation des séquences homologues situées de part et d'autre de la cassure. Il existe dans le génome de courtes séquences de micro-homologie et ce sont elles qui sont utilisées dans cette voie de réparation. Une fois les deux régions micro-homologues hybridées, le complexe ERCC1/XPF vient cliver les extrémités simple-brin générées par cette hybridation. Une étape de ligation permet de retrouver une séquence d'ADNdb continu. L'hybridation simple-brin est une voie de réparation rapide mais qui aboutit à une perte de matériel génétique. (Adapté de ⁴²⁵)

2. Deux protéines au cœur de la RH : RAD51 et RAD52

2.1. RAD51 ou la protéine centrale de la recombinaison homologue

Comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, RAD51 est la protéine centrale de la RH de par son activité de recherche d'homologie, son rôle d'invasion de l'ADN homologue et sa capacité d'échange de brins. Rad51, chez les levures *S. cerevisiae* ou *S. pombe*, est importante pour le bon déroulement de la RH, cependant, son inactivation n'est pas rédhibitoire à sa survie, puisque la levure dont le gène *Rad51* a été inactivé demeure viable mais acquiert cependant une sensibilité aux rayonnements γ ¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Chez les eucaryotes, la recombinase RAD51 revêt une forte importance, dont l'impact peut être évalué par les études d'inactivation du gène dans la cellule ou chez l'embryon. Une

étude menée sur une lignée de cellules de poulet DT40 dont le gène *RAD51* a été mis sous contrôle d'un promoteur répressible, a permis de montrer que lorsque l'expression du gène *RAD51* est inhibée, la cellule est arrêtée dans son cycle cellulaire au niveau de la transition G2/M aboutissant par la suite à sa mort. De nombreuses anomalies au niveau de l'ADN sont également observées, comme une plus forte présence de cassures double-brin ou encore des anomalies chromosomiques, témoins, finalement de l'importance de *RAD51* pour la stabilité du génome de la cellule et pour sa survie ¹²⁰.

L'importance de *RAD51* est également observable pour un organisme pluricellulaire. Des recherches ont essayé de mettre en place des lignées de souris déficientes en *RAD51*, cependant ces études ont mis en avant l'impossible viabilité de ces lignées. En effet, l'absence de *RAD51* entraîne une létalité précoce des embryons. De plus, les cellules embryonnaires montrent notamment un ralentissement de leur prolifération et des anomalies chromosomiques ^{121,122}. Dans des cellules de poulet DT40, lorsque le gène *RAD51* est inactivé, cela aboutit à la mort de ces cellules ¹²⁰.

2.1.1. RAD51, une protéine conservée dans l'évolution

La protéine Rad51 a été identifiée suite à un screening génétique chez *Saccharomyces cerevisiae* après irradiation (IR). D'autres gènes de protéines impliquées dans la RH ont été identifiés en même temps, comme *RAD50*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11* et *XRS2* ¹²³. *RAD51* appartient à la famille des RecA recombinase, comportant les protéines RecA chez les bactéries, RadA et Rad51 chez les archées et DMC1 chez les eucaryotes. Ces protéines possèdent des caractéristiques communes, notamment la capacité à lier l'ATP, à fixer l'ADNsb et l'ADNdb afin de réaliser l'échange de brins. Malgré des propriétés communes, des différences existent entre ces protéines, *RAD51* chez les eucaryotes ne présentant qu'environ 40% d'identité de séquence avec la RadA chez les archées ^{124,125} (Figure 8).

Sa conservation à travers l'évolution démontre son importance pour l'homéostasie de la cellule et de l'organisme.

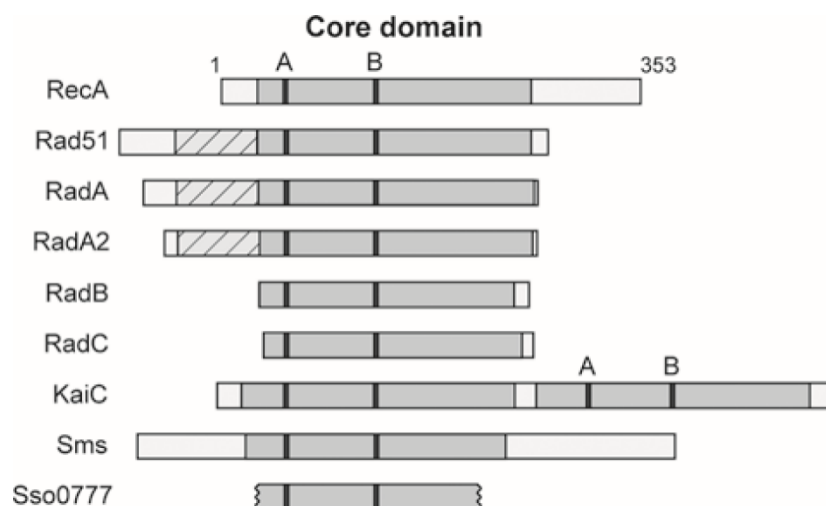


Figure 9 - Conservation des domaines de RAD51 à travers l'évolution.

La conservation des domaines chez les protéines de la famille RecA est forte. Le *core domain*, partie centrale des protéines de la famille RecA est représenté en gris. Dans ce *core domain*, on retrouve les domaines Walker A et B, nécessaires à la liaison à l'ATP et son hydrolyse (séquences en noir). Il existe une partie N-ter conservée chez Rad51, RadA et RadA2 (section hachurée). Les parties qui ne présentent aucune identité sont représentées en gris pâle. (Adapté de ⁴²⁶)

2.1.2. Structure et domaines de RAD51

RAD51 est une protéine de 339 acides aminés pour un poids moléculaire de 37 kDa. La séquence de RAD51 est très bien conservée dans l'évolution, en effet, RAD51 partage 98,8% de similarité avec son homologue chez la souris mmRad51 (*Mus musculus* Rad51) et 81% de similarités avec son homologue chez la bactérie *Saccharomyces cerevisiae* ScRad51 (*Saccharomyces cerevisiae* Rad51) ^{126,127}.

Actuellement, aucune structure complète de RAD51 n'a été élucidée. Les structures cristallines de ScRad51 tronquée au niveau de l'acide aminé située en position 79 ¹²⁸, une structure chez RadA de *Pyrococcus furiosus* ¹²⁹ et cinq structures de RadA chez *Methanococcus voltae* ^{130,131} et *Sulfolobus solfataricus* ¹³² sont accessibles actuellement.

RAD51, comme RadA est constitué de deux grands domaines N-ter et un domaine central en C-ter (Core domain). Ces deux structures ont été résolues par RMN pour le domaine N-ter ¹³³ et par cristallographie pour le domaine central ¹³⁴ (Figure 9).

2.1.2.1. Domaine de liaison à l'ADN db

La partie N-ter de RAD51 comporte un motif HhH (*Helix-hairpin-Helix*, pour Hélice-boucle-Hélice) (résidus 61 à 69) nécessaire à la liaison à l'ADNdb ¹³³. Ce motif est très conservé

dans l'évolution et présent dans de nombreux types de protéines aptes à lier l'ADNdb, comme des ADN polymérases, ADN ligases dépendantes du NAD⁺ ou encore des ADN glycosylases^{135,136}.

Le rôle de l'ion Ca²⁺ est également important dans la liaison de RAD51 à l'ADNdb, puisqu'il participe notamment à l'augmentation de la rigidité du nucléofilament une fois RAD51 associé à l'ADNdb et permet ainsi une meilleure stabilité de cette structure¹³⁷.

A forte concentration en RAD51, le filament de RAD51-ADNdb aurait tendance à former des structures filamentaires discontinues entrecoupées par de l'ADN nu. Ce type de structure n'est pas retrouvé chez l'homologue de RAD51, RecA¹³⁸.

2.1.2.2. Domaine de liaison à l'ADNsb

Le domaine de liaison à l'ADNsb de RAD51 est constitué de deux structures appelées boucles L1 et L2 situées dans la partie C-ter de la protéine. Ces boucles ont été découvertes et décrites chez RAD51 ainsi que chez ses homologues que sont MvRadA, ScRad51 et EcRecA^{128-130,134,139}.

Les structures de RAD51 et ses homologues ont été plus ou moins résolues. Story et collaborateurs ont mis en évidence la présence de deux boucles L1 et L2 chez RecA¹³⁹. Cette structure serait ainsi capable de lier l'ADP et l'ADN chez RecA, et par extension chez RAD51, via des études comparatives de structures protéiques. Matsuo et collaborateurs ont ensuite montré que ces boucles flexibles étaient importantes pour lier l'ADN chez RAD51, en étudiant le comportement de mutants RAD51 pour des acides aminés situés au niveau des boucles L1 et L2¹⁴⁰. Dans cette étude, les mutations sur les résidus Asp231, Tyr232, Ser233 et Gly236 de RAD51 sont les plus délétères dans la fonction de liaison à l'ADN. Des mutations sur des résidus de la boucle L2 montrent que ce site semble moins important dans la liaison à l'ADNsb. Le modèle proposé suggère que le résidu Tyr232, situé dans la boucle L1, qui sert d'ancrage en permettant, via son intercalation dans la double hélice d'ADN, l'alignement des monomères de RAD51 le long de l'ADN pendant l'assemblage du filament. Le résidu Arg235, aussi situé dans la boucle L1, interagirait ainsi avec le squelette phosphate de l'autre brin d'ADN via des interactions électrostatiques^{141,142}.

Récemment, il a été montré que RAD51 ne pouvait former un filament autour de l'ADNsb sans se lier à l'ATP¹⁴³. RAD51 forme un filament par auto-association entre les monomères en absence de Ca²⁺, d'ATP et d'ADN. En présence d'ADNsb, RAD51 forme un filament non-structuré et lorsque du Ca²⁺ et de l'ATP sont présents, le filament de RAD51 se réorganise pour former des structures en anneau et en courtes hélices, soulevant ainsi le fait que

l'ATP puisse jouer un rôle structurel dans la formation du nucléofilament lors de la phase présynaptique ¹⁴³.

Via ses deux domaines de liaison à l'ADNsb, RAD51 est capable de s'associer à l'ADN et initier la formation du nucléofilament de RAD51 autour de l'ADN.

2.1.2.3. Domaine de polymérisation (PM)

RAD51 possède entre ses deux principaux domaines un motif de polymérisation nécessaire à la formation du nucléofilament de RAD51 lors de la phase pré-synaptique de la RH.

La polymérisation de RAD51 a été étudiée chez l'archée *Pyrococcus furiosus* par cristallographie ¹²⁹. La structure de la protéine a été élucidée dans cette étude et le rôle de BRCA2 et plus particulièrement des motifs répétés BRC, capables de lier le motif de polymérisation de RAD51.

Subramanyam et al ¹⁴⁴ ont récemment confirmé l'importance du domaine N-ter de RAD51, capables d'interagir avec BRCA2. Ils ont ainsi pu générer une forme cristallisée de la partie N-ter de RAD51 fusionnée au peptide BRC4. Ce peptide se fixe à RAD51 en mimant les motifs répétés de BRCA2. Ces motifs, au nombre de 8 séquences d'environ 35 acides aminés, sont situés sur la partie centrale de la protéine et permettent notamment l'interaction entre BRCA2 et RAD51, les motifs répétés BRC3 et BRC4 jouant un rôle important dans cette interaction ¹⁴⁵. Le résidu S3291 dans la partie C-ter de BRCA2 joue également un rôle important dans cette interaction. En effet, lorsque ce résidu est phosphorylé, RAD51 se dissocie de BRCA2 ¹⁴⁶⁻¹⁵⁰. Cette interaction est à la base du transport de RAD51 au noyau et à la formation du nucléofilament.

2.1.2.4. Domaine de liaison à l'ATP

Pour assurer un rôle actif, RAD51 est capable de lier et hydrolyser l'ATP. Dans ce but, la protéine possède un domaine Walker A et un domaine Walker B au centre de la protéine.

Il a été montré que la liaison de l'ATP à la protéine, et pas nécessairement son hydrolyse, est suffisante pour permettre à RAD51 d'exercer son activité de recombinaise ^{151,152}.

Amunugama et al ¹⁵³ ont montré que les résidus F129 et H294, situés respectivement dans les domaines Walker A et dans la boucle L2, sont importants pour l'activité recombinaise de RAD51. La substitution de ces résidus par des résidus valine entraîne une diminution de

l'activité ATPase de la protéine aboutissant à un défaut de formation du nucléofilament protéique.

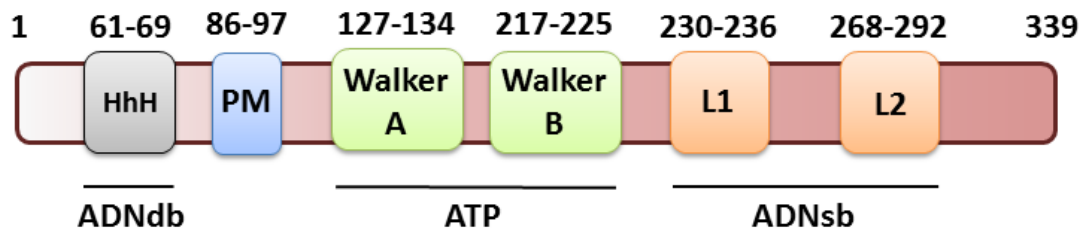


Figure 10 - Domaines de la protéine RAD51 humaine.

La protéine RAD51 humaine possède quatre grands domaines. Situé en N-ter de la protéine, le motif HhH (*Helix-hairpin-Helix*, pour Hélice-boucle-Hélice) permet l'association à l'ADNdb. Le motif de polymérisation (PM) constitue la région d'interaction entre deux monomères de RAD51, jouant un rôle prépondérant dans la formation du filament de RAD51. Les domaines Walker A et B constituent la partie centrale de la protéine et permettent la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. Enfin, le dernier domaine de RAD51 est composé de deux boucles L1 et L2, permettant l'association de la protéine à l'ADNsb ^{131,134,140,141}.

2.1.3. Les rôles de RAD51 durant la recombinaison homologue

Nous verrons ici les différentes activités de RAD51 au cours du processus de réparation des CDB par RH. Ces différentes activités seront plus approfondies par la suite.

Avant d'intervenir dans la RH, l'ADN au niveau de la cassure est résecté, générant ainsi des extrémités 3'-sortantes. C'est le point de départ de la phase pré-synaptique de la RH, durant laquelle RAD51 est recruté au niveau de la zone lésée et forme un nucléofilament avec l'ADNsb. Cette étape nécessite la fixation de l'ATP par RAD51.

Durant l'étape suivante, la phase synaptique, le nucléofilament recherche une homologie de séquence. Une fois l'homologie trouvée, RAD51 catalyse l'échange de brins entre l'ADNsb issu de la cassure et l'ADNdb de la matrice intacte. La structure formée est appelée D-loop (*displacement loop*).

Durant la phase post-synaptique, la troisième et dernière étape de la RH, RAD51 participe à la formation des jonctions de Holliday, extension de la structure en D-loop de l'étape précédente. Ces structures sont ensuite résolues par des résolvas et des hélicases. RAD51 n'a pas un grand rôle durant cette phase, cette étape signifiant surtout le départ de RAD51 de l'ADN. Celle-ci est active et nécessite l'hydrolyse de l'ATP.

Au fil des étapes de la RH, RAD51 sollicite ainsi différentes interactions avec l'ADNsb, l'ADNdb, l'ATP mais également avec d'autres monomères de RAD51. Toutes ces interactions définissent les différentes activités de RAD51, comme la liaison à l'ADNsb ou l'ADNdb, son activité recombinaise, l'hydrolyse de l'ATP ou encore la capacité à former un nucléofilament. Ces activités sont décrites dans la suite du manuscrit.

2.1.3.1. L'interaction RAD51-RAD51

Via son motif de polymérisation (PM), RAD51 est capable de s'associer à un second monomère de RAD51^{148,154}. Ceci s'accompagne de la liaison de RAD51 à l'ADNsb ou l'ADNdb¹⁴² et entraîne différents degrés de polymérisation de RAD51^{148,154}. En absence d'ADN, RAD51 forme un anneau heptamérique ou octamérique selon les organismes^{129,155}.

Comme dit précédemment, ce sont les résidus situés entre les positions 86 et 97 qui sont responsables de la polymérisation. D'autres résidus sont suggérés pour intervenir dans l'interaction monomère-monomère, il s'agit des résidus Tyr188, chez un homologue de RecA nommé Rad51.1 de *Xenopus*, (correspondant à Tyr191 chez hRAD51) et Tyr315, chez RAD51 humaine^{156,157}.

La capacité de RAD51 à s'auto-associer est primordiale puisqu'elle est à la base de toutes les activités de RAD51 au cours de la RH. Lorsque l'on empêche RAD51 de s'auto-associer, cela perturbe totalement les fonctions de RAD51, notamment son activité recombinaise. L'utilisation de petits peptides imitant le motif BRC4 de BRCA2 ou encore des mutations sur RAD51 au niveau du domaine de polymérisation entraîne une perte de l'activité recombinaise de RAD51^{145,149,158}.

2.1.3.2. La formation du nucléofilament

La première phase de formation du nucléofilament est la nucléation. Celle-ci correspond à la fixation de 4 à 5 monomères de RAD51 sur l'ADNsb issu de la résection^{159,160}. L'association et la dissociation des monomères de RAD51 sont très dynamiques, les monomères se liant à l'ADN et le quittant rapidement^{90,154}. Une fois les monomères fixés à l'ADNsb, ceux-ci servent de point d'ancrage à d'autres monomères de RAD51 pour réaliser l'extension du nucléofilament. Ces points de nucléation, si le nucléofilament ne s'allonge pas, peuvent se dissocier de l'ADNsb. C'est en effet la longueur du nucléofilament qui détermine sa stabilité¹⁵⁴. La nucléation est observée tous les 500pb au minimum, le nucléofilament

recouvre presque la totalité de l'ADNsb présent à la cassure, mis à part quelques portions pour lesquelles la nucléation n'est pas réalisable, par manque d'espace ⁹⁰.

L'hélice que forme le nucléofilament est de forme dextrogyre, un tour d'hélice étant formé de 18,6 bases et de 6 monomères de RAD51 ¹⁶¹. L'ATP revêt une grande importance dans la formation du nucléofilament. En présence d'ATP, le filament aura une conformation plus compacte alors qu'en absence d'ATP, celle-ci sera plus relâchée. Ce processus est réversible, un filament privé d'ATP peut de nouveau s'allonger s'il est en présence d'ATP ^{143,162}. L'importance de l'ATP est également soutenue par une étude sur des mutants de RAD51, sur le résidu Lys133 ¹⁵².

Plusieurs partenaires interagissent avec RAD51 pour faciliter son recrutement au niveau de la cassure, il s'agit de BRCA1, BRCA2 et PALB2. Le processus de recrutement de RAD51 au niveau de la CDB est connu et met en jeu le recrutement de BRCA1, qui joue un rôle également dans la fin de la résection ¹⁶³⁻¹⁶⁷, qui s'associe à PALB2 pour former ensuite un complexe avec BRCA2. C'est BRCA2 et PALB2 qui agissent ensuite directement avec RAD51 pour l'amener à la cassure ^{70-72,168,169}. Récemment, il a été montré que la protéine DSS1 participerait également à l'arrivée de RAD51 à la cassure. DSS1 mimerait l'ADNsb pour diminuer l'affinité de RPA pour l'ADNsb, et faciliter son départ ⁸⁹.

RAD52 participe également à l'interaction de RAD51 avec l'ADN. RAD52 forme des complexes structuraux avec RAD51 et l'ADNdb ¹⁷⁰ et permet le recrutement de RAD51 sur l'ADNsb recouvert de RPA ⁷⁸.

Comme expliqué dans la partie 2.1.2, les domaines Walker A et Walker B, pour la liaison à l'ATP, et les boucles L1 et L2, pour l'association à l'ADNsb, de RAD51 sont sollicités pendant l'étape de formation du nucléofilament ^{140,142,143,152}.

Lorsque l'on se penche sur les homologues de RAD51, on peut noter que la formation du nucléofilament est l'étape la plus étudiée et qu'il existe des différences dans la manière dont les boucles interagissent avec l'ADN ¹⁴². Ceci est sûrement dû à la différence de séquences des boucles entre les espèces et donc à une différence d'interaction entre l'ADN et la protéine ¹⁴⁰. Le processus de nucléation a également été étudié pour ScRecA. Il s'avère qu'il est nécessaire qu'un dimère de ScRecA s'associe à l'ADNsb et que ce phénomène est dépendant de la composition en nucléotides et de la concentration en cofacteurs ioniques comme le Ca^{2+} , le Na^+ et le Mg^{2+} ^{171,172}. L'extension se déroule dans les deux sens, cependant, l'élongation dans le sens 5'-3' est plus rapide. Des médiateurs comme ScRecO, ScRecR ou ScRecF participent à la modulation de la nucléation de ScRecA ¹⁷³.

2.1.3.3. *La recherche d'homologie et l'activité recombinase*

Après que RAD51 se soit associée à l'ADNsb formant ainsi le nucléofilament, elle doit rechercher l'homologie avec la séquence d'ADNdb matrice et réaliser l'échange de brins. Au contraire de RecA, où le phénomène est bien décrit ^{174,175}, l'association de RAD51 à l'ADNdb et la recherche d'homologie est moins bien comprise ¹⁷⁶. En se basant sur les mécanismes décrits pour RecA, il est suggéré que l'ADNsb se fixe d'abord sur un site de RAD51, puis l'ADNdb se lie à un second site avec une affinité moindre. Ceci a pour but d'effectuer un roulement dans les séquences d'ADNdb associées à RAD51 afin de trouver l'homologie avec l'ADNsb issu de la cassure ^{177,178}. Cette activité a été observée chez la levure avec le phénomène de mobilité de la zone de cassure ¹⁷⁹.

Dans cette optique de recherche d'homologie, la protéine RAD54 joue un rôle important vis-à-vis de RAD51 ¹⁸⁰. Une étroite collaboration existe entre RAD51 et RAD54 conditionnant la dynamique de RAD51 et son association avec l'ADNdb, notamment grâce aux activités ATPasiques des deux protéines ¹⁸¹.

Lorsque RAD51 recherche une homologie de séquence, elle tolère une certaine hétérologie. Cette hétérologie a été chiffrée au nombre de 4 mésappariements acceptés ¹⁸². La tolérance est augmentée lorsque l'activité ATPasique de RAD51 est diminuée, comme c'est le cas pour le mutant RAD51 K133R ¹⁸².

Tout récemment, une étude a proposé un modèle pour la recherche d'homologie par les recombinaisons de la famille RecA, dont RAD51 fait partie ¹⁸³. Il est basé sur la recherche de micro-homologie entre l'ADNsb et l'ADNdb, puis par une dissociation si l'homologie n'est pas correcte. Ce phénomène serait très rapide, pour une homologie d'au moins 8 nucléotides entre les deux séquences. L'homologie parfaite semble être d'au moins 8 nucléotides, aucune association n'étant observée pour 7 nucléotides. Dans ce modèle, si l'association avec une séquence de 8 nucléotides est parfaite, la recherche continuera sur le 9^{ème} nucléotide, qui semble jouer un rôle important. RAD51 continuera de chercher une homologie par triplet de nucléotides avec un seuil qui semble être de 15 nucléotides pour la séquence d'ADNdb homologues. Au-delà de ce seuil, la dissociation et l'échange avec une autre séquence à scanner est moindre (Figure 10). De manière intéressante, des résultats similaires ont été observés pour d'autres protéines de la famille RecA (ScDmc1 et ScRecA). Ce phénomène semble donc conservé à travers l'évolution, indiquant l'importance de ce processus dans la recherche d'homologie.

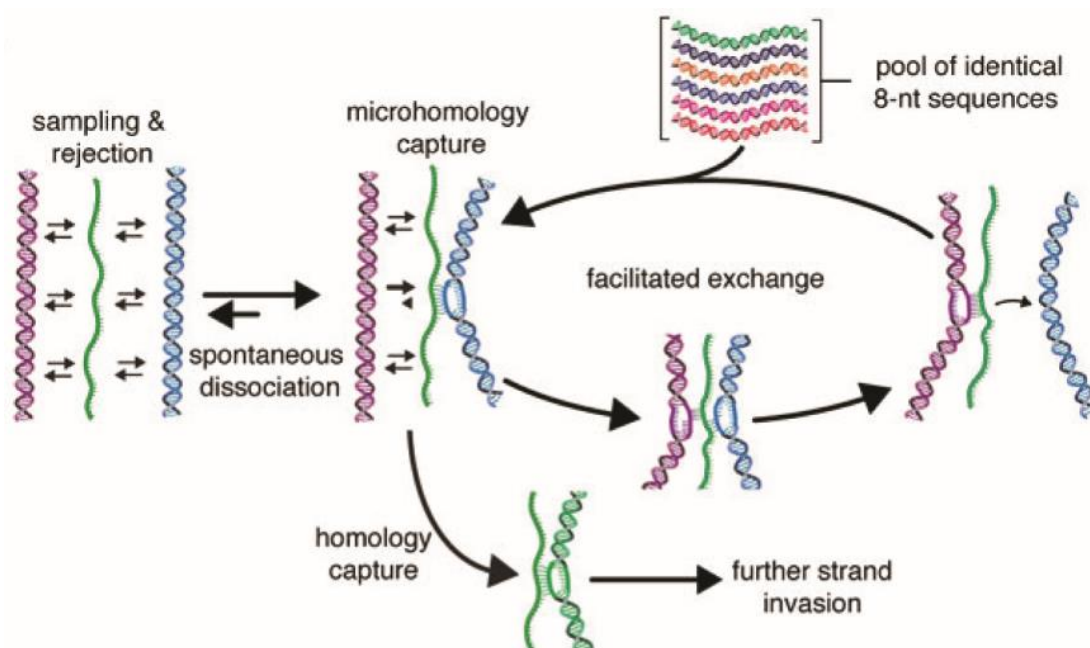


Figure 11 - Modèle de recherche d'homologie par RAD51.

La recherche d'homologie par RAD51 durant la RH n'est pas totalement connue. Le modèle présenté propose que le nucléofilament se fixe à l'ADNdb afin de chercher une homologie de séquence. Cette homologie de séquence doit être parfaite sur un minimum de 8 nucléotides (capture par micro-homologie ou *microhomology capture*). Si cela n'est pas le cas, le nucléofilament de RAD51 se dissocie de l'ADNdb et se lie à un nouveau brin d'ADNdb (échange facilité ou *facilitated exchange*). En revanche, si l'homologie est parfaite sur 8 nucléotides, le scan continue sur le 9^{ème} nucléotide. Le même cas de figure se présente à nouveau, puisque si l'homologie n'est pas correcte, l'ADNdb est relâché et le nucléofilament change d'ADNdb à scanner. Si le 9^{ème} nucléotide est adéquat, RAD51 continue de scanner la région homologue, la stabilité de l'hétéroduplexe RAD51-ADNsb-ADNdb étant corrélée à la perfection de l'homologie détectée. Ce mécanisme assure ainsi un roulement dynamique dans la recherche de la séquence adéquate. (Tiré de ¹⁸³).

2.1.4. Les autres rôles de RAD51

RAD51 est également impliqué dans d'autres phénomènes, comme la recombinaison V(D)J, responsable du changement de classe des immunoglobulines chez les lymphocytes B. L'implication de Rad51 a été montrée chez le poulet. Durant la maturation des immunoglobulines chez les lymphocytes B, les segments géniques V, D et J sont remaniés afin de générer une immunoglobuline adaptée à la réponse immunitaire ¹⁸⁴. Dans le processus de recombinaison de ces séquences géniques, Rad51 intervient après la génération d'une CDB pour permettre une recombinaison entre les séquences d'ADNsb issues de la cassure et

d'ADNdb de la région génique nécessaire à la formation de la séquence génique codant l'immunoglobuline^{185,186}. Chez l'humain, c'est la NHEJ qui est responsable de ce phénomène.

RAD51 joue également un rôle important dans la conservation des télomères, par le mécanisme d'allongement alternatif des télomères. Ce mécanisme est indépendant des télomérases, des enzymes capables d'ajouter des nucléotides au niveau des télomères des chromosomes. Le mécanisme d'allongement alternatif des télomères utilise plusieurs protéines impliquées dans la RH, comme BRCA1¹⁸⁷, MRE11, NBS1^{188,189} ou encore RPA¹⁹⁰. RAD51 intervient également dans ce processus, puisque sa présence a été détecté au niveau des APB¹⁹⁰. RAD51 participe à la formation de la t-loop, une structure intermédiaire formée par la queue d'ADNsb et l'ADNdb du télomère afin d'aboutir à l'allongement des télomères¹⁹¹.

La protéine RAD51 est également impliquée avec BRCA2 dans la protection des fourches de réplication contre la résection par MRE11¹⁹²⁻¹⁹⁴.

2.1.5. La régulation de RAD51

2.1.5.1. Les dérégulations de RAD51

RAD51 possède un rôle primordial dans la cellule. De nombreux tests ont été menés pour mesurer cette importance. Lorsque l'on inactive le gène *RAD51* dans les cellules de poulet DT40, cela entraîne une mortalité accrue des cellules¹²⁰. L'utilisation de siARN dirigé contre *RAD51* affecte également la survie cellulaire¹⁹⁵. Ce phénomène est également observé dans des organismes pluricellulaires, puisque l'inactivation de *RAD51* chez la souris aboutit à la létalité prématurée des embryons¹²².

Plusieurs mutations de RAD51 ont été mises en évidence dans des cas de cancer du sein, de l'ovaire¹⁹⁶⁻²⁰⁴. Ces mutations sont souvent retrouvées associées à d'autres mutations présentes sur les gènes *BRCA1* et *BRCA2*. La mutation la plus couramment rencontrée est le polymorphisme G135C, souvent retrouvé dans les cancers²⁰⁵⁻²⁰⁸.

Plusieurs études ont mis en exergue la surexpression de RAD51 dans divers types de cancer. C'est ainsi le cas du cancer du pancréas²⁰⁹, du cancer du sein²¹⁰, de l'adénome colorectal²¹¹ ou encore le cancer du poumon à non-petites cellules²¹². L'hypothèse suggérée concernant l'impact d'une dérégulation de l'expression de *RAD51* dans les cellules tumorales, est que cela procure une capacité de résistance de ces cellules aux traitements anti-cancéreux. Plusieurs études ont ainsi montré le lien qui existe entre une surexpression en *RAD51* et la résistance des cellules cancéreuses²¹²⁻²¹⁴. Plusieurs éléments ont confirmé ceci, via l'inhibition de RAD51. Inhiber RAD51 par ARN interférence permet de sensibiliser les cellules cancéreuses au

traitement à la cisplatine et à l'inhibiteur de PARP, AZD2281²¹⁵. Un autre élément montre que l'inhibition de RAD51 par siARN sensibilise les cellules tumorales au gefitinib²¹⁶.

2.1.5.2. Les modes de régulation de RAD51

2.1.5.2.1. La régulation au niveau génique

Actuellement, seuls deux facteurs sont connus pour moduler l'expression génique de *RAD51*, il s'agit du suppresseur de tumeur, p53 qui inhibe l'expression de *RAD51*²¹⁷⁻²¹⁹, et de EGR1 qui stimule l'expression de *RAD51*²²⁰. Il est suggéré que la protéine STAT5 participe à la régulation de l'expression de *RAD51*²¹⁷. E2F1 semble être un régulateur, même si son rôle semble être encore sujet à débat^{221,222}.

2.1.5.2.2. L'épissage alternatif

Il existe 4 isoformes de *RAD51*. L'isoforme 1 est la plus connue et celle qui est le plus couramment étudiée. Les isoformes 2 et 4 ont également été décrites mais ne semblent pas jouer de rôle biologique^{223,224}. Enfin, l'étude de l'isoforme 3 montre des résultats intéressants. En effet, elle est localisée dans le noyau, mais possède une activité recombinaise *in vitro*. Cette isoforme est issue d'un épissage alternatif dont l'exon 9 est manquant, résultant en la troncation de la protéine en position C-ter. Elle est plus petite que l'isoforme 1, puisque son poids moléculaire est de 31 kDa²²⁵. Son expression a été détectée dans le testicule. Il est envisageable que cette isoforme de *RAD51* puisse jouer un rôle plus ou moins important dans la cellule.

2.1.5.2.3. La régulation au niveau protéique

2.1.5.2.3.1. Localisation et translocation nucléaire de RAD51

Outre l'expression de *RAD51* contrôlée au niveau de son promoteur ou, plus tard, lors de l'épissage, un autre niveau de contrôle existe et s'établit au niveau protéique. Cette régulation influe sur différentes fonctions de *RAD51*, sur sa localisation dans la cellule ou son activité recombinaise.

RAD51, par son activité recombinaise, doit être localisée dans le noyau pour jouer son rôle. A l'état basal, *RAD51* est réparti aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme^{145,226-228}. *RAD51* ne possède aucun domaine qui lui permette de se localiser au noyau. Cependant, elle présente un domaine d'exclusion du noyau (séquence NES, *Nuclear Export Sequence*)²²⁹. On ne connaît pas le mode de localisation de *RAD51* en l'absence de CDB, mais on peut suggérer un transport passif de la protéine. Ce qui tend à cette hypothèse est la présence d'une séquence NLS sur la protéine *RAD51C*, un paralogue de *RAD51*, impliqué notamment dans la RH²³⁰⁻²³². *RAD51* est connu pour interagir avec *RAD51C*, un transport nucléaire de *RAD51*

en compagnie de RAD51C est alors envisageable ²²⁸. En revanche, en présence de CDB, RAD51 est localisé au noyau et forme des foyers de réparation observables par microscopie ^{126,233}. La localisation nucléaire de RAD51 après des dommages causés à l'ADN implique BRCA2 ^{145,234-236}. BRCA2 interagit avec RAD51 et possède un NLS, responsable de ce transport. Il est ainsi impossible d'observer la présence de foyers RAD51 dans les cellules cancéreuses du pancréas CAPAN-1, dont un allèle du gène BRCA2 est inactivé et le second présente une mutation résultant en une protéine tronquée et inactive ²³⁷. Ce transport implique également la protéine PALB2, partenaire de BRCA2 et BRCA1 dans un complexe facilitant le transport de RAD51 au noyau ^{168,238-240}. Une autre protéine est susceptible de participer à la localisation nucléaire de RAD51, il s'agit de DSS1 ⁸⁷. Cette protéine est capable d'interagir avec BRCA2 de mimer l'ADN et de permettre la dissociation de RPA de l'ADNsb ⁸⁹.

Plusieurs partenaires interviennent dans le recrutement de RAD51 au site de lésion et participent également à la stimulation de l'activité de RAD51. Comme dit précédemment, BRCA2 est un partenaire particulier de RAD51, puisqu'il permet son import au noyau, notamment via sa complexation avec BRCA1 et PALB2 ^{88,168,238-240}. On le considère comme un médiateur de RAD51. BRCA2 participe au chargement de RAD51 sur l'ADN et à la stabilité du filament via ses 8 motifs répétés BRC, son domaine de liaison à l'ADN et à DSS1, ainsi que sa partie C-ter ^{86,241-244}. BRCA2 est capable de stimuler l'activité recombinaise de RAD51 ⁸⁶, tout comme PALB2 stimule l'étape d'invasion ^{245,246}.

Le recrutement de RAD51 sur l'ADN est également facilité par RAD52 qui déplace RPA de l'ADNsb ^{77,247,248}. En plus de son rôle sur l'association de RAD51 à l'ADN, RAD52 stimule également l'activité recombinaise de RAD51 ^{76,249}.

Il existe également une interaction directe entre RAD51 et p53, aboutissant à l'inhibition de la RH ²⁵⁰.

2.1.5.2.3.2. Stabilité de RAD51

Il existe des systèmes menant à la dégradation de RAD51 et donc au contrôle de la quantité de RAD51 dans la cellule. RAD51 est une cible de l'ubiquitylation. Cela a été préalablement montré chez la levure ²⁵¹, puis chez les cellules de mammifères, ceci menant à la dégradation de RAD51 par le protéasome ^{252,253}. Un autre système de dégradation de RAD51 existe, il est dépendant de la caspase 3 capable de cliver RAD51 et de mener à l'apoptose ²⁵⁴⁻²⁵⁶.

Les paralogues de RAD51 (RAD51B/C/D, XRCC2 et XRCC3) participent à l'étape de fixation de RAD51 à l'ADN ^{79,231,257}.

Le suppresseur de tumeur, p53, en plus d'inhiber l'expression de *RAD51*, interagit directement avec RAD51 et inhibe la fixation de RAD51 à l'ADN ²⁵⁸.

Durant la phase de dissociation du nucléofilament et le départ de RAD51 de l'ADN, l'activité ATPasique de RAD51 est mise en jeu, mais RAD54 faciliterait ce processus. Le rôle de RAD54 n'est pas totalement clair, puisque RAD54 stimule l'échange de brins, stabilise et déstabilise le nucléofilament ^{181,259}. Son rôle vis-à-vis de RAD51 est important, puisqu'une déficience en RAD54 entraîne une distribution anormale de RAD51 sur les chromosomes dans les cellules de mammifère ²⁶⁰.

2.1.5.2.3.3. Régulation de RAD51 par les PTM

RAD51 est également sujet à des modifications post-traductionnelles (ou PTM pour *Post-Translational Modification*), et notamment des phosphorylations. Plusieurs sites de phosphorylation sur RAD51 ont été décrits et la conservation de ces sites dans l'évolution est importante.

Le résidu Thr309 est phosphorylé par CHK1 suite à des dommages à l'ADN ²⁶¹. CHK1, protéine responsable du blocage du cycle cellulaire en cas de dommage à l'ADN, phosphoryle RAD51 sur le résidu Thr309 et l'active. Lorsque CHK1 est inhibé, la formation des foyers RAD51 est diminuée.

Deux résidus de RAD51 sont sollicités par un phénomène de phosphorylation séquentiel : les résidus Ser14, phosphorylé par Plk1, et Thr13, cible de CK2 ²⁶². Cette double-phosphorylation participe à l'association entre RAD51 et NBS1, suggérant ainsi le rôle de ces phosphorylations dans le recrutement de RAD51 au site de cassure. BRCA2 serait impliqué dans la phosphorylation par Plk1 ¹⁵⁰.

Un autre phénomène de phosphorylation séquentiel existe chez RAD51 sur les résidus Tyr54 et Tyr315. Ce phénomène prend place après induction de dommages à l'ADN. La protéine c-Abl activée par ATR, phosphoryle RAD51 tout d'abord sur le résidu Tyr315, puis sur le résidu Tyr54 ²⁶³⁻²⁶⁷.

Le rôle des différentes phosphorylations sur RAD51 n'est pas totalement élucidé. La phosphorylation séquentielle des résidus Tyr315 et Tyr54 jouerait un rôle dans la polymérisation de RAD51, le résidu Tyr315 étant situé à l'interface entre deux monomères, sa phosphorylation affecterait l'association entre deux unités de RAD51 ^{157,268}. La

phosphorylation de RAD51 par c-Abl faciliterait également son recrutement au site de cassure via RAD52 ²⁶⁴.

RAD51 est également la cible de l'ubiquitinylation ²⁶⁹. Le complexe SCF, composé de SKP1, CUL1 et d'une protéine à F-box, est capable d'ajouter une ubiquitine sur RAD51. La protéine à F-box concernée est FBH1. Le modèle proposé par les auteurs est que FBH1 soit transloqué dans le noyau, puis interagisse directement avec RAD51 entraînant la dissociation du nucléofilament. Le complexe SCFFBH1 intervient pour ubiquitinyler RAD51 et empêcher sa réassociation à l'ADN.

2.2. RAD52, une protéine de la recombinaison homologue qui révèle peu à peu son importance

2.2.1. Rad52 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la conservation dans l'évolution

Tout comme Rad51, la protéine Rad52 a été identifiée par irradiation (IR) chez l'organisme *Saccharomyces cerevisiae* ¹²³. Parmi les protéines du groupe épistatique de Rad52, c'est l'absence de Rad52 qui s'avère être la plus délétère ²⁷⁰. Rad52 est capable d'auto-association formant ainsi un oligomère, ce processus étant médié par la partie N-ter de la protéine. Cette même portion N-ter comporte un site d'interaction avec l'ADNsb ^{104,271}. Rad52 est considéré comme un médiateur de Rad51, étant donné l'absence de BRCA2 chez *S. cerevisiae*. Ainsi, Rad52 est capable de stimuler l'étape d'invasion par Rad51 en interagissant directement avec elle ²⁷². Rad52 agit également en empêchant RPA d'inhiber les fonctions ATPase et recombinase de Rad51 ^{74-76,273}.

2.2.2. RAD52 chez l'homme : caractéristiques et fonctions

2.2.2.1. Les caractéristiques de RAD52

La protéine RAD52 chez l'homme, constituée de 418 acides aminés pour un poids moléculaire de 46 kDa, est structuellement similaire à ScRad52 et possède des fonctions biochimiques proches (Figure 11). RAD52 est ainsi capable d'interagir avec RPA, de lier l'ADNsb, d'hybrider deux ADNsb et de lier RAD51 et stimuler son activité d'échange de brins ^{274,275}. RAD52 présente une poche composée de résidus aromatiques, basiques et chargés positivement, lui permettant notamment de former une structure en anneau constituée de 7 à 11

sous-unités de RAD52 et de lier l'ADNsb, la forme heptamérique étant prédominante (Figure 13)^{106,107,276–278}. Des mutations sur ces résidus de ScRad52 mettent en évidence un défaut dans la réparation de l'ADN²⁷⁹. En plus de pouvoir lier l'ADNsb, RAD52 est capable de lier l'ADNdb¹⁰⁸ (Figure 12). Des mutations sur des résidus de ce domaine empêchent ScRad52 de stimuler la fonction de formation de la D-loop par ScRad51²⁸⁰.

2.2.2.2. *Les fonctions de RAD52*

RAD52 participe à l'arrivée de RAD51 au niveau du site de la cassure durant la phase pré-synaptique de la RH, de lier les deux extrémités de la cassure, de protéger le site de l'action des nucléases²⁸¹. Au contraire de ScRad52, HsRAD52 n'est pas considéré comme un médiateur de RAD51²⁸². Cependant, en absence de BRCA1, BRCA2 ou PALB2, RAD52 semble prendre ce rôle de médiateur^{283,284}. Il est possible que RAD52, n'étant pas suffisant pour assumer le rôle de médiateur, agisse en coopération avec d'autres protéines. Dans ce contexte, les paralogues de RAD51 ne semblent pas être liés à ce phénomène²⁸⁵. De manière intéressante, le complexe SWS1-SWASP1 est capable d'interagir avec RAD51 et également avec les paralogues de RAD51, et une déplétion en SWASP1 entraîne un défaut de réparation par RH²⁸⁶. Ce complexe est un candidat potentiel au rôle de médiateur que RAD52 peut endosser dans un contexte de déficience en BRCA1, BRCA2 ou PALB2. RAD52 est également sujette à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation de la tyrosine 104 par c-Abl ou la sumoylation^{287–289}.

RAD52 est également impliqué dans le phénomène de capture de la seconde extrémité de la cassure (*second-end capture*). Ce phénomène intervient dans les dernières étapes de la RH et permet la recapture de l'ADNsb pour aboutir à la formation de jonctions de Holliday. Suite à la formation de la D-loop, l'ADN est synthétisé par la polymérase η , puis l'ADNsb issu de la cassure est hybridé à l'ADNsb de la matrice. La structure aboutit à la formation des jonctions de Holliday, résolues par la suite avec ou sans *crossing-over*^{290,291}.

Rad52 a été très étudié chez *Saccharomyces cerevisiae*, ceci étant notamment dû à son rôle prépondérant dans la RH, ce qui n'est pas le cas pour son homologue humain. En effet, malgré son rôle dans la RH et la SSA, un défaut en RAD52 n'affecte que peu le phénotype de la cellule chez les mammifères, rendant ainsi des investigations sur RAD52 nécessaires pour mieux comprendre son importance^{292,293}.

Chez certains organismes, comme *Ustilago maydis*, l'impact de Rad52 est moindre pour l'homéostasie de la cellule. En effet, dans cet organisme, un homologue de BRCA2, Brh2, est responsable du processus de *second-end capture* ²⁹⁴.

Les fonctions de BRCA2 et RAD52 semblent être liées à travers l'évolution. Par exemple, *Saccharomyces cerevisiae* ne possède pas d'homologue de BRCA2 et Rad52 assure les fonctions de cette absence. Un autre exemple marquant est le fait que *Caenorhabditis elegans* exprime Brc-2, un homologue de BRCA2, mais ne possède pas d'homologue de RAD52. Il a été montré que Brc-2 possède des capacités d'hybridation à l'ADNsb en présence de RPA, capacité absente de BRCA2 chez l'homme ^{282,295} (Figure 14).



Figure 12 - Domaines de la protéine RAD52 humaine.

La protéine RAD52 est découpée en quatre parties. Le premier domaine, situé dans la partie N-ter de la protéine permet de lier l'ADNsb. La seconde portion de la protéine comporte deux fonctions, un site de polymérisation (PM) nécessaire à l'auto-association entre monomères de RAD52 nécessaire à la formation de l'anneau et un site de fixation à l'ADNdb. Ce site n'est pas encore clairement défini, cependant, les résidus importants à la liaison à l'ADNdb sont les Lys-102, Lys-133, Lys-169 et Lys-173. De plus, les modèles d'étude d'interaction RAD52-ADNdb mettent en évidence que RAD52₁₋₂₁₂ est capable de lier l'ADNdb ^{108,427}.

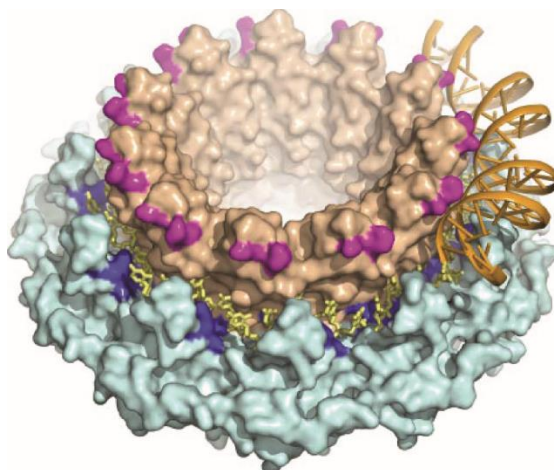


Figure 13 - Modèle structural de l'anneau de RAD52 complexé à l'ADNsb et l'ADNdb.

Les résidus lysine 102 et lysine 133 de RAD52₁₋₂₁₂ sont représentés en magenta, l'ADNsb en jaune et l'ADNdb en orange. L'anneau de RAD52 est capable de s'associer à la fois à l'ADNsb et également à l'ADNdb. Le mécanisme d'action de RAD52 n'est pas encore clair, mais il est suggéré que l'anneau de RAD52 s'associe à l'ADNdb et permet son ouverture grâce notamment à l'association de l'ADNdb à plusieurs anneaux de RAD52. L'ADNdb lié à RAD52 est ainsi étiré et est alors aligné à l'ADNsb associé à RAD52. (Tiré de ¹⁰⁸)

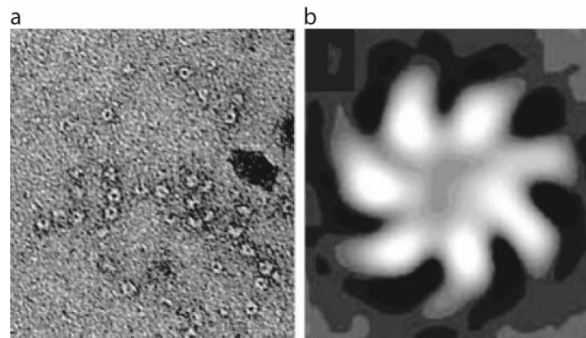


Figure 14 - RAD52 s'auto-associe pour former des structures en anneau.

Les images obtenues par microscopie électronique à transmission montrent la structure en anneau que prend l'association entre monomères de RAD52. A plus fort grossissement, on peut observer la structure heptamérique de cet anneau. (Tiré de ^{106,276})

		Mediator	Annealer	HR Phenotype
<i>H. sapiens</i>	BRCA2	✓	NO	++
<i>M. musculus</i>	RAD52	NO	✓	(+)
<i>C. elegans</i>	BRC-2	✓	✓	++
	No Rad52			
<i>U. maydis</i>	Brh2	✓	✓	++
	Rad52	low	✓	-
<i>S. cerevisiae</i>	No BRCA2			
	Rad52	✓	✓	++

Figure 15 – Fonctions et phénotypes des protéines BRCA2 et RAD52 dans différents organismes.

Certains organismes expriment un homologue de RAD52, un homologue de BRCA2 ou les deux. Dans le premier cas (chez *Saccharomyces cerevisiae*), Rad52 prend en charge toutes les fonctions de médiation et d'hybridation de l'ADN. Dans le deuxième cas (chez *Caenorhabditis elegans*), c'est l'homologue de BRCA2 qui possède ces fonctions. Dans le dernier cas, ces fonctions sont réparties entre les deux protéines. (Tiré de ⁴²⁸)

3. Le cancer, les traitements associés et les liens avec la recombinaison homologue

3.1. Les traitements thérapeutiques ciblant le cancer

Le cancer est une pathologie très étudiée actuellement, notamment par le fait qu'il n'existe pas de remède universel pour le traiter. Plusieurs types de traitement ont été développés dans cette optique. Parmi les plus connus, il y a la radiothérapie, la chimiothérapie,

l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la chirurgie. Cependant, les cancers sont des pathologies complexes qui impliquent différentes voies de signalisation dans la cellule, des modifications génétiques rendant également la cellule tumorale plus résistante en adaptant les processus essentiels de la cellule. C'est pourquoi, ces dernières années, les approches personnalisées sont privilégiées. Elles combinent généralement plusieurs types de traitement afin d'empêcher la cellule de résister. Un bon pronostic, et donc une bonne connaissance du cancer, notamment les données génétiques, sont nécessaires pour cette approche.

3.2. La disponibilité du médicament

Un médicament qui se veut efficace, se doit être facilement disponible pour le ou les lieux où il exerce son action. La définition approuvée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et la FDA (Food and Drug Administration) est la suivante : « La biodisponibilité représente la fraction du principe actif administré qui atteint la circulation générale et la vitesse à laquelle elle l'atteint ». Plusieurs facteurs peuvent interférer avec la délivrance du médicament sur son lieu d'action. Ainsi, le médicament peut être dégradé par des enzymes, ségrégué par des protéines du sang comme l'albumine sérique ou dans des vésicules ou encore rejeté par des transporteurs cellulaires.

3.3. La létalité synthétique

Dans la continuité des thérapies ciblées, un concept s'est développé, la létalité synthétique. Le principe de létalité synthétique a été premièrement décrit au début du 20^{ème} siècle par le généticien Calvin Bridges. Il a observé, en croisant certaines drosophiles (*Drosophila melanogaster*), que certaines combinaisons de gènes non-alléliques étaient létales alors que les parents possédant ces mêmes gènes homologues étaient viables. C'est son collègue, Theodore Dobzhansky qui a donné le nom de « létalité synthétique » en observant le même phénomène chez *Drosophila pseudoobscura* ²⁹⁶.

Le terme de létalité synthétique désigne ainsi une interaction entre deux événements génétiques résultant en la mort d'une cellule, voire d'un organisme (Figure 15). On la retrouve le plus souvent dans le cas d'une mutation entraînant une perte de fonction, cependant, on peut également l'observer dans le cas de la surexpression d'un gène, via l'action d'une molécule ou encore dans le cas d'un changement d'environnement ^{297–300}.

L'approche par létalité synthétique est facile à mettre en place, notamment par des criblages génétiques, mais cette stratégie a pris plus d'importance ces dernières années dans la recherche pour la lutte contre le cancer, notamment dans la recherche et le développement de petites molécules anti-tumorales ²⁹⁷.

La létalité synthétique a été très étudiée chez la levure, chez laquelle les études de cartographie (« *mapping* ») génétique sont plus facile à mettre en œuvre et ont notamment permis de déterminer des réseaux protéiques, source d'information intéressante pour l'annotation fonctionnelle des gènes ^{299,301}. Ceci est dû au fait que les gènes impliqués dans les mêmes processus ont tendance à se retrouver en cluster ³⁰².

Les petites molécules aussi peuvent avoir un effet de létalité synthétique avec les gènes afin d'en étudier les effets sur la cellule ²⁹⁸. Il y a déjà des études chez la levure portant sur l'effet de létalité synthétique de petites molécules et le lien avec les gènes ^{303–305}. Cette approche revêt un intérêt particulier en clinique afin d'identifier des effets sur d'autres protéines.

Connaître l'effet de létalité synthétique de petites molécules pourrait être utilisé pour concevoir des combinaisons thérapeutiques et prédire l'effet sensibilisateur d'une petite molécule ^{306–308}. Ce type de traitement s'avère être important afin de limiter les effets de résistance tumorale, pour limiter les concentrations en petites molécules et ainsi éviter des effets indésirables sur d'autres cibles ³⁰⁹.

De manière intéressante, Hartwell et al, proposent que la létalité synthétique puisse être une solution à la difficulté de restaurer la perte de fonction issue d'une mutation d'un gène suppresseur de tumeur ³¹⁰. Pour eux, les changements moléculaires qu'a subis la cellule cancéreuse l'ont rendu différente de la cellule normale. De ce fait, le réseau protéique a été repensé dans la cellule, exposant ainsi de nouveaux points faibles. De ce fait, tous les partenaires de ces protéines affectées par ces changements moléculaires doivent être considérés comme des cibles de choix dans une stratégie de traitement basée sur la létalité synthétique. Tout cela peut être lié à l'addiction oncogénique, c'est-à-dire que la cellule cancéreuse est devenue dépendante à ces changements génétiques, la rendant vulnérable à l'inhibition des oncogènes ou à la réactivation de gènes suppresseurs de tumeur ³¹¹. Un des exemples les plus connus concerne BRCA1 et BRCA2, des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN et considérées comme des suppresseurs de tumeur. Ainsi, dans le cas où BRCA1 ou BRCA2 est mutée, le traitement par un inhibiteur de PARP, une protéine senseur impliquée dans la détection des dommages à l'ADN, entraîne un phénomène de létalité synthétique avec peu

d'effets ^{312–315}. Cet exemple est considéré comme une preuve de concept pour les traitements impliquant l'effet de létalité synthétique ^{316–318}. Cette partie est également traitée dans le chapitre 2.

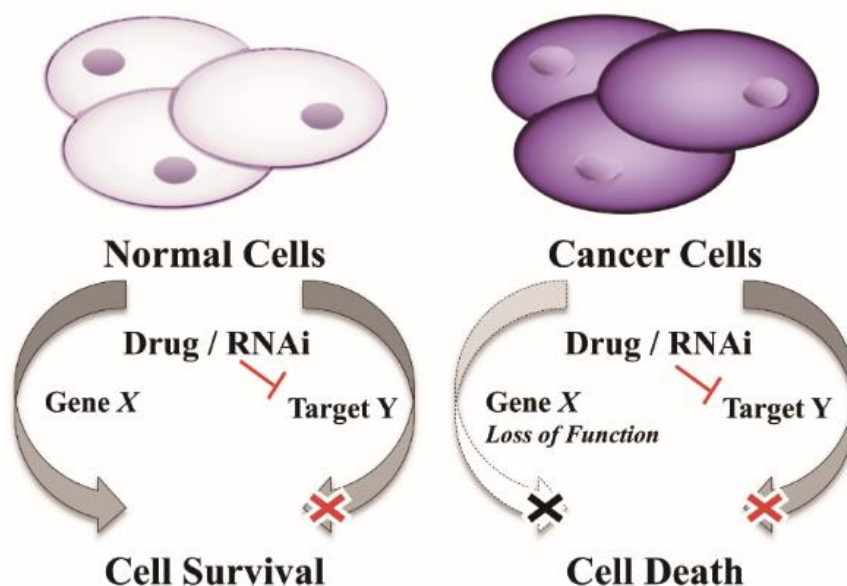


Figure 16 - Principe de létalité synthétique.

Les mutations dans une cellule cancéreuse peuvent entraîner une perte de fonction pour un gène, qui n'affectera pas la cellule tumorale qui utilise un système parallèle afin de réaliser la même fonction. Lorsque l'on cible cette voie de secours dans une cellule tumorale, par des inhibiteurs chimiques, peptidiques ou encore des siARN, on prive la cellule des deux voies qui permettent d'assurer le processus essentiel dans la cellule, alors que la cellule normale possède toujours un système pour assurer cette fonction. C'est cette différence entre la cellule normale et la cellule tumorale qui crée le principe de létalité synthétique. (Tiré de ⁴²⁹)

3.4. L'inhibition de RAD51

RAD51 représente une cible de choix dans les traitements thérapeutiques contre le cancer. Ainsi, depuis une dizaine d'années, plusieurs études ont mis en avant de nouveaux inhibiteurs de RAD51, comme l'halenaquinone ³¹⁹, B02 ^{320–323}, RI-1 ³²⁴ et ses dérivés ^{325,326}, IBR2 ³²⁷ et, récemment, un dérivé de IBR2 appelé IBR120 ³²⁸. Ces inhibiteurs sont plus amplement décrits dans le chapitre 2.

D'autres stratégies basées sur des petits peptides existent également. Ainsi, Nommé et al, ont montré qu'un petit peptide dont la séquence est basée sur celle des motifs répétés BRC présents sur la partie centrale de BRCA2 ¹⁴⁹. Ce court peptide de 28 acides aminés est capable de lier spécifiquement RAD51 au niveau du domaine d'interaction protéine-protéine de

RAD51. En absence et en présence d'ADN, ce peptide est ainsi capable de dissocier le filament de RAD51, son effet étant dépendant de sa concentration. Il a depuis été rendu plus efficace en produisant des peptides mutants dérivés du peptide initial tel que le triple mutant peptide Y-S2-F³²⁹. En analysant l'énergie d'interaction entre les peptides et RAD51 et la capacité d'inhibition par des études biochimiques, les auteurs ont démontré la capacité de ce peptide à s'associer au monomère de RAD51 et à empêcher l'association tout en promouvant la dissociation du filament de RAD51. Le potentiel inhibiteur de ces peptides a également été observé par microscopie électronique, le peptide Y-S2-F étant capable de dissocier le filament de manière concentration dépendante.

3.5. Parmi les inhibiteurs de RAD51, le DIDS

Le DIDS est une petite molécule, initialement décrite dans les années 1970 pour son rôle en tant qu'inhibiteur des canaux chlorures³³⁰⁻³³². Les canaux chlorures sont des pores au niveau de la membrane cellulaire qui permettent un transport passif d'ions (pas seulement le chlore Cl^- , mais aussi HCO_3^- , I^- , SCN^- , et NO_3^-) afin d'assurer des rôles assez variés comme la stabilisation du potentiel membranaire dans les cellules du muscle squelettique, la régulation du volume cellulaire chez un grand nombre de cellules ou encore la neutralisation des ions H^+ dans les vésicules lysosomales³³³.

Le DIDS a ainsi été décrit comme un des inhibiteurs de canaux chlorures ClC-Ka et ClC-K1 les plus affins³³⁴. Il fait partie des stilbénoides, famille de molécule chimiques polyphénoliques constituées de deux noyaux benzéniques reliés par une liaison entre deux atomes de carbone, selon la formule $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$. Il existe trois classes de stilbénoides : les bibenzyl dont les deux cycles benzéniques sont liés par une liaison simple C-C , les phénantrènes pour lesquels la liaison C-C est cyclisée et enfin les stilbènes caractérisés par une liaison double C=C . C'est à cette dernière classe qu'appartient le DIDS.

Le DIDS est constitué de deux groupements benzènes cycliques reliés par une double liaison carbonique. Sur chacun des deux cycles, se trouve un groupement anhydride sulfurique SO_3^- en position ortho de la double liaison C=C , ainsi qu'un groupement isothiocyanate NCS en position para de cette même double liaison C=C (Figure 16). Des molécules dérivées du DIDS ont été utilisées pour tester leurs effets et améliorer leur action sur les canaux inhibiteurs. Les plus connus sont le SITS (4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) qui diffèrent du DIDS par la substitution d'un des deux groupements isothiocyanate par un groupement acétamide ($-\text{NH-CO-CH}_3$), le DADS pour lequel les groupements isothiocyanate

sont substitués par des groupements amine (NH_2) ou bien le DNDS dont les groupements isothiocyanate ont été substitués par des groupements nitro (NO_2). Le DIDS et ses dérivés sont surtout étudiés quant à leurs effets sur l'inhibition de canaux ioniques^{331,335} et les effets de cette inhibition sur les pompes potassium-sodium³³⁶, la croissance tumorale en complément de traitement antitumoraux^{337,338} ou dernièrement comme inhibiteurs de c-Met, le récepteur aux hormones de croissance³³⁹.

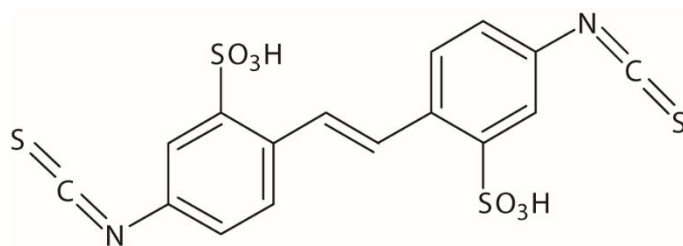


Figure 17 - Structure chimique du DIDS.

Le DIDS (4,4'-Diisothiociano-2,2'-stilbenedisulfonic acid) appartient à la famille des stilbénoides et est caractérisé par deux groupements isothiocyanate situés en position para de la double liaison C-C.

Outre l'action inhibitrice des canaux ioniques, le DIDS a également une action contre RAD51 comme l'a montrée une équipe japonaise³⁴⁰. A partir du criblage d'une banque de 185 molécules, cette équipe a ainsi montré que le DIDS était capable d'inhiber la capacité d'échange de brins de RAD51. D'autres approches biochimiques ont permis de révéler que le DIDS inhibait la capacité de RAD51 à lier aussi bien l'ADNsb que l'ADNdb. Il est également capable de lier directement RAD51 et d'inhiber la fonction recombinaise de RAD51 en l'empêchant de réaliser l'invasion de l'ADN et la formation de la D-loop.

L'inhibition de RAD51 par le DIDS est cependant modulée par la présence de sels, comme c'est le cas avec du chlorure de potassium à 0,2 M qui empêche le DIDS d'exercer son action sur RAD51. Ainsi, en absence de KCl, lorsque la concentration en DIDS augmente, cela entraîne une plus forte inhibition de l'échange de brins par RAD51, avec une IC_{50} proche de 2 μM , alors que la concentration en protéine est de 6 μM . En présence de KCl, (0,2 M), le comportement inhibiteur du DIDS est modifié, puisque le DIDS n'a pas d'effet en-dessous de 1 μM . L' IC_{50} dans ce cas est alors proche de 5 μM pour la même concentration de RAD51 (6 μM). Ceci suggère que des forces électrostatiques sont impliquées dans l'interaction entre le DIDS et RAD51.

Comme dit précédemment, RAD51 est capable d'hydrolyser l'ATP via un site de liaison à l'ATP, conférant à la protéine une activité ATPasique³⁴¹. Cette activité ATPasique est fortement diminuée en absence d'ADNsb. Cependant, selon Ishida et al, il a été observé que la

présence ou l'absence d'ATP n'avait pas d'effet sur l'inhibition de la liaison entre RAD51 et l'ADNsb, puisque RAD51 est capable d'hydrolyser l'ATP en présence de DIDS et en absence d'ADN. Les auteurs suggèrent ainsi que le DIDS se lierait près du site de liaison à l'ADNsb, entraînant une compétition entre le DIDS et l'ADNsb pour lier RAD51.

Une deuxième étude portant sur l'effet du DIDS sur RAD51 a montré que cette petite molécule avait un effet anti-leucémique en ciblant RAD51. Dans les lymphocytes B, l'expression d'une enzyme appelée AID (Activation-Induced cytidine Deaminase), suite à l'activation de la réponse immunitaire par l'antigène, entraîne le phénomène de commutation isotypique (« *Switch Class Recombination* »)³⁴². Cet événement participe à l'adaptation de l'organisme à l'infection par un antigène. Ce dernier induit un changement de l'isotype des immunoglobulines produites par les lymphocytes B en maturation. RAD51 participe à ce processus de remaniement de l'ADN, caractérisée par la création de cassures double-brin au niveau de l'ADN codant les immunoglobulines générant une boucle de l'ADN qui est ensuite excisée³⁴³. Il a été ainsi montré qu'on sensibilise les lymphocytes B néoplasiques exprimant AID à la cytotoxicité médiée par l'AID, lorsque la RH est atténuée³⁴⁴. Ainsi, Lamont et al, ont montré que le DIDS est capable d'inhiber la formation des foyers RAD51 et empêche le lymphocyte B tumoral d'utiliser la RH pour réparer les cassures double-brin induites par AID.

Le mécanisme d'action du DIDS sur RAD51 n'est pas encore clair, même si les deux études menées par Ishida et al, ainsi que Lamont et al, suggèrent que le DIDS se lie à RAD51 au niveau des sites de liaison à l'ADN de la protéine.

3.6. Un point sur les inhibiteurs connus de RAD52

Les gènes *BRCA1*, *BRCA2* et *PALB2* sont les gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers du sein et de l'ovaire. Des études récentes ont montré que lorsque l'on inhibe RAD52 dans les cellules déficientes pour un de ces trois gènes, dans un phénomène de létalité synthétique, cela entraîne la mort des cellules, relançant par la même occasion l'intérêt sur l'importance de RAD52 chez l'humain^{78,284}.

Jusque récemment, la recherche d'inhibiteurs à la protéine RAD52 n'était pas une approche privilégiée dans la lutte contre le cancer. Dans cette optique, Cramer-Morales et al, ont mis en place une approche basée sur l'utilisation d'un aptamère ciblant la F79 de RAD52, situé au niveau de domaine de liaison à l'ADNsb³⁴⁵. Ce petit peptide est capable d'inhiber l'interaction entre RAD52 et l'ADN entraînant une accumulation de cassures double-brin dans

les cellules de carcinome déficientes en *BRCA1* ou *BRCA2*, mais pas dans les cellules normales. Ils ont également montré que, de manière intéressante, l'utilisation de l'aptamère améliore l'effet de médicaments anti-leucémiques comme l'imatinib et l'ATRA.

Chandramouly et collaborateurs ont récemment mis en évidence une petite molécule capable d'inhiber la formation de l'anneau de RAD52³⁴⁶. Pour ce faire, ils ont criblé deux banques d'environ 20 000 molécules et mis en évidence dix molécules capables d'empêcher RAD52 de se lier à l'ADNsb. Parmi elles, une seule molécule, la 6-hydroxy-DL-dopa (ou 6-OH-dopa), est capable d'inhiber l'hybridation simple-brin dans la cellule en agissant spécifiquement sur RAD52 et d'empêcher la formation de foyers RAD52 après traitement à la cisplatine. Par des approches biochimiques, ils ont montré que 6-OH-dopa est capable de dissocier l'anneau de RAD52. Ils suggèrent ainsi que la molécule se lierait au site de liaison de l'ADNsb. La 6-OH-dopa diminue la viabilité des cellules déficientes en *BRCA1* ou *BRCA2*, avec une efficacité proche de l'olaparib, un inhibiteur de PARP. La molécule est très intéressante, puisque son action sur RAD52 est bien caractérisée, cependant, pour obtenir un effet sur les cellules, les concentrations utilisées sont de l'ordre du μM . Une optimisation de son effet est nécessaire. Cette étude met en avant le fait que cibler la polymérisation de RAD52 est une voie de recherche intéressante pour le développement de molécules inhibitrices de RAD52.

Une étude préliminaire a mis en évidence plusieurs molécules issues d'une banque de 372 903 composés en utilisant une technique d'hybridation basée sur la fluorescence. Après plusieurs étapes de criblage, notamment pour vérifier l'association des molécules à l'ADN et l'effet dose-dépendant des composés, 70 molécules ont été sélectionnées. Un test de formation de D-loop par RAD52, additionné au même test en présence de RAD51, a permis de confirmer l'effet spécifique de 14 molécules. Des tests cellulaires sur des cellules déficientes en *BRCA1* ou *BRCA2* ont révélé qu'un composé, D-I03, diminue la survie de tous les types cellulaires testés. D'autres composés parmi les 14 testés, comme D-G23, ont également un effet mais sont moins efficaces que D-I03. Ces deux molécules sont également les plus efficaces pour lier RAD52 spécifiquement. D-I03 est également capable de diminuer par deux le nombre de foyers RAD52 après traitement à la cisplatine, sans avoir d'effet sur RAD51. De plus, D-I03 entraîne une diminution de l'efficacité de la SSA, sans avoir d'impact sur la RH. D-I03 semble être un inhibiteur spécifique de RAD52 très prometteur.

Très récemment, Sullivan et al, ont criblé, par *docking*, deux banques d'environ 140 000 molécules dont 1217 molécules classées FDA ³⁴⁷. Parmi toutes ces molécules testées, deux d'entre elles, l'A5MP et l'AICAR/ZMP possèdent une activité d'inhibition sur RAD52 et ont un effet de létalité synthétique sur les cellules HCC1937, mutées pour *BRCA1*, et sur les Capan-1, qui expriment une forme tronquée de *BRCA2*. L'AICAR est également capable de réduire le nombre de foyers de RAD52 dans les cellules leucémiques déficientes en *BRCA1* traitées à la cisplatine. Par *docking*, il est envisagé que ces molécules lient RAD52 au niveau du site de jonction entre deux monomères de RAD52. Certains acides aminés semblent ainsi jouer un rôle dans l'interaction entre les molécules et RAD52. Ainsi, les résidus Arg153, Arg155 et Arg156 de la sous-unité B du dimère RAD52 et les Thr126 et Thr148 de la sous-unité A. Les concentrations en drogue dans les tests cellulaires sont de l'ordre de la dizaine de μM , des concentrations importantes pour envisager une utilisation en clinique. La synthèse de molécules dérivées de ces deux drogues est ainsi envisagée notamment en ciblant les résidus Arg55 et Lys141.

Objectifs

Des avancées récentes majeures ont été réalisées dans la recherche thérapeutique contre le cancer, notamment dans le développement de thérapies ciblées et personnalisées. Dans le cas des protéines des voies de réparation de l'ADN, RAD51, protéine centrale de la RH, constitue une cible de choix durant cette dernière décennie. Plusieurs molécules, notamment, ont été décrites, via des criblages, comme de potentiels candidats thérapeutiques. Actuellement, malgré des résultats intéressants, aucun n'a passé le cap des tests cliniques. Nous avons choisi de nous intéresser à une petite molécule, le DIDS, capable d'inhiber diverses fonctions de RAD51, mais dont le mode d'action n'est pas connu. Nous avons décidé d'étudier son mécanisme d'action via des modifications de la molécule, dans des tests biochimiques et cellulaires, et également son effet sur l'albumine sérique, une protéine très abondante dans le sang.

Le principe de létalité synthétique trouve également un écho dans les avancées réalisées dernièrement. Ce principe s'est souvent appliqué aux inhibiteurs de PARP notamment, mais les recherches récentes ont montré que l'on pouvait utiliser ce principe pour cibler également RAD52 ^{283,348}. D'autres voies sont également envisagées afin de mettre en évidence des molécules et leurs effets sur d'autres protéines de réparation de l'ADN ou du cycle cellulaire.

Mes travaux de doctorat ont pour but de mieux comprendre les mécanismes de la recombinaison homologue et de mettre en évidence de nouvelles molécules capables d'inhiber les protéines de la recombinaison homologue et d'analyser leurs effets, notamment sur RAD51 et RAD52.

La suite du manuscrit s'articule en trois grands objectifs :

- 1- Un état des lieux des inhibiteurs connus de protéines de réparation de l'ADN, dont les résultats sont décrits dans le **chapitre 2**.
- 2- L'étude et la compréhension du mode d'action du DIDS et de ses dérivés sur la l'albumine sérique et RAD51, notamment via le développement d'une nouvelle méthode d'analyse de l'activité de formation de la D-loop par RAD51. Tout cela est décrit dans les **chapitres 3 et 4**.
- 3- La mise en évidence de potentiels nouveaux inhibiteurs de RAD52 sur le principe de létalité synthétique. Ces résultats préliminaires sont décrits dans le **chapitre 5**.

Chapitre 2

Chapitre 2 – DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer

Denis Velic ^{1,2,3,†}, Anthony M. Couturier ^{1,2,†}, Maria Tedim Ferreira ^{2,4}, Amélie Rodrigue ^{1,2},
Guy G. Poirier ^{2,4}, Fabrice Fleury ³ and Jean-Yves Masson ^{1,2,4,*}

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, Centre de Recherche sur le Cancer, Laval University, Québec City, QC G1V-0A6, Canada;

³ DNA repair regulation team, UFIP, CNRS UMR 6286, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, Nantes 44322, France ;

⁴ CHU de Québec Research Center, Oncology Axis, 2705 boul. Laurier, Quebec City, QC G1V-4G2, Canada

[†] These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; or Tel.: +1-418-525-4444 (ext. 15154); Fax: +1-418-691-5439.

Résumé : Pendant des décennies, la radiothérapie et la chimiothérapie étaient les deux seules approches qui exploitaient le processus de réparation de l'ADN dans la lutte contre le cancer. De nos jours, les thérapies anti-cancéreuses peuvent être un énorme challenge lorsque l'on souhaite développer une médecine personnalisée et ciblée qui soit à la fois efficace et sélective vis-à-vis de la malignité du cancer. Au cours de la dernière décennie, la découverte de nouvelles thérapies ciblées contre la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN ont offert la possibilité d'améliorations thérapeutiques en oncologie. Dans cette revue, nous résumons la connaissance actuelle sur les inhibiteurs des voies de signalisation et de réparation de l'ADN, leurs effets moléculaires et cellulaires et l'utilisation future en thérapeutique.

Abstract: For decades, radiotherapy and chemotherapy were the two only approaches exploiting DNA repair processes to fight against cancer. Nowadays, cancer therapeutics can be a major challenge when it comes to seeking personalized targeted medicine that is both effective and selective to the malignancy. Over the last decade, the discovery of new targeted therapies against DNA damage signalling and repair has offered the possibility of therapeutic improvements in oncology. In this review, we summarize the current knowledge of DNA damage signalling and repair inhibitors, their molecular and cellular effects, and future therapeutic use.

Biomolecules **2015**, *5*(4), 3204-3259; doi:10.3390/biom5043204

Review

DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer

Denis Velic ^{1,2,3,†}, Anthony M. Couturier ^{1,2,†}, Maria Tedim Ferreira ^{2,4}, Amélie Rodrigue ^{1,2}, Guy G. Poirier ^{2,4}, Fabrice Fleury ³ and Jean-Yves Masson ^{1,2,4,*}

¹ Genome Stability Laboratory, CHU de Québec Research Center, HDQ Pavilion, Oncology Axis, 9 McMahan, Québec City, QC G1R-2J6, Canada;

² Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Centre de Recherche sur le Cancer, Laval University, Québec City, QC G1V-0A6, Canada;

³ DNA repair regulation team, UFIP, CNRS UMR 6286, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, Nantes 44322, France ;

⁴ CHU de Québec Research Center, Oncology Axis, 2705 boul. Laurier, Quebec City, QC G1V-4G2, Canada

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; or Tel.: +1-418-525-4444 (ext. 15154); Fax: +1-418-691-5439.

Academic Editors: Wolf-Dietrich Heyer, Thomas Helleday and Fumio Hanaoka

Received: 7 September 2015 / Accepted: 9 November 2015 / Published: 20 November 2015

Abstract: For decades, radiotherapy and chemotherapy were the two only approaches exploiting DNA repair processes to fight against cancer. Nowadays, cancer therapeutics can be a major challenge when it comes to seeking personalized targeted medicine that is both effective and selective to the malignancy. Over the last decade, the discovery of new targeted therapies against DNA damage signalling and repair has offered the possibility of therapeutic improvements in oncology. In this review, we summarize the current knowledge of DNA damage signalling and repair inhibitors, their molecular and cellular effects, and future therapeutic use.

Keywords:

DNA repair; inhibitors; ATM; ATR; CHK1; CHK2; MRE11; RAD51; PARP

1. Introduction

All living organisms can suffer from deleterious attacks from extrinsic agents as well as intrinsic sources such as reactive oxygen species. One of the most harmful lesions found in genomic DNA are double-strand breaks (DSBs), whose massive cytotoxicity is the basis for conventional DSB-inducing agents, such as ionizing radiation (IR), radiomimetic drugs and topoisomerase II inhibitors, currently used as treatment of choice for cancer therapy. Unfortunately, such treatments come with a lack of tumour specificity, resulting in severe side effects that negatively impact on patient's life. Current research efforts are now directed toward identifying small inhibitory molecules targeting specific pathways involved in signalling and repairing DSBs. These pathways collectively form a complex network, termed the DNA damage response (DDR), evolved to neutralize DNA lesions and prevent transmission of incorrect genetic information to daughter cells during cell division. In normal cells, the DDR can coordinate cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis, and consists of three classes of proteins, each exerting critical functions. Sensors detect the presence of DNA lesions, signal transducers generate and amplify the DNA damage signal, and effectors induce DNA repair, cell cycle delay, programmed cell death or senescence (for review see [1,2]). Cancer cells, for a large part, have compromised DDR pathways, some of them being dependent on a sole back-up pathway for survival. The use of inhibitors against essential components of a back-up pathway, in a synthetic lethal approach, is a promising avenue to specifically eradicate cancer cells. Another inhibitor-based approach to therapy is the potentiation of the effects of DNA-damaging anti-cancer agents, particularly in instances of therapeutic resistance. This review aims to provide a comprehensive view of key inhibitors of DSB DNA damage signalling and repair proteins (outlined in Figure 1).

To respond to DNA damage, cells have implemented the DNA Damage Response. DDR is a signal transduction pathway that implicates different actors depending on the type of damage and/or the cell cycle phase. Firstly, the damage is detected by sensor proteins such as MRN (MRE11-RAD50-NSB1) or PARP1 (Poly(ADP-ribose) Polymerase 1). These sensors recruit the apical kinases Ataxia telangiectasia mutated (ATM) or Rad3-related (ATR). The signal is further amplified and the response results in repair (following diverse mechanisms), cell cycle arrest and/or apoptosis. Single-strand breaks are repaired by Single-Strand Break Repair (SSBR—not discussed in this review). Double-strand breaks are repaired by two main mechanisms: Homologous Recombination (HR) and Non-Homologous End-Joining (NHEJ). HR involves mediators such as BRCA2, RAD51 and PALB2. NHEJ brings into play proteins

such as DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs), Ku70/80, Ligase IV and XRCC4. During DDR pathway, cells require effectors, activated by ATM and ATR, such as CHeckpoint Kinase 1 (CHK1), Checkpoint Kinase 2 (CHK2) or p53 to arrest the cell cycle or enter in apoptosis. A dysregulation of these processes can lead to cell death or, more seriously, to mutagenesis and cancer. When cancer does occur, targeting the principal DDR actors allows the promotion of cell death in order to limit cancer progression. Specific inhibitors have been designed to target different actors of the DDR pathway. Major inhibitors, discussed in this review, are represented in different boxes in this figure.

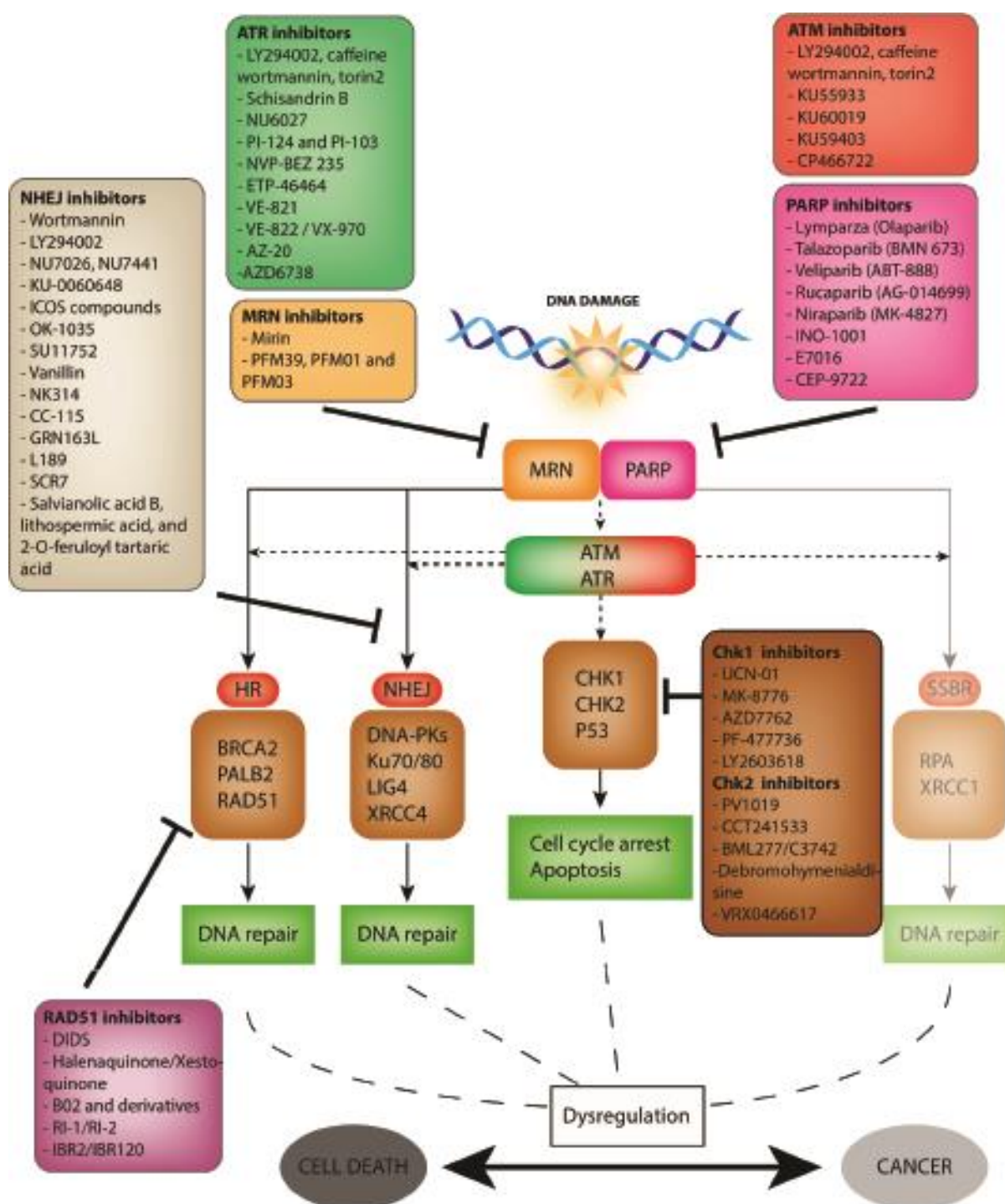


Figure 1. The DNA damage response pathways and its inhibitors.

2. The ATM and ATR Kinases

The ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) gene was identified in 1995 from a genetic disorder called ataxia-telangiectasia (A-T) [3]. Ataxia telangiectasia (AT), is a syndrome characterized by neuronal degeneration, immunodeficiency, chromosomal fragility and extreme sensitivity to ionizing radiation [4]. Identified the following year [5], the ataxia and Rad3-related (ATR) gene

came to be known for its essentiality for the viability of proliferating human [6] and mouse cells [7,8,9]. When hypomorphically mutated, the gene has been linked to a rare autosomal-recessive disease, the Seckel syndrome, marked by growth and mental retardation, microcephaly, and chromosomal instability [10]. ATM and ATR belong to the phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) family of serine/threonine protein kinases, which also includes DNA-PKcs. These kinases are major DDR transducers, which propagate upon DNA damage a message alert by initiating signalling cascades through phosphorylation of numerous targets, including H2AX, p53 and the checkpoint kinases Chk1 and Chk2. To ensure maintenance of genomic integrity, ATM and ATR crucially halt the cell cycle via Chk2 and Chk1, allowing time for repair or invoke cell death mechanisms in the irreparable (for review see [11]). ATM is the primary responder to DSBs, while ATR responds to a variety of lesions including intra-strand crosslinks, oxidative damage, replication blocks, and polymerase toxins [12], with overlapping but non-redundant activities (for review see [13]). The cellular effects of down-regulating ATM and ATR have been the focus of many early studies, using either dominant-negative, small interfering RNA (siRNA) depletion, or chemical inhibition (e.g., with caffeine) approaches [14,15,16,17]. One therapeutically interesting phenotype that emerged from ATM or ATR deficiencies was the increased sensitivity to cell killing by genotoxic agents due to compromised cell cycle checkpoints. This sparked interest in therapeutically using ATM and ATR inhibitors as radio- or chemo-sensitizers, or as a monotherapy in tumours addicted to particular DNA repair pathways. However, the road to finding specific inhibitors of ATM/ATR has been long and winding. One example of this challenge goes as far as 2008. The small molecule CGK-73 was reported to inhibit both ATM and ATR kinases and block checkpoint signalling with great selectivity, but the study was later retracted [18]. Although the long search for selective inhibitors of ATM and ATR has not yet paid off, some of them remain clearly promising. Below is a brief summary of the dual ATM/ATR, ATM or ATR inhibitors (depicted in Figure S1) described to date and the latest advances in the field.

2.1. Dual ATM/ATR Inhibitors

2.1.1. Caffeine, Wortmannin and LY294002

The PIKKs ATM and ATR present a high level of sequence similarity and share common targets [19]. These features constitute a difficult challenge for the development of specific inhibitors. Early studies made use of caffeine or wortmannin to block the ATM and ATR kinases. Caffeine and wortmannin exhibited radio- and chemo-sensitizing capabilities but were

shown to be non-specific inhibitors that cross-react with phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) and PI3K-related kinases including DNA-PKcs [14,20,21,22]. More recently, Tsabar and colleagues revealed that caffeine impaired resection during DNA break repair by reducing the levels of nucleases Sae2 and Dna2 [23]. Nevertheless, caffeine and wortmannin present a lack of selectivity and high in vivo toxicity thus rendering the development of these drugs for the clinic obsolete [24,25].

The first synthetic inhibitor of the PI3K family and PI3K-like family, named LY294002, was characterized at the beginning of the 1990s by the Eli Lilly Company [26]. In this study, LY294002 was used to inhibit PI3K activity in human neutrophils and the proliferation of smooth muscle cells in cultured rabbit aortic segments. Subsequently, LY294002 was shown to be an inhibitor of ATM and ATR [27,28,29,30]. For the next 10 years, several inhibitors were designed from LY294002. Although these show an increased affinity for the PI3K family, there have been reports showing they could act non-specifically by targeting other PI3K-related kinases and proteins apparently unrelated to the PI3K family as well [31,32].

2.1.2. *Torin2*

Torin2 is a compound developed to overcome the pharmacological limitations of Torin1 (a mTOR selective inhibitor 1) [33]. This compound is also a potent inhibitor of ATR, ATM and DNA-PK in PC3 AktS473D cells [34]. Interestingly, it exhibits an anti-proliferative activity across a panel of cancer cell lines. In vivo, Torin2 causes significant growth inhibition of KRAS mutant lung tumours when used in combination with AZD6244 (MEK1/2 inhibitor).

2.2. Selective ATM Inhibitors

2.2.1. *KU-55933*

In 2004, Hickson and KuDOS Pharmaceuticals Ltd discovered the ATM inhibitor KU-55933, which will eventually become one of the most used in laboratories worldwide. KU-55933 has been described as a cell-permeable, potent, selective and ATP-competitive inhibitor of ATM [35]. KU-55933, with an IC₅₀ of 13 nmol/L and a K_i of 2.2 nmol/L in vitro, showed a >100-fold higher potency against ATM compared to other PIKK family members, with no selectivity toward a panel of 60 unrelated protein kinases. Lipophilicity issues have, however, limited its potential for clinical use [36,37]. Nonetheless, KU-55933 can induce cell death in senescent breast, lung, and colon carcinoma cells through p21, in an ATM-dependent manner [38]. Using

KU-55933, Eaton et al. also characterized the role of ATM in the overall regulation of ribonucleotide reductase subunit expression/stability and proper mtDNA copy number dynamics/expression in the presence and absence of induced DNA damage [39]. Recently, KU-55933 has been shown to sensitize several radioresistant cells, such as bladder cancer cells bearing a DAB2IP gene defect [40] and non-small cell lung cancer cells [41]. Consequently, these findings have revived the potential use of KU-55933 in a clinical setting.

2.2.2. KU-60019

In an attempt to improve the specificity of PI3K-like protein inhibitors, KU-60019 was designed by Golding and colleagues [37]. KU-60019 is able to inhibit the DNA damage response, reduce AKT phosphorylation and prosurvival signalling, and effectively radiosensitize human glioma cells. Failure by KU-60019 to reduce AKT phosphorylation and to mediate radiosensitization in A-T fibroblasts, suggested specific targeting of ATM [37]. This drug has similar, if not identical target specificity to KU-55933, with little to no non-specific target effects at 1 $\mu\text{mol/L}$ against a panel of 229 protein kinases. It was also more efficient than KU-55933 at blocking radiation-induced phosphorylation of ATM downstream targets. Studies have demonstrated that KU-60019 radiosensitizes several glioblastoma cell lines [42,43]. Recently, this inhibitor has been shown to be harmful for PTEN mutant cancer cells in tumour xenograft models. This toxicity was reversible by reintroduction of wild-type PTEN [44]. Finally, it has been reported that KU-60019 significantly increases doxorubicin-induced chemosensitization of MCF-7 cells, suppressing their proliferation, supporting the use of KU-60019 as a promising strategy for non-invasive breast cancer [45].

2.2.3. KU-59403

Another ATP competitive inhibitor, KU-59403, was considered as a serious candidate for clinical development, owing to its increased potency, selectivity and solubility, compared to other KU drugs [46]. KU-59403 was shown to be non-cytotoxic in several human cancer cell lines (SW620, LoVo, HCT116, and MDA-MB-231) and was found to have a good tissue distribution and significant chemosensitization without major toxicity. However, KU-59403 has never reached clinical trial steps and no data have been published since.

2.2.4. CP466722

This drug was initially identified in a targeted compound library screen for potential ATM inhibitors, as non-toxic and very specific against inhibition of ATM-dependent phosphorylation

events [47]. Rainey and colleagues showed that a transient inhibition of ATM was sufficient to sensitize cells to IR and suggested that CP466722 could be used in a therapeutic perspective. However, a recent study has found that CP466722 is cytotoxic in both MCF-7 and SKBr-3 cell lines by inducing apoptosis [48].

2.3. Selective ATR Inhibitors

2.3.1. *Schisandrin B*

Nhishida et al. identified schisandrin B (SchB) as a selective ATR inhibitor by screening herbal extracts and ingredients, although inhibition of ATM was also observed at high concentrations [49]. By focusing on how SchB could be implicated in ATR inhibition, Tatewaki and colleagues found that SchB is a mixture of diastereomers gomisins N (GN) and γ -schisandrin (γ -Sch), in which the former is the active component [50]. More precisely, GN was found to exert its inhibitory action via stereospecific interaction with ATR. SchB can enhance doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells [51], prevent doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity and enhance its anticancer activity in vivo [52]. Recently, SchB has been implicated as an anti-UVB-induced damage agent in HaCat cells [53]. While its role as an ATR inhibitor is promising, further studies are needed to validate SchB as a sensitizing agent for anti-cancer therapy.

2.3.2. *NU6027*

NU6027 is a potent inhibitor of ATR activity in several breast and ovarian cancer cell lines, but its initial discovery as a CDK2 inhibitor renders it less interesting [54]. Still, NU6027 reduces G2/M arrest following DNA damage, decreases RAD51 focus formation and increases cytotoxicity of the major classes of DNA-damaging anticancer agents, but not the antimetabolic agent paclitaxel. Furthermore, A2780 cells with functional p53 and mismatch repair (MMR) are sensitive to a combination of NU6027 and cisplatin treatment, whereas p53 mutant cells with functional MMR are susceptible to temozolomide (TMZ) combined with NU6027. Importantly, NU6027 is synthetically lethal when DNA single-strand break repair is impaired, either through poly(ADP-ribose) polymerase inhibition or defects in XRCC1. Recently, Sultana et al., confirmed that ATR inhibition by NU6027 leads to synthetic lethality in XRCC1-deficient ovarian cancer cells [55]. The resulting enhanced cytotoxicity was accompanied by accumulation of double-strand DNA breaks, G2/M cell cycle arrest and increased apoptosis.

2.3.3. *PI-124 and PI-103*

In a screen for PI3K inhibitors, PI-124 and PI-103 were identified as being potent inhibitors of ATR, but also of mTOR protein kinases [56]. Recently, the combination of olaparib and PI-103 has been shown to enhance radiation-induced death in triple-negative breast cancer (TNBC) cells and to significantly reduce tumour volume in a mouse xenograft model. PI-103 inhibitor treatment was accompanied by persistent γ -H2AX foci, indicating delayed repair of DNA strand breaks (associated with decreased RAD51 and p-DNA-PK, but not ATR). Remarkably, PI-103 alone increased poly(ADP-ribose) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase levels, while downregulating BRCA1 [57]. Consequently, the combination of PI3K signalling pathway and PARP inhibitions could be a suitable approach to enhance effects of radiation in BRCA-proficient TNBC.

2.3.4. *NVP-BEZ235*

Identified from a high throughput screening (HTS), NVP-BEZ235 possesses significant inhibitory activity against ATR kinase [58]. However, it also presents affinity for mTOR and DNA-PKcs proteins, which makes it a less specific compound [59]. As a result, research is now focused on how NVP-BEZ235 can be used to block the PI3K/Akt/mTOR pathway in bladder cancer [60], malignant pleural mesothelioma [61] or in endometrial carcinoma [62]. Particularly, NVP-BEZ235 is a potent radiosensitizing compound for Ras-overexpressing tumours [63]. This drug is now in phase 2 of clinical trials for its PI3K/mTOR inhibitory function.

2.3.5. *ETP-46464*

In addition to NVP-BEZ 235, Toledo et al. studied the action of ETP-46464 and showed that it possesses an ATR inhibitory activity, but lacked selectivity since it could inhibit the activities of PI3K α , mTOR and DNA-PKcs [58]. ETP-46464 was found to destabilize replication-stalled forks, suppress the ionizing radiation-induced G2/M checkpoint and enhance the presence of micronuclei or fragmented nuclei in cells. Furthermore, ETP-46464 was specifically toxic for p53-deficient cells (the overexpression of cyclin E enhances this effect). Unfortunately, ETP-46464 seems to have poor pharmacological properties in mice, which limits its use for therapy.

2.3.6. VE-821

An HTS held by Vertex Pharmaceuticals identified VE-821 as a potent and selective ATR inhibitor [64]. ATR inhibition by VE-821 blocks downstream Chk1 activation and enhances DNA damage mediated by cisplatin or gemcitabine. Of interest, VE-821 presents low activity against ATM, DNA-PK and a large panel of unrelated protein kinases [65]. VE-821 has been shown by different groups to IR sensitize 12 human cancer cell lines [66], pancreatic cancer cells [67] and ovarian cancer cells [68]. Accordingly, ATR inhibition by VE-821 leads to the inhibition of radiation-induced G2/M arrest in cancer cells.

2.3.7. VE-822/VX-970

Fokas et al. identified this analogue of VE-821 as a powerful ATR inhibitor that radiosensitized pancreatic cancer cells [69]. Importantly, VE-822 was well tolerated in mice and did not enhance toxicity in normal cells and tissues [69]. VE-822 was the first selective ATR inhibitor to enter clinical development and is now known as VX-970. This inhibitor was tested in a series of in vitro and in vivo lung cancer models. VX-970 was shown to block ATR activity in tumours and dramatically enhance the efficacy of cisplatin across a panel of patient-derived primary lung xenografts [70]. These data suggest that VX-970 may have the potential to increase the efficacy of DNA damaging therapy in patients with lung cancer. A phase I clinical trial to assess the safety, tolerability and pharmacokinetics of VX-970 in combination with cytotoxic chemotherapy is currently ongoing (ClinicalTrials.gov: NCT02157792). To a lesser extent, VE-822 has been shown to suppress the activation of NF- κ B and increase E1-dependent replication of the HPV16 genome [71].

2.3.8. AZ-20

Belonging to the sulfonylmorpholinopyrimidines family, AZ-20 was synthesized by the AstraZeneca (London, UK) plc group from the optimization of a high quality screening hit and showed a selective affinity for ATR [72]. It compellingly inhibits the growth of LoVo colorectal adenocarcinoma tumour cells in vitro and has high symptom-free exposure in mice following moderate oral doses.

2.3.9. AZD6738

AZD6738, developed by AstraZeneca in 2012, is an analogue of AZ-20, a potent and selective ATR inhibitor [36]. No data have yet been published about this inhibitor, but it is one of the

few that has been tested in a completed clinical trial (NCT01955668). A recent plenary session from Glenn Clack (AstraZeneca) also described two clinical studies with AZD6738 that will test the monotherapy and combination therapy hypotheses, along with an overview of the supporting pre-clinical in vitro and in vivo data [73] (NCT02223923).

3. The Chk1 Kinase

3.1. Roles of Chk1 in the DNA Damage Response

Checkpoint kinase 1, commonly named Chk1 or Check1, is a serine-threonine kinase. Chk1 is encoded by the CHK1 (CHEK1) gene and is located on chromosome 11 (11q22-23) in humans. Chk1 is highly conserved from budding yeast (Rad27) to humans, particularly its amino-terminal catalytic domain [74]. Chk1 has a C-terminal regulatory SQ/TQ domain which may be involved in its translocation between the cytoplasm and the nuclear compartment. Chk1 is one of the key proteins in cell cycle control which activates cell cycle checkpoint initiation. Chk1 is thus involved in several steps of the cell cycle from S to G2/M phase. Chk1 is also a cell regulator and a DNA damage sensor. In response to DNA damage, Chk1 phosphorylates and thus inhibits Cdc25 phosphatases, particularly Cdc25A which is its main target. This causes Cdc25 degradation, inhibition of cyclin-Cdk and prevention of mitotic phase entry [75]. Activation of Chk1 results in the initiation of cell cycle checkpoints, cell cycle arrest, DNA repair and cell death to prevent damaged cells from progressing through the cell cycle. Therefore, Chk1 is crucial in genomic stability but can also be a source of resistance to anticancer therapies.

3.2. Phosphorylation of Chk1

Chk1 activation occurs through ATR-mediated phosphorylation of two conserved sites, Ser317 and Ser345 [76]. These phosphorylation events promote the autophosphorylation of Chk1 on Ser296, which triggers its cell cycle arrest and DNA repair functions [77,78]. Chk1 pSer345 site has been described as an important phosphorylation site for its catalytic activation and is considered as a marker of DNA damage [79]. These post-translational modifications trigger the release of Chk1 from the chromatin fraction into the soluble compartments [80] which allows cell cycle arrest and repair processes. Released and activated Chk1 then phosphorylates a number of downstream targets to control cell cycle transition and DNA damage repair [81]. DNA DSB repair proteins involved in homologous recombination, such as the key protein RAD51, have been identified among the targeted proteins [82]. Indeed Chk1 is involved in the

activation of DNA repair by homologous recombination [83]. In response to DNA lesions, Chk1 physically interacts with and phosphorylates RAD51 on Thr309, promoting the recruitment of RAD51 at DNA damage sites [82]. Treatment with Chk1 inhibitors impairs HU-induced RAD51 foci formation, confirming the essential role of Chk1 as activator of HR [82].

3.3. Targeting Chk1 as a Novel Strategy in Cancer Therapy

Chk1 plays a key role in regulating replication checkpoints and the DDR since this kinase is mainly responsible for G2/M checkpoint. The main checkpoint regulator in G1/S phase is p53 and in numerous cancers (about 50% of cases) p53 is either mutated or null. Given that most tumour cells suffer defects in the p53 pathway, cancer cells have to maintain functional S and G2/M phases mediated by Chk1 to avoid premature mitotic entry which could lead to mitotic catastrophe. This latter status is characterized by phosphorylation of Histone H3 (on Ser10) and aberrant mitotic spindle formation [84]. These p53-related defects have been taken advantage of to kill cancer cells and it has been shown that using Chk1 siRNA enables to enhance apoptosis in p53-deficient tumour cell lines [85,86]. P53 inhibitors are described in [87].

In addition, a high level of Chk1 is often described in various types of cancers, including breast cancer, pancreatic cancer, non-small cell lung carcinoma and leukemia. In one report, lung cancer cells expressing high levels of Chk1 were hypersensitive to Chk1 inhibitors. Recently, Sarmiento et al. have shown that Chk1 overexpression in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) enables cellular proliferation and survival by preventing replication stress [88]. Chk1 overexpression contributes to cancer resistance by delaying mitotic entry and thereby it has been associated with tumour grade and poor prognosis [89,90]. Chk1 contributes to cell survival by inducing G2 arrest and signalling to the HR pathway for DNA repair [82].

3.4. Inhibitors of Chk1

In the last decade, increasing publications describe the potential of targeting Chk1 with small molecule inhibitors (depicted in Figure S2) as a new direction for anticancer therapy [91]. A number of Chk1 inhibitors have been developed against different cancer types and are under clinical investigation [92,93,94]. The main inhibitors of Chk1 activity are described below.

3.4.1. UCN-01 (7-Hydroxystaurosporine)

This inhibitor is one of the first molecules directed against Chk1 [95]. It has frequently been used in in vitro experiments but its nonselective kinase inhibition and its lack of clinical efficacy have not allowed its progression beyond phase II of clinical trials [96,97].

3.4.2. MK-8776 Inhibitor (Previously Known as SCH900776) (Pyrazolo [1,5-a] Pyrimidine Derivative)

MK-8776 is a potent and selective Chk1 inhibitor in clinical development. Guri et al. have developed a functional approach to identify the most potent Chk1 inhibitor, the mechanism-based phenotypic screening. This method is based on the assessment of γ -H2AX foci accumulation, known as a marker of DSBs and collapsed replication forks. The Chk1 inhibitor SCH900776 was thus discovered [98]. This molecule is potent and highly reactive. It induced γ -H2AX accumulation and suppressed pS296 Chk1 autophosphorylation within two hours. This Chk1 inhibitor has been combined with gemcitabine treatment and has shown chemotherapy sensitization by increasing the level of double-stranded DNA damage. The efficiency of Chk1 inhibition was demonstrated by the increase and persistence of γ -H2AX foci. The ex vivo assay of intracellular γ -H2AX foci in gemcitabine-exposed cells from patient serum was performed by flow cytometry measurement and confirmed this efficiency [92]. Another study has shown the ability of MK-8776 to sensitize pancreatic cancer cells in which HR is proficient to gemcitabine-radiation treatment [99]. In this study, treatment of pancreatic cancer cells with the Chk1 inhibitor promoted a sensitization to gemcitabine-radiation that is associated with inhibition of RAD51 foci formation. This result confirmed the role of Chk1 in the recruitment of RAD51 on DNA damage sites. In non-small cell lung cancer cells similar observations were made after using MK-8776 in combination with pemetrexed, a classic anti-metabolite drug. The authors concluded that the levels of Chk1 may be a predictive marker for MK-8776 sensitivity [100]. These findings have allowed the MK-8776 molecule to enter in phase II clinical trials in combination with chemotherapy.

3.4.3. AZD7762

AZD7762 is an ATP competitive Chk1 inhibitor and is equally efficient against Chk2. Since HR allows the restart of replication forks in treated cancer cells, its inhibition has been proposed as a novel strategy for cancer therapy [101]. Inhibition of HR repair and DNA damage-induced cell cycle checkpoint response by Chk1 inhibition led several scientific teams to test other

inhibitors such as AZD7762 for sensitizing different cancers to conventional therapy. It has been described that lung cancer cells expressing high levels of Chk1 were hypersensitive to AZD7762. This suggests a correlation between Chk1 inhibitor-mediated sensitivity and elevated amounts of Chk1 [89]. In one report, the combination of AZD7762 with gemcitabine and ionizing radiation was assessed in vitro and allowed sensitizing pancreatic cells to radiation. In addition to abrogating the G2/M checkpoint, the inhibition of HR was suggested as the main mechanism for this sensitization [83]. More recently, AZD7762-mediated sensitization has been shown to be more selective and efficient against pancreatic cancer stem cells, known to be refractory to standard chemo- and radiotherapy [102,103]. The in vitro cytotoxicity of AZD7762 has also been investigated on MM cell lines. Combined with alkylating agents, such as melphalan, AZD7762 promoted apoptosis and mitotic catastrophe of p53-mutated MM cells [104].

3.4.4. PF-477736

PF-477736 is a selective and competitive inhibitor for the Chk1 ATP site. Its specificity is one hundred times stronger for Chk1 than for Chk2. Ovarian cancer often responds well to treatment with PF-477736 but it rapidly generates metastatic and chemoresistant forms [105]. A subtype of ovarian cancer, high-grade serous (HGS) carcinoma, is characterized by a defect in DNA repair including mainly the HR pathway [106]. The treatment of HGS cells by PF-477736 combined with topotecan (topoisomerase I inhibitor) improved and synergized the cellular toxicity by inducing apoptosis [105]. Sarmiento et al. demonstrated that treatment of T-ALL cells by PF-477736 promotes apoptotic cell death. PF-477736-induced Chk1 inhibition led to impaired replication combined with the abrogation of G2/M checkpoint in T-ALL cells. Interestingly, this inhibitor did not significantly affect normal thymocyte cells in vitro which shows the ability of PF-477736 to discriminate normal and cancer cells [88].

3.4.5. LY2603618

This molecule is a potent and selective inhibitor of Chk1 and was selected after high throughput screening. Like most of the other inhibitors, LY2603618 binds to the ATP binding site of Chk1. The phenotype of LY2603618-treated cells was similar to Chk1-depleted cells by siRNA, proving that the Chk1 inhibition pathway is involved. In a recent preclinical study, the characterization of LY2603618 has been reported [107]. By inhibiting Chk1, this molecule was able to abrogate the G2/M DNA damage checkpoint in colon cancer cells treated with gemcitabine and doxorubicine. It has been demonstrated that LY2603618 potentiated the effect

of DNA damage drugs in vitro. This result was also validated in vivo using a tumour xenograft approach. LY2603618 is the most advanced molecule in phase II trial evaluation and a number of studies using combinations with other DNA damage drugs are ongoing [108].

3.4.6. Other Inhibitors

The interest of inhibiting Chk1-mediated DNA damage checkpoints in cancer has been demonstrated in numerous studies. Therefore the pharmaceutical industry is interested in the development of new more specific and more efficient molecules [77]. Candidates such as XL844 and CHR-124 have been proposed but the clinical phase of their development has been discontinued [109]. The development of novel Chk1 inhibitors for anticancer therapies based on specific checkpoint defects may lead to personalized cancer treatment.

4. The Chk2 Kinase

The serine/threonine protein kinase Chk2 has been firstly described as the mammalian ortholog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad53 [110]. Chk2 bears three important domains: a SQ/TQ cluster domain (SCD), a forkhead-associated (FHA) domain located at the N-terminus and a kinase domain near the C-terminus of the protein [111]. In instances of DSBs, Chk2 is thought to be the primary effector kinase to be activated and to spread the DNA damage signal to downstream effectors of the DDR. Its activation is initiated by ATM phosphorylation on Thr68 and other residues in its N-terminus, which triggers conformational changes and auto-phosphorylation on many residues for complete activation [111,112,113]. Chk2 activity is mediated by many proteins such as 53BP1, MDC1, NBS1 [114,115,116,117,118]. The main role of activated Chk2 is to block the cell cycle progression by inactivating phosphorylation of Cdc25 family proteins (A, B and C) [119]. Chk2 also targets proteins involved in DNA repair, p53 signalling, and apoptosis. Among these, Chk2 phosphorylates BRCA2 on Thr3387, which is critical for RAD51 localization to DSBs [120]. The kinase also facilitates HR through BRCA1 phosphorylation on Ser988 [121]. Chk2 inhibitors (depicted in Figure S2) have been envisioned as attractive therapeutic agents for their potential at sensitizing cancer cells to DNA-damaging agents and their ability to protect normal cells against DNA damage-induced apoptosis [93,122,123,124]. To date, five main molecules targeting Chk2 in cells have shown interesting results, all of them being ATP-competitive inhibitors.

4.1. PV1019 ([7-Nitro-1H-Indole-2-Carboxylic Acid {(4-[1-(Guanidinohydrazone)-Ethyl]-Phenyl)}-Amide]

When a high-throughput screen for Chk2 inhibitors was conducted on a 100,000-compounds library, using an immobilized metal ion affinity-based fluorescence polarization assay (IMAP), a member of the guanidylhydrazones, named NSC109555, emerged as the sole hit [125]. NSC109555 exhibited highly selective inhibition against Chk2 kinase activity on histone H1, but was not cell penetrant [126]. Removal of the second guanidylhydrazone group and replacement of one side of the aryl urea with a 7-nitroindole motif linked through an amide gave rise to a new cell-penetrant molecule, PV1019, with improved affinity and conserved selectivity for Chk2 [127]. Cellular evidence for the inhibition of Chk2 kinase activity was confirmed by assessment of Chk2 autophosphorylation, and phosphorylation of downstream targets Cdc25c and HDMX. Other analogues of PV1019 with increased cell permeability and selectivity have been developed [122]. PV1019 is the only guanidylhydrazone tested in cells to be able to decrease IR-mediated apoptosis in mouse thymocytes [127]. Another potential therapeutic value highlighted by this study was that PV1019 potentiated effect of two topoisomerase I inhibitors, topotecan and camptothecin, or IR-treatment in various cancer cell lines, including the human ovarian cancer cell lines OVCAR-4 and 5, and the brain glioma cell line U251. In U251 cells, the potentiation of IR by PV1019 (5 μ M) was enhanced 1.4-fold, which represents the only case of radiosensitization of a cancer cell line caused by a selective Chk2 inhibitor.

4.2. CCT241533

In a kinome profiling study, Caldwell and colleagues discovered one compound belonging to the 2-(quinazolin-2-yl)-phenols molecules that inhibited Chk2 activity [128]. Optimization of the hit led to CCT241533 synthesis, a more efficient Chk2 inhibitor which interacts with Met304 and Asn352 of Chk2 via hydrogen bonds. CCT241533 had a high passive permeability and inhibited Chk2 in cancer cells while showing no effect in combination with DNA-damaging agents, such as SN38, gemcitabine, mitomycin C, bleomycin or etoposide on p53-deficient cells HT29 and HeLa, but interestingly potentiated effect of two PARP inhibitors AG14447 and olaparib [129]. This was shown by decreased cell growth in both HT29 and HeLa cancer cell lines in the presence of 1.5 μ M and 3 μ M CCT241533 respectively. Furthermore, combination of CCT241533 and olaparib enhanced apoptosis in HeLa cells by potentiating PARP inhibitor cytotoxicity in a Chk2-dependent manner. The cytotoxicity of the combination of CCT241533

and olaparib was attributed to the Chk2-mediated inhibition of BRCA1 phosphorylation and concomitant HR impairment.

4.3. 2-(4-(4-Chlorophenoxy)Phenyl)-1H-Benzimidazole-5-Carboxamide Hydrate/BML277/C3742

The first selective Chk2 inhibitor, which belongs to the benzimidazole class of inhibitors, was obtained through a high-throughput screening of a 2-arylbenzimidazole library for binding to purified Chk2, followed by Structure-Activity Relationship (SAR) study to improve specificity of the first hits [130]. It has been shown that this compound binds Chk2 via three main interactions: (1) a hydrogen interaction between the benzimidazole H1 and the carbonyl group of Glu302 and the amide NH of Met304; (2) binding of the carboxamide group with many residues in the pocket of the kinase and (3) interaction of the 4-chlorophenyl substituent with hydrophobic residues located at the entrance of the ATP-pocket (Leu226, Leu236, Lys245, Leu303 and Glu305) [131]. This molecule showed protective effect in p53 wild-type CD4⁺ and CD8⁺ T-cells exposed to IR in a concentration-dependent manner [130]. No study on the cellular effects of this molecule has been published recently.

4.4. Debromohymenialdisine and Analogues

Based on the Chk2 inhibitor debromohymenialdisine identified in marine sponge, analogue development led to the synthesis of a derivative compound by substitution of the pyrrole of the hymenialdisine core with an indole group [132,133,134]. This compound showed an increased selectivity and affinity for Chk2 compared to the initial debromohymenialdisine. IR-treatment of non-malignant-cells revealed a protective effect on apoptosis by the molecule [135]. Other analogues were developed based on the substitution of the 2-pyrrole moiety with phenyl rings, increasing selectivity for Chk2 but decreasing its inhibitory effect on Chk2 [136]. No further investigation has been reported as yet with this compound or analogues.

4.5. VRX0466617

VRX0466617 was synthesized using a structure-based drug design strategy led by Valeant Pharmaceuticals International starting from an isothiazole carboxamide identified by screening [137]. VRX0466617 exhibits higher affinity and selectivity for Chk2 ($IC_{50} = 120$ nM, $K_i = 11$ nM) compared to Chk1 ($IC_{50} > 10$ μ M) [138]. This compound showed an effect on IR-treated cells by blocking the kinase activity of Chk2. Phosphorylation on Ser19 and Ser33-35 was inhibited in the presence of the molecule, but the ATM-dependent Thr68 phosphorylation of

Chk2 was spared. HDMX is a negative regulator of p53 that is phosphorylated by Chk2 on Ser342 and Ser367 upon exposure to IR, leading to its degradation. VRX0466617 prevented IR-induced HDMX degradation in a concentration-dependent manner. It was found to inhibit IR-induced apoptosis, but did not potentiate effect of DNA-damaging drugs cisplatin and doxorubicin in MCF-7 cancer cell line, nor taxol in BJ-hTERT cells.

Other small molecules, such as UCN-01 [139], AZD7762 [140], or XL844 [141], have been identified to inhibiting Chk2 but these are thought to exhibit equal or higher potency for Chk1 than for Chk2.

In contrast to Chk1 inhibitors, Chk2 inhibitors have not reached the clinical trial stage. Although the experimental setting (e.g., the genetic background of the cancer cell lines and the DNA-damaging agents used) may account for this, there have been conflicting studies as to whether pharmacological inhibition of Chk2 can synergize DNA-damaging agents. A lack of clarity regarding the role of CHK2 inhibition and the context for Chk2 selectivity works also against the favor of Chk2 inhibitors.

5. The Poly(ADP) Ribose Polymerase

Poly (adenosine diphosphate [ADP]) ribose polymerase (PARP) inhibitors are a class of drugs which have recently had an investigational growth in the cancer treatment setting due to the increasing understanding of the functions of PARP enzymes in DNA repair. PARP1 and PARP2 are the best studied enzymes out of a 17 PARP protein family [142,143]. Activation of PARP upon DNA damage leads to the synthesis of poly(ADP)-ribose (pADPr), which is one of the earliest steps of DNA damage recognition and signalling in mammalian cells [144]. PARP1 catalysis the addition of pADPr to chromatin-related proteins, increasing the accessibility of repair factors to DNA lesions. Numerous molecules are recruited at DNA-damage sites in a pADPr-dependent manner [142,143,145].

PARP inhibitors are analogues of the nicotinamide moiety of the NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) [146,147,148] and their mechanistic effect is to compete for the substrate binding site of PARP, acting as an effective catalytic (CAT) inhibitor [146,147,149,150]. Inhibiting PARP catalysis blocks base excision repair (BER) and leads to the accumulation of unrepaired single-strand DNA breaks (SSBs), which develop into DSBs in replicating cells. Such DSBs require competent HR repair to allow cell survival [151,152].

The BRCA1 and BRCA2 genes code for proteins that have been very well documented for being key for a functional HR repair pathway. Normal cells of BRCA1/2 mutation carriers have one copy of BRCA1 or BRCA2 (BRCA1/2+/-), which allows them to retain their capability to undergo repair with satisfactory proficiency. However, when the wild-type BRCA is lost, these cells become defective in repairing DSBs by HR. Instead, these lesions are repaired by the error-prone mechanisms of NHEJ leading to genomic instability and predisposition to cancer [151,152,153]. Therefore, much of the development of PARP inhibitors has been focused on targeting this weakness of cancers associated with mutations in these breast cancer-related tumour suppressor genes. Accordingly, cells containing a mutation in either of these genes, when treated with PARPi will fail to undergo normal HR repair. This selective targeting of BRCA-deficient cancer cells by PARPi introduces the concept of synthetic lethality, whereby a cell harbouring one of two gene or protein defects is viable while a cell containing both defects is nonviable. Moreover, PARP has been suggested to participate in the restoration of stalled replication forks [152,154] by accumulating at the damaged site and recruiting MRE11 to catalyse DNA-end processing. Therefore by inhibiting PARP, stalled replication forks will not progress and the consequent accumulation of toxic DNA structures will lead to cytotoxicity in HR-deficient cells [155].

Since the discovery of such concept, PARPi have been developed with a highly efficacious CAT inhibitory concentration, at an impressive nanomolar range. Olaparib (AZD-2281; AstraZeneca, London, UK) was the first PARPi to demonstrate clinical activity in BRCA mutation-associated cancers. The trial demonstrated that more than 90% of PARP enzymatic activity could be inhibited with no increased toxicity [156]. Following clinical trials also provided proof of concept of olaparib single-agent activity of PARP inhibition in patients with tumours that have genetic loss of function of BRCA1-associated or BRCA2-associated DNA repair [157,158]. Subsequent work has shown that, in addition to BRCA1/BRCA2 mutations, BRCA-like tumours may also have implications for PARPi-based therapy. These tumours have molecular and clinical characteristics in common with tumours occurring in patients with germ line BRCA mutations (gBRCAm) [159]. Furthermore, a wider subgroup of solid tumours that may have deficiency in other HR genes may also cause cancer cells to become sensitive to PARP inhibitors [160,161,162,163]. The clinical success of olaparib and the discovery of tumours with molecular and clinical features similar to gBRCAm-associated tumours, prompted the clinical development of various PARP inhibitors either as single agents or as part of combined treatment with DNA damaging agents in phase I and II clinical trials.

There are at least 8 PARP inhibitors (depicted in Figure S3) that have reached clinical development in oncology [164,165,166]. Lynparza (Olaparib) is a potent (PARP-1 IC_{50} = 5nM) oral PARP1/2 inhibitor [156] whose therapeutic efficacy has recently led to the approval by the US FDA and the European commission (report on the FDA website) for the treatment of patients with platinum-sensitive, recurrent, high-grade serous ovarian cancer with BRCA1 or BRCA2 mutations. This is the first approval of a drug in the PARP inhibitor class and efforts are being made for its potential approval in other types of cancer. An ongoing phase II, TOPARP-A (NCT01682772), is now evaluating olaparib for its anti-tumour activity in metastatic castration resistant prostate cancer, in order to identify molecular signatures of tumour cells in responding and non-responding patients, and to identify predictive biomarkers of olaparib response. Moreover, an ongoing phase II (NCT01078662) study of olaparib monotherapy in BRCA1/2 mutation carriers of different tumour types revealed clinical benefit in prostate and pancreatic cancer as well as activity in ovarian and breast cancer. The gBRCAm-associated pancreatic cancer patients yielded a clinical benefit rate of 57% [167]. Prolonged responses to olaparib across all tumour types observed in this study support the hypothesis that therapy directed against a genetically-defined target has activity regardless of the anatomic organ of origin. Olaparib has been shown to have therapeutic effects in cell lines with mutations in other HR genes such as tumour suppressor PTEN [168]. Such event was later supported by subsequent studies in xenografts of PTEN-deficient endometrial cancer [169,170]. These studies provided a rationale for further studies in whether PTEN loss can serve as a potential biomarker for PARPi sensitivity [171,172,173]. Also, most recently olaparib was suggested to be an attractive therapeutic option as a monotherapy for acute myeloid leukemia patients not suitable for conventional chemotherapy (CT), also giving strong evidence of possible biomarkers to predict PARPi resistance or response [174].

5.1. Talazoparib (BMN 673; BioMarin Pharmaceutical Inc., Novato, CA, USA)

Talazoparib is an oral PARP1/2 inhibitor with greater in vitro activity than any other PARP inhibitor currently in development (PARP-1 IC_{50} = 0.6 nM) [173]. Much like olaparib, BMN 673 has been shown to cause single-agent synthetic lethality in BRCA1/2- and PTEN-deficient cell lines, with potent antitumour activity in animal models of tumours harbouring mutations in DNA repair pathways [173,174,175]. It is especially showing promise as single-agent treatment in patients with advanced ovarian and breast cancer harbouring deleterious BRCA1/2 mutations. Furthermore, BMN 673 has also demonstrated to potentiate the antitumour effects of TMZ, cisplatin (CIS), and carboplatin [173]. These therapeutic effects were achieved with

tolerable toxicity, evidence of pADPr inhibition in vivo in animal tumour models, and favourable pharmacokinetic properties that allow once a day oral dosing in human patients. It is currently under trial as single agent and in combination therapy with chemo and radiotherapy (RT) in a plethora of different types of cancer such as advanced solid malignancies and deleterious BRCA1/2 mutation-associated cancers (clinicaltrials.gov).

5.2. Veliparib (ABT-888; AbbVie Inc., North Chicago, IL, USA)

Veliparib is a potent oral PARP-1/2 inhibitor (PARP-1 $K_i = 5\text{nM}$) with nanomolar cell-based activity, decent oral bioavailability [176] and apparent CNS penetration [164]. Preclinical studies in breast cancer, melanoma and glioma models demonstrated that veliparib potentiates the CT effect of a number of agents including TMZ, platinum, and irinotecan (CPT), as well as radiation [177]. Veliparib also has the capacity to synergise with olaparib in combination with ionizing radiation in cell line modes of head and neck cancer and lymphoma [178,179]. An ongoing phase I/II (NCT01489865) study is testing the efficacy of a new combination of drugs, with veliparib and a platinum agent, mFOLFOX-6 (modified 5-fluorouracil and oxaliplatin), for patients with metastatic pancreatic cancer (MPC). The combination has demonstrated promising efficacy in MPC, particularly in patients with BRCA2 gene mutations [180]. Other phase I and II trials are exploring the combination with RT and CT, respectively, in various cancer types [181,182].

5.3. Rucaparib (AG-014699; Clovis Oncology, Boulder, CO, USA)

Rucaparib is an intravenous (IV) PARP inhibitor characterized as a potent PARPi (PARP-1 $IC_{50} = 2\text{ nM}$) in cell based assays of radio and chemosensitization and is a very potent enzyme inhibitor [183,184,185]. As a solo agent, rucaparib has been demonstrated to sensitize human cancer cells or xenograft tumours with mutated or epigenetically silenced BRCA1/2, indicating a potential role for PARP inhibitors in sporadic human cancers [186]. This inhibitor is mainly being trialled as a monotherapy for different types of ovarian cancer (clinicaltrials.gov). Two ongoing clinical trials, known as ARIEL2 (NCT01891344) and ARIEL3 (NCT01968213) are aiming to evaluate biomarkers to predict how a woman with ovarian cancer may respond to rucaparib and to explore the effect of rucaparib in women with high-grade serous platinum-sensitive relapsed ovarian cancer or endometrioid epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer, respectively. A first time study on leukemic cells using a combined therapy that associates the conventional CT agent fluorouracil (5FU), used as a source of DNA damage,

and rucaparib, demonstrated the efficacy and the specificity of this combined therapy in killing both acute myeloid leukemia and acute lymphoid leukemia cells in vitro and in vivo. This study therefore suggests a new therapeutic strategy able to enhance the cytotoxic effect of DNA-damaging agents in leukemia cells via inhibiting the repair of damaged DNA [187].

5.4. Niraparib (MK-4827; Tesaro Inc., Waltham, MA, USA)

Niraparib is an orally available PARPi, which demonstrates potent and selective PARP-1 and PARP-2 inhibitory activity ($IC_{50} = 3.8$ and 2.1 nM respectively) [188,189]. It was firstly studied in patients with BRCA1/2 mutations and sporadic cancers associated with HR repair defects. These demonstrated niraparib to be and to have promising antitumour activity in both BRCA-deficient and sporadic cancers [190]. Niraparib was also found to cooperate with radiation and enhance cell death of neuroblastoma cells in vitro. When experimented in vivo the radiation combination with niraparib decreased tumour burden and prolonged survival in a metastatic neuroblastoma model. Overall, this study proposed this therapeutic combination to be a promising new therapy for treatment of metastatic neuroblastoma [191]. Currently, this inhibitor is enrolled in a phase I (NCT02044120) trial in a combination regimen with TMZ in recurrent Ewing sarcoma [182]. It is also enrolled in a phase II (NCT02354586) and III (NCT01905592) trial studies as maintenance therapy in ovarian cancer and as a treatment for breast cancer.

5.5. INO-1001 (Selleck Chemicals, Euromedex, France)

INO-1001 is an IV PARPi that shows capability to restore sensitivity to TMZ in a mismatch-repair (MMR) deficient xenograft model of malignant melanoma [192]. This inhibitor has also demonstrated potential in enhancing radiation sensitivity without associated cytotoxicity in mammalian cells [193]. MMR loss of function could potentially be a predictive biomarker of PARPi responsiveness in patients with metastatic melanoma. A most recent IB trial concluded that the administration of INO-1001 in combination with TMZ is safe for metastatic melanoma individuals [194]. No clinical trials are ongoing for this PARPi.

5.6. E7016 (Eisai Co., Ltd; Tokyo, Japan)

E7016 is an orally bioavailable PARP inhibitor that can enhance tumour radiosensitivity and also provide a greater than an additive effect when used in combination with TMZ and radiation

[195]. It is currently enrolled in an ongoing phase II (NCT01605162) trial which is exploring its efficacy in combination with TMZ in patients with malignant melanoma [196].

5.7. CEP-9722 (Cephalon, Inc.; Frazer, PA, USA)

CEP-9722 is an oral PARP-1/2 inhibitor and a pro-drug of CEP-8983. Pre-clinical studies [197] demonstrated its capability of sensitizing different types of tumour cells to TMZ, CPT and radiation. Concluded phase I studies have evaluated CEP-9722 maximum tolerated dose (MTD) in patients with advanced or metastatic solid tumours, its antitumour activity as a single agent, its MTD in combination with gemcitabine and CIS in advanced solid tumours and mantle cell lymphoma (NCT01311713), and its safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics as single-agent therapy and as combination therapy with TMZ in patients with advanced solid tumours (NCT00920595). Clinical trials for this inhibitor have been completed or terminated and no other studies are ongoing.

Overall, the utility of PARP inhibitors as therapeutic candidates is not limited to their efficacy in treating malignancies. They also have emerged with a spectrum of actions that incorporates treating other conditions such as cardiovascular diseases, stroke, metabolic disorders, diabetes, and autoimmune disorders [198,199,200,201].

5.8. PARP Trapping: Mechanism of Action of PARP Inhibitors

As previously mentioned, many clinically investigated PARP inhibitors, including talazoparib, niraparib, olaparib, rucaparib and veliparib, are highly efficacious at inhibiting PARP CAT activity, with very similar half-maximal inhibitor concentration values in the single-digit nanomolar range. This antitumour activity was thought to be exerted solely by the inhibition of PARP1 and PARP2 CAT activity. However, several studies [202,203,204] have demonstrated that, in addition to CAT inhibition, PARP inhibitors have the capacity of trapping PARP1 and PARP2 at SSB sites, possibly via a poisonous allosteric effect that affects the conformational flexibility and dynamics of PARP, enhancing its affinity for the SSB repair intermediate [202,203]. Trapped PARP-DNA complexes prevent DNA replication and transcription. Thus, these DNA-PARP complexes kill cancer cells more effectively than genetic depletion of PARP [202,205]. This recent mechanism of action is denominated PARP poisoning or trapping.

If CAT inhibition was the only way of antitumour activity, one would expect that similar IC₅₀ values of CAT activity would result in similar PARPi cytotoxicity potency. Whereas, it has

been demonstrated that the ability of PARP inhibitors both in terms of single-agent activity in BRCA-deficient cells and in the sensitization of cancer cells to alkylating agents, differ by several orders of magnitude. Rucaparib, olaparib, and niraparib are comparable regarding cancer cytotoxicity, whilst talazoparib is approximately 25- to 100-fold more potent. On the other hand, veliparib is ~1000- to 10,000-fold less potent than talazoparib in cytotoxicity assays [202,203,206]. This magnitude of differences in cytotoxicity cannot only be explained by differences in CAT inhibition or by differential off-target activity of the PARP inhibitors. In fact, olaparib and veliparib have similar selectivity profiles against 13 of the 17 human PARP family members and do not demonstrate off-target activity [207]. Talazoparib is also comparable to both these PARPi in its selectivity profile [204], with its non-off-target activity most recently demonstrated by the resistance effect PARP1 knock out cells acquired to talazoparib [203]. Likewise, cells with PARP1 loss-of-function mutations are 100-fold more resistant to olaparib than wild-type cells [208]. These data indicate that PARP1 protein is the critical mediator of the cytotoxic effect of PARP inhibitors, arguing against the suggestion that these differences in cytotoxicity result from off-target activities.

As mentioned above, the proposed mechanistic effect that could be behind such differences is PARP trapping, where PARP inhibitors induce an allosteric conformational change in PARP1 and PARP2, stabilizing their associations with DNA and therefore forming lethal PARP-DNA complexes. Direct evidence has been provided, demonstrating that in fact, PARP inhibitors exert their cytotoxicity primarily by this trapping mechanism rather than by classic enzyme inhibition and that this capacity varies widely across different PARP inhibitors [202,203]. Five PARPi have been extensively tested in different cell lines for their trapping capacity [202,203]. The stabilization of the PARP-DNA complexes by PARPi is reversible and these complexes have been demonstrated both in intact cells and in cell-free systems [202,203,209]. Veliparib is primarily a CAT inhibitor with little trapping activity, consistent with the effect observed in PARP1 loss-of-function mutant cell lines showing resistance to veliparib only at very high drug concentrations [202]. On the other hand, olaparib, niraparib, and rucaparib trap PARP ~100-fold more efficiently than veliparib. Talazoparib is the most potent PARP trapper studied to date, promoting PARP-DNA complexes ~100-fold more efficiently than olaparib, niraparib, and rucaparib [202,203]. Overall, these data suggest in fact that the anticancer cytotoxicities of PARP inhibitors do not have a linear relationship with CAT inhibition, but instead correlate very well with trapping potency. The clinical efficacy data for PARP inhibitors in cancer patients with deleterious BRCA gene mutations are consistent with the in vitro cytotoxicity

levels of the PARP inhibitors, nicely correlating the clinical activity with the ability to trap PARP [204].

Moreover, attempts have been made to decipher the differences in the trapping potency of equally strong PARP1 CAT inhibitors [202]. Studies suggest that the level of inhibitor-induced reverse-allosteric-effect may be correlated with the size or bulk of PARP inhibitors, which may ultimately be related to the degree of PARP trapping. It is understood, by a substantial body of structural data, that PARP inhibitors do in fact differ considerably in overall size/scaffold and consequently in binding modes. Comparing to the bulkier PARP inhibitors, such as olaparib, niraparib, rucaparib and talazoparib, veliparib is the smallest amongst them [202,203], and demonstrates to be the least potent in trapping PARP. Accordingly, it also does not appear to induce conformational changes on PARP1 in microsecond molecular dynamic simulations studies [210]. On the other hand, olaparib demonstrates to cause CAT domain steric bumps on the HD subdomain. These steric bumps trigger conformational rearrangements in the DNA-binding domains and stabilize the PARP1-DNA complex, therefore implicating the HD subdomain as a crucial structural element in the proposed reverse-allosteric mechanism [210]. The fact that veliparib does not induce steric bumps can be explained by its methylpyrrolidine moiety being too small to make significant contacts with the CAT domain [176,210]. Further supporting this relationship of inhibitor size and degree of PARP trapping, a potent CAT inhibitor in pre-clinical development similar to veliparib in size and binding mode, also shows low levels of PARP trapping activity [210,211]. However, among the bulky PARP1 inhibitors, no correlation can be firmly established. For instance, talazoparib has been shown to be the most potent PARP-trapping inhibitor tested to date, despite its small size compared to olaparib [203]. Thus, the molecular size of the inhibitor alone, seems insufficient to justify these vast differences between trapping potency. Recent studies suggest that the shape and flexibility of inhibitors may contribute to the efficiency of trapping PARP-DNA complexes [203], by dictating the extent and type of binding interactions. Also, inhibitors with noticeable ability to stabilize the PARP-DNA complexes appear to interact with the D-loop, localized at the outer border of the NAD⁺ site. For instance, rucaparib and niraparib appear to bind close to the D-loop, and olaparib forms a hydrogen bond with the D-loop residue Met890 [210]. Talazoparib has unique tripartite chemical scaffolds that are rigid and stereospecific [173,212]. The stereospecific 4-fluorophenylsubstituent is favourably oriented to interact with the Met890 backbone via a water molecule and the Tyr889 side chain on the D-loop. This Tyr889 residue, can assume multiple side-chain conformations [213,214], however binding of a rigid

stereospecific inhibitor such as talazoparib may sterically restrict the side-chain flexibility. These interactions suggest that the degree of PARP-trapping capacity may be associated with the extent to which the inhibitor interacts with the D-loop residues. These residues are structurally linked to the HD subdomain. Therefore, structural changes in this domain will consequently influence the conformational flexibility of the CAT domain. Additional studies are required to elucidate the structural consequences of the decreased side-chain flexibility of the D-loop residues, such as Tyr889, on PARP trapping [215].

Overall, the effectiveness in PARP trapping may be an important factor to consider when formulating a therapeutic regimen involving a PARP inhibitor (single agent or in combination), therefore it is of highly importance to elucidate the molecular basis that explains the differential PARP trapping between the inhibitors. Newly available structural data on the non-catalytic domains [216,217], combined with co-crystal structures of the inhibitor-bound PARP1 CAT domain is a major step into answering such question [147,163,218,219].

6. The MRE11-RAD50-NBS1 Complex

The MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex (Figure 2) acts both as a sensor and an effector in the DDR, with crucial roles in the detection, signalling and repair of DSBs. Mre11 and Rad50 were originally characterized in genetic screens from *Saccharomyces cerevisiae*, the Mre11 mutant being defective in meiotic recombination [175] and Rad50 mutant sensitive to DNA damage [176]. NBS1 was later isolated as a member of the ternary complex, binding MRE11 and RAD50. Mutations in NBS1 gene are linked to Nijmegen Breakage Syndrome, an autosomal recessive disorder characterized by high cancer incidence, cell cycle checkpoints defects and IR sensitivity [177]. In human, mutations in MRE11 cause A-T like disorder [178] and a RAD50 deficiency has been reported in NBS-like disorder [179]. Null-mutations in each of these three genes cause embryonic lethality in mice [180,181,182]. MRE11 acts as a dimer [183], binds DNA [184,185], presents exo- and endonuclease activities [186,187] and has the ability to synapse DNA ends [183]. RAD50 carries an ATPase activity used to maintain DNA ends in close proximity [188]. NBS1 recruits DNA repair and checkpoint proteins at the DSB site via phospho-dependent interactions, namely with γ -H2AX, checkpoint adaptor MDC1 and HR regulator CtIP (CtBP-interacting protein) [189,190,191,192]. MRN has been extensively studied for its essential role in the resection of DSBs that it owes to the endo- and exonuclease activities of MRE11. Resection contributes to the generation of 3' single-stranded DNA tails, which are essential for ATM stimulation and subsequent cell cycle checkpoint activation as

well as for initiation of HR repair [193,194]. Moreover, recent studies have revealed that resection plays a critical role in the DSB pathway choice by committing cells to HR while suppressing NHEJ [195,196]. As dysfunction in the MRN functionality leads to hypersensitivity to DNA-damage agents by impairment of ATM pathway, inhibiting one of the MRN complex components represents an attractive strategy to induce cancer cell death in combination with DNA-damaging treatment. In an effort to identify small molecules inhibiting the MRN complex, a few MRE11 inhibitors (depicted in Figure S4) have been discovered.

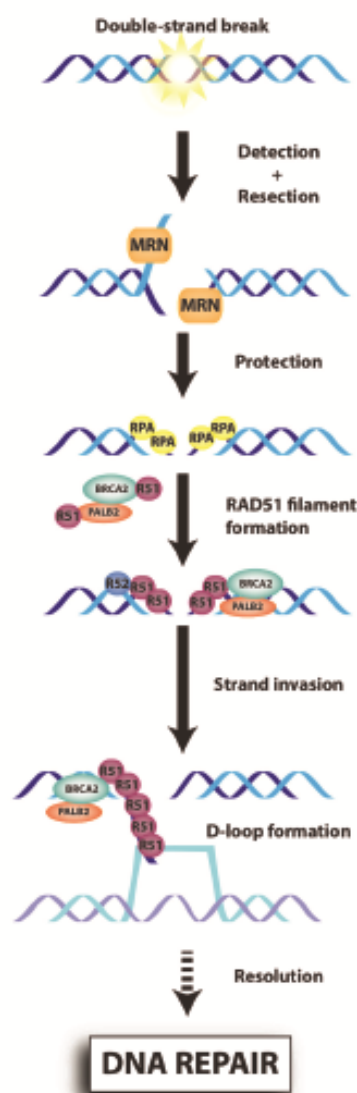


Figure 2. Schematic representation of DNA repair by homologous recombination. During Homologous Recombination (HR), the double-strand break is recognized by the MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) (MRE11-RAD50-NBS1) complex, which resects DNA (with EXO1, CtIP and BLM) to create a 3'-overhang DNA that will be protected by RPA. The BRCA1-PALB2-BRCA2 complex then mediates the replacement of RPA by RAD51. RAD51 nucleoprotein filament, invades the complementary DNA template (a step called strand invasion), leading to the formation of the Displacement-loop (D-loop) structure. Following branch migration and resolution, faithful DNA repair occurs.

6.1. Mirin

Mirin, the first MRE11 inhibitor described, was isolated from a screen of a 10,000 small-molecule library (DIVERSet, Chembridge Corporation), wherein compounds were tested for their inhibitory effect on the phosphorylation of a peptide derived from γ -H2AX by ATM [197]. With the most efficient inhibitory effect ($IC_{50} = 66 \mu M$), mirin appeared to target the MRN

complex rather than ATM. More specifically, mirin was found to block the MRN-dependent activation of ATM without affecting the kinase activity and to abolish MRE11 nuclease activity (100 μ M). Exposing mammalian cells to mirin led to the abrogation of the IR-induced G2/M checkpoint and failure of HR repair. Mirin was later shown to down-regulate NHEJ repair efficiency as well [198]. The broad range of cellular effects associated with mirin denoted a lack of HR specificity that has limited the enthusiasm for its potential clinical utility. To date, no clinical study has been initiated with mirin.

6.2. PFM39, PFM01 and PFM03

Recently, novel small molecules have been discovered to inhibit endo- or exonuclease activity of MRE11 [196]. A library of molecules, derived from mirin with substituents in the styryl moiety and replacement of the pseudothiohydantoin ring by rodanine moiety, was created. The mechanism of action of mirin was first studied by co-crystallization of Mre11 from *Thermotoga maritima* with mirin. It appeared that the His61 (corresponds to His63 in human MRE11) and Asn93 residue may be involved in the interaction with mirin. The His61 residue controls dsDNA end accessibility to the active site and Asn93 may interact with single-strand DNA. Based on this and the structure of mirin, three molecules were developed, namely PFM39, PFM01 and PFM03. PFM39, which has an amino group substituting the hydroxyl group, binds between the His61 loop and the adjacent loop (Asn93-Lys97) and inhibits the exonuclease activity of MRE11, as mirin does. PFM01, which has a rodanine ring plus an isobutyl chain on the nitrogen, and PFM03, which has a sec-butyl chain, may bind near the dimer interface of MRE11 to inhibit its endonuclease activity. The three PFM molecules induced a decrease in MRE11-dependent DSB resection that was supported by reduced ssDNA formation, as detected using an antibody against BrdU, and impaired IR-induced RAD51 foci in G2 cells. Mirin and PFM39 cause a G2 repair defect 8 h after IR treatment in HR deficient cells while PFM01 and PFM03 have no effect, highlighting the fact that exo- and endonuclease inhibitors confer different DSB repair phenotypes. PFM01 and PFM03 enhanced NHEJ and reduced HR while PFM39 inhibited HR but have no effect on NHEJ. No translational applications have been led yet with these molecules, but because of the importance of DNA resection in DNA repair and the fact that these small molecules influence the DNA repair pathway choice, it will be interesting to evaluate their combined impact in a synthetic lethal strategy.

7. The RAD51 Protein, a Central HR Protein

RAD51 is an evolutionarily conserved recombinase that is central to DSB repair by HR (Figure 2) and crucial for cell survival, as knock-out of the Rad51 gene in the mouse led to an early embryonic death [199]. With the assistance of HR mediator proteins, such as BRCA2, PALB2, and the RAD51 paralogs, RAD51 is recruited to the DSB sites and polymerizes onto the resection-generated ssDNA ends, forming a nucleoprotein filament that promotes strand invasion and exchange between homologous DNA sequences [200,201,202,203]. The complete RAD51 crystal structure has not been determined yet, but analysis of the crystallized BRC-RAD51 fusion protein, NMR and mutations analysis of RAD51 revealed that RAD51 holds two domains: a N-terminal part that binds both ssDNA and dsDNA and a C-terminal part that binds ATP [204,205]. In vitro, RAD51 recombinase activity is manifested by DNA binding, homologous pairing, strand exchange and DNA-dependent ATPase activity [200]. In vivo, it takes the form of discrete nuclear foci at the DNA break sites [206]. It has been suggested that RAD51 regulation is important for cell homeostasis, as a variety of cancers, such as leukemia [207], pancreatic [208], breast [209], prostate [210] and non-small lung cancers [211], have been linked to an overexpression or up-regulation of RAD51 while others, including breast and colorectal cancers, exhibit RAD51 underexpression [212]. Overexpression of RAD51 has been shown to stimulate HR efficiency and promote chemotherapy resistance [212,213]. Previous experiments with siRNA against RAD51 have highlighted the potential of RAD51 down-regulation at increasing radio- or chemosensitivity of cancer cells [214,215]. In this light, RAD51 has become a recognized target to anti-cancer therapies and finding molecules (these inhibitors are depicted in Figure S5) that target either its expression level, recombinase activity, or protein interactions is the current focus of many research studies.

7.1. DIDS

DIDS (4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid) has been previously known for its ability to inhibit chloride channels [216]. By screening a library of 185 molecules, Ishida et al. [217], have found that DIDS is able to inhibit RAD51 strand-exchange activity. Further in vitro studies revealed that DIDS inhibits both the ssDNA and dsDNA-binding activity of RAD51, binds directly to RAD51 and prevents DNA invasion and D-loop formation by RAD51. Recently, Lamont et al. [218], have shown that DIDS provides an antileukemic effect by targeting RAD51. In normal B cells, expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) by antigenic stimulation leads to immunoglobulin switch class, by creating double-strand breaks.

Evidences showed that attenuating HR sensitizes AID-expressing neoplastic B cells to AID-mediated cytotoxicity [219]. In their study, Lamont et al., showed that DIDS inhibits RAD51 foci formation and prevents malignant B cells to use the HR pathway to repair AID-induced DSB. The mechanism of action of DIDS on RAD51 is still unknown, but it is suggested that the molecule may bind near the DNA-binding domains of RAD51, preventing the recombinase from binding DNA [218].

7.2. Halenaquinone/Xestoquinone

Takaku et al. used 160 crude extract fractions from marine sponges in a D-loop formation assay screening [220]. They highlighted the ability of the compound halenaquinone to significantly decrease RAD51 DNA-invasion and strand-exchange activities. Interestingly, a derivative molecule from halenaquinone, xestoquinone, that lacked the oxygen at position C-3 had no effect on RAD51 DNA pairing. The authors also showed by Surface Plasmonic Resonance that halenaquinone directly binds to RAD51, with a higher affinity than xestoquinone. In vitro, halenaquinone was found to inhibit RAD51 binding to dsDNA but not to ssDNA. In cells, the compound had a dose-dependent effect on RAD51 foci formation after IR treatment, but not on RAD51 expression, suggesting that it interfered with RAD51 retention at DSB sites. Xestoquinone had no effect on RAD51-dsDNA binding or foci formation, suggesting that the oxygen at position C-3 is important for halenaquinone activity on RAD51. No other investigation has been yet published on halenaquinone inhibitory effect.

7.3. B02 and Derivatives

Huang et al. [221] developed a high-throughput method based on FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) to screen a 200,000 molecules library from the NIH repository and identify inhibitors of RAD51 strand-exchange activity. From the 17 compounds identified, four molecules emerged as the most potent RAD51 inhibitors, as determined by D-loop assays, and were tested for selectivity towards RAD51. B02 (3-(Phenylmethyl)-2-[(1E)-2-(3-pyridinyl)ethenyl]-4(3H)-quinazolinone) was found the most efficient inhibitor of RAD51 activity ($IC_{50} = 27,4 \mu M$), with no effect on RecA, the *E. coli* homolog of RAD51, and structurally unrelated RAD54. B02 derivatives were then synthesized to develop RAD51 inhibitors of higher efficiency. It revealed that B02-3a and B02-3b, which contain an ethyl and a m-methylphenyl group, respectively, instead of a benzyl group, are at least as efficient as B02 on RAD51 D-loop formation and strand-exchange activities.

Three studies were then carried out to assess the effect of B02 in a cellular environment. A first study showed that B02 was also able to decrease RAD51 foci formation by 3.8-fold (50 μ M) and HR efficiency by 8-fold in HEK cells after IR treatment [222]. The authors revealed that B02 sensitized RAD51 siRNA-treated HEK293 cells to cisplatin and MEF cells to a combined MMS and PARP1 inhibitor (AZD2281) treatment. Huang and collaborators [223] tested the effect of B02 in combination with different chemotherapeutics agents, such as etoposide, cisplatin, doxorubicin, and topotecan, on the MDA-MB-231 human breast cancer cell line. B02 was able to sensitize MDA-MB-231 cells to all drug combinations, the most important effect of B02 being seen with cisplatin. They also highlighted the inhibitory effect of B02 combined with cisplatin treatment in mouse xenografts by studying MDA-MB-231 proliferation. B02 was able to disrupt RAD51 foci formation in MDA-MB-231 cells in mouse xenografts. Another study led by Alagpulinsa et al. [224] investigated the effect of B02 on multiple myeloma (MM) cells combined with doxorubicin treatment. Alone, doxorubicin treatment induced RAD51 foci formation in multiple myeloma cells, whereas pre-treatment with B02 blocked doxorubicin-induced RAD51 foci formation and increased the γ -H2AX foci number, due to unrepaired DSB caused by the doxorubicin treatment. Using HR assays, they estimated that B02 inhibits HR at least 6-fold.

7.4. RI-1 and RI-2

By screening a library of 10,000 molecules DIVERSet from Chembridge Corporation, Budke et al. [225] reported a molecule able to inhibit RAD51 ssDNA binding, RI-1 (3-chloro-1-(3,4-dichlorophenyl)-4-morpholino-1H-pyrrole-2,5-dione). The mechanism of action of RI-1 was based on its chloromaleimide moiety, which binds covalently to the thiol group of the Cys319 residue on RAD51 surface by a Michael addition mechanism. This interaction was found to inhibit DNA binding ($IC_{50} = 6.62 \mu$ M) and polymerization of RAD51 during nucleofilament formation. As the interaction site on RAD51 surface is highly conserved among mammalian, RI-1 bound also Rad51 from *Saccharomyces cerevisiae*, the Cys319 human RAD51 residue corresponding to its Cys377 residue, but not RecA where the site is absent. The Cys319 residue of RAD51 is located on the interface between two RAD51 monomers. This site overlaps the ATPase domain of RAD51, suggesting RI-1 may prevent nucleofilament formation and also modulate ATP binding. RI-1 treatment is associated with decreased RAD51 foci formation and increased γ -H2AX foci formation [226]. Importantly, RI-1 has been shown to produce an anti-cancer effect (IC_{50} range from 5 μ M to 30 μ M) when associated with mitomycin-C treatment in four cell lines (U2OS, HeLa, MCF-7 and SH2038).

A RI-1 analog, named RI-2 (1-(3,4-dichlorophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-4-morpholino-1H-pyrrole-2,5-dione), was developed to reduce probability of off-targets and to improve the stability of the molecule in vivo [227]. RI-2 lacks the chloromaleimide-based reactivity that potentially limits RI-1 use in animal models. This compound was able to bind RAD51 at the same location as RI-1 does and inhibited DNA binding function of RAD51 ($IC_{50} = 44.17 \mu M$) in a reversible manner. As RI-1 (20 μM), RI-2 treatment (60 μM) led to HR inhibition in cells despite it lacks the Michael acceptor reactivity of RI-1.

7.5. IBR2 and IBR120

IBR2 is a small molecule able to inhibit RAD51 by mimicking the effect of BRC repeat binding to RAD51. BRC repeats are structural motifs that confer upon BRCA2 the property to bind to RAD51 [228]. IBR2 was discovered by screening a 24,000 molecules Nanosyn library using an inducible reverse yeast two-hybrid system to highlight molecules capable to inhibit BRC-RAD51 interaction [229]. IBR2 was shown to specifically bind to RAD51 to prevent its multimerization and therefore nucleofilament formation. Consistent with this, IBR2 diminishes the efficiency of HR and inhibits RAD51 foci formation in MCF-7 cells after IR treatment (20 μM for 8 h). IBR2-treated cells showed no effect of the molecule on RAD51 at the transcriptional level, but IBR2 was found to promote RAD51 degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. IBR2 exhibited a potential therapeutic use for treating a broad spectrum of human malignancies, as it inhibited cell growth in various cancer cell lines, including K562, HeLa, MBA-MD-231, MBA-MD-435, MBA-MD-468, MCF-7, T47D and HBL100 (GI_{50} range from 11.5 to 16.0 μM). It was also tested in vivo as a monotherapy on a breast cancer xenograft model, leading to a decrease in tumour growth in nude mice. This same study also highlighted the promise of IBR2 as a treatment against hard-to-treat cancers, such as CML resistant to imatinib (a Bcr-abl inhibitor used to treat CML). For instance, IBR2 treatment of murine cells that express the imatinib-resistant mutant T315I Bcr-abl led to a decrease in cell proliferation and HR efficiency with associated apoptosis. Moreover, non-Obese Diabetic/Severe-Combined Deficiency mice injected with T315I cells and treated with IBR2 (100 mg/kg) showed a prolonged survival compared to mice treated with imatinib alone (125 mg/kg). Finally, co-treatment of K562 human leukemia cells, a BCR-ABL positive and chemo-resistant cell line derived from a CML patient, with IBR2 and imatinib showed an increase of apoptosis, suggesting a synergistic effect on cell killing.

Recently, IBR2 analogues were developed to improve the efficiency of the initial molecule [230]. All 24 newly synthesized analogues were screened for their ability to inhibit the growth of the triple-negative breast cancer cell line MBA-MD-468. Four of them exhibited at least a 1.6-fold greater effect than IBR2 ($IC_{50} = 14.8 \mu M$), especially the isoindolinyl derivative IBR120 ($IC_{50} = 3.1 \mu M$), which showed a 4.8-fold increase in growth inhibition activity compared to IBR2. IBR120 demonstrated anti-proliferative activity in many cancer cell lines (breast cancer cell lines K562, MCF-7, MBA-MD-231, MBA-MD-361, MBA-MD-435, MBA-MD-468, HsT578-T, T47D, human osteosarcoma cell line U2OS, human glioblastoma cell line T98G and human cervical cell line HeLa), with IC_{50} in the low micromolar range (from 3 to 5 μM for most tested cell lines). Using docking analysis, three RAD51 residues (V189, Y191 and Q206) were identified as potential hydrogen bonding sites for interaction with IBR120. As IBR2, IBR120 prevented RAD51 multimerization and decreased HR efficiency. IBR2 and IBR120 also share structural similarities, the central ring structure in IBR120 being only one carbon smaller than that of IBR2. In contrast to IBR2, the effects of IBR120 *in vivo* has not been yet investigated. This study provided interesting insights into the chemical groups and structures involved in IBR2 and IBR120 inhibition of RAD51, and suggested the possibility of improving IBR2 inhibitory activity on RAD51.

Although no clinical trial involving RAD51 inhibitors has been initiated, these molecules remain promising in light of a combinatory treatment as well as a potential therapy for hard-to-treat cancers such as CML.

8. The RAD52 Protein

Rad52 was firstly identified in *Saccharomyces cerevisiae* by a genetic screen for mutants sensitive to IR treatment [231]. Absence of Rad52 confers important defects, Rad52 being involved in all HR pathways both Rad51-dependent (Double-Strand Break Repair and Synthesis-Dependent Strand Annealing) and Rad51-independent (Single-Strand Annealing) [7]. Human RAD52 is structurally and biochemically close to ScRad52, even if inactivation of RAD52 is not lethal in mice [232]. RAD52 binds ssDNA, promotes DNA annealing, interacts with RAD51 to modulate its DNA strand-exchange activity upon the reaction conditions and interacts with RPA [233,234]. Previous studies have shown that the N-terminal part of RAD52 is involved in the oligomeric ring formation leading to the RAD52-ssDNA binding. This interaction is due to a large number of positively charged residues in the groove of the RAD52 ring [235,236]. RAD52 also possesses a second DNA binding site that binds dsDNA [237].

Genome-wide study has lately characterized RAD52 as a lung cancer susceptibility gene, the region containing RAD52 gene was amplified in patients affected by lung cancer. The authors showed that overexpression of RAD52 causes an increase in cell proliferation and that depletion of Rad52 in mouse lung cancer cells leads to cell death [238]. Recent studies have highlighted importance of RAD52 in human cancer cell lines deficient in BRCA1, PALB2 [239] or BRCA2 [240], as its depletion led to cell death in a synthetic lethality manner. Thus, developing therapeutic strategies targeting RAD52 to treat PALB2, BRCA1 or BRCA2 mutant cancers might be considered. Currently, no molecules have been described to inhibit RAD52 whether it is by preventing RAD52 ring formation, dissociating RAD52 ring, preventing RAD52-DNA binding or modulating RAD52 post-transcriptional modifications. These approaches will need high-throughput screening of small molecules libraries in addition to biochemical and cellular assays to characterize and improve the effects of potential inhibitors. To this end, advances have been made in the characterization of RAD52 activity at both the biochemical and cellular levels [241,242].

9. The Non-Homologous End-Joining (NHEJ) Proteins

Non-Homologous End-joining (NHEJ) is a major double-strand break repair pathway, accounting for 75% of DSB repair in proliferating cells [243]. This repair mechanism can operate throughout the cell cycle, but is suppressed by HR which functions S-G2 phases, when the sister chromatid is available as a repair template [2,244]. NHEJ can be divided into two distinct sub-pathways: classical NHEJ (C-NHEJ), the main canonical DNA-PK-dependent pathway, and alternative NHEJ (Alt-NHEJ) (Figure 3). A particularity of NHEJ is the polyvalence of the nuclease, polymerase, and ligase activities, which provides the ability to repair a broad spectrum of DNA-end substrate configurations that can possibly arise at a DSB (e.g., DNA ends of variable overhang length, sequence or chemistry) [245]. Hence, targeting this main repair pathway is one strategy to fight cancer by increasing cancer cell sensitivity to DSB-inducing agents.

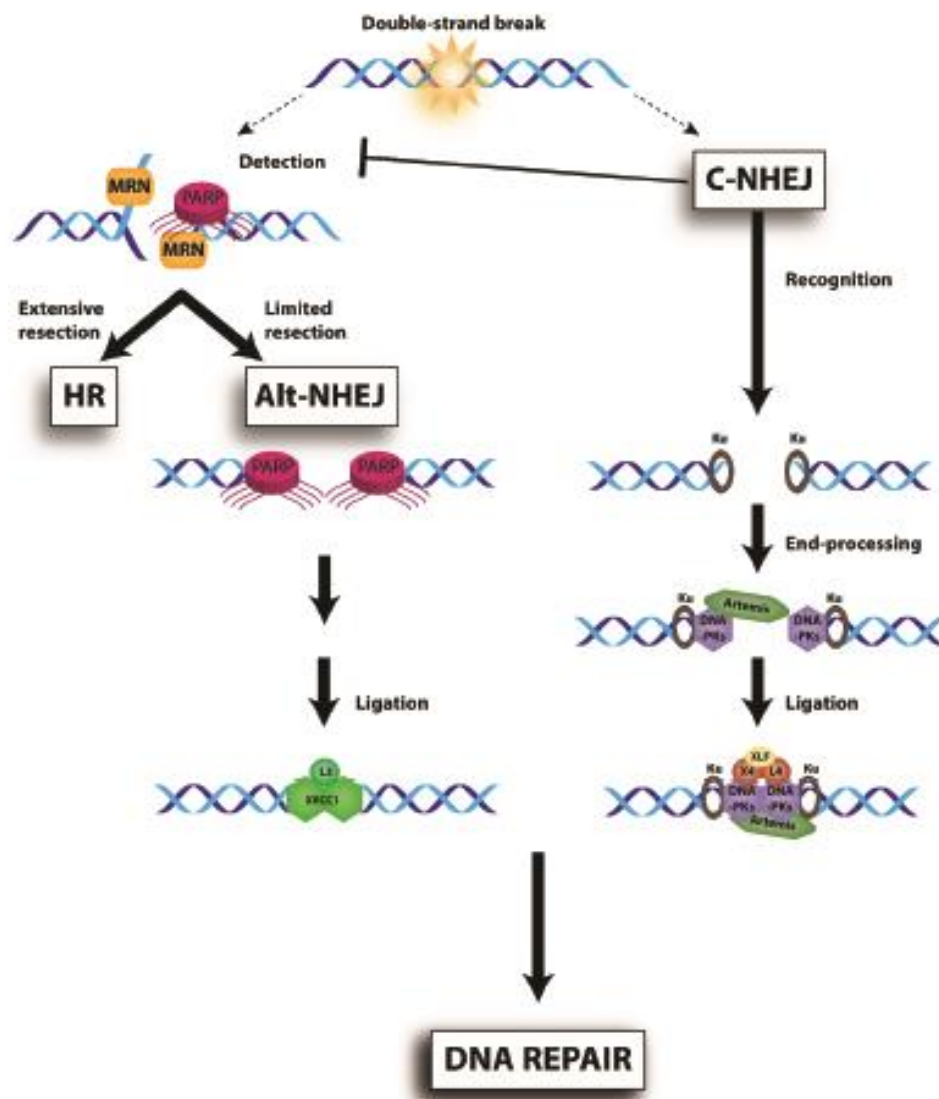


Figure 3. Schematic representation of DNA repair by non-homologous end-joining (NHEJ): classical NHEJ (C-NHEJ) or alternative NHEJ (alt-NHEJ).

C-NHEJ is composed of 3 steps: break recognition, end-processing and ligation. During C-NHEJ, the double-strand break is recognized by the Ku70/Ku80 complex, a dyad-symmetrical molecule that encircles duplex DNA with its ring structure. Ku recruitment and binding helps to stabilize NHEJ enzymes at the DNA termini. Indeed, Ku allows the recruitment of DNA-PKcs, the Artemis complex, the λ and μ polymerases, and a ligation complex composed of XLF (XRCC4-like factor, also called Cernunnos), XRCC4 and DNA ligase IV. The catalytic subunit DNA-PKcs serves as a platform for NHEJ repair. DNA-PKcs is a serine/threonine protein kinase which belongs to the PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) family. Several types of DNA

ends activate DNA-PK, leading to its auto-phosphorylation and the downstream phosphorylation of Artemis, an exo- and endonuclease. As a result, DNA end-processing can occur to render the DSB extremities competent for ligation. The recruitment of the XLF-XRCC4-DNA ligase IV complex can then allow the direct ligation of the break ends. Unfortunately, this step implies the loss of base pairs and explains why NHEJ is not an entirely faithful mechanism. C-NHEJ is able to inhibit other DNA repair pathways. In the absence of this inhibition, PARP1 and the MRN (MRE11–RAD50–NBS1) complex are recruited to the DNA damage site. When resection at the break-ends is limited, the DSB can be repaired by the alt-NHEJ pathway, which implicates DNA ligase III and XRCC1. Alt-NHEJ functions as a backup repair pathway, detected only when C-NHEJ is compromised. In contrast to C-NHEJ, Alt-NHEJ is promoted by poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and relies on the activities of distinct factors, such as X-ray cross complementing factor 1 (XRCC1), DNA ligase III α , polynucleotide kinase (PNK), and Flap endonuclease 1 (the latter two are not shown on the figure).

9.1. Selective DNA-PK Inhibitors

The DNA-PK holoenzyme is composed of a regulatory heterodimer (Ku70 and Ku80 subunits) and a 460 kDa catalytic component, DNA-PKcs. Given that DNA-PK is central to NHEJ, its loss results in inefficient repair of DSBs, increasing sensitivity of cells to ionizing radiation. Conversely, its overexpression can lead to resistance to ionizing radiation in tumour cells. Hence, the search for specific inhibitors against DNA-PK has rapidly gained interest and potential. To date, the most promising approach to DNA-PK inhibition has been to target the ATP-binding site of the kinase catalytic subunit DNA-PKcs using small inhibitors [246]. A major interest around these inhibitors lies in their radio- and chemosensitization capabilities. However, activity against other PI3K proteins and poor pharmacokinetic issues have brought some difficulties into the development of specific molecules targeting DNA-PK (depicted in Figure S6).

9.1.1. Wortmannin

Wortmannin is a sterol-like fungal metabolite, and as mentioned previously, is a non-competitive general inhibitor of PI3K that has been used to target both DNA-PK and ATM. Wortmannin causes the irreversible alkylation of Lys802, which is located in the ATP-binding site of DNA-PKcs and critical for the phosphate transfer reaction [247]. However, the lack of

specificity of this compound, its poor solubility, and in vivo toxicity have limited its clinical application [248].

9.1.2. LY294002

LY294002, a morpholine-containing chemical compound, is also a non-specific DNA-PK inhibitor, most frequently used in vitro as a PI3K inhibitor [249]. It acts by reversibly binding to the kinase domain of DNA-PK in a competitive manner [248]. LY294002 has also been shown to inhibit Ras signalling pathway, rendering it a potential antitumour drug [250]. Unfortunately, in vivo toxicity has made its clinical use in humans unconceivable. Nonetheless, the basic chemical structure of LY294002 has been used as the basis for the development of more potent novel inhibitors.

9.1.3. NU7026

NU7026 is a competitive and highly selective inhibitor of DNA-PK. Importantly, it shows no activity against ATM and ATR and has a 60-fold selectivity towards DNA-PK compared to PI3K [251]. It has been shown that NU7026 potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. [252]. NU7026 enhances the growth inhibition of chemotherapeutic agents such as idarubicin, daunorubicin, doxorubicin, etoposide, amsacrine, mitoxantrone but does not potentiate the effects of camptothecin or cytosine arabinoside. However, considering the pharmacokinetics of this compound, Nutley et al. suggested that sufficient exposure time and concentrations could not be achievable in patients for its therapeutic use in synergy with radiation or chemotherapy. Hence, in spite of its high selectivity, NU7026 requires optimization for clinical use [253]. Lately, NU7026 has been shown to enhance the cytotoxic effect of irradiation gastric cancer cells. This heightened cytotoxicity was explained by an increase in DSB formation, resulting in G2/M cell arrest and possibly higher levels of apoptosis [254].

9.1.4. NU7441

NU7441 was designed from the LY294002 backbone with improved potency and similar promise to NU7026. In cultured cell lines, NU7441 showed strong inhibition of DNA-PK, caused persisting doxorubicin- and IR-induced DSBs, and resulted in a modest increase in HR activity [255]. NU7441 has also been shown to increase the cytotoxicity of IR and etoposide in SW620, LoVo, and V3-YAC colon cancer cells but not in DNA-PKcs-deficient V3 cells, showing the specificity of the inhibitor for DNA-PK [256]. In xenograft colon cancer models,

NU7441 was maintained at concentrations necessary for chemopotential in vitro for at least 4 h at non-toxic doses. Finally, etoposide-induced tumour growth delay was increased two-fold without enhancing toxicity. NU7441 was further found to radiosensitize human leukaemic MOLT-4 cells, with the authors proposing that NU7441 could be a platform for the development of new radiosensitizers in radiotherapy [257]. More recently, it has been shown that NU7441 markedly sensitizes Hep3B cells to the anti-proliferative effects of harmine, a naturally occurring alkaloid with HR suppression ability that induces DSBs through the inhibition of RAD51 recruitment. Interestingly, this suggested that targeting NHEJ and HR could be used as a new synthetic lethal approach in anti-cancer treatment [258]. Furthermore, it has been shown that NU7441 (and NU7026) could dramatically enhance WAY-600 (a potent mTOR inhibitor) cytotoxic and pro-apoptotic effect against colorectal cancer cells [259].

9.1.5. KU-0060648

KU-0060648 was investigated in a panel of human breast (MCF7, T47D and MDA-MB-231) and colon (LoVo and SW620) cancer cells. This compound inhibits cellular DNA-PK auto-phosphorylation and PI3K-mediated AKT phosphorylation [260]. Hence, KU-0060648 is a potent dual inhibitor of DNA-PK and PI3K, which inhibits cell growth and enhances the cytotoxicity of topoisomerase II poisons in a cell line-dependent manner. KU-0060648 showed good oral bioavailability and pharmacokinetics. Recently, a study showed that KU-0060648 (and NU7441 previously described) can improve the Cas9-mediated genome editing [261].

9.1.6. ICOS Compounds

The ICOS Corporation (The name Icos comes from icosahedron, a twenty-sided polygon—a shape common to many viruses) small molecule library has been used to identify compounds inhibiting the DNA-PK-dependent phosphorylation of a p53 peptide substrate [262]. The first molecule identified was the moderately potent kinase inhibitor IC60211, an arylmorpholine. Optimization of this compound resulted in many DNA-PK selective inhibitors that maintained the arylmorpholine structure, none of which were cytotoxic at concentrations of <50 μ M. IC86621, a methyl ketone derivative of IC60211, was not the most active compound. However, it was a suitable, easily synthesized, and chemically stable representative of this inhibitor class. IC86621 was structurally very simple and demonstrated no activity against a panel of distantly related protein kinases or against closely related protein kinases, including ATM and ATR. However, the drug has activity against the closely related PI3K. Surprisingly, IC86621 reduced spontaneous HR but also HR induced by the I-SceI nuclease [263]. The compound did not

induce fusions in Ku70 knock-out mouse cells, suggesting it requires the holoenzyme to be effective [264]. IC86621 inhibition of DNA-PKcs prevents chromosomal end protection through mechanism reminiscent of dominant-negative reduction in DNA-PKcs activity. [265].

IC87361 is the most highly evolved morpholino-flavonoid and is 50-fold more selective for DNA-PK than for the PI3K catalytic subunit p110 β . At least 4 h exposure to a 10 μ M concentration of IC87361 was required for radiosensitization. It presents a rapid clearance from circulation and low bioavailability which usually are the major barriers to the clinical use of these compounds [266]. IC486241 is an inhibitor studied by Davidson et al. in 2012. The authors showed that treatment of three breast cancer cell lines (MCF7, BT-20 and MDA-MB-436) with doxorubicin or cisplatin in combination with the DNA-PKcs inhibitor IC486241 synergized the cytotoxic effects of these drugs [267]. Davidson et al. showed that Irinotecan and IC486241 synergized in the killing of colon cancer cells [268].

9.1.7. OK-1035

Kinetic studies have first indicated that OK-1035 was an inhibitor of DNA-PK activity in an ATP-competitive manner [269]. Functionally, OK-1035 has been shown to affect p53 activity in cells following DNA damage [270] and to inhibit DNA repair in radioresistant L5178Y cells [271]. However, no information concerning effects on PI3K-kinase activity or DSB repair was reported. Stockley et al. also found that OK-1035 is a weaker inhibitor of DNA-PK than initially reported [272]. Furthermore, this compound displayed weak pharmacokinetic properties, making it unsuitable for further clinical development.

9.1.8. SU11752

SU11752 is an ATP-competitive drug that can cause inhibition of DNA-PK activity [273]. SU11752 was shown to lack the required potency for in vivo trials; hence, no studies have since been published using this particular inhibitor. Nonetheless, the authors suggested that SU11752 could be used to develop a new class of specific DNA-PK inhibitors.

9.1.9. Vanillin

Several natural plant-derived compounds, including vanillin, cinnamaldehyde, coumarin, umbelliferone, anisaldehyde and tannic acid, are known to possess moderate antimutagenic properties. They also sensitize cancer cells to the lethal effects of DNA-damaging agents [274]. Particularly, the phenolic aldehyde vanillin, derived from a species of vanilla pods, has also

been shown to inhibit DNA-PK. Following IR of human ovarian carcinoma cells, vanillin specifically affected NHEJ and was selective for DNA-PK over ATM and ATR [275]. Hence, through their specific action, vanillin-based molecules could be further used to investigate DNA-PK and NHEJ implication in DSB repair. Recently, vanillin was utilized to inhibit the aberrant activation of centrosomal DNA-PK in the absence of SF-1 (a tissue-specific transcription factor expressed mainly in the adrenal glands and gonads), which reversed a cascade of centrosomal events leading to genomic instability [276]. The potentially beneficial impact of vanillin-based molecules in the prevention of genomic instability and cancer could also be of interest.

9.1.10. NK314

NK314 is characterized as an anti-tumour agent possessing activity against topoisomerase II alpha (TOPOII) [277,278,279]. Interestingly, its dual molecular targeting properties have first been discovered in 2011, Hisatomi et al. showed that NK314 could induce the degradation of DNA-PKcs in adult T-cell leukemia-lymphoma cell lines, causing impaired DNA DSB repair [280]. The mechanism by which this drug inhibits DNA-PK remains unclear. NK314 is currently in clinical trials for the treatment of ATL, due to its impressive activities in preclinical models, illustrating the potential for using DNA-PK inhibitors in the clinic.

9.1.11. CC-115

CC-115 is an improved ATP-competitive molecule developed from the mTOR kinase inhibitor CC-223 [281]. CC-115 is hence a dual inhibitor for DNA-PKcs and mTOR and the first clinical trial are undergoing to assess its safety and action in patients with advanced solid tumours and hematologic malignancies that are unresponsive to standard therapies.

9.2. Nucleotide-Based Inhibitors of DNA-PK

This class of inhibitors is a secondary type of drugs that few have focused on, despite their potentially great clinical efficacy as DNA-PK inhibitors. Indeed, the biological nature of these molecules could allow them to overcome the poor solubility and short serum half-lives of inhibitors previously discussed.

GRN163L

GRN163L (Imetelstat), is a 13-mer oligonucleotide initially developed as a direct inhibitor of the telomerase active site. In 2013, Shawi and colleagues showed that GRN163L inhibits DNA-PK phosphorylation and increases H2AX phosphorylation following treatment with the nucleotide analog fludarabine in CLL lymphocytes [282]. Inhibition of DNA-PK by GRN163L has also been found to be equivalent that observed with the use of NU7026. Together these observations indicate that GRN 163L, in addition to inhibiting telomerase activity, enhances chemotherapy through DNA-PK inhibition and impaired DNA damage repair. Whether GRN163L can be efficiently used in synergy with other DNA damaging therapies remains to be shown. However, from this time, studies have been focused on its use as a telomerase inhibitor.

9.3. Ku70/Ku80 Inhibitors

It has been shown that Ku70/80 levels are increased in a number of tumours suggesting that tumour survival may rely on these proteins. Recently, it has been shown that up-regulation of Ku70 expression in renal carcinoma cell line (786-O) could inhibit cell apoptosis and reduce susceptibility to radiation. Conversely, deletion of Ku70 induces cell apoptosis and significantly enhanced the sensitivity to radiation [283]. These observations suggest that Ku70/Ku80 may be a potential target for inhibition in cancer therapy in the future, although to date, specific inhibitors against Ku70/Ku80 have not been identified.

9.4. DNA Ligase IV Inhibitors

DNA ligase IV is the ATP-dependent DNA ligase that catalyzes the ligation step in NHEJ. Inhibiting the activity of DNA ligase IV is viewed as another approach to increase the sensitization of cancer cells to DNA damage (Skeletal representation in Figure S7).

9.4.1. L189

Chen and colleagues used a computer-aided drug design, from a database of 1.5 million commercially available low molecular weight chemicals, in order to identify compounds predicted to bind to a DNA binding pocket within the DNA binding domain of DNA ligase I, thereby inhibiting DNA end-joining. It was found that 10 of 192 candidates specifically inhibited purified human DNA ligase I with some affinity for DNA ligase III. Of interest, L189 used in in vitro DNA joining assays showed inhibitory activity against DNA ligase I, III, and

IV. L189 increased the cytotoxicity of MMS and IR in three cancer cell lines (breast, cervical, and colon) but not in a normal breast epithelial cell line. Hence, this suggests that L189 could be used as a potential compound for the development of treatments [284]. However, in vivo data and clinical trials are required to confirm the efficacy of this inhibitor.

9.4.2. SCR7

SCR7 is a L189 derivative that was identified as a specific inhibitor of DNA ligase IV [285]. SCR7 inhibits end-joining of DSB by blocking ligase IV-mediated joining. SCR7 interferes specifically with ligase IV DNA binding, but not that of T4 DNA ligase or ligase I. Through its ligase IV-dependent inhibition of NHEJ, SCR7 has been shown to activate the intrinsic apoptotic pathway in cells and disrupt tumour progression in mouse models. SCR7 can also significantly enhance sensitivity of DSB-inducing agents (IR and etoposide) administered in combination. This NHEJ inhibitor offers therefore a great strategy toward the treatment of cancer and improvement of existing therapeutic agents.

9.5. XRCC4 Inhibitors

XRCC4 may function as an additional NHEJ scaffolding protein, responsible for the recruitment of other NHEJ factors to the site of the damage. XRCC4, in complex with ligase IV, is implicated in the NHEJ ligation step.

Salvianolic Acid B, Lithospermic Acid, and 2-O-Feruloyl Tartaric Acid

In 2011, Sun et al. screened a traditional Chinese medicine (TCM) database, TCM Database@Taiwan, and have identified three XRCC4 potent inhibitors [286]. Salvianolic acid B, lithospermic acid, and 2-O-feruloyl tartaric acid all bind to the DNA ligase IV binding region on XRCC4 (structures depicted in Figure S7). As potential enhancers of radiotherapy, the use and efficacy of these inhibitors require further assessment in vitro and in in vivo models. To date, no inhibitor targeting XRCC4 has been described in vivo and in clinical trials.

9.6. Alt-NHEJ Inhibitors

In a recent analysis of clinical samples from chronic myeloid leukemia (CML) patients, 50% of bone marrow mononuclear cells from patients with imatinib-resistant disease, as well as all patients in blast crisis, presented elevated levels of 2 Alt-NHEJ proteins, DNA ligase III α and PARP1, that correlated with hypersensitivity to the combination of DNA ligase and PARP

inhibitors [287]. This suggested that increased dependence upon Alt-NHEJ can be identified and targeted in a significant fraction of CML patients having acquired resistance to the first line therapy and exhausted treatment options available. The Alt-NHEJ targeting strategy is likely to extend to a wide range of solid tumours, as there is evidence that this abnormality in DSB repair may also occur in a significant fraction of cell lines derived from different solid tumours [284], in particular from breast cancer with acquired or intrinsic resistance to anti-estrogens [288].

10. Conclusions

Cancer remains one of the most lethal diseases worldwide. In order to advance the management of this disease, we must identify agents that improve survival rates. Several of the DDR inhibitors we reviewed here have demonstrated potential to specifically and effectively eliminate cancer cells by DSB damage potentiation. While some require further *in vitro* and *in vivo* testing, for instance RAD51 inhibitors, other have advanced to clinical trials or are on the verge to do so. Among these, PARP inhibitors have shown therapeutic merit whether it is as a monotherapy or in combination with cytotoxic agents, with olaparib being the furthest progressed into clinical development and recently FDA-approved for use in women with BRCA-associated ovarian cancer. Promise for PARP inhibitors as a single agent also extends beyond BRCA cancers, as they have shown to be effective in sporadic tumours bearing no germline BRCA mutations, including high-grade serous ovarian cancers and triple-negative breast cancers [289] as well as in tumours with defects in other HR proteins. For instance, Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) is a protein which also shares a synthetic lethal interaction with PARP [290,291]. ATM is frequently altered or deleted in several types of human cancers [292,293,294,295], in particular in haematological cancers [296,297]. Recent pre-clinical [298,299] and clinical studies [300] explored the applicability of olaparib synthetic lethality to cancers with disrupted ATM protein expression, specifically gastric cancer and mantle cell lymphoma (MCL). All studies demonstrated the powerful effect of olaparib synthetic lethality in MCL [298] and gastric [299] cancer cells with improvement in patients overall survival. It was also shown that the combination of PARP and ATM inhibitors has potential against ATM-proficient gastric cancer with p53 inactivation. These findings raise the prospect of targeting other p53-deficient cancers with the combined use of ATM and PARP inhibitors, and the possibility of a predictive biomarker for PARP-1 inhibitor activity in cancers harbouring a p53 disruption. PARPi are also effective in cells depleted for RAD51, RPA, RAD54, NSB1, MRE11, ATR, ATM, Chk1, and Chk2 [160]. However, more studies are required to optimize current clinical settings and combinations in which to administer olaparib.

Moreover, the implementation of PARP inhibitors faces considerable limitations in that not all BRCA1/2 breast cancer patients have shown a response to PARP inhibition [156] and resistance can occur [301], emphasizing the need for new therapeutic alternatives.

The clinical development of NHEJ inhibitors and more specifically DNA-PKcs inhibitors falls behind, in comparison to the rapid clinical evaluation of PARP1 inhibitors. As mentioned above, a great number of agents with DNA-PKcs-inhibiting properties have been developed and pre-clinically characterized. Unfortunately, only CC-115 is currently being evaluated in a phase I trial (NCT01353625). The potential for combining DNA-PK activity with chemotherapeutics is clearly a strategy to cancer treatment. In particular, with the appropriate dose and delivery, DNA-PK inhibitors could be combined with HR inhibitors in a synthetic lethal strategy for cancer treatment. Recently, a novel synthetic lethal strategy was highlighted using Alt-NHEJ and HR (Figure 4). Depletion of polymerase theta and the BRCA genes has a synergistic effect on cell survival and represent a valid therapeutic avenue for tumours carrying mutations in homology-directed repair genes [302]. Altogether, several inhibitors described here have true potential for clinical use.

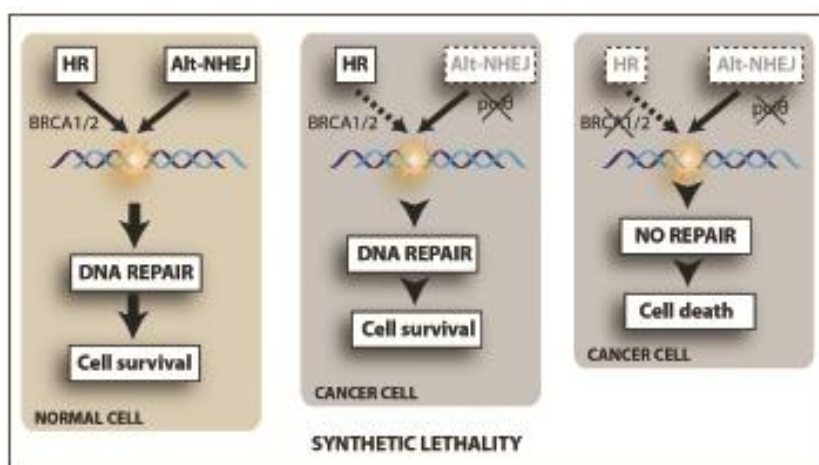


Figure 4. The synthetic lethality pathway model based on a deficiency in Alt-NHEJ and the double-strand break repair pathway.

In normal cells, DSBs are repaired by homologous recombination or alternative non-homologous end joining (through polymerase theta). In cancer cells, one of these two repair pathways can be deficient. The inhibition of HR and polymerase theta leads to an accumulation of damage and cell death.

Acknowledgments

We thank Isabelle Brodeur for critically reviewing the manuscript and Sébastien Fortin (CHU de Québec) for discussions. Anthony M. Couturier is a Luc Bélanger scholar from the Centre de Recherche en Cancer de l'Université Laval. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Guy G. Poirier; Jean-Yves Masson) and by Ligue Cancer 44 (Fabrice Fleury; Denis Velic). Chemical structures were depicted using ACD/ChemSketch from ACD/Labs.

Author Contributions

Denis Velic, Anthony M. Couturier, Maria Tedim Ferreira, Amélie Rodrigue, Guy G. Poirier, Fabrice Fleury, and Jean-Yves Masson wrote the manuscript. Anthony M. Couturier and Denis Velic designed the figures.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ciccia, A.; Elledge, S.J. The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 179–204.
2. Jackson, S.P.; Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **2009**, *461*, 1071–1078.
3. Savitsky, K.; Sfez, S.; Tagle, D.A.; Ziv, Y.; Sarti, A.; Collins, F.S.; Shiloh, Y.; Rotman, G. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Mol. Genet.* **1995**, *4*, 2025–2032.
4. Shiloh, Y. Ataxia telangiectasia and the nijmegen breakage syndrome: Related disorders but genes apart. *Annu. Rev. Genet.* **1997**, *31*, 635–662.
5. Bentley, N.J.; Holtzman, D.A.; Flaggs, G.; Keegan, K.S.; DeMaggio, A.; Ford, J.C.; Hoekstra, M.; Carr, A.M. The schizosaccharomyces pombe Rad3 checkpoint gene. *EMBO J.* **1996**, *15*, 6641–6651.
6. Cortez, D.; Guntuku, S.; Qin, J.; Elledge, S.J. ATR and ATRIP: Partners in checkpoint signaling. *Science* **2001**, *294*, 1713–1716.
7. San Filippo, J.; Sung, P.; Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Ann. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 229–257.
8. de Klein, A.; Muijtjens, M.; van Os, R.; Verhoeven, Y.; Smit, B.; Carr, A.M.; Lehmann, A.R.; Hoeijmakers, J.H. Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 479–482.

9. Brown, E.J.; Baltimore, D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 397–402.
10. O'Driscoll, M.; Ruiz-Perez, V.L.; Woods, C.G.; Jeggo, P.A.; Goodship, J.A. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in seckel syndrome. *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 497–501.
11. Marechal, A.; Zou, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2013**.
12. Cortez, D. Unwind and slow down: Checkpoint activation by helicase and polymerase uncoupling. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1007–1012.
13. Cimprich, K.A.; Cortez, D. Atr: An essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2008**, *9*, 616–627.
14. Sarkaria, J.N.; Busby, E.C.; Tibbetts, R.S.; Roos, P.; Taya, Y.; Karnitz, L.M.; Abraham, R.T. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4375–4382.
15. Cliby, W.A.; Roberts, C.J.; Cimprich, K.A.; Stringer, C.M.; Lamb, J.R.; Schreiber, S.L.; Friend, S.H. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J.* **1998**, *17*, 159–169.
16. Mukhopadhyay, U.K.; Senderowicz, A.M.; Ferbeyre, G. Rna silencing of checkpoint regulators sensitizes p53-defective prostate cancer cells to chemotherapy while sparing normal cells. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 2872–2881.
17. Cliby, W.A.; Lewis, K.A.; Lilly, K.K.; Kaufmann, S.H. S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 1599–1606.
18. Won, J.; Kim, M.; Kim, N.; Ahn, J.H.; Lee, W.G.; Kim, S.S.; Chang, K.Y.; Yi, Y.W.; Kim, T.K. Retraction: Small molecule-based reversible reprogramming of cellular lifespan. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 431.
19. Abraham, R.T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 2177–2196.
20. Price, B.D.; Youmell, M.B. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 246–250.
21. Sarkaria, J.N.; Tibbetts, R.S.; Busby, E.C.; Kennedy, A.P.; Hill, D.E.; Abraham, R.T. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4375–4382.
22. Blasina, A.; Price, B.D.; Turenne, G.A.; McGowan, C.H. Caffeine inhibits the checkpoint kinase atm. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 1135–1138.
23. Tsabar, M.; Eapen, V.V.; Mason, J.M.; Memisoglu, G.; Waterman, D.P.; Long, M.J.; Bishop, D.K.; Haber, J.E. Caffeine impairs resection during DNA break repair by reducing the levels of nucleases Sae2 and Dna2. *Nucleic Acids Res.* **2015**.
24. Newton, R.; Broughton, L.J.; Lind, M.J.; Morrison, P.J.; Rogers, H.J.; Bradbrook, I.D. Plasma and salivary pharmacokinetics of caffeine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1981**, *21*, 45–52.
25. Karve, S.; Werner, M.E.; Sukumar, R.; Cummings, N.D.; Copp, J.A.; Wang, E.C.; Li, C.; Sethi, M.; Chen, R.C.; Pacold, M.E.; et al. Revival of the abandoned therapeutic wortmannin by nanoparticle drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8230–8235.
26. Vlahos, C.J.; Matter, W.F.; Hui, K.Y.; Brown, R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4h-1-benzopyran-4-one (ly294002). *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5241–5248.

27. Hall-Jackson, C.A.; Cross, D.A.; Morrice, N.; Smythe, C. Atr is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK. *Oncogene* **1999**, *18*, 6707–6713.
28. Hammond, E.M.; Denko, N.C.; Dorie, M.J.; Abraham, R.T.; Giaccia, A.J. Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 1834–1843.
29. Goodarzi, A.A.; Lees-Miller, S.P. Biochemical characterization of the ataxia-telangiectasia mutated (atm) protein from human cells. *DNA repair* **2004**, *3*, 753–767.
30. Stiff, T.; O'Driscoll, M.; Rief, N.; Iwabuchi, K.; Löbrich, M.; Jeggo, P.A. Atm and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2390–2396.
31. Cleary, J.M.; Shapiro, G.I. Development of phosphoinositide-3 kinase pathway inhibitors for advanced cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **2010**, *12*, 87–94.
32. Gharbi, S.I.; Zvelebil, M.J.; Shuttleworth, S.J.; Hancox, T.; Saghir, N.; Timms, J.F.; Waterfield, M.D. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem. J.* **2007**, *404*, 15–21.
33. Liu, Q.; Wang, J.; Kang, S.A.; Thoreen, C.C.; Hur, W.; Ahmed, T.; Sabatini, D.M.; Gray, N.S. Discovery of 9-(6-aminopyridin-3-yl)-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1h)-one (torin2) as a potent, selective and orally available mtor inhibitor for treatment of cancer. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1473–1480.
34. Liu, Q.; Xu, C.; Kirubakaran, S.; Zhang, X.; Hur, W.; Liu, Y.; Kwiatkowski, N.P.; Wang, J.; Westover, K.D.; Gao, P.; et al. Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM and ATR. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 2574–2586.
35. Hickson, I.; Zhao, Y.; Richardson, C.J.; Green, S.J.; Martin, N.M.B.; Orr, A.I.; Reaper, P.M.; Jackson, S.P.; Curtin, N.J.; Smith, G.C.M. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 9152–9159.
36. Weber, A.M.; Ryan, A.J. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *149*, 124–138.
37. Golding, S.E.; Rosenberg, E.; Valerie, N.; Hussaini, I.; Frigerio, M.; Cockcroft, X.F.; Chong, W.Y.; Hummersone, M.; Rigoreau, L.; Menear, K.A.; et al. Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 2894–2902.
38. Crescenzi, E.; Palumbo, G.; de Boer, J.; Brady, H.J.M. Ataxia telangiectasia mutated and P21CIP1 modulate cell survival of drug-induced senescent tumor cells: Implications for chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1877–1887.
39. Eaton, J.S.; Lin, Z.P.; Sartorelli, A.C.; Bonawitz, N.D.; Shadel, G.S. Ataxia-telangiectasia mutated kinase regulates ribonucleotide reductase and mitochondrial homeostasis. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 2723–2734.
40. Zhang, T.; Shen, Y.; Chen, Y.; Hsieh, J.T.; Kong, Z. The atm inhibitor KU55933 sensitizes radioresistant bladder cancer cells with dab2ip gene defect. *Int. J. Radiat. Biol.* **2015**, *91*, 368–378.
41. Toulany, M.; Mihatsch, J.; Holler, M.; Chaachouay, H.; Rodemann, H.P. Cisplatin-mediated radiosensitization of non-small cell lung cancer cells is stimulated by ATM inhibition. *Radiother. Oncol.* **2014**, *111*, 228–236.
42. Vecchio, D.; Daga, A.; Carra, E.; Marubbi, D.; Raso, A.; Mascelli, S.; Nozza, P.; Garrè, M.L.; Pitto, F.; Ravetti, J.L.; et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy on pediatric tumors of the glioma radiosensitizer ku60019. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 1445–1457.

43. Biddlestone-Thorpe, L.; Sajjad, M.; Rosenberg, E.; Beckta, J.M.; Valerie, N.C.K.; Tokarz, M.; Adams, B.R.; Wagner, A.F.; Khalil, A.; Gilfor, D.; et al. ATM kinase inhibition preferentially sensitizes p53-mutant glioma to ionizing radiation. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 3189–3200.
44. McCabe, N.; Hanna, C.; Walker, S.M.; Gonda, D.; Li, J.; Wikstrom, K.; Savage, K.I.; Butterworth, K.T.; Chen, C.; Harkin, D.P.; et al. Mechanistic rationale to target PTEN-deficient tumor cells with inhibitors of the DNA damage response kinase ATM. *Cancer Res.* **2015**.
45. Zhu, Y.; Mao, C.; Wu, J.; Li, S.; Ma, R.; Cao, H.; Ji, M.; Jing, C.; Tang, J. Improved ataxia telangiectasia mutated kinase inhibitor KU60019 provides a promising treatment strategy for non-invasive breast cancer. *Oncology Lett.* **2014**, *8*, 2043–2048.
46. Batey, M.A.; Zhao, Y.; Kyle, S.; Richardson, C.; Slade, A.; Martin, N.M.; Lau, A.; Newell, D.R.; Curtin, N.J. Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, KU59403, in vitro and in vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 959–967.
47. Rainey, M.D.; Charlton, M.E.; Stanton, R.V.; Kastan, M.B. Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 7466–7474.
48. Węsierska-Gądek, J.; Heinzl, S. Interactions between ataxia telangiectasia mutated kinase inhibition, poly(adp-ribose) polymerase-1 inhibition and brca1 status in breast cancer cells. *J. Cancer Prev.* **2014**, *19*, 125–136.
49. Nishida, H.; Tatewaki, N.; Nakajima, Y.; Magara, T.; Ko, K.M.; Hamamori, Y.; Konishi, T. Inhibition of ATR protein kinase activity by schisandrin b in DNA damage response. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5678–5689.
50. Tatewaki, N.; Nishida, H.; Yoshida, M.; Ando, H.; Kondo, S.; Sakamaki, T.; Konishi, T. Differential effect of schisandrin b stereoisomers on ATR-mediated DNA damage checkpoint signaling. *J. Pharmacol. Sci.* **2013**, *122*, 138–148.
51. Li, L.; Lu, Q.; Shen, Y.; Hu, X. Schisandrin b enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 584–595.
52. Xu, Y.; Liu, Z.; Sun, J.; Pan, Q.; Sun, F.; Yan, Z.; Hu, X. Schisandrin B prevents doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity and enhances its anticancer activity in vivo. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28335.
53. Hou, W.; Gao, W.; Wang, D.; Liu, Q.; Zheng, S.; Wang, Y. The protecting effect of deoxyschisandrin and schisandrin b on HaCat cells against UVB-induced damage. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127177.
54. Peasland, A.; Wang, L.Z.; Rowling, E.; Kyle, S.; Chen, T.; Hopkins, A.; Cliby, W.A.; Sarkaria, J.; Beale, G.; Edmondson, R.J.; et al. Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 372–381.
55. Sultana, R.; Abdel-Fatah, T.; Perry, C.; Moseley, P.; Albarakti, N.; Mohan, V.; Seedhouse, C.; Chan, S.; Madhusudan, S. Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related (ATR) protein kinase inhibition is synthetically lethal in XRCC1 deficient ovarian cancer cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57098.
56. Knight, Z.A.; Gonzalez, B.; Feldman, M.E.; Zunder, E.R.; Goldenberg, D.D.; Williams, O.; Loewith, R.; Stokoe, D.; Balla, A.; Toth, B.; et al. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling. *Cell* **2006**, *125*, 733–747.

57. Jang, N.Y.; Kim, D.H.; Cho, B.J.; Choi, E.J.; Lee, J.S.; Wu, H.G.; Chie, E.K.; Kim, I.A. Radiosensitization with combined use of olaparib and PI-103 in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 89.
58. Toledo, L.I.; Murga, M.; Zur, R.; Soria, R.; Rodriguez, A.; Martinez, S.; Oyarzabal, J.; Pastor, J.; Bischoff, J.R.; Fernandez-Capetillo, O. A cell-based screen identifies Atr inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 721–727.
59. Maira, S.M.; Stauffer, F.; Brueggen, J.; Furet, P.; Schnell, C.; Fritsch, C.; Brachmann, S.; Chene, P.; de Pover, A.; Schoemaker, K.; et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 1851–1863.
60. Matsushima, M.; Kikuchi, E.; Matsumoto, K.; Hattori, S.; Takeda, T.; Kosaka, T.; Miyajima, A.; Oya, M. Intravesical dual PI3K/mTOR complex 1/2 inhibitor NVP-BEZ235 therapy in an orthotopic bladder cancer model. *Int. J. Oncol.* **2015**, *47*, 377–383.
61. Echeverry, N.; Ziltener, G.; Barbone, D.; Weder, W.; Stahel, R.A.; Broaddus, V.C.; Felley-Bosco, E. Inhibition of autophagy sensitizes malignant pleural mesothelioma cells to dual PI3K/mTOR inhibitors. *Cell Death Dis.* **2015**.
62. Schrauwen, S.; Depreeuw, J.; Coenegrachts, L.; Hermans, E.; Lambrechts, D.; Amant, F. Dual blockade of PI3K/AKT/mTOR (NVP-BEZ235) and Ras/Raf/MEK (AZD6244) pathways synergistically inhibit growth of primary endometrioid endometrial carcinoma cultures, whereas NVP-BEZ235 reduces tumor growth in the corresponding xenograft models. *Gynecol. Oncol.* **2015**, *138*, 165–173.
63. Konstantinidou, G.; Bey, E.A.; Rabellino, A.; Schuster, K.; Maira, M.S.; Gazdar, A.F.; Amici, A.; Boothman, D.A.; Scaglioni, P.P. Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin blockade is an effective radiosensitizing strategy for the treatment of non-small cell lung cancer harboring K-RAS mutations. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7644–7652.
64. Charrier, J.D.; Durrant, S.J.; Golec, J.M.; Kay, D.P.; Knegt, R.M.; McCormick, S.; Mortimore, M.; O'Donnell, M.E.; Pinder, J.L.; Reaper, P.M.; et al. Discovery of potent and selective inhibitors of ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related (ATR) protein kinase as potential anticancer agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2320–2330.
65. Reaper, P.M.; Griffiths, M.R.; Long, J.M.; Charrier, J.-D.; McCormick, S.; Charlton, P.A.; Golec, J.M.C.; Pollard, J.R. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 428–430.
66. Pires, I.M.; Olcina, M.M.; Anbalagan, S.; Pollard, J.R.; Reaper, P.M.; Charlton, P.A.; McKenna, W.G.; Hammond, E.M. Targeting radiation-resistant hypoxic tumour cells through ATR inhibition. *Br. J. Cancer* **2012**, *107*, 291–299.
67. Prevo, R.; Fokas, E.; Reaper, P.M.; Charlton, P.A.; Pollard, J.R.; McKenna, W.G.; Muschel, R.J.; Brunner, T.B. The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 1072–1081.
68. Huntoon, C.J.; Flatten, K.S.; Wahner Hendrickson, A.E.; Huehls, A.M.; Sutor, S.L.; Kaufmann, S.H.; Karnitz, L.M. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3683–3691.
69. Fokas, E.; Prevo, R.; Pollard, J.R.; Reaper, P.M.; Charlton, P.A.; Cornelissen, B.; Vallis, K.A.; Hammond, E.M.; Olcina, M.M.; Gillies McKenna, W.; et al. Targeting

- ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death Dis.* **2012**.
70. Hall, A.B.; Newsome, D.; Wang, Y.; Boucher, D.M.; Eustace, B.; Gu, Y.; Hare, B.; Johnson, M.A.; Li, H.; Milton, S.; et al. Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970. *Oncotarget* **2014**, 5, 5674–5685.
 71. Nakahara, T.; Tanaka, K.; Ohno, S.I.; Egawa, N.; Yugawa, T.; Kiyono, T. Activation of NF- κ B by human papillomavirus 16 E1 limits E1-dependent viral replication through degradation of E1. *J. Vir.* **2015**, 89, 5040–5059.
 72. Foote, K.M.; Blades, K.; Cronin, A.; Fillery, S.; Guichard, S.S.; Hassall, L.; Hickson, I.; Jacq, X.; Jewsbury, P.J.; McGuire, T.M.; et al. Discovery of 4-{4-[(3r)-3-methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl)cyclopropyl]pyrimidin-2-yl}-1h-indole (az20): A potent and selective inhibitor of ATR protein kinase with monotherapy in vivo antitumor activity. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 2125–2138.
 73. Clack, G.; Lau, A.; Pierce, A.; Smith, S.; Stephens, C. O6.3 ATR inhibitor AZD6738. *Ann. Oncol.* **2015**.
 74. Rhind, N.; Russell, P. Chk1 and cds1: Linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *J. Cell Sci.* **2000**, 113, 3889–3896.
 75. Xu, N.; Libertini, S.; Black, E.J.; Lao, Y.; Hegarat, N.; Walker, M.; Gillespie, D.A. Cdk-mediated phosphorylation of Chk1 is required for efficient activation and full checkpoint proficiency in response to DNA damage. *Oncogene* **2012**, 31, 1086–1094.
 76. Goto, H.; Kasahara, K.; Inagaki, M. Novel insights into Chk1 regulation by phosphorylation. *Cell Struct. Funct.* **2015**, 40, 43–50.
 77. Goto, H.; Izawa, I.; Li, P.; Inagaki, M. Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Sci.* **2012**, 103, 1195–1200.
 78. Merry, C.; Fu, K.; Wang, J.; Yeh, I.J.; Zhang, Y. Targeting the checkpoint kinase Chk1 in cancer therapy. *Cell Cycle* **2010**, 9, 279–283.
 79. Walker, M.; Black, E.J.; Oehler, V.; Gillespie, D.A.; Scott, M.T. Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity. *Oncogene* **2009**, 28, 2314–2323.
 80. Smits, V.A.; Reaper, P.M.; Jackson, S.P. Rapid pikk-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr. Biol.* **2006**, 16, 150–159.
 81. Bryant, C.; Rawlinson, R.; Massey, A.J. Chk1 inhibition as a novel therapeutic strategy for treating triple-negative breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* **2014**.
 82. Sorensen, C.S.; Hansen, L.T.; Dziegielewska, J.; Syljuasen, R.G.; Lundin, C.; Bartek, J.; Helleday, T. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* **2005**, 7, 195–201.
 83. Morgan, M.A.; Parsels, L.A.; Zhao, L.; Parsels, J.D.; Davis, M.A.; Hassan, M.C.; Arumugarajah, S.; Hylander-Gans, L.; Morosini, D.; Simeone, D.M.; et al. Mechanism of radiosensitization by the chk1/2 inhibitor azd7762 involves abrogation of the G2 checkpoint and inhibition of homologous recombinational DNA repair. *Cancer Res.* **2010**, 70, 4972–4981.
 84. Wei, Y.; Yu, L.; Bowen, J.; Gorovsky, M.A.; Allis, C.D. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **1999**, 97, 99–109.
 85. Chen, Z.; Xiao, Z.; Gu, W.Z.; Xue, J.; Bui, M.H.; Kovar, P.; Li, G.; Wang, G.; Tao, Z.F.; Tong, Y.; et al. Selective Chk1 inhibitors differentially sensitize p53-deficient cancer cells to cancer therapeutics. *Int. J. Cancer* **2006**, 119, 2784–2794.

86. Chen, Z.; Xiao, Z.; Chen, J.; Ng, S.C.; Sowin, T.; Sham, H.; Rosenberg, S.; Fesik, S.; Zhang, H. Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 543–548.
87. Benada, J.; Macurek, L. Targeting the checkpoint to kill cancer cells. *Biomolecules* **2015**, *5*, 1912–1937.
88. Sarmento, L.M.; Pova, V.; Nascimento, R.; Real, G.; Antunes, I.; Martins, L.R.; Moita, C.; Alves, P.M.; Abecasis, M.; Moita, L.F.; et al. Chk1 overexpression in T-cell acute lymphoblastic leukemia is essential for proliferation and survival by preventing excessive replication stress. *Oncogene* **2015**, *34*, 2978–2990.
89. Grabauskienė, S.; Bergeron, E.J.; Chen, G.; Thomas, D.G.; Giordano, T.J.; Beer, D.G.; Morgan, M.A.; Reddy, R.M. Checkpoint kinase 1 protein expression indicates sensitization to therapy by checkpoint kinase 1 inhibition in non-small cell lung cancer. *J. Surg. Res.* **2014**, *187*, 6–13.
90. Zhang, Y.; Hunter, T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1013–1023.
91. Curtin, N.J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 801–817.
92. Daud, A.I.; Ashworth, M.T.; Strosberg, J.; Goldman, J.W.; Mendelson, D.; Springett, G.; Venook, A.P.; Loechner, S.; Rosen, L.S.; Shanahan, F.; et al. Phase I dose-escalation trial of checkpoint kinase 1 inhibitor MK-8776 as Monotherapy and in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1060–1066.
93. Garrett, M.D.; Collins, I. Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: What, where and when? *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 308–316.
94. Prudhomme, M. Novel checkpoint 1 inhibitors. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2006**, *1*, 55–68.
95. Wang, Q.; Fan, S.; Eastman, A.; Worland, P.J.; Sausville, E.A.; O'Connor, P.M. Ucn-01: A potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 956–965.
96. Welch, S.; Hirte, H.W.; Carey, M.S.; Hotte, S.J.; Tsao, M.S.; Brown, S.; Pond, G.R.; Dancey, J.E.; Oza, A.M. Ucn-01 in combination with topotecan in patients with advanced recurrent ovarian cancer: A study of the princess margaret hospital phase II consortium. *Gynecol. Oncol.* **2007**, *106*, 305–310.
97. Li, T.; Christensen, S.D.; Frankel, P.H.; Margolin, K.A.; Agarwala, S.S.; Luu, T.; Mack, P.C.; Lara, P.N., Jr.; Gandara, D.R. 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*, 741–748.
98. Guzi, T.J.; Paruch, K.; Dwyer, M.P.; Labroli, M.; Shanahan, F.; Davis, N.; Taricani, L.; Wiswell, D.; Seghezzi, W.; Penafior, E.; et al. Targeting the replication checkpoint using sch 900776, a potent and functionally selective Chk1 inhibitor identified via high content screening. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 591–602.
99. Engelke, C.G.; Parsels, L.A.; Qian, Y.; Zhang, Q.; Karnak, D.; Robertson, J.R.; Tanska, D.M.; Wei, D.; Davis, M.A.; Parsels, J.D.; et al. Sensitization of pancreatic cancer to chemoradiation by the Chk1 inhibitor MK8776. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4412–4421.
100. Grabauskienė, S.; Bergeron, E.J.; Chen, G.; Chang, A.C.; Lin, J.; Thomas, D.G.; Giordano, T.J.; Beer, D.G.; Morgan, M.A.; Reddy, R.M. Chk1 levels correlate with sensitization to pemetrexed by Chk1 inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* **2013**, *82*, 477–484.

101. Chernikova, S.B.; Game, J.C.; Brown, J.M. Inhibiting homologous recombination for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 61–68.
102. Venkatesha, V.A.; Parsels, L.A.; Parsels, J.D.; Zhao, L.; Zabloudoff, S.D.; Simeone, D.M.; Maybaum, J.; Lawrence, T.S.; Morgan, M.A. Sensitization of pancreatic cancer stem cells to gemcitabine by Chk1 inhibition. *Neoplasia* **2012**, *14*, 519–525.
103. Hermann, P.C.; Huber, S.L.; Herrler, T.; Aicher, A.; Ellwart, J.W.; Guba, M.; Bruns, C.J.; Heeschen, C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 313–323.
104. Landau, H.J.; McNeely, S.C.; Nair, J.S.; Comenzo, R.L.; Asai, T.; Friedman, H.; Jhanwar, S.C.; Nimer, S.D.; Schwartz, G.K. The checkpoint kinase inhibitor AZD7762 potentiates chemotherapy-induced apoptosis of p53-mutated multiple myeloma cells. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 1781–1788.
105. Kim, M.K.; James, J.; Annunziata, C.M. Topotecan synergizes with chek1 (Chk1) inhibitor to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *BMC Cancer* **2015**.
106. Network., C.G.A.R. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **2011**, *474*, 609–615.
107. King, C.; Diaz, H.; Barnard, D.; Barda, D.; Clawson, D.; Blosser, W.; Cox, K.; Guo, S.; Marshall, M. Characterization and preclinical development of LY2603618: A selective and potent Chk1 inhibitor. *Invest. New Drugs* **2014**, *32*, 213–226.
108. Calvo, E.; Chen, V.J.; Marshall, M.; Ohnmacht, U.; Hynes, S.M.; Kumm, E.; Diaz, H.B.; Barnard, D.; Merzoug, F.F.; Huber, L.; et al. Preclinical analyses and phase I evaluation of LY2603618 administered in combination with pemetrexed and cisplatin in patients with advanced cancer. *Invest. New Drugs* **2014**, *32*, 955–968.
109. Carrassa, L.; Damia, G. Unleashing Chk1 in cancer therapy. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 2121–2128.
110. Matsuoka, S.; Huang, M.; Elledge, S.J. Linkage of atm to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **1998**, *282*, 1893–1897.
111. Ahn, J.; Urist, M.; Prives, C. The Chk2 protein kinase. *DNA repair* **2004**, *3*, 1039–1047.
112. Kass, E.M.; Ahn, J.; Tanaka, T.; Freed-Pastor, W.A.; Keezer, S.; Prives, C. Stability of checkpoint kinase 2 is regulated via phosphorylation at serine 456. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30311–30321.
113. Lovly, C.M.; Yan, L.; Ryan, C.E.; Takada, S.; Piwnica-Worms, H. Regulation of Chk2 ubiquitination and signaling through autophosphorylation of serine 379. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 5874–5885.
114. Wang, B.; Matsuoka, S.; Carpenter, P.B.; Elledge, S.J. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* **2002**, *298*, 1435–1438.
115. Lou, Z.; Minter-Dykhouse, K.; Wu, X.; Chen, J. Mdc1 is coupled to activated Chk2 in mammalian DNA damage response pathways. *Nature* **2003**, *421*, 957–961.
116. Mochan, T.A.; Venere, M.; DiTullio, R.A.; Halazonetis, T.D. 53BP1 and NFB1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 8586–8591.
117. Lou, Z.; Minter-Dykhouse, K.; Franco, S.; Gostissa, M.; Rivera, M.A.; Celeste, A.; Manis, J.P.; van Deursen, J.; Nussenzweig, A.; Paull, T.T.; et al. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 187–200.

118. Minter-Dykhouse, K.; Ward, I.; Huen, M.S.Y.; Chen, J.; Lou, Z. Distinct versus overlapping functions of MDC1 and 53BP1 in DNA damage response and tumorigenesis. *J. Cell Biol.* **2008**, 181, 727–735.
119. Blasina, A.; de Weyer, I.V.; Laus, M.C.; Luyten, W.H.; Parker, A.E.; McGowan, C.H. A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr. Biol.* **1999**, 9, 1–10.
120. Bahassi, E.M.; Ovesen, J.L.; Riesenbergh, A.L.; Bernstein, W.Z.; Hasty, P.E.; Stambrook, P.J. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene* **2008**, 27, 3977–3985.
121. Zhang, J.; Willers, H.; Feng, Z.; Ghosh, J.C.; Kim, S.; Weaver, D.T.; Chung, J.H.; Powell, S.N.; Xia, F. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell Biol.* **2004**, 24, 708–718.
122. Lountos, G.T.; Jobson, A.G.; Tropea, J.E.; Self, C.R.; Zhang, G.; Pommier, Y.; Shoemaker, R.H.; Waugh, D.S. Structural characterization of inhibitor complexes with checkpoint kinase 2 (Chk2), a drug target for cancer therapy. *J. Struct. Biol.* **2011**, 176, 292–301.
123. Pommier, Y.; Weinstein, J.N.; Aladjem, M.I.; Kohn, K.W. Chk2 molecular interaction map and rationale for Chk2 inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 2657–2661.
124. Hirao, A.; Kong, Y.Y.; Matsuoka, S.; Wakeham, A.; Ruland, J.; Yoshida, H.; Liu, D.; Elledge, S.J.; Mak, T.W. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **2000**, 287, 1824–1827.
125. Jobson, A.G.; Cardellina, J.H.; Scudiero, D.; Kondapaka, S.; Zhang, H.; Kim, H.; Shoemaker, R.; Pommier, Y. Identification of a bis-guanylhydrazone [4,4'-diacetyldiphenylurea-bis(guanylhydrazone); NSC 109555] as a novel chemotype for inhibition of Chk2 kinase. *Mol. Pharmacol.* **2007**, 72, 876–884.
126. Lountos, G.T.; Tropea, J.E.; Zhang, D.; Jobson, A.G.; Pommier, Y.; Shoemaker, R.H.; Waugh, D.S. Crystal structure of checkpoint kinase 2 in complex with NSC 109555, a potent and selective inhibitor. *Protein Sci.* **2009**, 18, 92–100.
127. Jobson, A.G.; Lountos, G.T.; Lorenzi, P.L.; Llamas, J.; Connelly, J.; Cerna, D.; Tropea, J.E.; Onda, A.; Zoppoli, G.; Kondapaka, S.; et al. Cellular inhibition of checkpoint kinase 2 (Chk2) and potentiation of camptothecins and radiation by the novel Chk2 inhibitor PV1019 [7-nitro-1h-indole-2-carboxylic acid {4-[1-(guanidinohydrazone)-ethyl]-phenyl}-amide]. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2009**, 331, 816–826.
128. Caldwell, J.J.; Welsh, E.J.; Matijssen, C.; Anderson, V.E.; Antoni, L.; Boxall, K.; Urban, F.; Hayes, A.; Raynaud, F.I.; Rigoreau, L.J.M.; et al. Structure-based design of potent and selective 2-(quinazolin-2-yl)phenol inhibitors of checkpoint kinase 2. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 580–590.
129. Anderson, V.E.; Walton, M.I.; Eve, P.D.; Boxall, K.J.; Antoni, L.; Caldwell, J.J.; Aherne, W.; Pearl, L.H.; Oliver, A.W.; Collins, I.; et al. CCT241533 is a potent and selective inhibitor of Chk2 that potentiates the cytotoxicity of PARP inhibitors. *Cancer Res.* **2011**, 71, 463–472.
130. Arienti, K.L.; Brunmark, A.; Axe, F.U.; McClure, K.; Lee, A.; Blevitt, J.; Neff, D.K.; Huang, L.; Crawford, S.; Pandit, C.R.; et al. Checkpoint kinase inhibitors: Sar and radioprotective properties of a series of 2-arylbenzimidazoles. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1873–1885.
131. Matijssen, C.; Silva-Santisteban, M.C.; Westwood, I.M.; Siddique, S.; Choi, V.; Sheldrake, P.; van Montfort, R.L.M.; Blagg, J. Benzimidazole inhibitors of the

- protein kinase Chk2: Clarification of the binding mode by flexible side chain docking and protein-ligand crystallography. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 6630–6639.
132. Curman, D.; Cinel, B.; Williams, D.E.; Rundle, N.; Block, W.D.; Goodarzi, A.A.; Hutchins, J.R.; Clarke, P.R.; Zhou, B.B.; Lees-Miller, S.P.; et al. Inhibition of the g2 DNA damage checkpoint and of protein kinases Chk1 and Chk2 by the marine sponge alkaloid debromohymenialdisine. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 17914–17919.
 133. Oliver, A.W.; Paul, A.; Boxall, K.J.; Barrie, S.E.; Aherne, G.W.; Garrett, M.D.; Mitnacht, S.; Pearl, L.H. Trans-activation of the DNA-damage signalling protein kinase Chk2 by t-loop exchange. *EMBO J.* **2006**, 25, 3179–3190.
 134. Sharma, V.; Tepe, J.J. Potent inhibition of checkpoint kinase activity by a hymenialdisine-derived indoloazepine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4319–4321.
 135. Nguyen, T.N.T.; Saleem, R.S.Z.; Luderer, M.J.; Hovde, S.; Henry, R.W.; Tepe, J.J. Radioprotection by hymenialdisine-derived checkpoint kinase 2 inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 172–184.
 136. Saleem, R.S.Z.; Lansdell, T.A.; Tepe, J.J. Synthesis and evaluation of debromohymenialdisine-derived Chk2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 1475–1481.
 137. Larson, G.; Yan, S.; Chen, H.; Rong, F.; Hong, Z.; Wu, J.Z. Identification of novel, selective and potent Chk2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 172–175.
 138. Carlessi, L.; Buscemi, G.; Larson, G.; Hong, Z.; Wu, J.Z.; Delia, D. Biochemical and cellular characterization of VRX0466617, a novel and selective inhibitor for the checkpoint kinase Chk2. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, 6, 935–944.
 139. Yu, Q.; La Rose, J.; Zhang, H.; Takemura, H.; Kohn, K.W.; Pommier, Y. Ucn-01 inhibits p53 up-regulation and abrogates gamma-radiation-induced g(2)-m checkpoint independently of p53 by targeting both of the checkpoint kinases, Chk2 and Chk1. *Cancer Res.* **2002**, 62, 5743–5748.
 140. Zabłudoff, S.D.; Deng, C.; Grondine, M.R.; Sheehy, A.M.; Ashwell, S.; Caleb, B.L.; Green, S.; Haye, H.R.; Horn, C.L.; Janetka, J.W.; et al. AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7, 2955–2966.
 141. Matthews, D.J.; Yakes, F.M.; Chen, J.; Tadano, M.; Bornheim, L.; Clary, D.O.; Tai, A.; Wagner, J.M.; Miller, N.; Kim, Y.D.; et al. Pharmacological abrogation of s-phase checkpoint enhances the anti-tumor activity of gemcitabine in vivo. *Cell cycle* **2007**, 6, 104–110.
 142. Ame, J.C.; Spenlehauer, C.; de Murcia, G. The parp superfamily. *BioEssays* **2004**, 26, 882–893.
 143. Otto, H.; Reche, P.A.; Bazan, F.; Dittmar, K.; Haag, F.; Koch-Nolte, F. In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC Genomics* **2005**.
 144. Tartier, L.; Spenlehauer, C.; Newman, H.C.; Folkard, M.; Prise, K.M.; Michael, B.D.; Menissier-de Murcia, J.; de Murcia, G. Local DNA damage by proton microbeam irradiation induces poly(adp-ribose) synthesis in mammalian cells. *Mutagenesis* **2003**, 18, 411–416.
 145. Malanga, M.; Althaus, F.R. The role of poly(adp-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem. Cell Biol.* **2005**, 83, 354–364.
 146. Curtin, N.J.; Szabo, C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *JMAM* **2013**, 34, 1217–1256.

147. Ekblad, T.; Camaioni, E.; Schuler, H.; Macchiarulo, A. Parp inhibitors: Polypharmacology versus selective inhibition. *FEBS J.* **2013**, 280, 3563–3575.
148. Lupo, B.; Trusolino, L. Inhibition of poly(adp-ribosyl)ation in cancer: Old and new paradigms revisited. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1846, 201–215.
149. Kummar, S.; Chen, A.; Parchment, R.E.; Kinders, R.J.; Ji, J.; Tomaszewski, J.E.; Doroshow, J.H. Advances in using parp inhibitors to treat cancer. *BMC Medicine* **2012**.
150. Rouleau, M.; Patel, A.; Hendzel, M.J.; Kaufmann, S.H.; Poirier, G.G. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, 10, 293–301.
151. Farmer, H.; McCabe, N.; Lord, C.J.; Tutt, A.N.J.; Johnson, D.A.; Richardson, T.B.; Santarosa, M.; Dillon, K.J.; Hickson, I.; Knights, C.; et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **2005**, 434, 917–921.
152. Bryant, H.E.; Schultz, N.; Thomas, H.D.; Parker, K.M.; Flower, D.; Lopez, E.; Kyle, S.; Meuth, M.; Curtin, N.J.; Helleday, T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(adp-ribose) polymerase. *Nature* **2005**, 434, 913–917.
153. Tutt, A.N.; Lord, C.J.; McCabe, N.; Farmer, H.; Turner, N.; Martin, N.M.; Jackson, S.P.; Smith, G.C.; Ashworth, A. Exploiting the DNA repair defect in BRCA mutant cells in the design of new therapeutic strategies for cancer. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2005**, 70, 139–148.
154. Petermann, E.; Orta, M.L.; Issaeva, N.; Schultz, N.; Helleday, T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different Rad51-mediated pathways for restart and repair. *Mol. Cell* **2010**, 37, 492–502.
155. Schlacher, K.; Christ, N.; Siaud, N.; Egashira, A.; Wu, H.; Jasins, M. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by Mre11. *Cell* **2011**, 145, 529–542.
156. Fong, P.C.; Boss, D.S.; Yap, T.A.; Tutt, A.; Wu, P.; Mergui-Roelvink, M.; Mortimer, P.; Swaisland, H.; Lau, A.; O'Connor, M.J.; et al. Inhibition of poly(adp-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* **2009**, 361, 123–134.
157. Tutt, A.; Robson, M.; Garber, J.E.; Domchek, S.M.; Audeh, M.W.; Weitzel, J.N.; Friedlander, M.; Arun, B.; Loman, N.; Schmutzler, R.K.; et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: A proof-of-concept trial. *Lancet* **2010**, 376, 235–244.
158. Audeh, M.W.; Carmichael, J.; Penson, R.T.; Friedlander, M.; Powell, B.; Bell-McGuinn, K.M.; Scott, C.; Weitzel, J.N.; Oaknin, A.; Loman, N.; et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: A proof-of-concept trial. *Lancet* **2010**, 376, 245–251.
159. Turner, N.; Tutt, A.; Ashworth, A. Hallmarks of “brcaness” in sporadic cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 4, 814–819.
160. McCabe, N.; Turner, N.C.; Lord, C.J.; Kluzek, K.; Bialkowska, A.; Swift, S.; Giavara, S.; O'Connor, M.J.; Tutt, A.N.; Zdzienicka, M.Z.; et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.* **2006**, 66, 8109–8115.
161. Peng, G.; Lin, S.Y. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World J. Clin. Oncol.* **2011**, 2, 73–79.
162. Turner, N.C.; Ashworth, A. Biomarkers of PARP inhibitor sensitivity. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, 127, 283–286.

163. Yap, T.A.; Sandhu, S.K.; Carden, C.P.; de Bono, J.S. Poly(Adp-Ribose) polymerase (PARP) inhibitors: Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 31–49.
164. Ferraris, D.V. Evolution of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. From concept to clinic. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4561–4584.
165. Davar, D.; Beumer, J.H.; Hamieh, L.; Tawbi, H. Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3907–3921.
166. Kopetz, S.; Mita, M.M.; Mok, I.; Sankhala, K.K.; Moseley, J.; Sherman, B.M.; Bradley, C.R.; Tolcher, A.W. First in human phase I study of BSI-201, a small molecule inhibitor of poly ADP-Ribose polymerase (PARP) in subjects with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3577.
167. Kaufman, B.; Shapira-Frommer, R.; Schmutzler, R.K.; Audeh, M.W.; Friedlander, M.; Balmaña, J.; Mitchell, G.; Fried, G.; Stemmer, S.M.; Hubert, A.; et al. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germ-line BRCA1/2 mutation: An open-label phase II study. *J. Clin. Oncol.* **2013**.
168. Mendes-Pereira, A.M.; Martin, S.A.; Brough, R.; McCarthy, A.; Taylor, J.R.; Kim, J.S.; Waldman, T.; Lord, C.J.; Ashworth, A. Synthetic lethal targeting of pten mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 315–322.
169. Forster, M.D.; Dedes, K.J.; Sandhu, S.; Frentzas, S.; Kristeleit, R.; Ashworth, A.; Poole, C.J.; Weigelt, B.; Kaye, S.B.; Molife, L.R. Treatment with olaparib in a patient with pten-deficient endometrioid endometrial cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 302–306.
170. Dedes, K.J.; Wetterskog, D.; Mendes-Pereira, A.M.; Natrajan, R.; Lambros, M.B.; Geyer, F.C.; Vatcheva, R.; Savage, K.; Mackay, A.; Lord, C.J.; et al. PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors. *Sci. Transl. Med.* **2010**.
171. Hunt, C.R.; Gupta, A.; Horikoshi, N.; Pandita, T.K. Does pten loss impair DNA double-strand break repair by homologous recombination? *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 920–922.
172. Fraser, M.; Zhao, H.; Luoto, K.R.; Lundin, C.; Coackley, C.; Chan, N.; Joshua, A.M.; Bismar, T.A.; Evans, A.; Helleday, T.; et al. PTEN deletion in prostate cancer cells does not associate with loss of Rad51 function: Implications for radiotherapy and chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 1015–1027.
173. Minami, D.; Takigawa, N.; Takeda, H.; Takata, M.; Ochi, N.; Ichihara, E.; Hisamoto, A.; Hotta, K.; Tanimoto, M.; Kiura, K. Synergistic effect of olaparib with combination of cisplatin on PTEN-deficient lung cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **2013**, *11*, 140–148.
174. Faraoni, I.; Compagnone, M.; Lavorgna, S.; Angelini, D.F.; Cencioni, M.T.; Piras, E.; Panetta, P.; Ottone, T.; Dolci, S.; Venditti, A.; et al. BRCA1, PARP1 and γ H2AX in acute myeloid leukemia: Role as biomarkers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1852*, 462–472.
175. Ajimura, M.; Leem, S.H.; Ogawa, H. Identification of new genes required for meiotic recombination in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **1993**, *133*, 51–66.
176. Parry, J.M.; Davies, P.J.; Evans, W.E. The effects of “cell age” upon the lethal effects of physical and chemical mutagens in the yeast, *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **1976**, *146*, 27–35.
177. Carney, J.P.; Maser, R.S.; Olivares, H.; Davis, E.M.; Le Beau, M.; Yates, J.R.; Hays, L.; Morgan, W.F.; Petrini, J.H. The hMre11/hRad50 protein complex and nijmegen breakage syndrome: Linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **1998**, *93*, 477–486.

178. Stewart, G.S.; Maser, R.S.; Stankovic, T.; Bressan, D.A.; Kaplan, M.I.; Jaspers, N.G.; Raams, A.; Byrd, P.J.; Petrini, J.H.; Taylor, A.M. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* **1999**, *99*, 577–587.
179. Waltes, R.; Kalb, R.; Gatei, M.; Kijas, A.W.; Stumm, M.; Soback, A.; Wieland, B.; Varon, R.; Lerenthal, Y.; Lavin, M.F.; et al. Human Rad50 deficiency in a nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **2009**, *84*, 605–616.
180. Xiao, Y.; Weaver, D.T. Conditional gene targeted deletion by cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair MRE11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2985–2991.
181. Luo, G.; Yao, M.S.; Bender, C.F.; Mills, M.; Bladl, A.R.; Bradley, A.; Petrini, J.H. Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7376–7381.
182. Zhu, J.; Petersen, S.; Tessarollo, L.; Nussenzweig, A. Targeted disruption of the nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 105–109.
183. Williams, R.S.; Moncalian, G.; Williams, J.S.; Yamada, Y.; Limbo, O.; Shin, D.S.; Grocock, L.M.; Cahill, D.; Hitomi, C.; Guenther, G.; et al. Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell* **2008**, *135*, 97–109.
184. Dery, U.; Coulombe, Y.; Rodrigue, A.; Stasiak, A.; Richard, S.; Masson, J.Y. A glycine-arginine domain in control of the human MRE11 DNA repair protein. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 3058–3069.
185. De Jager, M.; Dronkert, M.L.; Modesti, M.; Beerens, C.E.; Kanaar, R.; van Gent, D.C. DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: Implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1317–1325.
186. Paull, T.T.; Gellert, M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* **1998**, *1*, 969–979.
187. Paull, T.T.; Gellert, M. NBS1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1276–1288.
188. De Jager, M.; van Noort, J.; van Gent, D.C.; Dekker, C.; Kanaar, R.; Wyman, C. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 1129–1135.
189. Williams, R.S.; Dodson, G.E.; Limbo, O.; Yamada, Y.; Williams, J.S.; Guenther, G.; Classen, S.; Glover, J.N.M.; Iwasaki, H.; Russell, P.; et al. Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. *Cell* **2009**, *139*, 87–99.
190. Chapman, J.R.; Jackson, S.P. Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the Mrn complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 795–801.
191. Wang, H.; Shi, L.Z.; Wong, C.C.; Han, X.; Hwang, P.Y.; Truong, L.N.; Zhu, Q.; Shao, Z.; Chen, D.J.; Berns, M.W.; et al. The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003277.
192. Kobayashi, J.; Tauchi, H.; Sakamoto, S.; Nakamura, A.; Morishima, K.; Matsuura, S.; Kobayashi, T.; Tamai, K.; Tanimoto, K.; Komatsu, K. NBS1 localizes to

- γ -H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr. Biol.* **2002**, 12, 1846–1851.
193. Paull, T.T. Making the best of the loose ends: Mre11/Rad50 complexes and Sae2 promote DNA double-strand break resection. *DNA repair* **2010**, 9, 1283–1291.
 194. Lee, J.H.; Paull, T.T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **2005**, 308, 551–554.
 195. Ferretti, L.P.; Lafranchi, L.; Sartori, A.A. Controlling DNA-end resection: A new task for CDKs. *Front. Genet.* **2013**.
 196. Shibata, A.; Moiani, D.; Arvai, A.S.; Perry, J.; Harding, S.M.; Genois, M.M.; Maity, R.; van Rossum-Fikkert, S.; Kertokallio, A.; Romoli, F.; et al. DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct Mre11 nuclease activities. *Mol. Cell* **2014**, 53, 7–18.
 197. Dupré, A.; Boyer-Chatenet, L.; Sattler, R.M.; Modi, A.P.; Lee, J.-H.; Nicolette, M.L.; Kopelovich, L.; Jasin, M.; Baer, R.; Paull, T.T.; et al. A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 119–125.
 198. Rass, E.; Grabarz, A.; Plo, I.; Gautier, J.; Bertrand, P.; Lopez, B.S. Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 819–824.
 199. Tsuzuki, T.; Fujii, Y.; Sakumi, K.; Tominaga, Y.; Nakao, K.; Sekiguchi, M.; Matsushiro, A.; Yoshimura, Y.; Morita, T. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6236–6240.
 200. Baumann, P.; Benson, F.E.; West, S.C. Human rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* **1996**, 87, 757–766.
 201. Buisson, R.; Dion-Cote, A.M.; Coulombe, Y.; Launay, H.; Cai, H.; Stasiak, A.Z.; Stasiak, A.; Xia, B.; Masson, J.Y. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, 17, 1247–1254.
 202. Davies, A.A.; Masson, J.Y.; McIlwraith, M.J.; Stasiak, A.Z.; Stasiak, A.; Venkitaraman, A.R.; West, S.C. Role of BRCA2 in control of the Rad51 recombination and DNA repair protein. *Mol. Cell* **2001**, 7, 273–282.
 203. Takata, M.; Sasaki, M.S.; Tachiiri, S.; Fukushima, T.; Sonoda, E.; Schild, D.; Thompson, L.H.; Takeda, S. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol. Cell Biol.* **2001**, 21, 2858–2866.
 204. Pellegrini, L.; Yu, D.S.; Lo, T.; Anand, S.; Lee, M.; Blundell, T.L.; Venkitaraman, A.R. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* **2002**, 420, 287–293.
 205. Aihara, H.; Ito, Y.; Kurumizaka, H.; Yokoyama, S.; Shibata, T. The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: Structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *J. Mol. Biol.* **1999**, 290, 495–504.
 206. Haaf, T.; Golub, E.I.; Reddy, G.; Radding, C.M.; Ward, D.C. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 2298–2302.
 207. Raderschall, E.; Stout, K.; Freier, S.; Suckow, V.; Schweiger, S.; Haaf, T. Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res.* **2002**, 62, 219–225.

208. Maacke, H.; Jost, K.; Opitz, S.; Miska, S.; Yuan, Y.; Hasselbach, L.; Lüttges, J.; Kalthoff, H.; Stürzbecher, H.W. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* **2000**, 19, 2791–2795.
209. Maacke, H.; Opitz, S.; Jost, K.; Hamdorf, W.; Henning, W.; Krüger, S.; Feller, A.C.; Lopens, A.; Diedrich, K.; Schwinger, E.; et al. Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int. J. Cancer* **2000**, 88, 907–913.
210. Mitra, A.; Jameson, C.; Barbachano, Y.; Sanchez, L.; Kote-Jarai, Z.; Peock, S.; Sodha, N.; Bancroft, E.; Fletcher, A.; Cooper, C.; et al. Overexpression of Rad51 occurs in aggressive prostatic cancer. *Histopathology* **2009**, 55, 696–704.
211. Takenaka, T.; Yoshino, I.; Kouso, H.; Ohba, T.; Yohena, T.; Osoegawa, A.; Shoji, F.; Maehara, Y. Combined evaluation of Rad51 and ERCC1 expressions for sensitivity to platinum agents in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* **2007**, 121, 895–900.
212. Henning, W.; Stürzbecher, H.W. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology* **2003**, 193, 91–109.
213. Vispe, S.; Cazaux, C.; Lesca, C.; Defais, M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 2859–2864.
214. Ito, M.; Yamamoto, S.; Nimura, K.; Hiraoka, K.; Tamai, K.; Kaneda, Y. Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. *J. Gene Med.* **2005**, 7, 1044–1052.
215. Kiyohara, E.; Tamai, K.; Katayama, I.; Kaneda, Y. The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma. *Gene Ther.* **2012**, 19, 734–741.
216. Macara, I.G.; Cantley, L.C. Mechanism of anion exchange across the red cell membrane by band 3: Interactions between stilbenedisulfonate and NAP-taurine binding sites. *Biochemistry* **1981**, 20, 5695–5701.
217. Ishida, T.; Takizawa, Y.; Kainuma, T.; Inoue, J.; Mikawa, T.; Shibata, T.; Suzuki, H.; Tashiro, S.; Kurumizaka, H. Dids, a chemical compound that inhibits Rad51-mediated homologous pairing and strand exchange. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 3367–3376.
218. Lamont, K.R.; Hasham, M.G.; Donghia, N.M.; Branca, J.; Chavaree, M.; Chase, B.; Breggia, A.; Hedlund, J.; Emery, I.; Cavallo, F.; et al. Attenuating homologous recombination stimulates an aid-induced antileukemic effect. *J. Exp. Med.* **2013**, 210, 1021–1033.
219. Hasham, M.G.; Donghia, N.M.; Coffey, E.; Maynard, J.; Snow, K.J.; Ames, J.; Wilpan, R.Y.; He, Y.; King, B.L.; Mills, K.D. Widespread genomic breaks generated by activation-induced cytidine deaminase are prevented by homologous recombination. *Nat. Immunol.* **2010**, 11, 820–826.
220. Takaku, M.; Kainuma, T.; Ishida-Takaku, T.; Ishigami, S.; Suzuki, H.; Tashiro, S.; van Soest, R.W.M.; Nakao, Y.; Kurumizaka, H. Halenaquinone, a chemical compound that specifically inhibits the secondary DNA binding of Rad51. *Genes cells* **2011**, 16, 427–436.
221. Huang, F.; Motlekar, N.A.; Burgwin, C.M.; Napper, A.D.; Diamond, S.L.; Mazin, A.V. Identification of specific inhibitors of human Rad51 recombinase using high-throughput screening. *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 628–635.

222. Huang, F.; Mazina, O.M.; Zentner, I.J.; Cocklin, S.; Mazin, A.V. Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting Rad51 recombinase. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3011–3020.
223. Huang, F.; Mazin, A.V. A small molecule inhibitor of human Rad51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100993.
224. Alagpulinsa, D.A.; Ayyadevara, S.; Shmookler Reis, R.J. A small-molecule inhibitor of Rad51 reduces homologous recombination and sensitizes multiple myeloma cells to doxorubicin. *Front. Oncol.* **2014**.
225. Budke, B.; Logan, H.L.; Kalin, J.H.; Zelivianskaia, A.S.; Cameron McGuire, W.; Miller, L.L.; Stark, J.M.; Kozikowski, A.P.; Bishop, D.K.; Connell, P.P. RI-1: A chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 7347–7357.
226. Bee, L.; Fabris, S.; Cherubini, R.; Mognato, M.; Celotti, L. The efficiency of homologous recombination and non-homologous end joining systems in repairing double-strand breaks during cell cycle progression. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69061.
227. Budke, B.; Kalin, J.H.; Pawlowski, M.; Zelivianskaia, A.S.; Wu, M.; Kozikowski, A.P.; Connell, P.P. An optimized Rad51 inhibitor that disrupts homologous recombination without requiring michael acceptor reactivity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 254–263.
228. Jensen, R.B.; Carreira, A.; Kowalczykowski, S.C. Purified human BRCA2 stimulates Rad51-mediated recombination. *Nature* **2010**, *467*, 678–683.
229. Zhu, J.; Zhou, L.; Wu, G.; Konig, H.; Lin, X.; Li, G.; Qiu, X.L.; Chen, C.F.; Hu, C.M.; Goldblatt, E.; et al. A novel small molecule Rad51 inactivator overcomes imatinib-resistance in chronic myeloid leukaemia. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 353–365.
230. Zhu, J.; Chen, H.; Guo, X.E.; Qiu, X.L.; Hu, C.M.; Chamberlin, A.R.; Lee, W.H. Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of novel Rad51 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 196–208.
231. Game, J.C.; Mortimer, R.K. A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res.* **1974**, *24*, 281–292.
232. Rijkers, T.; van Den Ouweland, J.; Morolli, B.; Rolink, A.G.; Baarends, W.M.; Van Sloun, P.P.; Lohman, P.H.; Pastink, A. Targeted inactivation of mouse Rad52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 6423–6429.
233. Van Dyck, E.; Stasiak, A.Z.; Stasiak, A.; West, S.C. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* **1999**, *398*, 728–731.
234. Baumann, P.; West, S.C. Heteroduplex formation by human Rad51 protein: Effects of DNA end-structure, hRP-A and hRad52. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 363–374.
235. Singleton, M.R.; Wentzell, L.M.; Liu, Y.; West, S.C.; Wigley, D.B. Structure of the single-strand annealing domain of human Rad52 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13492–13497.
236. Kagawa, W.; Kurumizaka, H.; Ishitani, R.; Fukai, S.; Nureki, O.; Shibata, T.; Yokoyama, S. Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 359–371.
237. Kagawa, W.; Kagawa, A.; Saito, K.; Ikawa, S.; Shibata, T.; Kurumizaka, H.; Yokoyama, S. Identification of a second DNA binding site in the human Rad52 protein. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 24264–24273.

238. Lieberman, R.; Xiong, D.; James, M.; Han, Y.; Amos, C.I.; Wang, L.; You, M. Functional characterization of RAD52 as a lung cancer susceptibility gene in the 12p13.33 locus. *Mol. Carcinogen.* **2015**.
239. Lok, B.H.; Carley, A.C.; Tchang, B.; Powell, S.N. RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination. *Oncogene* **2013**, 32, 3552–3558.
240. Feng, Z.; Scott, S.P.; Bussen, W.; Sharma, G.G.; Guo, G.; Pandita, T.K.; Powell, S.N. Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 686–691.
241. Grimme, J.M.; Spies, M. FRET-based assays to monitor DNA binding and annealing by Rad52 recombination mediator protein. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 745, 463–483.
242. Grimme, J.M.; Honda, M.; Wright, R.; Okuno, Y.; Rothenberg, E.; Mazin, A.V.; Ha, T.; Spies, M. Human Rad52 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing via two hRad52-ssDNA complexes. *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 2917–2930.
243. Mao, Z.; Bozzella, M.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair* **2008**, 7, 1765–1771.
244. Mao, Z.; Bozzella, M.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell cycle* **2008**, 7, 2902–2906.
245. Lieber, M.R.; Gu, J.; Lu, H.; Shimazaki, N.; Tsai, A.G. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell. Biochem.* **2010**, 50, 279–296.
246. Davidson, D.; Amrein, L.; Panasci, L.; Aloyz, R. Small molecules, inhibitors of DNA-PK, targeting DNA repair, and beyond. *Front. Pharmacol.* **2013**.
247. Wymann, M.P.; Bulgarelli-Leva, G.; Zvelebil, M.J.; Pirola, L.; Vanhaesebroeck, B.; Waterfield, M.D.; Panayotou, G. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of LYS-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 1722–1733.
248. Collis, S.J.; DeWeese, T.L.; Jeggo, P.A.; Parker, A.R. The life and death of DNA-PK. *Oncogene* **2004**, 24, 949–961.
249. Chen, H.; Zeng, X.; Gao, C.; Ming, P.; Zhang, J.; Guo, C.; Zhou, L.; Lu, Y.; Wang, L.; Huang, L.; et al. A new arylbenzofuran derivative functions as an anti-tumour agent by inducing DNA damage and inhibiting PARP activity. *Sci. Reports* **2015**.
250. Wennström, S.; Downward, J. Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of ras and mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19, 4279–4288.
251. Veuger, S.J.; Curtin, N.J.; Richardson, C.J.; Smith, G.C.M.; Durkacz, B.W. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-Ribose) polymerase-1. *Cancer Res.* **2003**, 63, 6008–6015.
252. Willmore, E.; de Caux, S.; Sunter, N.J.; Tilby, M.J.; Jackson, G.H.; Austin, C.A.; Durkacz, B.W. A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase ii poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* **2004**, 103, 4659–4665.

253. Nutley, B.P.; Smith, N.F.; Hayes, A.; Kelland, L.R.; Brunton, L.; Golding, B.T.; Smith, G.C.M.; Martin, N.M.B.; Workman, P.; Raynaud, F.I. Preclinical pharmacokinetics and metabolism of a novel prototype DNA-pk inhibitor nu7026. *Br. J. Cancer* **2005**, *93*, 1011–1018.
254. Niazi, M.T.; Mok, G.; Heravi, M.; Lee, L.; Vuong, T.; Aloyz, R.; Panasci, L.; Muanza, T. Effects of DNA-dependent protein kinase inhibition by NU7026 on dna repair and cell survival in irradiated gastric cancer cell line n87. *Curr. Oncol.* **2014**, *21*, 91–96.
255. Tavecchio, M.; Munck, J.; Cano, C.; Newell, D.; Curtin, N. Further characterisation of the cellular activity of the DNA-PK inhibitor, NU7441, reveals potential cross-talk with homologous recombination. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, *69*, 155–164.
256. Zhao, Y.; Thomas, H.D.; Batey, M.A.; Cowell, I.G.; Richardson, C.J.; Griffin, R.J.; Calvert, A.H.; Newell, D.R.; Smith, G.C.M.; Curtin, N.J. Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5354–5362.
257. Tichy, A.; Durisova, K.; Salovska, B.; Pejchal, J.; Zarybnicka, L.; Vavrova, J.; Dye, N.; Sinkorova, Z. Radio-sensitization of human leukaemic molt-4 cells by DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7441. *Radiat. Environ. Biophys.* **2014**, *53*, 83–92.
258. Zhang, L.; Zhang, F.; Zhang, W.; Chen, L.; Gao, N.; Men, Y.; Xu, X.; Jiang, Y. Harmine suppresses homologous recombination repair and inhibits proliferation of hepatoma cells. *Cancer Biol. Ther.* **2015**.
259. Wu, L.; Zhang, J.; Wu, H.; Han, E. DNA-PKcs interference sensitizes colorectal cancer cells to a mTOR kinase inhibitor WAY-600. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *466*, 547–553.
260. Munck, J.M.; Batey, M.A.; Zhao, Y.; Jenkins, H.; Richardson, C.J.; Cano, C.; Tavecchio, M.; Barbeau, J.; Bardos, J.; Cornell, L.; et al. Chemosensitisation of cancer cells by KU-0060648; a dual inhibitor of DNA-PK and PI-3K. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 1789–1798.
261. Robert, F.; Barbeau, M.; Éthier, S.; Dostie, J.; Pelletier, J. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Med.* **2015**, *7*, 1–11.
262. Kashishian, A.; Douangpanya, H.; Clark, D.; Schlachter, S.T.; Eary, C.T.; Schiro, J.G.; Huang, H.; Burgess, L.E.; Kesicki, E.A.; Halbrook, J. DNA-dependent protein kinase inhibitors as drug candidates for the treatment of cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 1257–1264.
263. Allen, C.; Halbrook, J.; Nickoloff, J.A. Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end Joining11NIH grant CA77693 to JAN. *Mol. Cancer Res.* **2003**, *1*, 913–920.
264. Bailey, S.M.; Brenneman, M.A.; Halbrook, J.; Nickoloff, J.A.; Ullrich, R.L.; Goodwin, E.H. The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres. *DNA Repair* **2004**, *3*, 225–233.
265. Yasaei, H.; Gozaly-Chianea, Y.; Slijepcevic, P. Analysis of telomere length and function in radiosensitive mouse and human cells in response to DNA-PKcs inhibition. *Genome Integr.* **2013**.
266. Shinohara, E.T.; Geng, L.; Tan, J.; Chen, H.; Shir, Y.; Edwards, E.; Halbrook, J.; Kesicki, E.A.; Kashishian, A.; Hallahan, D.E. DNA-dependent protein kinase is a molecular target for the development of noncytotoxic radiation-sensitizing drugs. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 4987–4992.

267. Davidson, D.; Grenier, J.; Martinez-Marignac, V.; Amrein, L.; Shawi, M.; Tokars, M.; Aloyz, R.; Panasci, L. Effects of the novel DNA dependent protein kinase inhibitor, IC486241, on the DNA damage response to doxorubicin and cisplatin in breast cancer cells. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 1736–1742.
268. Davidson, D.; Coulombe, Y.; Martinez-Marignac, V.; Amrein, L.; Grenier, J.; Hodgkinson, K.; Masson, J.Y.; Aloyz, R.; Panasci, L. Irinotecan and DNA-PKcs inhibitors synergize in killing of colon cancer cells. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 1248–1256.
269. Take, Y.; Kumano, M.; Hamano, Y.; Fukatsu, H.; Teraoka, H.; Nishimura, S.; Okuyama, A. OK-1035, a selective inhibitor of DNA-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 41–47.
270. Take, Y.; Kumano, M.; Teraoka, H.; Nishimura, S.; Okuyama, A. DNA-dependent protein kinase inhibitor (OK-1035) suppresses p21 expression in HCT116 cells containing wild-type p53 induced by adriamycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *221*, 207–212.
271. Kruszewski, M.; Wojewódzka, M.; Iwaneńko, T.; Szumiel, I.; Okuyama, A. Differential inhibitory effect of OK-1035 on DNA repair in L5178Y murine lymphoma sublines with functional or defective repair of double strand breaks. *Mut. Res.* **1998**, *409*, 31–36.
272. Stockley, M.; Clegg, W.; Fontana, G.; Golding, B.T.; Martin, N.; Rigoreau, L.J.M.; Smith, G.C.M.; Griffin, R.J. Synthesis, crystal structure determination, and biological properties of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor 3-cyano-6-hydrazonomethyl-5-(4-pyridyl)pyrid-[1h]-2-one (OK-1035). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2837–2841.
273. Ismail, I.H.; Martensson, S.; Moshinsky, D.; Rice, A.; Tang, C.; Howlett, A.; McMahon, G.; Hammarsten, O. SU11752 inhibits the DNA-dependent protein kinase and DNA double-strand break repair resulting in ionizing radiation sensitization. *Oncogene* **2003**, *23*, 873–882.
274. Ohta, T. Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Crit. Rev. Toxicol.* **1993**, *23*, 127–146.
275. Durant, S.; Karran, P. Vanillins—A novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucl. Acids Res.* **2003**, *31*, 5501–5512.
276. Wang, C.Y.; Lai, P.Y.; Chen, T.Y.; Chung, B.C. NR5A1 prevents centriole splitting by inhibiting centrosomal DNA-PK activation and β -catenin accumulation. *Cell Commun. Signal* **2014**.
277. Guo, L.; Liu, X.; Nishikawa, K.; Plunkett, W. Inhibition of topoisomerase II α and G2 cell cycle arrest by NK314, a novel benzo[c]phenanthridine currently in clinical trials. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 1501–1508.
278. Onda, T.; Toyoda, E.; Miyazaki, O.; Seno, C.; Kagaya, S.; Okamoto, K.; Nishikawa, K. NK314, a novel topoisomerase ii inhibitor, induces rapid DNA double-strand breaks and exhibits superior antitumor effects against tumors resistant to other topoisomerase ii inhibitors. *Cancer Lett.* **2008**, *259*, 99–110.
279. Toyoda, E.; Kagaya, S.; Cowell, I.G.; Kurosawa, A.; Kamoshita, K.; Nishikawa, K.; Iizumi, S.; Koyama, H.; Austin, C.A.; Adachi, N. NK314, a topoisomerase II inhibitor that specifically targets the α isoform. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 23711–23720.
280. Hisatomi, T.; Sueoka-Aragane, N.; Sato, A.; Tomimasu, R.; Ide, M.; Kurimasa, A.; Okamoto, K.; Kimura, S.; Sueoka, E. NK314 potentiates antitumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II α and DNA-dependent protein kinase. *Blood* **2011**, *117*, 3575–3584.

281. Mortensen, D.S.; Perrin-Ninkovic, S.M.; Shevlin, G.; Elsner, J.; Zhao, J.; Whitefield, B.; Tehrani, L.; Sapienza, J.; Riggs, J.R.; Parnes, J.S.; et al. Optimization of a series of triazole containing mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase inhibitors and the discovery of CC-115. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5599–5608.
282. Shawi, M.; Chu, T.W.; Martinez-Marignac, V.; Yu, Y.; Gryaznov, S.M.; Johnston, J.B.; Lees-Miller, S.P.; Assouline, S.E.; Autexier, C.; Aloyz, R. Telomerase contributes to fludarabine resistance in primary human leukemic lymphocytes. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70428.
283. Qi, D.; Hu, Y.; Zhang, Y.; Peng, T.; Ji, W. Effect of KU70 expression on radiosensitivity in renal carcinoma 786-O cells. *Cancer Cell Int.* **2014**, *14*, 1–6.
284. Chen, X.; Zhong, S.; Zhu, X.; Dziegielewska, B.; Ellenberger, T.; Wilson, G.M.; MacKerell, A.D.; Tomkinson, A.E. Rational design of human DNA ligase inhibitors that target cellular DNA replication and repair. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 3169–3177.
285. Srivastava, M.; Nambiar, M.; Sharma, S.; Karki, S.S.; Goldsmith, G.; Hegde, M.; Kumar, S.; Pandey, M.; Singh, R.K.; Ray, P.; et al. An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell* **2012**, *151*, 1474–1487.
286. Sun, M.F.; Chen, H.Y.; Tsai, F.J.; Liu, S.H.; Chen, C.Y.; Chen, C.Y.C. Search for novel remedies to augment radiation resistance of inhabitants of fukushima and chernobyl disasters: Identifying DNA repair protein XRCC4 inhibitors. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2011**, *29*, 325–337.
287. Tobin, L.A.; Robert, C.; Rapoport, A.P.; Gojo, I.; Baer, M.R.; Tomkinson, A.E.; Rassool, F.V. Targeting abnormal DNA double strand break repair in tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemias. *Oncogene* **2013**, *32*, 1784–1793.
288. Tobin, L.A.; Robert, C.; Nagaria, P.; Chumsri, S.; Twaddell, W.; Ioffe, O.B.; Greco, G.E.; Brodie, A.H.; Tomkinson, A.E.; Rassool, F.V. Targeting abnormal DNA repair in therapy-resistant breast cancers. *Mol. Cancer Res.* **2012**, *10*, 96–107.
289. Gelmon, K.A.; Tischkowitz, M.; Mackay, H.; Swenerton, K.; Robidoux, A.; Tonkin, K.; Hirte, H.; Huntsman, D.; Clemons, M.; Gilks, B.; et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: A phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol.* **2011**, *12*, 852–861.
290. Lord, C.J.; McDonald, S.; Swift, S.; Turner, N.C.; Ashworth, A. A high-throughput RNA interference screen for DNA repair determinants of PARP inhibitor sensitivity. *DNA repair* **2008**, *7*, 2010–2019.
291. Turner, N.C.; Lord, C.J.; Iorns, E.; Brough, R.; Swift, S.; Elliott, R.; Rayter, S.; Tutt, A.N.; Ashworth, A. A synthetic lethal sirna screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *EMBO J.* **2008**, *27*, 1368–1377.
292. Fang, Z.; Kozlov, S.; McKay, M.J.; Woods, R.; Birrell, G.; Sprung, C.N.; Murrell, D.F.; Wangoo, K.; Teng, L.; Kearsley, J.H.; et al. Low levels of ATM in breast cancer patients with clinical radiosensitivity. *Genome Integr.* **2010**.
293. Tommiska, J.; Bartkova, J.; Heinonen, M.; Hautala, L.; Kilpivaara, O.; Eerola, H.; Aittomaki, K.; Hofstetter, B.; Lukas, J.; von Smitten, K.; et al. The DNA damage signalling kinase ATM is aberrantly reduced or lost in BRCA1/BRCA2-deficient and ER/PR/ERBB2-triple-negative breast cancer. *Oncogene* **2008**, *27*, 2501–2506.
294. Kang, B.; Guo, R.F.; Tan, X.H.; Zhao, M.; Tang, Z.B.; Lu, Y.Y. Expression status of ataxia-telangiectasia-mutated gene correlated with prognosis in advanced gastric cancer. *Mutat. Res.* **2008**, *638*, 17–25.

295. Ding, L.; Getz, G.; Wheeler, D.A.; Mardis, E.R.; McLellan, M.D.; Cibulskis, K.; Sougnez, C.; Greulich, H.; Muzny, D.M.; Morgan, M.B.; et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **2008**, 455, 1069–1075.
296. Boulton, J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. *J. Clin. Pathol.* **2001**, 54, 512–516.
297. Schaffner, C.; Stilgenbauer, S.; Rappold, G.A.; Dohner, H.; Lichter, P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1999**, 94, 748–753.
298. Williamson, C.T.; Kubota, E.; Hamill, J.D.; Klimowicz, A.; Ye, R.; Muzik, H.; Dean, M.; Tu, L.; Gilley, D.; Magliocco, A.M.; et al. Enhanced cytotoxicity of PARP inhibition in mantle cell lymphoma harbouring mutations in both ATM and p53. *EMBO Mol. Med.* **2012**, 4, 515–527.
299. Kubota, E.; Williamson, C.T.; Ye, R.; Elegbede, A.; Peterson, L.; Lees-Miller, S.P.; Bebb, D.G. Low ATM protein expression and depletion of p53 correlates with olaparib sensitivity in gastric cancer cell lines. *Cell Cycle* **2014**, 13, 2129–2137.
300. Bang, Y.J.; Im, S.A.; Lee, K.W.; Cho, J.Y.; Song, E.K.; Lee, K.H.; Kim, Y.H.; Park, J.O.; Chun, H.G.; Zang, D.Y.; et al. Randomized, double-blind phase II trial with prospective classification by ATM protein level to evaluate the efficacy and tolerability of olaparib plus paclitaxel in patients with recurrent or metastatic gastric cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**.
301. Fojo, T.; Bates, S. Mechanisms of resistance to PARP inhibitors—Three and counting. *Cancer Discov.* **2013**, 3, 20–23.
302. Mateos-Gomez, P.A.; Gong, F.; Nair, N.; Miller, K.M.; Lazzerini-Denchi, E.; Sfeir, A. Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* **2015**, 518, 254–257.

Chapitre 3

Chapitre 3 – Investigation of the Interaction of RAD51 Inhibitor DIDS with Human and Bovine Serum Albumins. Optical Spectroscopy and IsoThermal Calorimetry Approaches.

(Manuscrit soumis à Journal of Molecular Biology)

Denis Velic^{1,4}, Sébastien Henry¹, Cathy Charlier¹, Milena Popova¹, Pierre Weigel¹, Jean-Yves Masson², Igor Nabiev^{3,4}, Fabrice Fleury^{1*}

¹ Team 3 DNA repair and IMPACT Platform, UFIP UMR-CNRS 6286, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France Université de Nantes, France.

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

³Laboratoire de Recherche en Nanosciences, LRN - EA4682, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France.

⁴Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31 Kashirskoe shosse, 115409 Moscow, Russian Federation.

*Corresponding email: fleury-f@univ-nantes.fr

Résumé : L'acide 4'-diisothiocyanostillbène-2,2'-disulfonique (DIDS) a été largement utilisé durant les 30 dernières années pour son effet inhibiteur sur les transporteurs et les canaux ioniques. Plus récemment, Ishida et collègues ont décrit un mécanisme potentiel par lequel le DIDS inhibe la liaison homologue et l'échange de brins médiés par RAD51, des processus essentiels de la réparation par Recombinaison Homologue. Ainsi, le DIDS agirait comme un révertant de la radio- et/ou chimio-résistance dans les cellules cancéreuses, qui sont les causes majeures d'échec durant les essais thérapeutiques. Des nouvelles molécules ciblant RAD51 ont été développées, dans l'optique d'une utilisation pour des applications médicales.

Dans ce contexte, nous avons essayé de déterminer le comportement du DIDS vis-à-vis des protéines du sang et du plasma, comme l'albumine sérique. Premièrement, nous avons analysé les effets de différents facteurs environnementaux comme la polarité du solvant, qui peut affecter la stabilité de la molécule. Deuxièmement, nous avons analysé les propriétés spectroscopiques du DIDS en présence de l'albumine sérique humaine ou bovine. L'absorption UV-visible, le dichroïsme circulaire, la spectroscopie de fluorescence et la calorimétrie isothermique ont été utilisés. Nous avons montré, pour la première fois, que le DIDS peut interagir avec chacune des deux albumines sériques. Nous avons aussi déterminé les caractéristiques de ces interactions. La comparaison avec plusieurs dérivés du DIDS nous a mené à identifier le groupement chimique essentiel de ce composé impliqué dans l'interaction. De plus, en utilisant une approche par compétition entre sites, nous avons montré que le site principal de liaison de la molécule est le sous-domaine IB de la protéine. Ces découvertes montrent que la liaison du DIDS aux albumines sériques peut changer l'équilibre entre les formes libre et liée du DIDS, affectant ainsi sa biodisponibilité et son efficacité vis-à-vis de la recombinaison RAD51.

Abstract: 4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) has been largely used during the last 30 years for its inhibitory effect on anion transporters and channels. More recently, Ishida and colleagues have described a possible mechanism by which DIDS inhibits RAD51-mediated homologous pairing and strand exchange, key processes in DNA repair by Homologous Recombination. Thus, DIDS could act as a potential revertant of radio- and/or chemo-resistance in cancer cells, which are the major causes of failure during therapeutic protocols. New drugs targeting RAD51 protein have since been developed with potential use for medical applications.

In this context, we attempted to determine the behavior of DIDS towards blood and plasma proteins such as serum albumins. Firstly, we analyzed the effects of several environmental factors such as solvent polarity, which may affect the stability of the molecule. Secondly, we analyzed the spectroscopic properties of DIDS in the presence of Human or Bovine Serum Albumin proteins. UV-visible absorption, Circular Dichroism, Fluorescence Spectroscopy and Isothermal Calorimetry were used. Here we show for the first time that DIDS can interact with both Serum Albumins. We have also determined the characteristics of these interactions. The comparison of several DIDS derivatives led us to identify the essential chemical moiety of this compound involved in the interaction. Moreover, by using site competition approaches we show that the main binding site for this molecule is in subdomain IB of the protein. These findings show that the binding of DIDS to serum albumin proteins may change the equilibrium between the free and bound DIDS forms, thereby affecting its bioavailability and efficiency against the RAD51 recombinase protein.

Investigation of the Interaction of RAD51 Inhibitor DIDS with Human and Bovine Serum Albumins. Optical Spectroscopy and IsoThermal Calorimetry Approaches.

Denis Velic^{1,4}, Sébastien Henry¹, Cathy Charlier¹, Milena Popova¹, Pierre Weigel¹, Jean-Yves Masson², Igor Nabiev^{3,4}, Fabrice Fleury^{1*}

¹ Team 3 DNA repair and IMPACT Platform, UFIP UMR-CNRS 6286, rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France Université de Nantes, France.

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

³Laboratoire de Recherche en Nanosciences, LRN - EA4682, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France.

⁴Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31 Kashirskoe shosse, 115409 Moscow, Russian Federation.

*Corresponding email: fleury-f@univ-nantes.fr

Abstract

4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) has been largely used during the last 30 years for its inhibitory effect on anion transporters and channels. More recently, Ishida and colleagues have described a possible mechanism by which DIDS inhibits RAD51-mediated homologous pairing and strand exchange, key processes in DNA repair by Homologous Recombination. Thus, DIDS could act as a potential revertant of radio- and chemo-resistance in cancer cells, which is the major cause of failure during therapeutic protocols. New drugs targeting RAD51 protein have since been developed with potential use for medical applications.

In this context, we attempted to determine the behavior of DIDS towards blood and plasma proteins such as serum albumins. Firstly, we analyzed the effects of several environmental factors such as solvent polarity, which may affect the stability of the molecule. Secondly, we analyzed the spectroscopic properties of DIDS in the presence of Human or Bovine Serum Albumin proteins. UV-visible absorption, Circular Dichroism, Fluorescence Spectroscopy and Isothermal Calorimetry were used. Here we show for the first time that DIDS can interact with both Serum Albumins. We have also determined the characteristics of these interactions. The comparison of several DIDS derivatives led us to identify the essential chemical moiety of this compound involved in the interaction. Moreover, by using site competition approaches we show that the main binding site for this molecule is in subdomain IB of the protein. These findings show that the binding of DIDS to serum albumin proteins may change the equilibrium between the free and bound DIDS forms, thereby affecting its bioavailability and efficiency against the RAD51 recombinase protein.

Keywords

Stilben inhibitors, blood albumin, DNA repair, protein-ligand interaction,

Abbreviations

DIDS, 4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid; HSA, Human Serum Albumin; BSA, Bovin Serum Albumin; ITC, IsoThermal Calorimetry; CD, Circular Dichroism; War, warfarin; Ibu, ibuprofen; BR, bilirubin; BV, biliverdin.

1. Introduction

Since the early 1970s 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid, known as DIDS (Figure 1), has been used as a chloride channel blocker, one of the few to exist ¹. Mutations of these channels can cause bone and kidney diseases, yet DIDS cannot be used as a drug in these pathologies. A recent study shows, however, that DIDS acts as an inhibitor of RAD51-mediated processes ². RAD51 is an eukaryotic protein with a key role in the homologous recombination repair pathway, an accurate pathway for DNA double-strand break repair. RAD51 assembles onto the single-stranded tails of the break and forms a helical nucleofilament which allows homologous pairing and strand exchange with a homologous sequence in order to carry out DNA repair ³. The overexpression of RAD51 is frequently found in tumor cells which suggests that this protein promotes tumorigenesis and cell resistance to treatment. Over the last decade a large number of publications propose this protein as a new therapeutic target ^{4; 5; 6; 7}.

Our investigations are focused on inhibiting different steps of RAD51-mediated homologous recombination by the DIDS molecule. Prior to *in vivo* assays or therapeutic use, it would be interesting to assess the behavior of DIDS in the presence of the most abundant protein in blood plasma, human serum albumin (HSA). Indeed, it has been shown that the distribution, the available concentration and the metabolism of numerous drugs can be significantly altered as a result of their binding to HSA ⁸.

HSA shares about 80 percent of sequence similarity with BSA, bovine serum albumin. Both proteins have three domains (I, II and III), each composed of two subdomains A and B. HSA presents at least three main binding pockets located in subdomains IB, IIA and IIIA. Most compounds bind to a single site, yet some have two or more binding sites. Carter and al ⁹ have estimated that 39%, 19%, and 27% of the compounds are found at three major sites IB, IIA, and IIIA respectively. However, the contribution of each site for ligand transport is not clearly established.

Interaction with plasma proteins may affect the apparent distribution of drugs as well as their elimination rate. Using different biophysical experiments, such as circular dichroism, fluorimetry, absorbance, ITC, we provide evidence of the interaction between DIDS and the albumin proteins and we characterized the nature of the binding site.

2. Results and Discussion

2.1. Effect of solvent polarity on the physico-chemical proprieties of DIDS.

The physico-chemical characteristics of the DIDS compound were investigated by UV-visible absorption and fluorescence spectroscopy. DIDS absorption spectra were monitored in different solvents. As shown in figure 2A, the maximal absorption spectra of DIDS are strongly dependent on solvent polarity. Indeed, the maximal absorption shifted from 350 nm in water to 372 nm in DMSO, which corresponds to a bathochromic shift with the decrease in solvent polarity. The maximal absorption shifted from 372 nm in DMSO to 350 nm in water. The shape of the absorption spectra of DIDS is also sensitive to its environmental solvent.

The emission spectra of DIDS were then measured as the percentage of ethanol in the solvent was increased. The profiles of the emission spectra of DIDS were only slightly shifted. The fluorescence intensity however increased twice when the percentage of ethanol was increased from 0 to 100 %. Therefore, changes of the environmental polarity of DIDS can modify the shape and the intensity of its spectral characteristics. These results confirm our recent theoretical and experimental study in which we investigated the structural and optical properties of DIDS ¹⁰.

2.2. Evidence of the interaction of DIDS with human and bovine serum albumin.

Figure 3 shows the titration of DIDS in buffer solution by BSA and HSA using UV/visible and fluorescence spectroscopic approaches. The increasing concentration of BSA or HSA caused important changes of the spectra of DIDS. Upon addition of albumin proteins, we observed a bathochromic shift and a decrease of UV-Visible DIDS absorbance. These spectral modifications appeared to be similar with BSA and HSA although the shift was slightly more important for BSA than for HSA (Figure 3A and 3B). We thus show for the first time that DIDS interacts with both HSA and BSA.

The interaction between DIDS and HSA or BSA was further confirmed using a fluorescence approach. We performed titration analysis as described above. The results clearly show an enhancement of the DIDS signal with the increase in protein concentration. As shown in figure 3, the fluorescence emission increased by a factor of seven with 15 μ M of HSA and a factor of five with 15 μ M of BSA. The observed changes of the DIDS spectra, including the blue shift of the fluorescence maxima and the increase of fluorescence intensity, were similar to those

monitored when the environmental polarity of DIDS was modified (Figure 2).

In order to determine the environment of protein-bound DIDS, we used a fluorescent ANS compound known to probe the hydrophobic binding sites of a protein ^{11; 12; 13}. Free ANS fluoresces weakly in an aqueous solution, and its fluorescence at around 470 nm strongly increases when it binds to buried sites. The fluorescence of ANS in the presence of HSA and BSA provides information on all the hydrophobic binding sites of these proteins. As shown in figure 4, ANS fluorescence increased up to 600 a.u. in the presence of HSA or BSA. When DIDS was added to a solution containing the albumin/ANS complex, ANS fluorescence emission decreased with the increase of DIDS concentration from 0 to 20 μM .

This finding provides evidence that DIDS induces the displacement of ANS from its binding site(s) on albumins, suggesting that the binding site of DIDS is probably close and similar to that of ANS. It also suggests that the binding site(s) of DIDS has hydrophobic features. Interestingly, we found similar results for both HSA and BSA proteins. It is noteworthy that ANS and DIDS have two negatively charged sulfonate groups that may strongly bind to cationic groups of residues in the binding site ¹².

2.3. Identification of structural determinants of DIDS involved in the interaction

Using ITC titration, it is possible to measure the heat exchange induced by the interaction between a protein and a ligand. In our case, we performed a titration of HSA and BSA with DIDS and its derivatives.

Firstly, both ITC titrations obtained with DIDS (Figure 5A, 5B) show important heat exchange, confirming the interaction between DIDS and both serum albumins. Initially positive, the enthalpy value becomes negative when the ligand/protein molar ratio rises above one. This result indicates that the association reaction is endothermic until a molar ratio of one, after which it becomes exothermic. This enthalpy variation demonstrates that there are at least two types of binding sites for DIDS in both proteins. As described in Materials and methods, we fitted all data points and calculated several binding parameters including the stoichiometric number N and binding constant K_a (table 1). We found that for both HSA and BSA proteins, there are high-affinity and low-affinity DIDS binding sites, confirming previous studies. The K_a values of DIDS for the high-affinity sites were $3,37 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ and $2,08 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ for HSA and BSA respectively, whereas for the low-affinity sites K_a were one hundred times lower. As for

the N values, it seems that only one DIDS ligand binds to the high-affinity site, while 3-4 ligands interact with the low-affinity binding site for either HSA or BSA. Hence, DIDS has a similar behavior with regard to HSA and BSA, which suggests that the binding sites are the same in both proteins.

Secondly, in order to identify the chemical groups of DIDS involved in these protein-ligand interactions, we used two other DIDS analogs wherein the isothiocyanate group is replaced by an azido (DAZDS) or an amino (DADS) group (Figure 1).

The same experiments were performed with the DIDS chemical analogs. ITC titration with DAZDS results in a similar response as DIDS since the association reaction is first endothermic then exothermic when the molar ligand/protein ratio rises above 1 (Figure 5C, D). However, the association enthalpy is slightly weaker with DIDS. Once again, the ligand's behavior is identical towards HSA and BSA.

The titration with the DADS ligand is very interesting since there is almost no ITC signal. This shows that DADS does not interact with HSA and BSA, providing evidence that the presence of an amino group prevents the interaction of DADS with HSA and BSA. Thereby, this chemical group of the stilben is important for the interaction.

2.4. Localization of DIDS binding site in HSA

HSA presents three main binding sites 1, 2 and 3, located in subdomains IIA, IIIA and IB respectively ^{9; 14}. X-ray crystallography has shown that a large number of ligands are specific for each binding site. Thus warfarin (War), ibuprofen (Ibu) and bilirubin (BR) are described to bind to subdomains IIA, IIIA and IB respectively ^{15; 16}. In order to identify the binding site of DIDS, we probed the ability of DIDS to displace these albumin-binding drugs from their respective binding sites. Therefore, we pre-incubated HSA with the above mentioned competitor ligands before carrying out ITC and CD titrations by DIDS.

Figure 6 shows the ITC titrations by DIDS of HSA alone, as well as HSA complexed with War, Ibu or BR. Pre-incubation with Ibu induced a slight signal variation in comparison with HSA alone for a ratio of HSA:Ibu of 2:1 and 5:1, whereas no variation is observed for War-complexed HSA for the similar ratio (figure 6A). This result provides evidence that the War-binding site is not involved in the interaction of DIDS with HSA. The most significant

variations in the obtained profiles were observed when HSA was pre-incubated with BR and especially when the concentration of BR was five times higher than HSA (figure 6C).

We hypothesized that the primary binding site of DIDS is located in subdomain IB (BR site). The secondary binding site could involve subdomain IIIA (Ibu site), while site IIA is certainly not involved in the interaction.

To test this hypothesis, we preincubated HSA with Bilirubin (HSA/BR complex) and proceeded to titrate by DIDS in CD experiments. In the presence of HSA, BR displays a high induced circular dichroism (ICD) signal caused by its binding to HSA. This optical property is well described in many publications and is often used to prove the involvement of subdomain IB in protein-ligand interactions^{17; 18; 19}.

As shown in figure 7, the CD signal of BR alone was almost zero at 50 μ M. Addition of HSA induces the ICD of BR which presents a positive band at 475 nm and a negative band at 420 nm. The titration of the HSA/BR complex by DIDS leads to a decrease of the ICD signal confirming that DIDS and BR compete for binding to the same site. The same experiment was performed with DAZDS which results in a similar competition with BR whereas the titration with DADS has a clearly less pronounced effect.

The interpretation of such displacement assays is complicated by the presence of more than one binding site for the displaced molecule. This is the case for BR. HSA has one high affinity (K_a 10^8M^{-1})^{20; 21} and one or two low affinity binding sites for bilirubin^{18; 22}. Site IIIA has been suggested to be of low affinity¹⁸. Different studies have been conducted in order to determine the location of the primary binding site, yet the results are contradictory. Some authors have presented evidence that BR can bind to site IIA with high affinity^{18; 23; 24}. However, an equivocal number of studies have found site IB to be the primary binding site^{14; 22}. We have probed the ability of War to displace pre-bound BR from the HSA molecule in order to assess if the two molecules bind to the same site. War was able to reduce the BR CD signal by 50% at much higher concentrations compared to the displacement by DIDS. This demonstrates that site IIA is not a primary binding site for BR. Consequently, our results suggest that DIDS binds with high affinity to site IB.

To confirm this result and to eliminate any doubt due to the presence of secondary binding sites for bilirubin on HSA, we conducted the same CD experiments using Biliverdin. Biliverdin is known to bind to only one site on HSA – site IB¹⁴. As shown in the figure 8, DIDS and DAZDS

displaced BV from its binding site, whereas no variation is observed with DADS. This result confirms that DIDS and DAZDS bind primarily to site IB.

In this study, we demonstrated that the primary high affinity binding site of DIDS in HSA corresponds to subdomain IB while the secondary low affinity binding site could be localized in subdomain IIIA.

The interaction between BSA and RAD51 inhibitors could influence the biochemical analysis of RAD51 activity. Indeed, a number of biological assays use BSA as a stabilizer component in the reaction buffer. For example, for the measure of RAD51 DNA exchange or D-loop activities *in vitro* 1 to 5 μ M of BSA are added to the buffer. The presence of BSA can thus significantly affect the assessment of potential RAD51 chemical inhibitors.

3. Conclusion

In the last decade the development of inhibitors targeting DNA repair pathways has known a resurgence of interest ²⁵. Since 2009, when DIDS was discovered as a potential RAD51 inhibitor, at least seven other small molecules have been described as inhibitors of this human recombinase. These molecules associated with anti-cancer therapies could kill more effectively RAD51-mediated resistant cancer cells ²⁶. Understanding the interaction mechanisms between RAD51 inhibitors and Human Serum Albumin is a pivotal element for understanding the pharmacokinetics and pharmacodynamics of these inhibitors. Indeed, the interaction with HSA could play a dominant role in the bioavailability of anticancer drugs as the DIDS molecule.

Thus the potential interaction with blood proteins should be taken in consideration when developing more effective DIDS derivatives against RAD51. DIDS derivatives not interacting with these circulating proteins while remaining effective against RAD51 are serious candidates to sensitize resistant cancers with altered RAD51 activity and should be interesting for the research community in life sciences, chemistry and clinical medicine.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and proteins

DIDS and its derivatives, Human and Bovine serum albumins were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. Both proteins (>99% purity) are essentially fatty acid and globulin free. Stock solutions of DIDS and its analogs were prepared in water at a concentration of 10 mM then diluted in PBS buffer.

4.2. UV-Visible spectroscopy

UV-visible spectra were recorded from 300 to 450 nm with a Jasco V-530 UV-visible scanning spectrophotometer equipped with a Peltier temperature controller. Measurements were performed using quartz cells of 1 cm in path length. Experimental conditions are detailed in the figure legends.

4.3. Fluorescence spectroscopy

A Jasco spectrofluorometer, model FP-6500, was used for fluorescence measurements. Slit widths used for excitation (350 nm) and emission (range 380-600 nm) were 1 nm and 3 nm respectively. The measurements were taken with a 1cm × 0.2 cm quartz cell at 25°C. Fluorescence emission intensity data were collected directly on a computer connected to the spectrofluorometer and were analyzed using the Jasco Spectra Manager software. DIDS solution at 10 μM was titrated successively by HSA and BSA solution.

ANS was used to probe the hydrophobic surfaces of HSA and BSA. The fluorescence emission was measured from 400 to 600 nm for $\lambda_{\text{ex}}=370$ nm. Data were corrected for the effect of solvent on the intrinsic ANS fluorescence by subtracting the ANS fluorescence spectra in the absence of protein and this for each DIDS concentration.

4.4. Isothermal titration calorimetry (ITC)

Automated titrations of BSA and HSA with different ligands were conducted by isothermal Titration Calorimetry (iTTC) using an Auto-iTTC 200 microcalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA). Experiments were carried out at 22°C in PBS buffer. The reference cell was filled with deionized water and the BSA or HSA protein solution (70 μM) was loaded into the sample cell. The syringe was filled with a solution of DIDS ligand (2 mM). Titrations were performed with 20 successive injections of 2 μL of the ligand in the sample cell. A 150 s time interval between injections was applied in order to allow complete thermal equilibration after each injection. The same titration was used for site competition experiments but the HSA protein was pre-incubated with one of the three competitor ligands warfarin, ibuprofen or bilirubin at

concentrations of 50 μM or 500 μM . The titration experiments were repeated at least three times.

Control experiments were performed by injection of the buffer into the protein solution under identical conditions and yielded insignificant heats of dilution.

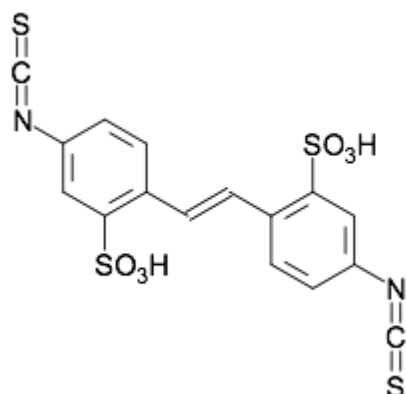
Data analyses were carried out using the Microcal Origin 7.0 software and data were fitted with the one- or two- set of site model. Experimental data yielded association constant (K_a), stoichiometry (n) and molar enthalpy binding (ΔH) value. The reaction entropy was calculated using the equations $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a$, in which T is the absolute temperature and $R=1.9872 \text{ cal. mol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

4.5. Circular Dichroism measurements

Circular Dichroism (CD) spectra of the small molecules were measured using a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Japan) and a miniquartz cell with 1 cm pathlength. Spectra were recorded from 385 to 525 nm and averaged over 3 scans to increase the signal/noise ratio. Measurements were carried out at room temperature in continuous mode (bandwidth: 2 nm; response time: 0.125 s; resolution: 0.1 nm). The final concentrations of DIDS and HSA protein were 0-300 μM and 70 μM respectively in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4. Warfarin, ibuprofen, bilirubin and biliverdin were used at 50 μM as competitor ligands.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (Comité 44) and from CNRS PICS n°3868. SH and DV are supported by a fellowship from the Region Pays de la Loire (CIMATH2) and Institut de Recherche en Santé du Canada.



DIDS

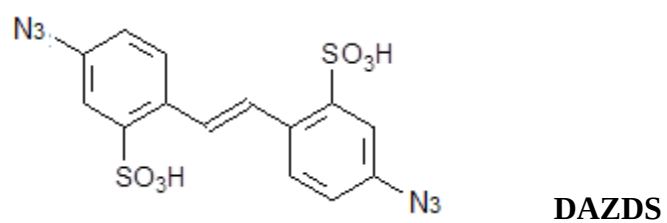
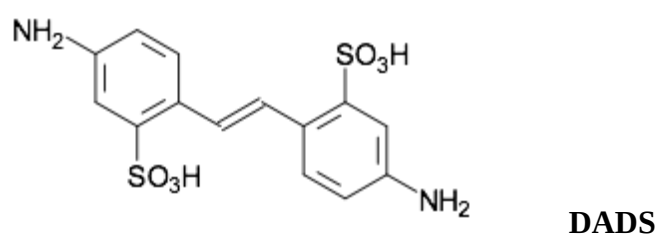


Figure 1: Chemical structure of DIDS and its Amino (DADS) and Azido (DAZDS) derivatives.

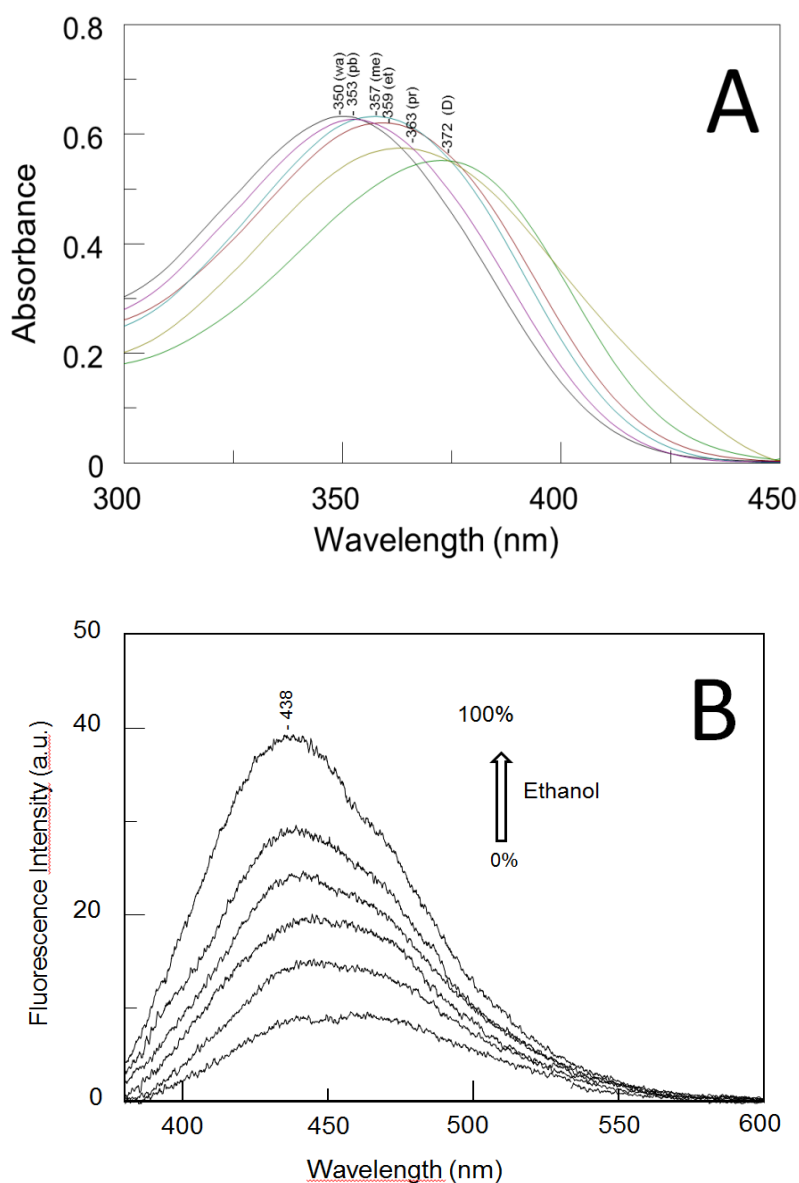


Figure 2: Effect of environmental polarity on DIDS spectral features.

A) Absorption spectra of DIDS at 20 μM in various solvents. The absorbance maximum shifts to shorter wavelengths as the solvent polarity increases. Water (wa), phosphate buffer (pb), methanol (me), ethanol (et), Propanol (pr) and DMSO (D).

B) Fluorescence spectra of 20 μM DIDS in increasing fractions of ethanol in water. The quantum yield increases as the percentage of ethanol increases from 0 to 100 %.

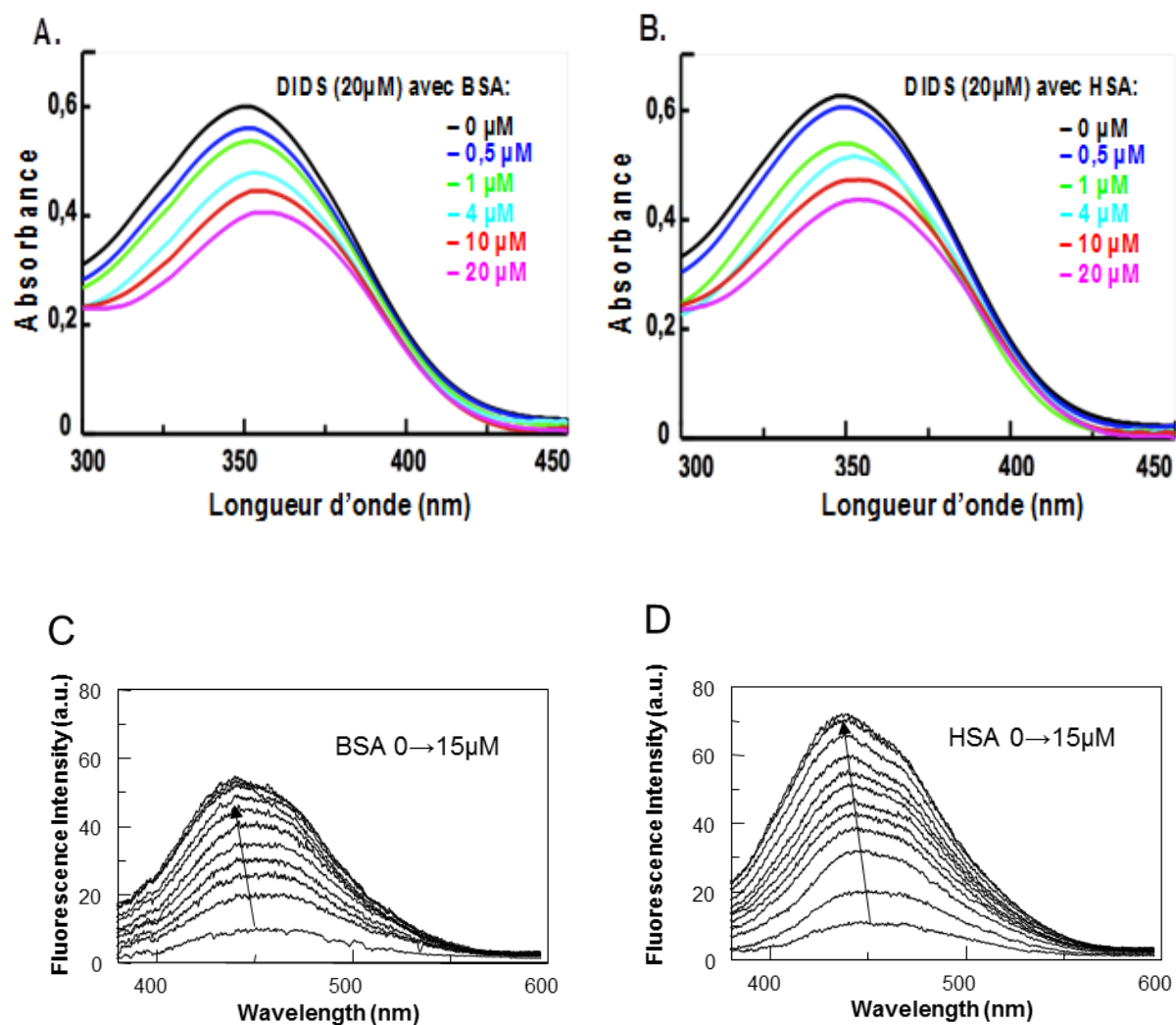


Figure 3: DIDS interacts directly with both human and bovine serum albumins.

20 μM DIDS in PBS buffer is titrated by increasing concentrations of BSA (A and C) and HSA (B and D) up to 20 μM for absorbance and 15 μM for fluorescence measurement.

Emission is monitored at an excitation wavelength of 350 nm.

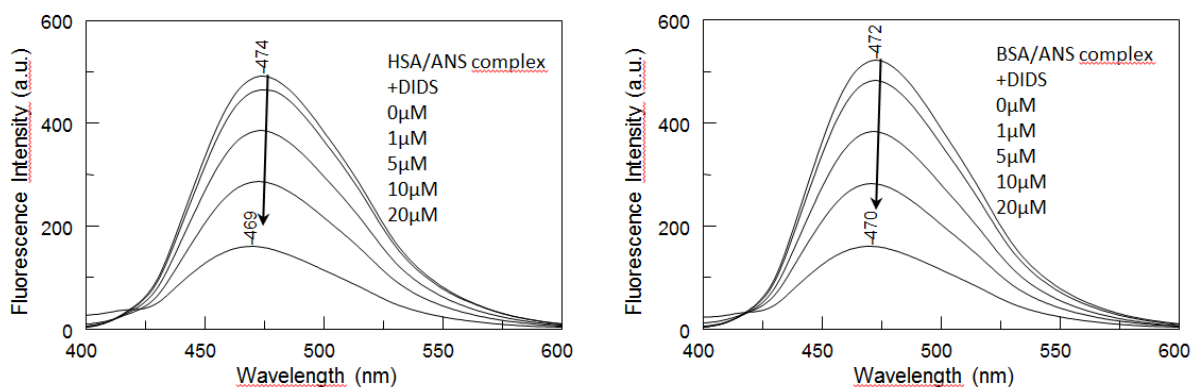
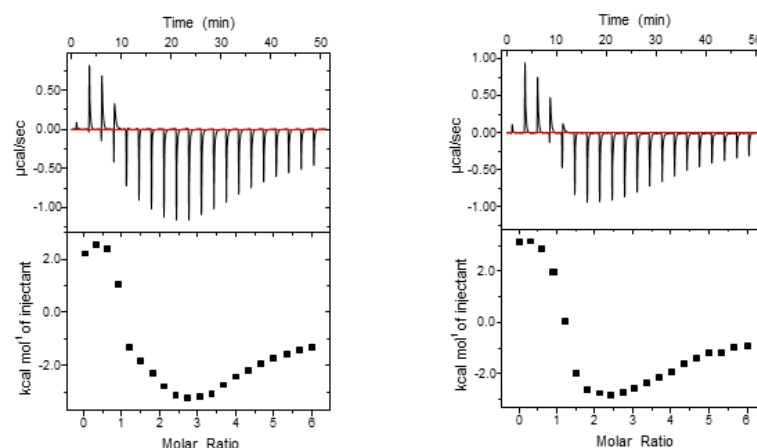


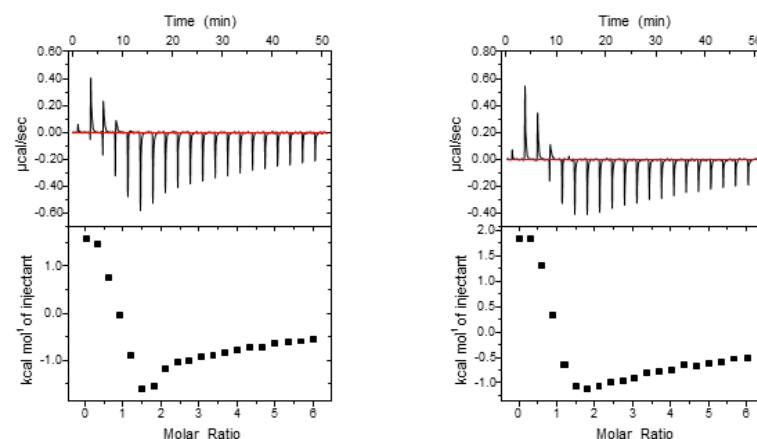
Figure 4. DIDS-induced loss of ANS fluorescence emission.

Fluorescence spectra of albumin-bound ANS 10 μM with increasing DIDS concentrations were measured using an excitation wavelength of 370 nm. Concentrations of HSA (left) and BSA (right) during titrations are 10 μM . DIDS concentrations successively 1, 5, 10 and 20 μM .

BSA



DAZDS



DADS

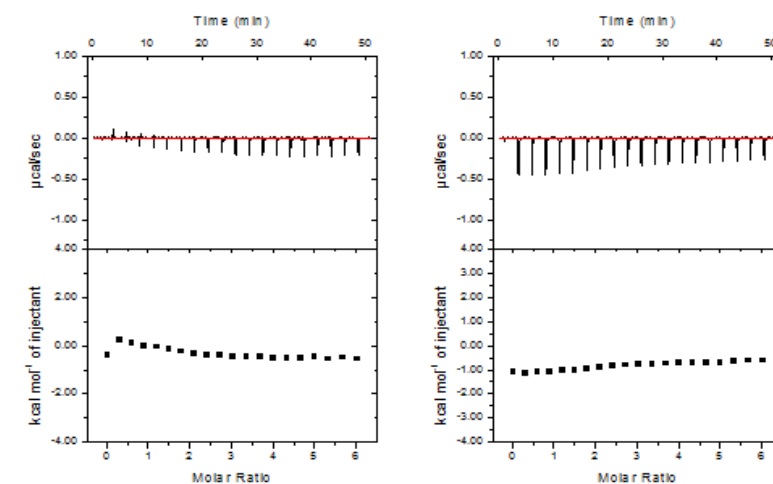


Figure 5: Isothermal titration calorimetry of DIDS derivatives with both human and bovine serum albumin. HSA and BSA at 70 μ M were titrated by DIDS (A and B), DAZDS (C and D) and DADS (E and F). Injected ligand concentrations are 2 mM in PBS buffer.

	Interaction Site 1				Interaction Site 2			
	N ₁	Ka ₁ (M ⁻¹)	ΔH ₁ (cal/mol)	ΔS ₁ (cal/mol)	N ₂	Ka ₂ (M ⁻¹)	ΔH ₂ (cal/mol)	ΔS ₂ (cal/mol)
HSA	0,93 +/- 0,05	3,37 10 ⁶ +/- 1,79 10 ⁶	4310 +/- 922	42.8 +/- 2	3,73 +/- 0,61	3,16 10 ⁴ +/- 1,50 10 ⁴	-4988.3 +/- 1360	3.47 +/- 6
BSA	1,04 +/- 0,25)	2,08 10 ⁶ +/- 0,59 10 ⁶	3827.3 +/- 675	42.1 +/- 2	3,23 +/- 0,76	1,71 10 ⁴ +/- 0,26 10 ³	-4237.0 +/- 512	5.31 +/- 2

Table 1. Binding parameters for the association of DIDS with HSA and BSA. Data in this table are derived from at least four ITC experiments performed in PBS buffer at pH 7.5 and 22°C.

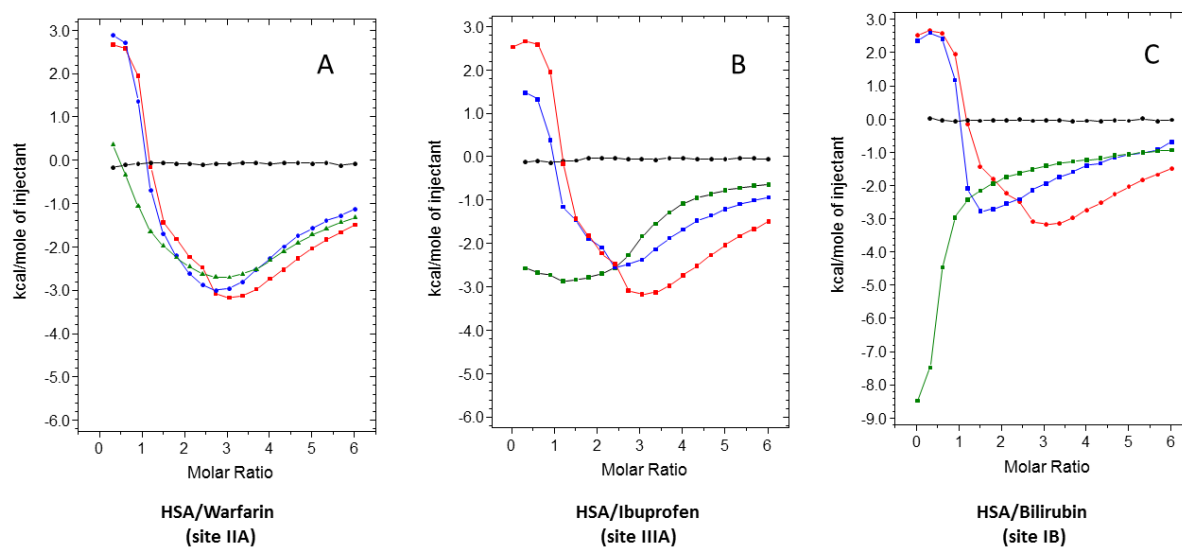


Figure 6: Identification of DIDS binding sites in HSA by binding competition.

HSA at 70 μ M is preincubated with competitor ligands at 50 (blue) or 500 μ M (green) for one hour in PBS buffer at 22°C. Preincubation of HSA with Warfarin (A), Ibuprofen (B) or Bilirubin (C) is performed to occupy the sites in respective in subdomain IIA, IIIA or IB. HSA alone (red) or competitor-bound HSA is titrated by increasing DIDS concentrations. ITC titrations without protein are represented in black.

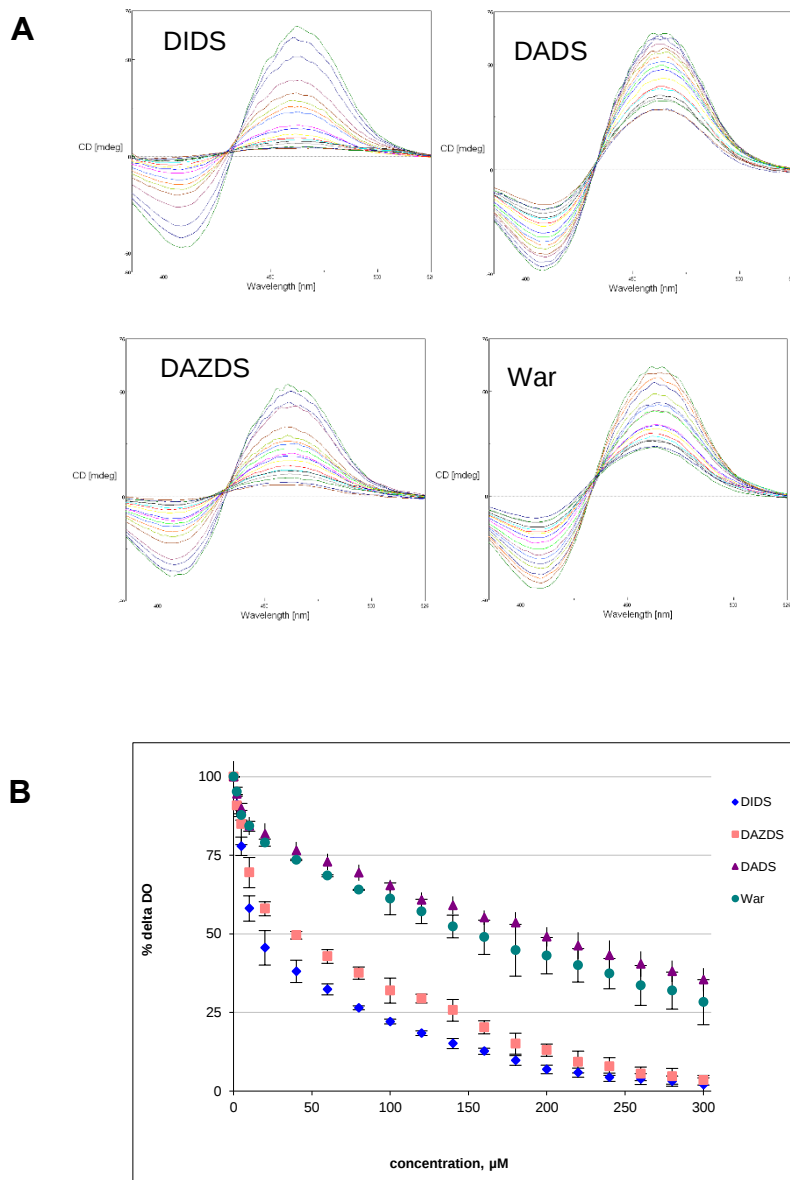


Figure 7: Probing of binding site IB by titration of HSA-bilirubin complex.

A) HSA concentration at 70 μM is complexed with 50 μM bilirubin. The HSA-BR complex is titrated by increasing drug concentration from 0 to 300 μM .

B) Induced Circular dichroism signal is measured at 410 nm.

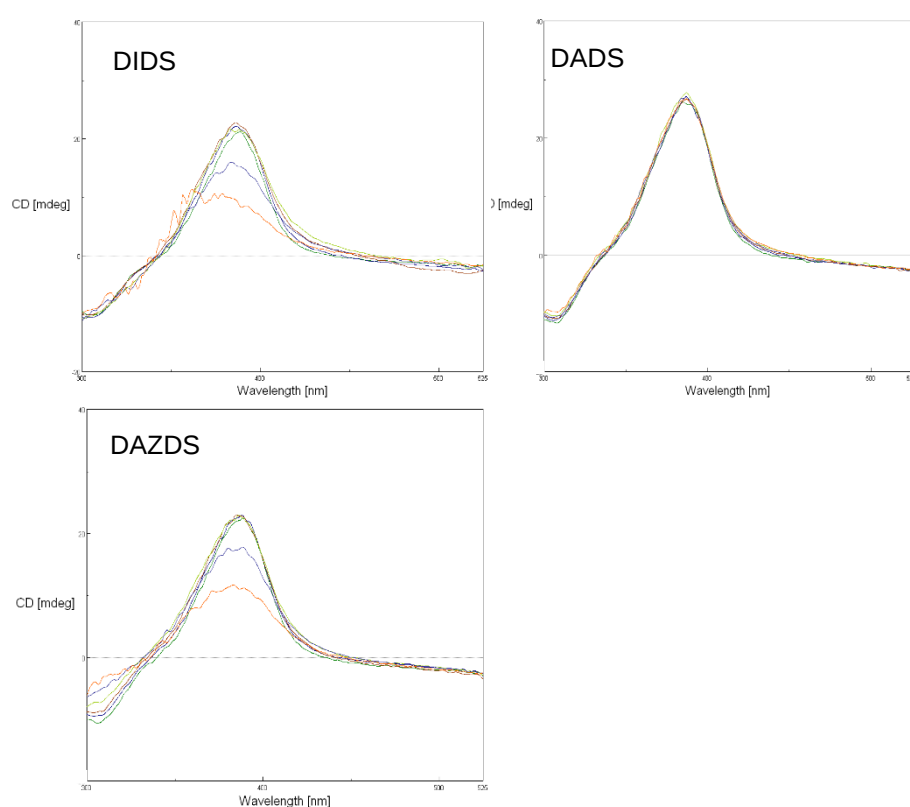
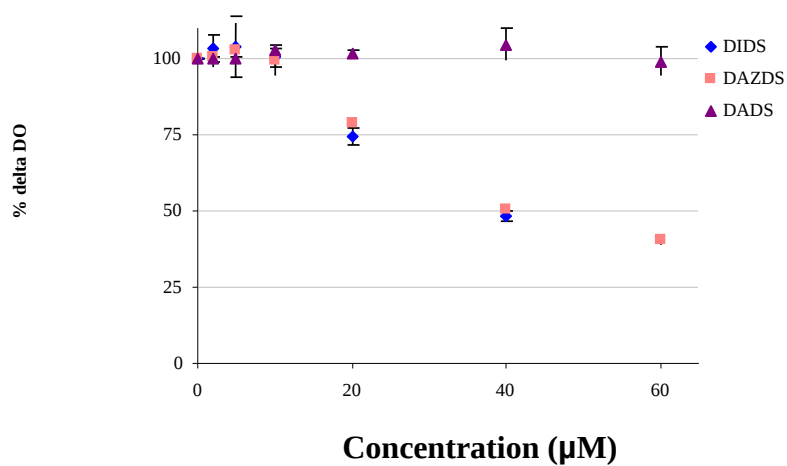
A**B**

Figure 8: Probing of binding site IB by titration of HSA-Biverdin complex.

A) HSA concentration at 70 μM is complexed with 50 μM BV. The HSA-BV complex is titrated by increasing stilben derivative concentration from 0 to 60 μM .

B) Induced Circular dichroism signal is measured at 410nm.

References

1. Wulff, H. (2008). New light on the "old" chloride channel blocker DIDS. *ACS Chem Biol* **3**, 399-401.
2. Ishida, T., Takizawa, Y., Kainuma, T., Inoue, J., Mikawa, T., Shibata, T., Suzuki, H., Tashiro, S. & Kurumizaka, H. (2009). DIDS, a chemical compound that inhibits RAD51-mediated homologous pairing and strand exchange. *Nucleic Acids Res* **37**, 3367-76.
3. Nomme, J., Renodon-Corniere, A., Asanomi, Y., Sakaguchi, K., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Norden, B., Tran, V. & Takahashi, M. (2010). Design of potent inhibitors of human RAD51 recombinase based on BRC motifs of BRCA2 protein: modeling and experimental validation of a chimera peptide. *J Med Chem* **53**, 5782-91.
4. Huang, J. W., Wang, Y., Dhillon, K. K., Calses, P., Villegas, E., Mitchell, P. S., Tewari, M., Kemp, C. J. & Taniguchi, T. (2013). Systematic screen identifies miRNAs that target RAD51 and RAD51D to enhance chemosensitivity. *Mol Cancer Res* **11**, 1564-73.
5. Nagathihalli, N. S. & Nagaraju, G. (2011). RAD51 as a potential biomarker and therapeutic target for pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta* **1816**, 209-18.
6. Scott, D. E., Coyne, A. G., Venkitaraman, A., Blundell, T. L., Abell, C. & Hyvonen, M. (2015). Small-molecule inhibitors that target protein-protein interactions in the RAD51 family of recombinases. *ChemMedChem* **10**, 296-303.
7. Velic, D., Couturier, A. M., Ferreira, M. T., Rodrigue, A., Poirier, G. G., Fleury, F. & Masson, J. Y. (2015). DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer. *Biomolecules* **5**, 3204-59.
8. Cui, F. L., Qin, L. X., Zhang, G. S., Yao, X. J. & Du, J. (2008). Binding of daunorubicin to human serum albumin using molecular modeling and its analytical application. *Int J Biol Macromol* **42**, 221-8.
9. Carter, D. C. (2010). Crystallographic Survey of Albumin Drug Interaction and Preliminary Applications in Cancer Chemotherapy. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* 7th edit. (D.J., A. & D.P., R., eds.), Vol. 3, pp. 437-468, New York.
10. Jaunet-Lahary, T., Goupille, A., Jacquemin, D., Fleury, F., Graton, J. & Laurent, A. D. (2016). A Joint Theoretical and Experimental Study of the Behavior of the DIDS Inhibitor and its Derivatives. *ChemPhysChem* DOI: **10.1002/cphc.201600107R1**.

11. De Campos Vidal, B. (1978). The use of the fluorescent probe 8-anilidonaphthalene sulfate (ANS) for collagen and elastin histochemistry. *J Histochem Cytochem* **26**, 196-201.
12. Gasymov, O. K. & Glasgow, B. J. (2007). ANS fluorescence: potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1774**, 403-11.
13. Essassi, D., Zini, R. & Tillement, J. P. (1990). Use of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a fluorescent probe in the investigation of drug interactions with human alpha-1-acid glycoprotein and serum albumin. *J Pharm Sci* **79**, 9-13.
14. Zsila, F. (2013). Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. *Mol Pharm* **10**, 1668-82.
15. Sudlow, G., Birkett, D. J. & Wade, D. N. (1975). The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* **11**, 824-32.
16. He, X. M. & Carter, D. C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209-15.
17. Bouvier, M. & Brown, G. R. (1989). The induced circular dichroism of bilirubin complexed with the alpha-helix form of poly(L-lysine). *Biochim Biophys Acta* **991**, 303-9.
18. Goncharova, I., Orlov, S. & Urbanova, M. (2013). The location of the high- and low-affinity bilirubin-binding sites on serum albumin: ligand-competition analysis investigated by circular dichroism. *Biophys Chem* **180-181**, 55-65.
19. Lighnter, D. A., Wijekoon, W. M. & Zhang, M. H. (1988). Understanding bilirubin conformation and binding. Circular dichroism of human serum albumin complexes with bilirubin and its esters. *J Biol Chem* **263**, 16669-76.
20. Knudsen, A., Pedersen, A. O. & Brodersen, R. (1986). Spectroscopic properties of bilirubin-human serum albumin complexes: a stoichiometric analysis. *Arch Biochem Biophys* **244**, 273-84.
21. Jacobsen, J. & Brodersen, R. (1983). Albumin-bilirubin binding mechanism. *J Biol Chem* **258**, 6319-26.
22. Zunszain, P. A., Ghuman, J., McDonagh, A. F. & Curry, S. (2008). Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. *J Mol Biol* **381**, 394-406.
23. Sochacka, J. (2015). Application of phenol red as a marker ligand for bilirubin binding site at subdomain IIA on human serum albumin. *J Photochem Photobiol B* **151**, 89-99.
24. Minomo, A., Ishima, Y., Kragh-Hansen, U., Chuang, V. T., Uchida, M., Taguchi, K., Watanabe, H., Maruyama, T., Morioka, H. & Otagiri, M. (2011). Biological

- characteristics of two lysines on human serum albumin in the high-affinity binding of 4Z,15Z-bilirubin-IXalpha revealed by phage display. *FEBS J* **278**, 4100-11.
25. Helleday, T. (2010). Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis* **31**, 955-60.
 26. Huang, F. & Mazin, A. V. (2014). A small molecule inhibitor of human RAD51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts. *PLoS One* **9**, e100993.

Chapitre 4

Chapitre 4 – Analyse de l'impact du DIDS et de ses dérivés sur RAD51 (manuscrit en préparation)

Résumé : RAD51 est la protéine centrale de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (RH), impliquée dans les trois phases du processus. Il a été montré qu'une surexpression de la protéine était corrélée avec une survie accrue des cellules cancéreuses aboutissant à un phénomène de résistance tumorale. Pour lutter contre ce type de cancer, la recherche d'inhibiteurs de RAD51 a mené à la synthèse et au développement de plusieurs molécules, dont le DIDS. Cette petite molécule s'avère efficace pour inhiber différentes fonctions de RAD51, cependant son mode d'action et les groupements impliqués dans l'inhibition n'ont pas été identifiés. Nous avons utilisé plusieurs molécules dérivées du DIDS afin de caractériser les déterminants impliqués. Nous avons montré que le DIDS ainsi que deux de ses dérivés sont capables d'inhiber la liaison de RAD51 à l'ADNsb, d'empêcher la formation de la D-loop par RAD51 et d'avoir un impact cellulaire en diminuant le nombre de foyers de RAD51. De manière intéressante, ces molécules ont également un impact sur RAD52 *in vitro*, mais pas dans la cellule. Les groupements isothiocyanate du DIDS semblent être des groupements importants dans l'inhibition de RAD51 par le DIDS. Ces résultats ouvrent la voie à la synthèse de nouvelles molécules dérivées du DIDS plus affines pour RAD51 et plus efficaces.

1. Introduction

La cellule est constamment soumise à des stress endogènes et des stress exogènes capables d'affecter la stabilité de son génome. Plusieurs types de lésions peuvent endommager l'ADN, les plus néfastes d'entre eux étant les cassures double-brin ^{7,349,350}. Si ces cassures ne sont pas réparées, la cellule entre en phase d'apoptose aboutissant à sa mort ^{24,49,349}. Cependant, la cellule possède deux principaux mécanismes capables de réparer ce type de dommages : la NHEJ et la RH. Ces deux types de mécanismes interviennent à des stades différents du cycle cellulaire, la RH étant principalement utilisée durant les phases S et G2, alors que la NHEJ est prépondérante durant les autres phases du cycle cellulaire ³⁵¹. La NHEJ peut entraîner la perte de matériel génétique, à la différence de la RH qui utilise la chromatide sœur comme matrice à la réparation ³⁵². La RH est séparée en trois phases impliquant chacune différentes protéines. Parmi toutes les protéines impliquées dans la RH, RAD51 est sans conteste la protéine dont le rôle est prépondérant dans ce processus. Les premières découvertes sur Rad51 ont été faites chez *S. cerevisiae* ^{117–119}, mais également chez son homologue RecA ^{174,175}. La famille des protéines Recombinases possède plusieurs membres comme RecA, DMC1, RadA et RAD51 ^{124,125}. Il existe beaucoup de similarités entre les membres de cette famille protéique. RAD51 possède ainsi plusieurs fonctions essentielles, comme la capacité de liaison à l'ADNsb et l'ADNdb, la fonction recombinase, la recherche d'homologie, l'invasion de l'ADNdb, la formation de la D-loop (Displacement-loop) et la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ^{90,353}. On la retrouve ainsi impliquée dans les trois phases de la RH.

Parmi les protéines de la réparation par RH, RAD51 est apparue comme une cible potentielle afin d'améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses. Ainsi la surexpression de la protéine RAD51 dans certains cancers est apparue comme un élément favorisant la survie cellulaire et pouvant mener à un phénomène de résistance. En effet, après induction de CDB, une cellule surexprimant RAD51 est capable de survivre ^{3,354}. A l'inverse, en diminuant l'expression de RAD51, en complément d'un traitement anticancéreux, cela entraîne une diminution de la survie cellulaire ^{4–6}.

Ainsi, plusieurs études ont été menées afin de mettre en évidence et de développer de nouveaux inhibiteurs de RAD51. Même si cette approche thérapeutique est récente, celle-ci s'avère prometteuse (cf. chapitre 2). Dans cette optique de recherche de nouveaux inhibiteurs ciblant RAD51, une équipe a mis en évidence la capacité du DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid) à empêcher RAD51 d'exercer ses fonctions primordiales ³⁴⁰. En

présence de DIDS, RAD51 devient incapable de lier aussi bien l'ADNsb que l'ADNdb. De plus, le DIDS inhibe les fonctions recombinaise de RAD51 en l'empêchant de réaliser l'invasion de l'ADNdb et la formation de la D-loop. La présence ou l'absence d'ATP n'a pas d'impact sur l'action du DIDS vis-à-vis de RAD51. Récemment, une étude a confirmé l'effet inhibiteur du DIDS sur RAD51 dans un contexte de leucémie ³⁴². Dans les lymphocytes B en maturation, l'AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*) participe à la commutation isotypique (*Switch Class Recombination*) suite à l'infection par un antigène. Ce phénomène implique des remaniements de l'ADN suite à la création de cassures double-brin. RAD51 intervient en créant une boucle d'ADN, ensuite excisée ³⁴³. Il a ainsi été montré que le DIDS inhibe la formation de foyers RAD51 et empêche le lymphocyte B à utiliser la RH pour réparer les cassures double-brin générées. Le mode d'action du DIDS sur RAD51 n'est pas encore clair, même si les deux études citées suggèrent que le DIDS se lierait au domaine de liaison de l'ADN de RAD51.

2. Matériel et méthodes

2.1. Production RAD51 et RAD52

La production de RAD51 suit le protocole décrit dans ¹⁴⁹. La production et la purification de la protéine RAD52 suit les étapes décrites dans ²⁴⁹. Les protéines RAD51 et RAD52 sont conservées dans le tampon SB1X (20 mM Tris-HCl pH8 ; 200 mM KOAc pH8 ; 10% glycérol, 1 mM EDTA ; 0.5 mM DTT ; qsp H₂O).

2.2. Production du plasmide surenroulé

La production du plasmide surenroulé suit les étapes décrites par Carbone et al. ³⁵⁵. Des cellules JM109 ont été transformées avec le plasmide pPB4.3 en suivant le protocole du fournisseur (Stratagene). Une transformation de ces mêmes bactéries avec le plasmide pUC19 a été utilisée comme contrôle positif. Après la transformation, les bactéries sont amplifiées en milieu liquide LB en présence d'ampicilline 100 µg/mL pendant la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm). La purification de l'ADN plasmidique a été réalisée à l'aide d'un kit maxiprep de Qiagen.

2.3. Test de D-loop

La sonde d'ADNsb est composée de 100 pb et est marquée en position 5' à l'IRD700 (ex : 684 nm/em : 702 nm). Elle est commandée chez Integrated DNA Technologies. Le milieu réactionnel est préparé (Tris-HCl pH7.5 25 mM ; DTT 1 mM ; ATP 1 mM ; CaCl₂ 1 mM ; qsp H₂O) en présence de la sonde d'ADNsb à 1 µM. Ensuite, RAD51 est ajouté au mélange et

incubé pendant 5 min à 37°C. L'ADN plasmidique (3 μ M) est ajouté à la réaction pour un volume final de 10 μ L et incubé pendant 15 min à 37°C. La réaction est déprotéinisée par l'ajout de la solution stop (Tris-HCl pH7.5 20 mM ; SDS 5 mg/mL ; protéinase K 2 mg/mL ; qsp H₂O) et le mélange est incubé pendant 20 min à 37°C. Après ajout du bleu de chargement, les échantillons sont ensuite séparés sur un gel d'agarose 1% et révélés sur un scanner LICOR (Odyssey Imager).

2.4. Etude de la liaison à l'ADNsb

Les résultats sont obtenus sur un appareil BLItz (ForteBio). L'ADNsb polydT (1 μ M) est biotinyllé pour permettre son association au senseur recouvert d'une couche de streptavidine. Deux méthodes d'étude sont utilisées : la première en pré-incubant RAD51 avec la molécule à tester et la seconde en ajoutant la molécule à tester après liaison à l'ADN. Dans le premier cas, RAD51 (2 μ M) est incubé en présence de la molécule pendant 10 min sur glace, puis la mesure de la liaison à l'ADN est effectuée (ligne de base : 10 sec / phase d'association : 40 sec / phase de dissociation : 30 sec). Dans le deuxième cas, la mesure est effectuée et l'association RAD51-ADNsb est mesurée. Après 50 sec d'association, la molécule est ajoutée selon la concentration souhaitée puis la dissociation est mesurée (ligne de base : 10 sec / phase d'association : 50 sec / phase de dissociation : 30 sec). Dans les deux cas, le tampon d'étude est constitué de PBS 1X comprenant 1 mM d'ATP et contenant la protéine RAD51 (2 μ M). Le senseur est régénéré avec 50 mM de NaOH pendant 40 sec avant réutilisation.

2.5. Test d'hybridation

Le test d'hybridation est basé sur la fluorescence. Deux ADNsb sont marqués, l'un par le fluorophore FAM (ex : 495 nm/em : 520 nm) et l'autre par BHQ (ex : 534 nm/em : 580 nm). Les deux ADNsb sont commandés chez Integrated DNA Technologies. Les réactions sont réalisées dans une plaque 96 puits Greiner Lumitrac 200. Les deux sondes sont diluées à 25 nM et placées au niveau des deux injecteurs d'un lecteur de plaque Cytation 5 (Biotek). Le milieu réactionnel (100 μ L) comprend le tampon MOPS 5X (125 mM MOPS pH7 ; 150 mM KCl ; 1% Tween-20 ; 10 mM DTT ; qsp H₂O), les molécules à tester à différentes concentrations, RAD52 à 75 nM. Le volume est complété par de l'eau. Les manipulations sont programmées à l'aide du logiciel Gen5.

2.6. Immunofluorescence

La détermination des foyers RAD51 suit en partie le protocole décrit par Pauty et al,³⁵⁶. Brièvement, 1x10⁵ cellules HeLa sont déposées dans des plaques 6 puits contenant une lamelle.

Le lendemain, les cellules sont traitées avec les molécules DIDS, N3, NAc, NO₂ et NH₂ à la concentration de 150 μ M pendant 24 h à 37 °C. Un contrôle DMSO est utilisé comme contrôle négatif. Les cellules sont ensuite traitées ou non à la néocarzinostatine (30 ng/mL) pendant 30 min à 37°C. Le milieu est ensuite changé avec la présence ou non des molécules testées et les cellules sont incubées pendant 4 h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées au PBS puis incubées en présence du tampon A (1 mM Pipes pH6.8 ; 100 mM NaCl ; 3 mM MgCl₂ ; 1 mM EGTA pH8 ; 0.5% Triton X-100 ; 300 mM sucrose ; qsp cold water) pendant 5 min sur glace. Cette étape est suivie par une incubation avec le tampon B (10 mM Tris-HCl pH7 ; 10 mM NaCl ; 3 mM MgCl₂ ; 1% Tween-20 ; 0.5% sodium deoxycholate, qsp cold water) pendant 5 min sur glace. Après deux lavages dans du PBS froid pendant 5 min, les cellules sont fixées pendant 20 min avec du paraformaldéhyde (3.8% dans le PBS) et perméabilisées pendant 15 min avec 0.5% Triton X-100 à température ambiante. Après un lavage au PBS pendant 5 min, les cellules sont bloquées avec du PBS-10% sérum de chèvre pendant 45 min à température ambiante. Les cellules sont incubées avec les anticorps primaires anti-RAD51 (1/500) (H92, Santa Cruz) et anti- γ -H2AX (1/6000) (JBW301, Upstate) pendant 2h à température ambiante. Les cellules sont lavées deux fois au PBS pendant 5 min puis incubées avec l'anticorps secondaire (1/800) pendant 1 h à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les anticorps secondaires sont couplés à Alexa 488 ou Alexa 568 (Invitrogen). Les lamelles sont lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS contenant du DAPI (1/1000) puis montées sur lames avec du PBS-glycérol (90%) contenant 1 mg/mL de paraphénylenediamine.

2.7. Test d'efficacité de la RH

100 000 cellules sontensemencées dans chaque puits d'une plaque 12 puits dans un milieu DMEM contenant du SVF 10% et des antibiotiques (pénicilline-streptomycine 1%). Les plaques sont incubées pendant 24h dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂. Les cellules sont ensuite transfectées. Pour cela, 1,5 μ L de FuGENE (Promega) est ajouté à 50 μ L d'Opti-MEM (ThermoFischer Scientific), puis le mélange est incubé pendant 5 min à température ambiante. 0,5 μ g d'ADN plasmidique contenant le gène *IsceI* (généreusement fourni par Dr Lopez Bernard) est ensuite ajouté au mélange et le tout est incubé pendant 15 min à température ambiante. L'intégralité du mélange est déposée goutte à goutte au milieu cellulaire, puis les plaques sont incubées pendant 3h à 37°C et 5% CO₂. Les molécules sont ensuite ajoutées dans chacun des puits correspondants à une concentration finale de 10 μ M, puis les plaques sont incubées à 37°C et 5% CO₂. Après 17h d'incubation, le milieu de culture est retiré, les cellules lavées au PBS puis trypsinées. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du milieu DMEM,

puis centrifugées pendant 7 min à 300 g. Le culot cellulaire est resuspendu dans du PBS, puis divisé en deux parties pour une analyse par Western blot et une analyse par cytométrie en flux. Chaque tube est de nouveau centrifugé pendant 7 min à 300 g.

2.8. Western-blot

Le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon de lyse (Cell Signaling Technology) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases, puis incubé pendant 10 min sur glace. Les cellules sont placées en sonication pendant 5 min puis les extraits protéiques sont dosés par la méthode BCA. Chaque extrait protéique (15 µg) est ensuite déposé sur un gel de polyacrylamide 15%, puis la migration s'effectue pendant 2h à 90 V. Les échantillons sont transférés sur membrane de nitrocellulose pendant 1h30 à 300 mA (4°C). La membrane est incubée dans le tampon de blocage (PBS-BSA 5 %) pendant 1h à température ambiante. Après lavages au TPBS, la membrane est incubée dans une solution contenant l'anticorps anti-HA 1/1000 (Sigma) pendant 1h30 à température ambiante. Suite aux lavages au TPBS, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa680 1/10000 (Thermo Scientific) pendant 45 min à température ambiante. Après lavages, les résultats sont révélés à l'aide d'un scanner LICOR Odyssey Imager.

2.9. Cytométrie en flux

Le culot cellulaire est resuspendu dans du paraformaldéhyde 4%, puis les tubes sont placés sur une roue tournante pendant 20 min à température ambiante. Du PBS est ensuite ajouté à chacun des tubes. Les échantillons sont ensuite dilués au 1/2 avant la lecture des résultats sur un cytomètre en flux BD LSR II (BD Biosciences) via le logiciel BD FACSDiva.

2.10. Test de survie

5000 cellules EUFA1341 et EUFA1341-PALB2WT sont déposées dans des plaques 96 puits en présence de RPMI 10% SVF-1% pénicilline/streptomycine. La molécule testée est ajoutée le lendemain suivant un gradient de concentrations croissantes. Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif. Les plaques sont incubées pendant 5 jours à 37°C. Les cellules sont ensuite traitées avec le réactif MTT (ATCC) pendant 2h à 37°C. Le détergent est ajouté et les plaques sont incubées à température ambiante sur la nuit et à l'abri de la lumière. Les résultats sont obtenus après lecture à 550 nm des plaques sur un scanner Cytation 5 (Biotek) via le logiciel Gen5.

3. Résultats

3.1. Le DIDS et ses dérivés N3 et NAc inhibent l'association RAD51-ADNsb

Nous avons cherché à analyser l'effet du DIDS ainsi que des dérivés (Figure 17) sur la capacité de RAD51 à se lier à l'ADNsb et à former le nucléofilament par la méthode de *bio-layer interferometry* (mesures Blitz). Deux types d'approches ont été envisagées, la première afin de déterminer l'impact des molécules sur l'association de RAD51 à l'ADNsb et la seconde sur leurs capacités à dissocier le nucléofilament. Concernant la première approche, nous avons pré-incubé RAD51 avec la molécule d'intérêt pendant 5 minutes avant de mesurer l'efficacité de liaison de RAD51 à l'ADNsb. On note que sur les cinq molécules testées, trois d'entre elles ont un effet sur RAD51 et empêchent sa liaison à l'ADNsb (Figure 18-A), à savoir le DIDS, les dérivés N3 et NAc. Nous avons voulu nous intéresser plus particulièrement à l'effet de ces trois molécules actives et notamment déterminer si cet effet est dose-dépendant. En pré-incubant RAD51 avec trois concentrations différentes (2, 10 et 20 μM) de chacune de ces trois molécules, on note que quelle que soit la molécule mise en jeu, l'effet est dose-dépendant (Figure 18-B/C/D). Il s'avère également que le DIDS soit la molécule la plus active des trois. Pour évaluer la capacité des cinq molécules à influencer sur la stabilité du nucléofilament, nous avons laissé RAD51 s'associer à l'ADNsb, puis nous avons ajouté la molécule d'intérêt pour évaluer l'effet sur la stabilité du nucléofilament RAD51-ADNsb. De manière intéressante, les trois molécules inhibant l'association RAD51-ADNsb déstabilisent également le nucléofilament (Figure 18-E). Le DIDS et le dérivé N3 entraînent la dissociation totale du filament RAD51-ADNsb, alors que le dérivé NAc a un effet moindre. Les deux dernières molécules n'influencent pas non plus sur la stabilité du filament.

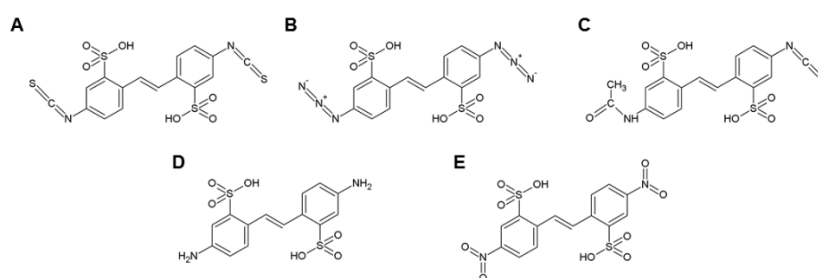


Figure 18 – Structures chimiques du DIDS et de ses dérivés.

(A) DIDS, (B) dérivé N3, (C) dérivé NAc, (D) dérivé NH₂ et (E) dérivé NO₂.

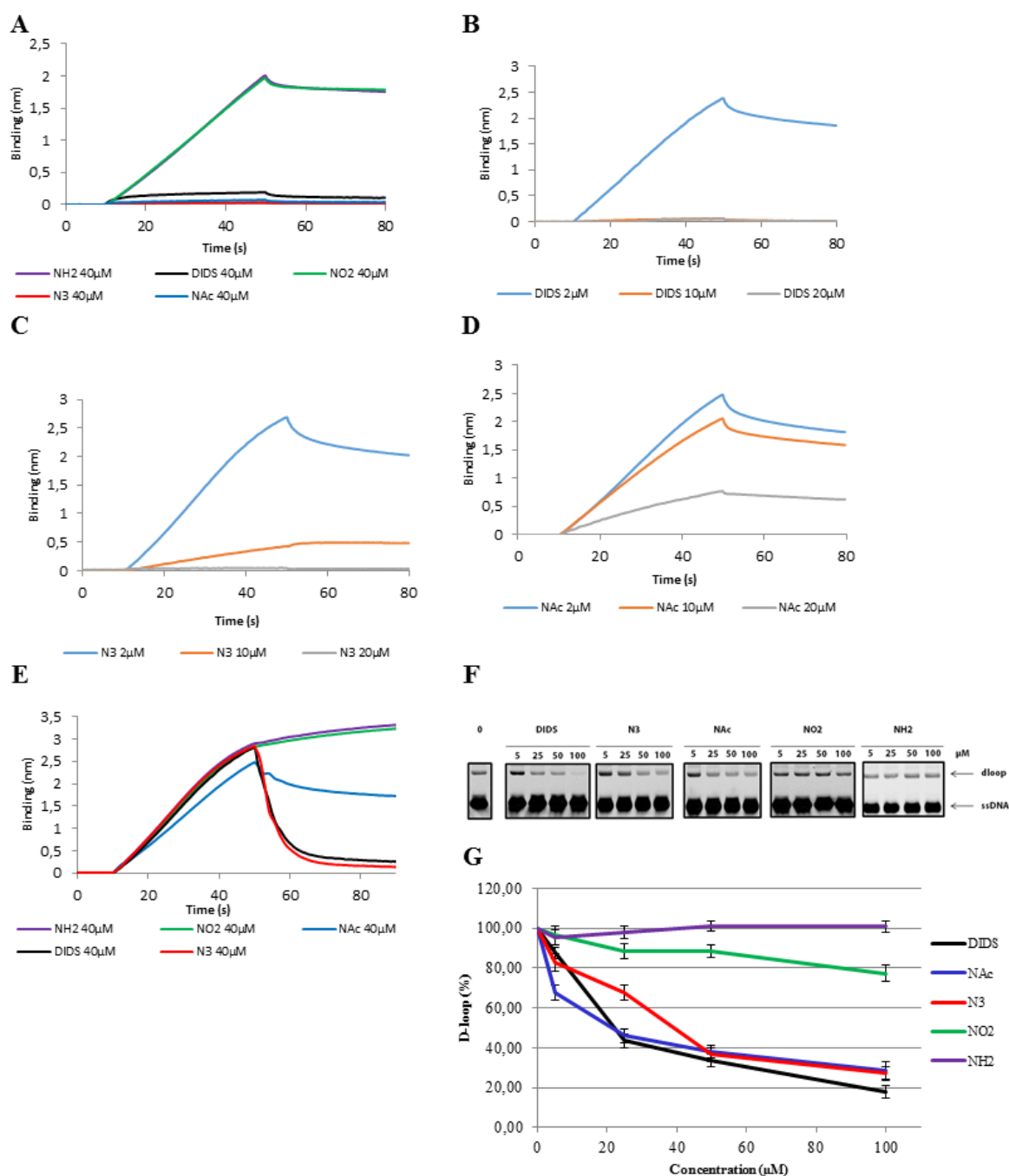


Figure 19 – Effet du DIDS et de ses dérivés sur la liaison de RAD51 à l'ADNsb et sur la formation de la D-loop.

(A) L'impact des molécules sur la capacité de RAD51 à lier l'ADNsb est évalué par biointerférométrie. RAD51 est pré-incubé avec chacune des molécules avant la lecture des résultats. RAD51 est pré-incubé avec le DIDS (B), le dérivé N3 (C) et le dérivé NAc (D) à trois concentrations différentes (2, 10 et 20 μM). (E) RAD51 s'associe à l'ADNsb pendant 40 sec, puis la molécule est ajoutée à la réaction (40 μM). (F) Effet des molécules sur la capacité de formation de la D-loop par RAD51 à quatre concentrations différentes (5, 25, 50 et 100 mM). (G) L'effet des molécules est mesuré pour évaluer leur efficacité.

3.2. Le DIDS et les dérivés N3 et NAc inhibent la formation de la D-loop par RAD51

Nous avons ensuite voulu évaluer l'impact de ces cinq molécules sur une fonction primordiale de RAD51 durant la RH, la formation de la D-loop. En incubant RAD51 en présence d'une concentration croissante de DIDS, on observe une diminution de l'efficacité de RAD51 à réaliser la formation de la D-loop (Figure 18-F et G). De manière intéressante, les dérivés N3 et NAc sont également capables d'inhiber cette activité de RAD51, cet effet étant également dépendant de la concentration en molécule. Les deux autres dérivés qui ne présentaient pas d'effet sur la liaison de RAD51 à l'ADNsb et la stabilité du nucléofilament ne montrent pas d'effet sur la formation de la D-loop.

3.3. Le DIDS et les dérivés N3 et NAc empêchent également la formation des foyers RAD51

Le DIDS ainsi que les dérivés N3 et NAc ont un effet inhibiteur sur RAD51 *in vitro*, l'empêchant d'exercer ses capacités de liaison à l'ADNsb, d'invasion de l'ADNdb et de recombinaise. Nous avons voulu observer l'impact de ces molécules ainsi que des dérivés NO2 et NH2, sans effet *in vitro*, sur l'activité intracellulaire de RAD51. En effet, RAD51 est capable de former des foyers de réparation, correspondant à des complexes protéiques au niveau des CDB, après induction de ces lésions ³⁵⁷. Après incubation de cellules HeLa en présence de chaque molécule (100 μ M) et induction de CDB par la néocarzinostatine (50 ng/mL pendant 30 minutes), nous avons observé et mesuré la capacité de RAD51 à former des foyers. En plus d'avoir un effet *in vitro*, le DIDS a également un impact *in cellulo*, puisque la formation de foyers de RAD51 est diminuée en présence de la molécule (Figure 19-A). La comparaison avec le contrôle (Figure 19-A, CTL), le nombre de cellules possédant plus de 10 foyers de RAD51 est grandement diminué (Figure 19-B). Les deux autres molécules capables d'inhiber RAD51 *in vitro*, les dérivés N3 et NAc, montrent le même effet dans la cellule, mais semblent moins efficaces que le DIDS, le nombre de cellules positives (10-40 foyers et >40 foyers) étant plus faibles. Les deux dérivés du DIDS inactifs *in vitro* le sont également *in cellulo*. Leur impact sur la formation des foyers RAD51 après induction de CDB étant proche de celui du contrôle. La protéine H2AX est un marqueur de la présence de CDB dans la cellule sous sa forme phosphorylée γ -H2AX ³³. De manière intéressante, certaines des molécules testées influent sur la formation des foyers γ -H2AX (Figure 19-C). Deux des trois molécules inhibitrices de RAD51, le DIDS et le dérivé N3, entraînent une augmentation du nombre de foyers de γ -H2AX. Ceci est dû au fait que RAD51 ne peut former des foyers à cause de ces molécules, les CDB ne sont ainsi pas réparées et H2AX continue à être recrutée au site de cassure pour induire leur

réparation. A la différence de ces deux molécules, la troisième molécule inhibitrice, le dérivé NAc, n'entraîne pas une augmentation du nombre de foyers de γ -H2AX, celui-ci reste similaire au contrôle. Cette molécule de structure chimique asymétrique n'est sans doute pas assez efficace pour empêcher RAD51 de réparer les CDB *in cellulo* à cette concentration (100 μ M). Le dérivé NO2 n'a pas d'impact sur la formation des foyers de RAD51 mais il est surprenant de constater une augmentation du nombre de foyers de γ -H2AX, sûrement dû à une toxicité de la molécule pour la cellule associée à la néocarzinostatine. Il est à noter qu'en absence de traitement à la néocarzinostatine, aucune des 5 molécules testées n'induit une augmentation du nombre de foyers RAD51 ou γ -H2AX.

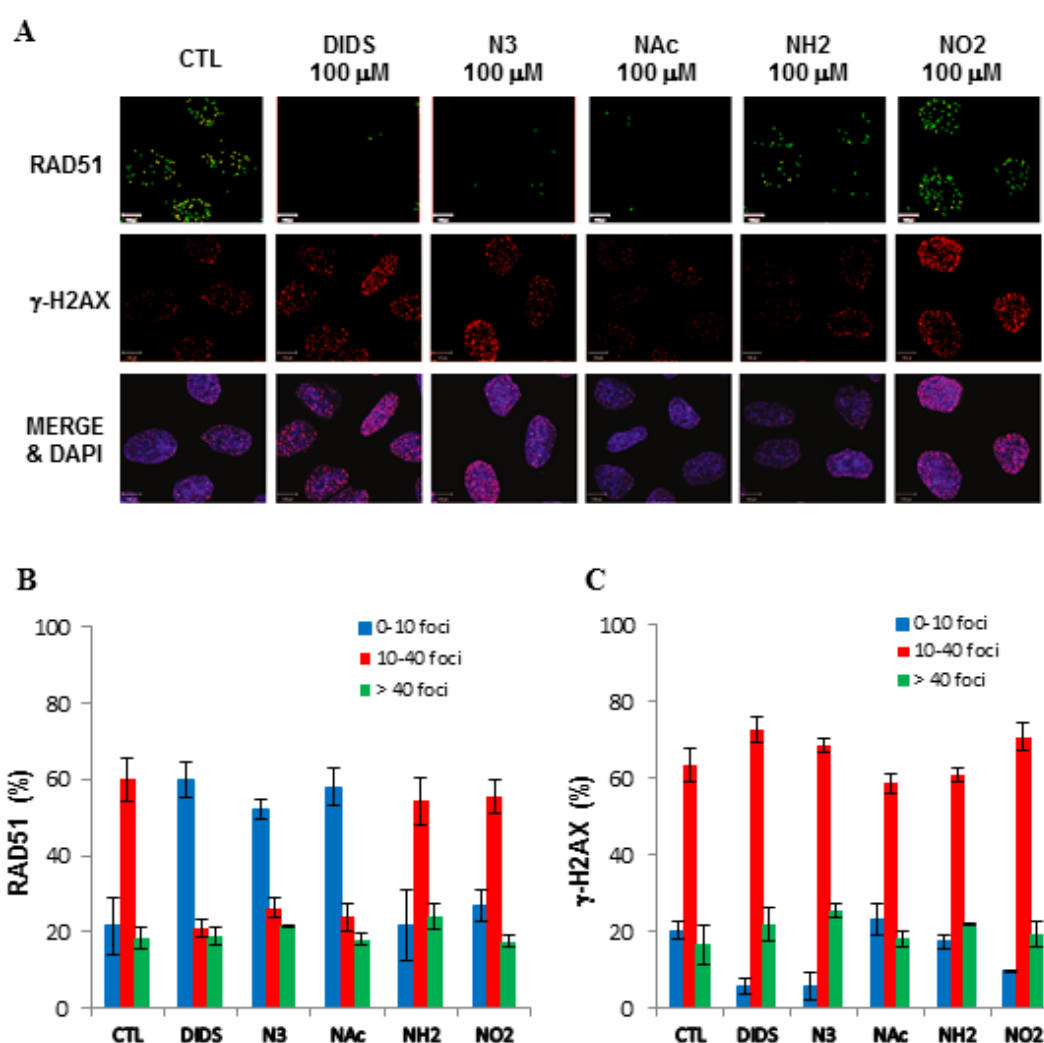


Figure 20 – Effet du DIDS et de ses dérivés sur la formation des foyers de RAD51 et γ -H2AX après induction de CDB par la néocarzinostatine.

(A) Les cellules sont incubées pendant 24h en présence des molécules puis traitées à la néocarzinostatine (30 ng/mL) pendant 30 min toujours en présence des molécules. L'effet des molécules sur la formation des foyers de RAD51 (B) et γ -H2AX (C) est évalué.

3.4. L'impact du DIDS sur l'efficacité de la recombinaison homologe intracellulaire

Afin d'évaluer l'effet du DIDS et de ses dérivés sur l'efficacité de la RH, nous avons mis en place un test basé sur la transfection de cellules par un plasmide codant la nucléase I-SceI. Ce système de double cassette permet de créer une CDB via l'action de I-SceI, capable de couper une séquence d'ADNdb contenant un site spécifique de coupure pour l'enzyme. Ce site de coupure spécifique de I-SceI est contenu dans une cassette codant la protéine fluorescente GFP. Lorsque la RH est efficace, la CDB créée par I-SceI est réparée, entraînant une augmentation de la fluorescence qui peut être quantifiée.

Nous avons tout d'abord validé la transfection en confirmant l'expression de l'endonucléase I-SceI par western-blot (Figure 20).

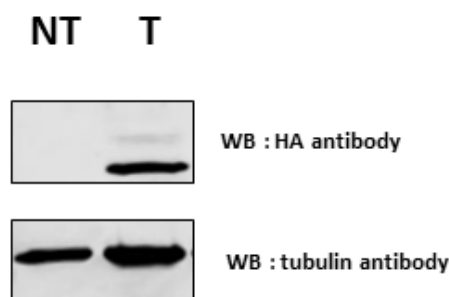


Figure 21 - Expression d'I-SceI taggé HA après transfection dans des cellules RG37.

Des cellules RG37 sont transfectées avec le plasmide codant I-SceI taggé avec l'étiquette HA. Les niveaux d'expression de I-SceI et de l'alpha-tubuline sont observés par western-blot (NT=Non Transfecté, T=Transfecté).

Nous avons ensuite étudié l'impact du DIDS et du dérivé N3 sur l'efficacité de la RH dans la cellule. En présence du DIDS 1 μ M, l'efficacité de la RH est très diminuée (Figure 21). Dans ces conditions, le pourcentage de cellules exprimant la GFP est comparable à celui de cellules non transfectées. Le même résultat est observé avec le dérivé N3 1 μ M. Ces deux molécules semblent avoir un effet inhibiteur sur la RH intracellulaire. Cependant ces résultats demandent confirmation.

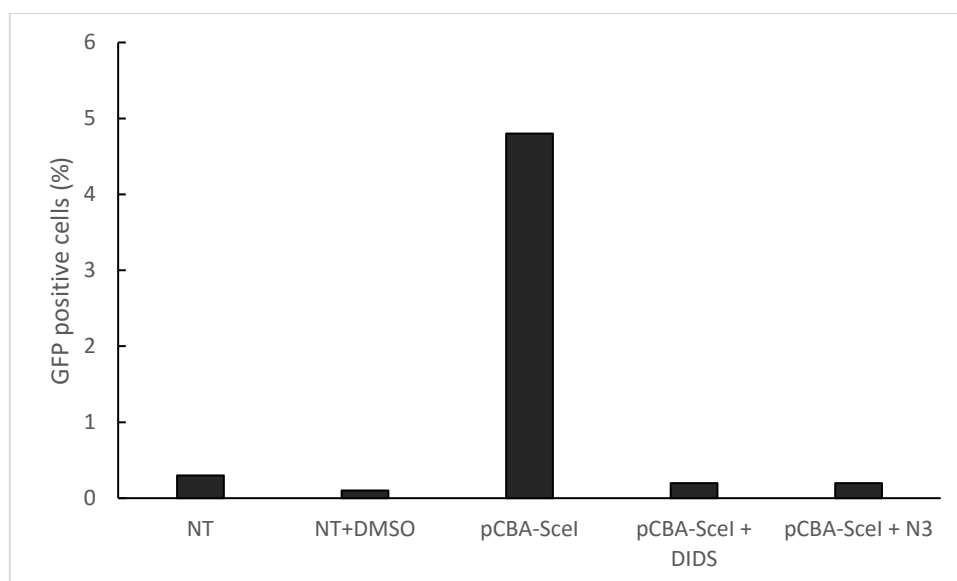


Figure 22- Evaluation de l'efficacité de la RH dans des cellules transfectées avec I-SceI en présence du DIDS ou du dérivé N3.

Des cellules RG37 sont transfectées avec le plasmide codant l'endonuclease I-SceI, puis traitées ou non avec du DIDS 1 μM ou du dérivé N3 1 μM . Les cellules sont ensuite fixées et analysées par cytométrie en flux à l'aide du logiciel BD FACSDiva.

3.5. Le DIDS et les dérivés N3 et NAc inhibent également l'hybridation par RAD52

Afin d'évaluer l'efficacité de RAD52 pour hybrider deux ADNsb, nous avons développé une nouvelle technique de mesure basée sur la fluorescence (Figure 22). Elle permet de suivre l'association grâce au couplage d'un des brins par un fluorophore (FAM) et de l'autre brin par un quencher (BHQ). L'association des deux brins est ainsi corrélée à une diminution du signal de fluorescence. De manière intéressante, le DIDS est capable d'inhiber la formation de l'ADNdb de manière dose-dépendante (Figure 23-A), l'effet étant maximal pour une concentration de 1 μM de molécule. Deux molécules dérivées ont également un effet inhibiteur dose-dépendant sur RAD52 : les dérivés N3 (Figure 23-B) et NAc (Figure 23-C). Cependant, ces deux molécules sont moins efficaces, les concentrations nécessaires pour atteindre l'inhibition maximale étant respectivement de 20 μM et 500 μM . L'effet du DIDS sur RAD52 a également été confirmé par un test d'hybridation par radioactivité (Figure 23-D et E).

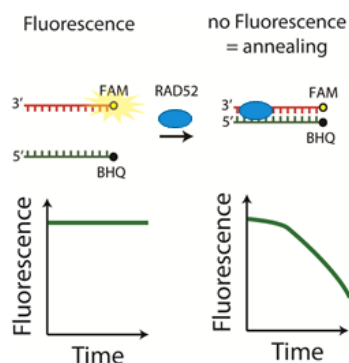


Figure 23 – Principe de la méthode de mesure par fluorescence pour évaluer la fonction d'hybridation de RAD52.

Deux ADNsb complémentaires sont marqués, le premier par FAM (ex : 495 nm / em : 520 nm) et le second par BHQ (ex : 534 nm / em : 580 nm). Quand les deux brins d'ADN sont distants l'un de l'autre, et excités à 495 nm, un signal de fluorescence est observé à 520 nm. En présence de RAD52, sa fonction d'hybridation entraîne l'association des deux brins aboutissant à un rapprochement du fluorophore FAM et du quencher BHQ. Si le milieu est excité à 495 nm, BHQ absorbe le signal de fluorescence émis par FAM menant à une diminution du signal de fluorescence.

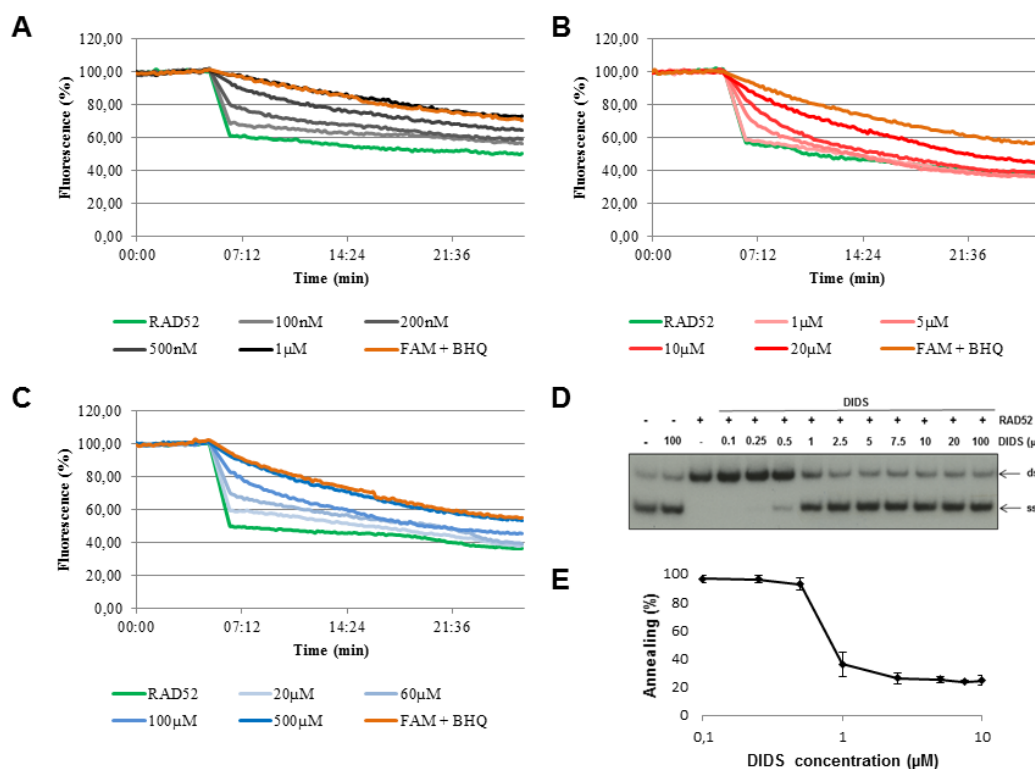


Figure 24 – Effet du DIDS et de ses dérivés sur la fonction d'hybridation de RAD52.

Trois molécules ont été évaluées sur leur capacité à inhiber l'hybridation par RAD52 : (A) le DIDS, (B) le dérivé N3 et (C) le dérivé NAc. (D) L'effet du DIDS sur RAD52 est également évalué par un test d'hybridation par radioactivité. (E) L'effet d'une concentration croissante de DIDS est également quantifié.

3.6. Le DIDS et les dérivés N3 et NAc n'ont pas d'effet dans la cellule sur RAD52

En ce qui concerne l'effet des molécules sur RAD52 *in cellulo*, nous avons traité des cellules *PALB2* déficientes avec les molécules (Figure 24). En effet, un effet de létalité synthétique existe lorsque l'on inhibe RAD52 dans des cellules déficientes en *PALB2* ²⁸⁴. Sur les trois molécules capables d'inhiber la fonction d'hybridation de RAD52 *in vitro*, aucune ne semble avoir d'effet sur la viabilité de ces cellules. On observe une légère diminution de viabilité, mais aucune différence lorsque les cellules sont incubées en présence ou non des molécules. Ceci semble indiquer que les trois molécules actives *in vitro* ne le sont plus dans la cellule, même à forte concentration (jusqu'à 100 μ M).

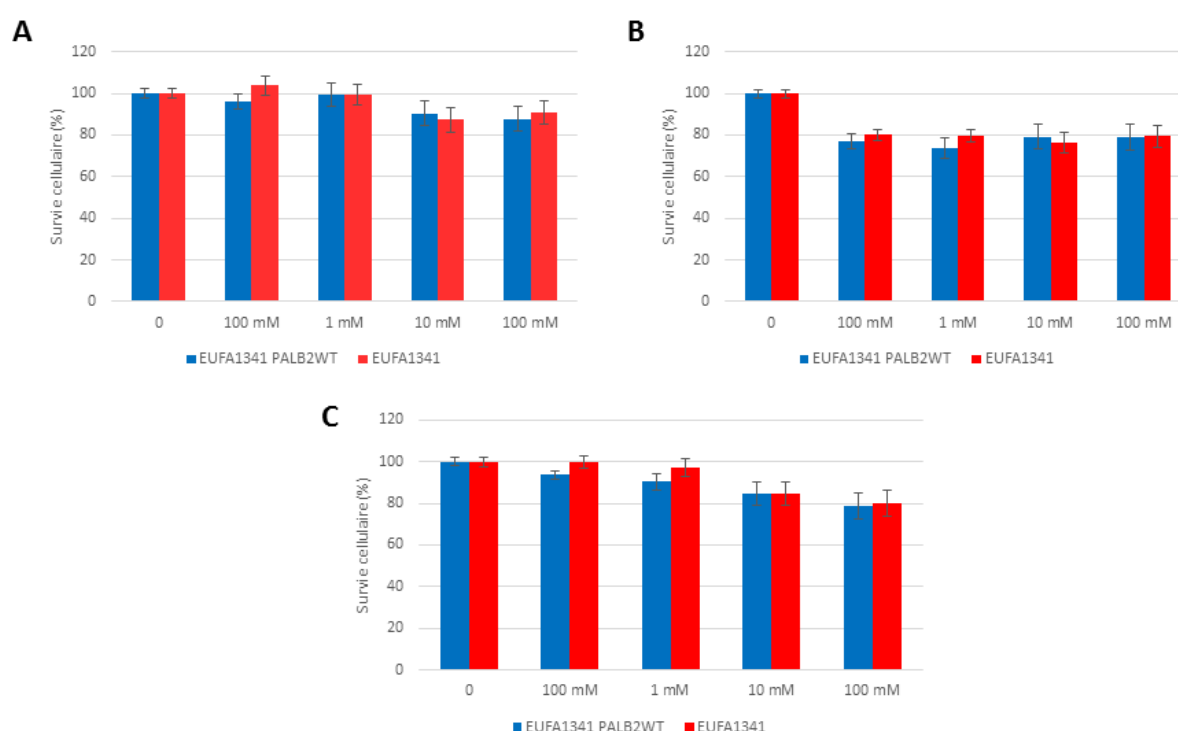


Figure 25 – Impact du DIDS et de ses dérivés sur la viabilité de cellules déficientes en *PALB2*.

Les cellules EUFA1341-PALB2WT et EUFA1341 sont incubées pendant 5 jours en présence de différentes concentrations (10 nM, 100 nM, 1 mM et 10 mM) de trois molécules : (A) DIDS, (B) dérivé N3 et (C) le dérivé NAc. Pour mesurer l'impact des molécules, un test de survie par MTT est réalisé. La lecture des plaques a été faite sur un appareil Cytation 5.

4. Discussion

La recherche et le développement de nouvelles molécules anti-cancéreuses constituent un véritable challenge dans la recherche de solutions au traitement du cancer. Le rôle de RAD51 dans plusieurs types de cancer ^{209–212} nous a conduits à nous intéresser au DIDS, une petite

molécule de la famille des stilbènes dont l'effet sur RAD51 a été démontré mais son mécanisme pas encore résolu ³⁴⁰. Pour ce faire, nous avons voulu évaluer l'impact de molécules dérivées du DIDS sur RAD51, en commençant par sa capacité de liaison à l'ADNsb. Pour cela, nous avons utilisé la détection de l'interaction ADNsb-RAD51 par *bio-layer interferometry*. Nous avons montré que le DIDS ainsi que les dérivés N3 et NAc, à la différence des dérivés NH2 et NO2, empêchent la liaison de RAD51 à l'ADNsb et dissocient le nucléofilament. Cet effet est dépendant de la concentration en molécule, le DIDS étant la molécule la plus active des trois. En plus de l'effet sur la liaison de RAD51 à l'ADNsb, ces trois molécules actives le sont également sur la fonction de formation de D-loop de RAD51. L'effet dose-dépendant de ces trois molécules est également retrouvé dans cette inhibition. En plus d'avoir un effet *in vitro*, ces trois molécules agissent *in cellulo*, en empêchant la formation de foyers RAD51 dans la cellule après induction de CDB. Il a déjà été montré que le DIDS entraînait une diminution du nombre de foyers RAD51 dans des cellules B après irradiation ³⁴². Le DIDS et le dérivé N3 sont également capables d'induire une diminution de l'efficacité de la RH. Ces résultats demandent une confirmation. En effet, une variabilité dans l'efficacité de transfection peut totalement affecter le rendement de la RH ³⁵⁸.

La linéarité chimique des groupements isothiocyanate du DIDS et du dérivé NAc, ainsi que celle des groupements azide présents sur le dérivé N3 pourrait jouer un rôle important dans leurs capacités à inhiber RAD51. En effet, le groupement azide est un groupement chimique connu pour être peu réactif biologiquement ³⁵⁹. En effet, le groupement azide est peu électrophile et de ce fait n'interagit pas avec les amines et d'autres nucléophiles forts que l'on retrouve en abondance dans les systèmes biologiques. Cependant, il existe une molécule thérapeutique possédant un groupement azide, et utilisé dans le traitement du SIDA. Il s'agit de l'AZT (azidothymidine ou 1-[(2R,4S,5S)-4-azido-5-(hydroxyméthyl)oxolan-2-yl]-5-méthylpyrimidine-2,4-dione[1]), un inhibiteur de la transcriptase inverse, qui est incorporé dans la séquence nucléotidique de l'ADN viral entraînant l'arrêt de la transcription ³⁶⁰. Malgré cela, le groupement azide est notamment utilisé dans les réactions de chimie click ou comme rapporteur chimique dans les systèmes vivants ³⁵⁹. L'effet du dérivé N3 reste intéressant dans notre cas. Etant donné la faible réactivité du groupement azide dans un système biologique et dans nos conditions expérimentales, la linéarité de ce groupement, similaire à celle du groupement isothiocyanate pourrait être liée à l'inhibition de RAD51. Cette caractéristique ouvre des perspectives intéressantes dans le développement d'inhibiteurs de RAD51.

RAD51 et RAD52 ne font pas partie de la même famille protéique, RAD51 appartenant à la famille des protéines RecA ¹²⁴ alors que RAD52 est lié à la famille des protéines RAD52 ³⁶¹. Il existe ainsi peu de similarités entre les deux protéines ³⁶²⁻³⁶⁴, ce qui n'explique pas l'effet observé à la fois du DIDS et des dérivés N3 et NAc sur RAD51 et RAD52 *in vitro*, et cela même à des concentrations faibles. En effet, des structures similaires entre les deux protéines auraient pu expliquer la liaison de ces molécules au niveau d'un site retrouvé sur les deux protéines. Cependant, les deux protéines possèdent des sites de liaison à l'ADNsb dont les caractéristiques structurales sont possiblement ressemblantes. A noter également que les trois molécules actives *in vitro*, ne le sont plus *in cellulo* sur RAD52. En les testant dans des cellules déficientes en *PALB2*, pour lesquelles une létalité synthétique a été observée lorsque RAD52 était inhibée ²⁸⁴, la viabilité cellulaire n'est pas affectée. L'effet *in cellulo* de ces trois mêmes molécules a été observé pour RAD51, puisqu'elles entraînent une diminution des foyers RAD51 dans des cellules HeLa après induction de CDB. Cette différence peut s'expliquer par un mode d'action différent de ces trois molécules vis-à-vis des deux protéines et une affinité beaucoup plus forte pour RAD51.

5. Conclusion

La recherche de médicaments ciblant le cancer constitue un challenge important de nos jours. Cibler la réparation de l'ADN et notamment RAD51 fait partie des stratégies étudiées actuellement et quelques molécules ont montré des résultats intéressants et prometteurs. Dans cette étude, nous avons montré que le DIDS peut inhiber RAD51 et RAD52 *in vitro*, mais a un effet *in cellulo* uniquement sur RAD51. Le rôle des groupements isothiocyanate du DIDS dans l'inhibition de RAD51 semble se confirmer par l'utilisation de molécules dérivées. Ces résultats nous confortent dans le choix de la voie de la recherche et le développement de nouvelles molécules inhibitrices de protéines de la réparation de l'ADN et en particulier RAD51.

Chapitre 5

Chapitre 5 – Recherche de nouveaux inhibiteurs de RAD52 (résultats préliminaires)

Résumé : RAD52 est une protéine impliquée dans la voie de réparation par recombinaison homologue (RH). L'inactivation de RAD52 dans les cellules déficientes en *BRCA1*, *BRCA2* ou *PALB2* entraîne une augmentation de la mortalité, par le phénomène de létalité synthétique. Développer des inhibiteurs de RAD52 pour cibler les cancers présentant des altérations génétiques pour *BRCA1*, *BRCA2* ou *PALB2* constitue une stratégie thérapeutique prometteuse. Ainsi, nous avons criblé une banque de 696 molécules à la recherche d'un inhibiteur potentiel. Pour ce faire, nous avons développé une méthode de criblage par fluorescence en mesurant l'impact de ces molécules sur l'activité d'hybridation de RAD52. Nous avons mis en évidence 3 molécules capables d'inhiber RAD52 par ce test biochimique et une d'entre elles montre un effet sur des cellules exprimant une forme tronquée de PALB2. Des tests supplémentaires doivent être réalisés, une optimisation des molécules également, mais ces premiers résultats sont intéressants dans la recherche d'inhibiteurs ciblant RAD52.

1. Introduction

La cellule est constamment soumise à des stress pouvant induire des lésions dans son ADN. La lésion la plus délétère pour elle est la cassure double-brin (CDB) dans son ADN qui peut mener à la mort de la cellule si elle n'est pas réparée. Cependant, la cellule possède des mécanismes pour pouvoir réparer ces dommages et survivre, les deux principaux mécanismes étant la recombinaison homologue (RH) et la réparation par ligation d'extrémités non-homologues (LNHE)³⁶⁵. Une voie alternative à ces deux voies existe, l'hybridation simple-brin (HSB) médiée par la protéine RAD52³⁶⁶.

Rad52 est une protéine très bien caractérisée chez *Saccharomyces cerevisiae*, dont le rôle est primordial pour la cellule, celle-ci n'exprimant pas de forme de BRCA2^{75,249,367}. Chez l'homme, RAD52 ne semble pas revêtir la même importance dans la réparation de l'ADN, l'inactivation de RAD52 n'ayant que peu d'effet sur les souris. De plus, lorsque l'on inactive RAD52 dans des cellules souches, cela ne les rend pas plus sensibles aux agents inducteurs de CDB^{292,293}.

RAD52 possède cependant plusieurs rôles chez la cellule humaine. Elle est responsable en partie du recrutement de RAD51 aux sites de cassure double-brin, notamment par son interaction avec l'ADN et RPA. Elle participe également à une étape plus tardive de la RH, la capture de la seconde extrémité (*second-end capture*). RAD52 est également impliquée dans un système de réparation des CDB, l'hybridation simple-brin, indépendante de RAD51.

Récemment, l'intérêt pour l'étude de RAD52 dans le cancer a grandi. En effet, il a été montré que dans les cellules cancéreuses déficientes en *BRCA2*⁷⁸, *BRCA1* ou *PALB2*²⁸⁴, l'inactivation de RAD52 aboutissait à la mort cellulaire selon le phénomène de létalité synthétique.

Trois études ont montré qu'il était possible de cribler des banques de molécules à la recherche d'un potentiel inhibiteur de RAD52. Ainsi, Chandramouly et al, ont mis en évidence l'effet inhibiteur de la molécule 6-OH-dopa sur RAD52³⁴⁶. Après le criblage d'une banque de molécules, la 6-OH-dopa se révèle être un inhibiteur allostérique de RAD52 capable de désassembler les anneaux de RAD52. Cette petite molécule empêche également la croissance des cellules déficientes en *BRCA1* et *BRCA2*. Une autre étude très récente a également mis en évidence une molécule inhibitrice de RAD52³⁴⁷. Après le criblage d'environ 140 000 molécules et des tests de sélectivité, deux molécules sont capables d'inhiber RAD52 *in vitro* et *in vivo*,

l'A5MP et l'AICAR/ZMP. En présence de cisplatine et de chacune des deux molécules, le nombre de foyers de RAD52 est diminué. Ces deux molécules peuvent également induire la mort des cellules HCC1937, mutées pour *BRCA1*, et Capan-1, qui expriment une forme tronquée de *BRCA2*. Récemment, une étude a mis en évidence plusieurs molécules capables d'inhiber RAD52, dont deux d'entre elles, D-I03 et D-G23, empêchent l'hybridation par RAD52³⁶⁸. Ces deux molécules ont également un effet sur les cellules, puisque D-I03, la molécule la plus active, diminue la survie de cellules de patients atteints de leucémie myéloïde chronique, cellules qui sous-expriment *BRCA1*. Ces deux molécules empêchent également la formation des foyers RAD52 dans des cellules traitées à la cisplatine, D-I03 n'ayant pas d'effet sur la formation des foyers RAD51. D-I03 inhibe la SSA, mais n'a pas d'effet sur la RH, confirmant que c'est RAD52 qui est spécifiquement inhibée.

Nous avons développé, dans le laboratoire, une technique de criblage par fluorescence basée sur la capacité d'hybridation de deux ADNsb de RAD52. Nous avons utilisé cette technique pour chercher parmi une banque de 696 molécules de potentiels inhibiteurs de RAD52. Nous avons mis en évidence 2 molécules capables d'inhiber RAD52. Des tests cellulaires ont permis de montrer que ces molécules augmentaient la mortalité des cellules EUFA-1341, exprimant une forme tronquée de *PALB2*. Ces résultats préliminaires sont prometteurs, mais des tests supplémentaires sont nécessaires afin de valider l'effet de ces molécules, notamment sur la HSB et la formation des foyers RAD52, puis de développer de nouvelles molécules dérivées plus sélectives et efficaces.

2. Matériel et méthodes

2.1. ADNsb fluorescents

Deux ADNsb sont marqués par FAM (6-carboxyfluorescein, ex : 495 nm/em : 520 nm) pour JYM3024 et BHQ (Black Hole Quencher, ex : 534 nm/em : 580 nm) pour JYM3025. Les deux sondes ADNsb sont commandés chez IDTechnologies.

2.2. Production et purification de RAD52

La production et la purification de RAD52 suivent le protocole suivant²⁴⁷.

2.3. Banque de molécules

La banque de 696 molécules a été synthétisée dans les laboratoires des Dr. R. C. Gaudreault et Dr. S. Fortin.

2.4. Test d'hybridation par fluorescence

Le test de criblage de la banque se base sur le principe de fluorescence et s'effectue avec des plaques 96 puits à fond blanc Greiner Lumitrac 200. Les deux sondes JYM3024 et JYM3025 sont diluées à 25 nM et placées au niveau des injecteurs d'un lecteur de plaque Cytation 5 de Biotek. Le milieu réactionnel (volume final = 100 μ L) comprend le tampon MOPS 5X (125 mM MOPS pH7 ; 150 mM KCl ; 1% Tween-20 ; 10 mM DTT ; qsp H₂O), la molécule à tester 1 mM diluée dans le DMSO, RAD52 à 75 nM dilué dans le tampon SB1X (20 mM Tris-HCl pH8 ; 200 mM KOAc pH8 ; 10% glycerol ; 1 mM EDTA ; 0,5 mM DTT ; qsp H₂O). Le volume est complété par de l'eau. Les manipulations sont programmées à l'aide du logiciel Gen5.

2.5. Test de survie cellulaire

L'effet des molécules est testé sur les cellules EUFA-1341 par un test MTT en plaque 96 puits ThermoScientific Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base. 1000 cellules sont déposées dans chaque puits dans du milieu RPMI 10% glucose-1% pénicilline/streptomycine et incubées sur la nuit à 37°C. Les molécules diluées dans le milieu sont ajoutées le lendemain et la plaque est incubée pendant 7 jours à 37°C. Pour révéler les résultats, le réactif MTT est ajouté au milieu, la plaque est centrifugée brièvement puis incubée pendant 2h à 37°C. Le détergent est ensuite ajouté dans chaque puits, puis la plaque est centrifugée brièvement et incubée à température ambiante durant la nuit. La plaque est révélée par lecture optique à 550 nm sur un Cytation 5 de Biotek.

3. Résultats

3.1. Mise en place de la méthode de criblage

Afin de cribler la banque de molécules disponibles, nous avons développé une méthode de mesure de l'effet de ces molécules sur la capacité de RAD52 à hybrider deux ADNsb (cf chapitre 4 – Figure 22, page 149).

Nous avons voulu tout d'abord vérifier la faisabilité du test d'hybridation en observant l'interaction des deux brins en absence de RAD52. Pour cela, nous avons préparé le milieu réactionnel sans RAD52. Il s'avère que les deux ADNsb (5 nM chacun) sont capables de s'hybrider, puisqu'une diminution de la fluorescence est observée. Ce phénomène, dénommé hybridation spontanée, s'explique par la complémentarité entre les deux séquences d'ADN qui suffit à une association entre les deux brins. En présence de RAD52 (15 nM), l'hybridation entre les deux ADN est plus rapide, confirmant la capacité de RAD52 à hybrider deux ADNsb et validant l'efficacité de la méthode (Figure 25).

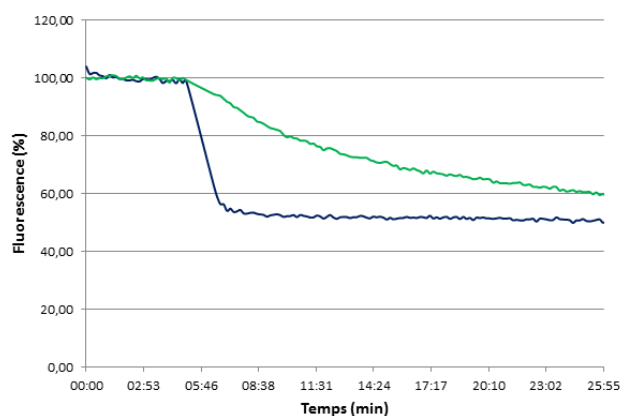


Figure 26 - Effet de l'hybridation entre les deux ADNsb en absence et en présence de RAD52.

La courbe est caractérisée par deux phases : une phase pendant laquelle la fluorescence est constante, correspondant à la présence du seul brin marqué par FAM et une phase de diminution du signal de fluorescence correspondant à la présence des brins d'ADNsb suite à l'injection de l'ADN marqué par BHQ. En absence de RAD52 (vert), la fluorescence diminue, correspondant à une hybridation spontanée entre les deux ADNsb. En présence de RAD52 (bleu), la fluorescence diminue très rapidement après l'ajout de l'ADN marqué par BHQ, ceci étant dû à la capacité d'hybridation de RAD52.

3.2. Deux molécules ont un effet sur la fonction d'hybridation de RAD52

Sur la banque de 696 molécules testées, il s'avère que deux d'entre elles inhibent l'hybridation par RAD52 de manière concentration dépendante. Ces deux molécules sont dénommées SL52-1 et SL52-2.

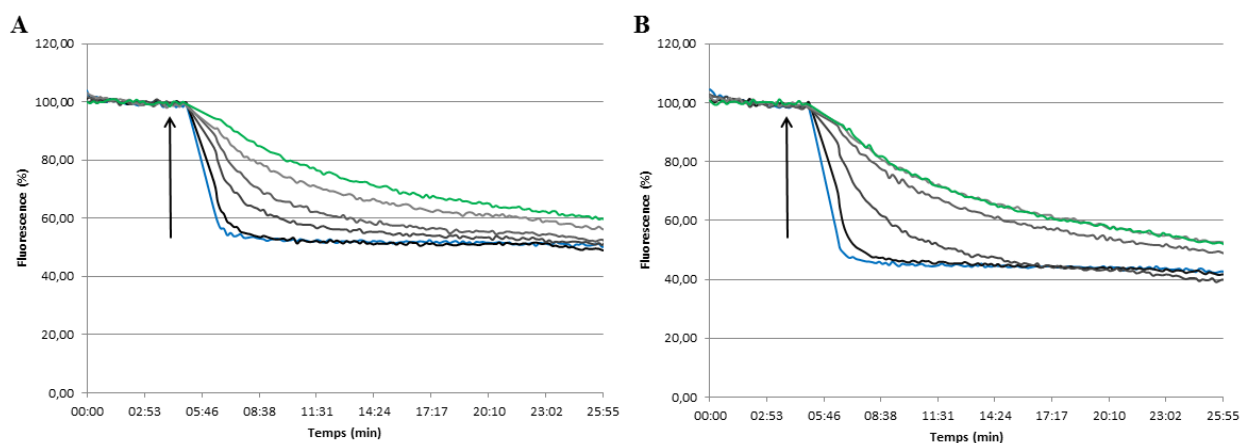


Figure 27 - Effet des molécules SL52-1 et SL52-2 sur l'hybridation d'ADNsb par RAD52.

Le criblage d'une banque de 696 molécules a permis de mettre en évidence deux molécules inhibitrices de RAD52 : SL52-1 (A) et SL52-2 (B). Les concentrations en SL52-1 sont de 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M et 1 mM, selon le sens de la flèche. Concernant SL52-2, les concentrations utilisées sont de 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M et 200 μ M, selon le sens de la flèche.

SL52-2 est la molécule la plus efficace des deux, puisque qu'en présence de 25 μM de SL52-2, l'inhibition est totale, alors qu'elle est atteinte avec 200 μM de SL52-1 (Figure 26). Les structures de chacune des trois molécules sont décrites dans la Figure 27.

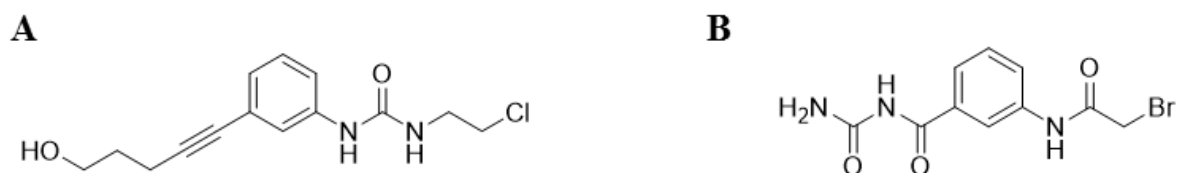


Figure 28 - Structures des molécules SL52-1 et SL52-2.

La figure représente les structures des deux molécules mises en évidence par le test d'hybridation. Il s'agit de SL52-1 (A) et SL52-2 (B).

3.3. Les deux molécules diminuent la survie cellulaire des cellules EUFA1341

Afin de valider l'effet observé *in vitro*, nous avons voulu évaluer l'effet de ces molécules *in cellulo*. Pour cela, nous avons réalisé des tests de survie cellulaire avec des cellules EUFA-1341, exprimant une forme tronquée et inactive de PALB2. Chacune des deux molécules entraîne une augmentation de la mortalité cellulaire. L'effet de létalité synthétique observé est le plus important en présence de SL52-2 (Figure 28-B), cependant, c'est aussi cette molécule qui induit une plus forte toxicité cellulaire à forte dose. L'effet de SL52-2 est observable pour une concentration de 100 nM. SL52-1 est également efficace mais à plus forte concentration (Figure 28-A), une différence de mortalité entre les cellules EUFA-1341-PALB2WT et EUFA-1341 étant observée pour une concentration de 100 μM .

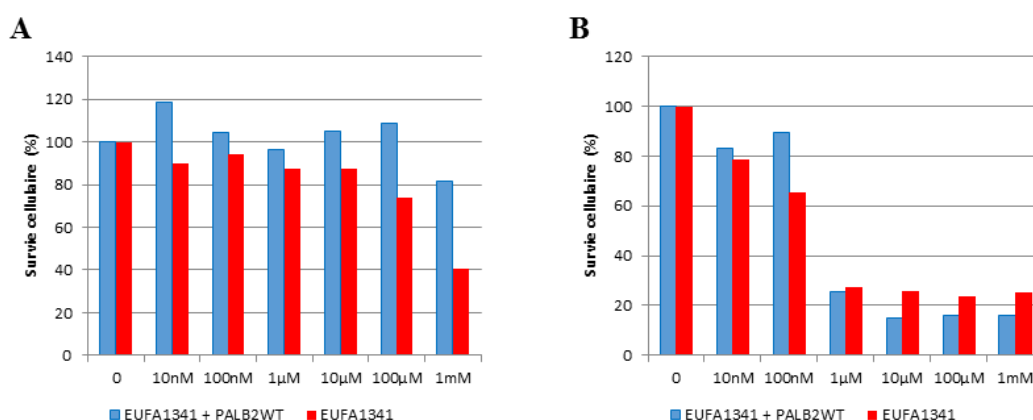


Figure 29 - Impact des molécules SL52-1 et SL52-2 sur la survie cellulaire de cellules déficientes en PALB2.

Des cellules EUFA1341 déficientes en PALB2 et le même type cellulaire complétement sont incubés en présence de concentrations croissantes en SL52-1 (A) et SL52-2 (B) pendant 7 jours. La survie cellulaire est ensuite mesurée via un test MTT.

4. Discussion

L'intérêt pour RAD52 a pris de l'importance dans les avancées thérapeutiques récentes. Il a été montré qu'un phénomène de létalité synthétique existe lorsque l'on inhibe RAD52 dans des cellules déficientes en *PALB2*, *BRCA1*²⁸⁴ ou *BRCA2*⁷⁸. Les gènes *PALB2*, *BRCA1* et *BRCA2* sont parmi les gènes les plus mutés dans les cas de cancer du sein notamment. Via ces découvertes, l'intérêt de rechercher et d'optimiser des inhibiteurs de RAD52 a grandi. Actuellement, trois études ont mis en évidence des molécules capables d'inhiber RAD52 aussi bien *in vitro* qu'*in cellulo*^{346,347,368}.

Trois méthodes ont été jusqu'ici développées pour mettre en évidence des inhibiteurs de RAD52. La première utilise le *docking* de molécules à cribler avec la forme undécamérique de RAD52 (PDB : 1KN0 ;²⁷⁷)³⁴⁷. Ce criblage a permis de définir un classement de molécules les plus affines pour cette forme de RAD52, en se basant notamment sur les interactions électrostatiques et hydrophobiques. Une seconde méthode basée sur la polarisation de fluorescence a été développée pour suivre l'association de RAD52 à l'ADNsb³⁴⁶. En se liant à l'ADN, RAD52 entraîne une augmentation détectable de la polarisation de fluorescence. La méthode développée dans notre étude se base sur une autre capacité de RAD52, à savoir sa fonction d'hybridation de deux ADNsb. Enfin, une troisième équipe a développé une technique de criblage en utilisant la capacité d'hybridation de RAD52³⁶⁸. Cette technique est assez proche de celle utilisée dans notre étude puisqu'elle se base sur deux ADNsb, l'un marqué par un fluorophore et l'autre par un atténuateur de fluorescence. La différence réside dans la non-complémentarité totale entre les deux brins d'ADN. En effet, un mésappariement existe, ce qui a pour conséquence de limiter l'hybridation spontanée entre les deux brins. Dans notre étude, nous avons développé une méthode de criblage à haut débit assez proche de cette dernière étude.

Nous avons criblé une banque de 696 molécules à la recherche de candidats potentiels comme inhibiteurs de RAD52. Nous avons ainsi mis en évidence deux molécules capables d'inhiber RAD52. Grâce à un test d'hybridation *in vitro* développé à cette occasion, nous avons montré que SL52-1 et SL52-2 sont efficaces de manière concentration dépendante. Parmi ces deux molécules, c'est SL52-2 qui est la plus efficace. Pour obtenir une inhibition totale de l'hybridation par RAD52, il nécessite une concentration cinq fois moins forte que celle de SL52-1.

Nous avons également évalué l'effet de ces deux molécules sur la capacité de survie de cellules EUFA1341. Ces cellules sont caractérisées par l'apparition d'un codon stop prématuré

dans la séquence codante du gène (1802T→A, Y551X), aboutissant à l'expression d'une forme tronquée et inactive de la protéine PALB2³⁶⁹. Les deux molécules ont un effet sur les cellules EUFA1341 mais la molécule la plus efficace demeure SL52-2 confirmant nos résultats *in vitro*. Il est à noter que ces deux molécules à forte dose sont toxiques pour les cellules complémentées en *PALB2*.

Les deux molécules mises en évidence possèdent des groupements similaires. Elles possèdent toutes les deux un noyau benzénique, ainsi qu'un groupement amide. De manière intéressante, les deux molécules exhibent un groupement halogéné (Br ou Cl), considéré comme un donneur d'électrons et donc facilement réactif.

Les résultats obtenus restent préliminaires et nécessitent une caractérisation plus approfondie. Il serait ainsi intéressant de confirmer l'impact des deux molécules sur l'hybridation par RAD52 par une technique de détection par radioactivité dont on dispose dans le laboratoire³⁷⁰. Un test de liaison à RAD52, par exemple par résonance plasmonique de surface, est également une manière intéressante de caractériser la liaison entre chaque molécule et la protéine, pour en déterminer l'affinité. L'impact cellulaire est également à évaluer, notamment en continuant les tests de survie cellulaire, par des tests de clonogénie par exemple, mais également en étudiant leur impact sur la formation des foyers RAD52. L'impact des molécules sur l'efficacité de la SSA peut également être évalué par des tests cellulaires utilisant un rapporteur fluorescent, comme cela a été décrit³⁶⁸. La synthèse de nouveaux dérivés de SL52-1 et SL52-2 est également envisagée, afin d'obtenir des molécules plus efficaces ciblant RAD52.

5. Conclusion

Nous avons réussi à développer une méthode de mesure et d'analyse de la capacité de RAD52 à hybrider deux ADNsb. Cette nouvelle méthode a été utilisée pour cribler une banque de 696 molécules afin de mettre en évidence deux molécules capables d'inhiber RAD52 de manière dose-dépendante. Ces deux molécules ont un effet cellulaire, puisqu'elles induisent également la mort de cellules déficientes en *PALB2*. Cependant, elles exhibent un caractère cytotoxique potentiellement néfaste. Cette première approche dans la recherche d'inhibiteurs de RAD52 apparaît prometteuse mais demande un approfondissement dans les tests biochimiques et cellulaires. Ces molécules pourraient constituer le point de départ du développement d'une nouvelle classe d'inhibiteurs dont les dérivés pourraient amener à

augmenter l'efficacité antitumorale tout en diminuant l'effet cytotoxique sur les cellules normales.

Chapitre 6

Chapitre 6 - Discussion

1. Les thérapies anticancéreuses et l'évolution des stratégies

1.1. Des premières observations aux premiers traitements

La description de cas de cancers et la recherche de moyens de les traiter sont datées de plusieurs millénaires. Les premiers écrits relatant l'existence de cancer remontent aux papyrus égyptiens, entre 3000 et 2000 av. J.C., décrivant des tumeurs du sein traités par cautérisation. Des momies égyptiennes ont même été diagnostiquées comme porteuses d'ostéosarcomes. Les premiers traitements, chez les populations hindoues, font état de l'utilisation de la pâte contenant de l'arsenic, qui entraînait la mort du malade. Bien plus tard, durant l'Antiquité, notamment, beaucoup de descriptions ont été faites, et le terme de cancer a été énoncé par Hippocrate (460-377 av. J.-C.) (« karkinos » en grec). Dans les siècles qui suivirent, les scientifiques décrivirent différents stades d'avancement du cancer, et les médecins préconisent alors des onguents et des cautérisations, voire par excision selon les circonstances. Galien (129-216 ap. J.-C.) proposa, plus tard, l'administration de purges ou l'excision dans les cas plus avancés de tumeur. C'est au Moyen-Age, que de nouveaux progrès dans le traitement des tumeurs virent le jour. Les médecins de l'époque, comme Avicenne (980-1037 ap. J.-C.) ou Albucasis (940-1013 ap. J.-C.) suggérèrent d'exciser la tumeur précoce tout en cautérisant les tissus alentours, et de ne pas enlever les tumeurs trop avancées. Les saignées étaient également pratiquées. Durant les siècles suivant, les avancées scientifiques initiées par les progrès en matière d'anatomie, comme la mise en évidence du système lymphatique par Gaspare Aselli (1581-1624 ap. J.-C.), et d'outillage, avec le développement de la microscopie grâce à Jan Swammerdam (1637-1680 ap. J.-C.) et Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723 ap. J.-C.), ont permis de caractériser les cellules et tissus, et donc une meilleure compréhension du cancer. Le concept de métastases vit le jour quelques dizaines d'années plus tard, notamment sous l'impulsion de Xavier Bichat (1771-1802 ap. J.-C.), poussant les scientifiques et médecins à adapter leurs traitements à ce phénomène.

Au cours du XXème siècle, des avancées scientifiques majeures ont été réalisées dans la compréhension de la cellule et du corps humain dans son ensemble. La mise en évidence de l'ADN et de sa structure, la présence et le rôle de diverses protéines ont mis en place des dogmes dont la science actuelle dépend. L'un des plus importants d'entre eux concernant le cancer est l'hypothèse de Knudson (« two-hits hypothesis » ou « multiple-hits hypothesis ») qui énonce

le fait qu'un cancer résulte d'au moins deux mutations au niveau de l'ADN d'une cellule. Cette théorie a permis une meilleure approche dans la compréhension du cancer, notamment dans la définition des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur, et dans le développement de thérapies anti-cancéreuses. Durant ce siècle, la chimiothérapie se développe pour traiter notamment le lymphome de Burkitt ou le lymphome de Hodgkin. Pour ce dernier, c'est la première fois que l'utilisation d'une combinaison de produits est réalisée (MOPP, pour moutarde azotée, vincristine, prednisone et procarbazine). Des produits comme le taxol ou le tamoxifène sont également utilisés comme agents thérapeutiques.

1.2. Les traitements actuels pour lutter contre le cancer

De nos jours, plusieurs types de thérapies sont envisagées pour lutter contre le cancer. L'immunothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, la radiothérapie ou la chirurgie constituent les principales stratégies thérapeutiques utilisées de nos jours.

De grandes avancées ont été réalisées dans le traitement du cancer par immunothérapie et plusieurs stratégies ont émergé. L'une d'entre elles consiste à stimuler directement le système immunitaire afin de lutter contre la progression tumorale. Certaines cellules cancéreuses expriment ainsi la protéine CTLA4 ou PD-L1, le ligand de la protéine PD-1, afin de passer inaperçu vis-à-vis des lymphocytes T. L'utilisation d'anticorps anti-CTLA4, comme l'ipilimumab, ou anti-PD-1, comme le pembrolizumab ou le nivolumab, en complément d'un inhibiteur de la voie des MAPK est une stratégie très intéressante. Ces trois médicaments, approuvés par la FDA, sont capables d'augmenter la survie de patients traités d'au moins 10 mois ³⁷¹. Les anticorps ciblant PD-1 semblent être plus efficaces et moins nocifs que l'ipilimumab ³⁷². Ce type de thérapie s'avère être très efficace dans le traitement de mélanomes cutanés, certains cancers du rein et certains cancers du poumon ³⁷³. Les anticorps anti-PD-1 ont été mis sur le marché depuis l'année 2014 en France dans le traitement de mélanomes métastatiques. Une autre stratégie d'immunothérapie existe et s'intéresse à des sous-populations de lymphocytes T et à des cellules dendritiques présentes au niveau des ganglions ³⁷⁴. La thérapie génique appliquée à l'immunothérapie a permis de grandes avancées. Un des exemples les plus marquants reste le traitement de patients par leurs propres lymphocytes T exprimant un récepteur antigénique chimérique ³⁷⁵. Ce traitement a entraîné une rémission rapide du cancer chez ces patients.

La radiothérapie, basée sur l'utilisation de rayons X afin de détruire les tissus cancéreux, est une des plus anciennes thérapies anti-cancéreuses utilisées, cependant, elle bénéficie encore

d'avancées technologiques. La principale limite à l'utilisation de cette thérapie réside dans le ciblage des tissus cancéreux et au temps d'exposition pouvant également endommager les tissus sains. Beaucoup d'études ont été menées pour limiter ces effets et améliorer le traitement. La radio-chirurgie, ou stéréo-radiothérapie ou encore radiothérapie stéréotaxique, consiste à irradier la zone cancéreuse à l'aide de faisceaux de radiation. C'est une technique efficace et non invasive mais qui nécessite un investissement financier très important et limite donc sa disponibilité. Une autre stratégie de radiothérapie a vu le jour récemment sous le nom de radiothérapie en flash ^{376,377}. Cette technique consiste en une exposition rapide et forte de la zone à irradier. Les doses administrées sont de l'ordre de 1000 à 10000 fois plus intenses que pour la radiothérapie conventionnelle. Ce traitement est plus efficace que la radiothérapie conventionnelle, puisqu'un traitement à 15 Gy par irradiation conventionnelle entraîne une fibrose pulmonaire chez des patients atteints d'un cancer du poumon entre 8 semaines et 6 mois, alors qu'une irradiation de 20 Gy par radiothérapie en flash n'entraîne pas l'apparition de fibrose.

La chimiothérapie est un des moyens le plus couramment utilisé pour lutter contre le cancer. Elle se base sur l'utilisation de molécules chimiques capables de tuer les cellules cancéreuses. Cependant, le ciblage des cellules cancéreuses n'est pas spécifique dans tous les cas et des cellules normales peuvent être affectées par le traitement. C'est pourquoi, plusieurs molécules sont parfois utilisées en combinaison afin de limiter les effets indésirables. Il existe plusieurs types de molécules comme des analogues de bases azotées ³⁷⁸, des inhibiteurs de CDK ³⁷⁹ ou encore des inhibiteurs du fuseau mitotique ³⁸⁰. Le véritable challenge des traitements par chimiothérapie réside dans le fait d'être le plus spécifique possible de la tumeur à traiter afin de limiter au maximum les effets indésirables. Les avancées en génétiques et la caractérisation des biomarqueurs du cancer ont notamment permis de définir les traitements via l'association de plusieurs molécules chimiques.

L'hormonothérapie est utilisée pour traiter les cancers dits hormonosensibles, principalement le cancer du sein, le cancer de la prostate, les cancers endocriniens et de la thyroïde. Le principe de ce traitement est de supprimer l'action des hormones afin d'empêcher la division cellulaire des cellules cancéreuses et leur prolifération. Les principales méthodes utilisées sont la castration chirurgicale ou chimique, l'administration de molécules inhibant les récepteurs d'hormone, comme les récepteurs aux œstrogènes, ou encore par l'utilisation de molécules bloquant la synthèse d'hormone. L'hormonothérapie est souvent associée à un autre traitement, comme la chirurgie ou bien la radiothérapie. Beaucoup d'études ont été menées

concernant le récepteur transmembranaire HER2, retrouvé muté dans un grand nombre de cas de cancer du sein notamment ^{381,382}.

La chirurgie est sans doute la méthode la plus ancienne de lutte contre les tumeurs solides. Elle consiste en une intervention afin de retirer les tissus tumoraux d'un patient. Elle est utilisée de manière précoce quand le cancer est bien caractérisé et très localisé. Cette méthode est souvent associée à d'autres traitements, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie lorsque la progression du cancer est à un stade plus avancé, que ce soit comme traitement néo-adjuvant ou adjuvant. Les avancées de la chirurgie sont corrélées aux avancées technologiques en termes d'imagerie, afin de mieux déterminer la zone tumorale à exciser, de développement informatique, notamment grâce à la chirurgie assistée par ordinateur, dans le développement de technologie comme le laser ou encore par la cryochirurgie. Le développement de la chirurgie passe surtout par un développement de méthodes d'imagerie, des outils informatiques afin de faciliter le plus possible l'intervention par le médecin tout en limitant les risques pour le patient.

L'association de ces traitements dans la lutte contre le cancer est déjà d'actualité puisque des patients sont actuellement traités par plusieurs de ces thérapies en même temps. Cependant, le bon traitement nécessite une bonne connaissance du type de cancer dont souffre le patient. C'est pourquoi on se dirige de plus en plus vers une médecine personnalisée, en se basant notamment sur les données génétiques des patients afin de mieux comprendre le type de cancer, son avancement et d'adapter au mieux le traitement au patient.

1.3. Les inhibiteurs de kinase dans le traitement contre le cancer

La phosphorylation de protéines est un des mécanismes essentiels qui permet un fonctionnement normal de la cellule. Malheureusement, ce mécanisme peut être dérégulé dans plusieurs types de cancer ³⁸³. Plusieurs études ont mis en évidence des molécules capables d'inhiber les protéines kinase responsables de ces phosphorylations. Parmi celles-ci, l'imatinib a montré des résultats très intéressants dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique en inhibant la protéine BCR-ABL ³⁸⁴. La protéine c-ABL est nécessaire à la formation du filament de RAD51 et à sa stabilité ³⁸⁵. La protéine ERBB2/HER2 est un récepteur de facteur de croissance épidermique nécessaire à la prolifération cellulaire, cependant sa dérégulation est responsable notamment du cancer du sein. Une molécule appelée lapatinib est capable de cibler ce récepteur et d'empêcher sa dimérisation, étape nécessaire à l'activation de la protéine ³⁸⁶. La lapatinib a été approuvée par la FDA pour le traitement du cancer du sein en combinaison avec

la capecitabine et a reçu une autorisation de mise sur le marché en France. D'autres molécules comme la gefitinib et l'erlotinib ciblent les récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques EGFR, et sont utilisés dans les cas de cancer pour lesquels ce gène est muté ou bien le fonctionnement de la protéine est dérégulé ³⁸⁶.

Des avancées majeures ont été réalisées dans la recherche d'inhibiteurs de kinase dans la lutte contre le cancer durant ces quinze dernières années aboutissant à des thérapies efficaces disponibles pour les patients. Des recherches sont encore en cours afin de mettre en évidence de nouvelles molécules capables d'inhiber ces kinases et d'en optimiser leurs effets.

1.4. Le traitement des cancers en ciblant les protéines de la réparation de l'ADN

Plusieurs gènes importants dans la réparation de l'ADN sont également identifiés comme associés au cancer lorsqu'ils sont mutés, c'est le cas de *p53* et de *BRCA1* par exemple. Plusieurs protéines liées à la réparation de l'ADN sont devenues des cibles de choix dans le développement de traitement thérapeutique contre le cancer, grâce aux stratégies basées sur la létalité synthétique. Une des protéines pour laquelle les avancées sont les plus importantes est la protéine PARP.

Comme cela a été vu dans le chapitre 2, l'inhibition de PARP a mis en exergue le principe de létalité synthétique. Ce dernier utilise le fait qu'un processus essentiel de la cellule soit inactivé après la mutation d'un gène, en inhibant la voie de secours utilisée par la cellule cancéreuse, cela entraîne la mort de cette dernière, alors que la cellule saine survit. C'est effectivement le cas pour PARP, puisque les cellules porteuses de mutations pour *BRCA1* et *BRCA2* sont déficientes en RH. En inhibant PARP, la NHEJ, la BER et la NER sont inactivées, entraînant la mort spécifique de ces cellules.

Le traitement des cancers se dirige de plus en plus vers des thérapies personnalisées. La combinaison de molécules induisant des CDB et de molécules inhibant une protéine de la réparation de l'ADN constitue une stratégie thérapeutique très prometteuse. Dans cette optique, plusieurs molécules inhibitrices de PARP ont vu le jour, notamment pour traiter les cancers liés à des mutations affectant *BRCA1* ou *BRCA2*. Parmi les inhibiteurs de protéines de la réparation de l'ADN, ce sont les inhibiteurs de PARP qui se montrent les plus prometteuses. Plusieurs essais cliniques incluant des inhibiteurs de PARP ont été mis en place et certains sont approuvés par la FDA pour le traitement de cancers de l'ovaire associés à des mutations de *BRCA*. Un exemple intéressant consiste en la combinaison d'un inhibiteur de PARP, l'olaparib, et d'un inhibiteur du récepteur à activité tyrosine-kinase au VEGF, le cediranib, à travers un essai

clinique de phase I ³⁸⁷. Cet essai a prouvé l'efficacité de cette combinaison d'inhibiteurs chez des patients atteints de cancer du sein ou de l'ovaire récurrents. Cette première étude a mené à la mise en place d'un essai clinique de phase II basée sur la combinaison de ces mêmes inhibiteurs ³⁸⁸. En comparaison des résultats obtenus avec un traitement unique à l'olaparib, la combinaison de ces deux molécules entraîne une augmentation de la survie sans progression de cancer chez les patients de 8,7 mois. Cependant, le traitement combinatoire induit plus d'effets secondaires que le traitement unique à l'olaparib, puisque de la fatigue, des diarrhées et de l'hypertension sont plus fréquemment retrouvées chez les patients traités avec les deux molécules. Les effets secondaires induits par l'utilisation de plusieurs molécules constituent un des obstacles importants à maîtriser dans le développement de traitements combinatoires, afin de limiter l'inconfort du traitement pour les patients.

Il existe également d'autres contraintes à l'utilisation de ce type de traitement par les inhibiteurs de PARP. Ainsi, tous les cancers impliquant des mutations pour *BRCA1* ou *BRCA2* ne sont pas sensibles au traitement par un inhibiteur de PARP ³¹⁴. Il existe également des phénomènes de résistance tumorale suite au traitement par des inhibiteurs de PARP ³⁸⁹.

Récemment, l'olaparib a reçu l'approbation par Santé Canada pour pouvoir être utilisé par les patientes atteintes de cancer de l'ovaire, des trompes de Fallope ou d'un cancer péritonéal primitif porteur de mutations sur les gènes *BRCA*. Ce traitement par l'olaparib est utilisé pour stopper la progression du cancer et permettre une meilleure combinaison avec la chimiothérapie classique. En Europe, et en France plus particulièrement, son utilisation est également possible pour le traitement du cancer de l'ovaire porteur de mutations sur les gènes *BRCA*. L'utilisation de l'olaparib pour le traitement du même type de cancer ovarien a été approuvée par la FDA.

Les inhibiteurs de PARP sont actuellement les inhibiteurs de protéines de la réparation de l'ADN les plus avancés dans leur développement. Les premiers résultats cliniques sont prometteurs et constituent une voie de recherche à explorer pour améliorer les inhibiteurs de PARP existants et en développer de nouveaux, mais également pour ouvrir la voie à des inhibiteurs d'autres protéines de la réparation de l'ADN qui n'ont pas encore franchi le stade de la clinique.

Concernant les autres protéines de la réparation de l'ADN, plusieurs inhibiteurs ont été ou sont en phase d'essai clinique. C'est le cas de molécules ciblant ATR ou ATM notamment. Parmi les molécules prometteuses, il y a celles ciblant la protéine DNA-PKcs, impliquée dans

la réparation des CDB par la NHEJ. En effet, il est possible de combiner un inhibiteur de DNA-PKcs à une inhibition de la RH pour aboutir à un phénomène de létalité synthétique. Ce phénomène existe également lorsque l'on cible RAD52 dans des cellules présentant une déficience en *BRCA1*, *BRCA2* ou *PALB2*^{78,284}. Ces trois gènes constituent les trois gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers du sein et de l'ovaire. Trois premières études ont mis en évidence plusieurs molécules capables d'induire la mort de cellules déficientes pour l'un de ces trois gènes^{346,347,368}. Parmi celles-ci, les deux dernières mises en évidence, D-I03 et D-G23, possèdent des caractéristiques (poids moléculaire, donneurs de liaisons hydrogène, accepteur de liaisons hydrogène, ...) proches de celles de molécules potentiellement utilisables en clinique. Ces molécules semblent prometteuses au vu de leur effet sur les cellules, une optimisation de leur sélectivité et de leur efficacité sont cependant des étapes nécessaires avant d'envisager une entrée en phase d'essai clinique. L'intérêt de l'inhibition de RAD52 est relativement récent, mais les premières études sont très prometteuses quant à la stratégie de cibler cette protéine.

Beaucoup d'avancées ont été réalisées quant à l'inhibition de RAD51. Les premières études mettant au jour des molécules inhibitrices de RAD51 sont encore récentes. Parmi les molécules les plus avancées dans leur développement et l'analyse de leurs effets, il y a la molécule B02, capables d'inhiber différentes fonctions de RAD51 et d'induire une sensibilisation de cellules cancéreuses à différents agents thérapeutiques^{322,323}. Une autre molécule, RI-2, dérivée d'un autre inhibiteur de RAD51 appelé RI-1, a montré des résultats très intéressants^{324,325}. Cette molécule, capable de lier RAD51 au niveau du résidu Cys319, induit une diminution de l'efficacité de la RH dans la cellule. RI-2 possède un potentiel plus fort que RI-1. Sa réactivité est amoindrie grâce à la substitution du chloroamélimide présent sur RI-1. Ceci reste très intéressant dans l'optique de l'utilisation de la molécule dans un modèle animal. La molécule IBR2 et son analogue IBR120 sont également très prometteurs^{327,328}. Ces deux molécules sont capables de mimer le motif BRC, correspondant à des motifs présents sur BRCA2 et nécessaires à son association à RAD51. IBR2 a montré des résultats très intéressants puisqu'elle sensibilise des souris exprimant des cellules cancéreuses résistantes à l'imatinib. Pour l'heure, aucun résultat du traitement d'un modèle animal avec le dérivé d'IBR2, IBR120, n'a été publié. A l'heure actuelle, aucun des inhibiteurs de RAD51 n'a franchi le pas de l'essai clinique, mais les efforts mis en jeu dans le développement de ces inhibiteurs durant la dernière décennie convergent vers cette étape du développement d'un médicament.

Plusieurs molécules inhibitrices de protéines de la réparation de l'ADN ont déjà été décrites, quelques-unes d'entre elles sont en phase d'essai clinique, et l'une d'entre elles est actuellement commercialisée pour le traitement du cancer de l'ovaire notamment, l'olaparib. Cette molécule a ouvert la voie aux stratégies d'inhibition de protéines de la réparation de l'ADN, et confirme que l'étude et le développement de molécules ciblant ces protéines sont des voies de recherche cohérentes et efficaces dans le traitement du cancer.

2. Etude de l'interaction entre le DIDS et les albumines sériques

2.1. Caractérisation de l'interaction entre le DIDS et les albumines sériques

Le DIDS est connu depuis plusieurs décennies pour être un inhibiteur de canaux et de transporteurs de chlore^{330–332}. Une étude a mis en évidence le rôle inhibiteur du DIDS vis-à-vis de RAD51³⁴⁰. Aucune étude n'a été faite sur la capacité de l'albumine sérique, une des protéines les plus abondantes du sang, à interagir avec le DIDS. Cette question fait écho à la biodisponibilité des molécules anti-cancéreuses, et plus précisément à l'impact de la présence de l'albumine sérique dans le sang sur la disponibilité du DIDS et de potentielles molécules dérivées du DIDS.

Nous avons ainsi voulu caractériser l'interaction entre le DIDS et l'albumine sérique. Pour cela, nous avons déterminé le comportement du DIDS dans différents solvants, en mesurant le spectre d'absorption de la molécule. Nous avons ainsi montré que le DIDS possède un comportement différent selon son environnement. Lorsqu'il est dissout dans le DMSO par rapport à l'eau, on observe un effet bathochrome de ses propriétés spectrales.

Nous avons également étudié le comportement du DIDS en augmentant le pourcentage d'éthanol dans le milieu, en observant l'impact sur le spectre d'absorption de la molécule. En influant ainsi sur la polarité du milieu, on note que les spectres d'émission ne sont que légèrement modifiés. Malgré cela, il existe une différence significative dans l'intensité de fluorescence lorsque le pourcentage d'éthanol varie de 0 à 100%. En effet, pour ces deux conditions extrêmes, on mesure un signal de fluorescence deux fois plus important en présence d'éthanol absolu. Ces observations sont par ailleurs confirmées dans une autre étude impliquant le laboratoire³⁹⁰.

Nous avons également montré que le DIDS est capable d'interagir avec deux types d'albumine sérique, l'albumine sérique bovine (ASB) et l'albumine sérique humaine (ASH).

Par des expériences de titration du DIDS par des concentrations croissantes en ASB ou ASH, nous avons observé ce même effet bathochromique, couplé à une diminution de l'absorbance du DIDS dans les longueurs d'onde de l'UV-visible. Ceci confirme le changement d'environnement du DIDS induit par son interaction avec la protéine.

Afin d'étudier de plus près l'interaction entre le DIDS et les deux protéines, nous avons analysé l'interaction par titration en fluorescence. Par cette approche, nous avons montré que le signal de fluorescence du DIDS était augmenté en présence de ASB et de ASH. En rassemblant les différents résultats obtenus avec le DIDS et les deux protéines, nous avons obtenus des résultats similaires à ceux obtenus lorsque l'environnement polaire du DIDS était modifié.

Afin de pousser plus loin les analyses de cette interaction, nous avons cherché à déterminer le site de liaison du DIDS aux deux protéines. Pour cela, nous avons utilisé un test de compétition, à l'aide d'une molécule fluorescente, l'ANS, capable de lier les parties hydrophobes d'une protéine^{391,392}. Libre dans le milieu, l'ANS fluoresce faiblement, son signal étant grandement augmenté lorsque la molécule se lie à une structure hydrophobe. En augmentant les concentrations en DIDS de 0 à 20 μM , on note une augmentation du signal de fluorescence.

Nous avons ainsi démontré que le DIDS déplace l'ANS de son/ses site(s) de liaison à l'albumine. Cet effet est observé aussi bien avec l'ASB que l'ASH. Ainsi, le DIDS se lie à un domaine similaire ou assez proche de celui de l'ANS sur l'albumine sérique. Au vu des résultats obtenus précédemment, le site de liaison du DIDS sur l'albumine sérique possède des caractéristiques hydrophobiques. Les charges négatives situées sur les groupements sulfate du DIDS peuvent jouer un rôle dans l'interaction en liant des groupements cationiques de résidus situés dans le site de liaison.

Nous nous sommes également intéressés aux déterminants structuraux impliqués dans l'interaction entre le DIDS et les albumines sériques. Pour cela, nous avons utilisé des analogues du DIDS. Nous avons analysé les interactions entre ces différentes molécules et chacune des albumines sériques par microcalorimétrie. En titrant les albumines sériques avec des concentrations croissantes en DIDS, nous avons montré que le DIDS interagit directement avec chacune des deux protéines. De plus, les résultats obtenus indiquent qu'il y a au moins deux sites d'interaction entre la molécule et les deux albumines sériques. Il existe ainsi des sites de plus haute affinité et de plus basse affinité. Parmi les sites à plus haute affinité, l'affinité du

DIDS est équivalente que ce soit avec l'ASH ou l'ASB. Une différence existe avec les sites à plus basse affinité, puisque les K_a pour ces sites sont environ cent fois plus faibles. Nous avons également pu déterminer qu'une molécule de DIDS est capable de se lier au site de haute affinité, alors que trois-quatre molécules se lient aux sites de plus faible affinité, et ce, quelle que soit l'albumine sérique testée. Tout cela suggère des sites de liaison similaires pour le DIDS au niveau des deux albumines sériques.

Nous avons également montré que les groupements isothiocyanate du DIDS sont impliqués dans l'interaction avec les deux albumines sériques. En utilisant des molécules dérivées du DIDS, via une substitution des groupements isothiocyanate par des groupements azoture (DAZDS) ou des groupements amine (DADS), nous avons montré que le DAZDS interagit de la même manière que le DIDS avec les deux protéines. Une réaction endothermique et une seconde réaction exothermique, lorsque le ratio ligand : protéine est supérieur à 1, caractérisent l'association entre la molécule et chacune des deux albumines sériques. Au contraire, le DADS n'interagit avec aucune des deux protéines, démontrant ainsi que le groupement isothiocyanate est important pour l'interaction.

2.2. Localisation du site de liaison du DIDS sur l'ASH

Dans la littérature, il a été décrit que l'ASH possède trois sites de liaisons principaux 1, 2 et 3 situés respectivement au niveau des sous-domaines IIA, IIIA et IB³⁹⁰⁻³⁹⁴. Il existe plusieurs ligands capables de se lier à chacun de ces sites, comme la warfarine, l'ibuprofène et la bilirubine capable de se lier respectivement aux sous-domaines IIA, IIIA et IB^{395,396}. Via des tests de compétition, nous avons évalué la capacité du DIDS à déplacer chacun des ligands de l'ASH par microcalorimétrie et dichroïsme circulaire.

Par microcalorimétrie, nous avons montré que le DIDS est capable de déplacer la bilirubine. Concernant les deux autres molécules testées, le DIDS semble déplacer légèrement l'ibuprofène, mais n'a pas d'impact sur la warfarine. Cela suggère que le DIDS se lierait sur un premier site qui serait situé au niveau du sous-domaine IB, le site de liaison de la bilirubine. Un second site de liaison du DIDS sur l'ASH serait situé au niveau du sous-domaine IIIA, correspondant au site de liaison de l'ibuprofène.

Ces observations ont été confirmées par des tests de compétition par dichroïsme circulaire. En comparant deux conditions, lorsque la bilirubine est incubée avec l'ASH et lorsque le DIDS est ajouté à un milieu contenant le complexe bilirubine-ASH, nous avons mis en évidence un changement du signal de la bilirubine. Ce signal d'interaction de la bilirubine avec l'ASH a

déjà été mis en évidence dans des études précédentes³⁹⁷⁻³⁹⁹. Le même type d'expérience mené avec les deux dérivés du DIDS indique que le DAZDS a un effet similaire au DIDS, au contraire du DADS.

Il existe cependant des divergences dans la littérature quant au site de liaison de haute affinité de la bilirubine sur l'ASH, certains suggérant le sous-domaine IIA³⁹⁹⁻⁴⁰¹ et d'autres le sous-domaine IB^{394,402}. Par une étude de compétition entre la warfarine et la bilirubine, nous avons confirmé que le site de liaison de la bilirubine sur l'ASH est bien situé au niveau du sous-domaine IB.

Pour confirmer cela, nous avons également effectué une étude de compétition par dichroïsme circulaire entre le DIDS et la biliverdine pour se lier à l'ASH. La biliverdine est connue pour se lier au sous-domaine IB de la protéine. Nous avons ici démontré que le DIDS est capable de déplacer la biliverdine de l'ASH. Les résultats de compétition obtenus entre le DIDS et la bilirubine, ainsi que la biliverdine, confirment bien que le site de liaison de haute-affinité du DIDS se situe au niveau du sous-domaine IB de l'ASH. Concernant les deux molécules dérivées du DIDS, le DAZDS se lie préférentiellement au même site que le DIDS, c'est-à-dire au niveau du sous-domaine IB, alors que le site de liaison du DADS ne se trouve pas sur le sous-domaine IB.

2.3. La biodisponibilité du médicament

L'albumine sérique humaine possède une demi-vie de 19 jours environ, mais celle-ci est réduite à un jour dans le plasma⁴⁰³. Ceci s'explique par le fait que l'albumine traverse constamment la barrière endothéliale pour se retrouver dans le fluide extracellulaire, tout cela malgré la barrière endothéliale. Dans les tissus tumoraux, la barrière endothéliale est beaucoup plus perméable, facilitant le passage de molécules en direction du fluide extracellulaire. Ce phénomène, couplé à un système de drainage moins efficace dans les tissus tumoraux⁴⁰⁴, entraîne le développement du phénomène appelé EPR. Ce dernier est caractérisée par une concentration de la molécule au niveau du site tumoral et sa rétention^{405,406}.

Un exemple de ce phénomène est l'étude d'une molécule appelée tasquinimod, un inhibiteur des protéines HDAC4 et S100A9 recrutées au niveau des sites tumoraux et favorisant la progression tumorale⁴⁰⁷. Cette molécule est capable de s'associer à l'albumine sérique au niveau de son sous-domaine IIA. Cette interaction est efficace, puisque 98% du tasquinimod plasmatique est lié à l'albumine sérique. Cette dernière potentialise l'effet inhibiteur de la molécule via le phénomène d'EPR, en concentrant la molécule au niveau du site tumoral. Pour

que cet effet soit efficace, il nécessite une réversibilité suffisante dans l'interaction entre la molécule et l'albumine sérique afin que l'agent actif soit délivré près des cellules cancéreuses et puisse inhiber sa cible.

Stepanenko et collègues ont également montré que le couplage d'inhibiteurs de cdk à une albumine sérique recombinante augmente la biodisponibilité des inhibiteurs au niveau de la tumeur grâce au phénomène d'EPR, augmentant ainsi leur cytotoxicité pour les cellules cancéreuses ⁴⁰⁸.

D'autres études ont prouvé que l'albumine peut être utilisée comme transporteur de molécules anti-tumorales, notamment pour augmenter la solubilité de la molécule dans l'eau lorsque celle-ci est de nature hydrophobe ^{409,410}.

De manière intéressante, l'ASH est utilisée sous forme de nanoparticules pour transporter des molécules sur leur site d'action. Une étude a montré que l'usage de ces nanoparticules améliore la distribution de la noscapine, une molécule induisant une régression tumorale ⁴¹¹. La molécule distribuée sous la forme de nanoparticules diminue la viabilité de cellules de cancer du sein. L'efficacité de ces nanoparticules a également été prouvée *in vivo*. Des nanoparticules renfermant du fenretinide, une molécule induisant l'apoptose via l'accumulation de DRO, ont été administrées à des souris ayant subi une xénogreffe de cellules A549 ⁴¹². Ce traitement ralentit la progression tumorale chez ces souris.

Nous avons montré que le DIDS lie l'ASH via deux sites d'interactions. Le site de plus haute-affinité se situe au niveau du sous-domaine IB, un second site de liaison, de plus basse-affinité, est retrouvé au niveau du sous-domaine IIIA de la protéine. En comparant ces résultats avec ceux obtenus avec deux molécules dérivées du DIDS, le DAZDS et le DADS, nous avons montré que les groupements isothiocyanate sont importants dans cette interaction.

Le DIDS fait partie de la classe des inhibiteurs de RAD51 mis en évidence durant la dernière décennie. Les tests d'analyse de l'efficacité de RAD51, notamment dans ses capacités d'échange de brins et de formation de la D-loop, impliquent souvent la présence d'albumine sérique dans le milieu réactionnel ^{191,413,414}. Nos résultats montrent que la présence de l'albumine sérique dans les tests biochimiques peut introduire un biais dans l'évaluation de potentiels inhibiteurs de RAD51, et par extension pour d'autres protéines. L'interaction entre le DIDS et l'ASH doit également être prise en compte quant à la biodisponibilité de la molécule,

notamment en ce qui concerne le phénomène d'EPR, mais également pour le développement de nouveaux inhibiteurs de RAD51 dérivés du DIDS.

3. L'inhibition de RAD51 par le DIDS et les dérivés

3.1. Le DIDS comme inhibiteur de RAD51

RAD51 est une cible thérapeutique de choix dans les cancers où la protéine est surexprimée. Les stratégies visant à inhiber RAD51 se sont développées récemment, et plusieurs molécules ont montré leur capacité d'inhibition sur la protéine. L'une d'entre elles, le DIDS, a été décrite comme un inhibiteur efficace de RAD51.

Une première étude a mis en évidence la capacité du DIDS à inhiber différentes fonctions de RAD51, comme la capacité de liaison à l'ADN et la fonction d'échange de brins³⁴⁰. Une seconde étude a poussé les investigations précédentes vers le domaine cellulaire et a montré que le DIDS est capable d'empêcher la formation des foyers après irradiation de lymphocytes B primaires de souris³⁴². Dans cette même étude, il a été montré que l'efficacité de la RH est diminuée dans ces mêmes cellules.

L'inhibition de RAD51 par le DIDS a été décrite, sans que l'on comprenne son mécanisme d'action, et notamment quel(s) groupement(s) est (sont) impliqué(s). Nous avons utilisé des molécules analogues du DIDS pour comprendre cette inhibition et ouvrir la voie à de nouvelles molécules inhibitrices dérivées du DIDS.

3.2. Confirmation de l'inhibition et détermination des groupements associés à l'inhibition

Nous avons pu confirmer l'impact du DIDS sur plusieurs activités de RAD51 : la liaison à l'ADNsb menant à la formation du nucléofilament, l'invasion de l'ADNdb aboutissant à la formation de la D-loop et la formation des foyers nucléaires après induction de CDB. Nous avons ainsi pu montrer que le DIDS est capable d'inhiber les fonctions de liaison à l'ADNsb et de formation de la D-loop, mais également d'avoir un effet *in cellulo*, puisqu'en présence de DIDS, la formation de foyers de RAD51 est diminuée après induction de CDB. Le DIDS est très intéressant puisqu'il empêche la formation du nucléofilament et qu'il le dissocie également. Nous avons également observé l'effet de quatre molécules dérivées du DIDS sur ces différentes fonctions de RAD51. Sur ces quatre molécules, deux sont sans effets *in vitro* quel que soit le test, et une des deux, le dérivé NO₂, entraîne une augmentation des foyers γ -H2AX. Ceci peut être dû au fait que la molécule agisse sur une autre cible dans la cellule.

Le point commun qui existe entre les trois molécules actives est la présence de groupements dont la structure est linéaire, à savoir, les groupements isothiocyanate pour le DIDS et le dérivé NAc, et les groupements azide pour le dérivé N3.

Il est intéressant de noter que le groupement azide n'est pas un groupement que l'on retrouve couramment dans les réactions biologiques³⁵⁹. C'est un groupement peu électrophile, il s'avère être ainsi peu réactif avec les amines, très abondants dans les molécules du vivant, ou d'autres nucléophiles forts. Il existe cependant un exemple d'action d'une molécule dotée d'un groupement azide dans un système biologique, il s'agit d'un inhibiteur de la transcriptase inverse appelé AZT. C'est une molécule mimétique d'un nucléotide qui est incorporé durant la transcription inverse. La présence d'un groupement azide substituant un groupement hydroxyle en position 3' bloque l'enzyme qui ne peut plus incorporer de nouveaux nucléotides à la séquence d'ADN virale.

L'inhibition de RAD52 par le DIDS et les dérivés N3 et NAc est intéressante. En effet, ces trois molécules, en plus d'avoir un effet sur RAD51, inhibent RAD52 *in vitro* dans un test biochimique d'hybridation de deux brins d'ADN fluorescents. On note cependant que l'action de ces trois molécules est moins forte sur RAD52, en comparaison de RAD51. Ainsi, l'inhibition est totale pour un ratio RAD52 : inhibiteur de 1 / 67 pour le DIDS, de 1 / 133 pour le dérivé N3 et de 1 / 33 333 pour le dérivé NAc. On a donc un effet *in vitro* de ces trois molécules, à la différence des deux autres dérivés NH₂ et NO₂ qui n'ont aucun effet sur les deux protéines, à la fois sur RAD51 et sur RAD52, avec cependant une efficacité beaucoup plus importante vis-à-vis de RAD51. On peut ainsi suggérer que ces trois molécules ont une affinité plus importante pour RAD51. Les résultats des tests de survie cellulaire semblent également aller dans cette direction. En effet, parmi les trois molécules actives *in vitro*, aucune n'a d'action *in cellulo* sur des cellules déficientes en *PALB2*. Or, il a été montré que l'inactivation de *RAD52* dans ce type de cellules engendrent un phénomène de létalité synthétique²⁸⁴. Des tests supplémentaires, notamment sur la formation des foyers RAD52 après induction de CDB, ou encore d'efficacité de la SSA sont des approches à envisager pour confirmer ces observations. Il y a également une seconde observation qui abonderait dans ce sens, à savoir le fait que les deux protéines n'appartiennent pas à la même famille protéique^{124,361} et présentent ainsi peu de similarités³⁶²⁻³⁶⁴.

4. L'inhibition de RAD52 par SL52

4.1. La recherche d'inhibiteurs de RAD52

La recherche d'inhibiteurs ciblant RAD52 est encore récente. Et pour cause, le rôle de RAD52 a souvent été caractérisée comme accessoire dans la réparation de l'ADN, malgré son rôle dans la SSA. Cependant, l'attrait de la recherche pour RAD52 a connu un tournant récemment. Il faut tout d'abord savoir qu'une femme porteuse d'une mutation sur les gènes *BRCA1* ou *BRCA2* aura un risque compris entre 40 et 85 %, selon l'âge, de développer un cancer du sein. Concernant *PALB2*, le risque est compris entre 14 %, à 50 ans, et 35 %, à 70 ans. Récemment, il a été montré que lorsque RAD52 est inhibé dans des cellules déficientes en *PALB2*, *BRCA1*²⁸⁴ ou *BRCA2*⁷⁸, cela entraîne la mort de ces cellules. Au vu de ces données, l'intérêt d'étudier RAD52 et de développer des inhibiteurs pour cette protéine a grandi. A l'heure actuelle, trois types de molécules ont été décrites^{346,347,368}. Les premières molécules se montrent très intéressantes notamment dans leur spécificité vis-à-vis de RAD52. Cependant, les concentrations utilisées, de l'ordre du μM , dans les tests cellulaires sont encore élevées. Il s'avère nécessaire d'améliorer l'efficacité de ces composés, surtout dans l'optique de les utiliser en clinique à plus long terme.

On ne connaît pas le mode d'action des molécules inhibitrices mises en évidence, il serait intéressant de comprendre la façon dont elles agissent. Il serait intéressant à l'avenir de mettre en évidence des molécules capables de cibler les modifications post-traductionnelles de RAD52. En effet, RAD52 est phosphorylé par c-Abl sur la tyrosine 104, ce qui a pour effet de contribuer à la formation des foyers RAD52 en présence de lésions dans l'ADN²⁸⁷. La phosphorylation de la tyrosine 104 de RAD52 par c-Abl participe également au bon fonctionnement de l'hybridation par RAD52²⁸⁸. Une autre modification post-traductionnelle qui pourrait être ciblée par des composés chimiques est la SUMOylation de RAD52, surtout que celle-ci a un impact sur la réparation de l'ADN chez *S. cerevisiae*⁴¹⁵⁻⁴¹⁸. Chez l'humain, RAD52 est également SUMOylé, notamment via un mécanisme impliquant PTEN⁴¹⁹, même si les interactions mises en jeu sont encore peu connues. Il est suggéré qu'un site de SUMOylation de RAD52 serait situé au niveau de la partie C-ter de la protéine et que cette modification post-traductionnelle influencerait sur la localisation de la protéine et non pas sur ses capacités à lier l'ADN, à hybrider deux ADNsb, à former la D-loop ou à interagir avec RAD51. En ciblant cette modification, il serait possible d'empêcher la localisation nucléaire de RAD52 et donc le bon déroulement de la RH par la suite.

4.2. La mise en évidence de deux molécules inhibitrices

Nous avons criblé une banque de 696 molécules, à travers un test de criblage développé à cet effet, et mis en évidence deux candidats potentiels. Ces deux composés sont capables d'inhiber la capacité d'hybridation de deux brins d'ADN par RAD52.

En plus d'avoir un effet *in vitro*, ces deux molécules ont un effet cellulaire sur RAD52. Lorsque l'on incube des cellules déficientes en *PALB2* en présence des molécules, elles entraînent la mort de ces cellules en comparaison de la même lignée complémentée en *PALB2*. Cependant, les concentrations utilisées sont encore trop importantes. Il serait intéressant de connaître l'impact de ces molécules sur la formation des foyers RAD52 après un traitement avec un agent inducteur de CDB. Tout comme Huang et collaborateurs l'ont montré via l'utilisation d'un gène rapporteur GFP contenant un site de coupure pour la nucléase I-SceI³⁶⁸, l'impact des molécules sur la capacité de RAD52 à réaliser l'hybridation de deux ADNsb (SSA) *in cellulo*, serait une approche à mettre en place pour ces deux molécules.

La structure de RAD52 est partiellement disponible, puisque le domaine N-ter de RAD52 (PDB : 1H2I ; PDB : 1KN0), capable de former un anneau undécamérique a été cristallisé^{107,277}. Celui-ci contient le domaine de la protéine responsable de la liaison à l'ADNdb. Cibler ce domaine de la protéine est une stratégie intéressante, puisque Sullivan et collaborateurs ont criblé une banque de molécules par *docking* en utilisant cette structure cristallisée de RAD52³⁴⁷. Ils ont mis en évidence deux molécules inhibitrices, qui seront utilisées comme charpente à la synthèse de nouvelles molécules plus efficaces et affines pour RAD52.

Le fait que le rôle de RAD52 chez l'humain soit considéré comme accessoire, lorsque l'on compare à l'importance de son homologue chez la levure, a quelque peu retardé les découvertes sur la protéine. Cela ne facilite pas la compréhension des mécanismes l'impliquant, mais rend également difficile l'élaboration de nouvelles molécules capables de l'inhiber. La recherche et le développement de nouveaux inhibiteurs de RAD52 passe obligatoirement par de la recherche fondamentale.

Conclusion

Conclusion

La lutte contre le cancer est un cheval de bataille pour la recherche scientifique. Différentes stratégies existent déjà ou sont actuellement en développement. Une des stratégies envisagées est de moduler l'expression, l'activation de certains facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN, phénomène essentiel à la survie d'une cellule. Ce type de stratégie est un des pans de recherche développé dans les deux laboratoires dans lesquels j'ai pu effectuer ma thèse en cotutelle.

Durant la thèse que j'ai effectuée, je me suis intéressé à l'inhibition de protéines de la réparation de l'ADN, et plus particulièrement à deux protéines de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, RAD51 et RAD52. Ces deux protéines sont liées au développement tumoral, RAD51 puisque sa surexpression est corrélée à la progression tumorale et RAD52, pour laquelle un phénomène de létalité synthétique existe dans des cellules déficientes en *BRCA1*, *BRCA2* ou *PALB2*, trois des gènes les plus mutés dans les cancers du sein et de l'ovaire notamment. Les travaux présentés dans la thèse permettent de mieux comprendre l'importance de développer des inhibiteurs des protéines de la réparation de l'ADN, en ciblant notamment RAD51 et RAD52. Concernant RAD51, nous avons mis en avant l'interaction du DIDS avec HSA, une protéine pouvant affecter la biodisponibilité de la molécule. Par une étude comparative avec des dérivés, nous comprenons mieux les groupements impliqués dans l'interaction entre le DIDS et RAD51. En criblant une banque de molécules, deux d'entre elles montrent des résultats intéressants puisqu'elles inhibent la fonction d'hybridation de RAD52 et entraînent un phénomène de létalité synthétique dans des cellules déficientes en *PALB2*. Ces travaux permettent une meilleure compréhension de l'avancée des recherches quant au développement de molécules inhibitrices de la réparation de l'ADN dans les traitements anti-cancéreux et ouvrent la voie au développement de molécules thérapeutiques.

Il sera intéressant de synthétiser de nouveaux dérivés du DIDS, en substituant notamment les groupements isothiocyanate. Etudier et caractériser leur impact sur les fonctions de liaison à l'ADN, d'échange brins, de formation de la D-loop et de l'hydrolyse de l'ATP serait intéressant. L'autre étape nécessaire sera d'étudier leur effet *in cellulo*, notamment en analysant l'impact sur la formation des foyers après induction de CDB, l'efficacité de la RH et la survie cellulaire. L'étude dans un modèle animal de l'effet du DIDS et des molécules dérivées est une approche à envisager.

Concernant RAD52, les résultats préliminaires sont très intéressants et encourageants, deux molécules sur la banque de 696 molécules ont un effet inhibiteur sur RAD52. Cependant, il sera nécessaire de valider l'inhibition de la fonction d'hybridation par RAD52, de confirmer la liaison directe des molécules à la protéine. Il sera également intéressant de confirmer l'impact cellulaire de ces deux molécules sur RAD52, en analysant la formation des foyers de RAD52 après induction de CDB, de mesurer la survie cellulaire et d'évaluer l'effet de ces molécules sur l'efficacité de la SSA. Une collaboration avec des chimistes sera une étape nécessaire afin de synthétiser des molécules dérivées de SL52-1 et SL52-2 en vue de générer de nouvelles molécules plus affines et sélectives vis-à-vis de RAD52.

Cibler les protéines de la réparation de l'ADN par des petites molécules afin de lutter contre le cancer est une stratégie encore récente mais qui montre des progrès forts et très prometteurs. Des molécules sont actuellement sur le marché, d'autres sont en phase d'essai clinique ou sont sur le point de l'être. La voie a été ouverte par les inhibiteurs de PARP et la découverte de nouveaux inhibiteurs, leur développement et leur optimisation ne fait que commencer.

Références

1. Hoeijmakers, J. H. J. DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1475–85 (2009).
2. Maacke, H. *et al.* DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* **19**, 2791–5 (2000).
3. Raderschall, E. *et al.* Elevated Levels of Rad51 Recombination Protein in Tumor Cells. *Cancer Res.* **62**, 219–225 (2002).
4. Ohnishi, T., Taki, T., Hiraga, S., Arita, N. & Morita, T. In vitro and in vivo potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 319–24 (1998).
5. Collis, S. J. *et al.* Ribozyme minigene-mediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1534–8 (2001).
6. Ito, M. *et al.* Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. *J. Gene Med.* **7**, 1044–52 (2005).
7. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–8 (2009).
8. Stojic, L., Brun, R. & Jiricny, J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 1091–101
9. Dupont, E., Gomez, J. & Bilodeau, D. Beyond UV radiation: a skin under challenge. *Int. J. Cosmet. Sci.* **35**, 224–32 (2013).
10. Deavall, D. G., Martin, E. A., Horner, J. M. & Roberts, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J. Toxicol.* **2012**, 645460 (2012).
11. Colleaux, L., D'Auriol, L., Galibert, F. & Dujon, B. Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6022–6 (1988).
12. Jasin, M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.* **12**, 224–228 (1996).
13. Cortez, D. Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity. *DNA Repair (Amst)*. **32**, 149–57 (2015).
14. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* **17**, 1195–214 (2003).
15. Morgan, W. F. & Sowa, M. B. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 14127–8 (2005).
16. Fang, J., Nakamura, H. & Iyer, A. K. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J. Drug Target.* **15**, 475–86

17. Weng, M. *et al.* Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6976–84 (2010).
18. Chen, G. L. *et al.* Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* **259**, 13560–6 (1984).
19. Chouluka, A., Perrin, A., Dujon, B. & Nicolas, J. F. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1968–73 (1995).
20. Bellaïche, Y., Mogila, V. & Perrimon, N. I-SceI endonuclease, a new tool for studying DNA double-strand break repair mechanisms in *Drosophila*. *Genetics* **152**, 1037–44 (1999).
21. Urnov, F. D. *et al.* Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**, 646–51 (2005).
22. Miller, J. C. *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* **29**, 143–8 (2011).
23. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–21 (2012).
24. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39–85 (2004).
25. Krokan, H. E. & Bjørås, M. Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012583 (2013).
26. Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W. & Hoeijmakers, J. H. J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 465–81 (2014).
27. Petrusseva, I. O., Evdokimov, A. N. & Lavrik, O. I. Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Naturae* **6**, 23–34 (2014).
28. Li, G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **18**, 85–98 (2008).
29. Jo, U. & Kim, H. Exploiting the Fanconi Anemia Pathway for Targeted Anti-Cancer Therapy. *Mol. Cells* **38**, 669–76 (2015).
30. Lieber, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211 (2010).
31. Lee, J.-H. & Paull, T. T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**, 551–4 (2005).
32. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499–506 (2003).
33. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **276**, 42462–7 (2001).

34. Stucki, M. *et al.* MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**, 1213–26 (2005).
35. Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**, 905–16 (1999).
36. Déry, U. & Masson, J.-Y. Twists and turns in the function of DNA damage signaling and repair proteins by post-translational modifications. *DNA Repair (Amst)*. **6**, 561–77 (2007).
37. Kolas, N. K. *et al.* Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* **318**, 1637–40 (2007).
38. Yan, J. & Jetten, A. M. RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. *Cancer Lett.* **271**, 179–90 (2008).
39. Mailand, N. *et al.* RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* **131**, 887–900 (2007).
40. Doil, C. *et al.* RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**, 435–46 (2009).
41. Pinato, S. *et al.* RNF168, a new RING finger, MIU-containing protein that modifies chromatin by ubiquitination of histones H2A and H2AX. *BMC Mol. Biol.* **10**, 55 (2009).
42. Stewart, G. S. *et al.* The RIDDLE Syndrome Protein Mediates a Ubiquitin-Dependent Signaling Cascade at Sites of DNA Damage. *Cell* **136**, 420–434 (2009).
43. Mattioli, F. *et al.* RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* **150**, 1182–95 (2012).
44. Huen, M. S. Y. *et al.* RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* **131**, 901–14 (2007).
45. Bohgaki, M. *et al.* RNF168 ubiquitylates 53BP1 and controls its response to DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 20982–20987 (2013).
46. Sakasai, R. & Tibbetts, R. RNF8-dependent and RNF8-independent regulation of 53BP1 in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **283**, 13549–55 (2008).
47. Roots, R., Kraft, G. & Gosschalk, E. The formation of radiation-induced DNA breaks: the ratio of double-strand breaks to single-strand breaks. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **11**, 259–65 (1985).
48. Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J. & Elledge, S. J. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**, 1713–6 (2001).
49. Zhou, B. B. & Elledge, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433–9 (2000).
50. Cimprich, K. A. & Cortez, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 616–27 (2008).
51. Jazayeri, A. *et al.* ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to

- DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **8**, 37–45 (2006).
52. Myers, J. S. & Cortez, D. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *J. Biol. Chem.* **281**, 9346–50 (2006).
53. Awasthi, P., Foiani, M. & Kumar, A. ATM and ATR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **128**, 4255–62 (2015).
54. Bunting, S. F. *et al.* 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell* **141**, 243–254 (2010).
55. Eid, W. *et al.* DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability. *EMBO Rep.* **11**, 962–8 (2010).
56. Shibata, A. *et al.* DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol. Cell* **53**, 7–18 (2014).
57. Coleman, K. A. & Greenberg, R. A. The BRCA1-RAP80 complex regulates DNA repair mechanism utilization by restricting end resection. *J. Biol. Chem.* **286**, 13669–80 (2011).
58. Soubeyrand, S. *et al.* Artemis phosphorylated by DNA-dependent protein kinase associates preferentially with discrete regions of chromatin. *J. Mol. Biol.* **358**, 1200–11 (2006).
59. Shrivastav, M., De Haro, L. P. & Nickoloff, J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* **18**, 134–47 (2008).
60. Nick McElhinny, S. A., Snowden, C. M., McCarville, J. & Ramsden, D. A. Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2996–3003 (2000).
61. Mari, P.-O. *et al.* Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18597–18602 (2006).
62. Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 712–20 (2003).
63. Lieber, M. R., Gu, J., Lu, H., Shimazaki, N. & Tsai, A. G. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell. Biochem.* **50**, 279–96 (2010).
64. Truong, L. N. *et al.* Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7720–5 (2013).
65. Sfeir, A. & Symington, L. S. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends Biochem. Sci.* **40**, 701–14 (2015).
66. Wang, M. *et al.* PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6170–82 (2006).
67. Huertas, P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 11–6 (2010).
68. Symington, L. S. End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation.

- Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
69. Nimonkar, A. V *et al.* BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* **25**, 350–62 (2011).
 70. Xia, B. *et al.* Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol. Cell* **22**, 719–29 (2006).
 71. Zhang, F., Fan, Q., Ren, K. & Andreassen, P. R. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol. Cancer Res.* **7**, 1110–8 (2009).
 72. Zhang, F. *et al.* PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr. Biol.* **19**, 524–9 (2009).
 73. Sy, S. M. H., Huen, M. S. Y. & Chen, J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 7155–60 (2009).
 74. Sung, P. Function of Yeast Rad52 Protein as a Mediator between Replication Protein A and the Rad51 Recombinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 28194–28197 (1997).
 75. Shinohara, A. & Ogawa, T. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature* **391**, 404–7 (1998).
 76. New, J. H., Sugiyama, T., Zaitseva, E. & Kowalczykowski, S. C. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* **391**, 407–10 (1998).
 77. Sugiyama, T., New, J. H. & Kowalczykowski, S. C. DNA annealing by Rad52 Protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 6049–6054 (1998).
 78. Feng, Z. *et al.* Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 686–91 (2011).
 79. Rodrigue, A. *et al.* Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *EMBO J.* **25**, 222–31 (2006).
 80. Rodrigue, A. *et al.* The RAD51 paralogs ensure cellular protection against mitotic defects and aneuploidy. *J. Cell Sci.* **126**, 348–59 (2013).
 81. Thacker, J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett.* **219**, 125–35 (2005).
 82. Somyajit, K., Subramanya, S. & Nagaraju, G. RAD51C: a novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer. *Carcinogenesis* **31**, 2031–8 (2010).
 83. Suwaki, N., Klare, K. & Tarsounas, M. RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 898–905 (2011).
 84. Kojic, M., Yang, H., Kostrub, C. F., Pavletich, N. P. & Holloman, W. K. The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability

- in *Ustilago maydis*. *Mol. Cell* **12**, 1043–9 (2003).
85. Zhou, Q., Mazloum, N., Mao, N., Kojic, M. & Holloman, W. K. Dss1 regulates interaction of Brh2 with DNA. *Biochemistry* **48**, 11929–38 (2009).
 86. Yang, H. *et al.* BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **297**, 1837–48 (2002).
 87. Gudmundsdottir, K., Lord, C. J., Witt, E., Tutt, A. N. J. & Ashworth, A. DSS1 is required for RAD51 focus formation and genomic stability in mammalian cells. *EMBO Rep.* **5**, 989–93 (2004).
 88. Liu, J., Doty, T., Gibson, B. & Heyer, W.-D. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1260–2 (2010).
 89. Zhao, W. *et al.* Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Mol. Cell* **59**, 176–87 (2015).
 90. Modesti, M. *et al.* RAD51AP1 is a structure-specific DNA binding protein that stimulates joint molecule formation during RAD51-mediated homologous recombination. *Mol. Cell* **28**, 468–81 (2007).
 91. Wright, W. D. & Heyer, W.-D. Rad54 functions as a heteroduplex DNA pump modulated by its DNA substrates and Rad51 during D loop formation. *Mol. Cell* **53**, 420–32 (2014).
 92. Li, X. & Heyer, W.-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* **18**, 99–113 (2008).
 93. San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229–57 (2008).
 94. Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T. & Liu, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 113–39 (2010).
 95. Ip, S. C. Y. *et al.* Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* **456**, 357–61 (2008).
 96. Fekairi, S. *et al.* Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell* **138**, 78–89 (2009).
 97. Svendsen, J. M. *et al.* Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell* **138**, 63–77 (2009).
 98. Iyama, T. & Wilson, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst.)* **12**, 620–36 (2013).
 99. Swuec, P. & Costa, A. Molecular mechanism of double Holliday junction dissolution. *Cell Biosci.* **4**, 36 (2014).
 100. Haber, J. E. & Leung, W. Y. Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13949–54 (1996).

101. Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J. & Haber, J. E. Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**, 693–704 (1996).
102. Sugawara, N., Ira, G. & Haber, J. E. DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5300–9 (2000).
103. Symington, L. S. Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 630–670 (2002).
104. Mortensen, U. H., Bendixen, C., Sunjevaric, I. & Rothstein, R. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10729–34 (1996).
105. Reddy, G., Golub, E. I. & Radding, C. M. Human Rad52 protein promotes single-strand DNA annealing followed by branch migration. *Mutat. Res.* **377**, 53–9 (1997).
106. Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S. & Ogawa, T. Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes to Cells* **3**, 145–156 (1998).
107. Singleton, M. R., Wentzell, L. M., Liu, Y., West, S. C. & Wigley, D. B. Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13492–7 (2002).
108. Kagawa, W. *et al.* Identification of a second DNA binding site in the human Rad52 protein. *J. Biol. Chem.* **283**, 24264–73 (2008).
109. Van Dyck, E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. & West, S. C. Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing. *EMBO Rep.* **2**, 905–9 (2001).
110. Sargent, R. G. *et al.* Recombination-dependent deletion formation in mammalian cells deficient in the nucleotide excision repair gene ERCC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13122–7 (1997).
111. Sargent, R. G. *et al.* Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3771–8 (2000).
112. Al-Minawi, A. Z., Saleh-Gohari, N. & Helleday, T. The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1–9 (2008).
113. Motycka, T. A., Bessho, T., Post, S. M., Sung, P. & Tomkinson, A. E. Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *J. Biol. Chem.* **279**, 13634–9 (2004).
114. Caldecott, K. W., McKeown, C. K., Tucker, J. D., Ljungquist, S. & Thompson, L. H. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 68–76 (1994).

115. Wei, Y. F. *et al.* Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3206–16 (1995).
116. Cappelli, E. *et al.* Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *J. Biol. Chem.* **272**, 23970–5 (1997).
117. Saeki, T., Machida, I. & Nakai, S. Genetic control of diploid recovery after gamma-irradiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **73**, 251–65 (1980).
118. Shinohara, A., Ogawa, H. & Ogawa, T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* **69**, 457–70 (1992).
119. Muris, D. F. *et al.* Cloning the RAD51 homologue of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4586–91 (1993).
120. Sonoda, E. *et al.* Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.* **17**, 598–608 (1998).
121. Lim, D. S. & Hasty, P. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 7133–43 (1996).
122. Tsuzuki, T. *et al.* Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6236–40 (1996).
123. Game, J. C. & Mortimer, R. K. A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **24**, 281–292 (1974).
124. Sandler, S. J., Satin, L. H., Samra, H. S. & Clark, A. J. recA-like genes from three archaean species with putative protein products similar to Rad51 and Dmc1 proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2125–32 (1996).
125. Li, Y., He, Y. & Luo, Y. Crystal structure of an archaeal Rad51 homologue in complex with a metatungstate inhibitor. *Biochemistry* **48**, 6805–10 (2009).
126. Haaf, T., Golub, E. I., Reddy, G., Radding, C. M. & Ward, D. C. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 2298–2302 (1995).
127. Barlow, A. L., Benson, F. E., West, S. C. & Hultén, M. A. Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO J.* **16**, 5207–15 (1997).
128. Conway, A. B. *et al.* Crystal structure of a Rad51 filament. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 791–6 (2004).
129. Shin, D. S. *et al.* Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *EMBO J.* **22**, 4566–76 (2003).
130. Wu, Y., He, Y., Moya, I. A., Qian, X. & Luo, Y. Crystal structure of archaeal recombinase RADA: a snapshot of its extended conformation. *Mol. Cell* **15**, 423–35 (2004).
131. Wu, Y., Qian, X., He, Y., Moya, I. A. & Luo, Y. Crystal structure of an ATPase-active form of Rad51 homolog from *Methanococcus voltae*. Insights into potassium dependence. *J. Biol. Chem.* **280**, 722–8 (2005).

132. Ariza, A., Richard, D. J., White, M. F. & Bond, C. S. Conformational flexibility revealed by the crystal structure of a crenarchaeal RadA. *Nucleic Acids Res.* **33**, 1465–73 (2005).
133. Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H., Yokoyama, S. & Shibata, T. The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *J. Mol. Biol.* **290**, 495–504 (1999).
134. Pellegrini, L. *et al.* Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* **420**, 287–93 (2002).
135. Thayer, M. M., Ahern, H., Xing, D., Cunningham, R. P. & Tainer, J. A. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J.* **14**, 4108–20 (1995).
136. Doherty, A. J., Serpell, L. C. & Ponting, C. P. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2488–97 (1996).
137. Lee, M., Lipfert, J., Sanchez, H., Wyman, C. & Dekker, N. H. Structural and torsional properties of the RAD51-dsDNA nucleoprotein filament. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7023–30 (2013).
138. Chen, Z., Yang, H. & Pavletich, N. P. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* **453**, 489–4 (2008).
139. Story, R. M., Weber, I. T. & Steitz, T. A. The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer. *Nature* **355**, 318–25 (1992).
140. Matsuo, Y., Sakane, I., Takizawa, Y., Takahashi, M. & Kurumizaka, H. Roles of the human Rad51 L1 and L2 loops in DNA binding. *FEBS J.* **273**, 3148–59 (2006).
141. Prasad, T. K., Yeykal, C. C. & Greene, E. C. Visualizing the assembly of human Rad51 filaments on double-stranded DNA. *J. Mol. Biol.* **363**, 713–28 (2006).
142. Reymer, A., Frykholm, K., Morimatsu, K., Takahashi, M. & Nordén, B. Structure of human Rad51 protein filament from molecular modeling and site-specific linear dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13248–53 (2009).
143. Schay, G. *et al.* Without Binding ATP, Human Rad51 Does Not Form Helical Filaments on ssDNA. *J. Phys. Chem. B* **120**, 2165–78 (2016).
144. Subramanyam, S., Jones, W. T., Spies, M. & Spies, M. A. Contributions of the RAD51 N-terminal domain to BRCA2-RAD51 interaction. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9020–32 (2013).
145. Davies, A. A. *et al.* Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein. *Mol. Cell* **7**, 273–282 (2001).
146. Chen, P. L. *et al.* The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5287–92 (1998).
147. Esashi, F. *et al.* CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory

- mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**, 598–604 (2005).
148. Davies, O. R. & Pellegrini, L. Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 475–83 (2007).
 149. Nomme, J. *et al.* Inhibition of filament formation of human Rad51 protein by a small peptide derived from the BRC-motif of the BRCA2 protein. *Genes Cells* **13**, 471–81 (2008).
 150. Yata, K. *et al.* BRCA2 coordinates the activities of cell-cycle kinases to promote genome stability. *Cell Rep.* **7**, 1547–59 (2014).
 151. Menetski, J. P., Bear, D. G. & Kowalczykowski, S. C. Stable DNA heteroduplex formation catalyzed by the Escherichia coli RecA protein in the absence of ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 21–5 (1990).
 152. Chi, P., Van Komen, S., Sehorn, M. G., Sigurdsson, S. & Sung, P. Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function. *DNA Repair (Amst.)* **5**, 381–91 (2006).
 153. Amunugama, R. & Fishel, R. Subunit interface residues F129 and H294 of human RAD51 are essential for recombinase function. *PLoS One* **6**, e23071 (2011).
 154. Candelli, A. *et al.* Visualization and quantification of nascent RAD51 filament formation at single-monomer resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15090–5 (2014).
 155. Du, L. & Luo, Y. Structure of a hexameric form of RadA recombinase from *Methanococcus voltae*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **68**, 511–6 (2012).
 156. Selmane, T. *et al.* Identification of the subunit-subunit interface of *Xenopus* Rad51.1 protein: similarity to RecA. *J. Mol. Biol.* **335**, 895–904 (2004).
 157. Conilleau, S. *et al.* Location of tyrosine 315, a target for phosphorylation by cAbl tyrosine kinase, at the edge of the subunit-subunit interface of the human Rad51 filament. *J. Mol. Biol.* **339**, 797–804 (2004).
 158. Yu, D. S. *et al.* Dynamic Control of Rad51 Recombinase by Self-Association and Interaction with BRCA2. *Mol. Cell* **12**, 1029–1041 (2003).
 159. Miné, J. *et al.* Real-time measurements of the nucleation, growth and dissociation of single Rad51-DNA nucleoprotein filaments. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7171–87 (2007).
 160. van der Heijden, T. *et al.* Real-time assembly and disassembly of human RAD51 filaments on individual DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5646–57 (2007).
 161. Benson, F. E., Stasiak, A. & West, S. C. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J.* **13**, 5764–71 (1994).
 162. Robertson, R. B. *et al.* Structural transitions within human Rad51 nucleoprotein filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12688–93 (2009).
 163. Wong, A. K. *et al.* Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein.

- Oncogene* **17**, 2279–85 (1998).
164. Yu, X., Wu, L. C., Bowcock, A. M., Aronheim, A. & Baer, R. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* **273**, 25388–92 (1998).
 165. Sartori, A. A. *et al.* Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509–14 (2007).
 166. Chen, L., Nievera, C. J., Lee, A. Y.-L. & Wu, X. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* **283**, 7713–20 (2008).
 167. Kass, E. M. & Jasin, M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett.* **584**, 3703–8 (2010).
 168. Sy, S. M. H., Huen, M. S. Y. & Chen, J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 7155–60 (2009).
 169. Liu, J., Doty, T., Gibson, B. & Heyer, W.-D. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1260–2 (2010).
 170. Balakrishnan, K., Krishnan, N. M., Kulkarni, A. & Rao, B. J. Human Rad51 mediated DNA unwinding is facilitated by conditions that favour Rad51-dsDNA aggregation. *BMC Biochem.* **10**, 2 (2009).
 171. Bugreev, D. V & Mazin, A. V. Ca²⁺ activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9988–93 (2004).
 172. Ziemienowicz, A., Rahavi, S. M. R. & Kovalchuk, I. The stimulatory effect of CaCl₂, NaCl and NH₄NO₃ salts on the ssDNA-binding activity of RecA depends on nucleotide cofactor and buffer pH. *BMB Rep.* **44**, 341–6 (2011).
 173. Bell, J. C., Plank, J. L., Dombrowski, C. C. & Kowalczykowski, S. C. Direct imaging of RecA nucleation and growth on single molecules of SSB-coated ssDNA. *Nature* **491**, 274–8 (2012).
 174. Roca, A. I. & Cox, M. M. RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **56**, 129–223 (1997).
 175. Bianco, P. R., Tracy, R. B. & Kowalczykowski, S. C. DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front. Biosci.* **3**, D570–603 (1998).
 176. Atwell, S. *et al.* Probing Rad51-DNA interactions by changing DNA twist. *Nucleic Acids Res.* **40**, 11769–76 (2012).
 177. Sigurdsson, S., Trujillo, K., Song, B., Stratton, S. & Sung, P. Basis for avid homologous DNA strand exchange by human Rad51 and RPA. *J. Biol. Chem.* **276**, 8798–806 (2001).
 178. Liu, Y. *et al.* Conformational changes modulate the activity of human RAD51 protein.

- J. Mol. Biol.* **337**, 817–27 (2004).
179. Miné-Hattab, J. & Rothstein, R. DNA in motion during double-strand break repair. *Trends Cell Biol.* **23**, 529–36 (2013).
 180. Golub, E. I., Kovalenko, O. V, Gupta, R. C., Ward, D. C. & Radding, C. M. Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4106–10 (1997).
 181. Li, X. *et al.* Rad51 and Rad54 ATPase activities are both required to modulate Rad51-dsDNA filament dynamics. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4124–40 (2007).
 182. Tsai, Y.-C., Wang, Y., Urena, D. E., Kumar, S. & Chen, J. Heterology tolerance and recognition of mismatched base pairs by human Rad51 protein. *DNA Repair (Amst)*. **10**, 363–72 (2011).
 183. Qi, Z. *et al.* DNA sequence alignment by microhomology sampling during homologous recombination. *Cell* **160**, 856–69 (2015).
 184. Sung, P. & Klein, H. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 739–50 (2006).
 185. Li, M. J. *et al.* Rad51 expression and localization in B cells carrying out class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10222–7 (1996).
 186. Barrington, R. A., Fasullo, M. & Knight, K. L. A role for RAD51 in the generation of immunoglobulin gene diversity in rabbits. *J. Immunol.* **162**, 911–9 (1999).
 187. Wu, G., Jiang, X., Lee, W.-H. & Chen, P.-L. Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen Breakage Syndrome 1. *Cancer Res.* **63**, 2589–95 (2003).
 188. Wu, G., Lee, W. H. & Chen, P. L. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J. Biol. Chem.* **275**, 30618–22 (2000).
 189. Zhu, X. D., Küster, B., Mann, M., Petrini, J. H. & de Lange, T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* **25**, 347–52 (2000).
 190. Yeager, T. R. *et al.* Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* **59**, 4175–9 (1999).
 191. Bower, B. D. & Griffith, J. D. TRF1 and TRF2 differentially modulate Rad51-mediated telomeric and nontelomeric displacement loop formation in vitro. *Biochemistry* **53**, 5485–95 (2014).
 192. Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M. & Costanzo, V. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1305–11 (2010).
 193. Schlacher, K. *et al.* Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* **145**, 529–42 (2011).

194. Ying, S., Hamdy, F. C. & Helleday, T. Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Res.* **72**, 2814–21 (2012).
195. Short, S. C. *et al.* Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells. *Neuro. Oncol.* **13**, 487–99 (2011).
196. Kato, M. *et al.* Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J. Hum. Genet.* **45**, 133–7 (2000).
197. Wang, W. W. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**, 955–60 (2001).
198. Levy-Lahad, E. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3232–6 (2001).
199. Blasiak, J. *et al.* Analysis of the G/C polymorphism in the 5'-untranslated region of the RAD51 gene in breast cancer. *Acta Biochim. Pol.* **50**, 249–53 (2003).
200. Jakubowska, A. *et al.* Breast cancer risk reduction associated with the RAD51 polymorphism among carriers of the BRCA1 5382insC mutation in Poland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **12**, 457–9 (2003).
201. Kadouri, L. *et al.* A single-nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies breast cancer risk in BRCA2 carriers, but not in BRCA1 carriers or noncarriers. *Br. J. Cancer* **90**, 2002–5 (2004).
202. Ricks-Santi, L. J. *et al.* Association of Rad51 polymorphism with DNA repair in BRCA1 mutation carriers and sporadic breast cancer risk. *BMC Cancer* **11**, 278 (2011).
203. Vral, A. *et al.* Combined effect of polymorphisms in Rad51 and Xrcc3 on breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity. *Mol. Med. Rep.* **4**, 901–12
204. Chen, J. *et al.* Tumor-associated mutations in a conserved structural motif alter physical and biochemical properties of human RAD51 recombinase. *Nucleic Acids Res.* **43**, 1098–111 (2015).
205. Sun, H. *et al.* RAD51 G135C polymorphism is associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 22,399 subjects. *Breast Cancer Res. Treat.* **125**, 157–61 (2011).
206. Nissar, S. *et al.* RAD51 G135C gene polymorphism and risk of colorectal cancer in Kashmir. *Eur. J. Cancer Prev.* **23**, 264–8 (2014).
207. Ming-Zhong, S., Hui-Xiang, J., Zhong-Wei, Z., Hao, J. & Rong, Z. Genetic variants of the DNA damage repair genes XRCC4 and RAD51 are associated with susceptibility to esophageal cancer. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **39**, 379–83 (2015).
208. Kong, F., Wu, J., Hu, L., Du, Y. & Pan, Y. Association between RAD51 polymorphisms and susceptibility of head and neck cancer: a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 6412–9 (2015).

209. Han, H. *et al.* Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res.* **62**, 2890–6 (2002).
210. Wiegman, A. P. *et al.* Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis. *Oncotarget* **5**, 3261–72 (2014).
211. Tennstedt, P. *et al.* RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **132**, 2118–26 (2013).
212. Hansen, L. T., Lundin, C., Spang-Thomsen, M., Petersen, L. N. & Helleday, T. The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* **105**, 472–9 (2003).
213. Vispé, S., Cazaux, C., Lesca, C. & Defais, M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2859–64 (1998).
214. Hannay, J. A. F. *et al.* Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 1650–60 (2007).
215. Wang, Y., Huang, J.-W., Calses, P., Kemp, C. J. & Taniguchi, T. MiR-96 downregulates REV1 and RAD51 to promote cellular sensitivity to cisplatin and PARP inhibition. *Cancer Res.* **72**, 4037–46 (2012).
216. Ko, J.-C. *et al.* Role of repair protein Rad51 in regulating the response to gefitinib in human non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3632–41 (2008).
217. Hasselbach, L., Haase, S., Fischer, D., Kolberg, H. C. & Stürzbecher, H. W. Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **26**, 589–98 (2005).
218. Arias-Lopez, C. *et al.* p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep.* **7**, 219–24 (2006).
219. Fong, V. *et al.* Adenoviral vector driven by a minimal Rad51 promoter is selective for p53-deficient tumor cells. *PLoS One* **6**, e28714 (2011).
220. Hine, C. M. *et al.* Regulation of Rad51 promoter. *Cell Cycle* **13**, 2038–45 (2014).
221. Chen, J. *et al.* E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* **10**, 1287–94 (2011).
222. Wu, M., Wang, X., McGregor, N., Pienta, K. J. & Zhang, J. Dynamic regulation of Rad51 by E2F1 and p53 in prostate cancer cells upon drug-induced DNA damage under hypoxia. *Mol. Pharmacol.* **85**, 866–76 (2014).
223. Strausberg, R. L. *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16899–903 (2002).
224. Ota, T. *et al.* Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat. Genet.* **36**, 40–5 (2004).
225. Park, J.-Y. *et al.* Identification of a novel human Rad51 variant that promotes DNA

- p strand exchange.
- Nucleic Acids Res.*
- 36**
- , 3226–34 (2008).
226. Yoshikawa, K. *et al.* Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int. J. Cancer* **88**, 28–36 (2000).
 227. Mladenov, E., Anachkova, B. & Tsaneva, I. Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage. *Genes Cells* **11**, 513–24 (2006).
 228. Gildemeister, O. S., Sage, J. M. & Knight, K. L. Cellular redistribution of Rad51 in response to DNA damage: novel role for Rad51C. *J. Biol. Chem.* **284**, 31945–52 (2009).
 229. Jeyasekharan, A. D. *et al.* A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1191–8 (2013).
 230. Dosanjh, M. K. *et al.* Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1179–84 (1998).
 231. Masson, J. Y. *et al.* Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev.* **15**, 3296–307 (2001).
 232. Lio, Y.-C., Mazin, A. V, Kowalczykowski, S. C. & Chen, D. J. Complex formation by the human Rad51B and Rad51C DNA repair proteins and their activities in vitro. *J. Biol. Chem.* **278**, 2469–78 (2003).
 233. Tashiro, S. *et al.* S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene* **12**, 2165–70 (1996).
 234. Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V & Bartel, P. L. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J. Biol. Chem.* **272**, 31941–4 (1997).
 235. Katagiri, T. *et al.* Multiple possible sites of BRCA2 interacting with DNA repair protein RAD51. *Genes. Chromosomes Cancer* **21**, 217–22 (1998).
 236. Chen, J. J., Silver, D., Cantor, S., Livingston, D. M. & Scully, R. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res.* **59**, 1752s–1756s (1999).
 237. Yuan, S. S. *et al.* BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* **59**, 3547–51 (1999).
 238. Zhang, F., Fan, Q., Ren, K. & Andreassen, P. R. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol. Cancer Res.* **7**, 1110–8 (2009).
 239. Buisson, R. & Masson, J.-Y. PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10312–23 (2012).
 240. Pauty, J., Rodrigue, A., Couturier, A., Buisson, R. & Masson, J.-Y. Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer. *Biochem. J.* **460**, 331–42 (2014).
 241. Esashi, F., Galkin, V. E., Yu, X., Egelman, E. H. & West, S. C. Stabilization of RAD51

- nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 468–74 (2007).
242. Ayoub, N. *et al.* The carboxyl terminus of Brca2 links the disassembly of Rad51 complexes to mitotic entry. *Curr. Biol.* **19**, 1075–85 (2009).
 243. Carreira, A. *et al.* The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. *Cell* **136**, 1032–43 (2009).
 244. Schlacher, K. *et al.* Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* **145**, 529–42 (2011).
 245. Buisson, R. *et al.* Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1247–54 (2010).
 246. Dray, E. *et al.* Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1255–9 (2010).
 247. Van Dyck, E., Hajibagheri, N. M., Stasiak, A. & West, S. C. Visualisation of human rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. *J. Mol. Biol.* **284**, 1027–38 (1998).
 248. Sugiyama, T. & Kowalczykowski, S. C. Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 31663–72 (2002).
 249. Benson, F. E., Baumann, P. & West, S. C. Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* **391**, 401–4 (1998).
 250. Bertrand, P. *et al.* p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet.* **20**, 235–243 (2004).
 251. Kovalenko, O. V *et al.* Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2958–63 (1996).
 252. Bennett, B. T. & Knight, K. L. Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *J. Cell. Biochem.* **96**, 1095–109 (2005).
 253. Ko, J.-C. *et al.* HSP90 inhibition induces cytotoxicity via down-regulation of Rad51 expression and DNA repair capacity in non-small cell lung cancer cells. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **64**, 415–24 (2012).
 254. Flygare, J., Armstrong, R. C., Wennborg, A., Orsan, S. & Hellgren, D. Proteolytic cleavage of HsRad51 during apoptosis. *FEBS Lett.* **427**, 247–51 (1998).
 255. Huang, Y. *et al.* Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2986–97 (1999).
 256. Flygare, J., Hellgren, D. & Wennborg, A. Caspase-3 mediated cleavage of HsRad51 at an unconventional site. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5977–82 (2000).
 257. Takata, M. *et al.* Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2858–66 (2001).

258. Linke, S. P. *et al.* p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res.* **63**, 2596–605 (2003).
259. Sanchez, H., Kertokallio, A., van Rossum-Fikkert, S., Kanaar, R. & Wyman, C. Combined optical and topographic imaging reveals different arrangements of human RAD54 with presynaptic and postsynaptic RAD51-DNA filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11385–90 (2013).
260. Wesoly, J. *et al.* Differential contributions of mammalian Rad54 paralogs to recombination, DNA damage repair, and meiosis. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 976–89 (2006).
261. Sørensen, C. S. *et al.* The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* **7**, 195–201 (2005).
262. Yata, K. *et al.* Plk1 and CK2 act in concert to regulate Rad51 during DNA double strand break repair. *Mol. Cell* **45**, 371–83 (2012).
263. Yuan, Z. M. *et al.* Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **273**, 3799–802 (1998).
264. Chen, G. *et al.* Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J. Biol. Chem.* **274**, 12748–52 (1999).
265. Slupianek, A. *et al.* BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol. Cell* **8**, 795–806 (2001).
266. Popova, M. *et al.* Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependent on that of Y315. *FEBS Lett.* **583**, 1867–72 (2009).
267. Slupianek, A. *et al.* Targeting RAD51 phosphotyrosine-315 to prevent unfaithful recombination repair in BCR-ABL1 leukemia. *Blood* **118**, 1062–8 (2011).
268. Takizawa, Y. *et al.* Mutational analyses of the human Rad51-Tyr315 residue, a site for phosphorylation in leukaemia cells. *Genes Cells* **9**, 781–90 (2004).
269. Chu, W. K. *et al.* FBH1 influences DNA replication fork stability and homologous recombination through ubiquitylation of RAD51. *Nat. Commun.* **6**, 5931 (2015).
270. San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229–57 (2008).
271. Ranatunga, W. *et al.* Human RAD52 exhibits two modes of self-association. *J. Biol. Chem.* **276**, 15876–80 (2001).
272. Milne, G. T. & Weaver, D. T. Dominant negative alleles of RAD52 reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. *Genes Dev.* **7**, 1755–65 (1993).
273. Hays, S. L., Firmenich, A. A., Massey, P., Banerjee, R. & Berg, P. Studies of the interaction between Rad52 protein and the yeast single-stranded DNA binding protein RPA. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4400–6 (1998).
274. Baumann, P. & West, S. C. Heteroduplex formation by human Rad51 protein: effects of DNA end-structure, hRP-A and hRad52. *J. Mol. Biol.* **291**, 363–74 (1999).

275. Jackson, D., Dhar, K., Wahl, J. K., Wold, M. S. & Borgstahl, G. E. . Analysis of the Human Replication Protein A:Rad52 Complex: Evidence for Crosstalk Between RPA32, RPA70, Rad52 and DNA. *J. Mol. Biol.* **321**, 133–148 (2002).
276. Stasiak, A. Z. *et al.* The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Curr. Biol.* **10**, 337–340 (2000).
277. Kagawa, W. *et al.* Crystal Structure of the Homologous-Pairing Domain from the Human Rad52 Recombinase in the Undecameric Form. *Mol. Cell* **10**, 359–371 (2002).
278. Lloyd, J. A., McGrew, D. A. & Knight, K. L. Identification of residues important for DNA binding in the full-length human Rad52 protein. *J. Mol. Biol.* **345**, 239–49 (2005).
279. Mortensen, U. H., Erdeniz, N., Feng, Q. & Rothstein, R. A molecular genetic dissection of the evolutionarily conserved N terminus of yeast Rad52. *Genetics* **161**, 549–62 (2002).
280. Arai, N. *et al.* Vital roles of the second DNA-binding site of Rad52 protein in yeast homologous recombination. *J. Biol. Chem.* **286**, 17607–17 (2011).
281. Essers, J. *et al.* Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. *EMBO J.* **21**, 2030–7 (2002).
282. Jensen, R. B., Carreira, A. & Kowalczykowski, S. C. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* **467**, 678–83 (2010).
283. Feng, Z. *et al.* Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 686–91 (2011).
284. Lok, B. H., Carley, A. C., Tchang, B. & Powell, S. N. RAD52 inactivation is synthetically lethal with deficiencies in BRCA1 and PALB2 in addition to BRCA2 through RAD51-mediated homologous recombination. *Oncogene* **32**, 3552–8 (2013).
285. Chun, J., Buechelmaier, E. S. & Powell, S. N. Rad51 paralog complexes BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 387–95 (2013).
286. Liu, T., Wan, L., Wu, Y., Chen, J. & Huang, J. hSWS1·SWSAP1 is an evolutionarily conserved complex required for efficient homologous recombination repair. *J. Biol. Chem.* **286**, 41758–66 (2011).
287. Kitao, H. & Yuan, Z.-M. Regulation of ionizing radiation-induced Rad52 nuclear foci formation by c-Abl-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 48944–8 (2002).
288. Honda, M., Okuno, Y., Yoo, J., Ha, T. & Spies, M. Tyrosine phosphorylation enhances RAD52-mediated annealing by modulating its DNA binding. *EMBO J.* **30**, 3368–82 (2011).
289. Altmannova, V. *et al.* Rad52 SUMOylation affects the efficiency of the DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4708–21 (2010).
290. Bugreev, D. V., Hanaoka, F. & Mazin, A. V. Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 746–53

- (2007).
291. McIlwraith, M. J. & West, S. C. DNA repair synthesis facilitates RAD52-mediated second-end capture during DSB repair. *Mol. Cell* **29**, 510–6 (2008).
 292. Rijkers, T. *et al.* Targeted Inactivation of Mouse RAD52 Reduces Homologous Recombination but Not Resistance to Ionizing Radiation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6423–6429 (1998).
 293. Yamaguchi-Iwai, Y. *et al.* Homologous Recombination, but Not DNA Repair, Is Reduced in Vertebrate Cells Deficient in RAD52. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6430–6435 (1998).
 294. Mazloun, N. & Holloman, W. K. Second-end capture in DNA double-strand break repair promoted by Brh2 protein of *Ustilago maydis*. *Mol. Cell* **33**, 160–70 (2009).
 295. Martin, J. S., Winkelmann, N., Petalcorin, M. I. R., McIlwraith, M. J. & Boulton, S. J. RAD-51-dependent and -independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3127–39 (2005).
 296. Nijman, S. M. B. Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Lett.* **585**, 1–6 (2011).
 297. Kaelin, W. G. Synthetic lethality: a framework for the development of wiser cancer therapeutics. *Genome Med.* **1**, 99 (2009).
 298. Lehár, J., Stockwell, B. R., Giaever, G. & Nislow, C. Combination chemical genetics. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 674–81 (2008).
 299. Hillenmeyer, M. E. *et al.* The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science* **320**, 362–5 (2008).
 300. Luo, J., Solimini, N. L. & Elledge, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* **136**, 823–37 (2009).
 301. Costanzo, M. *et al.* The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425–31 (2010).
 302. Fiedler, D. *et al.* Functional organization of the *S. cerevisiae* phosphorylation network. *Cell* **136**, 952–63 (2009).
 303. Lum, P. Y. *et al.* Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* **116**, 121–37 (2004).
 304. Yu, L. *et al.* Chemical-genetic profiling of imidazo[1,2-a]pyridines and -pyrimidines reveals target pathways conserved between yeast and human cells. *PLoS Genet.* **4**, e1000284 (2008).
 305. Ericson, E. *et al.* Off-target effects of psychoactive drugs revealed by genome-wide assays in yeast. *PLoS Genet.* **4**, e1000151 (2008).
 306. Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C. & Stockwell, B. R. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* **3**, 285–96 (2003).
 307. Guo, W., Wu, S., Liu, J. & Fang, B. Identification of a small molecule with synthetic

- lethality for K-ras and protein kinase C iota. *Cancer Res.* **68**, 7403–8 (2008).
308. Turcotte, S. *et al.* A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell* **14**, 90–102 (2008).
 309. Zimmermann, G. R., Lehár, J. & Keith, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov. Today* **12**, 34–42 (2007).
 310. Hartwell, L. H., Szankasi, P., Roberts, C. J., Murray, A. W. & Friend, S. H. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* **278**, 1064–8 (1997).
 311. Weinstein, I. B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* **297**, 63–4 (2002).
 312. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–21 (2005).
 313. Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913–7 (2005).
 314. Fong, P. C. *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* **361**, 123–34 (2009).
 315. Fong, P. C. *et al.* Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2512–9 (2010).
 316. Ashworth, A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J. Clin. Oncol.* **26**, 3785–90 (2008).
 317. Iglehart, J. D. & Silver, D. P. Synthetic lethality--a new direction in cancer-drug development. *N. Engl. J. Med.* **361**, 189–91 (2009).
 318. Sandhu, S. K., Yap, T. A. & de Bono, J. S. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer treatment: a clinical perspective. *Eur. J. Cancer* **46**, 9–20 (2010).
 319. Takaku, M. *et al.* Halenaquinone, a chemical compound that specifically inhibits the secondary DNA binding of RAD51. *Genes Cells* **16**, 427–36 (2011).
 320. Huang, F. *et al.* Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. *ACS Chem. Biol.* **6**, 628–35 (2011).
 321. Huang, F., Mazina, O. M., Zentner, I. J., Cocklin, S. & Mazin, A. V. Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase. *J. Med. Chem.* **55**, 3011–20 (2012).
 322. Huang, F. & Mazin, A. V. A small molecule inhibitor of human RAD51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts. *PLoS One* **9**, e100993 (2014).
 323. Alagpulinsa, D. A., Ayyadevara, S. & Shmookler Reis, R. J. A Small-Molecule Inhibitor of RAD51 Reduces Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to Doxorubicin. *Front. Oncol.* **4**, 289 (2014).

324. Budke, B. *et al.* RI-1: a chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. *Nucleic Acids Res.* **40**, 7347–57 (2012).
325. Budke, B. *et al.* An optimized RAD51 inhibitor that disrupts homologous recombination without requiring Michael acceptor reactivity. *J. Med. Chem.* **56**, 254–63 (2013).
326. Lv, W., Budke, B., Pawlowski, M., Connell, P. P. & Kozikowski, A. P. Development of Small Molecules that Specifically Inhibit the D-loop Activity of RAD51. *J. Med. Chem.* (2016). doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01762
327. Zhu, J. *et al.* A novel small molecule RAD51 inactivator overcomes imatinib-resistance in chronic myeloid leukaemia. *EMBO Mol. Med.* **5**, 353–65 (2013).
328. Zhu, J. *et al.* Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of novel RAD51 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **96**, 196–208 (2015).
329. Nomme, J. *et al.* Design of potent inhibitors of human RAD51 recombinase based on BRC motifs of BRCA2 protein: modeling and experimental validation of a chimera peptide. *J. Med. Chem.* **53**, 5782–91 (2010).
330. Knauf, P. A. & Rothstein, A. Chemical modification of membranes. I. Effects of sulfhydryl and amino reactive reagents on anion and cation permeability of the human red blood cell. *J. Gen. Physiol.* **58**, 190–210 (1971).
331. Miller, C. & White, M. M. A voltage-dependent chloride conductance channel from Torpedo electroplax membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **341**, 534–51 (1980).
332. Wulff, H. New light on the ‘old’ chloride channel blocker DIDS. *ACS Chem. Biol.* **3**, 399–401 (2008).
333. Suzuki, M., Morita, T. & Iwamoto, T. Diversity of Cl(-) channels. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 12–24 (2006).
334. Pusch, M., Zifarelli, G., Murgia, A. R., Picollo, A. & Babini, E. Channel or transporter? The CLC saga continues. *Exp. Physiol.* **91**, 149–52 (2006).
335. Wieth, J. O., Brahm, J. & Funder, J. Transport and interactions of anions and protons in the red blood cell membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **341**, 394–418 (1980).
336. Faelli, A., Tosco, M., Orsenigo, M. N. & Esposito, G. Effects of the stilbene derivatives SITS and DIDS on intestinal ATPase activities. *Pharmacol. Res. Commun.* **16**, 339–50 (1984).
337. Horvat, B., Taheri, S. & Salihagić, A. Tumour cell proliferation is abolished by inhibitors of Na⁺/H⁺ and HCO₃⁻/Cl⁻ exchange. *Eur. J. Cancer* **29A**, 132–7 (1992).
338. Hosogi, S. *et al.* An inhibitor of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger (NHE), ethyl-isopropyl amiloride (EIPA), diminishes proliferation of MKN28 human gastric cancer cells by decreasing the cytosolic Cl(-) concentration via DIDS-sensitive pathways. *Cell. Physiol. Biochem.* **30**, 1241–53 (2012).
339. Gray, A. L. *et al.* Isothiocyanatostilbenes as novel c-Met inhibitors. *Oncotarget* **6**, 41180–93 (2015).

340. Ishida, T. *et al.* DIDS, a chemical compound that inhibits RAD51-mediated homologous pairing and strand exchange. *Nucleic Acids Res.* **37**, 3367–76 (2009).
341. Stark, J. M. *et al.* ATP hydrolysis by mammalian RAD51 has a key role during homology-directed DNA repair. *J. Biol. Chem.* **277**, 20185–94 (2002).
342. Lamont, K. R. *et al.* Attenuating homologous recombination stimulates an AID-induced antileukemic effect. *J. Exp. Med.* **210**, 1021–33 (2013).
343. Muramatsu, M. *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553–63 (2000).
344. Hasham, M. G. *et al.* Widespread genomic breaks generated by activation-induced cytidine deaminase are prevented by homologous recombination. *Nat. Immunol.* **11**, 820–6 (2010).
345. Cramer-Morales, K. *et al.* Personalized synthetic lethality induced by targeting RAD52 in leukemias identified by gene mutation and expression profile. *Blood* **122**, 1293–304 (2013).
346. Chandramouly, G. *et al.* Small-Molecule Disruption of RAD52 Rings as a Mechanism for Precision Medicine in BRCA-Deficient Cancers. *Chem. Biol.* (2015). doi:10.1016/j.chembiol.2015.10.003
347. Sullivan, K. *et al.* Identification of a Small Molecule Inhibitor of RAD52 by Structure-Based Selection. *PLoS One* **11**, e0147230 (2016).
348. Lok, B. H. & Powell, S. N. Molecular pathways: understanding the role of Rad52 in homologous recombination for therapeutic advancement. *Clin. Cancer Res.* **18**, 6400–6 (2012).
349. Khanna, K. K. & Jackson, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* **27**, 247–54 (2001).
350. Pfeiffer, P., Goedecke, W., Kuhfittig-Kulle, S. & Obe, G. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet. Genome Res.* **104**, 7–13 (2004).
351. Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A. & Lahav, G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol. Cell* **47**, 320–9 (2012).
352. Mladenov, E., Magin, S., Soni, A. & Iliakis, G. DNA Double-Strand-Break Repair in Higher Eukaryotes and its Role in Genomic Instability and Cancer: Cell Cycle and Proliferation-Dependent Regulation. *Semin. Cancer Biol.* (2016). doi:10.1016/j.semcancer.2016.03.003
353. Ha, T., Kozlov, A. G. & Lohman, T. M. Single-molecule views of protein movement on single-stranded DNA. *Annu. Rev. Biophys.* **41**, 295–319 (2012).
354. Maacke, H. *et al.* Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int. J. Cancer* **88**, 907–13 (2000).

355. Carbone, A., Fioretti, F. M., Fucci, L., Ausió, J. & Piscopo, M. High efficiency method to obtain supercoiled DNA with a commercial plasmid purification kit. *Acta Biochim. Pol.* **59**, 275–8 (2012).
356. Pauty, J. *et al.* Investigation of the DNA damage response to SFOM-0046, a new small-molecule drug inducing DNA double-strand breaks. *Sci. Rep.* **6**, 23302 (2016).
357. Haaf, T., Golub, E. I., Reddy, G., Radding, C. M. & Ward, D. C. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2298–302 (1995).
358. Seluanov, A., Mao, Z. & Gorbunova, V. Analysis of DNA double-strand break (DSB) repair in mammalian cells. *J. Vis. Exp.* (2010). doi:10.3791/2002
359. Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. Chemistry in living systems. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 13–21 (2005).
360. Griffin, R. J. The medicinal chemistry of the azido group. *Prog. Med. Chem.* **31**, 121–232 (1994).
361. Lloyd, J. A., Forget, A. L. & Knight, K. L. Correlation of biochemical properties with the oligomeric state of human rad52 protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 46172–8 (2002).
362. Karran, P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 144–50 (2000).
363. van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. & Kanaar, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 196–206 (2001).
364. Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y. M., Morrison, C. & Takeda, S. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 8388–94 (2001).
365. Haber, J. E. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 271–5 (1999).
366. Stark, J. M., Pierce, A. J., Oh, J., Pastink, A. & Jasin, M. Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9305–16 (2004).
367. Pâques, F. & Haber, J. E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 349–404 (1999).
368. Huang, F. *et al.* Targeting BRCA1- and BRCA2-deficient cells with RAD52 small molecule inhibitors. *Nucleic Acids Res.* (2016). doi:10.1093/nar/gkw087
369. Xia, B. *et al.* Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat. Genet.* **39**, 159–61 (2007).
370. Genois, M.-M. *et al.* Roles of Rad51 paralogs for promoting homologous recombination in *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res.* **43**, 2701–15 (2015).
371. Hodi, F. S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic

- melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–23 (2010).
372. Robert, C. *et al.* Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 150419053123009 (2015).
373. Gentzler, R. *et al.* Beyond melanoma: inhibiting the PD-1/PD-L1 pathway in solid tumors. *Immunotherapy* **8**, 583–600 (2016).
374. Churlaud, G. *et al.* Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. *Clin. Immunol.* **151**, 114–26 (2014).
375. Brentjens, R. J. *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* **5**, 177ra38 (2013).
376. Favaudon, V. *et al.* Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci. Transl. Med.* **6**, 245ra93 (2014).
377. Favaudon, V., Fouillade, C. & Vozenin, M.-C. [Ultrahigh dose-rate, ‘flash’ irradiation minimizes the side-effects of radiotherapy]. *Cancer radiothérapie J. la Société Fr. radiothérapie Oncol.* **19**, 526–31 (2015).
378. Else, M., Dearden, C. E. & Catovsky, D. Long-term follow-up after purine analogue therapy in hairy cell leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **28**, 217–29 (2015).
379. Hamilton, E. & Infante, J. R. Targeting CDK4/6 in patients with cancer. *Cancer Treat. Rev.* **45**, 129–38 (2016).
380. Xu, W., Rush, J., Rickett, K. & Coward, J. I. G. Mucinous ovarian cancer: A therapeutic review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2016). doi:10.1016/j.critrevonc.2016.03.015
381. Bilancia, D. *et al.* Lapatinib in breast cancer. *Ann. Oncol.* **18 Suppl 6**, vi26–30 (2007).
382. Molina-Garrido, M. J., Guillen-Ponce, C. & Mora-Rufete, A. Targeted anti-HER2 cancer therapy in elderly women diagnosed with breast cancer. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **14**, 639–45 (2014).
383. Cohen, P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 309–15 (2002).
384. Kantarjian, H. *et al.* Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* **346**, 645–52 (2002).
385. Shimizu, H. *et al.* c-ABL tyrosine kinase stabilizes RAD51 chromatin association. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 286–291 (2009).
386. Arteaga, C. L. & Engelman, J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* **25**, 282–303 (2014).
387. Liu, J. F. *et al.* A Phase 1 trial of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib (AZD2281) in combination with the anti-angiogenic cediranib (AZD2171) in recurrent epithelial ovarian or triple-negative breast cancer. *Eur. J. Cancer* **49**, 2972–8 (2013).

388. Liu, J. F. *et al.* Combination cediranib and olaparib versus olaparib alone for women with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 study. *Lancet. Oncol.* **15**, 1207–14 (2014).
389. Fojo, T. & Bates, S. Mechanisms of resistance to PARP inhibitors--three and counting. *Cancer Discov.* **3**, 20–3 (2013).
390. Jaunet-Lahary, T. *et al.* A Joint Theoretical and Experimental Study of the Behavior of the DIDS Inhibitor and its Derivatives. *Chemphyschem* (2016). doi:10.1002/cphc.201600107
391. De Campos Vidal, B. The use of the fluorescent probe 8-anilinonaphthalene sulfate (ANS) for collagen and elastin histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **26**, 196–201 (1978).
392. Gasymov, O. K. & Glasgow, B. J. ANS fluorescence: potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 403–11 (2007).
393. Essassi, D., Zini, R. & Tillement, J. P. Use of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a fluorescent probe in the investigation of drug interactions with human alpha-1-acid glycoprotein and serum albumin. *J. Pharm. Sci.* **79**, 9–13 (1990).
394. Zsila, F. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. *Mol. Pharm.* **10**, 1668–82 (2013).
395. Sudlow, G., Birkett, D. J. & Wade, D. N. The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Mol. Pharmacol.* **11**, 824–832 (1975).
396. He, X. M. & Carter, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209–15 (1992).
397. Lighnter, D. A., Wijekoon, W. M. & Zhang, M. H. Understanding bilirubin conformation and binding. Circular dichroism of human serum albumin complexes with bilirubin and its esters. *J. Biol. Chem.* **263**, 16669–76 (1988).
398. Bouvier, M. & Brown, G. R. The induced circular dichroism of bilirubin complexed with the alpha-helix form of poly(L-lysine). *Biochim. Biophys. Acta* **991**, 303–9 (1989).
399. Goncharova, I., Orlov, S. & Urbanová, M. The location of the high- and low-affinity bilirubin-binding sites on serum albumin: ligand-competition analysis investigated by circular dichroism. *Biophys. Chem.* **180–181**, 55–65
400. Minomo, A. *et al.* Biological characteristics of two lysines on human serum albumin in the high-affinity binding of 4Z,15Z-bilirubin-IX α revealed by phage display. *FEBS J.* **278**, 4100–11 (2011).
401. Sochacka, J. Application of phenol red as a marker ligand for bilirubin binding site at subdomain IIA on human serum albumin. *J. Photochem. Photobiol. B.* **151**, 89–99 (2015).
402. Zunszain, P. A., Ghuman, J., McDonagh, A. F. & Curry, S. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IX α . *J. Mol. Biol.* **381**, 394–406 (2008).

403. Stehle, G. *et al.* Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself--implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **26**, 77–100 (1997).
404. Jain, R. K. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res.* **48**, 2641–58 (1988).
405. Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387–92 (1986).
406. Greish, K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J. Drug Target.* **15**, 457–64
407. Isaacs, J. T. *et al.* Anti-cancer potency of tasquinimod is enhanced via albumin-binding facilitating increased uptake in the tumor microenvironment. *Oncotarget* **5**, 8093–106 (2014).
408. Stepanenko, I. N. *et al.* Conjugation of organoruthenium(II) 3-(1H-benzimidazol-2-yl)pyrazolo[3,4-b]pyridines and indolo[3,2-d]benzazepines to recombinant human serum albumin: a strategy to enhance cytotoxicity in cancer cells. *Inorg. Chem.* **50**, 12669–79 (2011).
409. Webb, M. I. *et al.* Increasing the bioavailability of Ru(III) anticancer complexes through hydrophobic albumin interactions. *Chemistry* **19**, 17031–42 (2013).
410. Durante, S. *et al.* Anti-tumor activity of fenretinide complexed with human serum albumin in lung cancer xenograft mouse model. *Oncotarget* **5**, 4811–20 (2014).
411. Sebak, S., Mirzaei, M., Malhotra, M., Kulamarva, A. & Prakash, S. Human serum albumin nanoparticles as an efficient noscapine drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and in vitro analysis. *Int. J. Nanomedicine* **5**, 525–32 (2010).
412. Pignatta, S. *et al.* Albumin nanocapsules containing fenretinide: pre-clinical evaluation of cytotoxic activity in experimental models of human non-small cell lung cancer. *Nanomedicine* **11**, 263–73 (2015).
413. Amunugama, R., Groden, J. & Fishel, R. The HsRAD51B-HsRAD51C stabilizes the HsRAD51 nucleoprotein filament. *DNA Repair (Amst)*. **12**, 723–32 (2013).
414. Martinez, J. S. *et al.* BRCA2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 3515–20 (2016).
415. Sacher, M., Pfander, B., Hoege, C. & Jentsch, S. Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1284–90 (2006).
416. Torres-Rosell, J. *et al.* The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat. Cell Biol.* **9**, 923–31 (2007).
417. Ohuchi, T. *et al.* Rad52 sumoylation and its involvement in the efficient induction of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*. **7**, 879–89 (2008).

418. Altmannova, V. *et al.* Rad52 SUMOylation affects the efficiency of the DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4708–21 (2010).
419. Choi, B. H., Chen, Y. & Dai, W. Chromatin PTEN is involved in DNA damage response partly through regulating Rad52 sumoylation. *Cell Cycle* **12**, 3442–7 (2013).
420. Ghosal, G. & Chen, J. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Transl. Cancer Res.* **2**, 107–129 (2013).
421. Panier, S. & Boulton, S. J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 7–18 (2014).
422. Panier, S. & Durocher, D. Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 661–72 (2013).
423. González-Marín, C., Gosálvez, J. & Roy, R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 14026–52 (2012).
424. Sung, P. & Klein, H. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 739–50 (2006).
425. Valerie, K. & Povirk, L. F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**, 5792–5812 (2003).
426. Haldenby, S., White, M. F. & Allers, T. RecA family proteins in archaea: RadA and its cousins. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 102–7 (2009).
427. Bi, B., Rybalchenko, N., Golub, E. I. & Radding, C. M. Human and yeast Rad52 proteins promote DNA strand exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9568–72 (2004).
428. Liu, J. & Heyer, W.-D. Who's who in human recombination: BRCA2 and RAD52. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 441–2 (2011).
429. Thompson, J. M., Nguyen, Q. H., Singh, M. & Razorenova, O. V. Approaches to identifying synthetic lethal interactions in cancer. *Yale J. Biol. Med.* **88**, 145–55 (2015).

Annexes

Annexe 1 – Investigations sur la réponse aux dommages de l'ADN vis-à-vis de SFOM-0046, une nouvelle petite molécule induisant des cassures double-brin

Résumé : Le 2-Ethylphenyl 4-(3-ethylureido)benzenesulfonate (SFOM-0046) est un nouvel agent anticancéreux qui bloque le cycle cellulaire en phase S et induit un stress de la réplication de l'ADN aboutissant à la phosphorylation de H2AX en γ -H2AX. Premièrement, en utilisant des cellules M21, HT29, HT-1080 et HeLa, nous avons confirmé que l'arrêt du cycle cellulaire en phase S et la formation de foyers γ -H2AX induits par SFOM-0046 est un mécanisme général observable dans plusieurs types de lignées cellulaires cancéreuses. En plus de γ -H2AX, SFOM-0046 active la voie ATR-Chk1 dans les cellules M21 et HT29 alors que les deux voies ATR-Chk1 et ATM-Chk2 sont activées dans les cellules HCT116. La col-localisation des foyers 53BP1 induits par SFOM-0046 avec les foyers γ -H2AX confirme le fait que les dommages à l'ADN générés correspondent à des cassures double-brin (CDB). En corrélation avec l'arrêt en phase S du cycle cellulaire, le traitement par SFOM-0046 induit la formation de foyers RAD51 mais pas celle de foyers DNA-PKcs, confirmant le fait que la recombinaison homologue est la principale voie cellulaire ciblée par la molécule. De plus, en utilisant des cellules isogéniques HCT116 p53^{+/+} et HCT116 p53^{-/-}, nous avons montré que p53 joue un rôle prépondérant dans le mécanisme de survie induit par SFOM-0046. Finalement, SFOM-0046 présente un effet antitumoral dépendant de la dose sur des cellules de fibrosarcome humain HT-1080 greffées dans des membranes chorioallantoïdiennes de poulet, sans induire de toxicité pour l'embryon, même pour de hautes doses. Pris ensemble, nos résultats mettent en avant la molécule SFOM-0046 comme une molécule induisant une réponse au stress de réplication très prometteuse.

Abstract : 2-Ethylphenyl 4-(3-ethylureido)benzenesulfonate (SFOM-0046) is a novel anticancer agent that arrests cell cycle in S-phase and causes DNA replication stress leading to the phosphorylation of H2AX into γ -H2AX. First, using the M21, HT29, HT-1080 and HeLa cell lines, we confirmed that S-phase cell cycle arrest and γ -H2AX foci induction by SFOM-0046 is a general mechanism occurring in diverse cancer cell lines. In addition to γ -H2AX, SFOM-0046 activates preferentially ATR-Chk1 in M21 and HT29 cells while both ATR-Chk1 and ATM-Chk2 pathways are activated in HCT116 cells. Co-localization of SFOM-0046-induced 53BP1 foci with γ -H2AX foci validates that the DNA damage generated corresponds to double-strand-breaks (DSBs). Consistent with an S-phase arrest, SFOM-0046 treatment induces RAD51 foci formation but not DNA-PKcs foci, confirming that homologous recombination is the major DSB repair pathway targeted by the drug. Furthermore, using isogenic HCT116 p53^{+/+} and HCT116 p53^{-/-} cells, we showed that p53 plays a key role in the survival mechanism to SFOM-0046. Finally, SFOM-0046 exhibits a dose-dependent antitumor activity on human fibrosarcoma HT-1080 tumours grafted onto chick chorioallantoic membranes without showing embryo toxicity even at high doses. Altogether, our results highlight SFOM-0046 as a very promising drug that induces a replication stress response.

Scientific Reports **2016**; 6: 23302.; doi:10.1038/srep23302

Investigation of the DNA damage response to SFOM-0046, a new small-molecule drug inducing DNA double-strand breaks

Joris Pauty,^{1,2} Marie-France Côté,³ Amélie Rodrigue,^{1,2} Denis Velic,^{1,2} Jean-Yves Masson,^{1,2} and Sébastien Fortin^{a,3,4}

¹Genome Stability Laboratory, CHU de Québec Research Center, Oncology Axis, Hôtel-Dieu-de-Québec, 9 McMahon, Quebec City, QC, G1R 2J6, Canada

²Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, G1V 0A6, Canada

³CHU de Québec Research Center, Oncology Axis, Hôpital Saint-François d'Assise, 10 de l'Espinay, Quebec City, QC, G1L 3L5, Canada

⁴Faculty of Pharmacy, Laval University, Quebec City, QC, G1V 0A6, Canada

^aEmail : sebastien.fortin@pha.ulaval.ca

Received 2015 Jun 4; Accepted 2016 Mar 3.

Abstract: 2-Ethylphenyl 4-(3-ethylureido)benzenesulfonate (SFOM-0046) is a novel anticancer agent that arrests cell cycle in S-phase and causes DNA replication stress leading to the phosphorylation of H2AX into γ -H2AX. First, using the M21, HT29, HT-1080 and HeLa cell lines, we confirmed that S-phase cell cycle arrest and γ -H2AX foci induction by SFOM-0046 is a general mechanism occurring in diverse cancer cell lines. In addition to γ -H2AX, SFOM-0046 activates preferentially ATR-Chk1 in M21 and HT29 cells while both ATR-Chk1 and ATM-Chk2 pathways are activated in HCT116 cells. Co-localization of SFOM-0046-induced 53BP1 foci with γ -H2AX foci validates that the DNA damage generated corresponds to double-strand-breaks (DSBs). Consistent with an S-phase arrest, SFOM-0046 treatment induces RAD51 foci formation but not DNA-PKcs foci, confirming that homologous recombination is the major DSB repair pathway targeted by the drug. Furthermore, using

isogenic HCT116 p53^{+/+} and HCT116 p53^{-/-} cells, we showed that p53 plays a key role in the survival mechanism to SFOM-0046. Finally, SFOM-0046 exhibits a dose-dependent antitumor activity on human fibrosarcoma HT-1080 tumours grafted onto chick chorioallantoic membranes without showing embryo toxicity even at high doses. Altogether, our results highlight SFOM-0046 as a very promising drug that induces a replication stress response.

The DNA damage response has a crucial and natural function to maintain the genome integrity in all eukaryotic cells¹. It comprises a complex network of signalling and transduction pathways involving proteins that sense DNA damage and coordinate many cellular processes, including DNA repair, damage tolerance, transcriptional responses, DNA damage checkpoints and apoptosis². 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 signalling and repair pathways³. 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 (γ -H2AX)^{4,5}. Chk1 and Chk2 are key cell cycle checkpoint kinases while histone H2AX is crucial for recruiting and maintaining downstream effectors and repair proteins at DNA damage sites. Notably, the phosphorylation of H2AX into γ -H2AX, a proper indicator of DNA damage and replication stress, is considered a hallmark of the number of DNA double-strand breaks (DSBs) generated⁶. Although ATM and ATR partially play overlapping, additive and cooperative roles in DNA damage response, they play also distinct roles during DNA repair⁷. ATM is mostly responsible to respond to DNA DSBs as well as disruption of the chromatin structure while ATR responds primarily to single-stranded DNA induced by UV damage and stalled replication forks⁸. Another important player of the DNA damage response is 53BP1, which binds damaged chromatin through multiple histone modifications initiated by MDC1⁹.

There are two main pathways to repair DNA DSBs in eukaryotic cells, homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ)¹⁰. The initial step in NHEJ is the recognition and binding of the Ku heterodimer, composed of the Ku70 and Ku80, proteins to the DSB¹¹. The Ku heterodimer then recruits, either directly or indirectly, DNA-PKcs, DNA ligase IV, XRCC4, XRCC4-like factor (XLF), and aprataxin-and-PNK-like factor (APLF) to DSBs¹². DNA-PKcs is autophosphorylated at Thr2609 *in vivo* in a Ku-dependent manner in response to ionizing radiation¹³. If the ends of the DSBs are compatible and exhibit 3' hydroxyl

and 5' phosphate termini, end processing by the Artemis nuclease is not necessary¹⁴. The DNA ligase IV complex, consisting of the catalytic subunit DNA ligase IV and its cofactor XRCC4, performs the ligation step of the ends to complete DNA repair of the DSBs¹⁵.

The NHEJ repair mechanism occurs throughout the cell cycle and may introduce mutations at repair sites while the HR mechanism is considered to be error free. HR can be divided into presynaptic, synaptic, and post-synaptic stages. In the presynaptic phase, HR is initiated by the binding of the heterotrimeric MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex to the broken DNA ends¹⁶. MRE11 initiates 5'-3' nucleolytic processing, which is continued by the combined action of EXO1, BLM, and DNA2. Next, the heterotrimeric ssDNA-binding protein replication protein A (RPA) coats the resected DNA and inhibits secondary structures formation to facilitate the loading of RAD51¹⁷, a step that is mediated by BRCA2 and/or PALB2¹⁸. In the synaptic phase, RAD51 promotes DNA strand exchange between the broken and the targeted homologous DNA to form the displacement loop (D-loop), which contains the novel heteroduplex DNA and the displaced strand of the donor DNA¹⁹. In the postsynaptic phase, DNA synthesis is primed from the broken 3' end. Mitotic DSBs are preferentially repaired by synthesis-dependent strand annealing (SDSA), in which the invading strand is displaced after DNA synthesis and then anneals with the second DSB end²⁰.

We recently uncovered a new class of compounds designated as *N*-phenyl ureidobenzenesulfonates (PUB-SOs, Fig. 1) that exhibited antiproliferative activity in the micromolar range on several human tumour cell lines notably M21 skin melanoma, estrogen-dependent MCF-7 breast adenocarcinoma and HT29 colon adenocarcinoma^{21,22}. PUB-SOs blocked Jurkat cell cycle progression in S-phase and induced the formation of γ -H2AX in M21 cells, indicating that these new agents led to DNA replication stress. The screening of our PUB-SOs chemolibrary identified 2-ethylphenyl 4-(3-ethylureido)benzenesulfonate (SFOM-0046) as a promising new anticancer drug. Interestingly, the molecular structure of SFOM-0046 is devoid of elements allowing spontaneous DNA alkylation or DNA intercalation. Consequently, its mechanism of action is not related to a direct interaction with DNA to generate replication stress. In this study, we investigated the DNA-damaging properties of SFOM-0046 and its effect on the DNA damage response using M21 and HT29 cells. We also analysed the antitumoral activity of SFOM-0046 on the HT-1080 fibrosarcoma cell line grafted onto the chick chorioallantoic membranes (CAM assay).

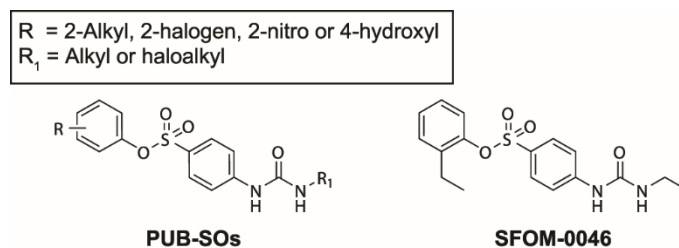


Figure 1. Chemical structure of PUB-SOs and SFOM-0046.

Results

S-phase arrest and induction of γ -H2AX by SFOM-0046 is a general mechanism of action

To evidence that S-phase cell cycle arrest by SFOM-0046 is part of a general mechanism of action that is not specific to Jurkat cells²², we have investigated the effect of SFOM-0046 on cell cycle progression of human M21 melanoma, HT29 colon adenocarcinoma, HT-1080 fibrosarcoma, and HeLa cervix adenocarcinoma cells using flow cytometry. Cells were treated with DMSO, cisplatin (15 μ M, as a positive control) or SFOM-0046 (6 μ M) for 24 h prior to flow cytometry analysis (Fig. 2A). When treated with DMSO, the majority of the cells were in G0/G1-phase. Indeed, 59, 56, 44 and 73% were in G0/G1-phase for M21, HT29, HT-1080 and HeLa cells, respectively. Moreover, fewer cells were in S-phase with 17, 19, 19 and 13% of cells for M21, HT29, HT-1080 and HeLa cells, respectively. Treatment with cisplatin, a DNA-interstrand and -intrastrand crosslinker that interferes with DNA replication²³, resulted in an S-phase accumulation of 22, 33, 50 and 59% for M21, HT29, HT-1080 and HeLa cells, respectively. These results are similar to those obtained with M21, HT29, HT-1080 and HeLa cells treated with 6 μ M of SFOM-0046, where 27, 30, 51 and 40% of the cells were accumulated in S-phase, respectively. Thereafter, we set out to confirm our previous results with M21 cells showing that SFOM-0046-induced S-phase arrest is due to DNA damage accumulation, using another cell line (HT29). To that end, we performed immunofluorescence staining to detect the phosphorylation of the histone variant H2AX, known to be phosphorylated on Ser139^{24,25} to form γ -H2AX foci in response to DNA DSBs. M21 and HT29 cells were treated either with SFOM-0046 (6 μ M), cisplatin (30 μ M) or DMSO for 24 h, followed by immunofluorescence staining to detect the formation of γ -H2AX foci. As depicted in Fig. 2B, SFOM-0046 and the positive control cisplatin induced an increase in the number of γ -H2AX foci compared to DMSO, used as excipient and negative control, in both cell lines. Quantification revealed that upon treatment with SFOM-0046 or cisplatin at least 70% of M21 cells had 10 or more γ -H2AX foci compared to only 10% with DMSO treatment. These results were also confirmed in all

other cancer cell lines tested so far, including HeLa and HCT116. Altogether, these results indicate that the accumulation of cells in S-phase and the generation of DNA replication stress induced by SFOM-0046 is not cell-type specific, supporting a general mechanism of action in cancer cell lines.

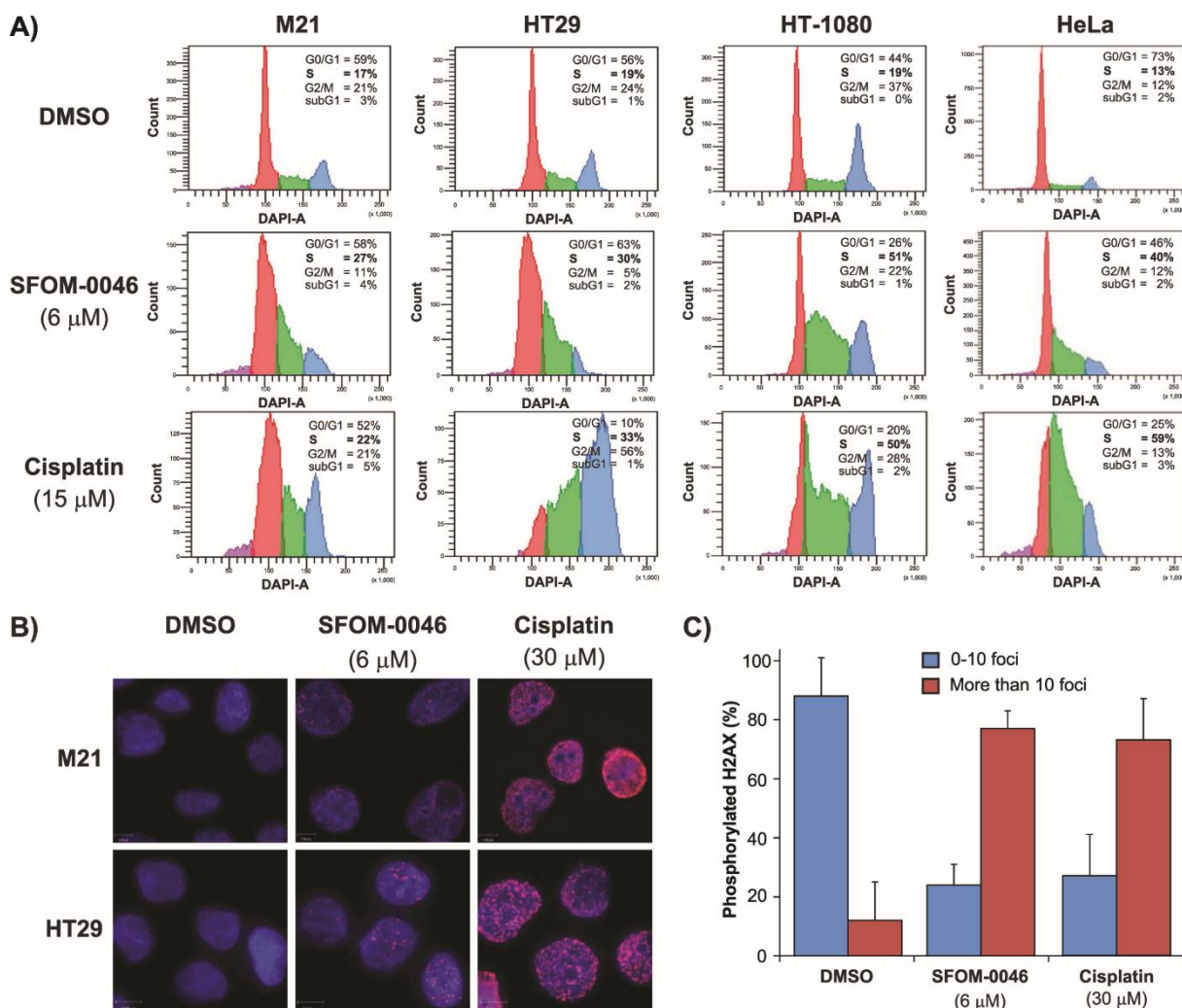


Figure 2. (A) Effect of a 24-h treatment with DMSO, SFOM-0046 (6 μM) or cisplatin (15 μM) on the cell cycle progression of M21, HT29, HT-1080 and HeLa cells. (B) Effect of DMSO, SFOM-0046 (6 μM) and cisplatin (30 μM) on the phosphorylation of H2AX into γ-H2AX after 24 h of treatment in M21 and HT29 cells. (C) Quantification of the number of M21 cells displaying less and more than 10 γ-H2AX foci.

SFOM-0046 activates ATR-Chk1 and ATM-Chk2 pathways

The latter results suggested that SFOM-0046 induces DNA replication stress by elevating DNA damage, causing an arrest of cell cycle progression in S-phase. To identify which DNA damage checkpoint is involved in promoting the S-phase arrest, M21 and HT29 cells were treated with DMSO or escalating concentrations of SFOM-0046 or cisplatin for 24 h. Whole cell extracts were then prepared and analysed by immunoblotting to detect the phosphorylated, or activated,

forms of ATR, ATM, Chk1, Chk2 and p53. As shown in Fig. 3, HT29 and M21 cells exhibited higher levels of phosphorylation of ATR (Thr1989), ATM (Ser1981), Chk1 (Ser317) and Chk2 (Thr68) after a 24-h cisplatin treatment. Phosphorylation of ATR, ATM, and Chk1 was also detected with SFOM-0046 treatment. However, Chk2 was phosphorylated to a much lesser extent than Chk1 in both cell lines, suggesting that ATM is activated more weakly than ATR by SFOM-0046. In support of this, the kinetics of activation of ATR and Chk1 by SFOM-0046 (6 μ M) at 2, 4, 6, 16, and 24 h shows that ATR is quickly phosphorylated (2 h) followed by activation of Chk1 at 6 h (Fig. S2). These results suggest that SFOM-0046 induces preferentially the activation of ATR and also that the activation of Chk1 and Chk2 is mainly mediated by respective phosphorylation of ATR and ATM. While the G2/M checkpoint uses, at least in part, both pathways to activate and maintain cell cycle arrest, replication checkpoints preferentially activate the ATR-Chk1 pathway²⁶. The rapid and specific activation of ATR and Chk1 at the early time points supports this finding. However, a sustained replication-stress signalling could account for the observed weak activation of ATM. The phosphorylation of p53 was also assessed in our cells lines. M21 appeared to be defective in p53 activation as no phosphorylation of p53 was observed. Conversely, p53 was highly phosphorylated in HT29 following SFOM-0046.

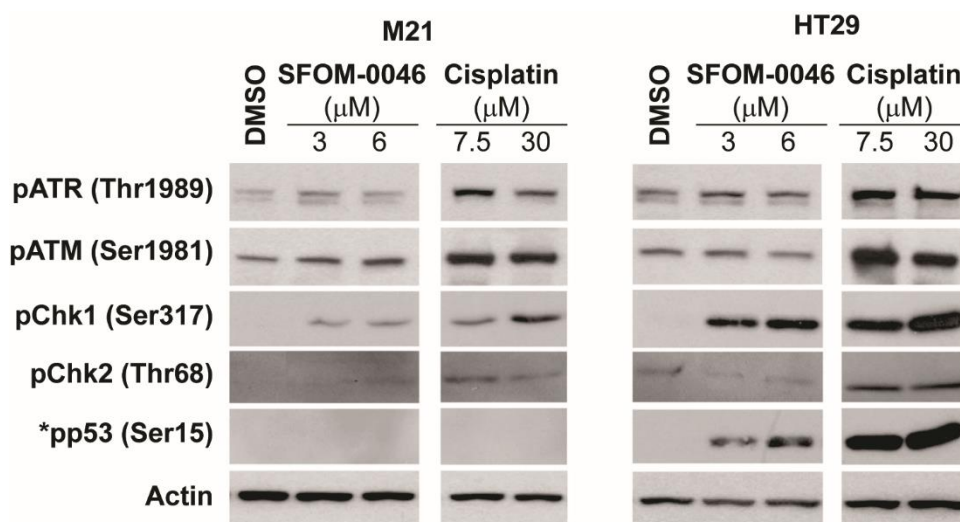


Figure 3. Dose-dependent activation of DNA damage response by the ATR-Chk1 and ATM-Chk2 pathways following a 24-h treatment with SFOM-0046 or cisplatin in M21 and HT29 cells. *Expression of p53 in M21 cells is deficient comparatively to HT29 cells (Fig. 6C). The gels/blots have been run under the same experimental conditions. Full-length western blots are included in the supplementary information (Fig. S1).

The replication stress induced by SFOM-0046 is DNA DSBs

The latter results suggested that SFOM-0046 induces replication stress and the detection of γ -H2AX foci indicated that DNA damage, most likely DSBs, could be the cause of this replication

stress. To further validate the nature of the damage induced by SFOM-0046, we performed immunofluorescence staining to detect 53BP1 foci, a second marker of DNA DSBs²⁷. M21 and HT29 cells were treated either with SFOM-0046 (1.5 and 3 μ M) or DMSO for 24 h, followed by immunofluorescence staining for 53BP1 foci. As shown in Fig. 4, DMSO treatment did not induce 53BP1 foci while both SFOM-0046 treatments (1.5 and 3 μ M) induced significantly 53BP1 in the two cell lines. These results confirm that replication stresses induced by SFOM-0046 are DNA DSBs.

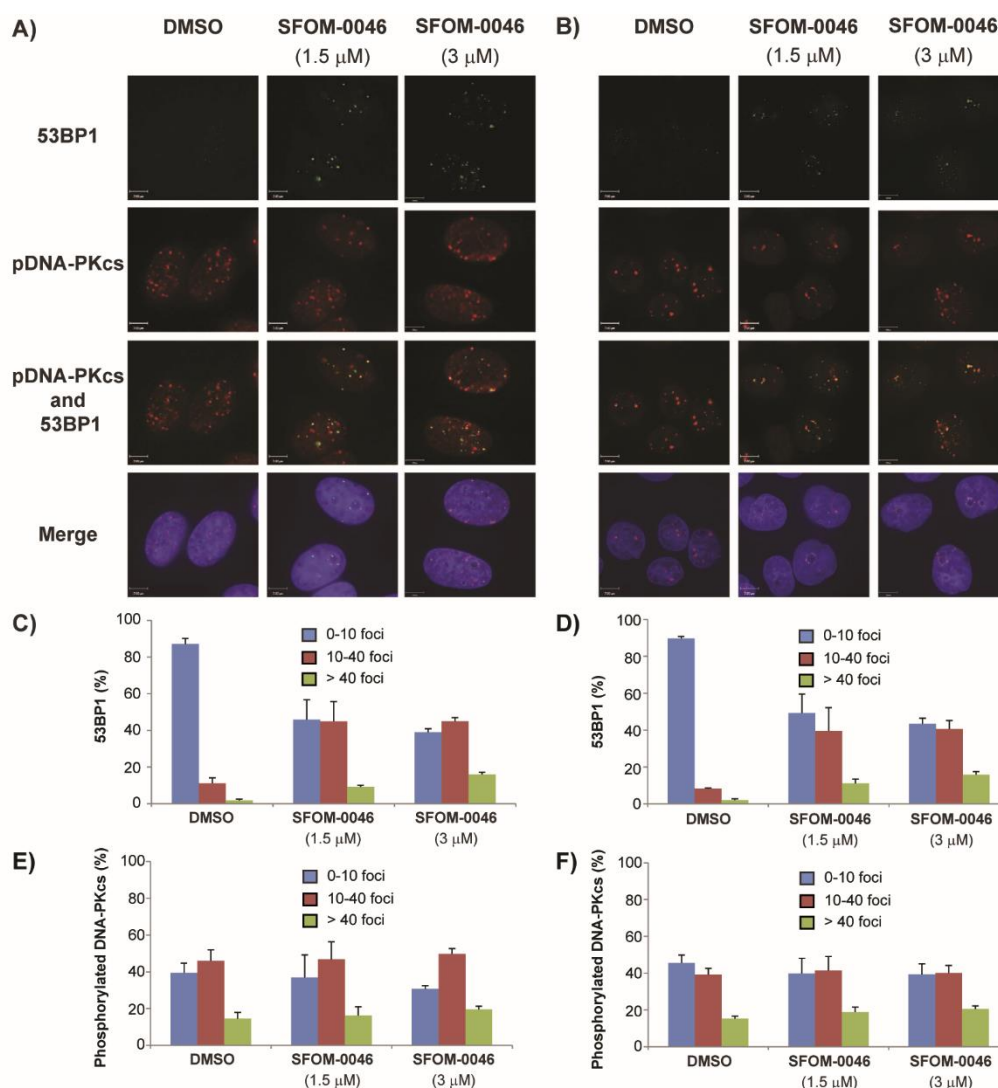


Figure 4. Effect of DMSO and SFOM-0046 at 1.5 and 3 μ M on the phosphorylation of 53BP1 and DNA-PKcs after 24 h of treatment on: (A) M21 and (B) HT29 cells. Quantification of the number of: (C) M21 and (D) HT29 cells displaying less than 10, 10–40 and over 40 53BP1 foci. Quantification of the number of: (E) M21 and (F) HT29 cells displaying less than 10, 10–40 and over 40 DNA-PK foci.

Treatment with SFOM-0046 activates homologous recombination repair

Since treatment with SFOM-0046 results in accumulation of cells in S-phase, we expected the induced DNA DSBs would be repaired by the HR pathway instead of NHEJ. Indeed, HR is

more prone to repair DSBs in S-phase while NHEJ pathway is known to be activated throughout the cell cycle and favoured in G1-phase²⁸. To that end, we performed immunofluorescence staining to detect RAD51 and phosphorylated DNA-PKcs, two essential kinases involved in the HR and NHEJ cascades, respectively^{28,29}. Hence, M21 and HT29 cells were treated with the excipient (DMSO) or with 1.5 or 3 μ M of SFOM-0046 for 24 h followed by immunofluorescence staining of Thr2609-phospho-DNA-PKcs, γ -H2AX and RAD51. As expected, treatments with SFOM-0046 (1.5 and 3 μ M) did not induce the formation of phosphorylated DNA-PKcs foci when compared to the excipient (Fig. 4). In contrast, the number of γ -H2AX and RAD51 foci generated by SFOM-0046 in M21 and HT29 cells was concentration-dependent (Fig. 5). In addition, RAD51 foci co-localized with γ -H2AX foci. Our results confirm that the HR pathway is activated following DNA damage caused by SFOM-0046.

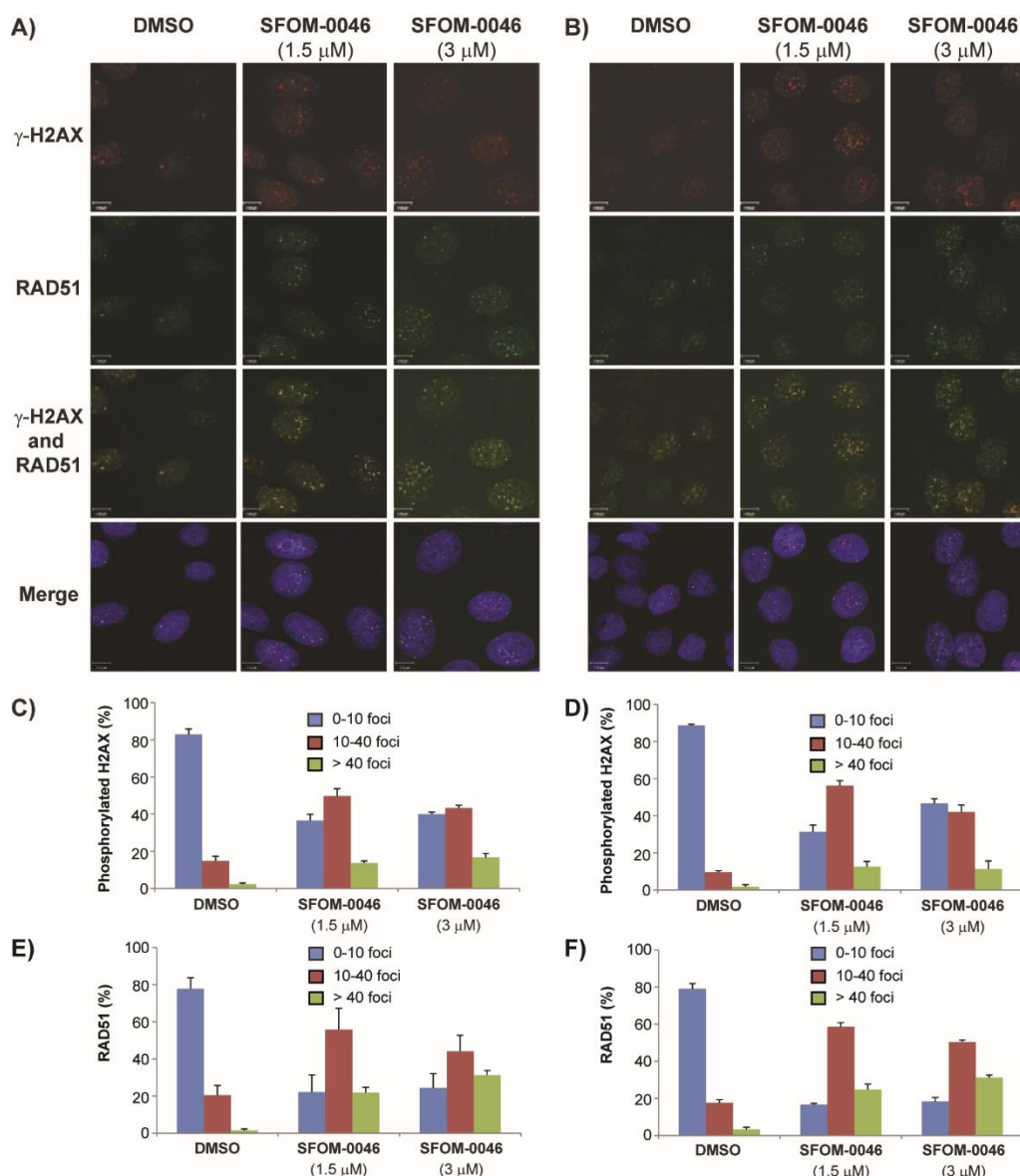


Figure 5. Effect of DMSO and SFOM-0046 at 1.5 and 3 μM on the phosphorylation of H2AX and RAD51 after 24 h of treatment on: (A) M21 and (B) HT29 cells. Quantification of the number on: (C) M21 and (D) HT29 cells displaying less than 10, 10–40 and over 40 RAD51 foci.

p53-deficient cells are more sensitive to SFOM-0046

Our previous studies showed that M21 cells are more sensitive to PUB-SOs than HT29 cells²². This result was also confirmed by a cell viability assay performed after 96 h of treatment with increasing concentrations of SFOM-0046 (Fig. 6A). Moreover, studies on the phosphorylation of p53 in DNA damage response show that p53 is not phosphorylated in M21 cells as compared to HT29 cells. In addition, studies report that M21 cells are expressing a functional p53 with a G266E mutation^{30,31}. Nevertheless, the quantification of p53 proteins in M21 and HT29 cell lines shows that p53 is very weakly expressed in M21 cells comparatively to HT29 cells (Fig. 6C). This result suggests that p53 plays a key role in the cell survival after treatment with

SFOM-0046. To support this hypothesis, we studied the effect of SFOM-0046 on isogenic HCT116 cell lines expressing (p53^{+/+}) or not p53 (p53^{-/-}). First, the isogenic HCT116 p53^{+/+} and p53^{-/-} status were confirmed by the detection of the p53 protein by immunoblot (Fig. 6D). Then, the cell viability assay after 96 h of treatment with increasing concentration of SFOM-0046 showed that HCT116 p53^{-/-} cells are more sensitive to SFOM-0046 than p53^{+/+} cells (Fig. 6B). These results evidence that the expression of p53 plays a role in the cell survival to SFOM-0046 treatment.

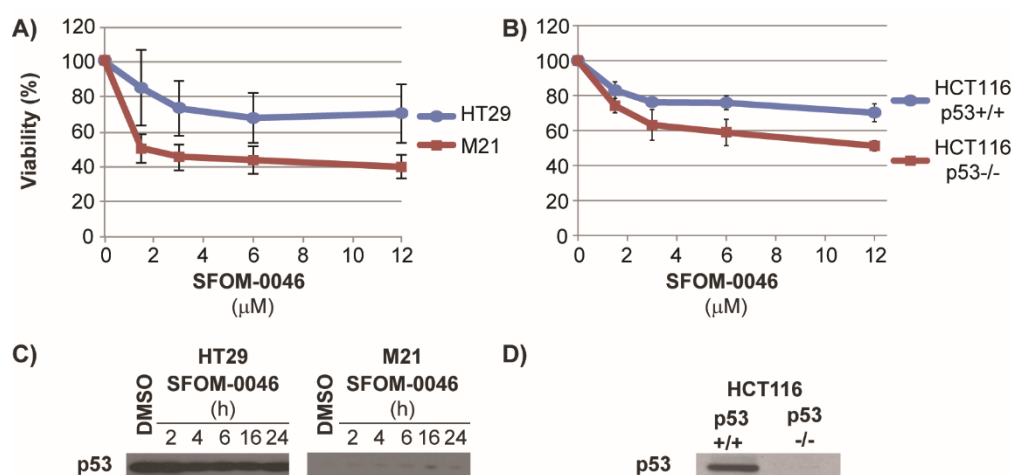


Figure 6. Cells viability of (A) HT29 and M21 as well as (B) HCT116 (p53^{+/+} and p53^{-/-}) cells treated with escalating concentrations of SFOM-0046. (C) Effect of DMSO and SFOM-0046 on the p53 expression level of HT29 and M21 cells at different treatment times. (D) Confirmation of the p53 (p en minuscule) status of the isogenic HCT116 p53^{+/+} and HCT116 p53^{-/-} cells.

SFOM-0046 induces a general mechanism of DNA damage response

To study the effect of the status of p53 on the DNA damage response to SFOM-0046, we assessed the activation of markers of the DNA damage checkpoints (ATR, ATM, Chk1, γ -H2AX) and HR in isogenic HCT116 (p53^{+/+} and p53^{-/-}) cancer cell lines. As shown in Fig. 7, treatment with SFOM-0046 for 24 h activated ATR and ATM pathways in both cell lines at all concentration tested. In addition, the treatment of the cells with either 1.5 or 3 μ M of SFOM-0046 induced γ -H2AX and RAD51 foci in both cell lines indicating that SFOM-0046 induces also replication stress and DNA DSBs that are repaired by HR (Fig. 8A–D). These results show that p53 has relatively minor effects on the early stages of the DNA damage response induced by SFOM-0046 and that the DNA damage response to SFOM-0046 is a general mechanism and is not cancer cell line specific. Nonetheless, the role of p53 to trigger pro-survival biological processes is evidenced by the result showing that p53-deficient cancer cells are more sensitive to the drug than p53-proficient cancer cells.

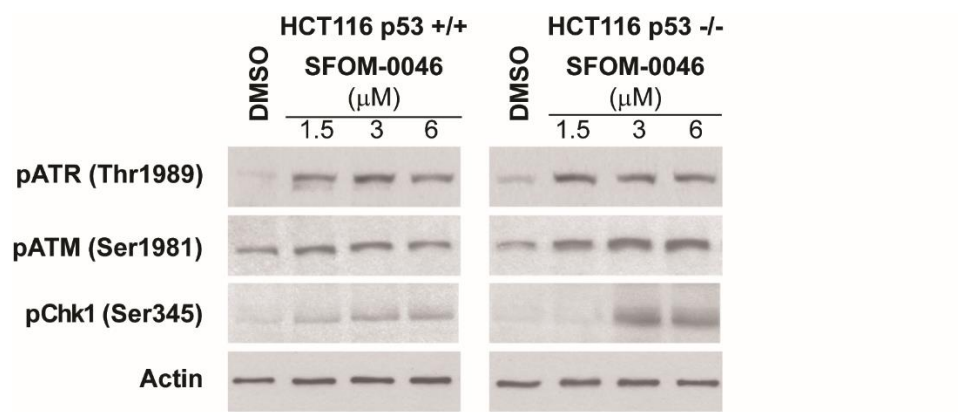


Figure 7. Dose-dependent phosphorylation of ATR and ATM in response to SFOM-0046 (1.5, 3 and 6 μ M) in isogenic HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- cells.

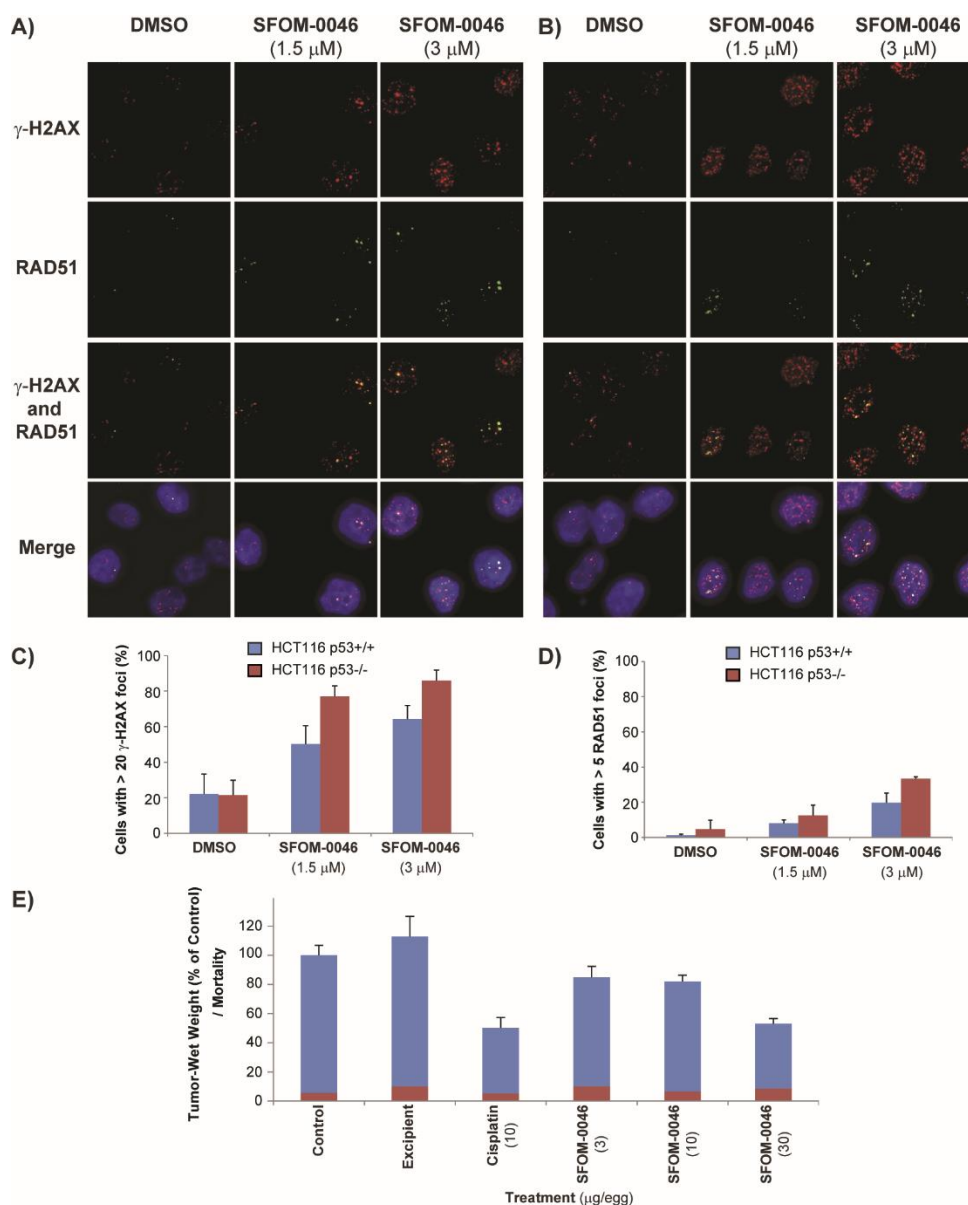


Figure 8. Effect of DMSO and SFOM-0046 at 1.5 and 3 μ M on the phosphorylation of H2AX and RAD51 after 24 h of treatment in isogenic HCT116 (A) p53+ /+ and (B) p53 -/- cells. Quantification of the number of cells with: (C) more than 20 γ -H2AX foci and (D) over 5 RAD51 foci. (E) Effect of SFOM-0046 and cisplatin on the growth of HT-1080 tumours and their toxicity on chick embryos in the CAM assay. Blue bars represent the percentage of wet-weight of tumours treated with or without the excipient. Red bars represent the percentage of dead chick embryo.

SFOM-0046 exhibits dose-dependent antitumor activity in the CAM Assay

We investigated the dose-response effect of SFOM-0046 on HT-1080 by using the CAM assay. To that end, cisplatin (10 μ g per egg) was used as positive control and showed that the size of the tumours decreases by 50% as compared to untreated controls without increasing the chick embryos mortality (5%). Our excipient (Cremophor® EL/99% ethanol/PBS, 1/1/14 v/v) did not affect tumour growth but slightly increased the embryos lethality (from 6% to 10%, Fig. 8E). When treated with 3 μ g of SFOM-0046 per egg, the tumour sizes decreased to 85% of the

control tumours. The tumour size dropped to 82% of the controls at 10 µg of SFOM-0046, and 53% at 30 µg/egg reaching the tumour size obtained for the positive control. SFOM-0046 showed also very low toxicity on the chick embryos. Embryos mortality was less or identical to the one caused by the excipient alone showing 10%, 7% and 9% for 3, 10 and 30 µg/egg of SFOM-0046, respectively. These results show for the first time that the inhibition of the growth of HT-1080 tumours by SFOM-0046 is dose-dependent.

Discussion

Drugs that impact on DNA replication are amongst the most useful anticancer agents used in clinic^{32,33,34}. We previously reported the development of new compounds showing antiproliferative activity²². Among them, the prototypical SFOM-0046 emerged as attractive for development due to its simple molecular structure, its antiproliferative activity in the low micromolar range against HT29, M21, and MCF-7 cell lines, its ability to block the cell cycle progression in S-phase on Jurkat cells, its ability to induce DNA replication stress (induction of γ -H2AX on M21 cells) showing DNA damage and its significant antitumour activity at 30 µg/eggs with low toxicity in the CAM assay²². The molecular mechanism underlying the generation of DNA damages by SFOM-0046 leading to an accumulation of cancer cells in S-phase is not completely deciphered yet. However, the SFOM-046 molecular structure excludes the possibility of direct DNA interaction mechanisms involving either alkylation or DNA intercalation. Indeed, the latter mechanisms are attributed to molecular structures that generate electrophilic species, unstable leaving groups or planar structures. The molecular structure of SFOM-0046 bearing an ethylurea substituent on the aromatic ring A, an ethyl group on aromatic ring B, and a sulfonate bridge between the two aromatic rings does not meet these criteria. In this study, we further investigated the DNA replication stress induced by SFOM-0046 and the pathways involved in the blocking of cancer cells in the S-phase.

Our study confirms that the SFOM-0046-induced cell cycle arrest and DNA replication stress are not cell-line specific. This was confirmed in M21, HT29, HT-1080 and HeLa cells and corroborated by our results obtained using Jurkat cells in the screening of PUB-SOs and the selection of SFOM-0046 as our prototypical PUB-SOs²². When studying the DNA damage response induced by SFOM-0046 in M21 and HT29 cells after a 24-h treatment, we observed that the drug induces preferentially the ATR-Chk1 pathway at all the concentrations tested while the ATM-Chk2 pathway was only weakly activated. Then, time-course activation of ATR and Chk1 in response to SFOM-0046 treatment (6 µM) revealed that ATR was quickly activated

(2 h) followed by a delayed, strong activation of Chk1 (6 h). As known, ATR was activated in response to persistent single-stranded DNA breaks that occur when the replication forks stall and the replicative helicases continue to unwind the DNA ahead of the replication fork³⁵. ATR-Chk1 plays an important role in the activation of the intra-S-phase checkpoints in response to DNA replication stress during normal cell division. In addition, it is a main mediator of G2/M checkpoints to prevent the presence of DNA damage during mitosis³⁶. The rapid and selective activation of ATR after a short period in presence of SFOM-0046 suggests that the accumulation of cells in the S-phase is initially a consequence of the activation of the ATR-Chk1 pathway. This is also supported by a much higher induction of phosphorylated Chk1 than Chk2 in M21 and HT29 cells treated with SFOM-0046. However, the activation of the ATR-Chk1 pathway is not the only mechanism involved in the S-phase arrest. Indeed, the accumulation of cells in the S-phase begins to be observed at 6 h (Fig. S3), several hours after the beginning of the activation of the ATR-Chk1 pathway. Nonetheless, the activation of both the ATR-Chk1 and ATM-Chk2 pathways suggests that the two pathways may be involved in the activation of the intra-S-phase checkpoints and it also supports the work on ionising radiation and topoisomerase inhibitors showing that persistent activation of the intra-S-phase checkpoint leads to an accumulation of cells in the S-phase^{36,37}.

Next, we characterized the type of DNA damage induced by SFOM-0046. Besides the fact that the phosphorylation of H2AX into γ -H2AX is considered as a hallmark of the number of DSBs generated, it has also been reported to be activated by other stresses including changes in the chromatin structure. Based on this, we confirmed that SFOM-0046 induces DNA DSBs, using 53BP1 as additional marker of DSBs. 53BP1 is actually known to be an important regulator of the DSB repair pathway choice that preserves DSB ends and antagonizes their resection. According to current models, DSBs are channelled into a particular DNA repair pathway via regulation of 53BP1 recruitment or inhibition at the break sites depending on the state of the cells³⁸. In G1 phase, 53BP1 promotes NHEJ and prevents HR while its inhibition in S-phase contributes to promote HR by mechanisms still under investigation, but that probably involve several proteins including BRCA1²⁸. By assessing DNA-PKcs and RAD51 foci, known as specific markers of NHEJ and HR repair respectively, we found that the SFOM-0046-induced DSBs are repaired by HR rather than NHEJ. This result strongly suggests that new inhibitors of the HR pathway will sensitize the anticancer activity of SFOM-0046.

Subsequently, we observed that M21 cells were more sensitive to SFOM-0046 than HT29 cells. Interestingly, the expression and activation of p53 in M21 cells are impaired compared to HT29 cells. p53 is a key protein that acts as a tumor suppressor and responds to diverse cellular stresses including DNA damage, oncogene activation or hypoxia. It orchestrates and modulates several cellular processes such as apoptosis, cell-cycle arrest, senescence and DNA repair in response to DNA damage³⁹. Using isogenic HCT116 p53^{+/+} and p53^{-/-}, we first confirmed that p53^{-/-} cells are more sensitive to SFOM-0046 treatment than p53^{+/+} cells. We also confirmed that both isogenic HCT116 cell lines activate ATR and HR in a very similar way in response to DNA DSBs induced by SFOM-0046. Interestingly, SFOM-0046 activates more strongly ATM in HCT116 cells than in HT29 and M21 cells. This suggests that the activation of ATM is cell-line dependent and the increased survival of p53-proficient cells is not related to an increase or a change in DNA damage response but to another p53-dependent cellular process. Furthermore, we performed *in vivo* assays on human fibrosarcoma HT-1080 tumours using CAM assay. First, we confirmed that SFOM-0046 acts through a mechanism of action causing cell cycle arrest in S-phase in HT-1080 cells. Second, we found that the antitumor activity of SFOM-0046 in the CAM-assay is dose-dependent. However, based on relatively low solubility the maximal tolerated dose and the maximal antitumor activity of SFOM-0046 were not reached. Nevertheless, SFOM-0046 appears as a promising new anticancer agent. The mechanism of action, the antitumor activity and the toxicity of SFOM-0046 in mammal models will be further investigated to determine the potential of this new class of anticancer agents in a clinical setting.

Methods

Reagents and chemicals

SFOM-0046 was dissolved in DMSO at 40 mM and cisplatin was dissolved in water at 2 mM. To avoid cytotoxicity, the final concentration of DMSO in the culture medium was maintained under 0.2% (v/v). SFOM-0046 was prepared as published previously²². Cisplatin and DMSO were purchased from Sigma/Aldrich Chemicals (St-Louis, MI) and used as received. The antibodies pATM (Ser1981), pp53 (Ser15), pChk1 (Ser317) and pChk2 (Thr68) were purchased from Cell Signalling Technology (New England Biolabs ltd, ON). Anti-pATR (Thr1989) was obtained from Genetex (Irvine, CA), anti-phospho histone H2AX from Millipore (Ser139, clone JBW301, Billerica, MA) and anti-RAD51 from Santa Cruz (Dallas, TX). Anti-pDNA-PKcs (Thr2609) and anti-p53 were purchased from Abcam, and anti-53BP1 from Novus. 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. of California in San Diego, CA). HT29, HT-1080 and HeLa 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 CO₂ and were cultured in DMEM containing NaHCO₃ (2.2 g/L), glucose (4.5 g/L) and glutamine (292 µg/mL), supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, Utah). Isogenic HCT116 p53^{+/+} and HCT116 p53^{-/-} cells (kindly provided by Dr. Bert Vogelstein, Johns Hopkins University) were cultured in McCoy's 5A medium, supplemented with 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin.

Cell cycle analysis

M21, HT29, HT-1080 and HeLa cells were seeded at 2×10^5 cells per well in 6-well plates overnight and incubated with escalating concentrations of either SFOM-0046 or cisplatin for 24 h. DMSO was used as control. 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 of 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 analysed using an Epics ESP flow cytometer (Coulter Corporation, Miami, FL).

Fluorescence microscopy

Cells were seeded at 1.5×10^5 cells (M21 and HT29) or 3×10^5 cells (HCT116) per well in 6-well plates containing glass coverslips. The next day, cells were treated with SFOM-0046 at concentrations ranging from 1.5 to 6 µM or 30 µM of cisplatin for 24 h. DMSO was used as negative control. For RAD51 and γ-H2AX detection, cells were first washed in PBS, incubated in cytoskeleton buffer (10 mM PIPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100) for 5 min on ice, followed by incubation in cytoskeleton stripping buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1% Tween 40, 0.5% sodium deoxycholate) for 5 min on ice. After 2 washes with ice-cold PBS, cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized in 0.5% Triton X-100 for 15 min at room temperature. Cells were blocked with PBS-10% goat serum for 1 h and incubated with

anti-RAD51 (1:400) and anti- γ -H2AX (1:5000) primary antibodies for 2 h at room temperature. Coverslips were washed twice in PBS for 5 min, incubated with the secondary antibodies for 1 h at room temperature and washed again as above. For 53BP1 and pDNA-PKcs staining, cells were fixed with 4% 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 anti-53BP1 (1:500) and anti-pDNA-PKcs (Thr2609, 1:500) primary antibodies diluted in PBS 1% BSA for 2 h at room temperature. Coverslips were washed three times 10 min with TBS prior to a 1-h incubation with the appropriate secondary antibody to be rinsed again as above. In each case, Alexa Fluor 488 and/or Alexa Fluor 568 (Invitrogen) were used as secondary antibodies (1:1000). 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).

For each condition, at least 100 cells from three independent trials were scored for γ -H2AX, RAD51, 53BP1, and pDNA-PKcs foci formation. For foci scoring, images were acquired using a Leica CTR 6000 microscope. Then, the number of foci per cell was automatically counted according to intensity following background subtraction and deconvolution using Volocity software v 6.0 (Perkin-Elmer Improvision).

Western blot analysis

M21, HT29, HT-1080 and HCT116 (p53^{+/+} and p53^{-/-}) cells were seeded in 60 mm petri dishes at 7×10^5 cells per dish and incubated overnight. Cells were incubated with escalating concentrations of SFOM-0046 or cisplatin for 24 h. DMSO was used as a control. Thereafter, cells were trypsinized, collected and washed with PBS. Then, cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.5% NP-40) containing protease and phosphatase inhibitors (PMSF (1 mM), aprotinin (0.019 TIU/ml), leupeptin (1 $\mu\text{g/ml}$), NaF (5 mM) and Na_3VO_4 (1 mM)), incubated for 30 min on ice, and lysed by sonication. Insoluble material was removed by high-speed centrifugation at 4°C and the protein concentration was determined by the Bradford assay. Forty 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 membranes and incubated with 5% (w/v) non-fat dry milk in 1X TBST (TBS, pH 7.4 and 0.1% Tween-20TM) for 1 h at room

temperature and then with antibodies pATR (Thr1989, 1:1000), pATM (Ser1981, 1:1000), pp53 (Ser15, 1:1000), p53 (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 β -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 1×10^3 and 4×10^3 cells per well, respectively, in 100 μ L of medium. Plates were incubated for 24 h. Medium was replaced with medium containing escalating concentrations of drugs and the plates were incubated for 96 h. Afterwards, 10 μ L of 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 μ L of the solubilisation 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 the dark. The optical density was read using an Infinite® F50/Robotic - Absorbance microplate readers (TECAN)) at 550 nm. The experiments were performed three times in triplicate.

Viability of HCT116 cells

Cells were trypsinized from stock cultures and seeded into black-sided, clear bottom 96-well microplates (Corning, cat# 3603) at a concentration of 1×10^3 cells per well in a volume of 100 μ L. The following day, the media was replaced with the intended drug concentrations diluted in media. Cells were exposed to drug treatment for 96 h, then stained with Hoechst 33342 at 10 μ g/mL in media for 30 min, at 37 °C, prior to imaging. Cells were imaged using a Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments). All cell counting experiments were performed at least four times in quadruplicates using a 4 $\times$ microscope objective. Threshold was set to 10,000 with a minimum object size of 5 μ m and a maximum size set to 50 μ m. Data are presented as mean percent cell viability relative to control DMSO-treated cells $\pm$ S.D.

CAM Assay

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. On day-10, 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 µL, 3.5×10^5 cells/egg) was applied directly on the freshly exposed CAM tissue. On day-11, drugs were extemporaneously diluted at the required concentrations in the excipient (Cremophor® EL/99% ethanol/PBS, 1/1/14 v/v). The drug solution (100 µL) was injected into a vein under the CAM. Each experimental group contained 10–12 eggs that were incubated until day-17. Embryos were then sacrificed by cooling at 4 °C for at least 4 h. Tumours were collected, and tumour wet-weight were recorded. The number of dead embryos and signs of toxicity from the different groups were also recorded.

Acknowledgments

We are thankful for the financial support from CHU de Québec Research Center (SF) and Canadian Institutes of Health Research (JYM). We would also like to thank Mr. Yan Coulombe, Mr. Jacques Lacroix and Dr. Isabelle Brodeur for technical help and critical reading of the manuscript.

Footnotes

Author Contributions J.P., M.-F.C., A.R., J.-Y.M. and S.F. have contributed to the conception, the design and the development of the methodology of the study. J.P., M.-F.C., A.R. and D.V. performed the experiments. All authors have contributed to the analysis and interpretation of results as well as to the writing, review, and revision of the manuscript.

References

1. C. Friedberg E., C. Walker G. & Siede W. DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, DC (1995).

2. Zhou B. B. & Elledge S. J. The DNA damage response : putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439 (2000).
3. Matsuoka S. et al. . ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160–1166 (2007).
4. Chen P. et al. . The 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1: implications for Chk1 regulation. *Cell* 100, 681–692 (2000).
5. Matsuoka S., Huang M. & Elledge S. J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893–1897 (1998).
6. Bonner W. M. et al. . YH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 957–967 (2008).
7. Culligan K. M., Robertson C. E., Foreman J., Doerner P. & Britt A. B. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* 48, 947–961 (2006).
8. Marechal A. & Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012716 (2013).
9. Zimmermann M. & de Lange T. 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol.* 24, 108–117 (2014).
10. Jackson S. P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687–696 (2002).
11. Mari P. O. et al. . Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 18597–18602 (2006).
12. Davis A. J. & Chen D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl. Cancer Res.* 2, 130–143 (2013).
13. Chan D. W. et al. . Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* 16, 2333–2338 (2002).
14. Ma Y., Pannicke U., Schwarz K. & Lieber M. R. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794 (2002).
15. Wilson T. E., Grawunder U. & Lieber M. R. Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 388, 495–498 (1997).
16. Stracker T. H. & Petrini J. H. The MRE11 complex : starting from the ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 90–103 (2011).
17. Suwaki N., Klare K. & Tarsounas M. RAD51 paralogs : roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 898–905 (2011).
18. Buisson R. et al. . Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1247–1254 (2010).
19. Krejci L., Altmannova V., Spirek M. & Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 40, 5795–5818 (2012).
20. Symington L. S. & Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* 45, 247–271 (2011).
21. Gagne-Boulet M. et al. . Synthesis and biological evaluation of novel *N*-phenyl ureidobenzenesulfonate derivatives as potential anticancer agents. Part 2. Modulation of the ring B. *Eur. J. Med. Chem.* 103, 563–573 (2015).
22. Turcotte V. 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.* 55, 6194–6208 (2012).

23. Siddik Z. H. Cisplatin : mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265–7279 (2003).
24. Rogakou E. P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y. & Bonner W. M. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* 275, 9390–9395 (2000).
25. Rogakou E. P., Boon C., Redon C. & Bonner W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J. Cell Biol.* 146, 905–916 (1999).
26. Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Unsal-Kacmaz K. & Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39–85 (2004).
27. Wang H. et al. . A perspective on chromosomal double strand break markers in mammalian cells. *Jacobs J. Radiat. Oncol.* 1, 1–8 (2014).
28. Chapman J. R., Taylor M. R. & Boulton S. J. Playing the end game : DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell* 47, 497–510 (2012).
29. Reddy Y. V., Ding Q., Lees-Miller S. P., Meek K. & Ramsden D. A. Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *J. Biol. Chem.* 279, 39408–39413 (2004).
30. Smith S. D. et al. . Protein kinase Calpha (PKCalpha) regulates p53 localization and melanoma cell survival downstream of integrin alphav in three-dimensional collagen and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 287, 29336–29347 (2012).
31. Bao W. & Stromblad S. Integrin α v-mediated inactivation of p53 controls a MEK1-dependent melanoma cell survival pathway in three-dimensional collagen. *J. Cell Biol.* 167, 745–756 (2004).
32. Rahman A. M., Yusuf S. W. & Ewer M. S. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int. J. Nanomedicine* 2, 567–583 (2007).
33. Florea A. M. & Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug : cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 3, 1351–1371 (2011).
34. Yount G., Yang Y., Wong B., Wang H. J. & Yang L. X. A novel camptothecin analog with enhanced antitumor activity. *Anticancer Res.* 27, 3173–3178 (2007).
35. Byun T. S., Pacek M., Yee M. C., Walter J. C. & Cimprich K. A. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 19, 1040–1052 (2005).
36. Xiao Z. et al. . Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.* 278, 21767–21773 (2003).
37. Falck J., Mailand N., Syljuasen R. G., Bartek J. & Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842–847 (2001).
38. Panier S. & Boulton S. J. Double-strand break repair : 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 7–18 (2014).
39. Green D. R. & Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, 1127–1130 (2009).

Thèse de Doctorat

Denis VELIC

Elaboration et Analyse de Molécules Inhibitrices de Protéines de la Réparation de l'ADN par Recombinaison Homologue

Elaboration and Analysis of Homologous Recombination DNA Repair Pathway Proteins Inhibiting Drugs

Résumé

Les cellules humaines sont soumises à des stress induisant des cassures double-brin de l'ADN (CDB). Ces CDB sont réparées notamment par la recombinaison homologue, impliquant les protéines RAD51 et RAD52. Une stratégie thérapeutique émergente est de développer des molécules inhibant RAD51 ou RAD52 afin d'accentuer l'instabilité génétique et la mort de la cellule cancéreuse. En effet, dans certains cancers, l'activité de RAD51 est dérégulée promouvant la prolifération tumorale. Il existe plusieurs molécules inhibitrices de RAD51 et nous nous sommes intéressés au DIDS dont le mode d'action n'a pas encore été déterminé. Concernant RAD52, une létalité synthétique a été montrée lorsque celle-ci est inactivée dans des cellules déficientes en *BRCA1*, *BRCA2* ou *PALB2*, trois gènes mutés dans de nombreux cancers. Récemment, trois types de molécules inhibitrices de RAD52 ont été mis en évidence.

Nous avons tout d'abord étudié l'impact du DIDS ainsi que des molécules dérivées afin de comprendre le mécanisme mis en jeu. Nous avons montré que le DIDS, ainsi que ses dérivés inhibent la liaison de RAD51 à l'ADN. Ces molécules empêchent la formation du nucléofilament entraînant une diminution du nombre de foyers RAD51.

Nous avons développé une méthode de criblage par fluorescence pour évaluer l'effet d'une banque de 696 molécules sur la capacité de RAD52 à hybrider deux ADNsb. Deux molécules capables d'inhiber la fonction d'hybridation de RAD52 ont été mises au jour. *In vivo*, elles entraînent une diminution de la survie de cellules déficientes en *PALB2*.

La recherche et le développement de nouveaux inhibiteurs de RAD51 et RAD52 constituent des stratégies thérapeutiques d'avenir.

Mots clés

RAD51 ; RAD52 ; DIDS ; HSA ; recombinaison homologue ; inhibiteur ; cancer

Abstract

Human cells are subjected to stress inducing DNA double-strand breaks (DSB). DSB are repaired in particular by homologous recombination, involving RAD51 and RAD52 proteins. An emerging therapeutic strategy is to develop RAD51 or RAD52 inhibitors that promote genetic instability and induce cancer cell death. In some cancers, the activity of RAD51 is deregulated promoting tumor proliferation. There are several RAD51 inhibitors and we focused on DIDS, whose mechanism of action has not been yet determined. Concerning RAD52, a synthetic lethality has been shown when its gene is inactivated in *BRCA1*, *BRCA2* or *PALB2* deficient cells, those genes being mutated in various cancers. Recently, three types of molecules inhibiting RAD52 were highlighted.

We studied the impact of DIDS and its derivatives to understand the mechanism involved in the inhibition. We showed that DIDS and its derivatives inhibit RAD51 DNA binding function. These molecules prevent the formation of nucleofilament leading to a decrease in RAD51 foci formation.

We have developed a fluorescent method of screening to evaluate the effect of a library of 696 molecules on the RAD52 ability to hybridize two ssDNA. Two molecules were able to inhibit the RAD52 hybridization function. *In vivo*, they induce a decrease in *PALB2* deficient cell survival.

Research and development of new RAD51 and RAD52 inhibitors represent promising therapeutic strategies.

Key Words

RAD51 ; RAD52 ; DIDS ; HSA ; homologous recombination ; inhibitor ; cancer