

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

Par

Thomas CHABOT

Modulation de l'activité de RAD51 par le récepteur tyrosine kinase c-Met dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 1^{er} Octobre 2020

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

Rapporteurs avant soutenance :

Josée GUIROUILH-BARBAT Chargée de Recherche à l'Institut Cochin - Département Développement, Reproduction, Cancer, Equipe Stabilité Instabilité du Génome, Paris - FRANCE
Jean-Yves MASSON Professeur au Centre de Recherche en Cancérologie du CHU de Quebec Université de Laval, Laboratoire de Stabilité du Génome, Québec - CANADA

Composition du Jury :

Président : Patrick CALSOU
Directeur de Recherche à l'Institut de pharmacologie et de biologie structurale, Equipe Radiobiologie et réparation de l'ADN
Examineurs : Axelle RENODON-CORNIERE
Chargée de Recherche à l'Institut de Recherche en Cancérologie Nantes-Atlantique, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers UMR CNRS Inserm 1232 - Equipe Apoptose et progression tumorale
Ibtissam TALHAOUI
Chargée de Recherche à l'Institut Gustave Roussy, UMR CNRS 9019 - Equipe Réparation des cassures double brin et intégrité du génome
Dir. de thèse : Fabrice FLEURY
Professeur d'Université à l'Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines UMR CNRS 6286, Equipe Mécanisme et Régulation de la Réparation de l'ADN
Co-enc. de thèse : Yvonnick CHERAUD
Maitre de Conférence Universitaire à l'Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines UMR CNRS 6286, Equipe Mécanisme et Régulation de la Réparation de l'ADN

A ma grand-mère,

« L'ouverture d'esprit n'est pas une fracture du crâne... »

Pierre Desproges

« La vie c'est comme une boîte de chocolats, on ne sait jamais sur quoi on va tomber.»

Forrest Gump

Remerciements

Je voudrais remercier tout d'abord, l'École Doctorale Biologie-Santé de Nantes et l'Université de Nantes de m'avoir accordé une bourse doctorale ministérielle me permettant de réaliser cette thèse. Les fonds alloués pour la réalisation des travaux présentés dans ce mémoire doivent beaucoup au financement de la Ligue Contre le Cancer 44 et 85. Je tenais également à les remercier pour leur confiance.

Josée Guirouilh-Barbat et Jean-Yves Masson ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail, je les en remercie. Je remercie également les autres membres de mon jury, Patrick Calsou, Ibtissam Talhaoui et Axelle Renodon-Cornière. Merci à eux d'avoir évalué cette thèse.

Je souhaite remercier Bénédicte Brounais-Leroy et Agnès Quemener pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse individuel et m'avoir guidé sur le bon chemin au cours de ces 3 années.

La réalisation de mes travaux de recherche s'est effectuée au sein du laboratoire UFIP – Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines UMR CNRS 6286, dont je remercie son directeur, le professeur Bernard Offmann. Je souhaiterais également exprimer mon affection à tous les membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux et les échanges cordiaux que nous avons pu avoir.

Je tiens évidemment à remercier plus spécifiquement chacun des membres de l'équipe 3 - Mécanisme et Régulation de la Réparation de l'ADN, conduite par le professeur Fabrice Fleury, avec qui j'ai passé 3 merveilleuses années de thèse, sans parler des précédentes. Merci à Pierre pour ses conseils avisés depuis son tapis volant et au soutien de la plateforme IMPACT sans qui certaines expériences n'auraient pu voir le jour. Particulièrement à Cathy pour sa bonne humeur, son aide et ses blagues Carambar. Merci à Gweninna pour son aide et sa bonne humeur à toute épreuve malgré ses petites crises de Gwenninnite aigües. Merci à Emmanuelle également pour son aide et sa franchise. Merci à Carine pour toutes les préparations. Merci à Houda pour ce côté maternel qu'elle a pu avoir avec chacun d'entre nous. Merci à Nizar pour son rire et sa joie de vivre communicatrice. Merci à Dimitri. Un merci tout particulier à mon Damdam qui a également participé activement à ce projet. M'ayant donné un goût prononcé pour les mots-fléchés autour du petit-déjeuner, tu as le cœur sur la main malgré tes fameuses petites colères sans quoi tu ne serais pas Damien. Un grand merci pour ton aide précieuse durant ce projet de thèse. Merci enfin à Alain pour son importante contribution à ce projet de thèse. Je reste persuadé que chacun des membres de l'équipe a fait partie de ma famille scientifique pendant ces quelques années. Chacun jouant son rôle avec, comme dans toutes les familles, des moments de tensions, d'incompréhension, de rire et de bonne humeur. Donc un grand merci à vous tous car la conception du travail présenté ici est le fruit de toutes nos discussions, de vos conseils et de votre soutien.

Je voudrais adresser un remerciement tout particulier à mes encadrants de thèse. Tout d'abord à Fabrice pour m'avoir fait confiance il y a maintenant 6 ans. De m'avoir permis de réaliser cette thèse sous ta tutelle a été riche d'enseignements à de nombreux points de vue. Tu m'as permis de faire et voir de nombreuses choses. Je ne t'en serais jamais assez reconnaissant. Je retiens de toi ta manie de la « deadline » presque toujours pas respectée, ce qui a toujours eu le don de me rendre fou. Je retiens surtout tes idées, ta bonne humeur et ta disponibilité envers moi malgré les réunionites à répétitions que tu as pu avoir. Également ta super patience malgré mon caractère pressant et impatient, que tu as subi plus d'une fois.

Ensuite un ÉNORME merci à Yvonnick pour sa bonne humeur, ses blagues et son soutien sans failles durant cette thèse. Nous avons commencé ensemble dans l'équipe et travaillé ensemble durant ces quelques années sur ce projet. Tu m'as poussé à faire de nombreuses choses. Tu as toujours été là dans les moments difficiles et de doutes au cours de cette thèse, me remotivant quand c'était nécessaire. Pour tout cela un grand merci à toi et je ne pense pas avoir besoin de développer plus la grande amitié que je te porte.

Merci donc à vous deux, mes 2 papas scientifiques et je suis fier d'avoir été votre thésard.

Je veux également remercier chacun de mes colocataires de bureau et les autres thésards du laboratoire. Tout d'abord Manuella, Sarah et Mohamad qui n'ont certes été que de passage, mais qui ont été tout simplement super durant leur Master 2. Également Iman qui a su calmer notre enthousiasme quand il le fallait et qui est d'une gentillesse folle. Merci à Ennys, Surbhi, Typhaine et tous les autres thésards et postdocs pour nos moments de pauses passés ensemble et notre soutien les uns envers les autres. Enfin, je ne pouvais pas ne pas citer mon compère d'aventure de thèse, le Tic de mon Tac, le Starsky de mon Hutch : Alexandre. Nous avons obtenu notre bourse et commencé cette thèse ensemble. Je ne te remercierais pas pour les effluves que tu pouvais dégager volontairement, ni pour ton manque certains de Pop Culture, mais pour tout le reste et ton caractère extra-serein (peut-être trop) dont tu as pu faire preuve et les quelques petites espiègleries que nous avons pu réaliser aux dépens de tous les autres.

Je voulais aussi remercier tous les stagiaires que j'ai pu encadrer ou qui ont été de passage dans la vie de l'équipe : Matthieu, Grégoire, Marion, Charles, Sandra, Séverine, Valentine, Maxime... Je tiens également à remercier les thésards précédents de l'équipe qui m'ont accompagné durant mon stage de Master 2. En particulier Florian dont j'attends toujours la galette des rois du mois de juillet à la fin du mois. Également Milena et Brendan qui ont tracé le chemin dans lequel je me suis engouffré pendant ma thèse.

J'ai eu la chance et l'opportunité de combiner une expérience d'enseignement à celle de recherche. Je voudrais donc remercier Thierry Dintinger, et le département de biologie, qui m'ont permis d'encadrer de jeunes étudiants de mon université d'origine et à qui j'espère avoir transmis ce que mes enseignants m'avaient eux- même transmis il y a maintenant quelques années. Cette

expérience m'a permis de savoir que j'étais non seulement fait pour la recherche, mais également que l'enseignement pouvait me convenir.

Un petit mot pour également remercier les professeurs Masayuki Takahashi et Hiroshi Iwasaki m'ayant permis de réaliser une expérience Tokyoïte, respectivement sur leur projet et dans leur laboratoire. Ainsi qu'un grand merci à toute l'équipe qui a su m'intégrer au laboratoire : Ito, Alek, Alfredo, Negar...

Une thèse se réalise principalement au laboratoire, mais se joue aussi à l'extérieur. C'est pour cela que je remercie ma deuxième famille qui ne m'a jamais lâché et avec qui je passe toujours autant de super moments malgré la vie passant et la distance existante entre nous : Valou, Clem, Stan, Marion, Célié, Lennie, Lucile, Mareva, Andgie, Constance, Jo, Quentin, Maxime,... Même si à votre grand désarroi, je ne suis pas avare de sentiments, vous savez l'importance que vous avez pour moi et à quel point j'aime chacun d'entre vous.

Merci à tous les membres de ma famille toujours intéressés et attentifs à ce que je fais. À Isabelle, ma marraine préférée toujours présente quand il le faut. À Marie et Johann, les seuls avec qui je peux parler science en réunion de famille, et les premiers à m'avoir permis de découvrir l'univers d'un laboratoire. À tous mes tantes, oncles, cousines et cousins que je ne vois que trop peu, mais qui je sais étaient derrière moi.

Évidemment un grand merci à mon petit frère d'1m90 et ma petite chipie de sœur, que j'ai vu tous deux grandir et réussir ; et qui pourront toujours compter sur leur grand frère préféré dans les bons et les mauvais moments. Enfin, un merci infini à mes parents qui ont toujours été derrière moi, qui m'ont aidé à me construire, qui m'ont poussé à travailler et à faire ce que je souhaitai. Je vous aime Papa et Maman, je suis fier d'être votre fils, vous avez bien bossé et merci pour votre amour inconditionnel.

À Camille, cela fait 8 années de bonheur que je passe avec toi. Nous nous sommes soutenus chaque jour, pour chacune des épreuves et des choix que nous avons rencontrés et surmontés ensemble. Qu'il s'agisse d'un confinement de 2 mois ou d'un voyage à travers l'Europe, tu es toujours avec moi. Ton amour ne me fait aucunement douter sur l'avenir et le chemin qui se trace devant nous.

La curiosité, l'envie d'avancer et la progression de nos connaissances ont été les fondements de ma motivation durant ces 3 années de thèse. Modestement, j'espère que ce travail servira et apportera une petite pierre à l'édifice immense qu'est la Biologie. Je remercie du fond du cœur tous ceux que j'ai rencontrés ou simplement croisés et qui ont pu m'aider, qu'il s'agisse de l'avancée de mon projet ou bien personnellement. Chacun d'entre vous m'a apporté quelque chose, m'a permis de me construire et de devenir ce que je suis aujourd'hui.

Sommaire

Sommaire	13
Liste des Abréviations	21
Liste des Figures & Tableaux.....	25
Introduction	29
Chapitre 1 - Dommages à l'ADN & Voies de Réparation.....	32
a. Les dommages à l'ADN	33
i. Les facteurs de dommages à l'ADN	33
1. Les facteurs endogènes	33
2. Les facteurs exogènes	35
ii. Les types de dommages causés	36
1. La désamination	36
2. La formation de sites apuriques & apyrimidiques	37
3. L'oxydation des bases de l'ADN.....	38
4. La formation de dimères pyrimidiques	39
5. Le mésappariement des bases de l'ADN.....	40
6. Les cassures simple-brin & double-brin.....	42
b. Choix et mécanismes de réparation de l'ADN	43
i. Réparation des mésappariements par MMR.....	44
ii. Réparation des pontages par Excision de Nucleotides.....	45
iii. Réparation des bases incorrectes par Excision de Bases	45
c. Gros plan sur la réparation des cassures double-brin.....	46
i. Détection, signalisation & choix de la réparation des cassures double-brin.....	47
1. Le remodelage chromatinien.....	47
2. La modification des histones	48
3. La modification des acides ribonucléiques.....	48
4. L'arrêt du cycle cellulaire via les voies ATM & ATR.....	49
ii. La réparation rapide par Jonction des Extrémités Non-Homologues	52
iii. La réparation fidèle par Recombinaison Homologue	54

Chapitre 2 - RAD51 : Protéine Centrale de la Réparation par Recombinaison Homologue	59
a. Découverte, conservation & diversification au cours de l'évolution.....	59
b. Structure & domaines.....	62
c. RAD51 : la protéine clé de la réparation par Recombinaison Homologue	64
i. L'interaction monomère-monomère et la formation du nucléofilament.....	64
ii. La formation d'un nucléofilament actif : chorégraphie entre RAD51, l'ADN simple brin et l'ATP.....	64
iii. Reconnaissance, fixation à l'ADN homologue et échange de brins	65
d. Une activité finement régulée	65
i. Une activité finement régulée par des partenaires protéiques.....	65
ii. Une activité finement régulée par des modifications post-traductionnelles	66
e. Rad51 et pathologies	68
i. Pathologies humaines associées à une modification du gène rad51	68
ii. Rad51 et cancers.....	69
Chapitre 3 - Les protéines kinases & la réparation des cassures double-brin	71
a. Les protéines kinases dans l'évolution	71
b. Les familles de protéines kinases	72
i. Les histidines kinases.....	72
ii. Les sérines, thréonines et tyrosines kinases.....	73
1. Les sérines/thréonines kinases	73
2. Les tyrosines kinases	73
c. Les récepteurs à activité tyrosines kinases	75
i. Structure & domaines	75
ii. Mécanisme d'activation général	77
iii. Les voies de signalisation activées	78
d. Les principaux récepteurs à activité tyrosine kinase modulant la réparation des cassures double-brin.....	81
i. L'Epidermal Growth Factor Receptor	81
ii. L'Insulin Growth Factor 1 Receptor	83
iii. La famille des Hepatocytes Growth Factor Receptor.....	85
1. Le Récepteur d'Origine Nantaise	85
2. Le Récepteur c-Met.....	85

Chapitre 4 - c-Met : Récepteur cible & point de départ de la réparation par Recombinaison Homologue ?	86
a. Structure & domaines.....	86
b. Le ligand spécifique Hepatocytes Growth Factor– Scatter Factor	87
c. Son réseau de signalisation & ses partenaires.....	89
i. Réseau extracellulaire	89
ii. Réseau membranaire	90
iii. Cross-talk entre c-Met et d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase	91
iv. Réseau intracellulaire	92
v. L'internalisation n'empêche pas la signalisation	93
d. Ses rôles & activités	94
i. Les principales réponses biologiques induites par c-Met.....	94
ii. Rôles au cours du développement embryonnaire.....	95
iii. Implication à l'âge adulte	96
iv. Implication dans le cancer	96
1. Principales mutations du récepteurs c-Met.....	97
2. Surexpression du récepteur	98
3. Surexpression du ligand HGF-SF	99
4. Implication métastatique.....	99
v. Rôle éventuel dans la réparation des cassures double-brin par Recombinaison Homologue.....	99
Matériels & Méthodes.....	101
I- Production & Purification de Protéines RAD51	102
a. Préparation des plasmides.....	102
b. Production & Purification.....	102
II- Mesure de Dichroïsme Circulaire	103
a. Principe.....	103
b. Conditions Expérimentales	104
III- Fixation d'ADNsb par Interférométrie	104
a. Principe.....	104
b. Conditions Expérimentales	105
IV- Mesure Activité Echange de brin par FRET en temps réel	105

a.	Principe.....	105
b.	Conditions Expérimentales	106
V-	Test de D-loop.....	106
a.	Principe.....	106
b.	Conditions Expérimentales	107
VI-	Fixation de l'ATP	107
a.	Principe.....	107
b.	Conditions Expérimentales	108
VII-	Test de Polymérisation des Protéines	108
a.	Principe.....	108
b.	Conditions Expérimentales	109
VIII-	Modélisation Structurale & Prédications in silico	109
a.	Modélisation Structurale de RAD51	109
b.	Prédications in silico des sites de phosphorylations de RAD51	109
IX-	Phosphorylation in vitro de RAD51	110
X-	Identification des MPT par Spectrométrie de Masse.....	110
XI-	Mise au point des puces de criblage	110
a.	Production des puces de criblage.....	110
b.	Phosphorylation in chip et immunoblot sur puce de criblage	111
c.	Analyse de données des puces de criblage	111
XII-	Culture Cellulaire & Transfection	111
XIII-	Traitements Cellulaires Réalisés	112
XIV-	Quantification de l'efficacité de réparation des CDB de l'ADN par RH in cellulo par Comet Assay	112
a.	Principe.....	112
b.	Conditions Expérimentales	114
XV-	Quantification de l'efficacité de réparation des CDB de l'ADN par RH in cellulo par Cytométrie en Flux.....	114
a.	Principe.....	114
b.	Conditions Expérimentales	115
XVI-	Evaluation de la transcription par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).....	116
XVII-	Extraction Protéique & Fractionnement Cellulaire	116

a.	Extraction de Protéines Totales	116
b.	Fractionnement des Compartiments Cytoplasmique & Nucléaire	117
XVIII-	Séparation des Protéines par Electrophorèse & Western Blot	117
XIX-	Immunofluorescence	118
XX-	Analyses Statistiques	118
Résultats	119
Chapitre 1 – La phosphorylation de la recombinaise RAD51 par le récepteur c-Met et l’impact sur son activité in vitro		122
a.	Phosphorylation de RAD51 et criblage des sites.....	122
i.	Mise en évidence d’une phosphorylation in vitro	122
ii.	Localisation de la phosphorylation de RAD51 par c-Met.	124
1.	Les résidus de RAD51 phosphorylés par c-Met in silico	124
2.	Etude de l’impact d’une mutation Y/F sur la structure et la fonction de RAD51 ...	125
a.	Structure secondaire des mutants non-phosphorylables RAD51 Y/F	125
b.	Capacité d’auto-association des mutants non-phosphorylables RAD51 Y/F ...	126
c.	Localisation des résidus impliqués dans les interfaces protéine-protéine par modélisation moléculaire.....	128
d.	Formation du nucléofilament des mutants non-phosphorylables RAD51 Y/F	129
e.	Fixation à l’ATP des mutants non-phosphorylables RAD51 Y/F	130
3.	Identification et validation des sites de phosphorylation de RAD51 par c-Met.....	132
a.	Détermination expérimentale des résidus phosphorylés par utilisation des mutants non-phosphorylables	132
b.	Localisation et modélisation moléculaire des sites phosphorylés de protéine RAD51	133
b.	Relation entre la phosphorylation de RAD51 et son auto-association	136
c.	Relation entre la phosphorylation de RAD51 et la stabilité du nucléofilament	139
d.	Discussion de la première partie.....	142
Chapitre 2 – Développement d’un nouvel outil de criblage.....		146
a.	Principe général	146
b.	Mise en place du système de criblage in chip	146
i.	Dépôts des protéines RAD51	148
ii.	Evaluation de la phosphorylation des protéines RAD51	150

c.	Criblages des sites de phosphorylation de RAD51	150
i.	Criblage de la kinase c-Abl.....	150
ii.	Criblage de la kinase c-Met.....	152
iii.	Contrôle de la phosphorylation spécifique de RAD51.....	152
d.	Discussion de la deuxième partie	153
Chapitre 3 – Impact de la modulation de c-Met dans la réponse aux dommages à l’ADN		158
a.	Impact de la modulation de c-Met sur la réparation des CDB par RH	158
b.	Impact de la modulation de c-Met sur des cellules cancéreuses prostatiques	159
i.	Caractéristiques des lignées cellulaires.	159
ii.	Impact de la modulation de c-Met sur la signalisation des dommages à l’ADN	161
iii.	Impact de la modulation de c-Met sur la formation des foyers RAD51 en réponses aux dommages induits par la camptothécine	162
iv.	Impact de la modulation de c-Met sur l’expression et la distribution intracellulaire de RAD51.....	165
1.	Augmentation de la transcription du gène codant pour RAD51.....	165
2.	Augmentation de la synthèse de la recombinaise RAD51	166
3.	Impact de l’activation de c-Met sur la distribution cellulaire de RAD51	168
c.	Impact de la modulation de c-Met sur la capacité de réparation des cellules cancéreuses prostatiques	170
d.	Discussion de la troisième partie	173
Chapitre 4 – Effet des ions bivalents Ca ²⁺ et Mg ²⁺ sur la recombinaise RAD51		179
a.	Conséquence de la mutation de RAD51 sur sa thermostabilité.....	179
b.	Conséquence de la mutation de RAD51 sur son oligomérisation	181
c.	Impact des ions bivalents sur la structure de RAD51.....	182
d.	Impact des ions bivalents sur la thermostabilité de RAD51	184
e.	Impact des ions bivalents sur l’activité intrinèque de RAD51	186
i.	Modulation de la fixation à l’ADN.....	186
ii.	Modulation de l’activité d’échange de brins.....	189
f.	Discussion de la quatrième partie.....	190
Conclusion et Perspectives		195
Bibliographie.....		203
Annexes.....		221

Annexe 1 – Construction plasmidique pET-15b.....	222
Annexe 2 – Séquence du gène rad51 inséré.....	223
Annexe 3 – Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.....	224
Annexe 4 – Contrôle de purification des mutants Y/F.....	225
Annexe 5 – Séquence FASTA Q06609 de l'isoforme 1 de RAD51	226
Annexe 6 – Protocole de la plateforme 3P5 pour l'identification des MPT par MS-MS	226
Annexe 7 – Tableaux des anticorps utilisés & dilution.....	227
Annexe 8 – Contrôle de la puce de criblage	227
Annexe 9 – Interactions mises en jeu entre les inhibiteurs PHA665752, BMS777607 et le domaine tyrosine kinase du récepteur c-Met	228
Annexe 10 – Constructions plasmidiques pour le système de réparation RH par cytométrie	229
Annexe 11 – Modélisation moléculaire des tyrosines Y191 et Y315 dans l'interaction monomère-monomère.....	230
Annexe 12 – Mécanisme de détournement du codon Ambre/Stop pour la formation de protéines phosphomimétiques pCMF.....	231
Annexe 13 – Mécanisme du système de détection de partenaires protéiques indirects - BioID ..	232

Liste des Abréviations

6-4 PP	Pyrimidine 6-4 pyrimidone
9-1-1	Rad9-Hus1-Rad1
(γ)H2AX	(Gamma) Histone H2A membre X (phosphorylé)
3P5	Plateforme protéomique Paris 5
53BP1	p53-binding protein 1
8-OxoG	8-oxo-7,8-dihydroguanine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	Acide désoxyribonucléique double-brin
ADNsb	Acide désoxyribonucléique simple-brin
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
A-T	Adénine-Thymine
ATCC	American type culture collection
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATP-TNP	2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related
ATRIP	Ataxia telangiectasia and Rad3-related-interacting protein
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BER	Base excision repair
BIR	Break-induced replication
BLM	Bloom syndrome protein
BRC3, 4 et 4-28	BRC motifs 3, 4 et 4-28 acides aminés
BRCA1 et 2	Breast cancer 1 et 2
BRCT	BRCA1 C-terminus domain
BS3	Bis(sulfosuccinimidyl)suberate
BSA	Bovin serum albumin
BTR	BLM-TopIII3-RMI1
c-Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
CAK	CDK-activating kinase
CCLÉ	Cancer cell line encyclopedia
CD44	Cluster de différenciation 44
CDB	Cassure double-brin
CDC25a et c	Cell division cycle 25a et c
CDK1 et 2	Cyclin-dependent kinase 1 et 2
CHK1 et 2	Checkpoint kinase 1 et 2
CK2	Casein kinase
c-Met	N-méthyl-N'-nitroso-guanidine ou c-mesenchymal-epithelial transition factor
COSMIC	Catalogue of somatic mutations in cancer
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimers
CPT	Camptothécine
CSA et B	Cockayne syndrom A et B
CSB	Cassure simple-brin
CtIP	C-terminal binding protein interaction protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DbdA, B et C	DNA binding domain A, B et C
DDR	DNA damage repair
D-Loop	Displacement loop
DMC1	Disrupted meiotic cDNA 1
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNA2	DNA replication helicase 2 homolog
DNAase	Désoxyribonucléase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate
DSBR	Double-strand break repair
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EME1	Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1
ErbB/HER1, 2, 3 et 4	Human epidermal growth factor receptor 1, 2, 3 et 4
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ETS1	ETS proto-oncogene 1, transcription factor
EXO1	Exonuclease 1

FAM	5-carboxyfluorescéine
FAS	Fas cell surface death receptor
FASL	Fas cell surface death receptor ligand
FAT	Focal adhesion targeting
FBH1	F-box DNA helicase 1
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
FOXO1	Forkhead box protein O1
FRET	Förster resonance energy transfer
GAB1	GRB2-associated-binding protein 1
GAP	GTPase-activating proteins
G-C	Guanine-cytosine
GDP	Guanosine diphosphate
GEN1	Gen endonuclease homolog 1
GFP	Green Fluorescent Protein
GGR	Global genome repair
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GTP	Guanosine triphosphate
H2A, 2B et 4	Histone 2A, 2B et 4
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HGF	Hepatocyte growth factor
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor
HGF-SF	Hepatocyte growth factor - scatter factor
HIF1	Hypoxia-inducible factor-1
IGF1	Insulin like growth factor 1
IGF1R	Insulin like growth factor 1 receptor
IMPACT	Plateforme interactions moléculaires puces activités
INSR	Insulin receptor
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IRDye	Infrared fluorescent dyes
IRS1 et 2	Insulin receptor substrate 1 et 2
JAK	Janus kinase
KCa3.1	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4
KD	Constante d'association
KD	Knock-Down
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
koff	Constante de dissociation
LB	Lysogeny broth
LIG4	DNA ligase 4
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDM2	Murine double minute 2
MicroPICell	Plateforme imagerie cellulaire
MLH1 et 3	MutL homolog 1 et 3
MMC	Mitomycine C
MMR	Mismatch Repair
MPT	Modification post-traductionnelle
MRMV2	Mirror movements 2
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
MSH2, 3 et 6	DNA mismatch repair protein Msh2, 3 et 6
MSP	Membrane scaffold protein
MST1	Macrophage stimulating 1
MST1R	Macrophage stimulating 1 receptor
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
MUSK	Muscle-specific kinase
NBS1	Nibrin 1
NDPK	Nucléoside diphosphate kinase
NER	Nucleotide excision repair
NES	Nuclear export sequence
NFκB	Nuclear factor-kappa B
NHEJ	Non-homologous end joining
Ni-NTA	Nickel-NTA
NOX	NADPH oxydase
NP40	Nonyl phenoxypolyethoxyethanol
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
P.A.	Phosphate-ATP
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1

PAXX	Paralog of XRCC4 and XLF
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases
PIPES	Acide pipérazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique)
PKC	Proteine kinase C
PKL	Proteine kinase-like
PLCy	Phospho-lipase C γ
PLK1	Polo-kinase 1
PMS1 et 2	Post meiotic segregation increased 1 et 2
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PSI	Plexin semaphorin integrin
PTB	Phosphotyrosine binding domain
QSP	Quantité suffisante pour
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAD51, A, B, C, D, 52 et 54	Radiation sensitive protein
RAD51AP1	Rad51 associated protein 1
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAG	Recombination activating gene
RECQL5	RecQ like helicase 5
RFWD3	Ring finger and WD repeat domain 3
RH	Recombinaison homologue
RIM2	Replication in mitochondria 2
RMI1et 2	RecQ-mediated genome instability protein 1 et 2
RNS	Reactive nitrogen species
rNTP	ribonucléoside triphosphate
RON	Récepteur d'origine nantaise
ROS	Reactive oxygen species
ROX	Carboxy-X-rhodamine
RPA14, 32 et 70	Replication protein A subunit 14, 32 et 70
RPL13a	60S ribosomal protein L13a
RPMI	Roswell park memorial institute medium
RSC	Chromatin structure remodeling complex
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
RT-qPCR	Real time - quantitative polymerase chain reaction
SCF	Skp, cullin, f-box containing complex
SD	Standard deviation
SDSA	Synthesis-dependent strand annealing
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEMA α et β	Semaphorin domain α et β
SF	Scatter factor
SH2 et 3	Src homology 2 et 3
SHP2	Src homology region phosphatase 2
siRNA	Small interfering RNA
SPR	Surface plasmon resonance
STAT(3)	Signal transducers and activators of transcription (3)
SVF	Serum de veau fœtal
SWI/SNF	SwItch/Sucrose non-fermentable
TBS(-T)	Tris-buffered saline(-Tween20%)
TCR	Transcription coupled repair
TFIIH	Transcription factor II H
TGFα et β	Transforming growth factor α et β
TKD	Tyrosine kinase domain
TOPBP1	DNA topoisomerase 2-binding protein 1
TOPIII3	DNA topoisomérase III α
TRMD1	tRNA (cytosine-5-)-methyltransferase
TPR	Translocated promoter region
TRPV5	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5
TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
UCHL3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
UV	Ultra-violet
XPA, B, C, D, F et G	Xenoderma pigmentosum A, B, C, D, F et G
XRCC1, 2, 3 et 4	X-ray cross complementing protein 1, 2, 3 et 4
WT	Wild-type
WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase
CaCo2 ; DLD1 ; DU145 ; GTL-16 ; hESC ; MCF10A et 12A ; MCF-7 ; MDA-MB231, 453 et 458 ; PC-3 ; RG37 ; SNU-484 ; SW837 ; UMSCC1 et 6	Dénomination lignées cellulaires

Liste des Figures & Tableaux

Figures

FIGURE 1 – PRINCIPAUX MECANISMES CONDUISANT A LA FORMATION ET AU DEVELOPPEMENT TUMORAL	32
FIGURE 2 – REACTION DE FORMATION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE VIA LA CHAINE DE TRANSPORT MITOCHONDRIALE DES ELECTRONS ET LES SYSTEMES DE DETOXIFICATION.....	34
FIGURE 3 – REACTION DE DESAMINATION DES BASES DE L'ADN	37
FIGURE 4 – REACTION DE DEPURATION ET DEPYRIMIDINATION FORMANT DES SITES ABASIQUES	38
FIGURE 5 – REACTION D'OXYDATION DE LA GUANINE EN 8-OxOG	39
FIGURE 6 – REACTION DE FORMATION DE DIMERES DE PYRIMIDINES CPD ET 6-4 PP	40
FIGURE 7 – MESAPPARIEMENT DES BASES DE L'ADN PAR INCORPORATION DE FORMES TAUTOMERES	41
FIGURE 8 – REACTION DE FORMATION DES CASSURES SIMPLE ET DOUBLE-BRIN	42
FIGURE 9 – LES DIFFERENTES VOIES DE REPARATION	44
FIGURE 10 – VOIES DE SIGNALISATION ATM ET ATR DANS L'ARRET DU CYCLE CELLULAIRE EN REPONSE AUX DOMMAGES A L'ADN PAR CDB	52
FIGURE 11 – MECANISME DE REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN PAR JONCTION DES EXTREMITES NON-HOMOLOGUES CLASSIQUE (C-NHEJ)	54
FIGURE 12 – MECANISME DE REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE	58
FIGURE 13 – EVOLUTION DE LA FAMILLE DE GENES RECA/RAD51	60
FIGURE 14 – STRUCTURE ET DOMAINES COMPOSANT LA PROTEINE RAD51	63
FIGURE 15 – POSITIONNEMENT DES DIFFERENTS SITES DE PHOSPHORYLATION CONNUS DE RAD51	68
FIGURE 16 – ARBRE PHYLOGENIQUE DES TYROSINES KINASES HUMAINES (MODIFIE D'APRES CELLSIGNAL.COM)	74
FIGURE 17 – LES 20 FAMILLES DE REPECTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE (RTK) & LEUR STRUCTURE	76
FIGURE 18 – ACTIVATION & SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DES RTK	80
FIGURE 19 – LA STRUCTURE DU REPECTEUR C-MET	87
FIGURE 20 – STRUCTURE DU LIGAND HGF-SF ET MODE D'ACTIVATION DU REPECTEUR C-MET SUITE A SA FIXATION	89
FIGURE 21 – LES PRINCIPAUX PARTENAIRES CONNUS DU REPECTEUR C-MET ET LES VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIEES	94
FIGURE 22 – CONSTRUCTION UTILISEE POUR LA PRODUCTION DES PLASMIDES HIS-RAD51-WT ET SES MUTANTS HIS-RAD51-Y/F, HIS-RAD51-F86E ET HIS-RAD51-A190/192L	102
FIGURE 23 – SPECTRES DC DES STRUCTURES SECONDAIRES DES PROTEINES	104
FIGURE 24 – FONCTIONNEMENT ET D'UTILISATION DU SYSTEME D'INTERFEROMETRIE – BLITZ®.....	105
FIGURE 25 – SCHEMA DU PRINCIPE DE MESURE D'ACTIVITE D'ECHANGE DE BRIN MESURE EN TEMPS REEL PAR FRET	106
FIGURE 26 – PRINCIPE DE MESURE DE FORMATION DE LA D-LOOP	107
FIGURE 27 – STRUCTURE DE L'ATP ET DE SON ANALOGUE FLUORESCENT L'ATP-TNP (2'(3')-O-(2,4,6-TRINITROPHENYL) ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHATE)	108
FIGURE 28 – STRUCTURE DU BS3 ET DE LA REACTION MISE EN JEU LORS DU CROSS-LINK.....	109
FIGURE 29 – FONCTIONNEMENT DU TEST COMET ET CALCUL DU TAIL MOMENT	113
FIGURE 30 – PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA QUANTIFICATION DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE IN CELLULO	115
FIGURE 31 – PHOSPHORYLATION IN VITRO SPECIFIQUE DE LA RECOMBINASE RAD51 PAR LA KINASE C-MET	123
FIGURE 32 – SPECTRE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE DES PROTEINES RAD51 SAUVAGE ET DES 10 PROTEINES RAD51 MUTANTES Y/F.....	126
FIGURE 33 – 4 DES 10 SITES MUTES REDUISENT L'ETAT DE POLYMERISATION DE LA PROTEINE RAD51	127
FIGURE 34 – MODELISATION DES SITES MODIFIANT LA POLYMERISATION DE RAD51 ET SE TROUVANT A L'INTERFACE MONOMERE-MONOMERE	129
FIGURE 35 – CERTAINES MUTATIONS Y/F DIMINUENT FORTEMENT LA CAPACITE DE RAD51 A S'ASSOCIER A L'ADN.	130
FIGURE 36 – SEULE LA MUTATION Y228F MODIFIE L'INTERACTION DE RAD51 AVEC L'ATP	131
FIGURE 37 – 4 DES 10 PROTEINES MUTANTES DE RAD51 VOIENT LEUR NIVEAU DE PHOSPHORYLATION PAR C-MET REDUIT	133

FIGURE 38 – LES 4 SITES VISES PAR C-MET SUR RAD51 SE TROUVENT A L'INTERFACE MONOMERE-MONOMERE OU RAD51-BRC4	135
FIGURE 39 – L'ETAT DE POLYMERISATION DE RAD51 INFLUE SUR SON ETAT DE PHOSPHORYLATION	137
FIGURE 40 – LA PHOSPHORYLATION DE RAD51 PAR C-MET AUGMENTE SON ETAT DE POLYMERISATION	138
FIGURE 41 – LA PHOSPHORYLATION DE RAD51 PAR C-MET STABILISE LE NUCLEOFILAMENT SUR L'ADN	140
FIGURE 42 – LA PHOSPHORYLATION DE RAD51 PAR C-MET STABILISE LA FORMATION DU COMPLEXE D-LOOP	141
FIGURE 43 – SCHEMA RECAPITULATIF DU ROLE DE LA PHOSPHORYLATION DE RAD51 PAR C-MET IN VITRO	145
FIGURE 44 – PLAN DETAILLE DES PROTEINES DEPOSEES SUR CHACUN DES PADS DE LA PUCE.....	147
FIGURE 45 – METHODE DE CRIBLAGE DES SITES DE PHOSPHORYLATION PROTEIQUE SUR PUCE	148
FIGURE 46 – MISE AU POINT DE LA METHODE DE CRIBLAGE ET CONTROLE DES DEPOTS PROTEIQUES.....	149
FIGURE 47 – CONTROLE DU DEPOT DES PROTEINES RAD51.....	150
FIGURE 48 – LE CRIBLAGE DES SITES DE PHOSPHORYLATION SUR PUCE CONFIRME LES RESULTATS OBTENUS QUANT A LA PHOSPHORYLATION DE RAD51 PAR C-ABL SUR 2 TYROSINES ET PAR C-MET SUR 4 TYROSINES.....	151
FIGURE 49 – CONTROLE DE LA SPECIFICITE DE LA PHOSPHORYLATION DES PROTEINES RAD51	153
FIGURE 50 – LA KINASE C-MET AUGMENTE LA REPARATION DES CDB PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE SUITE A L'ACTIVATION PAR L'HGF-SF	159
FIGURE 51 – ETAT DE PHOSPHORYLATION DE C-MET DANS LES CELLULES DU145 ET PC-3	160
FIGURE 52 – L'ACTIVATION DE C-MET PAR HGF-SF REDUIT LES FOYERS γ H2AX DANS LES CELLULES DU145.	161
FIGURE 53 – L'ACTIVATION DE C-MET PAR HGF-SF STIMULE LE RECRUTEMENT DE RAD51 DANS LE NOYAU	164
FIGURE 54 – TRANSCRIPTION DE L'ARN DE LA RECOMBINASE RAD51 EN FONCTION DE L'ACTIVATION PAR HGF-SF	166
FIGURE 55 – PHOSPHORYLATION DE C-MET ET EXPRESSION DE LA RECOMBINASE RAD51 EN FONCTION DE L'ACTIVATION PAR HGF-SF	167
FIGURE 56 – L'ACTIVATION DE C-MET PAR HGF-SF STIMULE LA SYNTHÈSE ET LA TRANSLOCATION NUCLEAIRE DES PROTEINES RAD51 POST-DOMMAGES.....	169
FIGURE 57 – L'ACTIVATION DE C-MET PAR HGF-SF REDUIT LES DOMMAGES DANS LES CELLULES DU145 ET PC-3.	172
FIGURE 58 – SCHEMA RECAPITULATIF DE L'ACTION DU HGF-SF SUR L'ACTIVATION DU RECEPTEUR C-MET ET LA PROTEINE RAD51 LORS DE DOMMAGES A L'ADN PAR CDB, IN CELLULO, DANS LES LIGNEES DU145 ET PC-3.	178
FIGURE 59 – SPECTRE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE DES PROTEINES RAD51 SAUVAGE ET MUTANTE D18 A DIFFERENTES TEMPERATURES	180
FIGURE 60 – LA DELETION D18 REDUIT L'ETAT DE POLYMERISATION DE LA PROTEINE RAD51	182
FIGURE 61 – SPECTRE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE DES PROTEINES RAD51 SAUVAGE ET MUTANTE D18 A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN IONS BIVALENTS Ca^{2+} ET Mg^{2+}	183
FIGURE 62 – SPECTRE DE DENATURATION THERMIQUE DES PROTEINES RAD51 SAUVAGE ET MUTANTE D18 EN PRESENCE D'IONS BIVALENTS Ca^{2+} ET Mg^{2+}	185
FIGURE 63 – MESURE D'ACTIVITE DE FIXATION A L'ADN DES PROTEINES RAD51-WT ET MUTANTE D18 A DIFFERENTES CONCENTRATION EN IONS BIVALENTS Ca^{2+} ET Mg^{2+}	188
FIGURE 64 – MESURE D'ACTIVITE D'ECHANGE DE BRIN DES PROTEINES RAD51-WT ET MUTANTE D18 A DIFFERENTES CONCENTRATION EN IONS BIVALENTS Ca^{2+} ET Mg^{2+}	189

Tableaux

TABLEAU 1 – RESULTATS DU POURCENTAGE D'IDENTITE ENTRE DIFFERENTES SEQUENCES PROTEIQUES DE RAD51, SES HOMOLOGUES ET PARALOGUES	61
TABLEAU 2 – LISTE DES CANCERS IMPLIQUANT LE DUO HGF-SF/C-MET.....	97
TABLEAU 3 – COMPILATION DES 6 SITES DE PHOSPHORYLATION DE RAD51 VISES PAR C-MET MIS EN AVANT PAR APPROCHE IN SILICO.....	124



Première Partie :

Introduction

Avant-propos de l'introduction

L'ADN d'une cellule subit entre 1 000 à 1 000 000 lésions par jour. Ces dommages, dus à des facteurs environnementaux ou à une conséquence du métabolisme cellulaire, sont potentiellement délétères pour l'organisme. Un ensemble de contre-mesures a donc été développé au cours de l'évolution afin de palier à ces agressions. L'objectif est de permettre un maintien de l'intégrité du génome par la mise en jeu de nombreux systèmes de réparation efficace. Malgré cette prévention, des dommages génétiques subsistent. S'ils touchent des gènes « clef » impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération ou la réparation de l'ADN, cela peut déclencher le développement de cancers. En tant que protéine centrale de la réparation des cassures double-brin de l'ADN par le mécanisme de recombinaison homologue, la protéine RAD51 fait partie des protéines gardiennes de l'intégrité du génome. Or, sa surexpression a été observée dans de nombreux types de cancers ce qui en fait à la fois un élément essentiel de la réparation et une cible intéressante dans la lutte contre la cancérogénèse. Cette surexpression induit une activité importante de la protéine qui permet aux cellules tumorales de résister aux cassures double-brin radio ou chimio-induites dans des conditions thérapeutiques. La compréhension de la régulation de cette protéine améliorera donc non seulement notre connaissance de la réparation par recombinaison homologue, mais permettra également la conception d'inhibiteurs spécifiques de cette protéine afin de stopper ces mécanismes d'échappements tumoraux.

En parallèle, les récepteurs à activité tyrosine kinase sont également connus pour être fortement surexprimés ou suractivés dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses. Ceci en activant de manière incontrôlée les voies de prolifération, de migration et de survie cellulaire. Il est intéressant de noter que la régulation de l'activité protéique passe notamment par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, spécialité des récepteurs à activité tyrosine kinase. De plus, certains récepteurs ont montré leur importance dans la modulation des mécanismes de réparation de l'ADN, et certaines kinases plus particulièrement dans la régulation de la protéine RAD51 par phosphorylation. Les kinases sont donc également une cible intéressante et reconnue dans la lutte contre le cancer. Parmi elles, le récepteur c-Met a été montré comme pouvant moduler, par son inhibition, la réparation de l'ADN et particulièrement la recombinaison homologue, via la protéine RAD51. En revanche, aucune étude ne montre un lien direct entre le récepteur et la protéine ou n'explique la modulation de l'activité de la protéine recombinase suite à celle du récepteur c-Met. Tout du moins dans des conditions non plus d'inhibition du récepteur, mais lorsque ce dernier est activé afin de se placer dans un environnement cellulaire plus « physiologique ».

La problématique de cette thèse a donc consisté à démontrer l'interaction directe protéine-récepteur RAD51-c-Met découlant sur la phosphorylation de RAD51. Elle a également été de comprendre les conséquences de cette phosphorylation sur l'activité protéique de RAD51.

Dans une première partie, un état de l'art du sujet traité sera développé. Un premier chapitre décrira les voies de réparation de l'ADN. Puis nous nous focaliserons sur la réparation des cassures double-brin, notamment par recombinaison homologue, mettant ainsi en lumière le rôle central de RAD51. Dans un second chapitre, nous présenterons cette protéine à travers sa structure, ses activités et sa régulation. Puis, dans un troisième, l'importance des protéines kinases dans la signalisation cellulaire en nous attardant particulièrement sur les récepteurs jouant un rôle dans les voies de réparation et la modulation des protéines réparatrices. Enfin, un dernier chapitre concernera la présentation de l'un de ces récepteurs en particulier : le récepteur c-Met. La seconde partie de ce manuscrit consistera au développement du matériel et des méthodes utilisées pour réaliser nos expériences afin de répondre à notre problématique. Une troisième partie présentera les expériences menées pour répondre à notre problématique et les résultats obtenus, que nous discuterons dans une dernière partie.

Chapitre 1 - Dommages à l'ADN & Voies de Réparation.

Nos cellules subissent chaque jour de nombreux dommages au niveau de leur ADN causés par divers stress endogènes ou exogènes (stress oxydatif, stress métabolique, mutations oncogènes) [1]. S'ils ne sont pas réparés, le fonctionnement cellulaire risque d'être altéré et de conduire à 3 scénarios : inactivité, mort cellulaire ou cancérogénèse. Alors que les deux premiers conduisent à une extinction de la cellule par un arrêt de sa capacité à se développer et communiquer, le phénomène de cancérogénèse résulte de la modification de séquence ou du niveau d'expression de certains gènes impliqués dans des mécanismes cellulaires primordiaux (**Figure 1**) [2]. Ces mécanismes modifiés sont définis comme des « marqueurs du cancer » et sont aujourd'hui au nombre de 10. Parmi eux, on retrouve des gènes qui agissent sur la dérégulation du métabolisme cellulaire, l'instabilité génomique, la prolifération et la réplication incontrôlées, la promotion de l'angiogénèse, la résistance à l'apoptose et à l'inhibition des facteurs de croissance (**Figure 1**) [3]. La réparation correcte de l'ADN est donc un défi essentiel que la cellule doit relever pour contrer les modifications génomiques et enrayer l'apparition de cancers [4]. Ce premier chapitre décrira tout d'abord les agents endogènes et exogènes induisant les multiples dommages de l'ADN. Il sera ensuite intéressant de décrire les dommages et les mécanismes mis en jeu par la cellule pour les réparer. Puis, nous nous intéresserons plus particulièrement aux cassures double-brin, leurs conséquences et le défi qu'elles soulèvent pour la survie cellulaire. Enfin, nous développerons les deux principaux mécanismes de réparation mis en jeu lors de ces dommages.

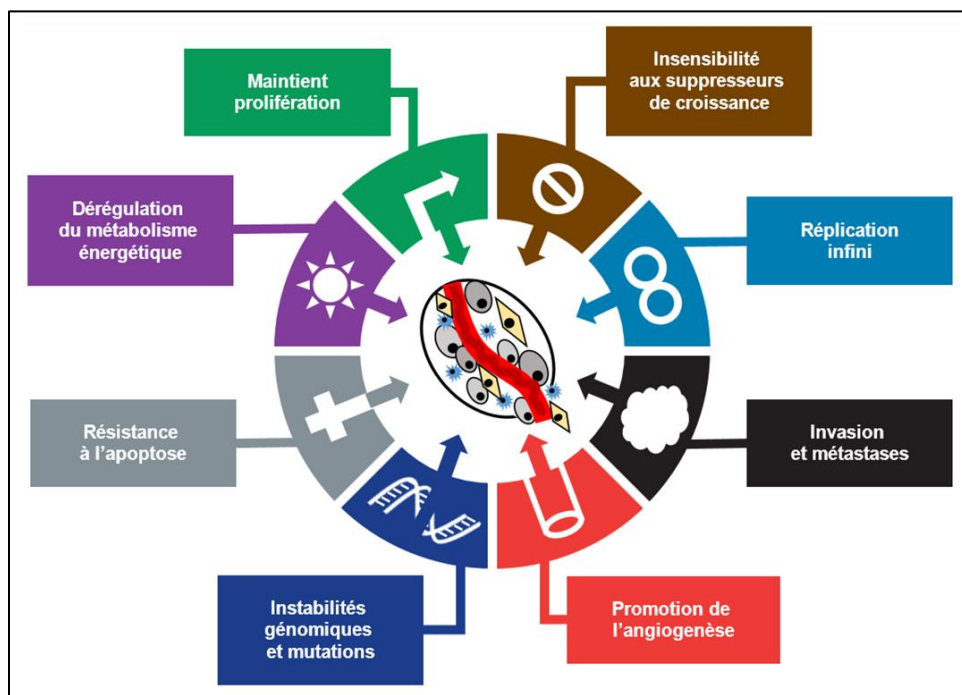


Figure 1 – Principaux mécanismes conduisant à la formation et au développement tumoral

La cancérogénèse est induite par l'altération de plusieurs systèmes participant à limiter le développement cellulaire incontrôlé : réplication, apoptose, instabilité génomiques. Une fois ces systèmes altérés, la machinerie cellulaire devient alors incontrôlée (*Inspiré par [3]*).

a. Les dommages à l'ADN

i. Les facteurs de dommages à l'ADN

1. Les facteurs endogènes

Les facteurs endogènes responsables des dommages à l'ADN proviennent principalement du métabolisme cellulaire. C'est particulièrement le cas du métabolisme oxydatif des mitochondries ou de la peroxydation des lipides conduisant à la génération de radicaux libres comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Parmi les ROS, les principaux formés sont les radicaux anioniques superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et hydroxyle HO^{\bullet} [5]. Ces espèces réactives sont présentes en forte concentration dans les cellules particulièrement en période de stress, on parle de stress oxydant. Le métabolisme énergétique des mitochondries, via la chaîne respiratoire, conduit à la formation d'espèces radicalaires toxiques, mais essentielles à la signalisation cellulaire. En effet, l'oxygène que nous respirons subit une réduction catalysée par la cytochrome oxydase conduisant à la production d'eau. La réaction d'oxydoréduction est réalisée dans la membrane interne mitochondriale dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons (**Figure 2**). Cette chaîne respiratoire est un complexe multi-protéique de la membrane interne de la mitochondrie responsable de la production d'ATP. La production est permise par la formation d'un gradient électrochimique de proton formé par l'énergie d'électrons provenant de la réduction du NAD(P)H et FADH₂ (**Figure 2**). Au cours de cette transformation, une partie des électrons utilisés par le complexe IV, une cytochrome C oxydase, s'échappe de la chaîne de transport et réduit l'oxygène (1 à 5%) [6], mais seulement de manière partielle (**Figure 2**), pour conduire à la formation du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Le niveau de ce type de ROS est maintenu à un seuil bas par les enzymes superoxydes dismutases qui utilisent le cuivre Cu, le zinc Zn dans le cytosol et le manganèse Mn dans la mitochondrie, formant de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène (**Figure 2**). Ce dernier reste relativement toxique pour la cellule même s'il ne s'agit pas d'un radical, car il a la capacité de générer des radicaux hydroxyles OH^{\bullet} [7]. Sa concentration est régulée par des enzymes telle que la catalase formant eau et oxygène, ou à la glutathion peroxydase formant de l'eau (**Figure 2**).

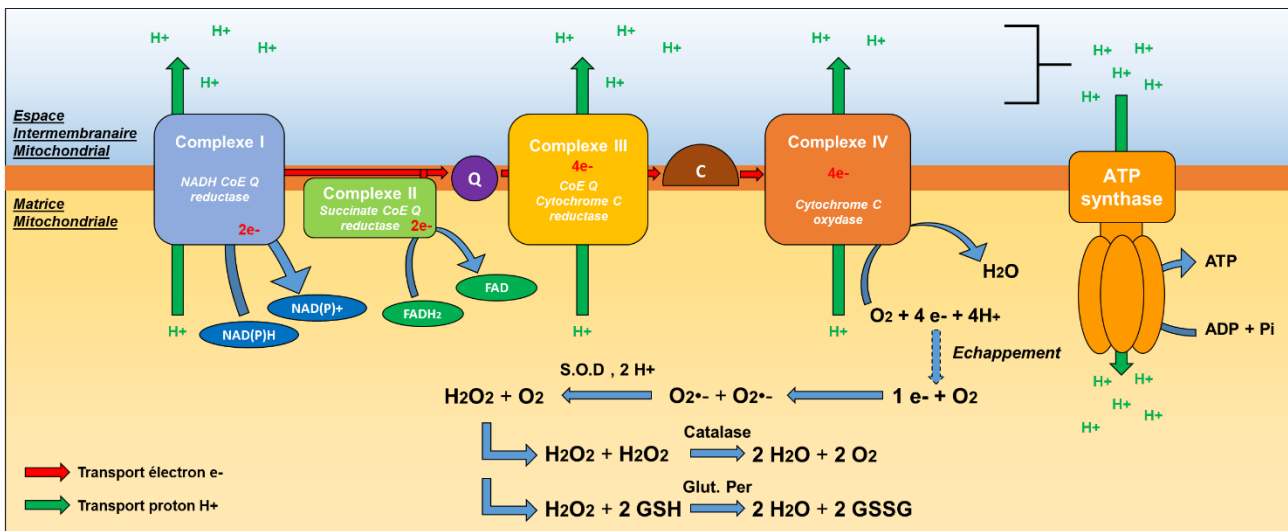


Figure 2 – Réaction de formation des espèces réactives de l'oxygène via la chaîne de transport mitochondriale des électrons et les systèmes de détoxification.

L'utilisation d'oxygène dans la chaîne respiratoire conduit à la formation d'eau, mais également à celle d'espèces réactives par réduction partielle de l'oxygène. Ces réactifs, potentiellement délétères mais essentiels, sont maintenus à une concentration faible par les systèmes de détoxification impliquant les enzymes superoxydes dismutases, la catalase ou la glutathion peroxydase (Thèse T.Chabot, 2020).

A cela s'ajoutent d'autres manières pour la cellule de produire ces radicaux superoxydes, notamment via la NAD(P)H oxydase membranaire qui catalyse également la réduction de l'oxygène via le couple NAD(P)H/NAD(P)⁻ comme donneur d'électron. Localisée notamment dans la membrane cytoplasmique, l'enzyme NADPH Oxydase (NOX) libère l'O₂•⁻ de manière préférentielle vers l'extérieur ou l'intérieur du cytoplasme selon la cellule (respectivement dans les cellules phagocytaires ou non phagocytaires) [8]. La xanthine oxydase, catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines, entraîne aussi la formation d'O₂•⁻. Les enzymes du réticulum endoplasmique réalisent quant à elle l'oxydation des acides gras insaturés réduisant l'oxygène moléculaire pour former O₂•⁻ et/ou H₂O₂ [9]. Enfin, la peroxydation des lipides de la membrane cellulaire par ces radicaux libres est une réaction d'oxydation qui conduit à la formation de produits de type aldéhyde [10]. Ces produits réagissent notamment avec les bases guanines de l'ADN. Malgré la mise en place de systèmes de détoxification impliquant des enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase ou la glutathion peroxydase, 2% des ROS échappent aux systèmes anti-radicalaires et antioxydants, et conduisent à la formation de dommages génomiques notamment par la modification des bases de l'ADN ou création de pontages [11] comme l'oxydation de la guanine en 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) [12], [13] et la thymidine (diols de thymidine) [5] [13]. Les ROS induisent aussi la formation de deux cassures simple-brin (CSB) proches l'une de l'autre sur les brins complémentaires et pouvant évoluer une cassure double-brin (CDB) [14]. Parmi les facteurs endogènes de dommage à l'ADN, on retrouve également ceux produits par la réplication ou la transcription. En effet, une erreur survenue lors de la réplication, de la

transcription, de la recombinaison ou de la réparation de l'ADN peut conduire à une apparition spontanée de CDB. La réplication est permise par l'action de polymérase efficaces copiant le génome humain dans son intégralité (environ 3,5 milliards de base). Or, une erreur est réalisée toutes les 10^5 paire de base dans les conditions *in vivo* [15]. Elles conduisent à un type de dommage particulier, le mésappariement des paires de bases [16]. De nouveau lors de la réplication, le blocage de la fourche de réplication, par des complexes ADN-ARN (interférence réplication/transcription) ou des produits du métabolisme cellulaire, provoque la formation de cassures simple puis double-brin si l'arrêt perdure [17]. Il est dû à une structuration complexe de l'ADN ou à un mauvais fonctionnement de la topoisomérase qui permet le déroulement du brin d'ADN [18], [19]. Le système de la transcription est également un générateur de dommages. En effet, il a été montré que la proportion de dommages génomiques était proportionnelle au taux de transcription du gène visé [20]. Un des phénomènes mis en jeu est la formation d'un hybride ARN-ADN, ou R-loop reconnu par des endonucléases *Xeroderma pigmentosum* F et G (XPF et XPG) et aboutissant à des cassures par coupure de l'ADN [21], [22]. Une altération des bases dépendante de leurs propriétés intrinsèques est également envisageable. En effet, elles sont induites par désamination des bases conduisant à la formation de sites abasiques, apuriques ou apyrimidiques.

2. Les facteurs exogènes

De nombreux facteurs exogènes induisent des dommages génomiques. Naturels ou synthétiques, chimiques ou physiques, ils sont à la base de nombreux sujets d'actualité sur le bien-être et la formation des mutations cancérigènes. Parmi eux, les produits chimiques génotoxiques comme les agents alkylants tel que le méthyle de méthane sulfonate qui conduit à la méthylation des bases par alkylation [15]. Les molécules intercalantes de l'ADN, comme le cisplatine, induisent des pontages intra/inter-brin entre les bases puriques, mais également entre l'ADN et une protéine [23]. L'ensemble inhibe la réplication ou la transcription et induit la mort cellulaire. D'autres, comme la camptothécine (CPT), jouent sur la protéine topoisomérase I. La camptothécine induit en effet une stabilisation du complexe topoisomérase I/ADN/camptothécine. Ceci conduit à empêcher la décontraction de l'ADN et provoquent le blocage de la fourche de réplication qui est stoppée par ce complexe induisant des CDB par blocage stérique [24], [25]. Il est important de noter que ces dommages ont été montrés comme principalement réparés par recombinaison homologue [26]. Ces composés ou leurs dérivés (topotécan, irinotécan,...) [27], [28] sont utilisés dans la mise en œuvre de thérapies anti-cancéreuses ayant pour objectif d'induire des CDB léthales au sein de l'ADN des cellules tumorales.

En parallèle de ces molécules chimiques, des agents physiques conduisent aussi à la formation de dommages. Parmi eux, nous trouvons les radiations ionisantes (naturelles ou médicales). Les rayonnements sont définis en deux classes. La première est les

rayonnements directement ionisant, correspondant à des particules électriquement chargées comme les rayons α et β . Ces rayonnements possèdent une énergie suffisante pour produire des ions par interaction avec la matière. La seconde est les rayonnements indirectement ionisant correspondant à des particules non-chargées électriquement comme les rayons γ ou X. Ces rayonnements possèdent une énergie suffisante pour produire une ionisation de la matière. Les rayons peuvent donc entrer en contact direct avec les chromosomes modifiant le support de l'information génétique. On parle d'effets génétiques définis, comme étant les dommages causés aux cellules reproductrices suite à l'exposition à de hauts niveaux de rayonnements ionisants, ou dommages radio-induits. On parle d'action directe lorsque des particules impactent physiquement l'ADN en brisant le squelette de l'ADN ou les liaisons hydrogènes faibles entre les paires de base, en formant des dimères de thymine ou des pontages ADN/protéines, en modifiant les bases de ADN [29], [30]. Ces modifications de l'ADN sont développées ci-après.

En ce qui concerne les rayonnements ultraviolets (UV), ils sont subdivisés en 3 classes selon leur longueur d'onde qui est inversement proportionnelle à leur énergie ($E=h\nu$ avec $\nu=c/\lambda$). Les UV induisent des dommages plus ou moins importants de manière directe ou indirecte selon leurs caractéristiques physiques [31]–[33]. Les UV.A (λ 320/400nm) sont peu énergétiques et conduisent à la libération de ROS ou d'espèces réactives de l'azote (RNS) par des molécules photosensibles. Les UV.B de « haute » longueur d'onde (λ 295/320nm) sont plus énergétiques et conduisent quant à eux à la formation de dimères pyrimidiques. Les UV.B de « basse » longueur d'onde (λ 280/295nm) et les UV.C (λ 100/280nm) sont encore plus énergétiques et conduisent à la modification des bases de l'ADN et à l'hydratation des bases pyrimidiques.

ii. Les types de dommages causés

1. La désamination

La désamination est une réaction chimique conduisant à la perte d'un groupement amine d'une molécule. Ce mécanisme est principalement présent au niveau du foie qui est le principal lieu du catabolisme des acides aminés chez les mammifères. A la suite d'une transamination dans une situation où l'apport protéique est excessif, il conduit au clivage de l'acide aminé et à l'apport d'énergie après la formation d'ammoniac. Cette réaction peut également se passer au niveau de l'ADN, avec jusqu'à 500 désaminations par jour et par cellule (National Research Council of the National Academies 2006), au niveau des bases guanines, adénines et cytosines, les seules qui possèdent une fonction amine libre.

La guanine par action d'une molécule d'eau se transforme en xanthine [35], [36] plus complémentaire d'une base thymine que de la cytosine (**Figure 3A**). Ceci modifie la paire originale Guanine-Cytosine (G-C) en Adénine-Thymine (A-T). L'adénine se transforme en hypoxanthine [36] plus complémentaire d'une base cytosine que la thymine (**Figure 3B**) pour modifier la paire originale A-T en G-C. La cytosine quant à elle se transforme en uracile [37]

complémentaire de l'adénine plutôt que de la guanine (**Figure 3C**) et permet la formation d'une paire de base A-T au lieu de la paire de base G-C initiale. Elle peut également subir une alkylation par méthylation en 5' la transformant en 5'méthylcytosine qui peut subir le phénomène de désamination spontanée et conduire à la formation d'une thymine [38] (**Figure 3D**) plus complémentaire de l'adénine que de la guanine et former ainsi de nouveau une paire de base A-T au lieu de la paire de base G-C initiale. Ces modifications chimiques des bases de l'ADN peuvent donc conduire à des mutations qui modifient le message génétique.

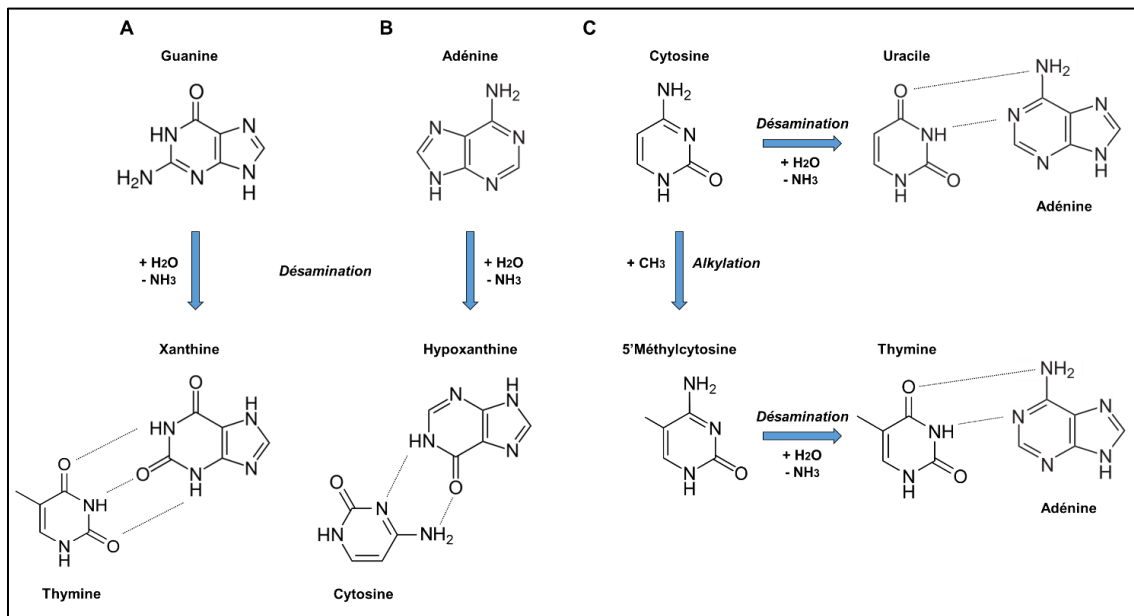


Figure 3 – Réaction de désamination des bases de l'ADN

La désamination des bases G, A et C conduit à la formation de nouvelles bases modifiant les paires de bases originales (*Thèse T.Chabot, 2020*).

2. La formation de sites apuriques & apyrimidiques

Les sites apuriques et apyrimidiques correspondent à l'absence d'une base au sein de la séquence ADN. Leur apparition se fait suite aux mécanismes de dépurination et dépyrimidination qui sont une hydrolyse spontanée du sucre désoxyribose des bases de l'ADN (**Figure 4**). Mécanisme physiologique d'hydrolyses des bases, il se produit près de 10.000 fois par jour et par cellule rien que pour les bases purines [39], [40]. Le phénomène de dépurination est plus fréquent et vingt fois plus rapide que celui de dépyrimidination. Il s'agit de la première cause de dommages à l'ADN. Ces modifications sont à la base du système de réparation par excision de base (BER) [41], [42]. En effet, lorsqu'une base est endommagée, la première étape du mécanisme est de la retirer. La dépurination qui conduit à la formation d'une base apurique peut aussi être provoqué par irradiation. La conséquence de cette ablation est de conduire à l'absence de matrice pour l'action des ADN polymérases lors de la réplication. Elles sont obligées de choisir aléatoirement la base à copier, même si dans la majorité des cas, il y aura insertion de manière préférentielle d'une adénine sur le brin néoformé, afin que le site abasique soit remplacé par une thymine (Règle du A) [43].

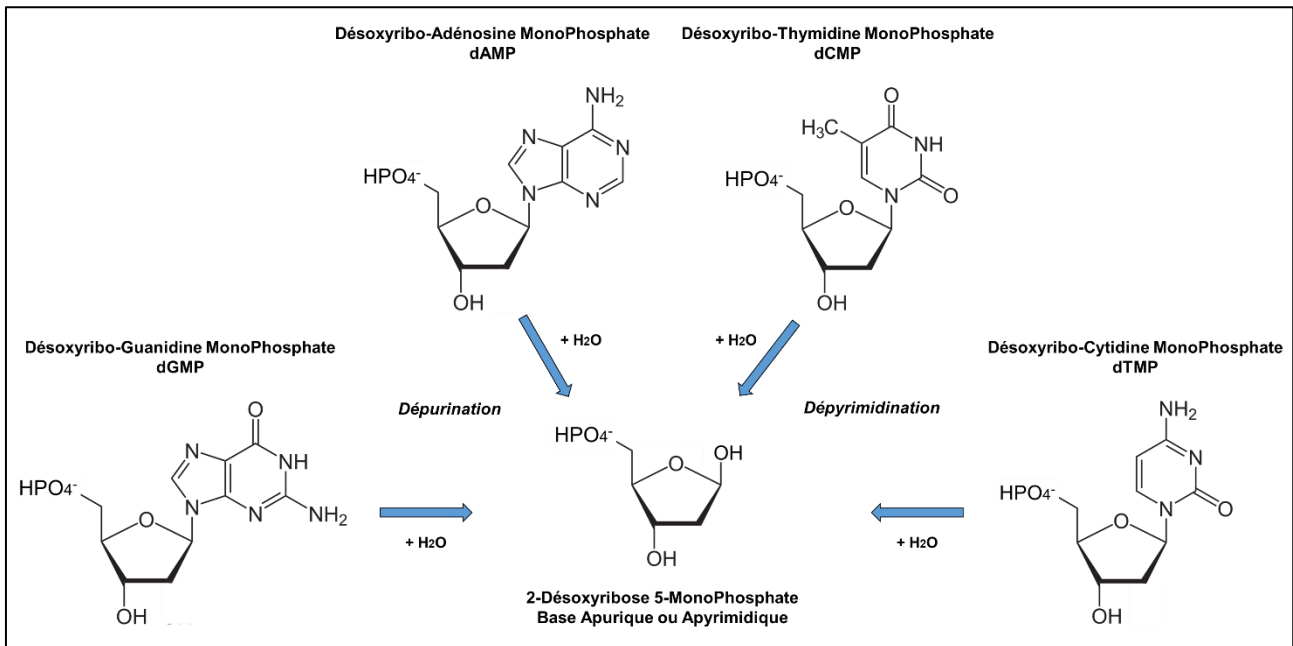


Figure 4 – Réaction de dépurination et dépyrimidination formant des sites abasiques

La perte des bases nucléiques par dépurination ou dépyrimidination conduit à une perte d'information génétique (Thèse T.Chabot, 2020).

3. L'oxydation des bases de l'ADN

L'oxydation des purines se fait principalement suite à la formation de ROS interagissant avec l'ADN qui sont particulièrement sensibles à ces réactions. La guanine est la base qui possède le potentiel d'ionisation le plus bas ce qui en fait la cible principale devant l'adénine, la thymine et la cytosine [31]. L'oxydation de la guanine conduit à la formation de la 8-OxoG [44] par deux mécanismes de photosensibilisation (**Figure 5**). Le premier débute par le transfert d'un électron au niveau de la base qui amène à la formation d'une espèce radicalaire cationique. L'action de l'eau et de l'oxygène forment de la 8-OxoG (**Figure 5A**). Le deuxième est basé sur la capacité de la guanine à réagir directement avec un singulet d'oxygène pour former un endoperoxyde instable et donner ensuite la 8-OxoG (**Figure 5B**). Le taux de formation de la 8-oxoG est toutefois 100 fois plus faible que celui des CPD (dimères cyclobutaniques de pyrimidines) présentés ci-après. Cette lésion apparaît comme une conséquence mineure de l'irradiation. La 8-oxoG, contrairement aux dimères de pyrimidines qui induisent des distorsions de la structure de l'ADN, ne crée pas de déformations de l'ADN [45].

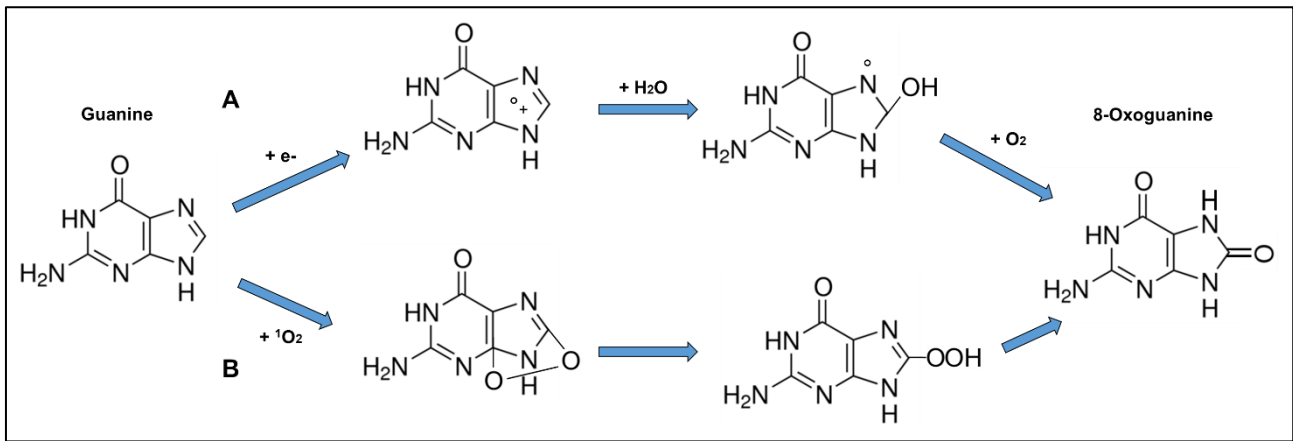


Figure 5 – Réaction d'oxydation de la guanine en 8-OxoG

L'oxydation de la guanine peut se faire de deux manières différentes mais n'est qu'une conséquence mineure de l'irradiation (Thèse T.Chabot, 2020).

4. La formation de dimères pyrimidiques

Les dimères de pyrimidine majoritairement formés sont ceux découlant principalement de l'action des UV.B et des UV.C de fortes énergies [46]. Il s'agit principalement des dimères cyclobutaniques de pyrimidines (CPD) et les pyrimidines 6-4 pyrimidone (6-4 PP). Les cycles aromatiques des bases d'ADN absorbent l'énergie des photons U.V. L'énergie apportée au niveau de deux pyrimidines proches permet la formation d'une liaison covalente entre ces deux bases, au détriment des liaisons hydrogènes établies par la complémentarité des bases entre les deux brins d'ADN. Ces liaisons entre les bases conduisent à des pontages intra ou inter-brin selon la position des bases mises en jeu. De plus en plus de publication montre également l'implication d'une irradiation par UV.A dans la formation des CPD [47]–[49].

Les CPD sont formés par liaison covalente de deux pyrimidines adjacentes créant une structure mettant en jeu les atomes C5 et C6 de carbone de chacune des pyrimidines (**Figure 6A**). Le taux de CPD dans les cellules après une irradiation aux UV est estimé à 1500 lésions par cellule et par jour [50], ce qui en fait la lésion photo-induite la plus fréquente. Les CPD créent une déformation de la double hélice d'ADN [51] qui bloque l'activité des ADN polymérase lors de la réplication et de l'ARN polymérase II lors de la transcription. Les 5'méthylcytosines présentes dans les îlots CpG des régions promotrices des gènes humains ont une longueur d'onde d'absorption maximale de 273nm favorisant donc la formation de lésions CPD sur ces sites suite à une irradiation [46], [52].

Après irradiation, les secondes lésions les plus fréquentes sont les 6-4 PP issues de la formation d'une liaison stable entre les carbones C6 et C4 de deux pyrimidines avoisinantes (**Figure 6B**). Elles sont beaucoup plus déformantes que les CPD (7 à 10°) et créent une distorsion de plus de 40° de l'ADN [51] bloquant de nouveau la progression des ADN et des ARN polymérase. Ces dimères de pyrimidines sont à l'origine notamment de liaisons intra et inter brin pouvant exister au sein de la double hélice d'ADN.

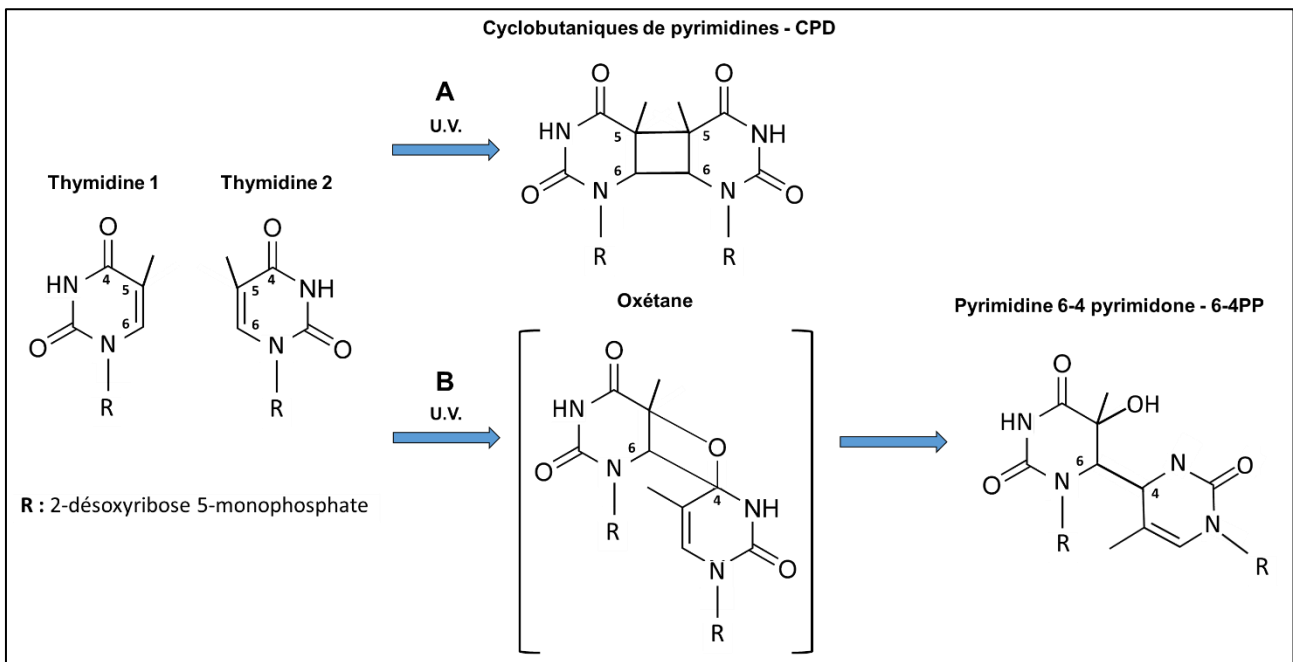


Figure 6 – Réaction de formation de dimères de pyrimidines CPD et 6-4 PP

La formation des dimères de pyrimidines (A – CPD , B – 6-4PP) a pour conséquence l'apparition de liaisons intra et inter-brin bloquant l'action des ADN polymérases (Thèse T.Chabot, 2020).

5. Le mésappariement des bases de l'ADN

Les bases azotées existent sous plusieurs formes dites tautomères. Elles résultent d'un déplacement inconstant des atomes d'hydrogène, des fonctions amine et des fonctions énol. Les formes tautomères sont plus rares, mais, au cours de la réplication de l'ADN, certaines bases peuvent se transformer en ces formes particulières (**Figure 7A**). La forme tautomère de l'adénine est l'imino-adénine, qui ne s'hybride pas avec la thymine, mais avec la cytosine. La forme tautomère de la thymine est l'énol-thymine qui s'hybride mieux avec la guanine qu'avec l'adénine. La forme tautomère de la guanine est l'énol-guanine qui se lie plus facilement avec la thymine qu'avec la cytosine [53]. Les modifications d'affinité pour les bases complémentaires jouent un rôle sur l'action des ADN polymérases qui provoquent la synthèse de bases différentes de celles attendues (**Figure 7B**). Lorsque la réplication est terminée, les bases azotées du brin modèle ne pourront alors plus s'hybrider totalement avec les bases du brin néoformé causant un mésappariement. Au cours de la mitose suivante, les deux brins mal-appareillés se répliqueront en produisant un nucléotide complémentaire erroné (**Figure 7C**). Sur le brin comportant un nucléotide « anormal », il y aura alors une modification permanente de la séquence génétique apparaît.

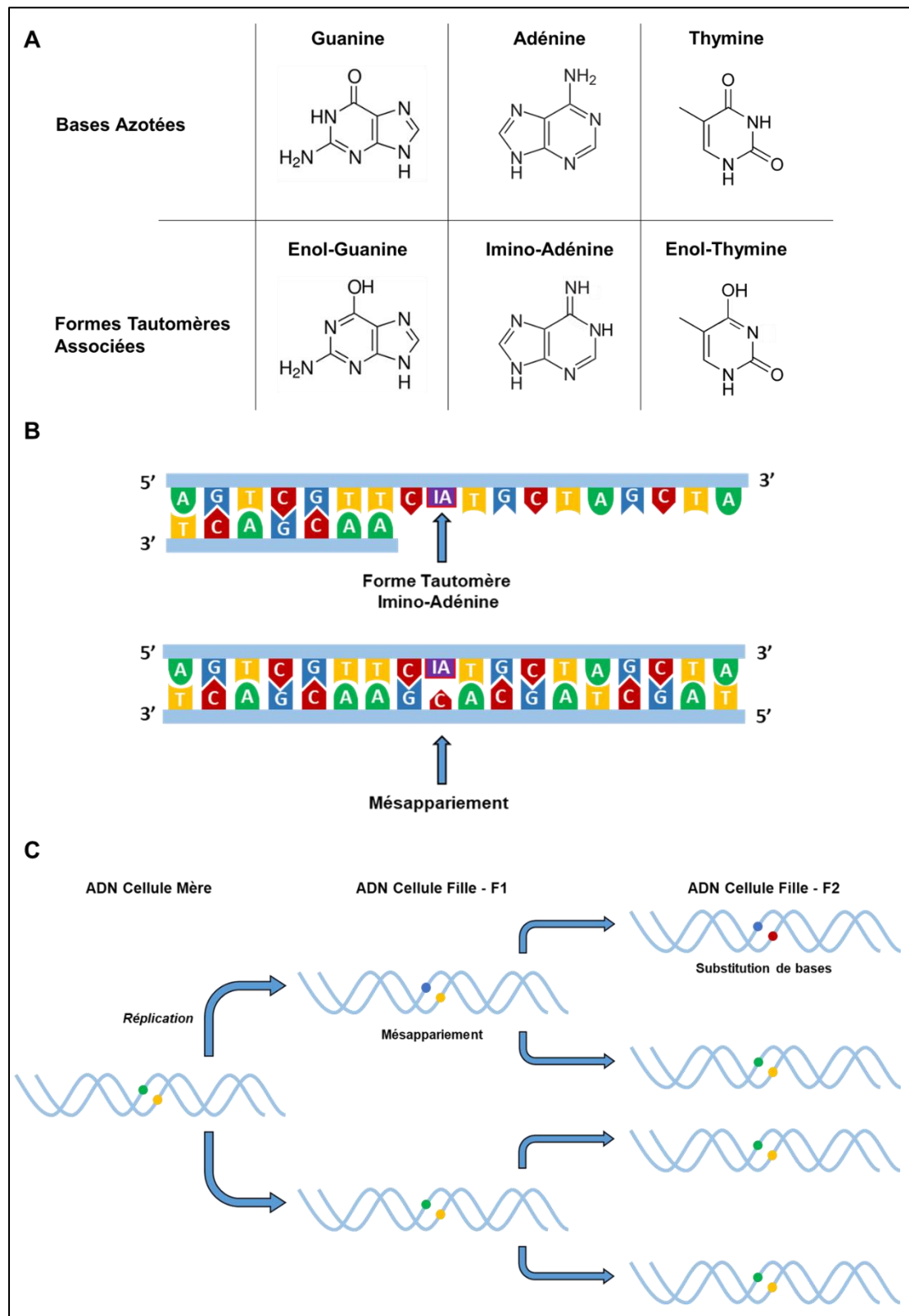


Figure 7 – Mésappariement des bases de l’ADN par incorporation de formes tautomères

(A) Chacune des bases azotées composant l’ADN possède une forme tautomère se formant lors de la réplication. (B) Les formes tautomères, par modification de leur complémentarité de base, induisent un mésappariement des paires de bases. (C) Le mésappariement induit un changement de paire de bases lors des réplifications suivantes et donc de l’information génétique qui se transmet à la descendance (Thèse T.Chabot, 2020).

6. Les cassures simple-brin & double-brin

Les cassures simple-brin consistent en la rupture du squelette nucléotidique sur un des deux brins de l'ADN. Elles sont réparées par action d'une ligase, suite aux mécanismes de réparation par excision de nucléotides (NER) ou par BER développés ci-après. Elles peuvent débouchées sur la formation de CDB (**Figure 8**). En effet, le passage de la fourche de réplication lors de la présence de CSB entraîne leur conversion en CDB. Une étude a d'ailleurs montré que 1% des CSB sont converties en CDB dans des cellules humaines (~50 CDB par jour), soit autant que des CDB induites par irradiation [54]. Les cassures double-brin sont les lésions les plus délétères pour le génome car elles présentent le plus de risque pour la cellule [55]. Elles correspondent à la rupture du squelette nucléotidique sur les deux brins de l'ADN et provoquent une désorganisation de la structure chromosomique. Dans cette situation, l'intégrité du génome est directement touchée, et cela ne peut conduire qu'à deux issues : la mort cellulaire programmée ou la réparation. Si cette dernière est mal réalisée, les CDB conduisent à des mutations par perte d'information génétique ou décalage du cadre de lecture, et à une transmission à la descendance de ces erreurs. Les CDB sont donc des lésions dangereuses mais elles peuvent pourtant être dans l'intérêt de certaines cellules quand elles sont délibérément induites. L'objectif de ces CDB physio-induites est de causer des réarrangements programmés du génome pour introduire une variabilité génétique [56]. C'est le cas des CDB générées par le complexe RAG (Recombination Activating Gene) ayant pour objectif de stimuler la recombinaison des segments V(D)J dans les lymphocytes, dont la réparation se fait principalement par NHEJ.

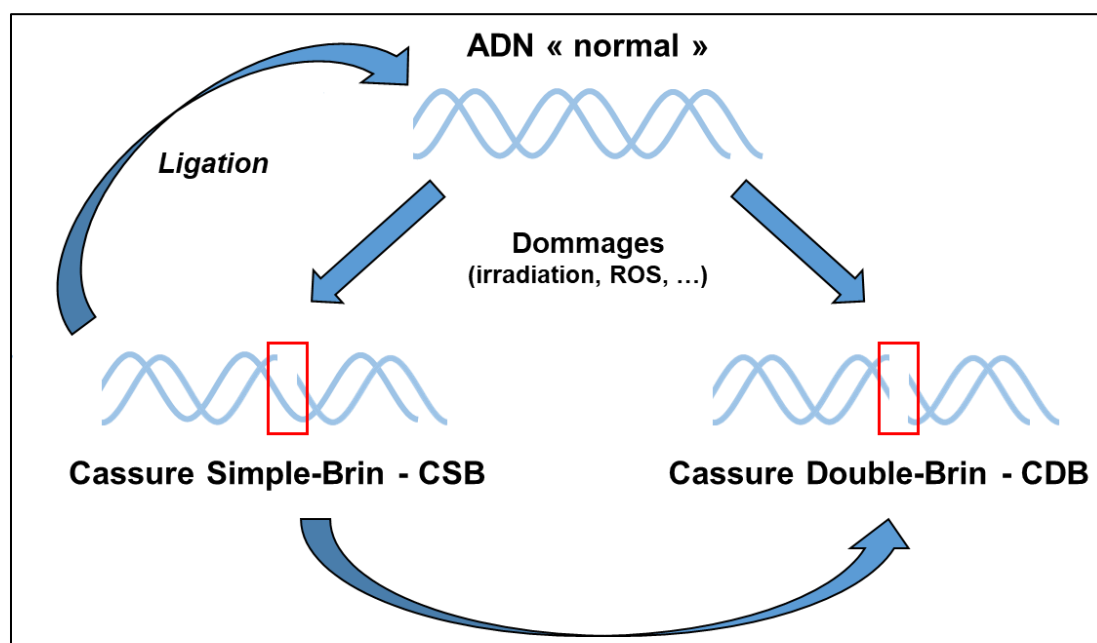


Figure 8 – Réaction de formation des cassures simple et double-brin

Les dommages subis chaque jour par notre ADN peuvent induire des cassures simple-brin réparées par simple ligation ou bien conduisant à des cassures double-brins plus délétères (Thèse T.Chabot, 2020).

b. Choix et mécanismes de réparation de l'ADN

Les dommages à l'ADN sont de différentes natures, et leurs conséquences sont plus ou moins retentissantes sur l'avenir de la cellule. Ils seront réparés de manière plus ou moins efficace, en activant des mécanismes précis de réparation détaillés ci-après (**Figure 9**) [30], [42]. Les systèmes de réparation des dommages à l'ADN et le génome travaillent ensemble de manière précise et fine afin de restaurer au mieux le support de l'information génétique, principalement par des cascades d'activation/inhibition protéiques. Le mécanisme mis en jeu dépend, notamment, des agressions subies, des dommages réalisés et de la phase du cycle cellulaire engagée. Ce choix est donc basé sur la coordination dans le temps de nombreuses protéines jouant un rôle dans la détection, le recrutement, la réparation et enfin la résolution des dommages. De manière plus globale, la réparation des dommages à l'ADN est constituée de plusieurs facettes mettant en jeu les mécanismes de la réparation à proprement parlé, mais également tous les mécanismes en qui y sont liés comme l'arrêt du cycle cellulaire, de la transcription ou la régulation de l'apoptose.

Pour les modifications de base, comme les pontages chimiques suite à la formation de dimères pyrimidiques, ou encore l'alkylation, l'oxydation ou la désamination des nucléotides, le mécanisme utilisé sera la BER (**Figure 9A**). La réparation des pontages intra ou interbrin, notamment causé par les UV, sera réalisée par NER (**Figure 9B**). En ce qui concerne les erreurs dues à la réplication du génome conduisant à un mésappariement, la réparation se fera par Réparation des Mésappariements (MMR) (**Figure 9C**). Les CDB sont réparées par 2 mécanismes majeurs : la Jonction des Extrémités Non Homologues (NHEJ) et la Recombinaison homologue (RH) (**Figure 9D**). Le choix d'un mécanisme plutôt qu'un autre dépend encore une fois de la phase du cycle cellulaire où se trouve la cellule lésée, et la nature des dommages subis (irradiation, blocage fourche de réplication, ...). En effet, un arrêt du cycle en réponse à des CDB en phases S/G2 conduira principalement à une réparation par RH en utilisant la chromatide sœur, présente lors de cette phase pour permettre une réparation fidèle. En revanche, une lésion par formation d'une CDB à un tout autre moment du cycle,

comme en phase G1, conduira à une réparation par NHEJ avec une simple ligation des extrémités de la cassure.

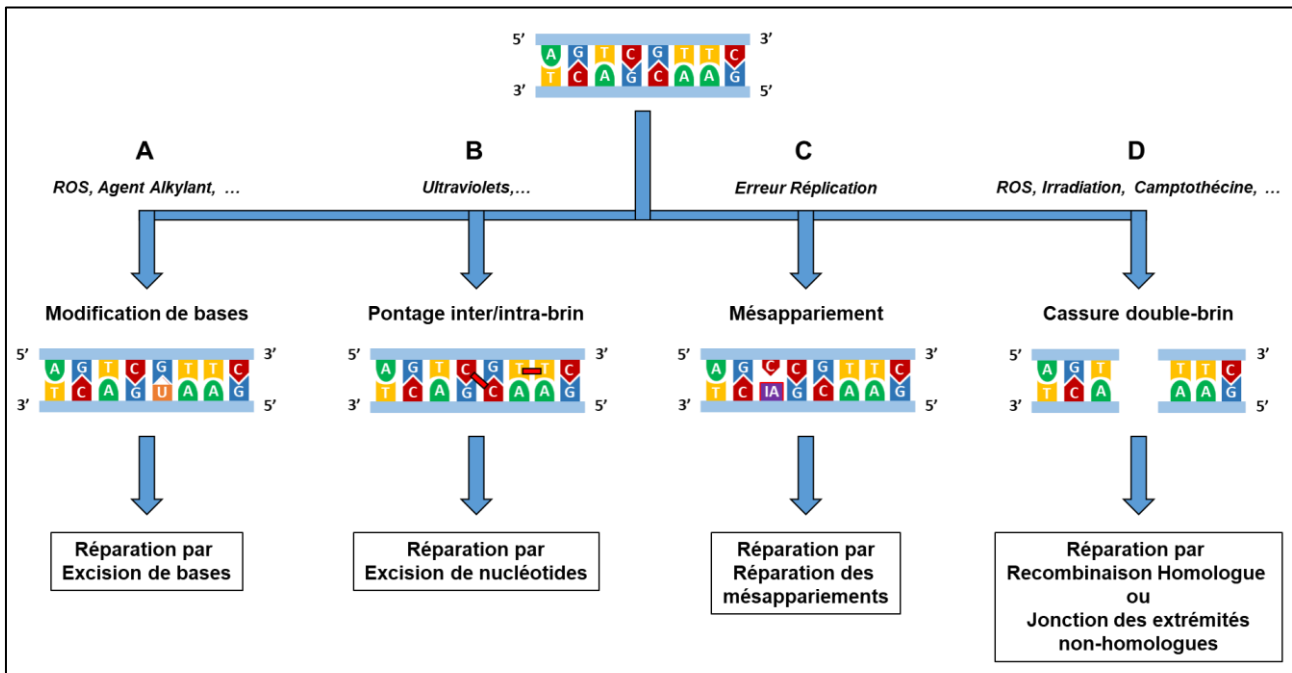


Figure 9 – Les différentes voies de réparation

Le choix d'une voie de réparation spécifique de l'ADN dépend de la cause et du dommage induit (*Thèse T.Chabot, 2020*).

i. Réparation des mésappariements par MMR

La voie de réparation par MMR répare les mésappariements, les erreurs d'incorporation ou d'insertion/délétion de bases azotées survenant notamment lors de la réplication et de la recombinaison du génome. Les acteurs principaux de ce mécanisme sont les protéines MSH2, 3 et 6 (homologue de MutS chez *E.coli*) formant les hétéroduplexes MSH2-3 (délétion:insertion longue) ou MSH2-6 (délétion:insertion très courte-base) selon la longueur de la délétion:insertion [57] ; la protéine MutL homolog 1 (MLH1) couplée à la protéine Post-Meiotic Segregation increased 1 (PMS1), 2 (PMS2) ou MutL homolog 3 (MLH3) (homologue de MutL chez *E.coli*) et l'homologue de MutH encore non découvert à ce jour chez l'homme. Chez *E.coli*, MutS reconnaît le mésappariement permettant sa fixation et celle de MutL pour permettre le recrutement de différentes protéines comme l'exonucléase Exonucléase 1 (EXO1). MutL et EXO1 interagissent après l'action de MutH qui reconnaît le brin non-méthylé. Après action d'une hélicase déroulant progressivement l'ADN, EXO1 libère par endonucléation la zone autour du mésappariement. Le tout forme une zone d'ADN simple-brin (ADNsb) dont la réparation se fera par néopolymérisation assurée par l'ADN polymérase III et par ligation assurée par l'ADN ligase [58].

ii. Réparation des pontages par Excision de Nucleotides

Les pontages intra/inter-brin causés par les UV induisent une liaison covalente entre deux bases (C=C, T=T, C=T). Le mécanisme permettant la réparation de ces dommages est la réparation par NER. A l'inverse de la BER, la NER prend en charge des lésions qui altèrent la structure de l'hélice [59]. Ce mécanisme très polyvalent et peut être divisé en 2 voies alternatives : la réparation globale du génome (GGR), la réparation couplée à la transcription (TCR). Ces 2 facettes de la NER partagent en revanche un même mode d'incision, de réparation et de ligature de la cassure, seule la reconnaissance du dommage diffère. Lors de la NER-GGR, elle est réalisée par la protéine *Xeroderma pigmentosum C* (XPC) qui reconnaît les distorsions de l'hélice et permet le recrutement de la protéine *Xeroderma pigmentosum A* (XPA). Cette protéine fixe l'ADN et sert de plateforme de recrutement aux autres protéines de la réparation. Elle recrute le complexe de facteur de transcription IIH (TFIIH) qui permet l'ouverture de l'ADN en collaboration avec les hélicases *Xeroderma pigmentosum D* et *B* (XPD et XPB). Les protéines Excision Repair Cross Complementing polypeptide 1 et *Xeroderma pigmentosum F* (XPF) forment un duplexe qui avec *Xeroderma pigmentosum G* (XPG) assurent alors l'excision d'une trentaine de nucléotides autour de la zone de pontage. La séquence est ensuite réparée par néopolymérisation par les polymérases Pol δ , ϵ et κ , et ligation par l'action de la ligase III α et de son cofacteur XRCC1 (X-ray Repair Cross Complementing protein 1) [60]–[62]. Lors de la réparation par TCR, seules les étapes initiales de reconnaissance diffèrent. En effet, la reconnaissance ne requiert pas la présence de la protéine XPC. La voie TCR débute lorsque l'ARN polymérase se bloque au niveau d'une lésion dans l'ADN lors de la transcription. C'est elle qui sert de signal de reconnaissance des dommages. De plus, les protéines CSA et B (Cockayne syndrome A et B) interviennent en remplacement de la protéine XPC [61].

iii. Réparation des bases incorrectes par Excision de Bases

La modification des bases azotées par oxydation comme la 8-oxoG, alkylation ou désamination comme l'hypoxanthine entraîne leur reconnaissance par des ADN glycosylases qui les retirent spécifiquement de la séquence nucléique formant un site abasique apurique ou apyrimidique [63]. Le mécanisme de réparation par BER débute alors. Il se divise en 4 étapes avec en premier lieu le clivage du site abasique par une endonucléase spécifique comme APE1 formant une CSB. Elle est reconnue par la protéine Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) qui induit l'accumulation de XRCC1. Notons que l'absence de la protéine PARP-1 empêche la progression de la fourche de répllication, induit des CSB et donne par la suite des CDB qui seront principalement réparées par RH [64]. De plus, PARP-1 fait partie des protéines visées par les caspases 3 et 7 activées et son clivage est donc révélateur d'une apoptose cellulaire [65]. Une ADN polymérase remplit l'espace libéré en utilisant la base intacte du brin opposé comme matrice. Enfin, une ADN ligase suture le brin réparé [42].

c. Gros plan sur la réparation des cassures double-brin

Les cassures double-brin sont les dommages représentant le plus de risque pour l'intégrité du chromosome, du génome et de la cellule [55]. A la différence des autres dommages à l'ADN, où il est aisé de reproduire le fragment perdu en se basant sur le brin complémentaire et donc d'avoir une réparation fidèle, les CDB n'ont plus de matrice sur laquelle s'appuyer pour se réparer de façon fidèle. Ce manque de matrice explique à lui seul que la réparation des cassures double-brin relève du défi pour la cellule afin d'être le plus fidèle possible à la séquence d'origine. Dans la plupart des cas, les mécanismes de réparation « normal » induisent certaines insertions ou délétions lorsque cela est nécessaire. Ce qui est le cas notamment lorsque les extrémités de la cassure sont incompatibles avec la réparation en termes de complémentarité de bases [66]. Les mécanismes aberrants représentent un risque non négligeable pour la cellule avec une possibilité de translocation et de réarrangement chromosomique importante, des aneuploïdies ou des pertes de fragments chromosomiques entiers. En effet, si la cassure se produit aux extrémités du chromosome elle induit une perte d'hétérozygotie et un phénomène de létalité pour les cellules haploïdes. Ce potentiel mortel des CDB est d'ailleurs utilisé lors des nombreux traitements anti-cancéreux comme la radiothérapie et la chimiothérapie.

Dans des conditions physiologiques, la plupart de ces modifications sont associées aux phénomènes de carcinogénèse [67], [68]. Pour une réparation la plus rapide et la plus fidèle possible, deux mécanismes principaux sont mis en jeu : la NHEJ et la RH. En plus de ces deux systèmes de réparation, une signalisation complexe est mise en place afin de les activer de manière spécifique en fonction de la situation, mais également afin de stopper la progression du cycle cellulaire. Notons que certaines protéines sont impliquées dans ces 2 aspects de la réparation. Il existe également des voies dites alternatives de ces systèmes de réparation. Les principaux mécanismes alternatifs de la réparation par RH et NHEJ sont la Single Strand Annealing (SSA), la Break-Induced Replication (BIR), et la voie alternative de la NHEJ (Alt-NHEJ). Lors de la résection des sites de cassures, il y a libération d'ADNsb. La présence d'homologie de part et d'autre du site de cassure permet l'appariement de ces ADNsb [69]. Dans le cas de la réparation par SSA, les grandes zones d'homologies sont traitées par la protéine RAD52, qui se trouve être une protéine de la RH chez la levure [70]. Dans le cas de la réparation par BIR, la réparation est semblable à la RH mais une seule extrémité cassée peut envahir la matrice homologue, ce qui est similaire aux cassures formées par des fourches de réplication effondrées ou des télomères érodés [71]. Dans le cas de la Alt-NHEJ, il s'agit de microhomologies traitées par certaines protéines de la NHEJ [70].

i. Détection, signalisation & choix de la réparation des cassures double-brin

Le choix d'un mécanisme plutôt qu'un autre dépend d'une signalisation précise découlant de la présence ou non de nombreux facteurs. Un des éléments est notamment la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule lésée. La nature des dommages subis est aussi prise en compte, afin d'établir une réparation la plus efficace possible. En effet, un arrêt du cycle en réponse aux dommages en phases S/G2 conduira principalement à une réparation par RH en utilisant la chromatide sœur, accessible lors de cette phase, pour permettre une réparation fidèle de l'ADN. En revanche, une lésion à un tout autre moment du cycle conduira à une réparation par NHEJ (classique C-NHEJ ou alternative Alt-NHEJ) avec une simple ligation des extrémités de la cassure. Ce mécanisme de réparation simple mais potentiellement non-fidèle peut entraîner l'ajout ou la perte de base et conduire à des mutations. Ce choix est dépendant du cycle cellulaire mais plus précisément des acteurs présents (53BP1, CtIP,...) et jouant sur la resection de l'ADN selon leurs régulation par les protéines du cycle cellulaire. C'est ce mécanisme de resection qui dirigera la réparation des CDB vers l'une ou l'autre des voies de réparation [72], [73].

1. Le remodelage chromatinien

Le premier élément à détecter les CDB, est l'ADN lui-même. En effet, la chromatine et les nucléosomes qui l'organisent, sont remodelés suite aux dommages que l'ADN subit [74]. Tout d'abord, la chromatine doit se réorganiser au niveau du site de cassure afin d'optimiser sa détection et sa réparation. Le remodelage est notamment permis grâce à l'action de différents complexes comme les complexes Switch/Sucrose Non-Fermentable (SWI/SNF), INO80, SWR, TIP60 ou le complexe de Remodelage de la Structure Chromatinienne (RSC). L'objectif est de désorganiser les nucléosomes pour ouvrir l'ADN double-brin (ADNdb), puis de déplacer les nucléosomes le long de l'ADN pour exposer ou masquer des séquences et enfin échanger les histones des nucléosomes par des variants spécialisés [74]. Une fois la réparation réalisée, la chromatine doit retrouver sa structuration initiale. C'est au cours de cette étape de restauration que des modifications épigénétiques apparaissent. En effet, une incorporation de nouvelles histones différentes de celles présentes avant les dommages, notamment au niveau de leur profil de modifications post-traductionnelles (MPT), est observée [75]. L'incorporation locale de nouvelles histones servirait de système de marquage de la chromatine, afin d'établir une mémoire génétique des dommages subis [75]. Cette modification de la structure chromatinienne a été décrite comme étant un modèle accessibilité-restauration-réparation [76].

2. La modification des histones

Les nucléosomes qui structurent la chromatine sont constitués d'une unité de base autour de laquelle s'enroule l'ADN. Les histones, formant cette structure, sont divisés en un tétramère d'histones 3 et 4 ((H3-H4)²) encadré par deux dimères d'histones 2A et 2B (H2A-H2B) [77]. Ils peuvent subir différentes MPT comme la phosphorylation [78], qui dans le cadre du remodelage de la chromatine après induction de CDB ont largement été étudiées et caractérisées. Le profil de MPT de chaque histone constitue la source d'information quant à la mémoire génétique des dommages. L'un des profils les plus étudiés dans le cadre des dommages à l'ADN est l'augmentation de l'incorporation du variant Histone 2A membre X (H2AX) au sein des nucléosomes de chaque côté de la cassure et de sa phosphorylation en sérine S139 formant le variant γ H2AX [79], [80], [81]. Il s'agit d'un marqueur des dommages à l'ADN et en particulier des CDB. Son apparition est très rapide à proximité de la cassure, il s'accumule suite à l'induction de la CDB et joue un rôle dans l'amplification de la cascade de signalisation de la réparation [80]. Cette phosphorylation a été longuement étudiée pour son rôle essentiel dans la détection et la réparation des CDB ainsi que dans la rétention des facteurs de remodelage de la chromatine. L'histone H2AX peut être phosphorylée par plusieurs kinases de la famille des Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) après induction de CDB [81], toujours selon les acteurs présents et le type de dommage réalisé. L'accumulation de γ H2AX est visible sous la forme de foyers, par microscopie à fluorescence, dont le nombre est proportionnelle à la quantité de CDB induites [82]. La formation de γ H2AX par les PIKK joue un rôle important dans la signalisation et le recrutement d'autres protéines clés pour la régulation de la réparation des CDB [83]. Au sein de la famille des PIKK, la kinase Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) est l'une des principales protéines de signalisation de dommages à l'ADN qui phosphoryle l'histone H2AX [84]. Ataxia Telangiectasia and Rad3-related (ATR), autre PIKK de la signalisation des dommages catalyse également la phosphorylation de H2AX dans le cadre d'un stress répliatif induisant des CSB ou CDB. Autre membre de la famille PIKK, la protéine DNA-dépendante protéine kinase (DNA-PK) est la protéine centrale de la réparation par NHEJ, qui est aussi capable de phosphoryler H2AX, que ATM soit présente [85] ou dans les cas où ATM est déficiente [84].

3. La modification des acides ribonucléiques

Des modifications post-transcriptionnelles existent aussi au niveau de l'ADN ou de l'ARN dont les fonctions dans la réparation des CDB commencent à être découvertes. Les fonctions des ARN modifiés jouent un rôle dans la modulation de la réparation ou facilitent le mécanisme enclenché [86]. De plus, la simple formation d'hybrides ADN:ARN lors de CDB favorise le recrutement de protéines spécifiques améliorant la réparation des cassures [87], [88]. Ce mécanisme illustre que le rôle de l'ARN dans la réparation est sous-estimé. En ce qui concerne ces modifications post-transcriptionnelles, un article a récemment mis en avant le rôle du « witter » TRDMT1 sur l'ARNm et l'impact sur la réparation par RH [89]. La protéine tRNA

(cytosine-5-)-methyltransferase (TRDMT1), est recrutée sur les sites de dommages et induit la formation d'ARN m5C. Son absence induit en revanche un mécanisme de recombinaison homologue défectueux avec une perte de localisation des protéines RAD52 et RAD51. La protéine TRDMT1 et l'ARN m5C sont donc nécessaires à ce système de réparation. De plus, il a été montré que RAD52 présentait une affinité plus importante pour un hybride ADN:ARN que pour de l'ADNsb [90]. L'absence de TRDMT1 conduirait donc à une absence d'ARN m5C ce qui impacterait directement sur la localisation de RAD52, « reader » de cette modification post-transcriptionnelle et essentielle au recrutement sur le site de CDB de RAD51. La réparation par RH est ainsi réduite [89]. Une autre publication récente a montré que la N6-adénosine-méthyltransférase (METTL3) est activée par phosphorylation d'ATM et est ensuite localisée sur les sites de dommages. Elle méthyle alors l'adénosine en position 6 (m6A) des ARN associés aux CDB. Cette méthylation permet le recrutement de la protéine « reader » YTH domain-containing protein 1 (YTHDC1) qui a pour fonction de protéger l'ARN. Il y a alors accumulation des hybrides ADN:ARN sur les sites des CDB. Ces ARN recrutent ensuite RAD51 et BRCA1 stimulant la réparation par recombinaison homologue [91]. Les cellules déficientes en METTL3 présentent un mécanisme de RH défectueux et une accumulation de CDB non réparées, ce qui montre l'importance de cette modification post-transcriptionnelle dans la régulation de la RH.

4. L'arrêt du cycle cellulaire via les voies ATM & ATR

La réparation commence par la reconnaissance de la CDB, avec l'arrivée sur le site de cassure des protéines senseurs de lésions à l'ADN. Les complexes MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) et Ku70/80 reconnaissent les dommages et servent de plateforme de recrutement aux protéines des deux voies de réparation RH et NHEJ décrites ci-après. Le complexe MRN par activation des voies ATM-ATR va médier une réparation des CDB principalement par RH. Son rôle sera également d'induire le processus de résection de ce mécanisme, en collaboration avec la protéine CtIP. Le complexe Ku70/80 par activation des voies ATM-ATR conduira à la réparation par NHEJ en recrutant la protéine DNA-PKcs (cs : catalytic subunit) [92], [93]. Ce complexe Ku70/80 permet également de protéger les extrémités de la lésion d'une dégradation excessive, mais également de les conserver proche les unes des autres. Ces protéines senseurs permettent donc l'activation des voies ATM-ATR qui sont également essentielles à l'arrêt du cycle cellulaire lors de la réparation des dommages à l'ADN, ou à l'induction de l'apoptose de la cellule en cas de dommages trop importants (**Figure 10**).

ATM et ATR font toutes deux parties de la famille PIKK. Cette famille de protéines sérine/thréonine kinase comprend 6 membres dont la protéine Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR), la protéine Transformation/transcription domain-associated (TRRAP), SMG1, ATM, ATR et DNA-PKcs avec sa sous-unité catalytique. Les trois derniers sont impliqués dans la réparation de l'ADN et la maintenance du génome [94]. Les autres membres

jouent des rôles importants dans de nombreux autres processus cellulaires [95], [96]. Ils possèdent une structure relativement commune composée d'une hélice α -solénoïdes impliquée dans les interactions protéine-protéine et protéine-ADN/ARN, d'un domaine Focal Adhesion Targeting (FAT) impliqué dans les interactions protéine-protéine ou enzyme-substrat [97], [98], et d'un domaine kinase catalytique homologue à celui des Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) mais avec comme différence de n'avoir que des protéines comme substrats [92]. Les protéines ATM et ATR ont la particularité de réaliser 2 vagues de signalisation par phosphorylation, une première permettant l'activation de la réparation par RH et la seconde permettant un arrêt du cycle cellulaire.

Comme nous l'avons développé précédemment, le complexe MRN détecte rapidement les CDB, notamment provoquée par irradiation (**Figure 10**). Il interagit directement avec la chromatine et promeut le recrutement de la protéine ATM par l'extrémité C-terminal de la protéine Nibrin 1 (NBS1) [99]. Son activation est faite par autophosphorylation en sérine S1981 [97]. Le signal est ensuite transmis à différents acteurs de la signalisation. ATM phosphoryle la protéine Checkpoint Kinase 2 (CHK2) [100] pour médier l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S. Elle phosphoryle également le gardien du génome p53 (**Figure 10**) [100] en sérine S15 afin d'enclencher si nécessaire l'apoptose. En ce qui concerne les cassures dues à des erreurs de réplication ou au stress réplicatif, elles sont détectées par le complexe protéique 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1). Ce complexe, associé à la protéine ATR Interacting Protein (ATRIP), est également activée de manière plus tardive dans le cas des CDB par la protéine Replication Protein A (RPA). En effet, son activation est dans ce cas médiée par les protéines RPA, une fois que ces dernières lient l'ADNsb formé lors de la réparation par RH canonique des CDB [101]. Une fois le complexe ATR/ATRIP formé, le complexe 9-1-1 active la protéine DNA topoisomérase 2-binding protein 1 (TOPBP1) qui active la protéine ATR [102] pour assurer la phosphorylation de Checkpoint Kinase 1 (CHK1) [103]. Tout comme ATM, ATR peut phosphoryler directement le suppresseur de tumeur p53 (**Figure 10**) [100].

CHK1 activé par ATR permet la dégradation de la protéine Cell-Division Cycle 25a (CDC25a) en la phosphorylant sur certains résidus sérine. Cette phosphorylation de CDC25a induit un arrêt du cycle cellulaire au cours de la phase S et inactive le complexe Cycline Dependente kinase 2/Cycline E (CDK2). CHK1 phosphoryle également la protéine Cell-Division Cycle 25c (CDC25c), qui inactive le complexe Cycline Dependente kinase 1/Cycline B (CDK1) et stoppe le cycle cellulaire en phase G2/M. Une voie parallèle via la phosphorylation de Wee1 par CHK1 permet d'inhiber l'action de CDK1 [104]. CHK2 sera phosphorylée par ATM activé par dimérisation et autophosphorylation. Tout comme son homologue CHK1, elle induira l'arrêt du cycle cellulaire par phosphorylation des protéines phosphatases CDC25a et CDC25c responsables de la déphosphorylation et de l'activation des CDK. Leur inactivation stoppe alors le cycle cellulaire. A l'instar d'ATM et d'ATR, CHK1 et 2 permettent aussi d'activer par phosphorylation, en thréonine T18 et sérine S20, le facteur de transcription p53. Toutes ces

phosphorylations conduisent à sa stabilisation et à son accumulation [105]. Le facteur p53 permet d'induire l'apoptose cellulaire et l'activation de la protéine p21 pour stopper le cycle cellulaire via les protéines CDK2 et CDK1 [105], [106]. Il est intéressant de noter le cross-talk important entre ces deux voies, qui assure une surveillance constante du cycle cellulaire et des dommages causés à l'ADN (**Figure 10**). Les protéines ATM et ATR ont des actions qui ne sont pas redondantes mais elles phosphorylent et activent des substrats donc les activités se chevauchent [107]. En effet, il a été montré dans un contexte ATR-déficient, que les CDB liées au stress répliatif étaient signalées par ATM [108]. Dans le cadre de CDB induites par irradiation, ATR est également activée de manière ATM et MRE11 dépendante [109] et stimule la relocalisation de PALB2 à la cassure, par BRCA1, suite à sa phosphorylation en sérine S59 favorisant une réparation par RH [110].

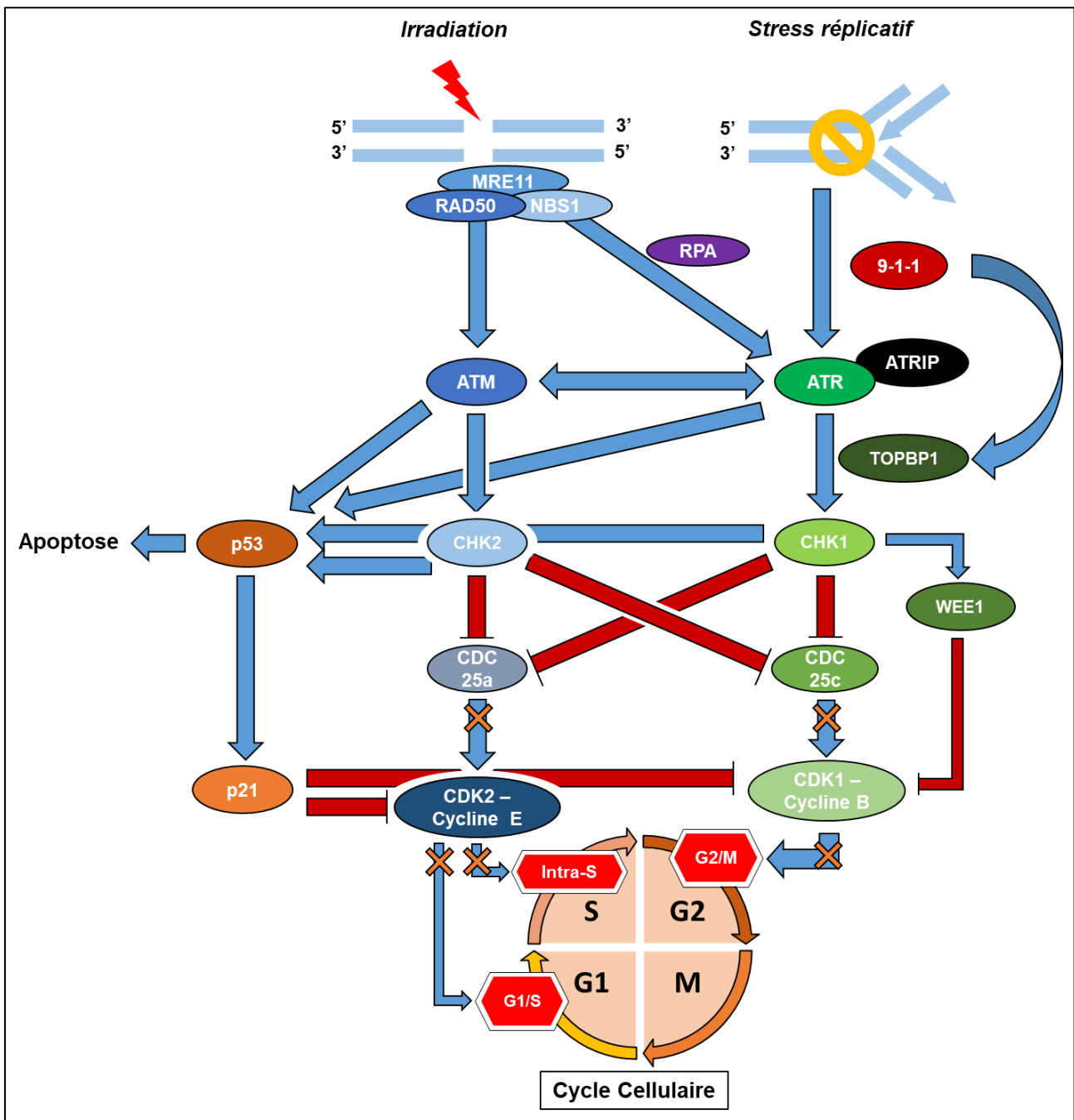


Figure 10 – Voies de signalisation ATM et ATR dans l’arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l’ADN par CDB

Suite à des dommages à l’ADN et notamment les CDB, les protéines ATM et ATR sont activées. Elles déclenchent différentes voies de signalisation qui régulent la réparation et bloquent le cycle cellulaire par l’intermédiaire de checkpoints, selon la phase dans laquelle le dommage a eu lieu (*Inspiré par [111]*).

ii. La réparation rapide par Jonction des Extrémités Non-Homologues

De par sa constance au cours du cycle cellulaire, la réparation par NHEJ est le mécanisme majeur dans les cellules humaines. En revanche, cette réparation rapide (environ 30 minutes [112]) par simple ligation est souvent accompagnée de délétions ou d’insertions de bases si cela est nécessaire au niveau des extrémités de la cassure. Notons que ces insertions:délétions ne sont pas obligatoires lors de la NHEJ [113], [114] ce qui en fait un

mécanisme qui s'adapte à la situation dans laquelle il se trouve. Cette réparation peut également être accompagnée de réarrangements chromosomiques qui conduisent à une réparation rapide mais peu fidèle de l'ADN lésé [115]. L'ajout ou la perte de bases provoque un décalage du cadre de lecture du gène, conduisant à son inactivation ou sa mutation. La réparation par NHEJ peut être réalisée tout au long du cycle cellulaire [116].

Tout débute par la reconnaissance de la CDB (**Figure 11A**) par le complexe hétérodimérique Ku70/80 [117] servant de plateforme de recrutement pour les différents acteurs de la NHEJ (**Figure 11B**) [118]. La présence en abondance de ces protéines dans les cellules et leur forte affinité pour l'ADN ($10^{-9}M/10^{-10}M$) [119] sont des éléments supplémentaires quant à la réparation des CDB majoritairement par NHEJ. La présence du complexe Ku70/80 au niveau de la CDB pourrait également empêcher la résection de l'ADN, bloquant ainsi les autres voies de la réparation des CDB de l'ADN comme la RH [120], [121]. La protéine majeure de ce mécanisme, la protéine DNA-PKcs est recrutée (**Figure 11C**). Elle interagit avec la partie C-terminale de Ku80 ce qui augmente son affinité pour l'ADN [122], [123]. Son activité est déclenchée par son auto phosphorylation et est régulée par le complexe Ku70/80. Le complexe DNA-PKcs/Ku70/80/ADN permet l'arrivée de la protéine hélicase de Werner (WRN). Il empêche l'activation de la voie de réparation par RH et stoppe l'action exonucléase des protéines MRN et CtIP. Le complexe DNA-PKcs/Ku70/80/ADN conduit alors à l'activation de l'endonucléase Artémis par phosphorylation de sa partie C-terminale inhibitrice qui la sépare alors de la partie activatrice N-terminale (**Figure 11D**). Selon la CDB, et si cela est nécessaire à l'obtention d'extrémités complémentaires, l'ajout ou la suppression de nucléotides par l'action de nucléases comme Artemis est réalisée [124]. Il y a ensuite l'intervention des polymérase μ et λ qui interagissent avec Ku70/80 et incorporent quelques bases desoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) ou ribonucleotide triphosphate (rNTPs) (**Figure 11E**) [125]. Ces erreurs sont réparées par BER. L'ajout ou la perte de base expliquent à elles seules la diversité et la mauvaise qualité de réparation de la NHEJ. Enfin, l'intervention des protéines Ligase 4 (LIG4), X-ray Repair Cross Complementing protein 4 (XRCC4), XRCC4-like factor (XLF) et la protéine Paralog of XRCC4 and XLF (PAXX) forme un complexe de ligation (**Figure 11F**) [118], [126], [127]. La protéine LIG4 liera les extrémités suite à son recrutement par Ku70/80 via ses domaines BRCA1 C-terminus (BRCT). Elle est stabilisée par XRCC4 et stimulée par XLF. Une fois la ligation réalisée, DNA-PKcs phosphoryle le complexe Ku70/80 pour déclencher le départ des différents acteurs du site de réparation (**Figure 11G**) [128].

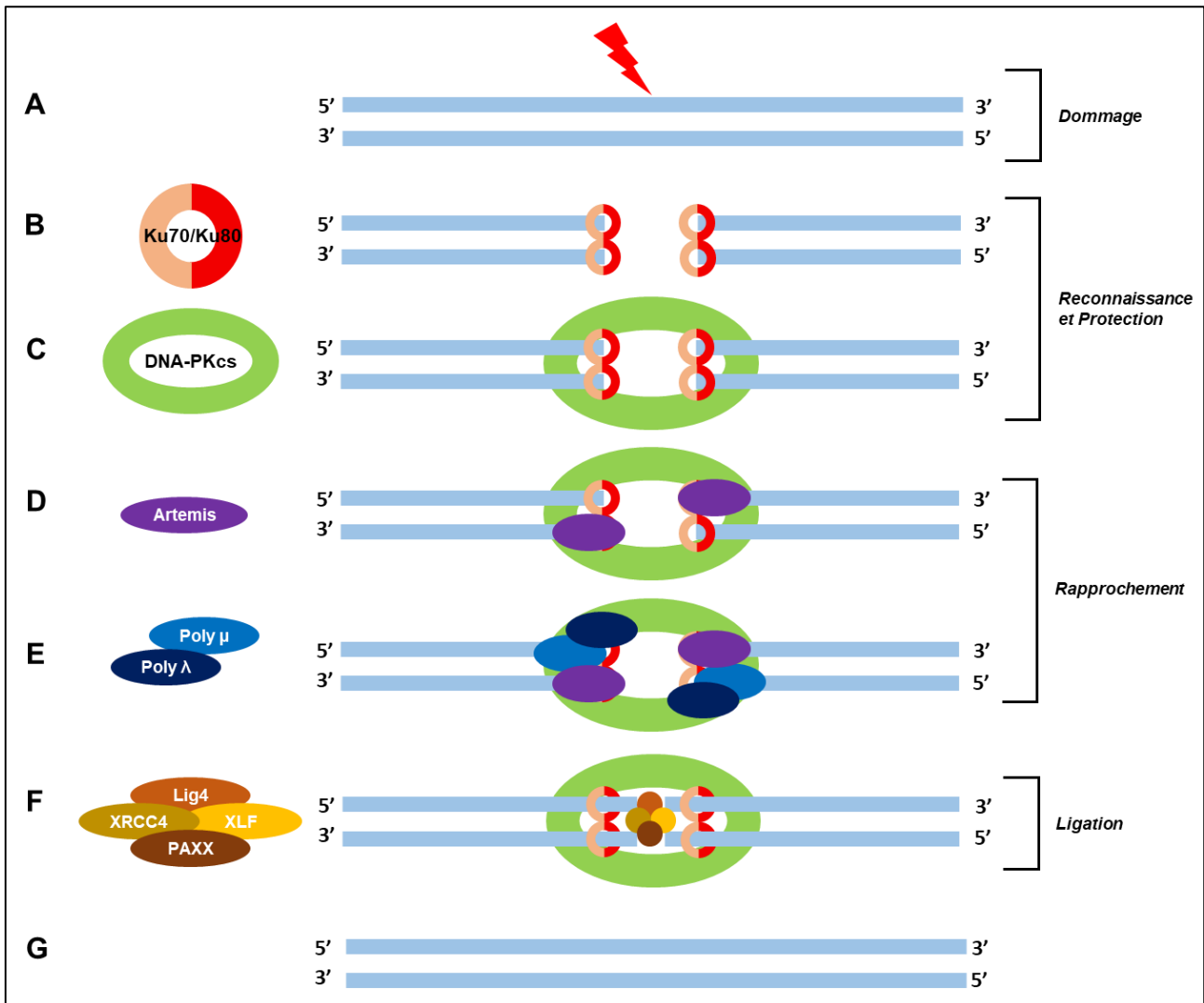


Figure 11 – Mécanisme de réparation des cassures double-brin par jonction des extrémités non-homologues classique (c-NHEJ)

La NHEJ est le mécanisme de réparation des CDB le plus présent dans la cellule car il peut intervenir à tout moment du cycle. Résultant en une simple ligation, il fait intervenir de nombreux acteurs et notamment la protéine: DNA-PKcs (Modifié d'après Chabot et al., soumise - cf. Annexe 16).

iii. La réparation fidèle par Recombinaison Homologue

Le mécanisme de réparation fidèle RH est un mécanisme de réparation long (plusieurs heures [112]) qui se déroule lors de la phase S/G2 du cycle cellulaire. En effet, la fidélité de réparation de l'ADN est due à l'utilisation de la copie du gène présent sur la chromatide sœur du chromosome lésé et qui sert de modèle lors de la recombinaison homologue. Notons que cette fidélité de la réparation par RH reste relative car des réarrangements chromosomiques ou des translocations sont possibles lors de ce mécanisme de réparation [129], au même titre que la NHEJ. Egalement à l'instar de la NHEJ, la RH peut être subdivisée en une voie classique et une voie alternative. Nous développerons ici la voie canonique de la réparation des CDB par RH (DSBR). Tout d'abord, le mécanisme de RH débute par la reconnaissance de la CDB (Figure 12A) par le complexe MRN (Figure 12B) [130]. Ce complexe MRN est conservé au

cours de l'évolution et sa structure commence à être bien défini [131]. Il possède des activités enzymatiques et structurales pour initier la résection des CDB et maintenir les extrémités des cassures liées les unes aux autres pour leur réparation. De plus, il est nécessaire pour le recrutement de protéines comme ATM jouant un rôle clé dans la signalisation des CDB. Une fois reconnue, les extrémités néoformées de la CDB subissent une première résection limitée de l'extrémité 5' vers 3' par notamment la protéine MRE11 du complexe MRN et la protéine C-terminale binding protein Interaction Protein (CtIP) pour permettre la formation d'extrémités 3'OH sortantes [132]. Une seconde résection est effectuée sur une plus longue distance par deux voies, l'une impliquant EXO1 [133], et l'autre utilisant le complexe Bloom syndrome Mutated protein, RecQ-Mediated genome Instability protein 1, DNA Topoisomérase III α (BLM-RMI1-TOPIII3) avec l'endonucléase DNA2 (**Figure 12C**) [134], [135]. Ces premières étapes permettent le déclenchement de la réparation par RH, mais il a également été montré qu'elles favorisaient l'inhibition de la NHEJ. En effet, en phase G2/M, l'activation par phosphorylation de CtIP par CDK2, associée à l'activation par phosphorylation de la protéine Breast Cancer 1 (BRCA1) par MRN, permet d'enlever le complexe Ku70/80 des extrémités de la cassure de l'ADN afin de stimuler la déphosphorylation et le départ de la protéine 53BP1 et donc d'inhiber la NHEJ [136], [137].

Les extrémités 3'OH sortantes créées sont protégées par les protéines RPA via une phosphorylation activatrice du complexe MRN et qui empêche la fixation de RAD51, mais également pour éliminer les structures secondaires potentielles formées par l'ADN simple brin résultant (**Figure 12D**) [138], [139]. La sous-unité RPA70 entoure l'ADNsb via ses domaines de liaison à l'ADN A, B et C (DbdA, B et C) pour former un filament protéique avec les sous-unités RPA32 et RPA14 de RPA. La formation du complexe RPA-ADN est également associée au recrutement des protéines ATR-ATRIP via son domaine DbdC [140], [141] qui bloquent le cycle cellulaire en phase G2/M. Le nucléofilament de protéine RPA est flexible [142] et s'associe à l'ADNsb en de nombreux endroits. Les protéines le composant sont également fortement modifiées par l'ubiquitylation et la phosphorylation pendant la réparation de l'ADN [143]. La façon dont plusieurs RPA s'associent sur l'ADNsb et coordonnent sa vaste gamme de processus reste encore à déterminer.

Il s'en suit l'activation des médiateurs de la réparation des CDB par RH : BRCA1 et 2. La protéine BRCA1 facilite le recrutement de la protéine Breast Cancer 2 (BRCA2) et de la protéine Partner And Localizer of BRCA2 (PALB2) à la CDB [144], [145], ainsi que RPA [146], notamment par l'interaction PALB2-BRCA1 suite à la phosphorylation de PALB2 par ATR. Les médiateurs BRCA2 et PALB2 sont alors activés et permettent le recrutement de RAD51 sur le site de cassure (**Figure 12E**) [147], [148]. Cette localisation est permise par BRCA2 qui interagit avec RAD51 afin d'assurer la translocation nucléaire de la recombinaise et son recrutement au niveau de la cassure double-brin en remplacement des protéines RPA (**Figure 12E**) [149], [150]. L'interaction RAD51-BRCA2 est donc primordiale au bon fonctionnement de

la RH humaine. Notons que chez la levure, c'est la protéine RAD52 qui sert de plateforme de recrutement à la protéine RAD51, stimule l'échange entre RAD51 et RPA [151]. Elle forme un anneau multimérique autour de l'extrémité 3'OH sortante du simple brin d'ADN et est capable de fixer RPA pour permettre l'échange des protéines RPA par RAD51 [151]–[153]. Ce rôle de régulateur de RAD52 entre RPA et RAD51 au cours de la RH chez l'homme commence d'ailleurs à être étudié [154].

Une fois RAD51 en place sur le site de la cassure, un nucléofilament de RAD51 se forme. Il correspond à une homo-oligomérisation de la protéine autour de l'ADN simple brin de manière ATP dépendante [155]. Cette structure permet la recherche sur la chromatide sœur de la séquence homologue à celle lésée. Le mécanisme de reconnaissance est très peu détaillé. Cependant, une étude récente a montré que cette reconnaissance était médiée par la protéine RAD54. Elle conduit à stimuler localement l'ouverture du brin matrice utilisée pour la réparation sur la chromatide sœur en catalysant la formation d'une structure d'ADN « mobile », en partenariat avec la protéine RPA. L'objectif est d'améliorer la reconnaissance de l'homologie par RAD51 [156]. Une fois la séquence homologie trouvée, elle est envahie par le complexe RAD51-ADN pour former le complexe D-loop (Displacement Loop) (**Figure 12F**). Cette boucle de déplacement est stabilisée par RAD51 et RAD51-Associated Protein 1 (Rad51AP1) [157]. Une fois l'appariement assuré, les polymérases et les ligases reconstruisent la séquence perdue en se basant sur l'ADN complémentaire homologue de la chromatide sœur.

L'échange de brin, suite au clivage de la D-loop et à la ligation, provoque la formation de jonctions de Holliday. Il s'agit d'une jonction entre les quatre brins d'ADN qui seront résolues (**Figure 12G**) par différentes voies. Les jonctions vont adopter une forme planaire créant deux axes de symétrie (un axe vertical et un axe horizontal). Si le clivage se fait selon l'axe vertical, les produits obtenus, à la fin de la résolution des jonctions de Holliday, auront subi une recombinaison génétique, un crossing-over. A l'inverse, si le clivage se fait selon l'axe horizontal, les produits obtenus n'auront pas subi de recombinaisons génétiques. En ce qui concerne les formes non-recombinées, elles apparaissent avec la « dissolution » des jonctions doubles de Holliday réalisée par le complexe BTR ou BLM-TOPIII3-RMI1 associé à la protéine Replication In Mitochondria 2 (RIM2) [158]. Deux mécanismes existent en ce qui concerne la résolution des jonctions simples de Holliday et les jonctions doubles qui ont échappé au complexe BTR [159]. Un premier fait intervenir la résolvasse GEN1 [160]. Cette protéine induit des incisions doubles à travers la jonction pour produire des duplex qui peuvent être ligaturés [159], cette incision se fait préférentiellement entre deux résidus G. Un second fait intervenir les protéines SLX1 et 4 [161], [162]. Deux cas de figure sont alors possibles, le premier ne faisant intervenir que le couple SLX1-SLX4 pour la résolution des jonctions avec un clivage symétrique permettant de former des duplex pouvant être ligaturés. Le deuxième où se produit un clivage asymétrique d'une partie des jonctions, les autres sont alors ciblées par les

protéines MUS81-EME1 en collaboration avec le couple SLX1-SLX 4 [158]. La régulation de ces mécanismes se fait de manière dépendante à l'avancée du cycle cellulaire [159].

Comme développé précédemment, il existe plusieurs voies de réparation par RH qui diffèrent par leur capacité à résoudre le problème causé par ces jonctions de Holliday lors de la phase post-synaptique : la Break-induced replication (BIR), la Synthesis-dependent strand annealing (SDSA) et la DSBR. Le choix de ces voies complémentaires de la réparation se fera encore une fois selon le type de dommages causés et des agents impliqués. Lors de la BIR, la D-loop se convertit en fourche de réplication pour recopier le bras entier du chromosome et est utilisée lorsque la deuxième extrémité de la cassure est perdue [163]. Lors de la SDSA, la D-loop est dissoute avant la formation de la jonction de Holliday pour s'hybrider avec l'ADNsb de la deuxième extrémité de la cassure [164], [165]. Enfin, lors de la DSBR, la résolution des jonctions de Holliday se fait par l'action des résolvases RAD51C et la protéine X-ray Repair Cross Complementing 3 (XRCC3) [166]. La réparation par recombinaison homologue se termine par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par RAD51 ce qui permet la dissociation du nucléofilament et le départ des protéines associées à l'ADN [167] (**Figure 12H**).

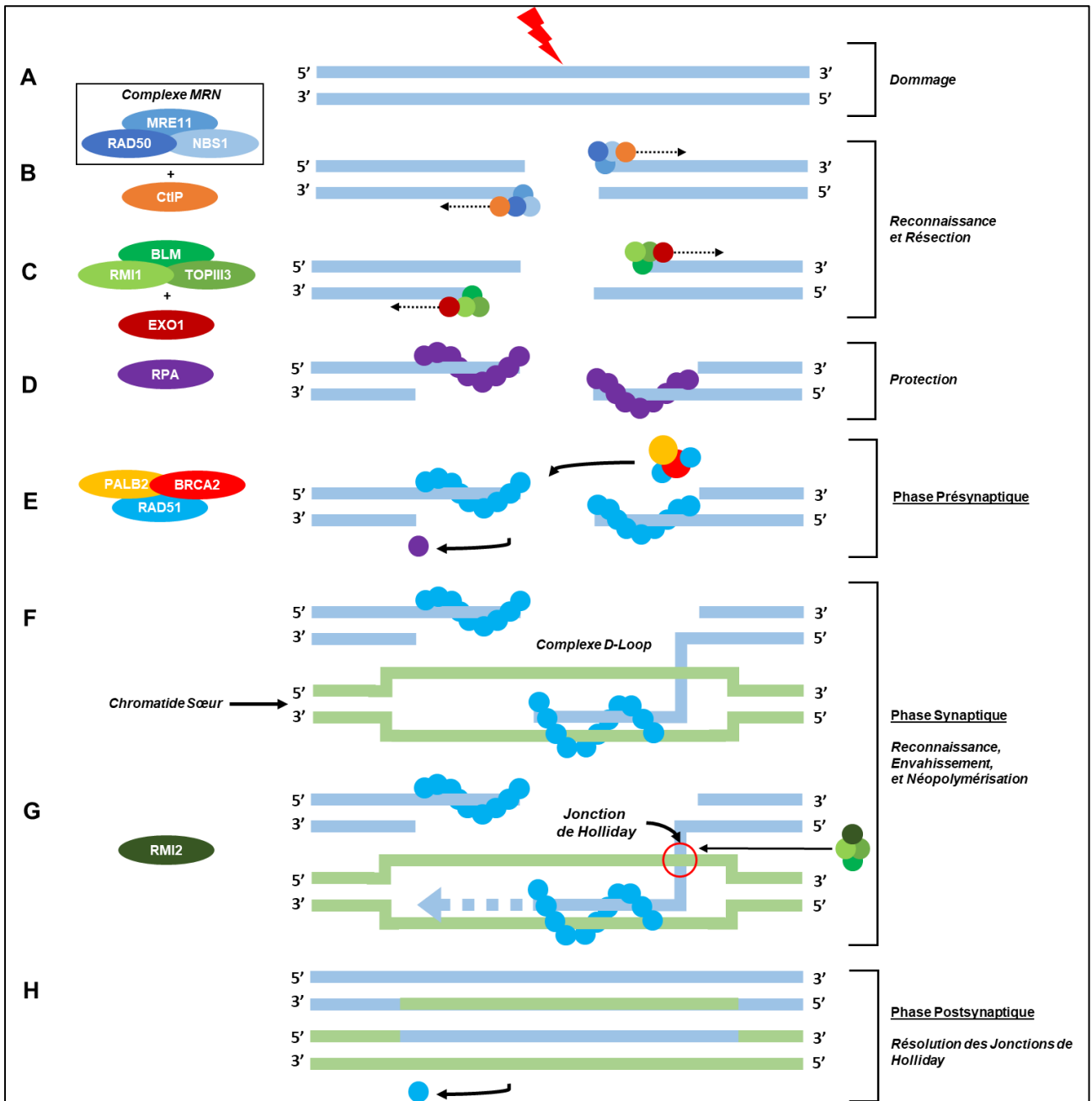


Figure 12 – Mécanisme de réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue

La RH intervient en phase G2/M du cycle cellulaire, car elle nécessite la présence de la matrice ADN présente sur la chromatide sœur lors de la réplication et la mitose. Ce mécanisme de réparation des CDB est le plus fidèle. Il résulte d'un mécanisme complexe qui fait intervenir de nombreux acteurs et notamment la protéine centrale : RAD51 (Modifié d'après Chabot et al., soumise - cf. Annexe 16).

Chapitre 2 - RAD51 : Protéine Centrale de la Réparation par Recombinaison Homologue

a. Découverte, conservation & diversification au cours de l'évolution

La recombinaison RAD51 est la protéine clé de la réparation des CDB par recombinaison homologue, elle est essentielle au maintien du génome. Elle est découverte suite à l'analyse génétique de mutations présentes chez une lignée de *Saccharomyces cerevisiae* déficiente pour la réparation des CDB par recombinaison homologue [168]. Sa forte conservation au cours de l'évolution reflète son importance majeure dans la mise en place du vivant [169]. En effet, le gène eucaryote codant pour RAD51 est également conservé dans les autres règnes du vivant comme chez les eubactéries et les archaebactéries (**Figure 13A**) [170]. L'ensemble de ces protéines forme la famille RecA. La première fut découverte en 1960 chez les eubactéries (RecA) [171], puis chez les archéobactéries (RADA) et chez les eucaryotes (RAD51) [170].

L'homologie entre toutes ces protéines orthologues est forte [172] car la protéine RAD51 humaine partage environ 25% d'homologie avec la protéine RecA de la bactérie *Escherichia coli* et 49% avec la protéine RADA de *Pyrococcus furiosus* une archée extrémophile (**Tableau 1**). L'hypothèse de la transmission de RecA dans les autres règnes serait due à l'endosymbiose des cyanobactéries et des protéobactéries [170]. Même au sein des différents règnes, l'homologie est très importante, notamment en ce qui concerne RAD51. En effet, la protéine RAD51 humaine (*Homo sapiens*) partage 95% de similitude avec celle du xénope (*Xenopus laevis*), et 99% avec celle de souris (*Mus musculus*) (**Tableau 1**) [170].

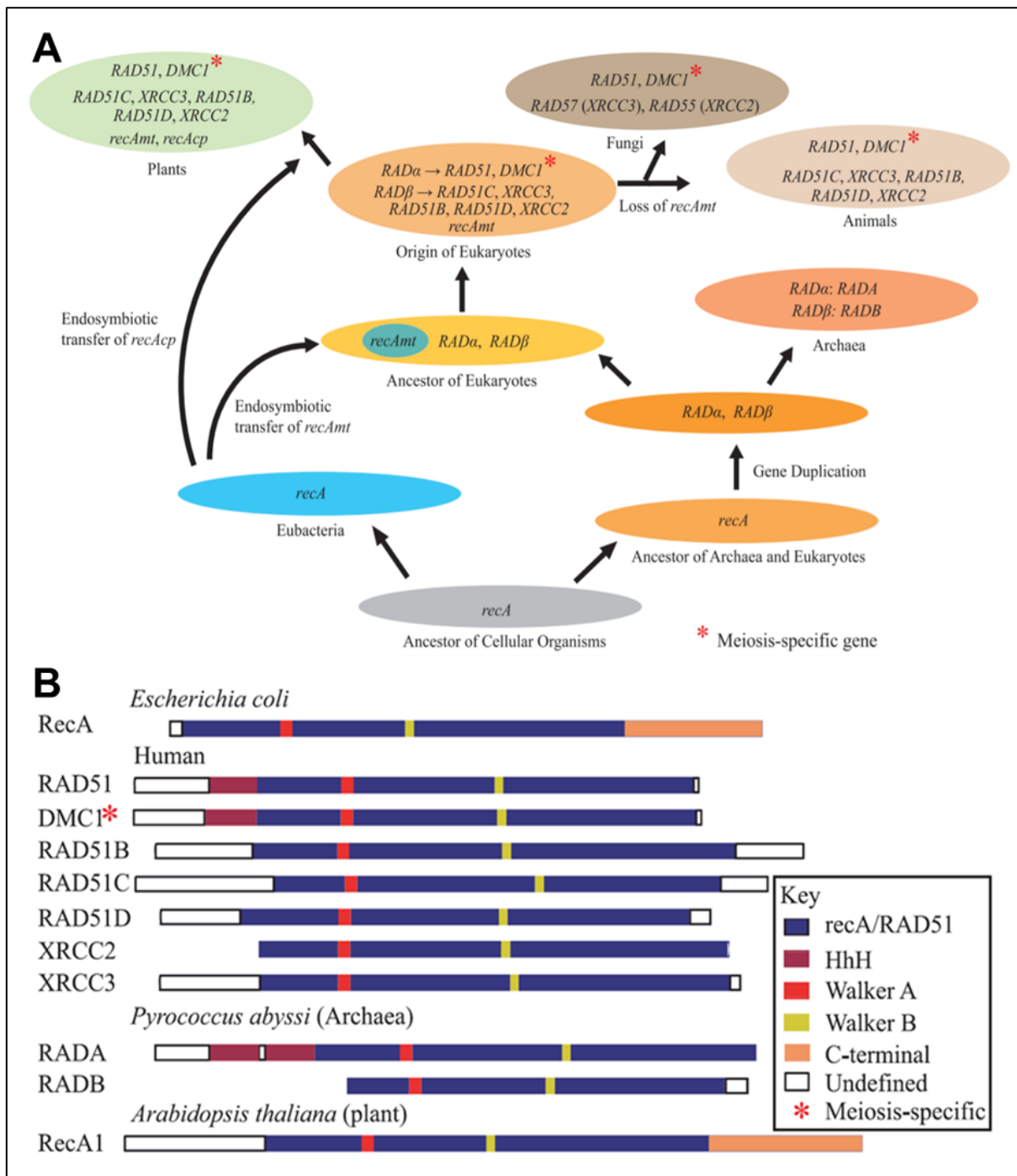


Figure 13 – Evolution de la famille de gènes RecA/Rad51

(A) Au départ il y a eu duplication des gènes avant la divergence des archaebactéries et des eucaryotes. Dans ces 2 règnes, le gène RecA a donné naissance aux gènes RAD α et RAD β . Chez les eubactéries, le gène RecA est resté un gène à copie unique. Chez les eucaryotes, les gènes RAD α et RAD β ont tous deux connu plusieurs événements de duplication formant de nombreux gènes de la famille RAD51. Chez les archaées, les gènes RAD α et RAD β sont restés comme des gènes à copie unique. Les gènes RecA retrouvés chez certains eucaryotes proviennent de deux événements endosymbiotiques de protéobactéries (recAmt) et cyanobactéries (recAcp). Les gènes recAmts ont ensuite été perdus chez les ancêtres des animaux et des champignons (D'après [170]). (B) Schéma des domaines (noms indiqués) des protéines représentatives de la famille RecA/Rad51, dessiné à l'échelle. Mise en évidence de région conservée entre les homologues et paralogues de RAD51 (D'après [170]).

La conservation phylogénétique n'a pourtant pas empêché une diversification au sein des espèces eucaryotes des protéines issues de RAD51 (**Figure 13A et Tableau 1**) [170]. On retrouve chez l'homme 6 protéines dérivant de la recombinaison RAD51, dues à la duplication génétique : Disrupted Meiotic cDNA 1 (DMC1), RAD51B, RAD51C, RAD51D, X-ray Repair Cross Complementing 2 et 3 (XRCC2 et 3). Ces paralogues ont été découverts par clonage complémentaire (XRCC3/2) ou par analyse de bases de données par similarité (RAD51B/C/D) [170]. Ils possèdent tous un rôle collaboratif avec RAD51. Par exemple, RAD51C participe à la formation des foyers de réparation de RAD51 et à la résolution des jonctions de Holliday. RAD51B forme un hétérodimère stable avec RAD51C pour ensuite interagir avec d'autres membres de la famille RAD51. RAD51D s'associe avec XRCC2 pour stimuler également la résolution des jonctions de Holliday [173]. Enfin, XRCC3 s'associe à RAD51C pour agir en aval du recrutement de RAD51. Le complexe se lie principalement à l'intersection des quatre bras de la jonction de Holliday et aux jonctions des fourches de réplication. Il joue également un rôle dans la régulation du nombre de copies d'ADN mitochondrial dans des conditions de stress oxydatif en présence de RAD51. Malgré une origine commune, seule RAD51 conserve une activité recombinaison homologue à celle de RecA. DMC1 possède également une activité recombinaison mais restreinte au mécanisme de la méiose [170].

Comparaison Séquences Protéiques Espèces		% Identité
H.sapiens – RAD51	E.coli – RecA	25,20%
	P.furiosus – RADA	49,66%
	S.cerevisiae – RAD51	66,57%
	R.norvegicus – RAD51	99,41%
	B.taurus – RAD51	99,41%
	C.lupus – RAD51	99,12%
	M.musculus – RAD51	98,82%
	G.gallus – RAD51	95,58%
	X.laevi – RAD51	95,28%
	H.sapiens – RAD51B	27,51%
	H.sapiens – RAD51C	28,31%
	H.sapiens – RAD51D	26,07%
	H.sapiens – XRCC2	28,12%
	H.sapiens – XRCC3	24,77%
	H.sapiens – DMC1	53,99%

Tableau 1 – Résultats du pourcentage d'identité entre différentes séquences protéiques de RAD51, ses homologues et paralogues

Le pourcentage d'identité suite à l'alignement des séquences protéiques des homologues de RAD51 montre bien une conservation de la séquence au cours de l'évolution dans les différents règnes du vivant (RecA et RadA). Une conservation très importante de la séquence de RAD51 est également présente au sein de différentes espèces eucaryotes, et entre les différents paralogues dérivés (Thèse T.Chabot, 2020).

b. Structure & domaines

La conservation des séquences induit la conservation de certains domaines protéiques chez les différents homologues de RAD51 au cours de l'évolution (**Figure 13B**) [170]. Il existe également 4 isoformes de la protéine RAD51, différent par des délétions de séquences partielles (isoforme 2 : délétion 77-173), des délétions de séquence exonique entière (isoforme 3 : délétion exon 9) ou la modification de séquence (isoforme 3 et 4). Si les isoformes 2 et 4 n'ont pas encore montré d'activité biologique, l'isoforme 3 de 31kDa est localisée dans le noyau et promeut l'activité d'échange de brin de manière plus efficace que l'isoforme 1 étudiée dans cette thèse [174].

La protéine RAD51 est divisée en 2 domaines distincts reliés par un linker permettant leur rotation l'un par rapport à l'autre [175]. Le premier est le domaine N-terminal. Il permet l'enroulement de la protéine RAD51 autour de l'ADN, pour former le nucléofilament et assurer sa stabilisation. Il est relié par un linker qui permet l'auto-association des protéines RAD51 via le domaine de polymérisation entre les acides aminés 85 à 91 (**Figure 14**) [176]. L'ensemble est relié au « Core Domain » ou domaine C-terminal. Ce dernier permet les activités intrinsèques de RAD51 (**Figure 14**). Il comporte notamment 2 séquences formant 2 boucles : L1 (**232-YSGRGEL-238**) et L2 (**269-VVAQVDGAAMFAADPKKPI-287**) qui sont impliquées dans la liaison à l'ADN simple brin (**Figure 14**) [177]. Récemment, l'équipe du professeur Iwasaki a mis en évidence que ces boucles possédaient une fonction distincte lors de l'échange de brin. En effet, cette équipe a démontré que cette activité se divise en plusieurs événements intermédiaires appelés C1 et C2 [178]. L'événement C1 correspond à l'envahissement de RAD51 et de l'ADNsb sur la séquence homologue d'ADNdb avant l'échange de brin. L'événement C2 correspond encore une fois à l'association ADNsb-ADNdb, mais cette fois ci, après que l'échange de brin soit réalisé. La boucle L1 est impliquée dans la formation du complexe C1 alors que L2 sert de médiateur pour la transition C1-C2, produisant l'hétéroduplex ADNsb-ADNdb [179].

Ces boucles ont pour la première fois été découvertes chez RecA d'E.coli [180]. Leur variabilité entre le règne procaryote explique la différence d'affinité pour l'ADN simple brin entre RecA et RAD51. On retrouve également un motif HhH sur l'extrémité N-terminale servant à une stabilisation par fixation à l'ADN mais de manière non spécifique. Il possède également la séquence d'export nucléaire (NES) (**245-LARFLRMLLRLADEF-260**) (**Figure 14**) qui permet à RAD51 de sortir du noyau. Cette séquence est masquée par BRCA2 lors de la translocation nucléaire du complexe RAD51-BRCA2 [181]–[183]. Enfin, ce Core Domain possède le site d'interaction de RAD51 avec l'ATP ou motif de Walker. Ce motif est divisé en 2 parties : Walker A et B qui ensemble, lors du repliement protéique, forment la poche ATP de RAD51 (**Figure 14**) [184].

Par comparaison à la protéine RecA, le motif Walker A de RAD51 est un motif protéique de liaison aux groupements phosphates de l'ATP (**127-GEFRTGKT-134**) [185]. On le retrouve dans de nombreuses protéines utilisant l'ATP et le GTP. Dans notre cas, le phosphate β et γ de l'ATP se lie au phosphate du nucléotide et à la lysine K133 du motif de Walker A [180]. Le motif de Walker B (**218-LLIVD-222**) est situé en aval du motif de Walker A. Le seul trait conservé qui le caractérise est la présence d'un résidu chargé négativement à la suite d'une séquence de résidus hydrophobes. En effet, dans le motif de Walker B, l'aspartate D222 établit une liaison covalente de coordination avec le cation Mg^{2+} . Il permet l'hydrolyse de l'ATP et la stabilisation par liaison hydrogène au motif Walker A [186]. Ces motifs forment une poche et assurent la fixation et l'utilisation de l'ATP par RAD51 lors de sa fixation à l'ADN [184], [187]. En présence d'ATP, la protéine est sous forme « contractée », elle sera relâchée à son départ [188].

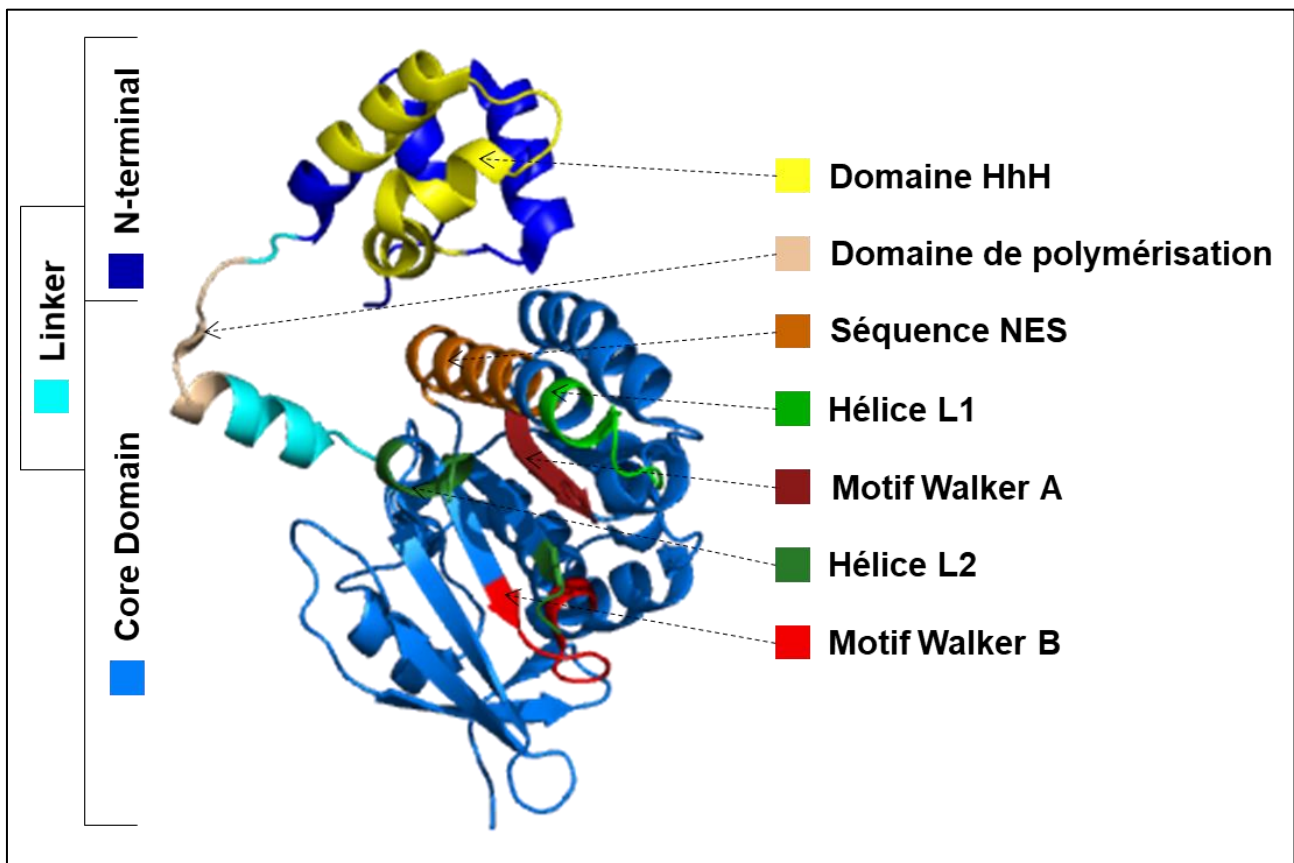


Figure 14 – Structure et domaines composant la protéine RAD51

En utilisant le logiciel PyMOL et avec la structure nucléofilamentaire de RAD51 5NP7 (Brouwer et al., 2018), un monomère de la protéine RAD51 est ici représenté avec ses différents domaines (Thèse T.Chabot, 2020).

c. RAD51 : la protéine clé de la réparation par Recombinaison Homologue

Préalablement à l'activité de RAD51, le site de cassure est modifié par une résection des extrémités 3' pour former une matrice d'ADN simple brin [132], [135]. La première étape de l'échange de brin est dite présynaptique. Elle correspond à l'envahissement de l'ADN simple brin néoformé par les protéines RAD51 [153] et à la formation du nucléofilament de RAD51 autour de l'ADN de façon ATP dépendante [155], [187]. La seconde étape ou étape synaptique correspond à la recherche de la séquence homologue par le nucléofilament. Une fois trouvée, RAD51 catalyse l'échange de brins [157]. L'ADN simple brin s'associe à la séquence complémentaire présente sur la chromatide sœur. L'ADN de la séquence homologue se retrouve au niveau du site de cassure. Cet échange de brin entraîne la formation de jonctions de Holliday. Durant la troisième étape, ou étape post-synaptique, la structure formée assure la réparation conforme grâce à la complémentarité des bases. L'ADN est néopolymérisé à partir du brin matrice apporté par la chromatide sœur sur le site de cassure. Pour terminer, l'hydrolyse de l'ATP permet à RAD51 de quitter l'ADN [187]. La résolution des jonctions de Holliday se fait par des hélicases et des nucléases [158]. L'activité de RAD51 dépend de nombreuses interactions avec des cations bivalents, de l'ATP, de l'ADP, de l'ADN simple et double-brin et des autres monomères de RAD51.

i. L'interaction monomère-monomère et la formation du nucléofilament

Dans des expériences réalisées *in vitro*, la protéine RAD51 est présente à différents degrés de polymérisation [183], [189]. En effet, elle est capable de s'associer pour former le nucléofilament sur un substrat d'ADN simple ou double-brin avec une affinité relativement faible ($10^{-6}M$) [190], [191]. Les structures obtenues *in vitro* pour RAD51 montrent une organisation en anneau de six à huit monomères [192], [193], chacun recouvrant environ 3 nucléotides de l'ADNsb. Cette association est permise grâce à l'existence d'une séquence de polymérisation du domaine N-terminal entre les acides aminés 85 à 91 [176] présente à l'interface monomère-monomère. Toutes perturbations dans cette région entraînent des modulations de la formation du nucléofilament et par conséquent de l'activité recombinase. Ainsi, les mutations A89E, F86E, A190/192L, SAM208/210LEA [176], [183], [194]–[196] ou l'utilisation d'interférents peptidiques issus des motifs BRC de BRCA2 (motifs BRC3 et BRC4) [195]–[197] empêchent l'auto-association de RAD51 et donc à une inhibition de son activité d'échange de brin.

ii. La formation d'un nucléofilament actif : chorégraphie entre RAD51, l'ADN simple brin et l'ATP

Il y a deux étapes essentielles dans la formation du nucléofilament. Pour commencer, la fixation d'un « noyau » de RAD51 sur l'ADN, on parle de nucléation. Durant cette étape, différents oligomères composés de 4 à 5 monomères se fixent à l'ADN simple brin [198], [199].

Une extension du nucléofilament se produit avec l'ajout progressif de RAD51 sur les « noyaux » de RAD51 qui servent de plateforme à l'ajout d'autres oligomères. Ce phénomène dynamique est caractérisé par l'association et la dissociation de RAD51 [200], [201]. Il existe donc de multiples points de nucléation avec une stabilité hétérogène qui est corrélée au niveau de polymérisation : plus le nucléofilament est long, plus il est stable [189]. A la fin de l'étape d'extension, l'ADN simple brin est presque entièrement recouvert par le nucléofilament de RAD51 [199], [200]. La structure du nucléofilament de RAD51 est une hélice dextrogyre où chaque tour est formé de 6 protéines recouvrant environ 18 bases. Nous pouvons en déduire qu'un monomère de RAD51 recouvre environ 3 bases (2,5 à 5 bases) [202], [203].

iii. Reconnaissance, fixation à l'ADN homologue et échange de brins

Il est admis que l'association de l'ADN simple brin et du nucléofilament de RAD51 stable est à la base du mécanisme d'échange de brin. Une fois formé, le complexe fixe l'ADN double-brin pour devenir l'hétéroduplexe RAD51-ADNsb-ADNdb, dont l'organisation exacte est peu décrite [204]. Les résultats obtenus dans la compréhension de ce mécanisme sont en partie inspirés de ceux obtenus avec la protéine RecA [168], [205]. L'hypothèse la plus couramment admise est celle d'une fixation de forte affinité à l'ADN simple brin et une fixation d'une affinité beaucoup moindre pour l'ADN double-brin de RAD51 [206]. Ceci permettrait de « scanner » plusieurs séquences d'ADN jusqu'à trouver celle homologue à l'ADN simple brin [207]. Le processus de recherche au cours duquel différents ADN double-brin sont mis en contact avec le nucléofilament serait apparemment aléatoire [168], [208]. Le mécanisme de reconnaissance est sans doute l'étape la moins connue du fonctionnement de RAD51 [209]. Il ne concernerait pas uniquement une séquence nucléotidique mais il utiliserait également la structure tridimensionnelle de l'ADN. En effet, RAD51 est capable de supporter un certain nombre de différences entre les séquences homologues. En revanche, elles ne doivent pas être trop importantes et ne peuvent pas dépasser plus de 4 mésappariements sous risque d'avoir une recombinaison quasi-nulle [210]. Enfin, la dissociation du nucléofilament et le départ de RAD51 de l'ADN est marqué par l'hydrolyse de l'ATP. En effet, il a été montré que si l'ATP n'est pas hydrolysé, notamment par utilisation d'analogues non-hydrolysables ou du mutant K133R déficient pour l'hydrolyse de l'ATP, une stabilisation du nucléofilament et une mauvaise réparation sont observées [167].

d. Une activité finement régulée

i. Une activité finement régulée par des partenaires protéiques

L'activité de toute protéine dépend notamment de ses interactions avec différents partenaires ou substrats. Au cours de la RH, la protéine RAD51 ne fait pas exception avec plusieurs interactions protéiques essentielles à la bonne marche de la réparation des CDB. Parmi tous les partenaires permettant de nucléer, d'allonger et de stabiliser le filament de RAD51, le plus essentiel à l'activité de la recombinaison est sans doute la protéine BRCA2.

En effet, chez les mammifères la formation du nucléofilament de RAD51 sur l'ADNsb néoformé suite à la CDB est médié par l'action de chargement de la protéine BRCA2. Cette fonction est réalisée chez d'autres eucaryotes, comme la levure, par la protéine RAD52 [211]. Cette interaction est permise grâce aux motifs de répétitions BRC, qui imitent l'interface d'oligomérisation de RAD51 et grâce au domaine C-terminal de la protéine BRCA2 [211], [212]. Il permet le chargement de RAD51 sur l'ADNsb par la libération d'environ 4 monomères de protéines RAD51 par la protéine BRCA2 [211], [213]. D'autres médiateurs de l'activité de RAD51, y compris ses paralogues, peuvent coopérer avec la protéine BRCA2 pour promouvoir et stabiliser la formation du nucléofilament de RAD51 [213], [214].

En plus de BRCA2, d'autres médiateurs de la recombinaise RAD51 existent. Parmi eux, on retrouve ses paralogues (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3). Une fois le nucléofilament de RAD51 formé, ils aident dans la stabilisation et à l'allongement du filament afin de faciliter la recherche d'homologie. Cependant, la fonction précise de chaque paragoue reste méconnue. A cette liste de régulateurs s'ajoute les protéines RAD54A et RAD54B qui sont définis comme des remodeleurs de la structure chromatinienne favorisant l'activité d'échange de brins [215], [216]. En miroir de ces régulateurs positifs, des régulateurs négatifs aident au désassemblage des nucléofilament de RAD51. Parmi eux, la protéine F-Box DNA Helicase 1 (FBH1) et la protéine RecQ Like Helicase 5 (RECQL5) dissocient RAD51 de l'ADNdb. Leurs rôles sont essentiels car ils limitent l'activité de RAD51 aux sites de recombinaison légitimes [216], [217].

ii. Une activité finement régulée par des modifications post-traductionnelles

L'activité de RAD51, comme pour de nombreuses protéines, est également régulée par des MPT. Plusieurs MPT de RAD51 ont déjà été découvertes comme l'ubiquitinylation et la phosphorylation. Pour la première, il a été montré que la protéine Ring Finger and WD repeat domain 3 (RFWD3) déclenche la polyubiquitinylation de RAD51 et de RPA pour conduire à leur dégradation par le protéasome [218]. Cette ubiquitinylation et dégradation n'intervient pas lors des étapes précoces de la RH mais est essentielle pour la progression vers les phases tardives comme lors du départ de RAD51 de l'ADN. Le complexe protéique Skp culin F-box containing complex F-box DNA helicase 1 (SCF(FBH1)) E3 ubiquitin ligase réalise également l'ubiquitinylation de RAD51 pour réguler sa localisation subcellulaire et prévenir l'association avec l'ADN [219]. Dans un modèle de cancer du poumon, l'ubiquitinylation de RAD51 réduit fortement son interaction avec BRCA2. En revanche, à la suite de dommages à l'ADN, la désubiquitinylation Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase enzyme L3 (UCHL3) est activée par phosphorylation par ATM. Elle « désubiquitinylise » alors RAD51 pour favoriser son interaction avec BRCA2 et aider à lutter contre les CDB [220].

L'autre MPT fortement présente dans la signalisation cellulaire et régulant l'activité de RAD51 est la phosphorylation. Actuellement, plusieurs sites de phosphorylation de RAD51 ont été identifiés. Il s'agit de phosphorylations présentes tant au niveau de sérines et de thréonines que de tyrosines. Pour commencer, la phosphorylation de RAD51 en thréonine T309 par la sérine/thréonine kinase CHK1 (**Figure 15**) [221] est essentielle à la résistance aux dommages à l'ADN. En effet, elle permet la mise en place des foyers de réparation nucléaire de RAD51 suite à des CDB.

Une double phosphorylation séquentielle a également été mise en évidence. Elle est assurée par deux sérine/thréonine kinases : Polo-kinase 1 (PLK1) et Casein Kinase 2 (CK2). L'équipe de Esashi a montré que la phosphorylation de RAD51 en sérine S14 par CK2 était suivie d'une phosphorylation de RAD51 en thréonine T13 par PLK1 (**Figure 15**) [222] pour jouer un rôle dans le recrutement de la protéine recombinaise sur les sites de réparation.

D'autres sites de phosphorylations de RAD51 ont été identifiés sur les tyrosines Y54 et Y315 par c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) ou ABL1 (**Figure 15**). La première, en Y54, joue un rôle dans l'échange de brin en inhibant l'activité de la protéine RAD51 [223]. Notre équipe a démontré que ces 2 phosphorylations coexistaient, et plus particulièrement que celle présente en Y54 était dépendante de la phosphorylation en Y315 suite à sa reconnaissance par le domaine Src-homology 2 (SH2) de la protéine kinase dans des conditions *in cellulo*. Une double phosphorylation séquentielle de RAD51 est donc médiée par c-Abl [224], [225]. Notons qu'il a été montré que la tyrosine Y188 de RAD51 de xénope pouvait également être phosphorylée par c-Abl (**Figure 15**) [226], [227], il se trouve qu'elle correspond à la tyrosine Y191 de la protéine RAD51 humaine que nous étudions.

Il est également important de faire la comparaison des sites de MPT entre les espèces. En effet, une phosphorylation par la kinase MEC1 est observée dans la protéine RAD51 de la levure en sérine S192 (**Figure 15**) [228] qui est homologue à la thréonine T134 de RAD51 humaine. Or, chez l'homme, aucune phosphorylation sur cette thréonine n'a encore été montrée. La conservation des sites de phosphorylation révèle leur importance au cours de la pression de sélection que subit le vivant. Leur étude en parallèle chez de nombreuses espèces et entre différentes lignées ou modèles est donc indispensable.

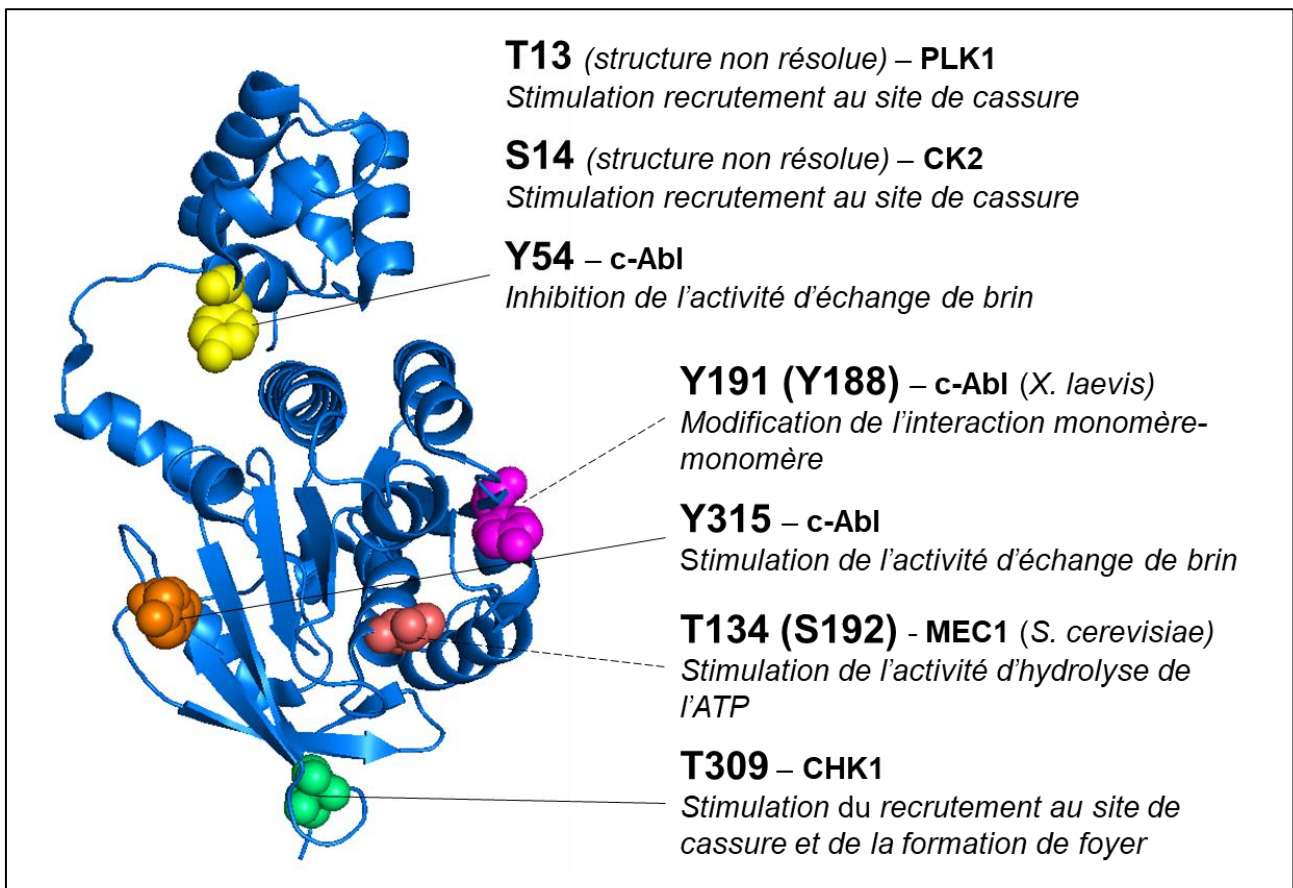


Figure 15 – Positionnement des différents sites de phosphorylation connus de RAD51

En utilisant le logiciel PyMOL et avec la structure nucléofilamentaire de RAD51 5NP7 (Brouwer et al., 2018), un monomère de la protéine RAD51 est ici représenté avec les différents sites de phosphorylation connus de RAD51, leurs conséquences, les kinases impliquées, le cas échéant l'organisme étudié s'il ne s'agit pas de la protéine RAD51 humaine (Thèse T.Chabot, 2020).

Dans cette thèse, nous mettons en évidence la phosphorylation de RAD51 dans les conditions *in vitro* par le récepteur kinase c-Met sur 4 sites distincts : les tyrosines Y159, Y191, Y205 et Y315. Ces phosphorylations par c-Met modulent de manière positive l'activité de RAD51 et notamment la stabilité du nucléofilament [229].

e. Rad51 et pathologies

i. Pathologies humaines associées à une modification du gène *rad51*

Le gène *RAD51* présent sur le chromosome 15 est une des cibles responsables d'une maladie rare : les mouvements en miroir familiaux congénitaux (MRMV2). Cette maladie neurologique génétique à transmission tantôt dominante, tantôt récessive se caractérise par l'apparition précoce de mouvements involontaires controlatéraux, qui reflètent les mouvements volontaires produits du côté opposé. Une sous expression de *RAD51* chez les patients MRMV2 est observée [230].

Une mutation du gène codant *RAD51* est également impliquée dans l'anémie de Fanconi. Ce trouble affecte tous les éléments cellulaires de la moelle osseuse et entraîne une anémie, une leucopénie et une thrombopénie. Il est associé à des malformations cardiaques, rénales et

des membres supérieurs et inférieurs. On identifie aussi des modifications pigmentaires du derme et une prédisposition au développement de tumeurs malignes. Au niveau cellulaire, la mutation du gène *RAD51* dans l'anémie de Fanconi est associée à une hypersensibilité aux agents endommageant l'ADN, à une instabilité chromosomique due à une réparation défectueuse de l'ADN. La première mutation de *RAD51* étudiée provoque une diminution de la fixation à l'ADN. Le changement de la thréonine T131 en proline située à l'interface du site ATPase [231], [232] est à l'origine de cette perte d'activité. Dans la seconde mutation mise en évidence, l'alanine A293 est changée en thréonine située également à l'interface du site ATPase et à l'interface monomère-monomère [232]. Elle empêche la formation du nucléofilament et la fixation à l'ADN.

ii. Rad51 et cancers

L'expression de *RAD51* doit donc être finement régulée car son abolition n'est pas viable. En effet, la construction d'un modèle de souris *Knock-Out* (KO) pour le gène *RAD51* conduit à une létalité embryonnaire précoce [233]. Cependant, le lien direct entre un niveau faible de *RAD51* et la formation de cancer n'a pas encore été démontré. Pourtant, la mutation inhibitrice G135C de *RAD51* semble être un facteur de risque dans la survenue de certains cancers comme le cancer colorectal [234], ou le cancer du sein dans le cadre d'une mutation de *BRCA2* [235], [236].

A l'inverse, une activité incontrôlée de l'expression de la recombinaison peut être cancérogène. En effet, la surexpression de *RAD51* a été observée dans de nombreux types de cancers. En se basant sur la létalité des CDB, il a été rapide d'émettre l'hypothèse que la surexpression d'une protéine réparatrice de l'ADN était liée aux phénomènes de résistance des cellules cancéreuses aux traitements de radio et chimiothérapies. De nombreux éléments sont venus étayer cette thèse [237]–[241].

Actuellement, près de 300 mutations possibles (tout type confondu) ont été montrées sur le gène codant pour *RAD51* (*COSMIC – Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*). L'analyse du génome de patients cancéreux a révélé que certaines de ces mutations entraînent une surexpression ou une sous expression de la recombinaison, et ont des conséquences fonctionnelles sur l'activité de la protéine. Parmi elles, la modification des résidus adjacents D149, R150 et G151 ont été identifiés dans le cancer du sein bilatéral [242], [243]. Pour commencer, les mutations R150Q et G151D induisent une diminution de l'affinité pour l'ATP et de l'activité ATPasique de la protéine *RAD51* [243], [244] alors que ces trois acides aminés sont localisés à une position distincte des sites de liaison à l'ADN ou de l'interface ATPase [242]. Cette région est intéressante car elle a été décrite comme permettant l'interaction avec la protéine gardienne du génome p53 [245], [246]. Ainsi, les mutations induites sur *RAD51* peuvent non seulement modifier la stabilité du nucléofilament mais également affecter les interactions avec d'autres partenaires protéiques.

C'est le cas des mutations F86L et E258A qui modifient l'interface du monomère de RAD51 en interaction avec son partenaire BRCA2 [247]. Associées encore une fois au cancer du sein, elles sont en effet situées dans l'interface de polymérisation de RAD51, comme développé précédemment. Enfin, les mutations Q268P et Q272L, trouvées dans les tumeurs rénales et pulmonaires, sont présentes dans la boucle de liaison à l'ADN de la protéine RAD51, essentielle à l'activité d'échange de brins [248]. Ces deux mutations modifient la stabilité thermique, la liaison à l'ADN et les propriétés de l'ATPase de RAD51. Ces variants conservent néanmoins une activité d'échange de brins d'ADN qui est fortement réduite.

Toutes ces données font de RAD51 un élément clé du mécanisme de réparation des CDB par RH, un élément central dans la suractivation de ce mécanisme dans certaines cellules cancéreuses et donc une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre le cancer. Une meilleure compréhension de son activité dans un contexte tumoral permettrait de mieux comprendre les mécanismes de sur-réparation de l'ADN pro-tumoral.

Chapitre 3 - Les protéines kinases & la réparation des cassures

double-brin

Il est intéressant de noter que l'ensemble de la signalisation mise en place par les cellules du vivant est en grande partie basée sur une série d'interactions et de phosphorylations en cascade de protéines à activité kinase (histidine, sérine, thréonine, tyrosine). La phosphorylation la plus fréquente est la O-phosphorylation sur le groupement hydroxyle d'un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. En modulant les voies de signalisation, elle joue un rôle majeur dans la régulation de la vie de la cellule. En 2012, une étude a suggéré que quasiment toutes les protéines humaines seraient phosphorylées sur un ou plusieurs résidus, estimant ainsi à près de 150.000 le nombre de sites de phosphorylation potentiel dans le protéome humain [249]. Plus récemment, une méta analyse a permis d'identifier 54.148 phosphoprotéines avec 483.001 sites de phosphorylation potentiels [250]. Actuellement, l'étude du « kinome » humain est un enjeu majeur de la recherche afin de comprendre les liens entre les molécules du vivant. Les kinases permettant ces MPT jouent un rôle clé dans la physiologie cellulaire. On répertorie environ 518 gènes codant pour des protéines kinases soit 2% du génome [251]. Parmi ces dernières, de nombreuses sont étudiées pour leur implication dans la progression ou la survie tumorale (EGFR, IGF1R, c-Met, c-Abl,...). Elles jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire parmi de nombreuses autres fonctions biologiques. Leurs mutations, leurs dérégulations peuvent entraîner des dysfonctionnements cellulaires [144] souvent présents et exacerbés dans les processus tumoraux. Une question se pose donc : d'où vient le signal de départ de ces différentes voies? Dans la majorité des cas, il semble provenir de l'extérieur de la cellule où il est reçu par des récepteurs membranaires qui déclenchent les voies cellulaires adéquates. Parmi eux, les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des initiateurs et des modulateurs intéressants des voies de signalisation activés chez l'homme. Leurs implications dans la survie cellulaire suite à l'irradiation sont d'ailleurs déjà en partie connues. De plus, leur surexpression et leur suractivation entraînent souvent à une prolifération cellulaire anormale pouvant conduire à un phénotype cancéreux et métastatique des cellules. Tous ces éléments font des RTK d'excellentes cibles dans la compréhension du « langage cellulaire » et dans la lutte contre le cancer.

a. Les protéines kinases dans l'évolution

La protéine kinase « antique », celle à l'origine de toutes, n'a pas encore été mise au jour. Il semblerait qu'il s'agisse plutôt d'un motif de ressemblance Protéine Kinase-Like (PKL) [252] conservé au cours de l'évolution et commun à tous les règnes (archées, bactéries, virus et eucaryotes) agissant comme médiateur de la phosphorylation.

Chez les archées il n'existe que 3 kinases PKL codées par le génome : Bud32, Rio1 et Rio2. Présentes aussi chez les eucaryotes, elles ont des fonctions variées avec les protéines Rio

associées à la traduction et Bud32 associée à p53 et à la régulation génomique. A l'inverse, les bactéries possèdent de nombreuses PKL, comme les histidines kinases. Cependant, il existe des variations importantes en ce qui concerne la présence des PKL entre les espèces qui les rendent spécifiques. Une des familles de PKL bactériennes les plus diversifiées est le groupe des Choline and Aminoglycoside Kinase (CAK), dont certains gènes n'ont pas encore été caractérisés. Il est lui-même subdivisé en 3 familles mieux définies : les homosérines kinases, les fructosamines kinases et les méthylriboses kinases. D'autres kinases sont également retrouvées comme la kinase PI3K, aussi présente chez les eucaryotes.

b. Les familles de protéines kinases

Le rôle principal des protéines kinases est de réaliser le transfert d'un groupement phosphate sur un groupement hydroxyle libre d'une molécule cible, à la suite de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP ($ATP = ADP + \gamma\text{-phosphate } PO_4^{4-}$). L'apparition d'un phosphate supplémentaire chargé négativement au sein de protéines conduit à modifier leur localisation, leur activité ou encore leurs interactions. Ces modifications post-traductionnelles réversibles par l'action de protéines phosphatases, sont à la base des moyens de communication cellulaire par l'activation des voies biologiques. Elles sont de manière générale classées selon leur structure (ou séquence) ou leur localisation cellulaire (cytosolique ou membranaire). La plus connue de ces classifications a été réalisée par Hanks et Hunter dans les années 1990 [253], [254] dans une étude phylogénétique qui a permis la découverte et le classement de nombreuses protéines kinases. Aujourd'hui, quatre groupes de protéines kinases composent le monde du vivant, auxquels s'ajoutent 83 kinases qui ne sont comprises dans aucun système biologique. Ils sont rapidement décrits ci-après.

i. Les histidines kinases

Les histidines kinases autophosphorylent l'un de leur résidu histidine avant de transférer le phosphate sur l'acide aspartique d'une molécule substrat. Il serait donc plus juste de les appeler des Histidine-Aspartate kinase. Elles sont fréquemment présentes chez les bactéries, les archées, les plantes et les eucaryotes inférieurs. Elles se distinguent structurellement des sérines, thréonines et tyrosines kinases. Principalement membranaires, elles permettent la transduction du signal en agissant de manière analogue aux récepteurs à activité tyrosine kinase. L'amélioration et la multiplication du séquençage des génomes d'une grande variété d'organismes eucaryotes, a permis de montrer qu'il existait des enzymes équivalentes chez les eucaryotes supérieurs. D'ailleurs aujourd'hui des preuves directes et sans équivoques montrent l'existence de la phosphorylation de l'histidine protéique chez les mammifères [255]. En effet, la phosphorylation d'histidines par la Nucleoside diphosphate kinase (NDPK) a été montrée pour la modulation de la sous-unité β de certaines protéines G [256], certains canaux potassiques KCa3.1 [257] et le canal calcique Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5 (TRPV5) [258]. Cependant, elle reste peu

étudiée ce qui est principalement dû aux difficultés de l'étudier en raison de son instabilité. Ce n'est que récemment que la synthèse d'analogues stables de la forme phospho-histidine a permis le développement d'anticorps spécifiques [259]. Leur utilisation commence à mettre en lumière le rôle de cette modification post-traductionnelle.

ii. Les sérines, thréonines et tyrosines kinases

1. Les sérines/thréonines kinases

La famille des sérines/thréonines kinases est sans doute la plus importante des familles de protéines kinases avec plus de 250 membres recensés. Elle est présente dans le règne eucaryote et met en jeu deux acides aminés, les sérines et les thréonines au cours du transfert de phosphate. Cette classe de protéines kinases est subdivisée en 6 familles. Trois d'entre elles sont impliquées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, les CDK comme CK2, les PLK comme PLK1 et la famille Aurora comme Aurora A [260]. Elles sont d'ailleurs ciblées pour ralentir la progression du cycle cellulaire dans le cadre des cellules cancéreuses. En effet, le cancer est décrit comme un processus de division cellulaire qui n'est plus contrôlé. D'autres sont impliquées dans des voies de signalisation cellulaire comme la voie de l'AMPc ou la voie des Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK). Dans ce cas, il existe des récepteurs membranaires comme celui au Transforming Growth Factor β (TGF β), ou bien des récepteurs cytosoliques.

2. Les tyrosines kinases

Composées de 90 membres, la famille de protéine tyrosine kinase met en jeu 2 acides aminés tyrosines lors de la catalyse de la phosphorylation. Chez l'homme, ces protéines sont à la base de toutes les signalisations cellulaires importantes à la vie. En effet, elles jouent un rôle essentiel dans la transduction intracellulaire des signaux, ou cascade de signalisation, conduisant notamment à la multiplication et à la différenciation cellulaire. De plus, elles existent sous forme cytosolique soluble comme la protéine c-Abl ou sous forme de récepteur membranaire à activité tyrosine kinase comme l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ou l'Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) (**Figure 16**).

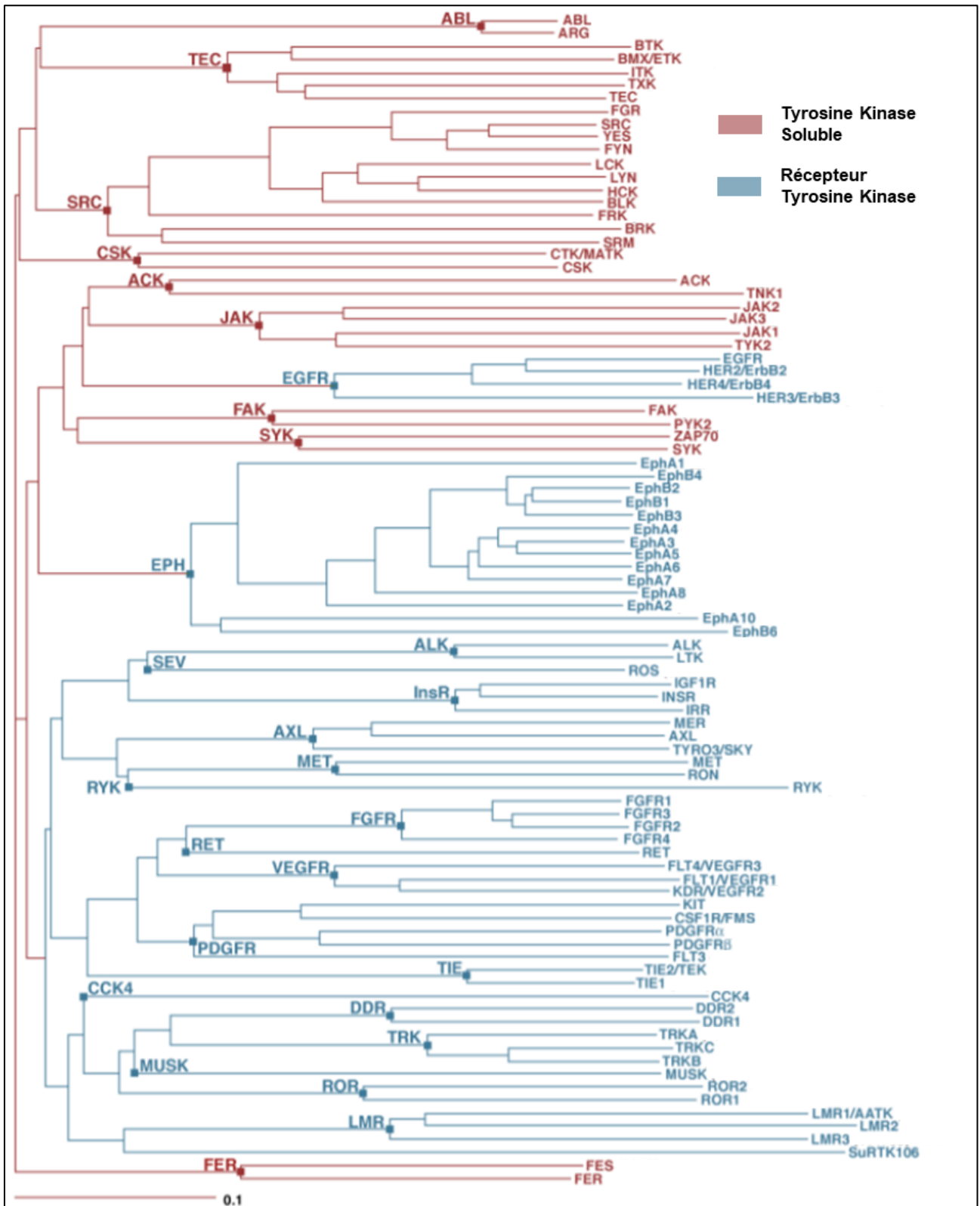


Figure 16 – Arbre phylogénique des tyrosines kinases humaines (Modifié d'après cellsignal.com)

c. Les récepteurs à activité tyrosines kinases

Découverts dans les années 1990 [261], les RTK sont codés par 58 gènes. Les protéines traduites sont divisés en 20 sous-familles classées selon la structure de la partie extracellulaire du récepteur (**Figure 17**). Leur rôle primordial au sein de la cellule est à l'origine de nombreuses voies de signalisation essentielle au développement et à la survie.

i. Structure & domaines

L'ensemble des RTK possède une structure globale assez similaire. Elle prendrait son origine d'un modèle commun Ig-Like RTK [262]. Les RTK sont composés d'une partie extracellulaire spécifique de chacune des familles, permettant l'interaction avec leurs ligands extracellulaires (**Figure 17**). Comme tous les récepteurs cellulaires, ils sont ancrés au niveau de la membrane plasmique via une hélice α transmembranaire, composée d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes traversant l'enveloppe cellulaire et reliant les milieux extracellulaire et intracellulaire. On retrouve entre la partie transmembranaire et le domaine à activité kinase, une partie juxta membranaire intracellulaire servant de point de départ aux différentes voies de signalisation cytoplasmique (**Figure 17**). Les RTK se terminent par une partie intracellulaire au niveau de laquelle est présente l'activité tyrosine kinase du récepteur (**Figure 17**) [263]. Au niveau du domaine à activité tyrosine kinase (TKD) de la partie intracellulaire se déroule l'activité enzymatique de la protéine. L'activité ATPasique permet le transfert du phosphate γ de l'ATP sur les tyrosines des protéines cibles [264]. L'activation par phosphorylation du TKD déclenche l'activation par une cascade de phosphorylation les différentes voies de signalisation (**Figure 18**) [265] (prolifération, survie, transcription, régulation du cycle cellulaire,...). Tous les RTK se terminent par une queue C-terminale, nécessaire à la régulation de la signalisation et à l'inhibition du récepteur. Chaque récepteur existe sous forme monomérique au niveau de la membrane plasmique hormis quelques exceptions comme les récepteurs de la famille Insulin Receptor (INSR) qui sont présents sous forme hétérotétramériques avec 2 fois 2 chaînes alpha et bêta reliées par des ponts disulfures [266], [267].

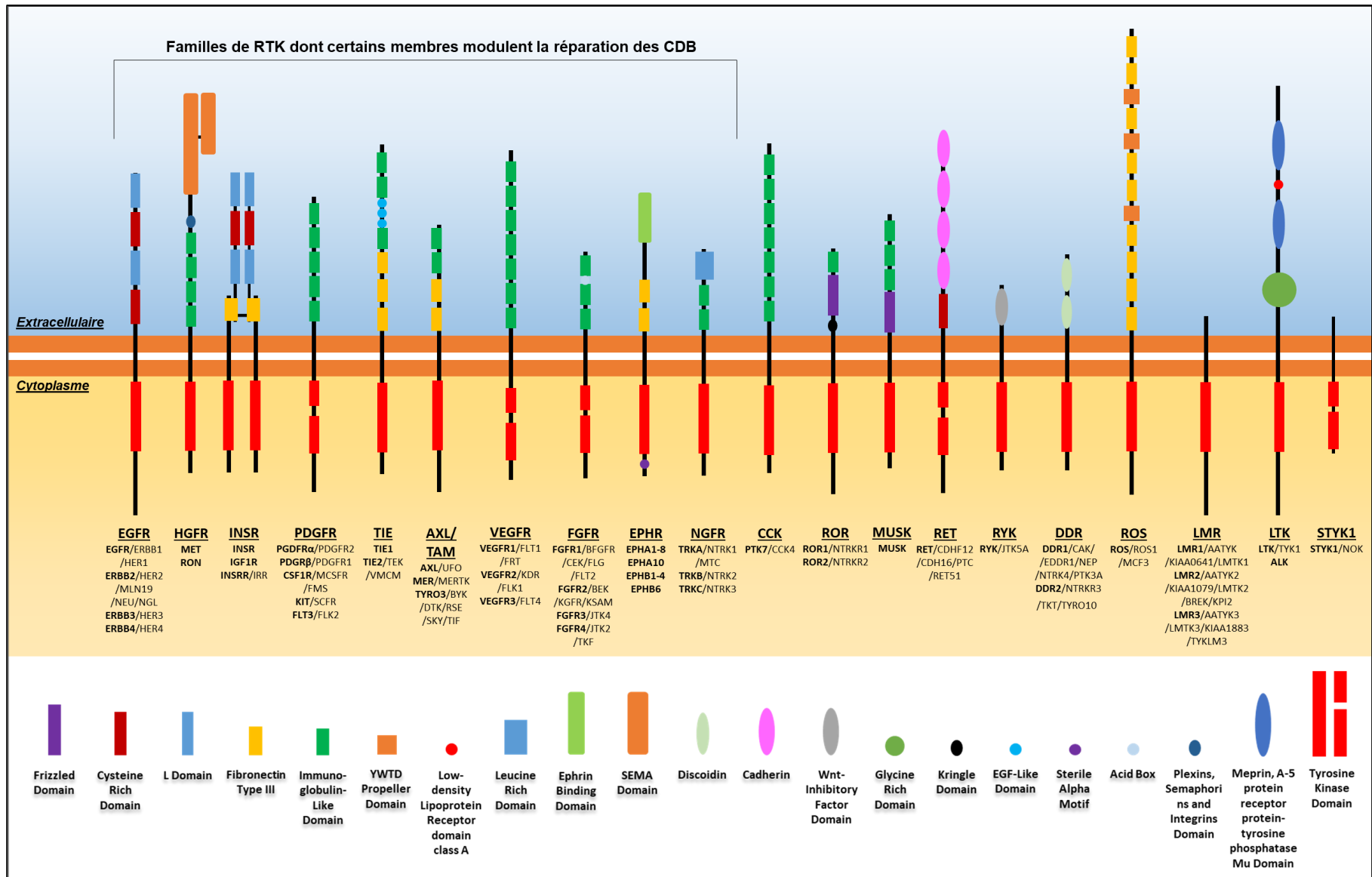


Figure 17 – Les 20 familles de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) & leur structure

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont divisés en 20 familles qui diffèrent principalement de part leur partie extracellulaire (**Modifié d'après Chabot et al., soumise - cf. Annexe 16 et Inspiré par [268]**).

ii. Mécanisme d'activation général

Le mécanisme d'activation des RTK est sensiblement équivalent, même si quelques exceptions existent en ce qui concerne les étapes d'activation ou d'inhibition [268]. Tout d'abord, pour la plupart des RTK, l'interaction de la partie extracellulaire des récepteurs avec son ligand conduit à la dimérisation (homo ou hétéro) du récepteur de manière non-covalente. En effet, il n'y a pas de contact direct entre les monomères, mais une association par l'intermédiaire du ligand [269], [270]. Dans ce cas il s'agit d'une dimérisation médiée par le ligand. Dans d'autres cas particuliers, le ligand se fixe aux monomères pour démasquer des sites qui permettent la dimérisation des deux monomères, comme pour les membres de la famille EGFR [271], on parle alors de dimérisation médiée par les récepteurs. De plus certains récepteurs voient leur dimérisation médiée par un mélange des 2 mécanismes précédemment développés, ou par des facteurs extérieurs comme par exemple le collagène pour les RTK DDR1 et 2. En ce qui concerne la famille InsR, le récepteur dimérique est déjà formé. Son activation est associée à une modification structurale déclenchée par l'interaction avec le ligand [272].

Classiquement, la dimérisation du récepteur RTK par le ligand produit une série de trans-autophosphorylation de la partie intracellulaire au niveau notamment du TKD qui active le récepteur. Il est formé de 2 parties principales, un lobe N comportant une boucle d'activation, l'hélice α C et un lobe C (**Figure 18**) [273]. On retrouve également la queue C-terminale qui occupe le site actif du TKD en conformation inactive et la partie juxta membranaire du récepteur avec des tyrosines phosphorylables qui modulent en interagissant avec la boucle d'activation, la stabilité du TDK sous forme inactive. C'est le cas des récepteurs Fms-Like Tyrosine kinase 3 (FLT3) [274], c-Kit [275] et Muscle-Specific Kinase (MUSK) [276] qui sont ainsi maintenus sous cis-inhibition. Ainsi, l'activation du récepteur se fait suite à sa dimérisation qui permet le changement de conformation de la boucle d'activation et de l'hélice α C du lobe N (**Figure 18**). Une première série de trans-autophosphorylation au niveau des tyrosines de la région juxta membranaire précédemment citées, est alors possible ce qui a pour conséquence de lever la cis-inhibition. Ces phosphorylations qui modifient la conformation de la boucle d'activation et du lobe N ont pour conséquence de libérer le site d'activité du récepteur.

En ce qui concerne le récepteur EGFR, le changement de conformation conduisant à l'activation est dû à l'interaction allostérique entre les TKD des 2 monomères. En effet, suite à la dimérisation, le lobe C du TKD activateur interagit avec le lobe N du TKD receveur et conduit au dégagement du site actif par modification structurale. Ensuite, une deuxième série de phosphorylation intervient sur le TKD et la queue C-terminale pour générer des « phosphotyrosines binding domain » (PTB) qui interagissent avec les protéines adaptatrices des différentes voies de signalisation. Ainsi, on retrouve, par exemple, Growth factor Receptor-

Bound protein 2 (GRB2) capable de se lier par ses domaines SH2 ou PTB. Les TKD peuvent également phosphoryler d'autres protéines impliquées dans les voies de signalisation (GAB1, IRS1,...) [277], [278].

iii. Les voies de signalisation activées

Pour de nombreux RTK, les voies de signalisation débutent par l'interaction du TKD avec une protéine adaptatrice comme GRB2 [279]. Il en découle la modification de la protéine Ras-GDP « inhibée » en Ras-GTP « activée ». Elle est à l'origine des principales voies de signalisation intracellulaire (**Figure 18**) [280], [281]. La première, la voie Ras/Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (RAF), appelée aussi MAPK/Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK), conduit notamment à la différenciation et à la modulation du cycle cellulaire [282]. La voie Phospholipase C, Gamma/Protein kinase C (PLC γ /PKC) interagit directement avec le RTK pour ensuite activer ERK et la voie MAPK précédemment citée (**Figure 18**) [282]. La seconde, la voie Ras/Rac conduit à la réorganisation du cytosquelette (**Figure 18**) [283]. La troisième, la voie Ras/PI3K ou PI3K/AKT est essentielle dans de nombreuses fonctions, comme notamment l'angiogenèse par l'intermédiaire de la protéine Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF1). Elle est aussi impliquée dans la régulation du cycle cellulaire via les protéines Wee1, p21 et Glycogen Syn-thase Kinase 3 β (GSK3 β), le développement et la synthèse protéique via la voie AKT/mTOR. Elle contrôle aussi la survie cellulaire et l'apoptose via les protéines Mouse Double Minute 2 homolog (MDM2), Forkhead Box protein O1 (FOXO1), Bcl-2-Associated Death promoter (BAD) et Nuclear Factor- κ B (NF κ B) (**Figure 18**) [284]–[286]. En parallèle, la voie Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT) interagit directement avec la TKD et conduit à la différenciation cellulaire (**Figure 18**) [287]. Après l'activation de ces voies, un système de rétrocontrôle négatif se met en place par l'interaction de Ras-GTPase activating protein (GAP) avec le RTK via son domaine Src-homology 3 (SH3). Il a pour objectif de rétablir la forme inactive Ras-GDP depuis la forme active Ras-GTP pour stopper les voies précédemment décrites.

Comme nous venons de le dire, les voies MAPK/ERK et PI3K/AKT sont impliquées dans la survie cellulaire dans laquelle le maintien de l'intégrité génomique et la réparation de l'ADN jouent un rôle important. De plus, elles sont souvent suractivées dans un contexte tumoral. Ainsi, l'inhibition de PI3K induit notamment une radio sensibilisation des tumeurs traitées en diminuant les voies de réparation par RH et NHEJ [288], [289]. En effet, la kinase PI3K régule de nombreux mécanismes cellulaires comme la réparation de l'ADN. Elle possède comme substrat clé la protéine AKT [290] qui existe sous 3 isoformes différents (AKT 1, 2, 3) et est impliquée dans la réparation des CDB par irradiation via RH et NHEJ [288], [289]. Il a été montré que les isoformes AKT1 et AKT3 phosphorylent la protéine centrale de la NHEJ en sérine S2056 : DNA-PKcs [291] pour activer la réparation des CDB par NHEJ [292]. Cependant le rôle d'AKT sur la NHEJ reste sujet à controverses car elle peut également

phosphorylée XLF en thréonine T181 conduisant à sa dégradation et à une diminution de la réparation par NHEJ [293]. Ces données opposées montrent donc bien un rôle d'AKT fortement dépendant du contexte où se trouve la cellule, et la complexité de l'étude des kinases impliquées dans de nombreuses voies cellulaires. En ce qui concerne la RH, un *Knock-Down* (KD) d'AKT1 conduit à une diminution du niveau de protéine RAD51. Après irradiation, sa colocalisation réduite au niveau des foyers γ H2AX conduit à une réparation par RH infructueuse observée par une augmentation des foyers BRCA1 [294]. Au même titre que la NHEJ, le rôle d'AKT1 sur la RH est à moduler. En effet, à l'inverse des résultats précédents, une surexpression d'AKT ne conduit pas à une meilleure réparation par RH mais à son inhibition en induisant la séquestration des protéines BRCA1 et RAD51 [295]. Encore une fois, ces données opposées montrent donc bien un rôle d'AKT fortement dépendant du contexte dans lequel se trouve la cellule. Notons également que si un KD d'AKT1 conduit à une diminution du niveau de protéine RAD51, AKT1 permet également de jouer un rôle de garde-fou de la RH dans des conditions physiologiques [296]. Une diminution de protéine RAD51 est également observée suite à l'inhibition de PI3K [286].

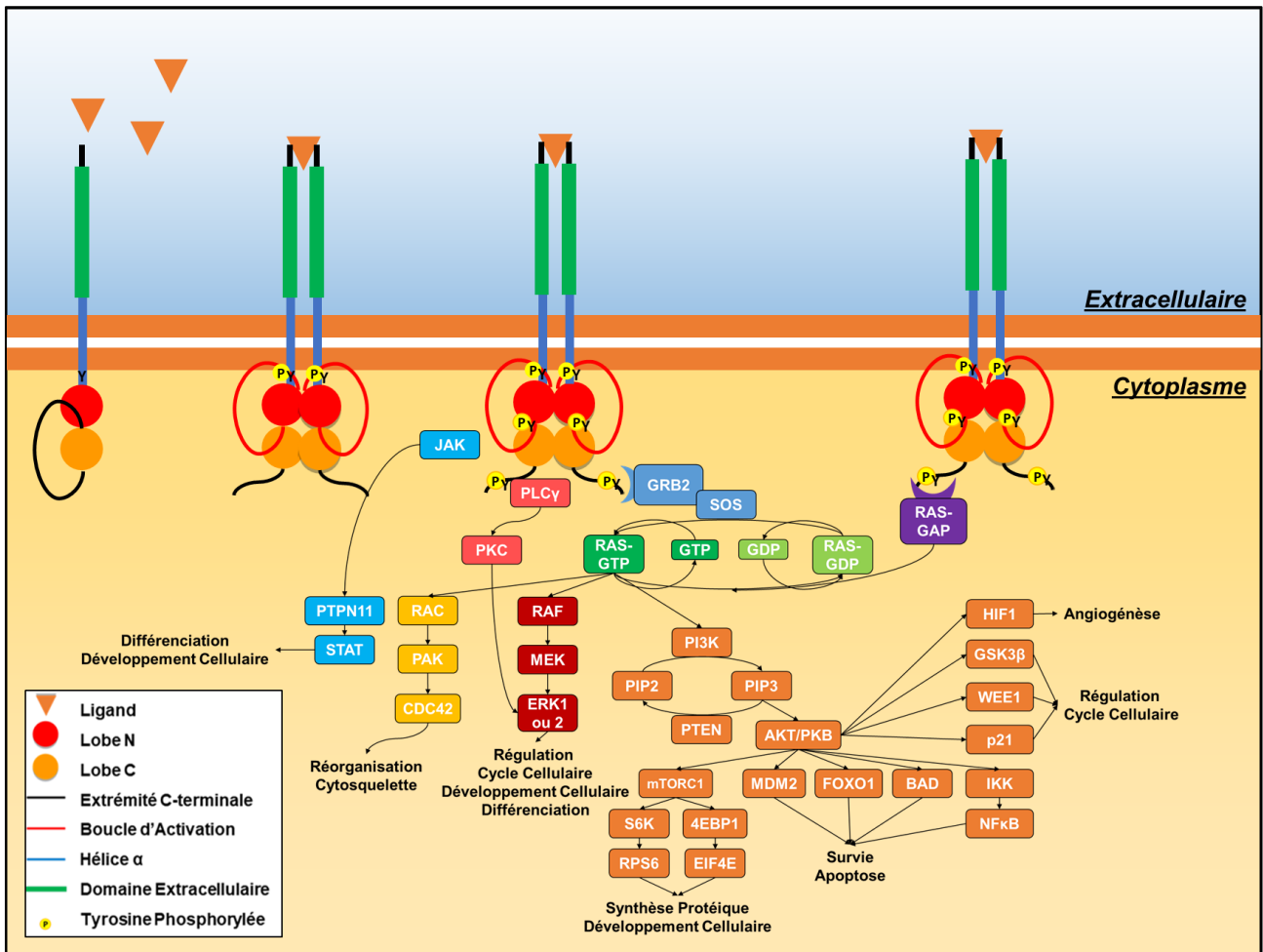


Figure 18 – Activation & signalisation intracellulaire des RTK

Une fois activés par une succession de phosphorylation, les RTK enclenchent de nombreuses voies de signalisation essentielles au développement cellulaire (**Modifié d'après Chabot et al., soumise - cf. Annexe 16**).

Chaque RTK est également spécialisé dans la phosphorylation d'autres acteurs extérieurs aux voies de signalisation « classiques ». Par exemple, IGF1R phosphoryle la protéine substrat Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) sans intermédiaires. La signalisation activée est également dépendante du ligand fixé et de la dimérisation mise en jeu. En effet, l'interaction d'EGFR avec plusieurs ligands (EGF, TGF α ou autres...) peut induire l'activation de différentes voies de signalisation [297], [298]. Ces cross-talk existent également pour de nombreux récepteurs au sein d'une même famille de RTK. Comme dans la famille des Human Epidermal growth factor Receptor (ErbB ou HER), une interaction de ErbB2 est possible avec ErbB1 [299], ErbB4 [300], ou ErbB3 [301] ; mais aussi entre les autres familles de RTK, comme la dimérisation du récepteur EGFR et c-Met [302] ou EGFR et IGF1R [303]. Les cross-talks conduisent ainsi à une multiplication des voies activées notamment dans les cellules cancéreuses. Les RTK sont enfin également capables d'activer d'autres RTK éloignés ainsi que les voies de signalisation qui en découlent. C'est notamment du cas de c-Met et du Récepteur d'Origine Nantaise (RON) [304] ou de c-Met et d'EGFR [305]. En thérapie anticancéreuse, ces possibilités réduisent ainsi l'impact des inhibiteurs dirigés contre un seul

RTK [306], [307]. Toutes ces informations nous invitent donc à prendre en compte l'intégralité du système. Il faut appréhender l'ensemble des voies de signalisation en les analysant bien au-delà du simple récepteur homo-dimérique, mais en prenant en compte la complexité et l'imbrication des différents acteurs et des voies de signalisation mises en jeu.

d. Les principaux récepteurs à activité tyrosine kinase modulant la réparation des cassures double-brin

Le rôle de la signalisation des RTK dans la modulation de la réparation de l'ADN est évident. Leurs implications dans la survie cellulaire suite à l'irradiation ont d'ailleurs été largement décrits dans la littérature [308], et sont généralement associés à leur surexpression et/ou à leur activation exacerbée dans le contexte pathologique cancéreux. Ces caractéristiques en font d'ailleurs des cibles pertinentes dans la lutte contre le cancer. Cependant, une interaction directe des RTK avec les acteurs principaux des différentes voies de réparation comme RAD51 et DNA-PKcs est également possible. En effet, il a tout d'abord été montré que la signalisation de certains récepteurs pouvait subsister après endocytose, mais également après leur translocation nucléaire [309]. Ces 2 phénomènes peuvent ainsi permettre la rencontre des RTK avec les protéines de la réponse aux dommages à l'ADN.

Le lien entre RTK et la réparation de l'ADN est indéniable notamment par la voie PI3K/AKT. Dans ce contexte, trois RTK sont particulièrement étudiés dans la bibliographie : EGFR, IGF1R et la famille des Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR). Ils ont été montrés comme jouant un rôle dans la modulation des voies de réparation des CDB de l'ADN en agissant soit indirectement, soit directement sur les acteurs de ces mécanismes de réparation. De nombreux autres parmi les 20 familles de RTK ont également été succinctement décrits comme pouvant moduler la réparation des CDB de manière plus ou moins importante (**Figure 17 - Chabot et al., soumise - cf. Annexe 16**).

i. L'Epidermal Growth Factor Receptor

Le récepteur EGFR (134kDa) est sans doute le plus étudié des RTK. Chez l'homme, il est codé par le gène *EGFR* du chromosome 7p11.2, il appartient à la famille des récepteurs ERBB. Il active plusieurs voies en interagissant avec de nombreux ligands. La complexité de la signalisation médiée par EGFR est également augmentée par le fait que le récepteur s'homo-dimérise ou s'hétéro-dimérise avec d'autres récepteurs tel que c-Met [302] ou IGF1R [307]. Ces possibilités conduisent à l'activation d'un nombre de voies de signalisation encore plus important. EGFR est exprimé dans de nombreux cancers dans lesquels le pronostic de survie est défavorable, comme par exemple dans les cancers urothéliaux.

Son implication dans la réparation des CDB a été mise en évidence de nombreuses fois au cours des 15 dernières années (**Chabot et al., soumise - cf. Annexe 16**). La modulation de l'activité d'EGFR, par notamment l'utilisation d'inhibiteurs, joue à la fois sur la réparation par

NHEJ mais également par RH. L'utilisation de l'erlotinib, dans un modèle de lignées cellulaires NSCLC A549 et H1299 stoppe la réparation des CDB par RH ou NHEJ, médiée par le récepteur EGFR suite à son activation par différents ligands (EGF, TGF α ,...) [310]. Ainsi, la réparation de l'ADN est généralement moins efficace lorsqu'EGFR est inhibé par l'erlotinib. Suite à l'utilisation d'arsenic trioxide, les auteurs observent une accumulation des foyers γ H2AX, caractéristique d'une diminution de réparation des CDB de l'ADN, mais plus particulièrement une diminution de la quantité des protéines RAD51 et 50 qui jouent un rôle central dans la RH pour la première et dans le complexe MRN pour la seconde [311]. Une diminution de la phosphorylation de la protéine BRCA1, essentielle à l'activation du mécanisme de RH a été aussi observée. En revanche, la simple utilisation d'arsenic trioxide sans inhibition d'EGFR augmente l'efficacité de la réparation médiée par EGFR via les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK. L'implication d'EGFR a également été montrée dans un modèle de cellules cancéreuses du sein MCF-7, suite à l'inhibition du récepteur par erlotinib. Une augmentation des foyers γ H2AX, une diminution de ceux de RAD51 et une rétention cytoplasmique de BRCA1 [16] ont été observées.

Le gefetinib, un autre inhibiteur d'EGFR, a également montré des résultats intéressants dans les lignées cellulaires NSCLC A549 et H1650. L'inhibition d'EGFR conduit à une réduction de la voie ERK et à une diminution du niveau de protéine RAD51 [312]. Dans les cellules cancéreuses des glandes mammaires MCF7 et AR42J, l'inhibiteur induit une interaction importante entre le récepteur EGFR et la protéine DNA-PKcs essentielle au mécanisme de réparation par NHEJ. Ainsi, DNA-PKcs est retenue dans le cytoplasme, réduisant ainsi son activité nucléaire [313]. D'autres inhibiteurs comme le NSC ont montré leur impact sur la NHEJ, car une diminution de la phosphorylation de DNA-PKcs et de son activité est induite dans des lignées de cancer prostatique PC-3 et DU145 (*cf. Annexe 14*) [314]. L'icotinib combiné à des dommages induits par irradiation empêche la translocation nucléaire d'EGFR et diminue l'expression et l'activité de RAD51 [315]. Enfin, le lapatinib qui empêche la formation du complexe BRCA1/EGFR et son entrée dans le noyau, inhibe la RH dans des lignées de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231, 453 et 458 [316].

Hormis les inhibiteurs « chimiques », des anticorps dirigés contre le récepteur EGFR comme le cetuximab C225 sont utilisés. Ils inhibent son activité dans les lignées cellulaires NSCLC A549 et abolissent la réparation par la NHEJ suite à l'utilisation de radio-mimétiques (peroxyde H₂O₂ ou cisplatine) capables d'induire des CDB [317]. Sans inhibiteur d'EGFR, les dommages causés par ces effecteurs augmentent la translocation nucléaire d'EGFR complexé avec DNA-PKcs. Ainsi, une augmentation de l'activité de DNA-PKcs et par conséquent de la réparation par NHEJ sont mises en évidence. A l'inverse, l'inhibition de la NHEJ induit une radio sensibilisation des cellules de carcinome squameux de la tête et du cou (UMSCC1 et 6) [318].

L'activité du récepteur EGFR est également modulée par l'apparition de certains variants « naturels » conduisant à des mutations hyper activatrices du récepteur qui ne nécessitent donc plus son activation par un ligand. C'est notamment le cas du variant EGFRvIII qui présente une mutation au niveau de la partie extracellulaire, mais aussi des mutations L858R et $\Delta E746-E750$ au niveau du TKD qui induisent l'activation des voies de signalisation dépendantes du récepteur. Lorsque ces 2 dernières mutations sont présentes dans un modèle de lignée cellulaire NSCLC, l'hypoxie entraîne une augmentation du nombre de foyers $\gamma H2AX$ et une diminution des protéines RAD51 et 50 impliquées dans la RH et la NHEJ en comparaison avec des cellules non mutées [319], [320]. Ce phénomène qui rend les cellules radio et chimiosensibles, est potentiellement dû à l'incapacité du récepteur à être transporté dans le noyau et à interagir avec DNA-PKcs [321]. En ce qui concerne le mutant EGFRvIII, les cellules deviennent radioresistantes. En effet, sa suractivation entraîne une augmentation de la réparation des CDB notamment via DNA-PKcs et la voie PI3K [322].

Une protéine de fusion EGFR-Rad51 a été mise en évidence dans une lignée de cancer du poumon NSCLC. Cette protéine chimère, composée du TKD d'EGFR et d'une grande partie de RAD51, est capable d'activer les voies MAPK et PI3K/AKT. En revanche, elle ne possède pas le site d'interaction avec la protéine c-Cbl qui conduit normalement à la dégradation d'EGFR. Son absence rend donc cette forme du récepteur plus stable et lui apporte un caractère pro-métastatique et oncogénique. La protéine de fusion a été montrée comme sensible aux traitements par inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) d'EGFR tel que l'erlotinib, mais son implication dans la réponse aux dommages à l'ADN via sa partie RAD51 n'a toujours pas été étudiée [323], [324].

ii. L'Insulin Growth Factor 1 Receptor

Le récepteur dimérique IGF1R (Insulin Growth Factor 1 Receptor) de 154kDa, codé par le gène *IGF1R* du chromosome 15q26.3, appartient à la famille des récepteurs à insuline (INSR). IGF1R phosphoryle directement les protéines IRS1/2 activant les voies PI3K/AKT et MAPK. Il est majoritairement impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire. IGF1R est un marqueur du pronostic favorable de survie dans les cancers rénaux, mais il est aussi exprimé de manière importante dans les cancers thyroïdiens, colorectaux et prostatiques.

Sa contribution dans la modulation de la réparation des CDB (**Chabot et al., soumise - cf. Annexe 16**) a été supposée en raison de sa capacité à être transporté dans le noyau. Tout d'abord, dans un modèle de cellules souche embryonnaires H1 hESC, son interaction avec différents partenaires comme la protéine 14-3-3, l'histone H4 et la protéine Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) a été démontrée [325], [326]. Par exemple, IGF1R phosphoryle directement PCNA en position Y60, Y133 et Y250 pour conduire à son ubiquitinylation après des dommages à l'ADN [327]. La translocation nucléaire est également facilitée par l'action de l'amphiréguline [328]. En effet, dans un modèle murin de cellules tumorales primaires de

cancers du poumon, l'utilisation d'un inhibiteur d'EGFR (gefetinib) induit une accumulation de récepteur IGF1R dans le noyau, médiée par l'amphiréguline. La translocation et l'accumulation nucléaire arrête le cycle cellulaire par l'activation de p21. Il est à noter que cette étape est essentielle à la réparation des CDB et à une augmentation de la résistance cellulaire aux dommages à l'ADN [328].

La double inhibition d'IGF1R et d'EGFR a donc été réalisée car il a été démontré que la formation d'un hétérodimère est possible entre les deux récepteurs [307]. Dans des modèles de cellules cancéreuses colorectales (SW837, DLD1 et CaCo2), en utilisant respectivement l'inhibiteur AEW541 pour IGF1R, et l'erlotinib ou EGFR, les auteurs montrent une augmentation des CDB induites par irradiation, mais également une augmentation de la mort cellulaire par apoptose. Tous ces phénomènes sont notamment corrélés à une diminution de phosphorylation d'AKT. Dans un modèle de cancer de la prostate PC-3 et DU145, la double inhibition d'EGFR et d'IGF1R en utilisant l'erlotinib et l'AG1024 a un effet synergique, une augmentation de la radiosensibilité des cellules due entre autre à une inhibition de la RH [329] est observée. Lorsqu'IGF1R ou EGFR sont inhibés après une irradiation, la survie cellulaire est diminuée car l'apoptose augmente. Mais lors de la double inhibition, une synergie du traitement post-irradiation est plus efficace que lors de l'utilisation d'un seul inhibiteur [330]. L'irradiation de cellules CaCo2 a également montré, suite à la mutation K/R (lysine-arginine substitution in the ATP binding domain of the β subunit) du récepteur IGF1R, une augmentation de la radiosensibilité mais également une diminution de la quantité de transcrits de BRCA2, protéine essentielle de la RH [331].

Même si certaines études illustrent l'impact d'IGF1R sur la réparation des CDB de l'ADN [332], son implication dans la RH est aujourd'hui bien mieux décrite que dans la NHEJ. De manière générale, l'utilisation de small-interfering RNA (siRNA) ou d'inhibiteurs spécifiques tels que l'AZ12253801 [332]–[334] augmente la radiosensibilité cellulaire, la réparation de l'ADN et le nombre de foyers γ H2AX. Après irradiation, l'extinction de l'activité d'IGF1R conduit également à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, car le récepteur est capable de réguler ce checkpoint en modulant l'activité de CHK1 via les voies PI3K/AKT [335]. En effet, son inhibition conduit à une diminution de la phosphorylation des sérines 345 et 296 de CHK1 réduisant son activité. L'inhibition de IGF1R après des dommages radio induits conduit également à une radiosensibilité médiée par HIF1 α dans un modèle de cellules cancéreuses du poumon [336], associée à une diminution des protéines de la réparation telle que H2AX, 53BP1 et ATM. L'association entre ATM et IGF1R a également été décrite comme un lien réciproque existant entre les deux kinases. ATM régule l'expression d'IGF1R et ce dernier module l'activité d'ATM suite à des dommages [336]–[338]. L'implication d'IGF1R dans la RH a donc déjà été plusieurs fois démontrée de manière assez générale [339], [340]. Le récepteur agit sur les acteurs spécifiques de la RH et particulièrement sur RAD51. En effet, l'activation d'IGF1R par son ligand conduit à la phosphorylation d'IRS1 qui interagit par sa partie N-terminale directement

avec la recombinaise RAD51 pour permettre la translocation nucléaire de la recombinaise suite à des dommages à l'ADN [339].

iii. La famille des Hepatocytes Growth Factor Receptor

La famille des Hepatocytes Growth Factor Receptor (HGFR) est composée de deux récepteurs : RON (gène *MST1R* chr.3p21.31) et c-Met (gène *MET* chr.7q31.2). Ils ont 34% d'homologie de séquence chez l'homme, la partie intracellulaire étant homologue à 60%. RON et c-Met sont impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire par l'intermédiaire des voies MAPK et PI3K. Leur lien avec la réparation des CDB a plusieurs fois été mis en avant notamment pour le récepteur c-Met sans pour autant être aussi étudié que les RTK précédemment décrits (*Chabot et al., soumise - cf. Annexe 16*).

1. Le Récepteur d'Origine Nantaise

Tout d'abord, le Récepteur d'Origine Nantaise (RON) de 152kDa, aussi connu sous le nom Macrophage Stimulating 1 Receptor (MST1R), est impliqué dans la survie cellulaire. La fixation de son ligand Macrophage Stimulating 1 (MST1) active la cellule par la voie PI3K/AKT. Le récepteur RON est un marqueur défavorable dans le pronostic de survie des malades atteints de cancers urothéliaux, comme le cancer de la vessie. Il est aussi souvent exprimé dans de nombreux cancers dont celui de la thyroïde, du foie, du sein et de l'ovaire. Son rôle et son activité dans la réparation des CDB par NHEJ notamment suite à sa translocation nucléaire a été démontré. En effet, en réponse à l'hypoxie, le récepteur est transporté au niveau nucléaire [341], notamment dans les cellules cancéreuses de vessie TSGH8301. Une immunoprécipitation du récepteur RON nucléaire révèle un lien avec 2 acteurs de la NHEJ, Ku70 via son TKD et DNA-PKcs [342]. Dans les cellules cancéreuses, la surexpression du récepteur entraîne une chimiorésistance associée à l'activation de la réparation des CDB par NHEJ.

2. Le Récepteur c-Met

Le récepteur c-Met de 155kDa est aussi un marqueur défavorable du pronostic de survie des malades atteints de cancers pancréatiques et des carcinomes squameux de la tête et du cou. Il est également exprimé dans de nombreux autres types de cancers (colorectaux, thyroïdiens, cervicaux, ...). Le récepteur c-Met a principalement été décrit comme modulant la réparation des CDB par RH. De plus en plus d'études ont montré sa translocation nucléaire et son activité modulatrice sur les différents acteurs de jouant un rôle dans la RH, et notamment RAD51. Ces données sont développées ci-après. Il est intéressant de noter que les deux récepteurs c-Met et RON appartenant à la même famille sont complémentaires puisqu'ils sont capables d'activer les deux mécanismes de réparations majeurs des CDB.

Chapitre 4 - c-Met : Récepteur cible & point de départ de la réparation par Recombinaison Homologue ?

Découvert en 1984, le récepteur à activité tyrosine kinase c-Met a été mis en évidence sous la forme d'une protéine oncogène de fusion TPR-Met isolée de lignées cellulaires d'ostéosarcome humain après son exposition à un carcinogène mettant en évidence l'apparition d'un phénotype transformant [343]. L'oncogène TPR-Met provient d'un réarrangement chromosomique, où un fragment du gène *Translocated Promoter Region (tpr)* présent sur le chromosome 1 et codant pour un motif de dimérisation fusionne avec un fragment du gène *met* présent sur le chromosome 7 (7q31.2) et codant la portion intracellulaire à activité tyrosine kinase du récepteur [344]. Ainsi, la partie *tpr* entraîne une dimérisation permanente menant à l'activation du domaine kinase de c-Met de la protéine chimérique [345]. Le nom de ce récepteur provient du nom du carcinogène utilisé lors de sa découverte : le N-méthyl-N'-nitroso-guanidine [344]. Exprimé dans la plupart des tissus, son action physiologique dépendra essentiellement de l'expression de son ligand : l'Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor (HGF-SF).

a. Structure & domaines

Comme tout récepteur à activité tyrosine kinase, le récepteur c-Met est divisé en 3 parties. Une partie extracellulaire permet la connexion avec son ligand, composé de différents domaines. Une partie transmembranaire hydrophobe lui permet de s'ancrer dans la membrane cellulaire et enfin une partie intracellulaire porte le domaine d'activité tyrosine kinase et le système d'activation/répression associé.

Le gène *MET* de 120 kb code pour un ARNm de 8 kb [346], [347]. La protéine traduite de cet ARNm fait 170 kDa et correspond au récepteur c-Met immature (pro-Met). Une fois la traduction de l'ARNm réalisé, le récepteur c-Met subit une maturation post-traductionnelle par glycosylation et clivage au niveau de l'appareil de Golgi lui permettant de passer de sa forme pro-Met à sa forme active c-Met mature (**Figure 19**) [348], [349]. Ceci est permis par l'action d'une furine, une sérine protéase reconnaissant la séquence consensus **R-X-(R/K)-R//S (Figure 19)**. Cette séquence se trouve être présente entre les acides aminés 304 et 308. L'action de la furine scinde le domaine Semaphorine (SEMA) initial en 2 domaines d'affinité différente pour le ligand HGF-SF : le domaine SEMA α , correspondant à toute la chaîne α , de haute affinité et le domaine SEMA β de faible affinité (**Figure 19**) [350]. Ainsi le récepteur c-Met est composé de 2 chaînes distinctes α et β , respectivement de 50 et 145 kDa, reliées par un pont disulfure [351]. La chaîne β est suivie d'un domaine riche en cystéine ou Plexin Semaphorin Integrin (PSI) de 50 résidus et de 4 domaines Ig-Like (IPT1 à 4) facilitant l'interaction protéine-protéine ou protéine-ligand (**Figure 19**) [352]. On trouve ensuite l'hélice transmembranaire nécessaire pour ancrer le récepteur, puis la partie intracellulaire. Cette dernière contient une partie juxtamembranaire régulant de manière négative l'action du

récepteur en partenariat avec la queue C-terminale, et le domaine à activité tyrosine kinase (Figure 19) [353].

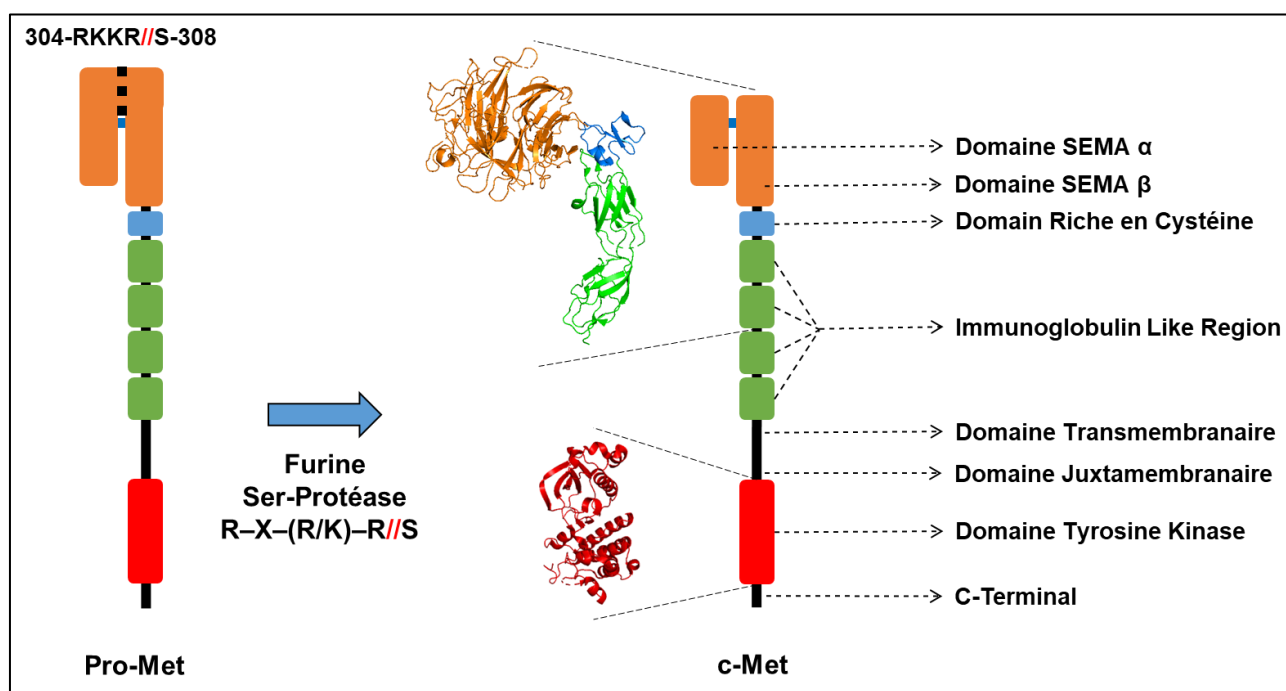


Figure 19 – La structure du récepteur c-Met

Le récepteur c-Met de la famille HGFR est caractérisé par les domaines Immunoglobuline-Like-Région (IPT) de sa partie extracellulaire, ainsi que les 2 domaines SEMA d'interaction avec son ligand HGF-SF issus de la maturation du récepteur depuis sa forme Pro-Met par l'action d'une furine. Seule une partie de la structure du récepteur c-Met, correspondant aux domaines SEMA-PSI-IPT1 et 2 pour la partie extracellulaire [354], et le TDK pour la partie intracellulaire [355] a pour l'instant été résolue (Thèse T.Chabot, 2020).

b. Le ligand spécifique Hepatocytes Growth Factor– Scatter Factor

L'HGF a aussi été découvert en 1984 par isolement à partir de sérum de rat après une hépatectomie partielle, comme étant un facteur mitogène des hépatocytes [356]. Le SF a été découvert en 1987 après avoir été purifié à partir de fibroblastes. Il est capable d'induire la propagation des cellules épithéliales [357]. En 1991, il a été découvert que l'HGF et le SF étaient codés par une seule et même séquence d'ADN donnant un ligand de 83kDa spécifique du récepteur c-Met de haute affinité : l'HGF-SF [358]. Le gène codant pour l'HGF-SF est situé au niveau du chromosome 7q21.1 [359]. C'est une protéine hétérodimérique de 90 kDa classée dans la famille des facteurs de croissance. Par la suite, plusieurs études ont également révélé d'autres effets, tels que l'intensification de la motilité cellulaire, l'angiogenèse, la réponse immunitaire, la différenciation cellulaire et l'anti-apoptose [360].

Tout comme le récepteur c-Met, son ligand subit une maturation post-traductionnelle. La forme synthétisée pro-HGF-SF est tout d'abord inactive [361]. Au sein de la matrice extracellulaire, il y a dimérisation de la molécule suite au clivage d'un site trypsine-like (R494/V495) par une protéase [362]. Le résultat est la formation d'une molécule d'HGF-SF hétérodimérique active et mature. Il s'agit alors de deux chaînes polypeptidiques α et β liées par un pont disulfure

(Figure 20A) [363]. Notons que la mutation R494Q de ce site de clivage conduit à une perte d'interaction du ligand pour son récepteur [364]. La sous-unité α de 69 kDa est formée d'un domaine N-terminal, contenant un site de liaison de haute affinité à l'héparine, associée à quatre domaines kringle (K1 à 4) **(Figure 20A)**. La sous-unité β de 34 kDa est constituée d'un domaine homologue aux sérines protéases (SPH) **(Figure 20A)** [353], [363], [365].

L'interaction entre c-Met et son ligand se fait entre le domaine SEMA β de c-Met et les domaines N-K1 et SPH du HGF-SF [365], [366]. Une fois lié à c-Met, l'HGF-SF se dimérise au niveau de ses domaines N et K1 [367]. Une interaction est également possible entre les domaines N-K1 du HGF-SF et les domaines IPT3 et 4 de c-Met [368]. Notons que la forme immature pro-HGF-SF peut aussi fixer le récepteur entrant en compétition avec l'HGF-SF actif [369], [370]. Cela suggère donc une activation du récepteur c-Met dépendant de la quantité d'HGF-SF mais aussi du rapport avec sa forme immature dans certaines lignées cellulaires. L'homodimérisation du récepteur c-Met conduit à son auto-transphosphorylation sur les tyrosines Y1234 et Y1235 **(Figure 20B)** [371]. Ces premières phosphorylations stabilisent la kinase sous forme active et favorise une seconde série de phosphorylations sur les tyrosines Y1349 et Y1356 au niveau du domaine de régulation C-terminal. Elle initie ainsi l'activation et le recrutement de protéines adaptatrices [372]–[374].

Une cinquième tyrosine régule c-Met négativement (Y1003) en induisant sa dégradation lysosomale médiée par l'E3 ubiquitine ligase c-Cbl **(Figure 20B)** [374]. De plus, la PKC active régule également le récepteur c-Met par phosphorylation de la sérine S985 et conduit à la dégradation du récepteur **(Figure 20B)** [375]. Un autre système de régulation de l'activité kinase du récepteur c-Met passe par l'activité de certaines phosphatases responsables de l'hydrolyse du groupement phosphate des tyrosines phosphorylées du récepteur à l'HGF-SF régulant ainsi négativement son activité. Parmi elles, les phosphatases PTP-1B et la T-cell phosphatase déphosphorylent les tyrosines Y1234 et Y1235 [376]. La tyrosine phosphatase RPTP- β déphosphoryle la tyrosine Y1356 [377] et la CD148 déphosphoryle la tyrosine Y1349 [378]. Ceci empêchant le recrutement des effecteurs de signalisation comme GAB1 et a pour conséquence d'inhiber la signalisation découlant du récepteur.

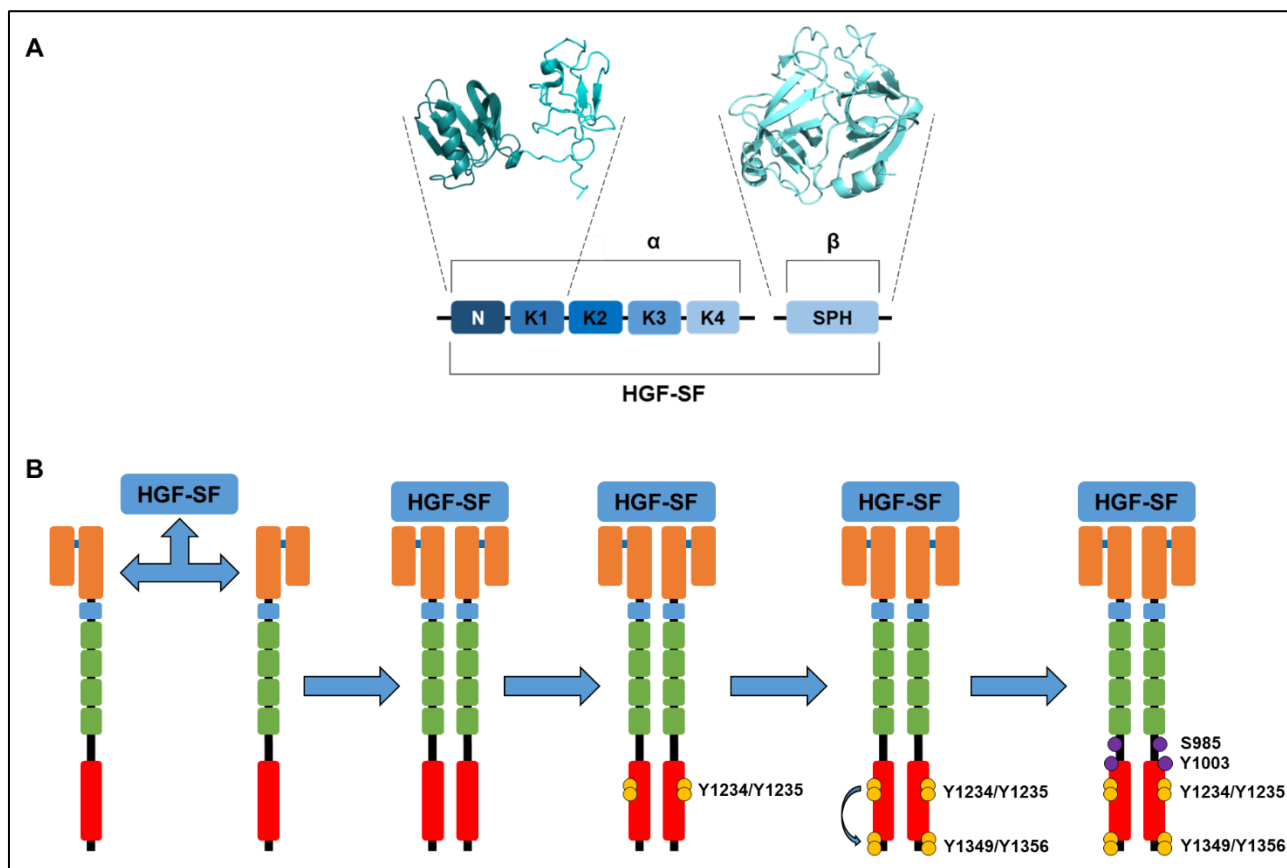


Figure 20 – Structure du ligand HGF-SF et mode d’activation du récepteur c-Met suite à sa fixation

(A) L’HGF-SF est formé de 6 domaines séparés sur 2 chaînes : la sous-unité α composée du domaine N-terminal (N) suivi de 4 domaines kringle (K1-K4) et la sous-unité β composée uniquement d’un domaine homologue aux sérines protéases (SPH). Seule une partie de la structure du HGF-SF, correspondant aux domaines N-K1 pour la sous-unité alpha [366] et SPH pour la sous-unité bêta [365], a pour l’instant été résolue.

(B) L’HGF-SF permet la dimérisation du récepteur et la trans-auto-phosphorylation des monomères c-Met au niveau des tyrosines intracellulaires Y1234/1235 pour marquer son activation et Y1349/1356 à l’origine du déclenchement des voies de signalisation du récepteur. La régulation négative du récepteur se fait par phosphorylation de la sérine S985 et de la tyrosine Y1003 conduisant à sa dégradation (**Thèse T.Chabot, 2020**).

c. Son réseau de signalisation & ses partenaires

Le récepteur c-Met module ses réponses par les nombreuses interactions qu’il établit avec ses partenaires extracellulaires, membranaires ou intracellulaires. Ces réponses peuvent être liées à l’interaction entre le récepteur et son partenaire, le récepteur et son ligand, de manière directe ou non, avec ou sans activité kinase. Chacune de ces possibilités assure l’amplification du signal et une réponse spécifique et efficace.

i. Réseau extracellulaire

Le réseau extracellulaire en connexion avec le récepteur c-Met est défini par les deux acteurs principaux que sont la nucléoline et les molécules d’héparines ou d’héparanes sulfates (**Figure 21**). Dans la matrice extracellulaire, le ligand HGF-SF est capable de se lier à ces dernières

avant son association avec le récepteur. Cette propriété confère aux héparines un rôle de corécepteur favorisant la liaison récepteur-ligand. Dans le cas des cellules tumorales, ces interactions facilitent les voies de signalisation enclenchant la migration cellulaire tumorale [379]. En ce qui concerne la nucléoline, protéine principalement nucléolaire, elle interagit avec le ligand HGF-SF dans le domaine extracellulaire. En effet, son expression à ce niveau favorise la tumorigénèse. Son interaction avec l'HGF-SF stimule par l'intermédiaire du récepteur c-Met la migration des cellules cancéreuses dans un modèle de cancer de la prostate [380]

ii. Réseau membranaire

Le réseau membranaire est plus dense, avec des acteurs plus nombreux facilitant la signalisation de c-Met. L'hétéro-dimérisation de c-Met avec un autre RTK conduit aussi à une possibilité d'activation d'autres voies de signalisation issues des autres récepteurs membranaires (**Figure 21**).

Le récepteur du cluster de différenciation 44 à l'acide hyaluronique (CD44) facilite l'interaction HGF-SF/c-Met en jouant un rôle de corécepteur [381]. Il permet l'activation des voies PI3K/AKT de survie cellulaire et MAPK/ERK de prolifération cellulaire [382], [383]. Ce travail a été réalisé dans un modèle murin *cd44*^{-/-} et *c-met*^{+/-} (ou un seul allèle de *c-met* a été invalidé) qui conduit à la mort de l'embryon [384]. Son intervention est donc essentielle lors de l'embryogénèse car ces voies sont à la base des mécanismes de survie et prolifération cellulaire.

Les intégrines sont des récepteurs membranaires impliquées dans l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice. Parmi elles, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est un constituant des hémidesmosomes impliqués dans l'adhésion cellule-matrice extra cellulaire et peut interagir avec le récepteur c-Met. En effet, décrite dans des lignées de carcinomes, elle favorise l'activation du récepteur par l'HGF-SF en jouant le rôle de corécepteur. Le récepteur c-Met activé induit la phosphorylation de l'intégrine créant des sites de recrutement pour notamment la protéine PI3K mais causant également la dissociation des hémidesmosomes. L'ensemble favorise la migration cellulaire [385]–[387].

Les E-cadhérines présentes dans la membrane cellulaire et impliquées dans la jonction cellulaire peuvent interagir avec le récepteur c-Met. Suite à l'activation du récepteur par l'HGF-SF, son endocytose associée aux E-cadhérines induit la diminution de l'adhésion intercellulaire [388], [389].

Le récepteur c-Met s'associe également avec la protéine tensine 4 qui favorise la stabilisation du récepteur. Il a été montré dans différentes lignées de cellules que la tensine 4, recrutée par c-Met, stabilise le récepteur en limitant sa dégradation. L'activation continue du récepteur régule alors positivement la survie, la migration et la prolifération cellulaire. Il a également été

mis en évidence dans le cancer du côlon et ovarien que l'expression de la tensine 4 est corrélée à celle de c-Met [390].

Les plexines sont des récepteurs transmembranaires ayant pour ligand les sémaphorines. Elles sont impliquées dans la migration cellulaire. Leur particularité structurale est de posséder un domaine SEMA homologue à celui de c-Met. Il a été démontré que le récepteur c-Met et la plexine B1 interagissaient ensemble par l'intermédiaire de leur domaine SEMA homologue [391], [392]. L'activation de la plexine B1 par la sémaphorine 4D, son ligand, permettait l'activation du récepteur c-Met en absence d'HGF-SF et des voies de signalisation de pro-migration et d'invasion consécutives [393], [394]. De plus, dans les cancers du sein et de l'ovaire, une coexpression de la plexine B1 et du récepteur c-Met est associée à des tumeurs plus agressives [395]. Il est intéressant de noter que dans des lignées issues de mélanomes, l'association c-Met/plexine B1 a pour effet de conduire à une inhibition de la migration et de l'invasion induites par le récepteur. Cet effet est à l'exact opposé des résultats précédents, ce qui implique une coopération lignée dépendante entre la plexine B1 et c-Met [396]–[398].

Le récepteur c-Met interagit également avec les récepteurs de mort Fibroblast Associated (FAS) pour empêcher leur activation par son ligand (FASL), nécessaire à l'induction de la mort cellulaire par apoptose. Cet effet a donc comme objectif de maintenir la survie cellulaire. L'interaction c-Met/FAS est abolie en présence de HGF-SF [399], [400].

iii. Cross-talk entre c-Met et d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase

Comme succinctement développé précédemment, l'hétéro-dimérisation de c-Met avec d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase est possible. L'activation croisée de nombreux récepteurs par c-Met ou son ligand multiplie ainsi les voies activées. Cette cross-signalisation est souvent présente dans le cadre des cellules cancéreuses. Les récepteurs principalement décrits qui communiquent avec c-Met sont EGFR et RON (**Figure 21**).

Pour commencer le récepteur c-Met interagit avec RON, qui est issu de la même famille de récepteur et très homologue à c-Met. Ils ont 34% d'homologie de séquence chez l'homme, la partie intracellulaire étant homologue à 60%. La communication entre les deux récepteurs a été montrée *in vitro* dans différents modèles cellulaires et confirmée dans plusieurs cancers dont celui du foie, de l'ovaire et du sein. En effet, l'ajout de HGF-SF ou l'activation constitutive de son récepteur c-Met conduit à l'activation du récepteur RON. Inversement l'ajout de protéines chaperonnes de la membrane (MSP), le ligand du récepteur RON, conduit à l'activation de c-Met [304]. L'homologie entre les deux récepteurs peut également expliquer le fait que RON puisse être transphosphorylé par c-Met, et que certains inhibiteurs de c-Met agissent également sur RON en inhibant sa phosphorylation [401], [402].

D'autres ligands spécifiques de RTK sont également capables d'activer c-Met. Notamment, le Glial cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF) ligand du récepteur RET induit sa phosphorylation [403]. L'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF1) ligand du récepteur IGF1R permet aussi l'activation de c-Met dans une lignée cellulaire cancéreuse de la prostate [404]. L'Epidermal Growth Factor (EGF) ou le TGF α deux ligands du récepteur EGFR agissent aussi sur c-Met. A l'inverse, l'HGF-SF conduit à une activation des récepteurs de la famille ErbB (EGFR/ErbB1, ErbB2 et ErbB3) [405]–[407].

Les récepteurs EGFR et c-Met interagissent directement l'un avec l'autre en se co-activant par transphosphorylation dans des cellules tumorales pulmonaires et épidermiques [302], [406]. Cependant l'activation se fait également sans contact directe par l'intermédiaire de la protéine tyrosine kinase cytoplasmique Src activée par c-Met [305], [306]. Le dialogue c-Met/EGFR est sans doute le plus étudié puisqu'il a des conséquences dans la régulation des réponses biologiques notamment au cours de la tumorigenèse et du développement embryonnaire où c-Met joue un rôle prépondérant [302]. La collaboration entre ces deux récepteurs est largement étudié dans le cadre de thérapie anti-cancéreuses [408]. Une telle coopération dans le cadre du développement, de la migration et l'invasion cellulaire a également été mise en évidence entre le récepteur c-Met et les récepteurs IGF1R ou Axl [409], [410].

iv. Réseau intracellulaire

L'activation du récepteur par l'HGF-SF induit une série de phosphorylation notamment en Y1349 et Y1356 qui sont alors responsables du recrutement de plusieurs partenaires intracellulaires. Ces tyrosines sont essentielles à la signalisation du récepteur car leur substitution par des phénylalanines n'affecte pas l'activité kinase du récepteur mais inhibe la prolifération, l'invasion et la motilité [374], [411]. L'importance de cette signalisation a été montré par l'utilisation d'une lignée de souris transgénique c-Met mutée sur les tyrosines Y1349 et Y1356. Les embryons KO meurent *in utero* [412] ce qui illustre l'importance de ces résidus dans la signalisation du récepteur et le rôle primordial de c-Met dans l'embryogénèse. Les tyrosines Y1349 et Y1356 phosphorylées sont spécifiquement reconnues par des protéines adaptatrices. Parmi elles, les principales sont la protéine GRB2-Associated Binder 1 (GAB1), GRB2 et PI3K (**Figure 21**). Elles sont à la genèse des voies de signalisation du récepteur. Les principales voies, du moins les plus caractérisées, sont les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire (**Figure 21**) précédemment développées. Chez la plupart des récepteurs avec une activité kinase, la reconnaissance se fait par l'intermédiaire de domaines spécifiques comme le domaine SH2 [374], [413]–[415].

GAB1 est sans doute la protéine adaptatrice de c-Met la plus étudiée. Elle fixe directement le récepteur sur la tyrosine Y1349 ou de manière indirecte via GRB2 sur la tyrosine Y1356 suite à leur phosphorylation et leur démasquage [415]–[417]. Cette protéine adaptatrice servira alors de plateforme pour les protéines PI3K, PLC γ Src-homology region phosphatase 2

(SHP2), GRB2 ou SHC. Chacun des partenaires sera à l'initiation d'une voie de signalisation particulière [415], [418]–[420] principalement impliquée dans la prolifération cellulaire. La seconde protéine adaptatrice étudiée, GRB2, se lie directement au récepteur c-Met sur la tyrosine Y1356 par son domaine SH2 [421], mais également par l'intermédiaire de la protéine SHC. Elle est également à la base de voies de signalisation intracellulaire consacrées à la prolifération.

v. L'internalisation n'empêche pas la signalisation

L'activation du récepteur c-Met par son ligand HGF-SF conduit à son internalisation rapide par endocytose (**Figure 21**). Ce mécanisme permet notamment le recyclage des protéines présentes à la membrane tel que les récepteurs. Il implique la formation d'endosomes tout d'abord précoces puis tardifs ou péri-nucléaires fusionnant avec des lysosomes dont l'acidité dégrade les composants protéiques. Malgré l'internalisation, la signalisation du récepteur continue au niveau des endosomes. Trois acteurs de la signalisation continuent d'interagir avec la partie intracellulaire du récepteur : les protéines ERK, STAT3 et Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) (**Figure 21**). La signalisation de c-Met n'est donc pas uniquement au niveau de la membrane plasmique, mais elle se poursuit aussi dans les différents compartiments intracellulaires.

En ce qui concerne la formation d'endosomes précoces contenant le récepteur c-Met, il a été montré dans un modèle cellulaire de cancer du sein que la signalisation de ce dernier perdure par son interaction avec la protéine G Rac1, membre des RhoGTPases. L'activation conduit notamment à un remodelage de l'actine favorisant la migration cellulaire [422], [423]. La signalisation du récepteur c-Met au niveau des endosomes précoces passe également par l'activation des protéines ERK (ERK1 et 2). En effet, l'inhibition de l'internalisation du récepteur inhibe la phosphorylation de ces protéines. Le récepteur c-Met permet aussi la relocalisation d'ERK pour favoriser la migration [424], [425].

STAT3 est recrutée par c-Met lorsque ce dernier se trouve au niveau de la membrane cellulaire, mais également lorsqu'il est enclavé à l'intérieur des endosomes péri-nucléaires. L'activation du facteur de transcription STAT3 est ainsi continue. Après sa phosphorylation par c-Met, STAT3 passe dans le noyau pour induire la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires [413].

Le récepteur c-Met est également présent dans le noyau de cellules cancéreuses du sein. En effet, la présence de sa partie active intracellulaire au niveau du noyau a été démontrée (**Figure 21**). Ainsi il pourrait jouer le rôle de facteur de transcription après son activation et son internalisation [426].

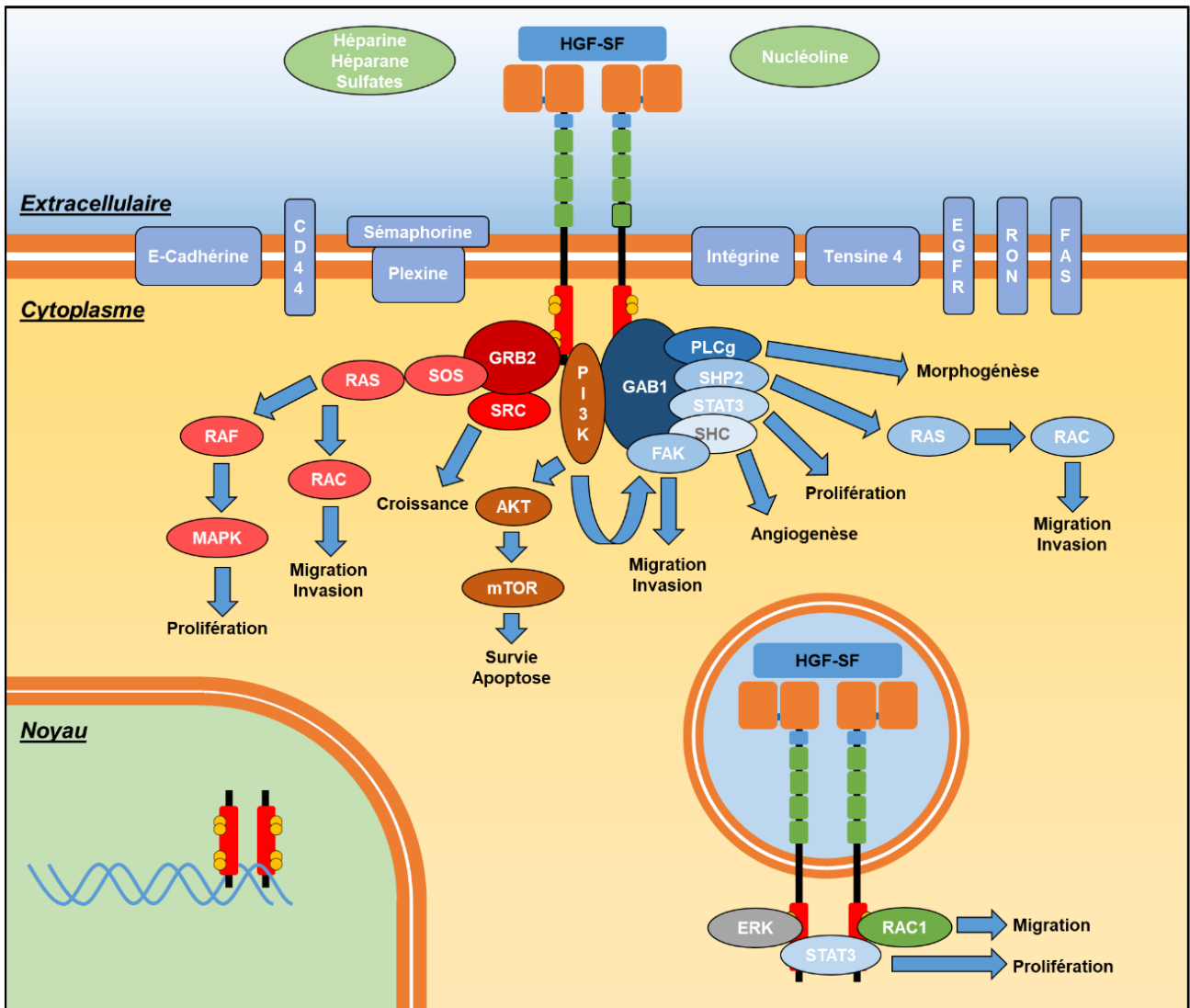


Figure 21 – Les principaux partenaires connus du récepteur c-Met et les voies de signalisation associées

Le récepteur c-Met interagit avec des partenaires extracellulaires, membranaires et intracellulaires multipliant les voies de signalisation associées. Il joue principalement un rôle dans la migration et la prolifération cellulaire. Son activité de transmission de signal continue après son endocytose dans le cytoplasme. Une activité a également été retrouvée au niveau nucléaire illustrant une possible action comme facteur de transcription (Thèse T.Chabot, 2020).

d. Ses rôles & activités

i. Les principales réponses biologiques induites par c-Met

L'activation du récepteur c-Met induit un phénomène de croissance invasif associant la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, la migration cellulaire et la morphogénèse [427]. Pour ce qui est du phénomène de prolifération cellulaire, l'activation de c-Met par son ligand le HGF-SF déclenche dans des cellules d'origine épithéliale une réorganisation du cytosquelette d'actine entraînant la formation de multiples bourgeonnements membranaires [357]. Ce phénomène de prolifération découle de l'activation du récepteur et de la voie signalisation Ras/MAPK et PI3K (Figure 21) [428], [429]. La stimulation du récepteur par

l'HGF-SF permet également de phosphoryler la protéine FAK augmentant ainsi les capacités migratoires des cellules [425], [430]. L'activation de c-Met est également responsable d'une augmentation de la résistance à l'apoptose et donc stimule la survie cellulaire, principalement grâce à l'activation de la voie PI3K (**Figure 21**) [431], [432]. En effet, la voie PI3K/AKT entraîne la phosphorylation et l'inactivation de la protéine Bad pro-apoptotique et l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xl et Mcl-1 [433]. Associé à cela, la voie PI3K/AKT, via la protéine mTOR, stimule la synthèse et le transport nucléaire de la protéine MDM2 responsable de l'inhibition de p53. Cette inhibition stoppe l'action de la gardienne du génome et favorise la survie cellulaire.

ii. Rôles au cours du développement embryonnaire

Le récepteur c-Met est fortement impliqué dans le développement embryonnaire de nombreux organes [434]. Tout d'abord, il a été montré qu'un KO des gènes codant pour c-Met ou HGF-SF était létal dès 15 jours de développement chez les souris. Un défaut d'organisation des organes dont le trophoblaste labyrinthique du placenta permettant les échanges mère-fœtus est observé et conduit à un défaut d'approvisionnement en oxygène et en nutriments [435]. Ces souris ont également une réduction de la taille du foie due à la perte de prolifération cellulaire induite par l'HGF-SF et à l'augmentation de l'apoptose [434]. Enfin, les embryons ont une absence de certains muscles squelettiques car c-Met est exprimé dans les précurseurs myoblastiques du dermomyotome tandis que l'HGF-SF est exprimé dans les bourgeons des membres. L'HGF-SF induit la migration et la prolifération des myoblastes qui exprime le récepteur c-Met pour permettre la formation des muscles. Ainsi, on comprend pourquoi la perte du récepteur ou de son ligand cause l'absence de muscles squelettiques [436]. Il a également été démontré que chez la souris au cours de la gastrulation (7 jours de développement), le récepteur c-Met et son ligand l'HGF-SF sont co-exprimés dans l'endoderme et le mésoderme. Entre 8 et 10 jours, lors de l'organogénèse, ils ne sont exprimés que dans quelques régions avant de s'éteindre. De manière générale, le récepteur est exprimé dans les tissus épithéliaux, alors que l'HGF-SF est sécrété par les tissus mésenchymateux [387], [437], [438].

L'utilisation de plusieurs mutants conditionnels a montré l'importance du récepteur dans différents organes, et dans la mise en place des muscles faciaux [439]. L'inactivation sélective du récepteur dans les cellules pulmonaires inhibe quant à elle le développement alvéolaire de manière significative. Son inhibition dans les reins conduit un mauvais développement du néphron et une augmentation de l'expression du récepteur EGFR suggérant un mécanisme compensatoire et soulignant l'importance de la collaboration de ces deux récepteurs dans l'embryogenèse [440]. Dans le système nerveux, le couple HGF-SF/c-Met a montré son importance suite à la réalisation de mutation *Knock-In* (KI) sur le domaine à activité tyrosine kinase. Leur rôle dans l'innervation sensorielle de la peau des membres et du thorax été largement démontré. Des expériences *in vitro* ont également déterminer leur rôle dans la

croissance axonale et la survie des neurones sensorielles périphériques [441]. Au cours du développement cérébral, une mutation inactivatrice du récepteur c-Met dans le futur cortex mène à une augmentation du nombre des interneurons striataux GABA-ergiques, ce qui provoque un retard dans les procédures d'apprentissages et révèle un lien entre c-Met et certains troubles neurologiques comme l'autisme [442]–[444].

iii. Implication à l'âge adulte

A l'âge adulte, le récepteur c-Met est principalement exprimé par les cellules épithéliales, endothéliales, cérébrales et lymphocytaires B [445]–[448]. L'HGF-SF est quand à lui produit par les cellules mésenchymateuses [357]. Le duo HGF-SF/c-Met est principalement impliqué dans la régénération et l'homéostasie tissulaire. En effet, il a été montré qu'un KO conditionnel de c-Met dans des cellules murines de foie, diminue la régénération tissulaire [449]. Il a été aussi montré qu'à la suite de lésions cutanées, un relargage massif et rapide du ligand HGF-SF se produit [450]. Le même phénomène se produit pour des lésions rénales [451], pulmonaires [452], et de la moelle épinière [453]. Enfin, l'injection d'HGF-SF améliore la réparation tissulaire de tous les organes précédemment cités [451], [452].

iv. Implication dans le cancer

La dérégulation du couple HGF-SF/c-Met est associée à la tumorigenèse et induit un phénotype invasif dans de nombreux types de cancers (**Tableau 2**). Cette dérégulation passe principalement par la surexpression ou la suractivation du récepteur à cause de mutations, ou suite à l'hypersécrétion du ligand HGF-SF [454], [455]. Un lien direct entre c-Met et le cancer a été montré par la découverte de mutations activatrices dans le cadre de carcinomes papillaires rénaux héréditaires [363], [456], [457]. Par la suite, plus de 2000 mutations possibles (tout type confondu) ont été répertoriées (*COSMIC – Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) sur le gène codant pour le récepteur c-Met. La majorité d'entre elles auront un impact sur la séquence protéique de c-Met, car près de 60%, de ces mutations sont des mutations faux-sens ou non-sens, des délétions ou des insertions de nucléotides. De plus, elles sont situées au niveau de la partie intracellulaire, et sont principalement réparties sur 3 « hot spots » avec, par ordre croissant de mutations, le domaine kinase du récepteur, le domaine juxtamembranaire et enfin les domaines SEMA. Au vue du nombre de mutations, nous ne développerons ici que les mutations et modifications d'expression les plus décrites.

Catégorie	Type de cancer	Expression HGF-SF	Expression c-Met	Mutation de c-Met	Mauvais pronostic associé
Carcinome	Vessie	X	X	X	X
	Sein	X	X	X	X
	Cervical	X	X		X
	Cholangiocarcinome	X	X	X	X
	Colorectal	X	X	X	X
	Endomètre	X	X	X	X
	Esophogéal	X	X	X	X
	Gastrique	X	X	X	X
	Tête et cou	X	X	X	X
	Rein	X	X	X	X
	Foie	X	X	X	X
	Poumon	X	X	X	X
	Nasopharyngé	X	X	X	X
	Ovaire	X	X	X	X
	Pancréas / vésicule biliaire	X	X		X
	Prostate	X	X	X	X
	Thyroïde	X	X	X	X
Sarcome musculo-squelettique	Ostéosarcome	X	X	X	X
	Rhabdomyosarcome	X	X		X
	Sarcome synovial	X	X		
Sarcome des tissus mous	Sarcome de Kaposi	X	X		X
	Léiomyosarcome	X	X		X
	MFH / fibrosarcome	X	X		
Tumeurs hématopoïétiques	Leucémie myéloïde aiguë	X	X		X
	Leucémie à cellules T adulte	X	X		X
	Leucémie myéloïde chronique	X	X	X	X
	Lymphomes	X	X	X	X
	Myélome multiple	X	X		X
Autres néoplasmes	Glioblastomes / Astrocytomes	X	X	X	X
	Mélanome	X	X	X	X
	Mésothéliome	X	X	X	X
	Tumeur de Wilms	X	X		

Tableau 2 – Liste des cancers impliquant le duo HGF-SF/c-Met

Ce tableau, issu du site resources.vai.org/met, récapitule les différents types de cancers. La surexpression du ligand HGF-SF ou du récepteur c-Met et les mutations (croix rouge), mais également les modifications qui impliquent un mauvais pronostic (croix verte) y sont référencées.

1. Principales mutations du récepteurs c-Met

Les conséquences de mutations localisées dans le TKD du récepteur c-Met ont pour certaines été identifiées. La mutation D1228H sensibilise positivement le récepteur c-Met au ligand l'HGF-SF [458]. D'autres, comme la mutation Y1235D, induit une phosphorylation et une activation constitutive du récepteur même en absence du ligand. Le remplacement d'une tyrosine par un acide aspartique mime une phospho-tyrosine. Cette mutation intervenant sur un résidu essentiel à l'activation de c-Met mène à une activité tyrosine kinase constitutive du récepteur c-Met. Elle ne peut pas entièrement compenser l'absence de phosphorylation de la tyrosine Y1234, l'activation est plus faible que celle d'un récepteur activé et phosphorylé sur ses deux tyrosines [459]. D'autres mutations, comme la D1246N et M1268T, activent le récepteur sans phosphoryler les tyrosines Y1234 et Y1235. Ainsi, la mutation M1268T est

associée au développement de cancers mammaires. Elles stabilisent le récepteur dans sa conformation active.

Différentes altérations du récepteur ont été décrites au niveau du domaine juxtamembranaire. Parmi elles, les plus décrites sont celles induisant une délétion de l'exon 14, correspondant à une cinquantaine d'acides aminés, du domaine juxtamembranaire [460]. La première a été décrite pour la première fois chez des patients atteints de cancers pulmonaires à non à petites cellules (NSCLC). Par ailleurs, il a très récemment été montré que les mutations conduisant à la délétion de l'exon 14 sont également présentes dans les cancers gastriques et du côlon suggérant l'existence d'un mécanisme commun de dérégulation de c-Met dans ces cancers [461], [462]. La forme de c-Met produite suite à la délétion de l'exon 14 est dépourvue de la tyrosine Y1003, qui est responsable du recrutement de l'E3 ubiquitine ligase c-Cbl induisant sa dégradation. Le récepteur présente alors un défaut d'internalisation et de dégradation suite à son activation. La signalisation est alors plus soutenue [460], [461], [463]–[465]. L'exon délété contient aussi la sérine S985 qui pour rappel déstabilise l'intégrité du récepteur, mais les conséquences de la délétion de cette sérine n'ont pas encore été bien décrites.

Enfin, pour ce qui est du domaine SEMA extracellulaire, la mutation N375S est la plus étudiée. Découverte dans la lignée germinale, elle n'est pourtant pas corrélée avec une augmentation du risque de cancer. Au contraire, une baisse du risque de cancer gastrique a été rapporté [466]. Comme la plupart des mutations décrites au niveau des domaines d'interaction récepteur-ligand, elle a pour conséquence de diminuer l'affinité du récepteur c-Met pour son ligand HGF-SF sans l'abolir. Elle a également été observée dans certains cancers du poumon, mais aucune preuve n'a montrée son implication dans le développement tumoral.

2. Surexpression du récepteur

Des souris surexprimant le récepteur c-Met développaient des tumeurs mammaires et des carcinomes hépatocellulaires [467], [468]. Chez l'homme, la surexpression a aussi été associée à un mauvais pronostic notamment dans les carcinomes mammaires et les cancers gastriques [469]–[471]. Elle peut être due à différents mécanismes. Tout d'abord, la transcription importante du récepteur est liée à la fixation du facteur de transcription ETS proto-oncogène 1 (ETS1) sur le promoteur [472]. L'inhibition de certains mi-RNA inhibant la traduction d'ARNm induirait également la surexpression du récepteur [473]. Dans d'autres cas, la surexpression de ce récepteur est aussi associée à une amplification génique du gène codant le récepteur c-Met [474]–[476].

Certaines cellules cancéreuses peuvent également posséder une addiction à un oncogène. Elle est définie par un arrêt de leur prolifération ou l'induction de leur mort suite à une inhibition de l'oncogène. Il est donc devenu indispensable à la survie des cellules [477]. L'utilisation de siRNA ou d'inhibiteurs spécifiques comme le PHA665752, a montré dans plusieurs lignées cancéreuses une addiction à c-Met [478], [479]. L'inhibition induit l'arrêt de la prolifération ou

la mort des cellules en affectant principalement les voies MAPK/PI3K/AKT. Les lignées utilisées, principalement d'origine pulmonaires ou gastriques, testées positives à l'addiction de c-Met présentent toutes une amplification des copies du gène codant pour le récepteur [480], [481]. Ces résultats suggèrent un lien entre amplification génique et addiction [482]. Le phénomène d'addiction est également retrouvé dans les lignées cellulaires ayant une délétion de l'exon 14.

3. Surexpression du ligand HGF-SF

La surexpression de l'HGF-SF est observée dans de nombreux cancers (gastrique, colorectaux,...). Elle est associée à un mauvais pronostic et un phénotype agressif [483]–[486]. Une étude a montré que des souris surexprimant l'HGF-SF développent, de manière spontanée, différents types de cancers (mélanomes, carcinomes ou sarcomes) montrant ainsi le rôle transformant du ligand HGF-SF [487]. De manière plus ciblée, des souris surexprimant l'HGF-SF au niveau des glandes mammaires développent des cancers mammaires [488]. L'activation autocrine de c-Met par l'HGF-SF a été montrée dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses exprimant c-Met et son ligand. Dans ces conditions, l'expression conjointe favorise la migration cellulaire et le développement de métastases. Par exemple, dans la lignée SNU-484 issue de cancer gastrique, c-Met est fortement phosphorylé dû à une forte sécrétion conjointe de l'HGF-SF [489]–[492]. Mais, l'activation paracrine est la plus fréquente. Par exemple, l'HGF-SF est souvent sécrété par les fibroblastes constituant le stroma tumoral [493].

4. Implication métastatique

L'implication du couple HGF-SF/c-Met dans l'apparition de métastases a plusieurs fois été montrée. La surexpression de c-Met est corrélée avec l'apparition de métastases dans le cancer des voies aérodigestives [494], [495]. Une autre étude a montré que l'expression du HGF-SF est fortement augmentée au niveau des sites métastatiques de ces cancers, ce qui suggère un rôle important du HGF-SF dans l'invasion et la formation de métastases cancéreuses [496]. Par ailleurs, la capacité de la signalisation du couple HGF-SF/c-Met à induire des métastases a été démontrée expérimentalement dans des xénogreffes de cellules tumorales du cancer du sein transfectées avec l'HGF-SF ou c-Met mais également dans des souris transgéniques qui surexpriment l'HGF-SF ou c-Met [488], [497].

v. Rôle éventuel dans la réparation des cassures double-brin par Recombinaison Homologue

La translocation nucléaire du RTK c-Met a récemment été montrée dans le noyau dans un modèle de cellules primaires de cancer du sein MCF10A et 12A, suite à l'utilisation du peroxyde H₂O₂ [498]. Un récepteur c-Met nucléaire actif susceptible de stimuler la transcription de certains gènes a également été décrit dans une lignée de cancer du sein MDA-

MB231 [426]. La présence du RTK dans le noyau suite à des dommages est donc largement prouvée [499]. Une colocalisation avec le marqueur γ H2AX a aussi été mise en évidence. Il s'agit peut-être de la première étape nécessaire dans son rôle dans la réparation des CDB par RH [499]. Tout d'abord, le récepteur c-Met stimule la radiorésistance des cellules cancéreuses de glioblastome. En effet, sa surexpression post-irradiation est corrélée avec une augmentation de l'expression des protéines appartenant à la voie de réparation par RH : ATM, CHK2 et RAD51. Toutes ces protéines sont associées à une réparation rapide des dommages induits par l'irradiation. Inversement, l'inhibition de c-Met diminue la phosphorylation d'ATM, l'expression de RAD51 et conduit à une défaillance de manière plus générale de la réparation de l'ADN post-irradiation [500]. Mais, le lien entre ATM et c-Met est réciproque. En effet, post-irradiation, le récepteur c-Met est surexprimé par l'activation de la voie ATM [501].

L'inhibition de c-Met réduit la radiorésistance de certaines cellules cancéreuses [500], [502], [503], notamment dans un modèle de cellules d'adénocarcinome gastrique GTL-16 et de cellules cancéreuses de prostate DU145. L'inhibition par la molécule PHA665752 ou l'activation par le ligand HGF-SF conduit à une modulation respectivement négative ou positive de la réparation des CDB par RH [229], [504]. En particulier, lorsque la chimiothérapie est associée avec des dommages radio-induits, une diminution de l'expression de RAD51 et de la formation des foyers γ H2AX marqueurs de CDB est observée [504], [505]. L'inhibition de c-Met diminue aussi la transduction nucléaire de RAD51 sans doute due à une diminution de l'interaction avec la protéine BRCA2, étape essentielle de la réparation par RH [504]. Une modulation de l'activité de RAD51, suite à la phosphorylation de c-Met, a également été mise en évidence *in vitro* par notre équipe [229]. La phosphorylation de RAD51 par c-Met est possible et a été montrée *in cellulo* avec des variants naturels de c-Met comme le mutant M1250T [504], correspondant à une forme suractivée de la protéine kinase. Nous avons également démontré *in vitro* que la kinase sauvage active phosphoryle directement RAD51 et ses mutants [229]. La phosphorylation conduit à l'augmentation des interactions « monomère-monomère » de RAD51 au sein du nucléofilament pour stabiliser son association à l'ADN. L'inhibition du récepteur c-Met bloque de manière concentration dépendante la phosphorylation des protéines AKT et MAPK régulant la signalisation de la survie cellulaire et de la réparation de l'ADN [503]. En parallèle son implication dans la réparation des CSB par modulation de l'activité de PARP-1 a également été avancée. En effet, il a été montré une colocalisation nucléaire et une co-immunoprécipitation de c-Met et PARP-1, suite à l'induction de ROS dans des cancers du sein triple négatif. De plus, il a été montré la phosphorylation de la tyrosine Y907 dans le site catalytique de PARP-1 par le récepteur c-Met réduisant son activité de PARylation et donc de décontraction de l'ADN post-dommages [506].



Deuxième Partie :

Matériels & Méthodes

I- Production & Purification de Protéines RAD51

a. Préparation des plasmides

Le plasmide pET-15b (**Figure 22**) (*cf. Annexe 1* - Addgene, Cambridge, MA, USA) contenant le gène codant pour la protéine RAD51-Wild-Type (WT) (**Figure 22**) (*cf. Annexe 2*) et relié par une séquence codant pour la thrombine à une séquence en N-terminale de la protéine correspondant à une étiquette histidine (6xHis) était déjà disponible. La construction contient également l'opéron lactose (LacI) ainsi qu'un gène codant pour la résistance à l'ampicilline (AmpR). Ce plasmide a servi de support à une mutagenèse dirigée afin d'obtenir 10 plasmides pET-15b. Chacun contient le gène codant pour His-Rad51-WT correspondant à la mutation d'une tyrosine en phénylalanine pour obtenir 10 plasmides His-Rad51-Y/F codant pour 10 des mutants non-phosphorylables (*cf. Annexe 3*). La mutagenèse dirigée a consisté à changer, pour chacun des mutants dans la séquence nucléotidique de His-Rad51-WT, les codons TAT ou TAC codant pour la tyrosine, en codon TTT ou TTC codant pour la phénylalanine. La réalisation de 2 plasmides supplémentaires a également été réalisée correspondant cette fois à la mutation d'une phénylalanine en glutamate (His-Rad51-F86E) ; et de deux alanines en leucines (His-Rad51-A190/192L) codant pour des mutants non-polymérisables. De plus, nous avons réalisé un plasmide codant pour une protéine mutante RAD51-D18 correspondant à une délétion des 18 premiers acides aminés de la protéine (Genscript Biotech, Piscataway, NJ, USA). La présence de ces mutations a été vérifiée par séquençage.

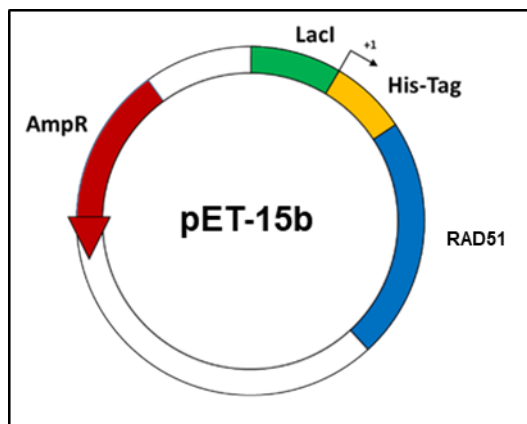


Figure 22 – Construction utilisée pour la production des plasmides His-Rad51-WT et ses mutants His-Rad51-Y/F, His-Rad51-F86E et His-Rad51-A190/192L

b. Production & Purification

Des bactéries *Escherichia Coli* BL21-DE3 chloramphénicol résistantes (CmpR) ont été transformées avec les plasmides codant pour les protéines d'intérêt (His-Rad51-WT, His-Rad51-Y/F, His-Rad51-F86E et His-Rad51-A190/192L). Elles ont été mises en culture à 37°C dans 1L de milieu Lysogeny Broth (LB) contenant de l'ampicilline (100µg/mL) et du Chloramphénicol (20µg/mL) afin de sélectionner les bactéries transformées, jusqu'à ce que l'absorbance du milieu de culture à 600nm soit comprise entre 0.6 et 0.8. L'induction a été réalisée à 30°C sur la nuit par ajout d' 1mM d'Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside ou IPTG.

Les bactéries ont été culotées par centrifugation et reprises dans du tampon de lyse (Tris HCl pH8 10mM, Éthylène-diamine-tétra-acétique-EDTA 1mM, Triton 100X, Lysosyme 1mg/mL, DNase 1/1000ème). Les cellules ont été lysées par 3 cycles de congélation/décongélation à -80°C suivis de 3 cycles de sonication (25W, 5min). La fraction soluble et la fraction insoluble ont été séparées après 45min de centrifugation à 15000rpm, à 4°C. Le surnageant a été incubé dans une colonne de résine de nickel Ni-NTA (#P6611, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 1h30 à 4°C sous agitation. Après élution de la fraction non-retenue, des lavages à 20, 60 et 80mM d'imidazole ont été réalisés (Tris HCl pH8 50mM, NaCl 500mM, Glycerol 10%, β -Mercapto-ethanol 5mM, concentration imidazole croissante). Enfin, les protéines ont été éluées par une solution à 300mM d'imidazole et recueillies en fractions de 2mL. Les fractions ont été analysées par migration sur gel Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), coloré au bleu de Coomassie. Après un dosage Bradford des fractions, celles contenant la protéine ont été récupérées et dialysées sur 2 jours afin d'éliminer l'imidazole (Tris HCl pH8 50mM, NaCl 500mM, Glycerol 10%, EDTA 1mM, Dithiothréitol-DTT 1mM, concentration imidazole décroissante). La concentration protéique a ensuite de nouveau été mesurée par Bradford (#1103060500, VWR, Radnor, PA, USA). La pureté des échantillons a été analysée par SDS-PAGE et révélée par coloration au bleu de Coomassie. Toutes les protéines RAD51 produites ont été conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Chaque étape de purification est suivie et contrôlée par gel SDS-PAGE après coloration au bleu de Coomassie. Ces contrôles de purification par gel de coomassie sont à retrouver en Annexe (**cf. Annexe 4**)

II- Mesure de Dichroïsme Circulaire

a. Principe

Le spectropolarimètre de dichroïsme circulaire (DC) est essentiellement utilisé pour suivre les modifications structurales de biomolécules telles que des protéines en solution. Cette approche repose sur la capacité qu'ont des molécules à absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. Le spectre dichroïque est obtenu par la différence d'absorbance entre ces deux types de lumière, pour chaque longueur d'onde. Dans la région UV lointain (180 à 260nm), cette méthode permet de déterminer et suivre les modifications de la structure secondaire des protéines à savoir les hélices alpha, feuillets bêta et formes aléatoires. Les hélices alphas sont caractérisées par une déviation positive à 190nm qui est d'autant plus importante que le taux d'hélice alpha est grand. Egalement par une déviation négative à 208 et 222nm. Les feuillets bêtas sont caractérisés par une déviation positive à 196nm et négative à 218nm. Chacune des protéines possède donc un spectre DC distinct selon sa composition en hélice alpha et feuillet bêta notamment (**Figure 23**). Si les formes secondaires des protéines sont les mêmes alors les profils à ces différentes longueurs d'onde seront les mêmes.

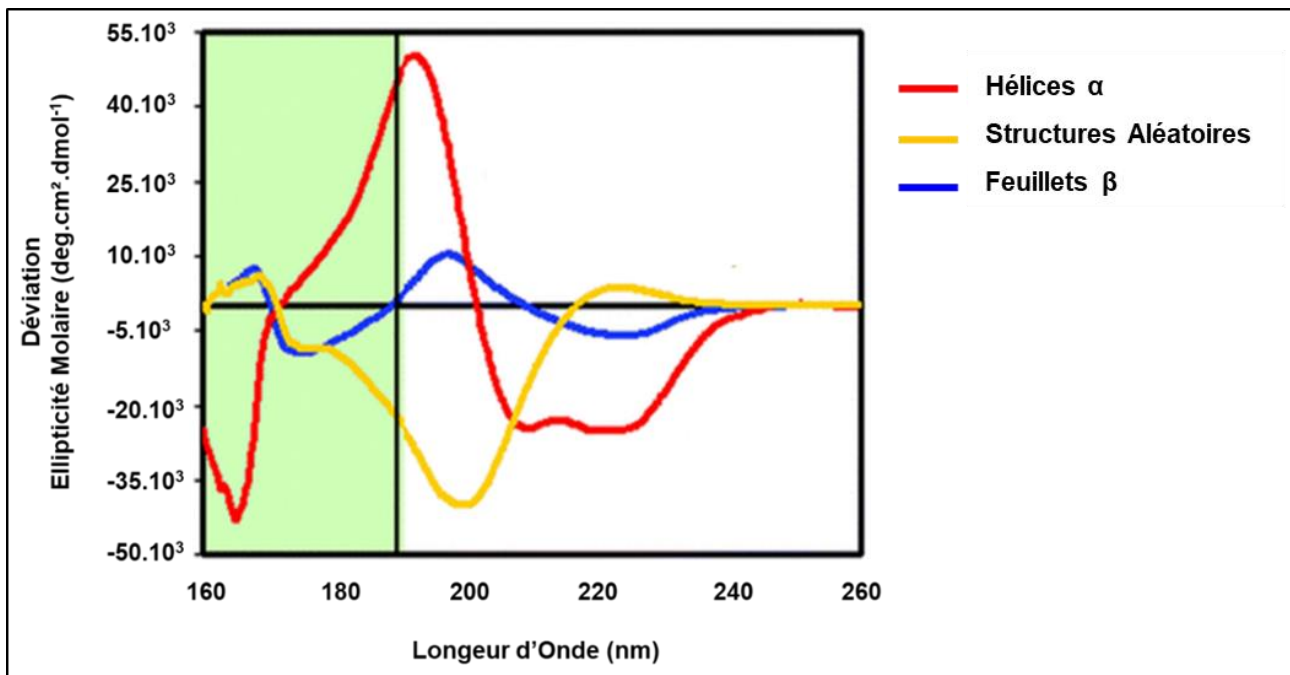


Figure 23 – Spectres DC des structures secondaires des protéines

Chacune des structures secondaires (hélices, feuilletts, ...) composant les protéines possède la capacité de dévier la lumière d'une façon spécifique définissant un spectre DC pour une protéine donnée en fonction des structures secondaires qui la compose (**Modifié d'après [507]**).

b. Conditions Expérimentales

L'acquisition des spectres de DC a été réalisée sur un spectrophotomètre CD J-810 (Jasco, Tokyo, Japon) équipé d'un contrôleur de température Peltier. Les échantillons de RAD51 dilués (4 μ M) dans un tampon phosphate (PBS) pH7.4, ont été placés dans des cuves en quartz 0,2x1cm (Hellma, Paris, France). Les signaux ont été moyennés sur 5 répétitions pour améliorer le rapport signal sur bruit. Les paramètres de mesure sont : la bande passante : 2nm ; l'intervalle : 0,1nm ; le temps de réponse 0,125s ; la température : 20°C ; la gamme de longueur d'onde : 210 à 260nm ; la distance optique : 1cm. Tous les spectres ont été corrigés par soustraction du spectre du tampon. En ce qui concerne l'observation de la thermostabilité des protéines, l'absorbance est fixée pour une longueur d'onde de 222nm et sa variation est observée en continue sur une plage de température croissante (15°C-90°C).

III- Fixation d'ADNs par Interférométrie

a. Principe

Le BLItz® (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) ou Bio-layer interferometry technology est une technique proche de la résonance plasmonique de surface (SPR). Le premier partenaire d'interaction est fixé à l'extrémité d'un tip. La fixation d'un second partenaire d'interaction contenu par exemple dans la solution où le tip est plongé, entraîne une prise de masse qui se traduit par la déviation du rayon lumineux. La mesure de sortie correspond donc à l'amplitude de la déviation dans le temps. Elle traduit l'alourdissement du complexe fixé au tip et donc de la liaison du partenaire.

b. Conditions Expérimentales

L'ADNsb poly(dT) biotinylé (100 mM) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) a été fixé sur un tip revêtu de streptavidine (**Figure 24**). Les échantillons de RAD51 (4 μ M) sont préparés dans un tampon de réaction P.A. (PBS et ATP 2mM). La cinétique d'interaction est divisée en 3 phases : ligne de base (10s), association de l'ADNsb avec Rad51 2 μ M (200s), dissociation (200s). Le tip est régénéré dans 2 bains de NaOH 50mM de 40s espacés de 2 bains de tampon P.A. de 10s avant sa réutilisation.

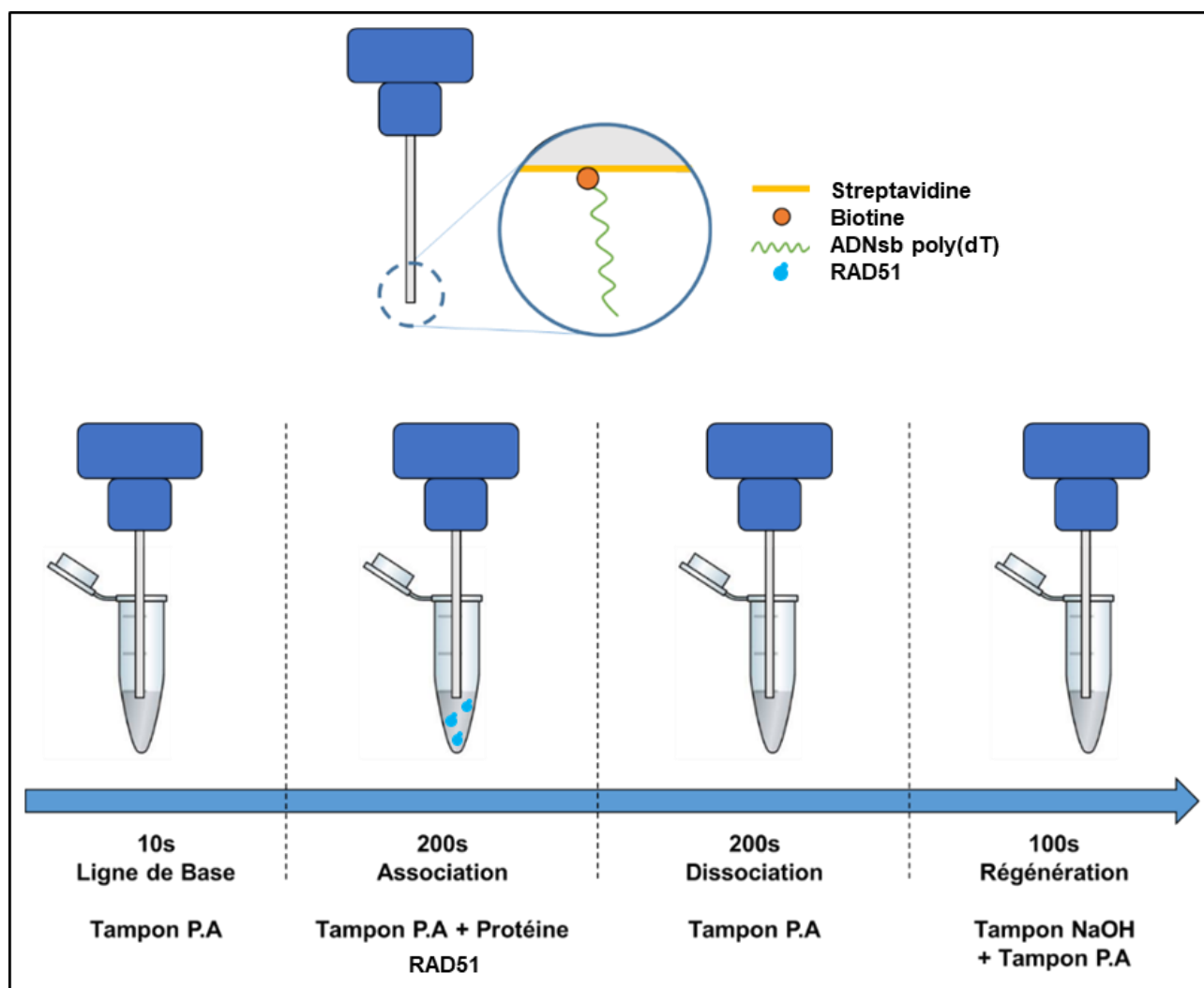


Figure 24 – Fonctionnement et d'utilisation du système d'interférométrie – BLItz®

Le principe de l'interférométrie par BLItz® repose sur la capacité qu'a l'ADNsb polydT, fixé au sensor par une liaison biotine-streptavidine, de dévier la lumière suite à la prise de masse due à la fixation des protéines de l'échantillon à l'ADN (Thèse T.Chabot, 2020).

IV- Mesure Activité Echange de brin par FRET en temps réel

a. Principe

Le test de mesure d'activité d'échange de brin par FRET (Förster resonance energy transfer) repose sur l'interaction entre deux brins d'ADN, un ADNdb marqué, ici à la rhodamine, sur l'un des brins et un ADNsb complémentaire également marqué, ici à la fluorescine. Cette interaction est ici médiée par la protéine RAD51. La réalisation de l'échange de brins se traduit

par une invasion du plasmide par RAD51 positionnant la séquence d'ADNsb marquée en face de sa séquence complémentaire. Le produit de la réaction est donc un ADNdb marqué sur chacun des brins par un système de FRET permettant de suivre en temps réel la formation de ce complexe et donc directement l'activité d'échange de brin de la protéine RAD51. Cette méthode est inspirée de celle développée par l'équipe du Professeur Iwasaki (**Figure 25**) [508].

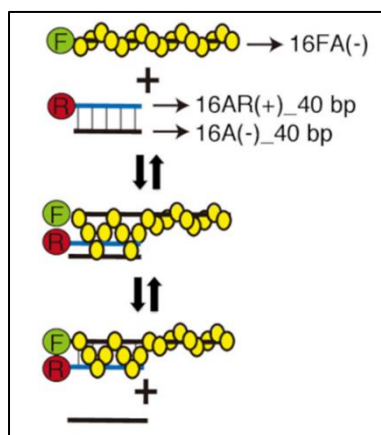


Figure 25 – Schéma du principe de mesure d'activité d'échange de brin mesuré en temps réel par FRET

16AR(+)_40bp : Séquence Nucleotidique marquée à la rhodamine en 3' ; 16A(-)_40bp : Séquence Nucleotidique complémentaire de 16AR(+)_40bp non-marquée ; 16FA(-) : Séquence Nucleotidique complémentaire de 16AR(+)_40bp marquée à la fluoresceine en 5' (Modifié d'après [508])

b. Conditions Expérimentales

Les protéines RAD51-WT ou mutantes D18 (1µM) ont été incubées avec 36nM d'ADNsb-FAM, ou 16FA dans la Figure 25 (Fluoresceine Amidite) de 100 nucléotides (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 5min à 37°C dans un tampon ATP 250µM, Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique-HEPES-KOH pH 7.5 30mM, DTT 10mM, BSA 0.1mg/mL, Glycérol 2%. L'ADNdb-ROX (Carboxy-X-Rhodamine) marqué (36nM) (Addgene, Cambridge, MA, USA), ou 16AR dans la Figure 25, est ajouté. L'intensité des signaux est mesurée en temps réel avec une excitation à 493nm et une lecture à 525nm sur le spectromètre CD J-810 (Jasco, Tokyo Japon) équipés d'un contrôleur de température Peltier. Les résultats obtenus correspondent à la formation des nouveaux complexes d'ADNdb directement corrélés avec une activité d'échange de brin dépendante de RAD51.

V- Test de D-loop

a. Principe

Le test D-loop repose sur l'interaction entre deux ADN, un ADNsb marqué et un plasmide surenroulé contenant une séquence homologue. La réalisation de l'échange de brins se traduit par une invasion du plasmide par RAD51 positionnant la séquence d'ADNsb marquée en face de sa séquence complémentaire présente sur le plasmide (**Figure 26**). Le produit de la réaction est donc un plasmide partiellement désenroulé contenant un complexe d'ADNsb et double-brin. La structure dite D-loop, marquée est plus lourde que la structure d'origine et peut

ainsi être discriminée de cette dernière car elle migre moins loin lors de l'analyse sur gel d'agarose.

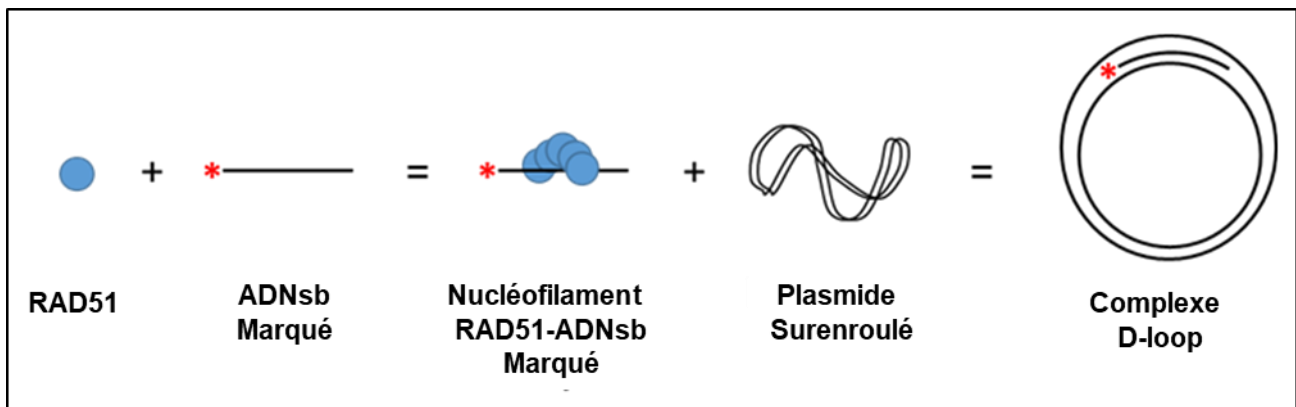


Figure 26 – Principe de mesure de formation de la D-loop

La protéine RAD51 marquée est incubée avec un ADNsB marqué afin de former un nucléofilament *in vitro*. L'ensemble est ensuite incubé avec un plasmide à ADNdb. Le complexe D-loop sera mesuré par mesure de la formation d'un complexe marquée plus lourd que l'ADNsB (Thèse T.Chabot, 2020).

b. Conditions Expérimentales

La protéine RAD51 (2 μ M) a été incubée avec 1 μ M d'ADNsB-IRD700 de 100 nucléotides (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) 20min à 37°C en présence d'ATP 1mM, Tris HCl pH8 20mM, DTT 1mM, CaCl₂ 1mM. Le plasmide sureroulé pPB4.3 (300 μ M) (Addgene, Cambridge, MA, USA) est ajouté. Après 30min à 37°C, la réaction est arrêtée par l'ajout de solution protéinase K à 1mg/mL pendant 15min (10 mM Tris–HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 1% SDS, 1 mg/mL protéinase K). Les produits d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% à 100V pendant 2h et analysés sur le scanner Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) à 700nm. L'intensité des signaux a été analysée et quantifiée avec le logiciel du scanner Odyssey Image Studio™ Lite software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à la valeur maximale de D-loop formée en présence de la protéine RAD51 sauvage.

VI- Fixation de l'ATP

a. Principe

Le 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate ou ATP-TNP est un analogue de l'ATP (Figure 27). Il possède un maximum d'absorption à 408nm et 470nm seul en solution et à 418nm lorsqu'il est complexé à une protéine [509]. La fluorescence à 550nm de l'ATP-TNP est faible en solution aqueuse et augmente dans un environnement hydrophobe tel que les poches de fixation de l'ATP des protéines.

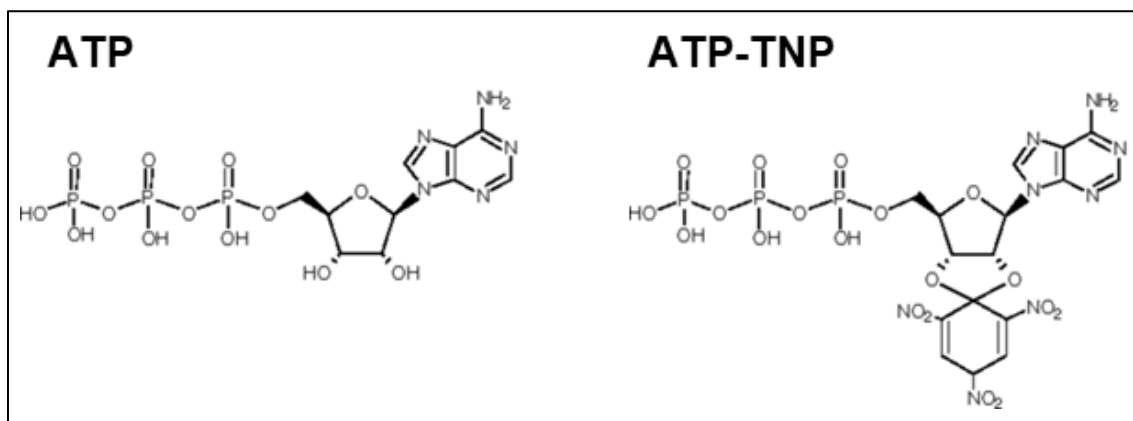


Figure 27 – Structure de l'ATP et de son analogue fluorescent l'ATP-TNP (2'(3')-o-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate)

b. Conditions Expérimentales

La fluorescence de l'ATP-TNP est mesurée par spectrofluorimétrie. RAD51 (1.5 μ M) est incubée en plaque 96 puits pendant 10min avec de l'ATP-TNP 5.2 μ M (#T4193, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) dans du Tris HCl 20mM pH8,1. La lecture de fluorescence à 550nm de l'ATP-TNP se fait par utilisation du scanner EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) avec une longueur d'onde d'excitation fixée à 420nm et la mesure du signal à une longueur d'onde d'émission fixée à 550nm. Les signaux sont moyennés sur 4 mesures.

VII- Test de Polymérisation des Protéines

a. Principe

En solution, certaines protéines ont tendance à se polymériser selon la concentration à laquelle elles se trouvent. L'utilisation de la molécule bis(sulfosuccinimidyl)suberate, ou BS3, permet de cross-linker, de lier de façon covalente, chacun des polymères formés qui sont ensuite étudiés par gel d'électrophorèse et Western Blot. Le BS3 agit en liant les amines des protéines entre elles, comme celles présentes sur la chaîne latérale de la lysine (**Figure 28**).

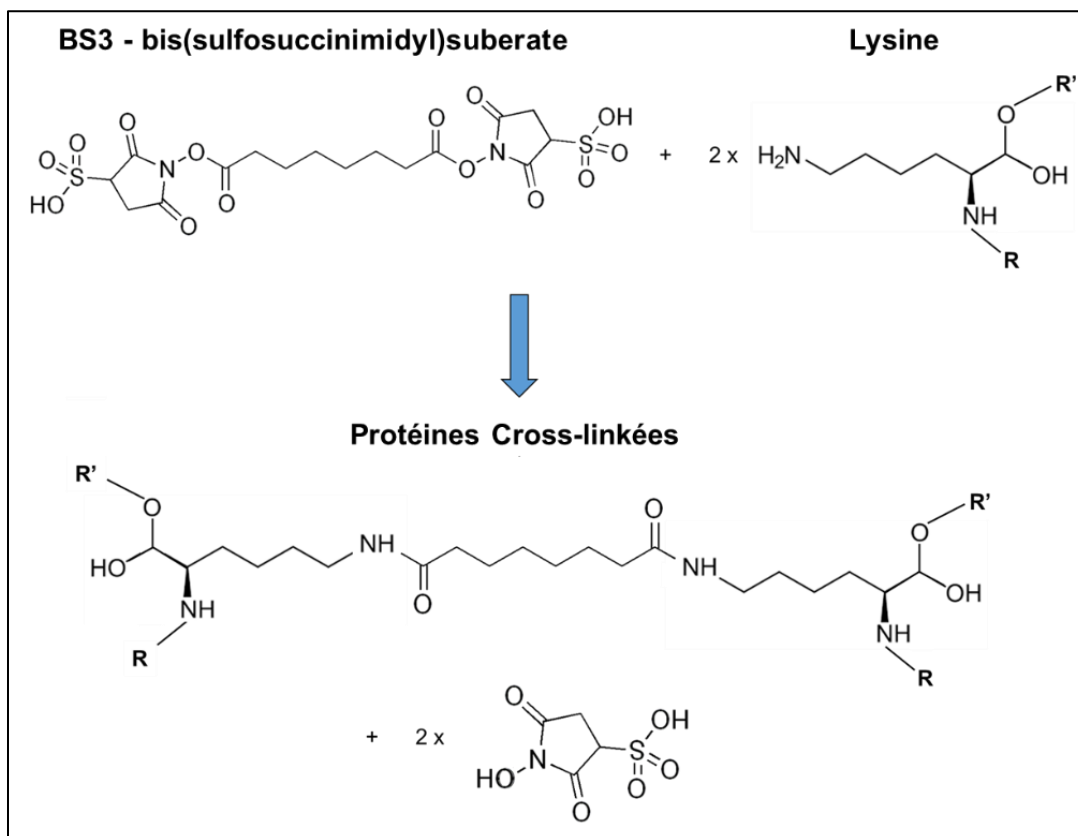


Figure 28 – Structure du BS3 et de la réaction mise en jeu lors du cross-link

b. Conditions Expérimentales

Les protéines RAD51 (10 μ M) sont incubées dans un tampon de polymérisation (Tris pH8 50mM, NaCl 500mM, Glycérol 10%, EDTA 1mM, DTT 1mM) et en présence de la molécule BS3 (2mM) (#21580, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pendant 30min à température ambiante. L'arrêt de la réaction se fait par ajout de Tris (82mM) et incubation pendant 15min à température ambiante. L'analyse des formes polymères de RAD51 cross-linkés se fait par gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie et par Western Blot. Cette technique est basée sur celle utilisée par l'équipe de Pellegrini [510]

VIII- Modélisation Structurale & Prédications *in silico*

a. Modélisation Structurale de RAD51

La modélisation de structures de la protéine RAD51 a été réalisée par l'utilisation du logiciel PyMOL 2.0 (Schrödinger, New York, NY, USA). Les structures 3D de la Protein Data Bank (PDB) 1N0W [176], 5NP7 [511] et 5NWL [188] ont été utilisées.

b. Prédications *in silico* des sites de phosphorylations de RAD51

La séquence FASTA de l'isoforme 1 de la protéine RAD51 (Q06609 – Uniprot - **cf. Annexe 5**) a été utilisée et évaluée sur 4 sites de prédiction de phosphorylation (GPS 3.0 - gps.biocuckoo.org [512], Phosphonet - phosphonet.ca - Kinexus Bioinformatics Corporation, Networkin - networkin.info [513]). Les sites de phosphorylation de RAD51 par différentes kinases ont été prédits.

IX- Phosphorylation *in vitro* de RAD51

Les protéines RAD51 (10µM) sont incubées avec les différentes kinases utilisées : c-Met (10nM) (#0171-0000-1, ProQinase, Freiburg, Germany) ou c-Abl (10nM) (#0992-0000-1, ProQinase, Freiburg, Germany) dans un tampon de réaction (60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5 ; 3 mM MgCl₂ ; 3 mM MnCl₂ ; 3 µM Na-orthovanadate ; 1.2 mM DTT ; 50 µg/ml PEG20.000) complémenté de 2mM d'ATP. Le mélange est incubé pendant 2h à 30°C. La réaction est arrêtée à -20°C. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à analyse.

X- Identification des MPT par Spectrométrie de Masse

Après séparation des protéines par gel d'acrylamide SDS-PAGE, le gel est d'abord rincé 3 fois pendant 15 min avec de l'eau distillée, afin d'éliminer le SDS. Le gel est ensuite coloré avec le Biosafe Coomassie G-250 (#1610786, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) pendant 1h à température ambiante. Après coloration, le gel est décoloré sur la nuit à l'eau distillée. Les bandes apparaissant dans le gel après décoloration sont ensuite découpées, introduites dans des tubes eppendorfs contenant une solution d'acide acétique à 10% dilué dans de l'eau distillée. Les tubes sont conservés à 4°C avant d'être envoyés à la plateforme de protéomique de l'Université Paris 5 Descartes - Plateforme Protéomique Paris 5 (3P5). Les morceaux de gel envoyés ont été digérés avec de la trypsine, selon le protocole publié avec des ajustements mineurs [514]. Le détail du protocole utilisé est à retrouver en Annexe (**cf. Annexe 6**). Les analyses par spectrométrie de masse sont effectuées avec un système nano-LC (Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatographic) couplé à un spectromètre de masse (LTQ-Orbitrap Velos), fourni par Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). L'identification des protéines a été effectuée à l'aide du serveur Mascot version 2.5.1 (Matrix Science) sur le protéome humain (20,268 séquences) à partir de la banque de données SwissProt (550.116 séquences, 196.219.159 résidus).

XI- Mise au point des puces de criblage

a. Production des puces de criblage

Les protéines RAD51 sauvages ou mutantes et les protéines contrôles de Bovin Serum Albumin ou BSA (#A2153 – Merck, Darmstadt, Germany), BSA-pTyrosine (#P3967 – Merck, Darmstadt, Germany), BSA-pSerine (#P3717 – Merck, Darmstadt, Germany), BSA-pThreonine (#P3842 – Merck, Darmstadt, Germany) et GST-SH2 (#FP-0002-SO – Biocat, Heidelberg, Germany) sont préparées à des concentrations comprises entre 0.062mg/mL et 1mg/mL dans un tampon PBS en microplaque 384 puits (Porvair Sciences, Shepperton, UK). Les protéines d'intérêts sont déposées sur les 16 pads de nitrocellulose des lames UniSART (Sartorius, Goettingen, Germany) avec l'aide d'un spotteur sciFLEXARRAYER S3 Piezo Electric Dispenser (Sciencion, Berlin, Germany). Pour l'ensemble des échantillons, six gouttes dont le volume est contrôlé par caméra (400pL/goutte), sont déposées en trois réplicats sur

chaque pad. Les dépôts sont réalisés dans une enceinte stabilisée à 25°C. Les lames ou puces sont ensuite conservées à 4°C avant leur utilisation.

b. Phosphorylation *in chip* et immunoblot sur puce de criblage

Les protéines tyrosines kinases actives c-Met (0.027 μ M) (#0171-0000-1, ProQinase, Freiburg, Germany) ou c-Abl (0.027 μ M) (#0992-0000-1, ProQinase, Freiburg, Germany) ont été incubées avec 2mM d'ATP sur chaque pad de la puce dans un tampon de phosphorylation (60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5 ; 3 mM MgCl₂ ; 3 mM MnCl₂ ; 3 μ M Na-orthovanadate ; 1.2 mM DTT ; 50 μ g/ml PEG20.000). Le mix de réaction est incubé à 37°C pendant 2h. Il est ensuite retiré et les pads sont lavés au Tris Buffer Saline-Tween20 0.1% (TBS-T). Puis, les pads sont incubés avec un anticorps anti-pTyrosine-Biotinylé (#9417, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) ; GST (#2622 – CellSignaling, Danvers, MA, USA) ou anti- RAD51 (Prestige, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) pendant 2h à température ambiante. La liste complète des différents anticorps utilisés est à retrouver en Annexe (**cf. Annexe 7**). Les lames sont ensuite lavées et incubées 1h à l'obscurité avec une solution de Streptavidine couplé à un Quantum-Dots 705nm (QD705) (#Q10161MP, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ou un anticorps secondaire couplé à un fluorophore IRDye800 (#926-32211, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Les lames sont ensuite de nouveau lavées au TBS-Tween20 0.1% et après séchage les signaux de fluorescences sont détectés au scanner Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Certaines données supplémentaires servant de contrôles sont à retrouver en Annexe (**cf. Annexe 8**).

c. Analyse de données des puces de criblage

L'intensité du signal de fluorescence est quantifiée en utilisant le logiciel GenePix Pro® 4 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Pour chacun des spots, la médiane d'intensité de fluorescence est déterminée après soustraction du bruit de fond. Les résultats présentés sont normalisés et exprimés en taux moyen de fluorescence en comparaison des protéines contrôles. L'analyse des données est réalisée avec une interface Galaxy.

XII- Culture Cellulaire & Transfection

Les lignées cellulaires utilisées dans les expériences présentées dans ce manuscrit sont les lignées cancéreuses prostatiques PC-3 et DU145 (ATCC - American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) et fibroblastique RG37 cultivées dans du milieu DMEM ou RPMI complété avec du SVF et un couple d'antibiotique Penicilline/Streptomycine, à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. Le choix des lignées cellulaires utilisées a été fait en fonction des lignées les plus adaptées à l'activation ou non du récepteur c-Met. Ceci afin de faire un comparatif entre un récepteur physiologiquement actif (PC-3) ou non (DU145) [515] et ainsi observer son impact sur la RH dans des systèmes semblables. Pour ces raisons, les lignées cellulaires les mieux adaptées ont été les cellules DU145 et PC-3. Les produits utilisés pour la

culture cellulaire sont : Dulbecco's Modified Eagle Medium, ou DMEM (#11965084, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [516], Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, ou RPMI 1640 (#21875091, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [517], [518], Sérum Fœtal de Veau (SVF) (#16000044, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Antibiotiques Peniciline et Streptomycine (#11548876, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline - PBS (#15326239, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Les transfections ont été réalisées avec de la lipofectamine (#11668019, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pour un ratio ADN:Lipofectamine 1µg:3µL. La transfection d'un puits de plaque 6 ou 12 puits contenant 2mL de milieu et des cellules DU145, PC-3 ou RG37 à 75% de confluence est réalisée avec un mélange de 300µL d'OptiMEM (#11524456, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 3µg d'ADN plasmidique codant pour HA-RAD51 ou I-SceI (Addgene, Cambridge, MA, USA) et 12µL de lipofectamine. Dans le cas des conditions contrôles le même mélange est réalisé sans ADN. Le mix de transfection est ajouté par goutte-à-goutte dans le milieu de culture et incubé pendant 24h. Les cellules sont ensuite lavées au PBS et le délai de récupération des cellules avant traitement est de 24h après transfection.

XIII- Traitements Cellulaires Réalisés

Différents traitements ont été mis au point sur les cellules DU145 et PC-3. Tout d'abord, des traitements au HGF-SF (50ng/mL) (#H9661-5UG, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) pendant une période de 0 à 24h d'incubation. Ce traitement est nécessaire pour l'activation du récepteur c-Met surexprimé naturellement dans les cellules DU145 mais inactif. En revanche, il est exprimé et actif dans les cellules PC-3 [515]. Ensuite, la camptothécine (10µM) (#S1288, Selleckchem, Houston, TX, USA) est utilisée pendant 1h sur les cellules pour inhiber la Topoisomérase I et induire des cassures double-brin dans le génome cellulaire. Après un repos de 0 à 4 heures sans camptothécine, les cellules sont rincées au PBS. Des traitements avec des inhibiteurs ATP compétitifs spécifiques de la kinase c-Met, PHA665752 (100nM) (#S1070, Selleckchem, Houston, TX, USA) [519] et au BMS777607 (100nM) (#S1561, Selleckchem, Houston, TX, USA) [520] pendant 2 heures ont aussi été réalisés. Leur mode d'interaction et leur modélisation au sein du domaine tyrosine kinase de c-Met avec la kinase est à retrouver en Annexe (*cf. Annexe 9*).

XIV- Quantification de l'efficacité de réparation des CDB de l'ADN par RH *in cellulo* par Comet Assay

a. Principe

Le test par Comet Assay est une technique simple et sensible pour détecter des lésions, des dommages/réparations de l'ADN génomique des cellules eucaryotes [521], [522]. Elle consiste à lyser des cellules encapsulées dans une suspension d'agarose, avec un détergeant dans des conditions neutres (CDB) ou alcalines (CSB et CDB) selon les dommages voulant être

observés (respectivement pH=7 et pH>13). Une électrophorèse des cellules lysées en suspension est réalisée. Le terme « comète » désigne le schéma de migration de l'ADN fragmenté à travers le gel d'agarose. Elles sont observées au microscope à fluorescence après marquage (**Figure 29**). L'intensité et la taille de la queue de la comète par rapport à la tête est proportionnelle à la quantité de dommages subis. Le scoring en découlant est réalisé automatiquement par le logiciel d'imagerie Lucia Comet.

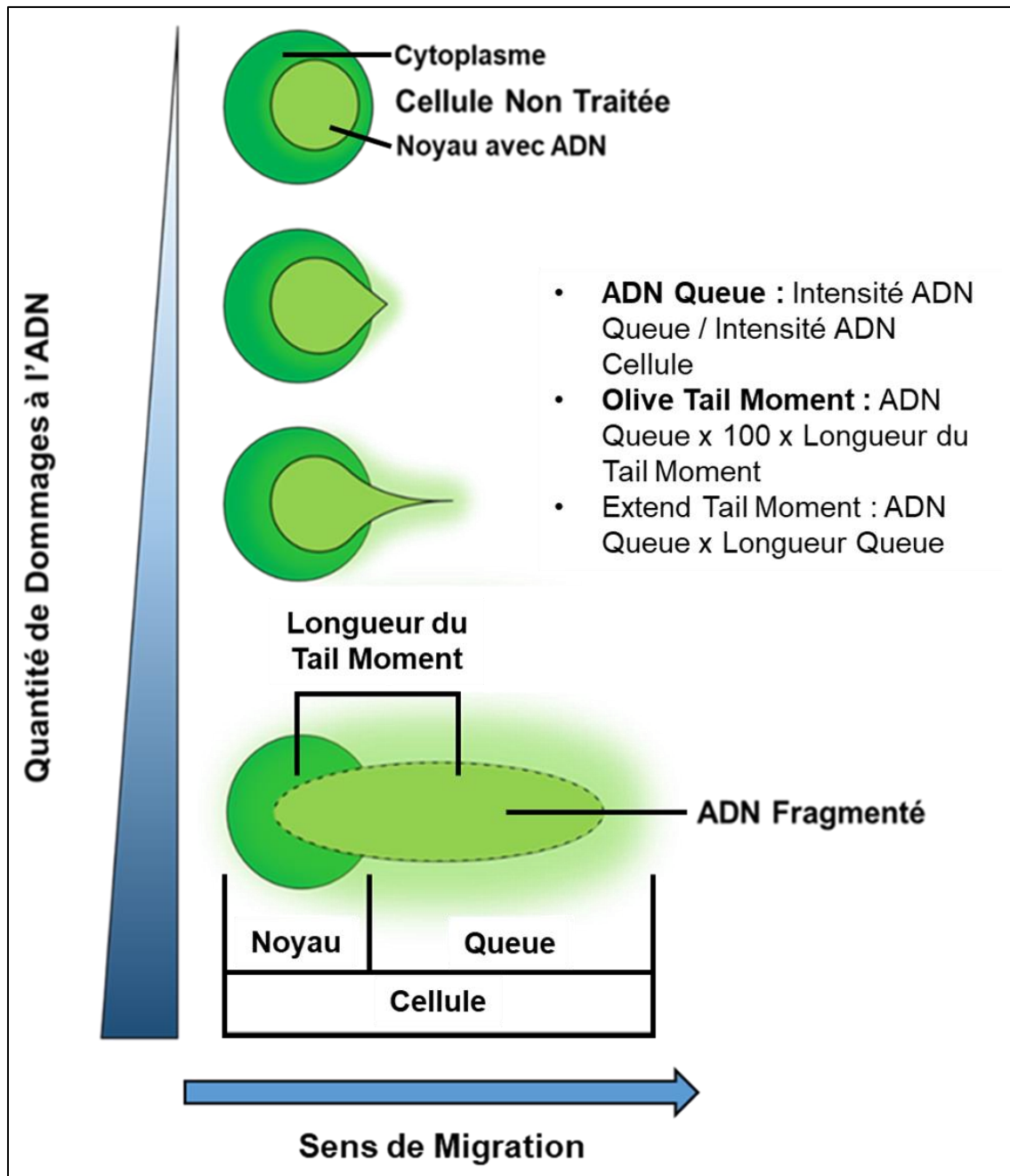


Figure 29 – Fonctionnement du test Comet et calcul du Tail Moment

Une fois les dommages génomiques réalisés, l'ADN migre dans le gel d'électrophorèse hors du noyau cellulaire formant une « comète » dont l'intensité et la taille est mesurée. Plus les dommages sont importants, plus la « comète » sera grande (*Thèse T.Chabot, 2020*).

b. Conditions Expérimentales

Les cellules sontensemencées en plaque 12 puits dans 1mL de milieu. Après 24 heures d'incubation (confluence à 80%), les cellules sont traitées comme décrit précédemment (**cf. Chapitre 2.XIII**). En parallèle, les lames d'agarose 1% sont préparées et stockées à température ambiante ainsi que les solutions d'immersion, de lyse et d'électrophorèse. Le surnageant cellulaire est retiré et les cellules sont rincées au PBS avant d'être décollé par action de la trypsine pendant 5 minutes à 37°C. Après l'ajout de milieu les cellules sont récupérées et centrifugées 5 minutes à 800rpm. Le culot est rincé au PBS et resuspendu dans le PBS. 50µL de chaque suspension cellulaire est mélangée à 500µL d'agarose 0.7% (1:10) et déposée sur les lames comètes. Les lames sont incubées 30 minutes à 4°C à l'obscurité, puis ensuite immergées dans le tampon de lyse (NaCl 2.5M, EDTA 100mM ; Tris Base 10mM ; N-Lauroylsarcosine 1% ; Triton X-100 1%) 2 heures à 4°C. Elles sont ensuite placées à équidistance des deux électrodes et incubées dans la solution d'électrophorèse alcaline. La migration dure 40 minutes à 300mA. Les lames sont retirées et lavées dans deux bains de 5 minutes avec du tampon de neutralisation (Tris Base pH=7.5 0.4M). Ensuite, elles sont immergées dans l'éthanol 70% pendant 10 minutes puis séchées 10 minutes à température ambiante. Le marquage se fait par utilisation de SYBR® Green (#4367659, Life Technologie - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dilué au 10000^{ème} dans du tampon T.E. (Tris-HCl pH7.5 10mM ; EDTA 1mM) pendant 30 minutes avant séchage. Après 24 heures, les lames sont analysées par microscopie à fluorescence au microscope Nikon Eclipse Ni-E (Nikon, Tokyo Japon). La quantification des signaux de fluorescence a été faite en utilisant le logiciel CometScore.

XV- Quantification de l'efficacité de réparation des CDB de l'ADN par RH *in cellulo* par Cytométrie en Flux

a. Principe

La lignée RG37 a été transfectée stablement avec une construction appelée « HR Reporter Assay » ou « cassette GFP » [523]. La construction nous a été généreusement fournie par le Dr. Bernard Lopez (IGR, Paris). La séquence insérée dans le génome cellulaire est composée d'une cassette iGFP (inactive Green Fluorescent Protein) et d'une cassette GFP non-fonctionnelle mutée par un site de restriction visé par l'endonucléase I-SceI (I-SceI-GFP) (**Figure 30**). Une transfection du plasmide codant pour cette endonucléase (pCBA-HA-I-SceI) est alors réalisée. La coupure réalisée par l'enzyme forme une cassure double-brin unique par cellule (**Figure 30**). Le détail des constructions plasmidiques est à retrouver en Annexe (**cf. Annexe 10**). Si le mécanisme de réparation par recombinaison homologue est utilisé, la séquence GFP inactive est utilisée comme modèle. La réparation par RH réhabilite la cassette GFP et l'expression de la protéine fluorescente (**Figure 30**). Le taux de réparation des cassures est alors mesuré par cytométrie en flux. La quantité de cellules fluorescentes reflète

l'efficacité de la réparation des cassures double-brin induites par l'expression d'I-SceI. Elle est directement proportionnelle au nombre de cellules ayant réparé la cassette GFP grâce à la RH.

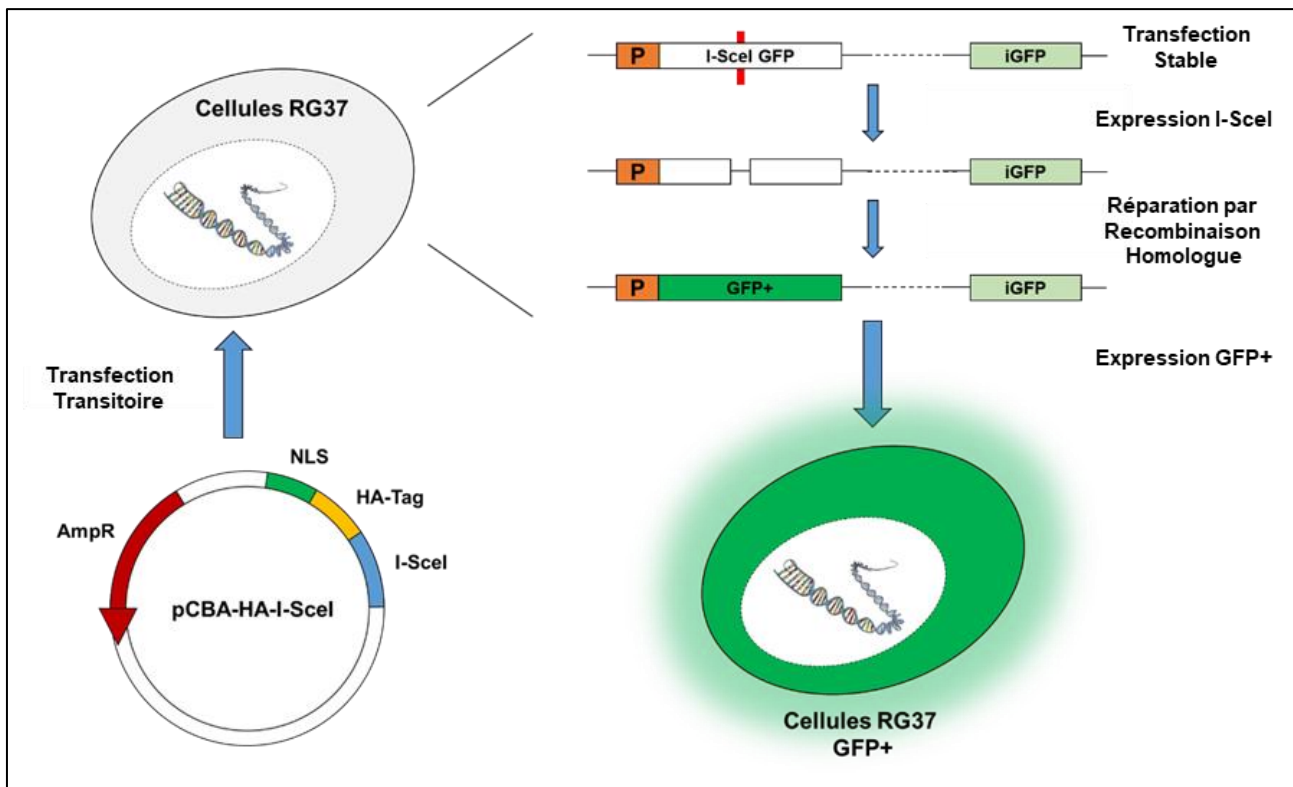


Figure 30 – Principe de fonctionnement de la quantification de la recombinaison homologue in cellulo

Des cellules possédant une séquence GFP inactive avec un site de clivage I-SceI sont transfectées transitoirement avec un plasmide codant pour l'endonucléase (I-SceI) capable de couper le gène cible. Si la réparation par recombinaison homologue est active, la cassette GFP intégrée est alors réhabilitée et les cellules expriment le marqueur fluorescent (*Thèse T.Chabot, 2020*).

b. Conditions Expérimentales

Les cellules RG37 sont ensemencées en plaque 12 puits et pré-traitées 24h après au HGF-SF (50ng/mL pendant, 24h). Puis, elles sont transfectées avec le plasmide pCBA-HA-I-SceI codant pour l'endonucléase fonctionnelle I-SceI. La transfection est réalisée avec la Lipofectamine2000 (#11668019, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dans les mêmes conditions que décrites précédemment (*cf. Chapitre 2.XII*). L'expression d'I-SceI génère une cassure double-brin unique. Son expression est contrôlée par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre le Tag-HA de l'endonucléase. La cassure entraîne la stimulation de la réparation par HR. Le signal GFP est mesuré 72h post-transfection au cytomètre en flux CytoFLEX (Beckman Counter, Brea, CA, USA). Pour chaque expérience, 10.000 cellules sont dénombrées, et le pourcentage de recombinaison est évalué en comparaison du nombre de cellules GFP-positives (GFP+) du contrôle des cellules RG37-I-SceI transfectées.

XVI- Evaluation de la transcription par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

La RT-qPCR (Real Time-quantitative Poly-Chain Reaction) est une technique qui permet de faire une PCR (Poly-Chain Reaction) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord extrait des cellules à l'aide d'un kit (Kit RNeasy® Mini, #74104, Qiagen, Hilden, Allemagne) puis rétro-transcrit grâce à la transcriptase inverse du kit GoScript RT (#A5003, Promega Corporation, Madison, WI, USA) en présence de MgCl₂ 25mM, oligo(dT)₁₅ Primer (#C1101, Promega Corporation, Madison, WI, USA), dNTP Mix 10mM (#U1515, Promega Corporation, Madison, WI, USA), Recomb Rnasin Ribonuclease Rnhibitor #N2515, Promega Corporation, Madison, WI, USA), QSP Nuclease free water). La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) est réalisé dans un thermocycleur au cours d'un cycle d'environ une heure (25°C/5min, 42°C/1h, 72°C/10min). Une PCR quantitative est ensuite réalisée (95°C/15sec, 40 cycles : 95°C/30sec, 60°C/30sec). Cette méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permet de quantifier l'ADN initial, en mesurant à chaque cycle le nombre d'amplicon d'intérêt. La portion d'ADN produit par un couple d'amorces est comparée à celle d'un couple d'amorce d'un gène de référence. Nous utilisons ici comme référence le gène codant pour la protéine du ribosome 60S RPL13a. Voici les amorces utilisées : for-RPL13a 5' – CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA – 3' ; rev-RPL13a 5' – TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A – 3' ; for-RAD51 5' – GAA TTC CAC CAA AGG CGG TCA GA – 3' ; rev-RAD51 5' – CAC CTC CAC CCC GGT CAA TC – 3'. Les réactions ont été réalisées grâce à l'utilisation du kit GoTaq® qPCR Master Mix (#A6002, Promega Corporation, Madison, WI, USA) et du système de détection CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System de Biorad. L'analyse des données et l'évaluation de la transcription ont été faites en utilisant le logiciel CFX Maestro Analysis Software, en comparaison du gène de référence.

XVII- Extraction Protéique & Fractionnement Cellulaire

a. Extraction de Protéines Totales

Les cellules DU145 sontensemencées en plaque 6 puits dans 2mL de milieu RPMI. Après 24h d'incubation les différents traitements cellulaires précédemment cités sont réalisés. Les cellules sont ensuite rincées au PBS et incubées avec 100µL de tampon de lyse (CellSignaling Lysis Buffer 10X 1/10^{ème} ; Fluorure de phénylméthylsulfonyle-PMSF 200mM 1/100^{ème} ; Cocktail Inhibiteur Protease 1/1000^{ème} ; Cocktail Inhibiteur Phosphatase 1/1000^{ème} ; DNAase 1/500^{ème}) pendant 30 minutes sous agitation sur la glace. Les cellules sont ensuite récupérées par grattage mécanique, soniquées et centrifugées à 10.000rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et le dosage protéique se fait par coloration de Bradford et mesure d'absorbance de la solution obtenue à 595nm en parallèle d'une gamme étalon de concentration protéique connue [524].

b. Fractionnement des Compartiments Cytoplasmique & Nucléaire

Comme précédemment, les cellules sontensemencées en plaque 6 puits dans 2mL de milieu RPMI. Après 24h d'incubation, les différents traitements cellulaires précédemment décrits sont réalisés. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis récupérées par grattage mécanique dans 1mL de PBS complémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (1/1000^{ème}, #P8340, #P004, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Elles sont ensuite centrifugées 5 minutes à 1500rpm. Le surnageant est retiré et 200µL de tampon de lyse A au 1/100^{ème} (Acide pipérazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique)-PIPES 5 mM pH= 8,0 ; KCl 0,086M ; Nonyl-phenoxy polyéthoxyéthanol-NP40 0,5% ; Inhibiteurs protéases (#P8340, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA)) sont ajoutés avec les inhibiteurs de phosphatases (#P0044, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) au 1/100^{ème} et du PMSF 1mM au 1/200^{ème}. Après homogénéisation et centrifugation 5 minutes à 5000rpm à 4°C, le surnageant récupéré correspond à la fraction cytoplasmique. Le culot est quant à lui lavé doucement dans 500µL de PBS et de nouveau centrifugé 5 minutes à 5000rpm à 4°C. Après avoir retiré le surnageant, il est incubé dans 150µL de tampon de lyse B (CellSignaling Lysis Buffer 10X 1/10^{ème} ; Cocktail Inhibiteurs protéases (#P8340, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) 1/1000^{ème} ; Cocktail Inhibiteurs phosphatases (#P004, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) 1/1000^{ème} ; PMSF 1 mM 1/200^{ème} ; DNAase 1/500^{ème}). Après 10 minutes d'incubation, l'extrait est soniqué et centrifugé 10 minutes à 14.000g à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction nucléaire est alors récupéré. Les concentrations protéiques des différents extraits sont déterminées par dosage de Bradford.

XVIII- Séparation des Protéines par Electrophorèse & Western Blot

Les extraits protéiques obtenus sont dilués au 1/4 avec le tampon de charge protéique de dénaturation de Laemmli ou bleu de Laemmli [525] et dénaturés à 90°C pendant 5 min. Des quantités équivalentes en protéines sont déposées pour chaque extrait dans les puits de gels d'acrylamide SDS-PAGE, à différents pourcentages d'acrylamide selon la taille des protéines étudiées (de 8% à 12%). Après migration et séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham - GE Healthcare, Chicago, IL, USA). La membrane est ensuite bloquée avec une solution de saturation (5% de BSA dans du TBS-Tween 20 0,1%) pendant 1h à température ambiante. Après un rinçage avec du tampon de lavage (TBS-T 0,1%), la membrane est incubée une nuit à 4°C avec une solution d'anticorps primaires (dilués dans du tampon de lavage avec 1% BSA) dirigés contre la protéine ou la modification post-traductionnelle d'intérêt. Après trois rinçages, la membrane est ensuite incubée pendant 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé avec un fluorophore Alexa fluor ou IRDye (dilué au 1/10000^{ème} dans le tampon TBS-T, 1% BSA). La liste complète des différents anticorps utilisés est détaillée en Annexe (**cf. Annexe 7**). Après trois rinçages, les bandes immunoréactives ont été révélées et quantifiées à l'aide d'un scanner Odyssey

Infrared Imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) à 700nm ou 800nm selon le fluorophore couplé à l'anticorps secondaire. Les analyses densitométriques des bandes observées ont été effectuées avec le logiciel Image Studio™ Lite software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

XIX- Immunofluorescence

Les cellules DU145 et PC-3 sont cultivées directement sur des lamelles en verre dans du RPMI. Les lamelles sont lavées dans du PBS 1X puis incubées dans une solution de fixation d'éthanol absolu pendant 25 minutes. Puis elles sont incubées 45 minutes à température ambiante avec un anticorps primaire dilué au 1/1000ème dans du PBS-BSA 1%. Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS, les lamelles sont mises en présence d'anticorps secondaires dilués au 1/1000ème dans du PBS-BSA 1% couplé à des fluorophores Alexa 555 ou 488 selon l'épitope. La liste complète des différents anticorps utilisés est détaillé en Annexe (**cf. Annexe 7**). Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS, les lamelles sont incubées dans une solution de 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, ou DAPI (#10236276001, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) pendant 10min puis disposées sur des lames avec une goutte de Prolong® (#P36930, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les lames sont laissées à sécher 24h minimum à l'obscurité avant observation au microscope à fluorescence Nikon Eclipse Ni-E (Nikon, Tokyo Japon). Elles sont ensuite observées au microscope confocal présent sur la plateforme d'imagerie cellulaire MicroPICell : NIKON A1 RSi (Nikon, Tokyo Japon). Le dénombrement des foyers de réparation de protéine RAD51 est réalisé de manière automatique grâce à une macro informatique développée par la plateforme MicroPICELL. Le nombre de foyers RAD51, définis par logiciel comme ayant une certaine intensité de signal émi à une certaine longueur d'onde, est compté au sein de chaque noyau des cellules présentes sur l'image, lui-même définit par une certaine intensité de signal émi à autre longueur d'onde. Une fois le nombre de foyer défini pour chaque cellule, une moyenne du nombre de foyer RAD51 est faite sur au moins 20 noyaux pour chaque condition, et comparée à la condition contrôle sans traitement.

XX- Analyses Statistiques

Chaque expérience a été répétée au moins 3 fois de façon indépendante. Les données expérimentales sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type (SD). Pour comparer deux groupes de données, un test de Student pour échantillons appariés a été effectué. Une p-value inférieure à 0,05 est considérée comme significative.



Troisième Partie :

Résultats

Avant-propos des résultats

Une régulation fine de l'activité de RAD51 est essentielle pendant la RH. Suite à un criblage de phosphorylation in vitro réalisé par radiométrie de plus de 80 tyrosines kinases (récepteurs ou solubles), 53 phosphorylent de manière significative RAD51, et parmi les meilleures candidates, on trouve le récepteur à activité tyrosine kinase c-Met. Par comparaison, la kinase c-Abl, décrite comme phosphorylant 2 sites de la protéine RAD51 (Y54 & Y315) a aussi été retrouvée dans ce criblage et le taux de phosphorylation est deux fois moins important que pour notre récepteur. En couplant toutes ces données à celles de la littérature, notre choix s'est donc porté sur le récepteur c-Met parmi les candidats possibles.

Au cours de ces résultats, nous cherchons à répondre à différentes questions. La protéine RAD51 peut-elle être phosphorylée par la kinase c-Met ? Qu'impliquent ces phosphorylations sur l'activité intrinsèque de la recombinaise ? Ces phosphorylations sont-elles retrouvées dans la cellule ? Le cas échéant, que provoque une activation du récepteur c-Met sur l'activité de RAD51 et de manière plus générale sur la réparation des CDB par RH ? L'objectif est donc d'avoir une vision moléculaire et cellulaire du lien entre le RTK, RAD51 et la RH. Il est en revanche important de préciser que l'étude d'une modification post-traductionnelle telle que la phosphorylation est particulièrement difficile. En effet, cette modification post-traductionnelle est très labile et n'est jamais homogène ou totale sur la population de protéines visées. Les protéines observées sont donc de qualité hétérogène et leurs modifications post-traductionnelles sont compliquées à analyser à un instant donné.

Afin de mettre en lumière de nouveaux sites de phosphorylation de RAD51 par c-Met, la stratégie adoptée a été de créer une série de 10 mutants non-phosphorylables afin d'observer des changements dans l'état de phosphorylation des protéines RAD51 par la tyrosine kinase c-Met. Cette méthode a été complétée par différentes expériences biochimiques et biophysiques. L'objectif a été d'être le plus précis possible dans la mise en évidence de nouvelles phosphorylations sur RAD51 et leur impact sur son activité. Ainsi, nous avons créé en parallèle un système de criblage à moyen débit des sites de phosphorylation de la protéine RAD51. L'impact plus global de l'activation du récepteur sur la réparation des CDB par RH a également été évalué afin de mieux comprendre le développement et la résistance tumorale dans des conditions cellulaires. À cette étude de la régulation de RAD51 par c-Met s'ajoute un projet mené en collaboration entre le laboratoire de l'UFIP de Nantes et l'Institute of Innovative Research de Tokyo. En effet, la régulation de RAD51 ne passe pas uniquement par des MPT mais aussi par l'action de cofacteurs. Ce projet a eu pour objectif de comprendre la modulation de l'activité recombinaise de RAD51 par différents ions bivalents.

Ces différentes questions m'ont conduit à diviser mon travail de thèse en 4 principaux axes. Premièrement, nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de la protéine RAD51 par le récepteur c-Met et l'effet de ces modifications sur l'activité intrinsèque de RAD51 in vitro.

Cette partie comporte également une étude structure-activité des mutants non-phosphorylables de RAD51 utilisés. Deuxièmement, nous avons réalisé la mise en place d'un nouvel outil de criblage des sites de phosphorylation de RAD51 par des tyrosines kinases. Troisièmement, nous avons cherché à montrer un impact de l'activation du récepteur c-Met sur la protéine RAD51 et la réparation des CDB par RH dans différentes lignées de cellules tumorales. Quatrièmement, nous avons initié une étude quant à la modulation de l'activité de RAD51 par différents ions bivalents. La finalité de ces différentes approches est de comprendre davantage la régulation de RAD51 au cours de la RH, en particulier celle induite par le récepteur c-Met.

Chapitre 1 – La phosphorylation de la recombinaise RAD51 par le récepteur c-Met et l'impact sur son activité *in vitro*

Le récepteur c-Met a été décrit comme étant un modulateur des mécanismes de la recombinaison homologe. Des recherches ont montré qu'il pouvait modifier l'activité de différents acteurs de ce système de réparation et notamment la protéine RAD51. La plupart des études menées impliquent une inhibition de c-Met menant à une diminution de la translocation nucléaire de RAD51 sans doute due à une synergie de 2 phénomènes : la diminution de synthèse de la protéine RAD51 et de son interaction avec la protéine BRCA2. Le récepteur c-Met étant un récepteur à activité tyrosine kinase, on peut s'attendre à ce qu'il phosphoryle RAD51 sur certains résidus tyrosines qui sont potentiellement impliqués dans l'interaction RAD51-BRCA2. Cette première partie a donc pour objectif de non seulement mettre en lumière une possible phosphorylation de RAD51 par c-Met, mais également d'expliquer en quoi cette modification de la recombinaise par le récepteur peut moduler son activité.

a. Phosphorylation de RAD51 et criblage des sites

i. Mise en évidence d'une phosphorylation *in vitro*

La première étape a été de montrer que c-Met était capable de phosphoryler spécifiquement RAD51 *in vitro*. La réaction se fait en présence du domaine tyrosine kinase actif de c-Met, de RAD51 et d'ATP à 37°C. Comme nous pouvons l'observer (**Figure 31A**), en absence de kinase active ou d'ATP, aucune forme phosphorylée de RAD51 n'est détectée par l'anticorps anti-phosphotyrosine. Dans les mêmes conditions, l'incubation avec la kinase c-Met dénaturée thermiquement, ne génère aucune bande phosphoprotéique après immunoblotting suggérant que l'activité kinase de c-Met est à l'origine de l'apparition de forme(s) phosphorylée(s) de RAD51 (**Figure 31A**). Dans tous ces cas, nous observons la présence d'une protéine révélée par l'anticorps RAD51 à 37kDa, et en quantité équivalente (**Figure 31A**). Par contre, en présence de RAD51, d'ATP et de kinase active, la protéine révélée par l'anticorps RAD51 à 37kDa est également mise en évidence par l'anticorps anti-phosphotyrosine. La superposition et la comparaison des signaux de RAD51 et des phosphotyrosine-protéines montrent que la(es) forme(s) phosphorylée(s) observée(s) correspon(den)t à RAD51. Il est à noter un léger décalage de la forme phosphotyrosine pouvant être expliqué par l'ajout des groupements phosphate sur la protéine RAD51 la rendant légèrement plus lourde (**Figure 31A**). Ce résultat montre clairement que l'activité kinase du récepteur c-Met phosphoryle *in vitro* la protéine RAD51.

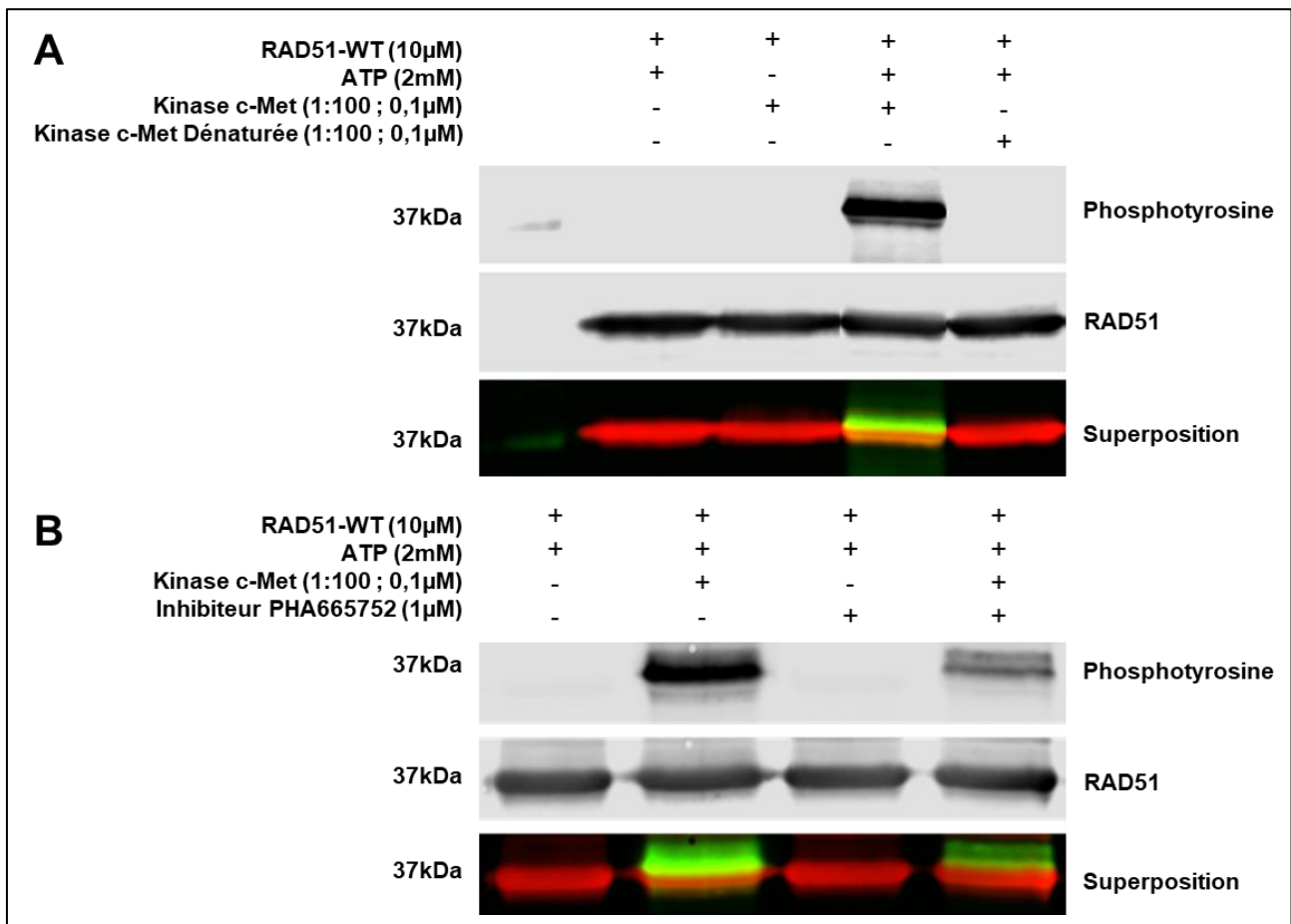


Figure 31 – Phosphorylation in vitro spécifique de la recombinase RAD51 par la kinase c-Met

(A) La protéine RAD51-WT purifiée (10µM) a été incubée avec de l'ATP (2mM) et avec ou sans la partie C-terminale active de la kinase c-Met (0,1µM) dénaturée thermiquement ou non. Les protéines ont ensuite été séparées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% acrylamide et analysée par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes phosphotyrosine (vert) ou les protéines RAD51 (rouge). (B) La même expérience a été réalisée avec ou sans inhibiteur spécifique de la kinase c-Met : le PHA665752 (1µM). Chacune des expériences a été réalisée trois fois de façon indépendante et les blots présentés correspondent à une expérience représentative (Modifié d'après Chabot et al., 2019 - cf. Annexe 15).

Pour lever toute ambiguïté et confirmer la(es) phosphorylation(s) spécifique(s) de RAD51 par c-Met, nous avons utilisé un inhibiteur ATP-compétitif spécifique du récepteur à activité tyrosine kinase, le PHA665752 [526]. Comme précédemment, nous observons une forme phosphorylée de RAD51 en présence de c-Met active et l'ATP (Figure 31B). En revanche, lorsque l'inhibiteur PHA665752 est ajouté et incubé avec le mélange RAD51, l'ATP et la kinase c-Met active, une forte diminution de l'intensité de la forme(s) phosphorylée(s) de RAD51 à 37kDa est observée par comparaison à la phosphorylation sans inhibiteur (Figure 31B). Après quantification, nous estimons à 60% la diminution de la forme phosphorylée. La superposition des signaux révélés par les anticorps dirigés contre la protéine RAD51 et les formes phosphotyrosines montrent bien une phosphorylation spécifique de RAD51 par la kinase c-Met (Figure 31B). Nous pouvons observer que plusieurs bandes sont révélées avec l'anticorps anti-phosphotyrosine, ce qui suggère qu'il existe plusieurs formes phosphorylées

de RAD51 médiées par c-Met. L'ensemble de ces résultats confirme que c-Met phosphoryle RAD51 *in vitro* et probablement sur plusieurs résidus tyrosines.

ii. Localisation de la phosphorylation de RAD51 par c-Met.

Il nous a semblé intéressant et indispensable de déterminer quel(s) est (sont) le(s) résidu(s) tyrosine(s) de RAD51 visé(s) par la kinase c-Met. Pour être le plus précis possible, différentes techniques ont été utilisées. Tout d'abord, nous avons réalisé une prédiction *in silico* des sites visés par c-Met sur RAD51.

1. Les résidus de RAD51 phosphorylés par c-Met *in silico*

La séquence de RAD51-Isoforme 1 a été chargée sur 3 logiciels de prédiction de phosphorylation (GPS 3.0, Phosphonet, Networkin). Les données recueillies ont été compilés dans le tableau suivant (**Tableau 3**). Les sites indiquent que plus de la moitié des tyrosines de RAD51 (6/10) peuvent être potentiellement phosphorylé par la kinase c-Met : les tyrosines Y159, Y178, Y191, Y205, Y301 et Y315. Nous pouvons d'ailleurs observer que la tyrosine Y315 est retrouvée comme potentiellement phosphorylable par c-Met quelque soit le logiciel utilisé.

Kinase	Substrat	Site de Phosphorylation Prédit			
Prédiction GPS 3.0					
c-Met	RAD51	Y205			
		Y315			
Prédiction Phosphonet					
c-Met	RAD51	Y159			
		Y191			
		Y205			
		Y301			
		Y315			
Prédiction Networkin					
c-Met	RAD51	Y178			
		Y191			
		Y301			
		Y315			
Compilation Prédiction Bioinformatique					
Y159	Y178	Y191	Y205	Y301	Y315

Tableau 3 – Compilation des 6 sites de phosphorylation de RAD51 visés par c-Met mis en avant par approche *in silico*

Avec l'utilisation des logiciels GPS 3.0, Networkin and Phosphonet, il a été possible de prédire différents sites de phosphorylation de RAD51 par c-Met en utilisant la séquence FASTA de RAD51. Le tableau représente la compilation de tous les sites possibles de phosphorylation basée sur le système de score propre à chacun des logiciels.

2. Etude de l'impact d'une mutation Y/F sur la structure et la fonction de RAD51

Un criblage *in vitro* a ensuite été mis en place pour confirmer expérimentalement les prédictions bioinformatiques. Pour cela, notre stratégie a été d'établir des mutants non-phosphorylables en remplaçant un résidu tyrosine par un résidu phénylalanine. RAD51 étant composé de 10 résidus tyrosine, nous avons ainsi produit et purifié 10 mutants RAD51. Il nous a semblé important de vérifier la qualité des protéines RAD51 mutantes Y/F utilisées pour notre étude. Nous avons donc réalisé une étude structure-fonction des protéines RAD51 mutantes Y/F en comparaison de la protéine RAD51 sauvage. Ceci afin d'observer l'impact des mutations Y/F sur la structure ou les fonctions intrinsèques de la protéine RAD51. Trois aspects des protéines sont étudiés. Leur structure secondaire, leur capacité à polymériser et leur capacité à fixer l'ATP. Ces trois caractéristiques sont parmi les plus essentielles à l'activité de la protéine RAD51 au cours de la RH.

a. Structure secondaire des mutants non-phosphorylables RAD51 Y/F

Tout d'abord, nous pouvons observer que l'étude par dichroïsme circulaire (DC), permettant d'évaluer les structures secondaires des protéines par déviation de la lumière, ne montre aucune différence majeure entre les protéines mutantes Y/F testées en comparaison de la protéine sauvage (**Figure 32**). Les profils obtenus par DC révèlent une somme de déviation/absorbance de la lumière par les structures secondaires de la protéine (hélices α , feuillets β). Chacun des profils est propre à une protéine donnée selon sa composition en feuillets et hélices. Nous pouvons voir que les profils ne varient pas entre 220 et 260nm, en sachant que la longueur d'onde d'absorption maximale de la protéine RAD51 est de 222nm (**Figure 32**). Ces résultats nous permettent d'avancer que les mutations ne semblent pas modifier de façon significative la structure secondaire de la protéine RAD51.

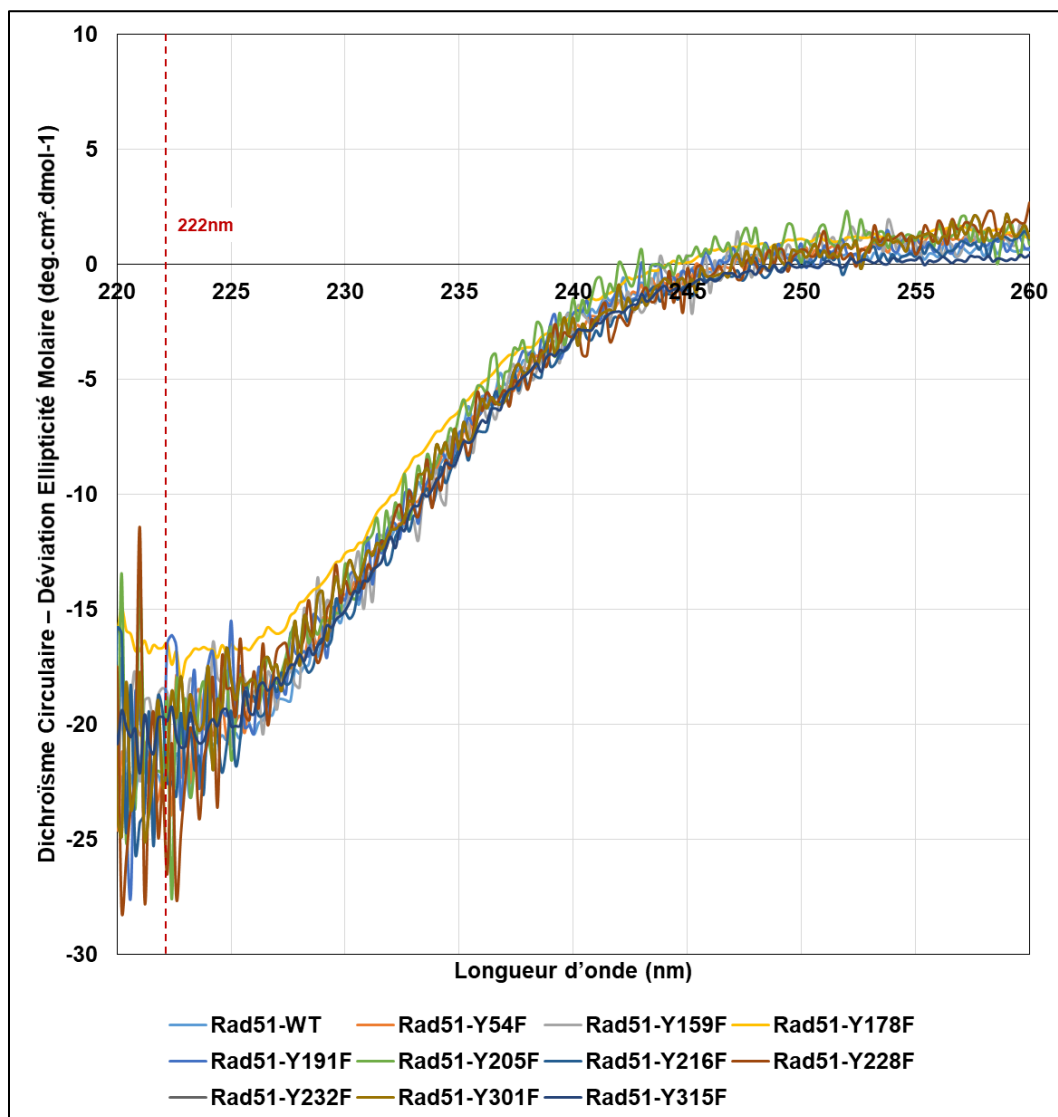


Figure 32 – Spectre de dichroïsme circulaire des protéines RAD51 sauvage et des 10 protéines RAD51 mutantes Y/F

Les signaux des spectres DC ont été obtenus à une température constante de 20°C et mesurés entre 220 à 260 nm dans une cellule de quartz Hellma avec une distance optique de 0,2 cm. Il est important de noter que l'absorption maximale de la protéine RAD51 s'effectue à 222nm. La concentration finale de chaque protéine RAD51 est de 4 μ M dans une solution saline tampon de phosphate (PBS) à pH 7,4 (**Modifié d'après Chabot et al., 2019 - cf. Annexe 15**).

b. Capacité d'auto-association des mutants non-phosphorylables RAD51 Y/F

La structure secondaire des protéines RAD51 n'est pas impactée par les différentes mutations Y/F apportées. Maintenant, la question se pose donc de savoir ce qu'il en est de sa capacité à s'homopolymériser. En effet, la protéine RAD51 est présente au sein d'un équilibre monomère-oligomère qui peut se déplacer selon sa concentration ou la concentration en sels du milieu. Nous avons réalisé des tests de réticulation des formes polymérisées de RAD51 en utilisant un agent cross-linker : le BS3. Le BS3 permet de fixer de manière covalente les formes polymérisées des protéines RAD51. Leur révélation se fait par séparation protéique en gel

SDS-PAGE puis par révélation par westernblot avec un anticorps dirigé contre RAD51. Comme nous pouvons le voir, la protéine sauvage sans BS3 est présente uniquement sous la forme de monomères (**Figure 33A**). Lors de l'ajout du cross-linker BS3, de nombreuses formes polymères de haut poids moléculaire apparaissent confirmant l'impact du BS3 sur la réticulation des formes polymères de RAD51 (**Figure 33A**). En ce qui concerne les protéines mutantes Y/F, nous observons des variations pour certaines dans les profils tendant plutôt à une diminution de l'état de polymérisation en comparaison de la protéine sauvage (**Figure 33A**).

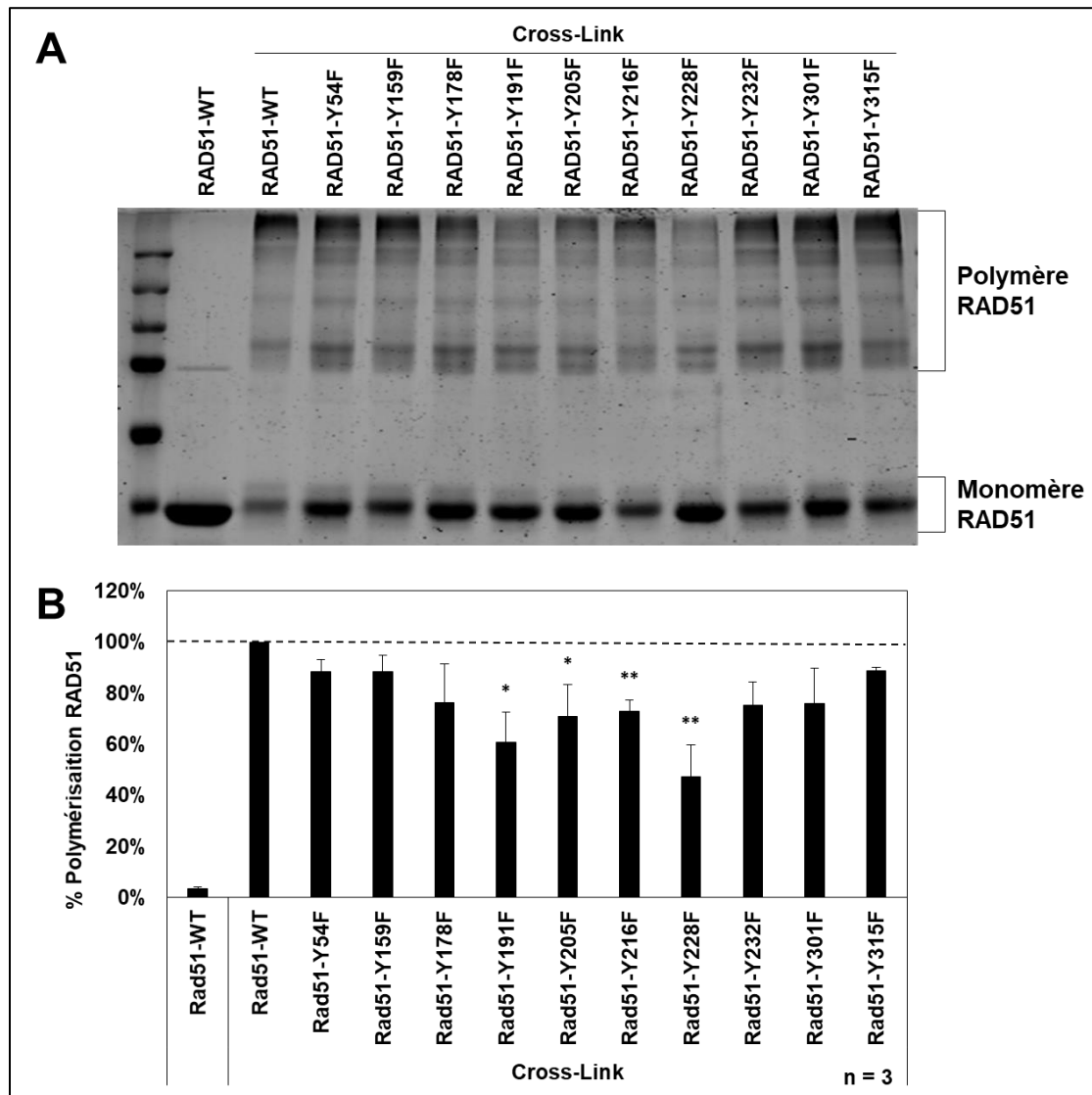


Figure 33 – 4 des 10 sites mutés réduisent l'état de polymérisation de la protéine RAD51

(A) La protéine RAD51-WT (10 μ M) et ses mutants Y/F non-phosphorylables ont été purifiés et ont ensuite été cross-linkés avec du BS3 puis séparés par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 10% acrylamide et analysée par westernblot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines RAD51. Les signaux ont été quantifiés sur le scanner Odyssey-Licor. (B) Le graphique représente le pourcentage de forme polymère de RAD51 sauvage ou mutée après quantification des blots. Chacune des expériences a été réalisée trois fois de façon indépendante (n = 3 ; barres d'erreur : s.d ; * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01).

Après quantification des signaux, et par comparaison avec la protéine sauvage, les variations de l'état de polymérisation des différents mutants Y/F sont confirmées. En particulier pour les mutants RAD51-Y191F, RAD51-Y205F, RAD51-Y216F et RAD51-Y228F, leur capacité de polymérisation diminue de manière significative jusqu'à 40% en comparaison de la protéine sauvage (**Figure 33B**).

c. Localisation des résidus impliqués dans les interfaces protéine-protéine par modélisation moléculaire

En observant structurellement la localisation des tyrosines de RAD51 (**Figure 34A**), nous pouvons voir que celles précédemment citées (Y191, Y205, Y216 et Y228) se trouvent logiquement être impliquées dans la surface d'interaction monomère-monomère de RAD51 (**Figure 34B**). En effet, elles sont à l'interface avec le monomère N-1 au sein du nucléofilament de RAD51 (**Figure 34C**). Cette localisation explique, à elle seule, le fait que l'on observe une diminution de l'état de polymérisation de ces mutants. Les quatre mutations Y191F, Y205F, Y216F et Y228F ne sont donc pas sans conséquences sur l'équilibre monomère-polymère de la protéine RAD51.

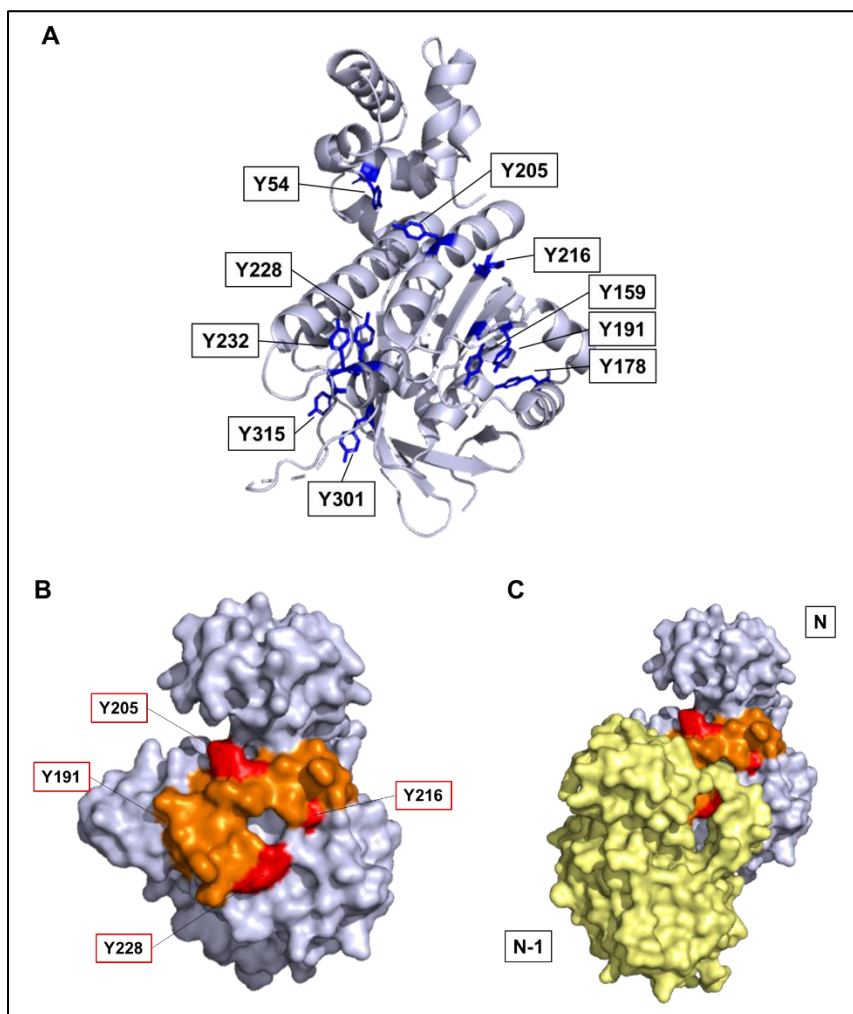


Figure 34 – Modélisation des sites modifiant la polymérisation de RAD51 et se trouvant à l'interface monomère-monomère

(A) Suite à l'utilisation du logiciel PyMOL et de la structure de RAD51 [188], les tyrosines d'un monomère de RAD51 (gris—cartoon) ont été indiquées. (B) La structure nous permet également d'observer la localisation des tyrosines (rouge – surface) qui, une fois mutée, modifient la capacité de polymérisation de la protéine RAD51, (C) et de la zone d'interaction (orange – surface) monomère-monomère N-1/N (jaune et gris – surface) dont elles font partie.

d. Formation du nucléofilament des mutants non-phosphorylables RAD51 Y/F

La protéine RAD51 est connue pour s'associer à l'ADN simple brin (ADNsb) présent au niveau de la cassure double-brin après la phase de résection. Cette association découle de la formation du nucléofilament qui repose sur l'oligomérisation de RAD51 sur l'ADNsb. Pour évaluer cette activité, nous avons réalisé un test d'interférométrie basé sur le système SPR (Résonance Plasmonique de Surface) entre un ADNsb poly(dT) immobilisé sur une pointe de streptavidine et nos différentes protéines sauvages et mutantes. L'expérience nous montre que la protéine sauvage fixe l'ADN avec une certaine force et une certaine vitesse, au même titre que la plupart des mutants Y/F (**Figure 35**). En revanche pour les mutations Y191F, Y205F, Y216F et Y228F, une forte diminution (entre 55 et 65%) de la capacité d'association à

l'ADN de la protéine RAD51 (**Figure 35**) est observée. Ces résultats sont sûrement la conséquence de la diminution de l'état de polymérisation préalablement décrit suite à ces mutations et donc de la nucléation des protéines RAD51.

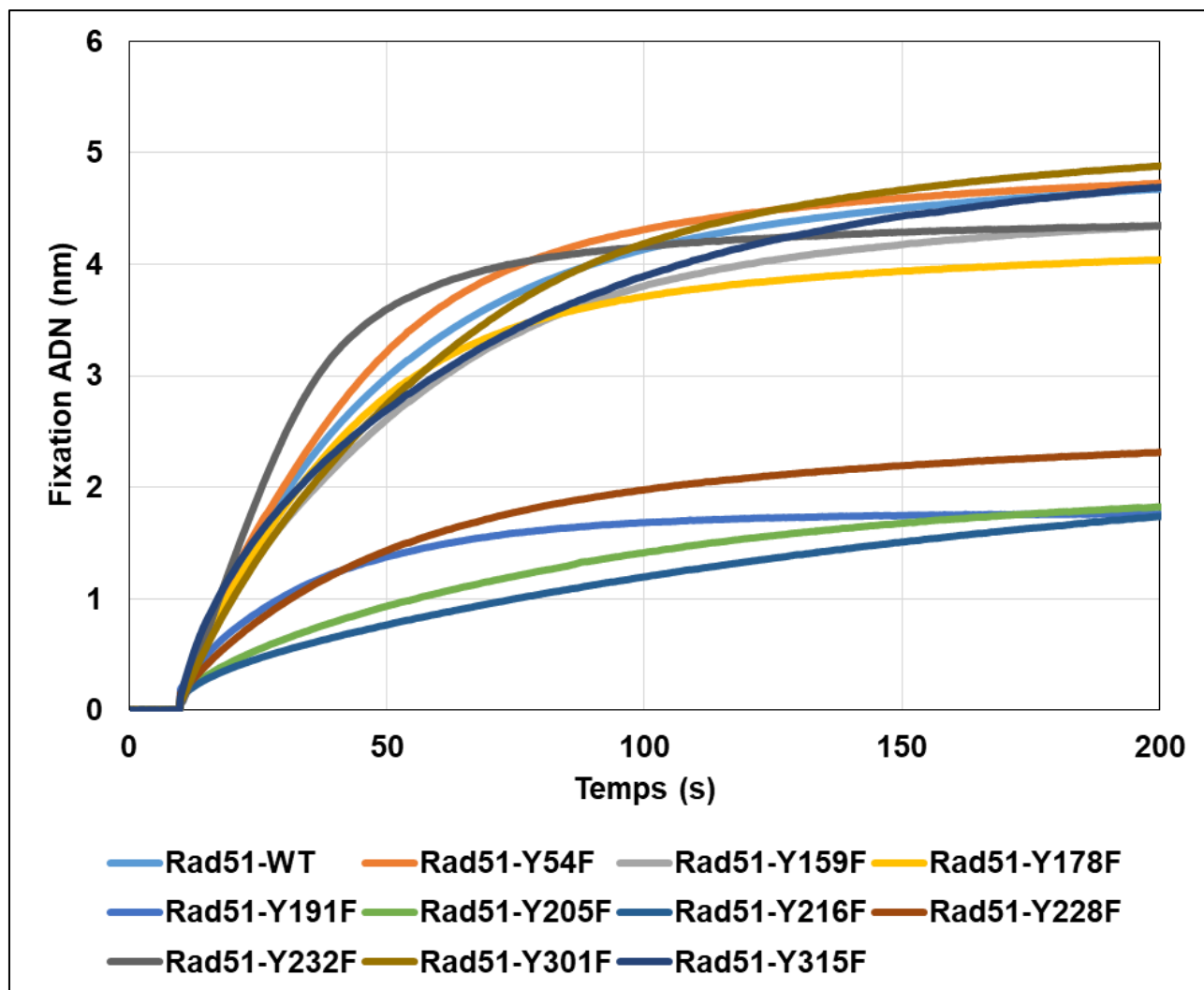


Figure 35 – Certaines mutations Y/F diminuent fortement la capacité de RAD51 à s'associer à l'ADN.

Un tip associé à un acide nucléique polydT est incubé avec les protéines RAD51-WT et mutants purifiées diluées (2 μ M) dans un tampon phosphate-ATP. L'interaction protéine-ADN est mesurée par interférométrie (BLItz®). Après 10 secondes de ligne de base dans le tampon, les extraits sont ajoutés et une phase d'association est réalisée pendant 200 secondes.

e. Fixation à l'ATP des mutants non-phosphorylables RAD51 Y/F

Enfin, nous avons réalisé un test d'interaction entre RAD51 et l'ATP. Cette interaction est essentielle aux différentes activités biologiques de RAD51 et a été évaluée par utilisation d'un analogue de l'ATP : l'ATP-TNP. Cette molécule possède un maximum d'absorption à 470nm en solution seule et à 418nm lorsqu'elle est complexée à une protéine. Sur ce principe, nous avons évalué le taux d'absorption de l'ATP-TNP complexé à nos différentes protéines mutantes. Parmi les 10 mutants Y/F, une seule voit son interaction avec l'ATP-TNP diminuer

de manière significative en comparaison de la protéine sauvage : la protéine RAD51-Y228F (**Figure 36A**). Après modélisation moléculaire, il se trouve que la tyrosine Y228 se trouve près de la poche ATP de la protéine RAD51, tant au niveau séquence qu'au niveau de sa structure (**Figure 36B**). La localisation particulière de cette tyrosine à l'entrée de la poche ATP, et sa modification en un acide aminé apolaire, peut expliquer cette diminution de 20% de l'interaction entre RAD51 et l'ATP-TNP.

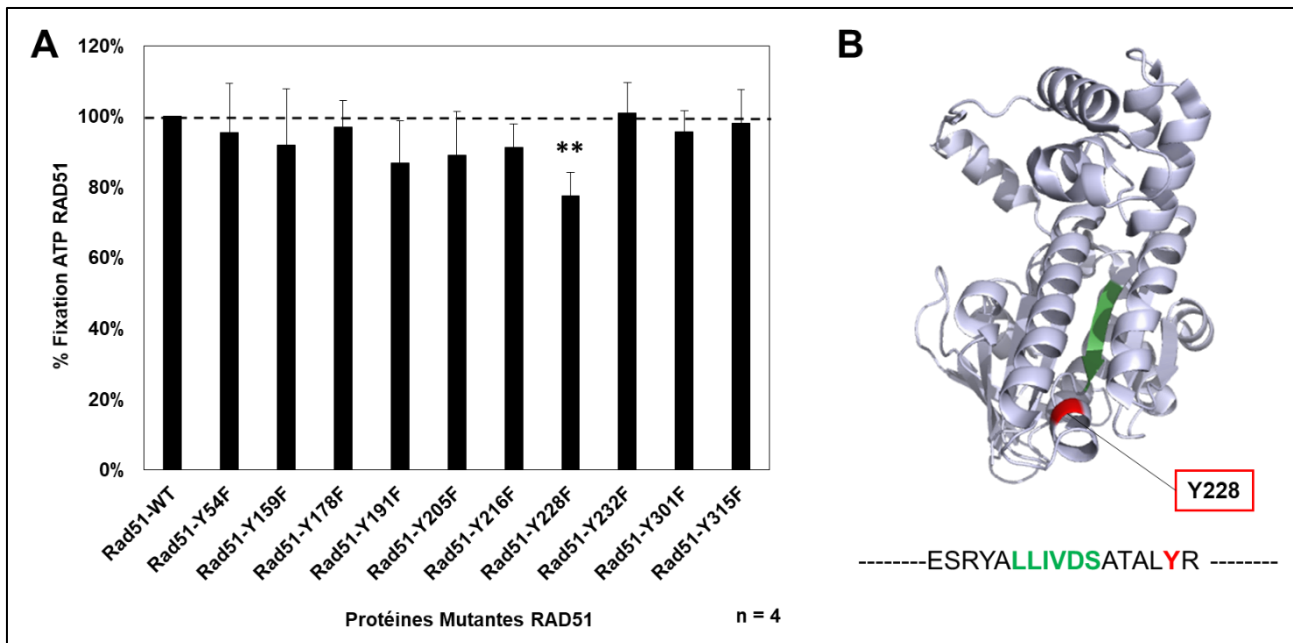


Figure 36 – Seule la mutation Y228F modifie l'interaction de RAD51 avec l'ATP

(A) La protéine RAD51-WT (1,5 μ M) et ses mutants Y/F non-phosphorylables ont été purifiées et ont ensuite été incubées en présence d'ATP-TNP (5,2 μ M) en plaque 96 puits. L'émission à 550nm a été réalisée via le scanner EnSpire Multimode Plate Reader. Le graphique représente la moyenne du pourcentage d'interaction de RAD51 avec l'ATP pour chacune des formes mutées de RAD51 en comparaison de la protéine sauvage. Chacune des expériences a été réalisée quatre fois de façon indépendante (n = 4 ; barres d'erreur : s.d ; ** : p < 0.01). (B) Suite à l'utilisation du logiciel PyMOL et de la structure de RAD51 [188], les tyrosines qui, une fois mutées, modifient la capacité d'interaction de la protéine RAD51 avec l'ATP ont été indiquées (rouge – cartoon) sur la structure de la protéine (gris – cartoon). La zone d'interaction de RAD51 avec l'ATP est représentée en verte.

En résumé, l'étude structurale et fonctionnelle des mutants RAD51 Y/F, nous a permis de montrer que ces mutations n'impactaient pas la structure secondaire de la protéine mais que certaines d'entre elles étaient capables de modifier la capacité d'auto association et de polymérisation autour de l'ADN (Y191F, Y205F, Y216F, Y228F). Ces résultats démontrent que certains résidus tyrosine, en particulier leur groupement hydroxyle, sont importants et fortement impliqués dans certaines activités de la protéine RAD51.

3. Identification et validation des sites de phosphorylation de RAD51 par c-Met

a. Détermination expérimentale des résidus phosphorylés par utilisation des mutants non-phosphorylables

Une fois l'impact des mutations Y/F évalué et afin de déterminer les sites visés par une phosphorylation de c-Met sur RAD51, nous avons réalisé la phosphorylation *in vitro* des différents mutants non-phosphorylables préalablement purifiés dans les mêmes conditions que la protéine sauvage. Après cette phosphorylation, nous avons quantifié le signal phosphotyrosine obtenu par western blot. La quantification des signaux montre une baisse significative de près de 25% de l'état de phosphorylation de 4 des 10 protéines mutantes : Y159F, Y191F, Y205F et Y315F, en comparaison de l'état de phosphorylation de la protéine sauvage (**Figure 37**). La diminution de l'état de phosphorylation des mutants non phosphorylables est directement corrélée aux sites visés par la kinase, nous pouvons en déduire que la protéine RAD51 est phosphorylée *in vitro* par la tyrosine kinase c-Met en Y159, Y191, Y205 et Y315.

Une deuxième approche a consisté à confirmer la phosphorylation des sites sur la protéine RAD51 par spectrométrie de masse. Une migration de RAD51 phosphorylée par c-Met *in vitro* a été réalisée sur un gel SDS-PAGE. La coloration au bleu de Coomassie G-250 a permis d'identifier les bandes qui ont ensuite été envoyées pour analyse par spectrométrie de masse (plateforme 3P5). Il est intéressant de noter que 3 des 4 tyrosines préalablement citées ont été montrées comme phosphorylées sur RAD51. La phosphorylation des tyrosines Y159, Y191 et Y205 par c-Met sur la protéine RAD51 est donc confirmée.

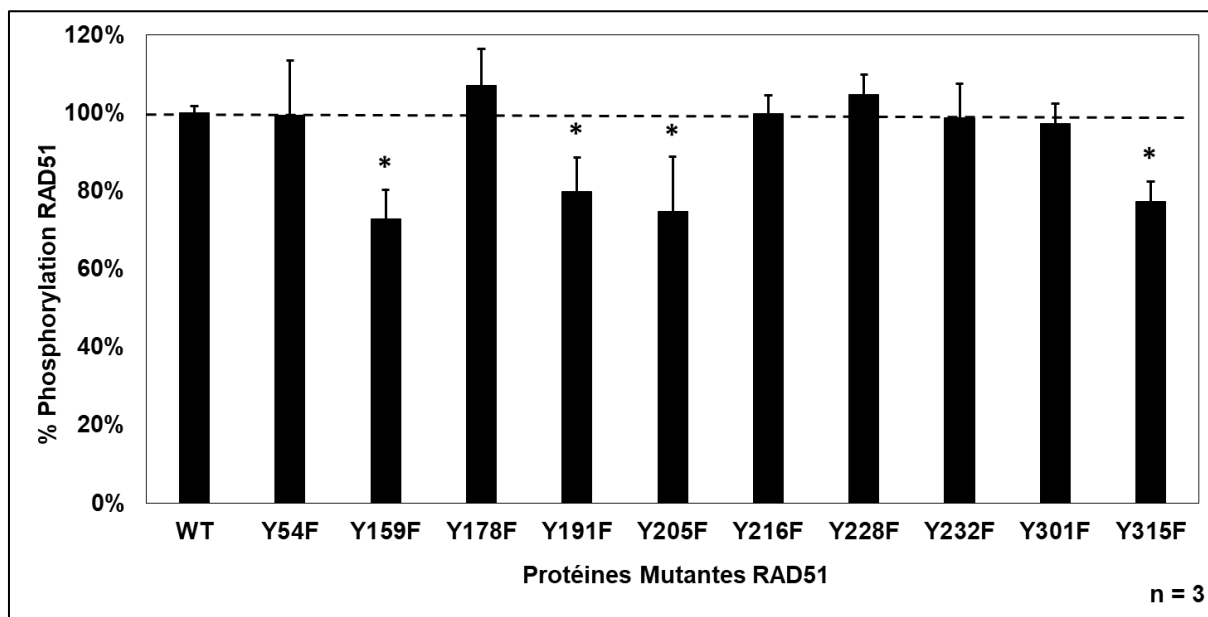


Figure 37 – 4 des 10 protéines mutantes de RAD51 voient leur niveau de phosphorylation par c-Met réduit

La protéine RAD51-WT purifiée (10 μ M) et ses mutants Y/F non-phosphorylables ont été incubées avec de l'ATP (2mM) et avec ou sans la partie C-terminale active de la kinase c-Met (0,1 μ M). Les protéines ont ensuite été séparées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% acrylamide et analysée par westernblot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes phosphotyrosine ou les protéines RAD51. Les signaux ont été quantifiés sur le scanner Odyssey-Licor et comparés à la protéine RAD51-WT sauvage. Le graphique représente le pourcentage de phosphorylation de chaque mutant en comparaison de la protéine sauvage et obtenu après quantification des blots. Chacune des expériences a été réalisée trois fois de façon indépendante (n = 3 ; barres d'erreur : s.d ; * : p < 0.05) (Modifié d'après Chabot et al., 2019 - cf. Annexe 15).

b. Localisation et modélisation moléculaire des sites phosphorylés de protéine RAD51

Après l'identification des sites de phosphorylation de RAD51 par c-Met, nous avons cherché à les localiser au sein de la protéine RAD51 et à déterminer leurs rôles dans les interactions avec son environnement et ses partenaires, en particulier la protéine BRCA2.

Pour répondre à cela, une approche *in silico* de modélisation de la protéine RAD51 a été réalisée. En nous basant sur différentes structures cristallographiques, nous avons cherché à déterminer si les sites visés par c-Met sur RAD51 se trouvent à des endroits stratégiques lors des interactions avec différents partenaires protéiques. La structure cristallographique d'un monomère de RAD51 seul n'ayant, à ce jour, pas encore été réalisée, nous nous sommes principalement basés sur la structure du polymère de RAD51 [188], ainsi que sur la structure du complexe RAD51/BRC4 [176]. Le peptide inhibiteur BRC4 (ici BRC4-28 composé de 28 acides aminés) est dérivé des motifs BRC de la protéine BRCA2 et est capable de déstabiliser les formes multimériques de RAD51. Il imite une des interfaces RAD51-BRCA2 et masque l'interface monomère-monomère RAD51-RAD51 provoquant la dissociation du nucléofilament de RAD51.

Tout d'abord, toutes les tyrosines Y159, Y191, Y205 et Y315 se trouvent au niveau de la partie C-terminale de la protéine, ou Core Domain (**Figure 38A**). A l'inverse d'autres tyrosines, ces 4 résidus sont exposés sur la partie externe de la protéine. Cette particularité fait qu'ils se trouvent être à l'interface monomère-monomère du nucléofilament de RAD51 (**Figure 34 et 38B**). Il semble que les tyrosines Y159, Y191 et Y205 sont impliquées dans l'interaction N-1/N, alors que la tyrosine Y315 serait impliquée dans l'interaction N/N+1. Enfin, si nous observons l'interaction entre le peptide et la recombinase, les tyrosines Y159, Y191 et Y205 se trouvent à l'interface RAD51-BRC4. Les tyrosines Y205 et Y191 se placent exactement en face des zones de forte interaction entre la protéine et le peptide (Zone 1: F1524 – K1530 ; Zone 2: K1541 – E1548) (**Figure 38C**). En extrapolant, les 3 tyrosines pourraient jouer un rôle dans l'interface RAD51-BRCA2. Toutes ces données structurales nous laissent penser que les tyrosines visées par la kinase c-Met jouent un rôle important dans la modulation de l'activité de RAD51.

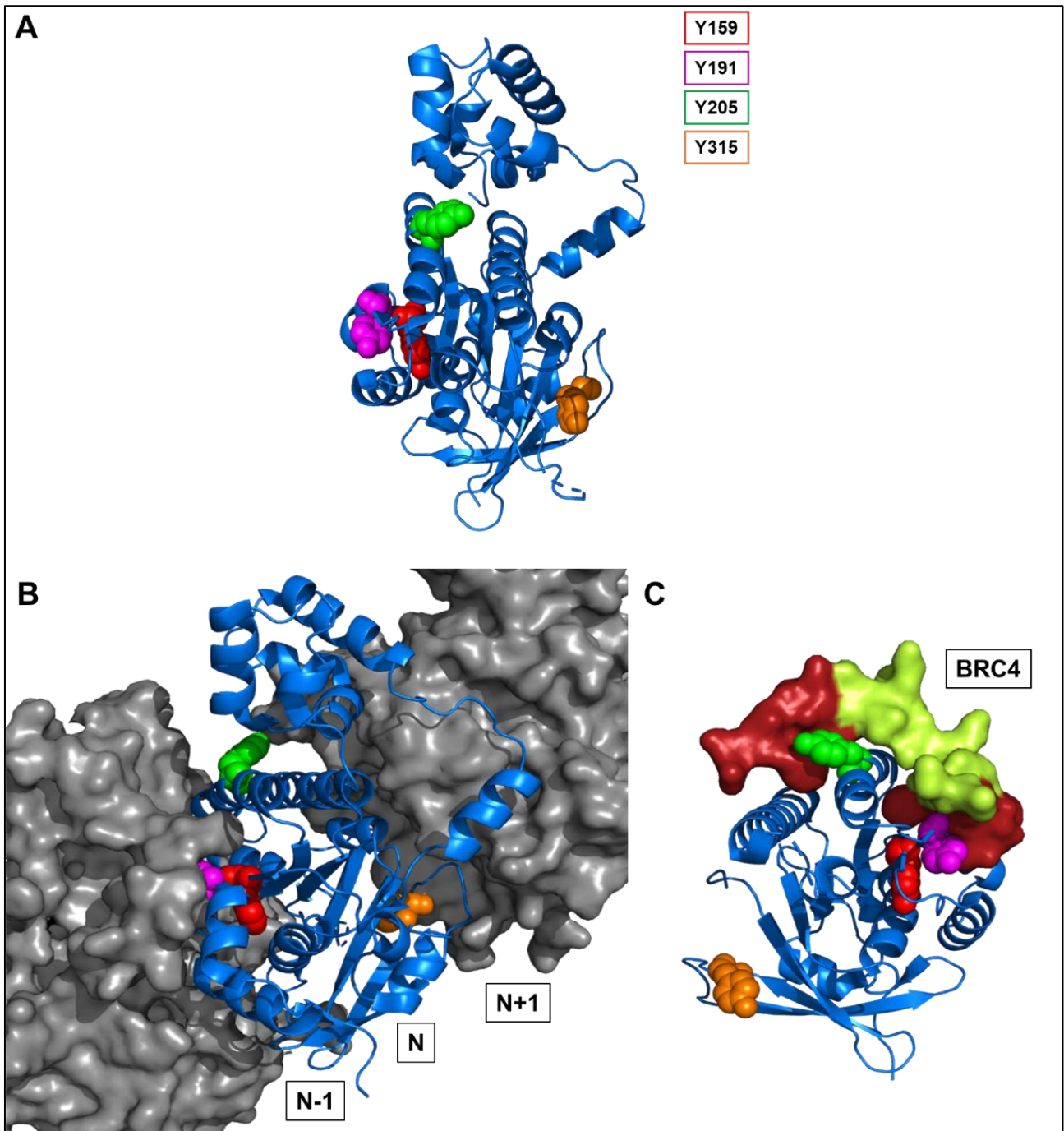


Figure 38 – Les 4 sites visés par c-Met sur RAD51 se trouvent à l'interface monomère-monomère ou RAD51-BRC4

(A) Suite à l'utilisation du logiciel PyMOL et de la structure de RAD51 [188], les tyrosines Y159 (rouge), Y191 (magenta), Y205 (green) et Y315 (orange) d'un monomère de RAD51 (bleu — cartoon) ont été indiquées. (B) Les sites au sein du nucléofilament et notamment à l'interface avec les monomères N+1 et N-1 (gris — surface) ont été localisés. (C) Mise en évidence de la partie C-terminale de RAD51 ou Core Domain en présence du peptide BRC4 mimant une des 8 zones d'interaction avec motif BRC de BRCA2, grâce à l'utilisation du logiciel PyMOL et de la structure de RAD51 couplée à BRC4 [176]. Les zones de forte interaction du peptide BRC4 avec RAD51 sont représentées (rouge — surface) ainsi que les zones de plus faible interaction (jaune — surface) (Modifié d'après Chabot et al., 2019 - cf. Annexe 15).

b. Relation entre la phosphorylation de RAD51 et son auto-association

La position des résidus tyrosines Y159, Y191, Y205 et Y315 suggère que leur exposition et donc leur accessibilité dépendent de l'organisation structurale de RAD51. Par conséquent, se trouvant à l'interface monomère-monomère, ils seraient plus exposés dans les formes monomères que dans les formes oligomères de RAD51 à une phosphorylation par c-Met. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons évalué l'effet de l'état de polymérisation de RAD51 sur sa phosphorylation. Des expériences *in vitro* ont été réalisées en utilisant les mutants RAD51-F86E et RAD51-A190/192L non-polymérisables [176], [194]. En solution, la protéine RAD51 est normalement présente sous la forme d'un équilibre monomère-oligomère. Nous avons donc utilisé le peptide BRC4, inhibiteur de la polymérisation de RAD51, qui est capable de déplacer l'équilibre en faveur de la forme monomère de la recombinaise. Des tests de phosphorylation *in vitro* avec la protéine RAD51-WT en présence de l'inhibiteur peptidique de polymérisation BRC4 ont été réalisés.

Les ratios phosphotyrosine/RAD51 ont été calculés à partir des immunoblots anti-phosphotyrosine et anti-RAD51 (**Figure 39A**). L'incubation avec des concentrations croissantes de peptide BRC4 augmente la proportion de phosphorylation de RAD51 pour atteindre la valeur maximale de 4 (**Figure 39D**). Ce résultat suggère que la dépolymérisation de RAD51 induite par le peptide BRC4 favorise sa phosphorylation par la kinase c-Met. Nous avons également réalisé le même type d'expérience avec les mutants non-polymérisables F86E (**Figure 39B**) et A190/192L (**Figure 39C**). Alors que le peptide BRC4 favorise la phosphorylation de RAD51-WT, aucune variation significative n'est observée avec les mutants non-polymérisables de RAD51. Il est intéressant de noter que l'augmentation de la phosphorylation de RAD51-WT tend vers des valeurs similaires à celles observées pour les deux mutants non-polymérisables. En effet, après quantification des signaux, une augmentation significative (3,5 fois) de la phosphorylation des deux mutants par rapport à la protéine RAD51-WT (**Figure 39D**) est observée. La dépolymérisation de la protéine sauvage par BRC4 tend à rétablir des taux de phosphorylation équivalents aux deux protéines non-polymérisables dans les mêmes conditions. Toutes ces données démontrent que la phosphorylation de RAD51 par c-Met est augmentée avec les formes monomères; elles soulignent aussi l'importance de l'état de polymérisation sur le niveau de phosphorylation de RAD51 par c-Met.

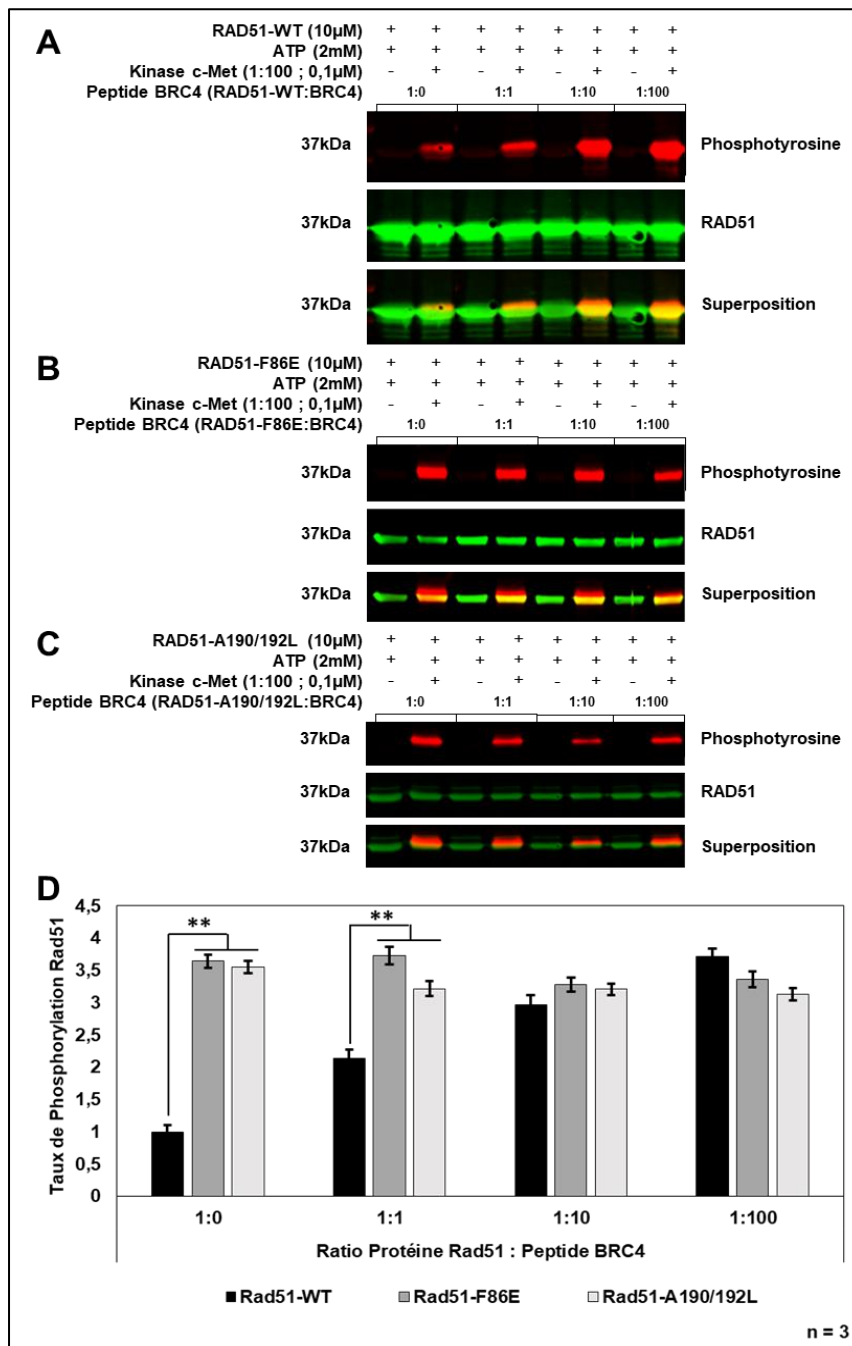


Figure 39 – L'état de polymérisation de RAD51 influe sur son état de phosphorylation

(A) La protéine RAD51-WT purifiée (10 μ M) et ses mutants non-polymerisables : (B) F86E and (C) A190/192L, ont été incubés avec de l'ATP (2mM) et avec ou sans la partie C-terminale active de la kinase c-Met (0,1 μ M), et avec une concentration croissante en peptide BRC4. Les protéines ont ensuite été séparées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% acrylamide et analysées par westernblot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes phosphotyrosine (rouge) ou les protéines RAD51 (vert). Les signaux ont été quantifiés sur le scanner Odyssey-Licor et comparés à la protéine RAD51-WT sauvage. (D) Le graphique représente le pourcentage de phosphorylation de chaque mutant en comparaison de la protéine sauvage et obtenu après quantification des blots. Chacune des expériences a été réalisée trois fois de façon indépendante (n = 3; barres d'erreur : s.d ; ** : p < 0.01) (Modifié d'après Chabot et al., 2019 - cf. Annexe 15).

Comme une relation étroite entre les états de polymérisation et de phosphorylation de la protéine RAD51 existe, il nous a semblé intéressant de savoir si le niveau d'oligomérisation de RAD51 change lorsque la protéine est phosphorylée. Nous avons effectué un test de réticulation des formes polymérisées de RAD51 avant et après la phosphorylation par la kinase c-Met.

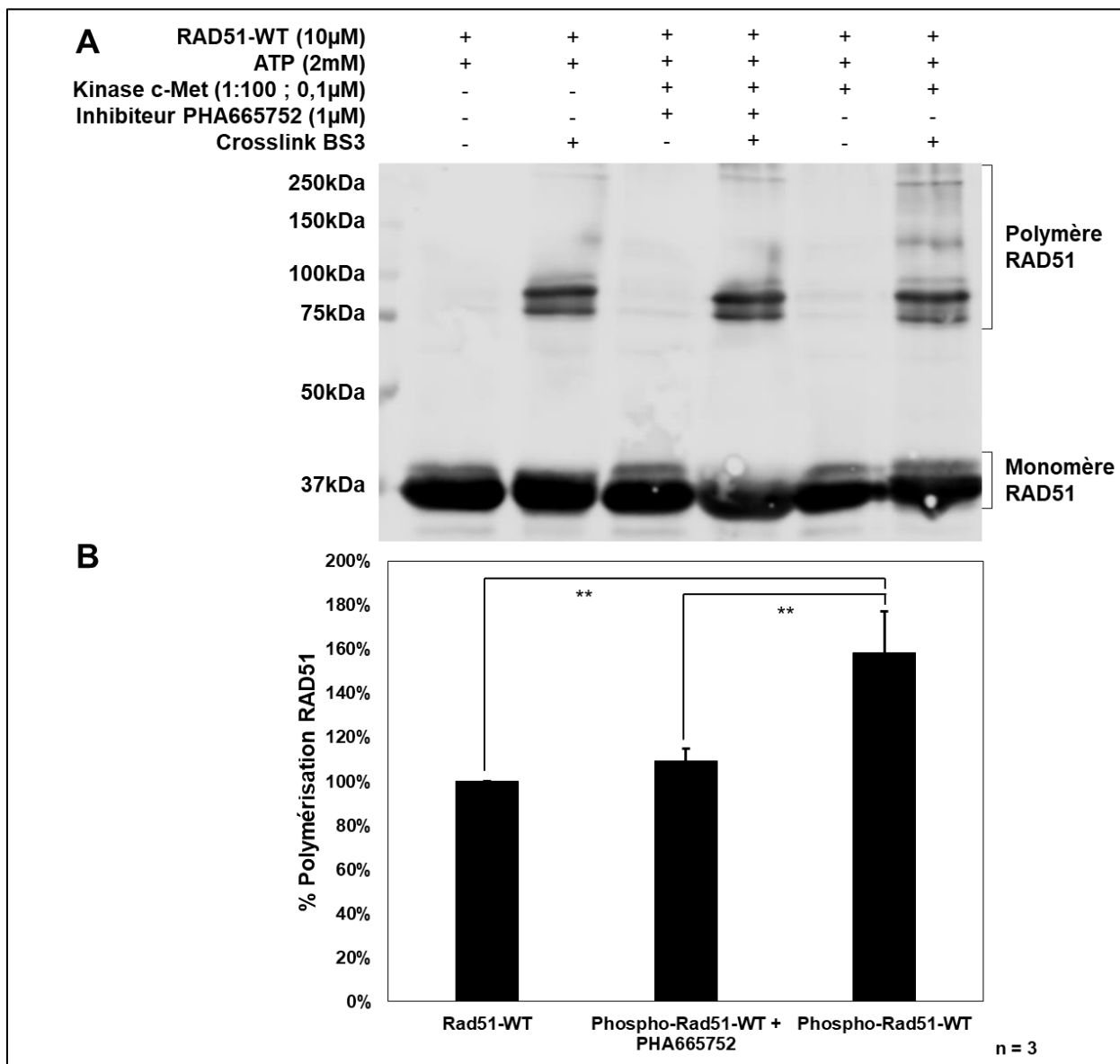


Figure 40 – La phosphorylation de RAD51 par c-Met augmente son état de polymérisation

(A) La protéine RAD51-WT purifiée (10µM) a été incubée avec de l'ATP (2mM) et avec ou sans la partie C-terminale active de la kinase c-Met (0,1µM) et l'inhibiteur PHA665752 (1µM). Les protéines ont ensuite été cross-linkées avec du BS3 puis séparées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 10% acrylamide et analysées par westernblot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines RAD51. Les signaux ont été quantifiés sur le scanner Odyssey-Licor. (B) Le graphique représente le pourcentage de forme polymère de RAD51, phosphorylée ou non par c-Met. Chacune des expériences a été réalisée trois fois de façon indépendante (n = 3 ; barres d'erreur : s.d ; ** : p < 0.01) (Modifié d'après Chabot et al., 2019 - cf. Annexe 15).

Les protéines ont ensuite été analysées par SDS-PAGE et révélées par immunoblot. Suite à la phosphorylation de RAD51 par c-Met, une augmentation des formes polymères de RAD51

(Figure 40A) est observée. En effet, la quantification montre que la proportion de formes polymères de RAD51 est 1,5 fois plus élevée après la phosphorylation **(Figure 40B)**. De plus, l'inhibition de l'activité kinase du c-Met par l'inhibiteur PHA665752 réduit le statut de polymérisation de RAD51 par rapport à la condition RAD51 phosphorylée par c-Met **(Figure 40)**. Cette expérience confirme que la phosphorylation de RAD51 médiée par c-Met favorise la forme polymère. La phosphorylation des tyrosines de RAD51 par c-Met entraîne une augmentation de l'état de polymérisation de la recombinaise.

c. Relation entre la phosphorylation de RAD51 et la stabilité du nucléofilament

L'équilibre des formes monomériques/oligomériques de RAD51 est étroitement lié à sa phosphorylation par c-Met. Quel pourrait être l'effet de la phosphorylation sur le nucléofilament de RAD51 ? En effet, la formation du nucléofilament autour de l'ADN simple brin, étape essentielle de la RH, dépend fortement de la capacité d'auto association de RAD51. Pour analyser l'impact de la phosphorylation du RAD51 par la kinase c-Met, nous avons utilisé un test d'interaction par interférométrie. Un ADN simple brin poly(dT) a été immobilisé sur une pointe recouverte de streptavidine, puis incubé dans une solution contenant la protéine RAD51 phosphorylée ou non par la kinase c-Met. Cette approche nous a permis non seulement d'évaluer l'association de la protéine RAD51 phosphorylée avec l'ADN, mais aussi de suivre la dissociation de l'ADN avec ou sans le peptide inhibiteur de la polymérisation de RAD51, le peptide BRC4.

Concernant la phase d'association de RAD51 avec l'ADN, nous n'avons observé aucune différence entre la forme phosphorylée et la forme non phosphorylée **(Figure 41A)**. C'est également le cas lors de la dissociation de RAD51 phosphorylé et non phosphorylé de l'ADN. Ce résultat est confirmé par la mesure des constantes de dissociation K_D de chaque protéine lors de son interaction avec l'ADN. Nous avons estimé des valeurs de K_D similaires : K_D RAD51-WT = $1,28 \times 10^{-7}$ M et K_D Phospho-RAD51-WT = $1,41 \times 10^{-7}$ M.

En revanche, la dissociation du nucléofilament RAD51 induite par le peptide BRC4 est différente selon que RAD51 est phosphorylé ou non **(Figure 41A)**. La quantification de la liaison du RAD51 phosphorylé et non phosphorylé sur l'ADN en pourcentage après 200 sec montre que la dissociation est deux fois plus faible lorsque RAD51 est phosphorylé **(Figure 41B)**. Ceci est confirmé par la détermination des constantes de vitesse de dissociation (k_{off}). Cette constante est plus faible pour la forme phosphorylée (k_{off} Phospho-RAD51-WT = $3,32 \times 10^{-7}$ M) que pour la forme non phosphorylée (k_{off} RAD51 = $4,56 \times 10^{-7}$ M).

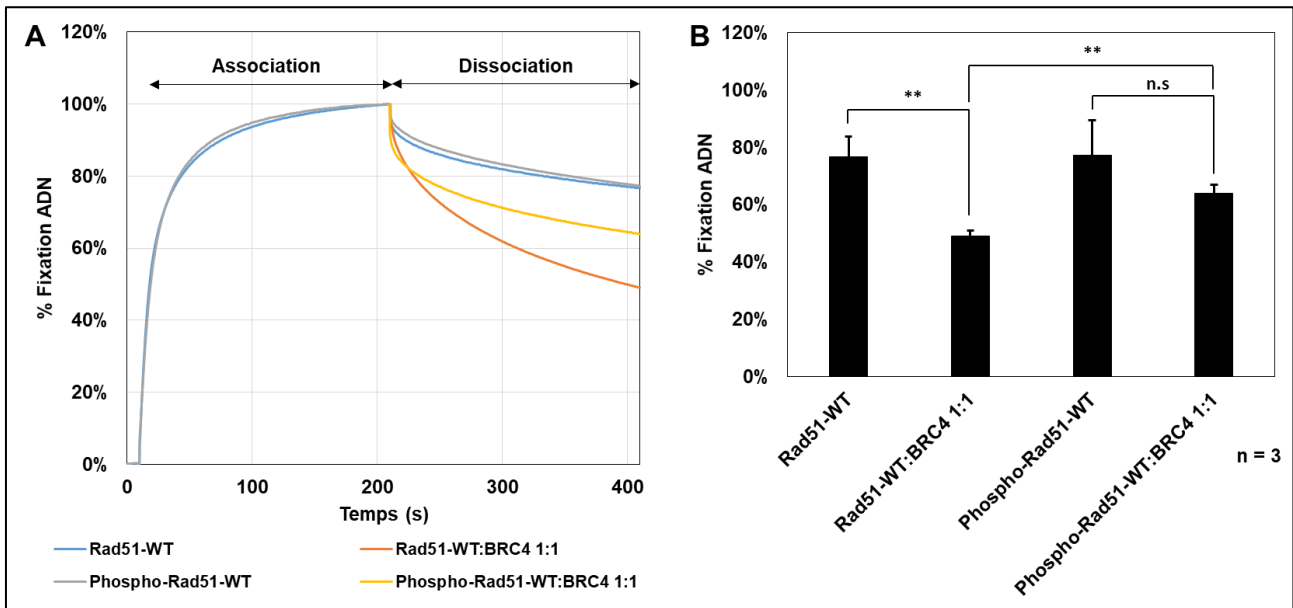


Figure 41 – La phosphorylation de RAD51 par c-Met stabilise le nucléofilament sur l’ADN

(A) La protéine RAD51-WT purifiée (10 μ M) a été incubée avec de l’ATP (2mM) et avec ou sans la partie C-terminale active de la kinase c-Met (0,1 μ M). Un tip associé à un acide nucléique polydT est ensuite incubé avec les extraits dilués dans un tampon phosphate-ATP. L’interaction protéine-ADN est mesurée par interférométrie (BLitz®). Après 10 secondes de ligne de base, les extraits sont ajoutés et une phase d’association et de dissociation est réalisée pendant 200 secondes. La dissociation se fait en présence de tampon phosphate contenant ou non le peptide BRC4 (1:1). (B) L’impact du peptide BRC4 sur la dissociation de RAD51 de l’ADN a été mesuré à t=200s. Le graphique représente le pourcentage d’association des différentes protéines RAD51 après addition ou non de BRC4. Chacune des expériences a été réalisée trois fois de façon indépendante (n = 3 ; barres d’erreur : s.d ; ** : p < 0.01 ; n.s : p > 0.05) (Modifié d’après Chabot et al., 2019 - cf. Annexe 15).

Nous avons donc évalué la capacité de RAD51 à fixer l’ADNsb selon son état de phosphorylation. La question suivante est de savoir ce qu’il en est de sa capacité à former un complexe D-loop, l’étape suivante de son activité au sein de la RH. En effet, le nucléofilament ou filament présynaptique de RAD51 est capable de rechercher une molécule d’ADN sur le chromosome homologue et de catalyser l’invasion du chromosome pour former une boucle de déplacement de l’ADN appelée « boucle D », « Displacement loop » ou « D-loop ». Le test D-loop permet d’estimer l’invasion et l’appariement au chromosome homologue de RAD51. Nous avons donc estimé l’effet de la phosphorylation sur la capacité de RAD51 à réaliser cette structure.

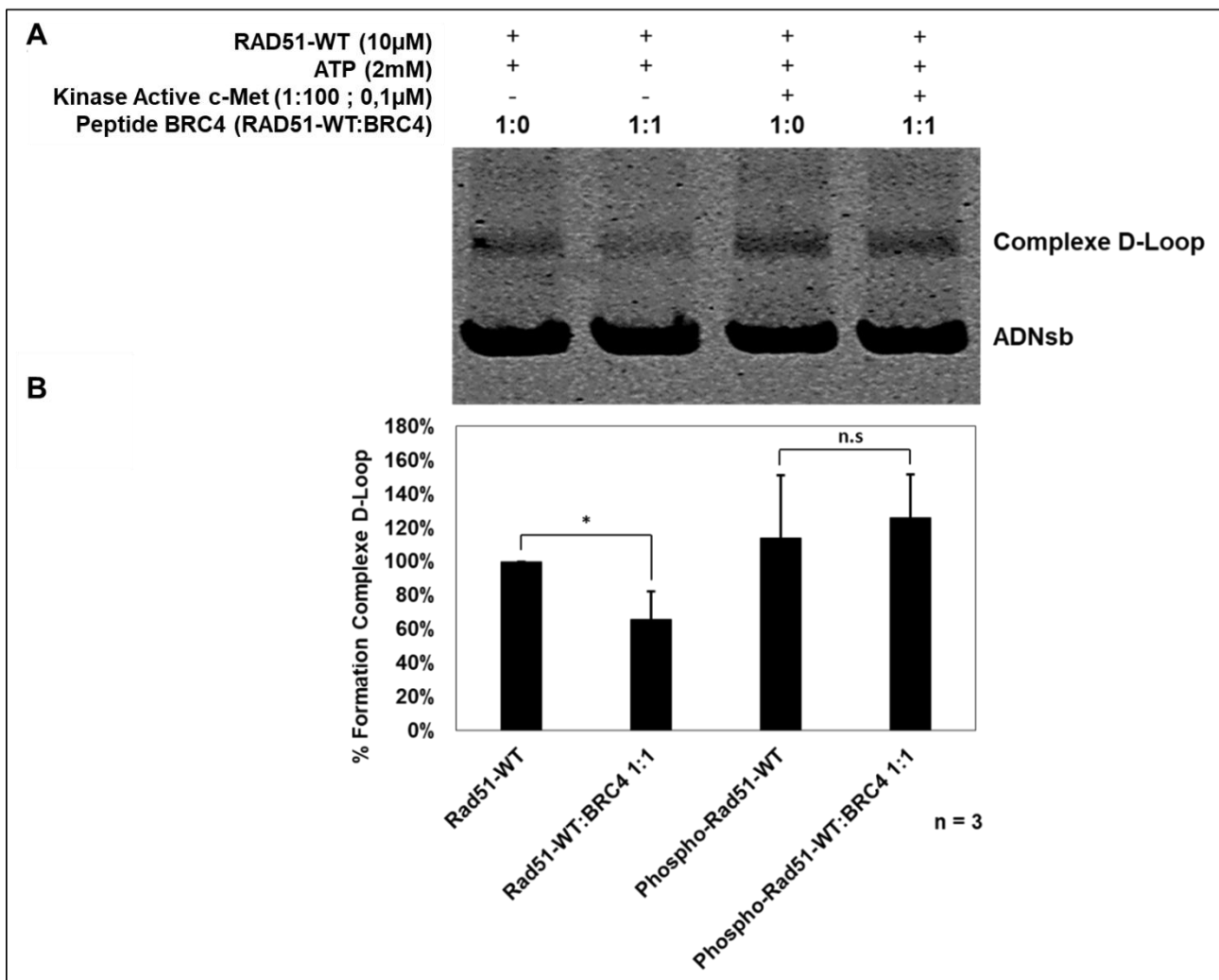


Figure 42 – La phosphorylation de RAD51 par c-Met stabilise la formation du complexe D-loop

(A) La protéine RAD51-WT purifiée (10µM) a été incubée avec de l'ATP (2mM) et avec ou sans la partie C-terminale active de la kinase c-Met (0,1µM). Les protéines sont ensuite incubées avec le mix D-loop contenant l'ADNsb marqué par un fluorophore, afin de réaliser la formation du nucléofilament. Le peptide BRC4 (1 :1) est ensuite ajouté avant l'ajout du plasmide permettant la formation de la D-loop. Les extraits sont ensuite séparés sur gel d'agarose 1%. Les signaux ont été quantifiés sur le scanner Odyssey-Licor. (B) Le graphique représente le pourcentage de complexe D-loop formé suivant ou non la phosphorylation de RAD51 par c-Met et suite ou non à l'action du peptide BRC4. Chacune des expériences a été réalisée trois fois de façon indépendante (n = 3 ; barres d'erreur : s.d ; * : p < 0.05 ; n.s : p > 0.05) (Modifié d'après Chabot et al., 2019 - cf. Annexe 15).

Le peptide BRC4 diminue le pourcentage de formation de complexe D-loop avec la forme RAD51 non phosphorylée (Figure 42A). Cet effet est annulé lorsque RAD51 est phosphorylé par c-Met. La quantification des complexes D-loop confirme ce résultat et montre une diminution significative de près de 40% de la formation des complexes D-loop par le peptide BRC4 lorsque RAD51 n'est pas phosphorylée (Figure 42B). La diminution est abolie lorsque la protéine est phosphorylée par c-Met. En effet, aucun changement de l'activité D-loop de la protéine RAD51 phosphorylée en présence et en absence du peptide BRC4 n'a été observé (Figure 42B).

L'ensemble de ces résultats démontrent que la forme RAD51 phosphorylée est moins sensible que la forme non-phosphorylée à l'action inhibitrice du peptide BRC4, suggérant un rôle stabilisateur de la phosphorylation de RAD51 par c-Met.

d. Discussion de la première partie

Les données de la littérature mettent en évidence le lien possible entre le récepteur c-Met et RAD51 puisque l'inhibition de la kinase réduit le niveau d'expression de protéine de RAD51 et induit une diminution de la réparation des RH en réponse aux lésions de l'ADN [505].

Les résultats de cette première partie démontrent pour la première fois que le récepteur tyrosine kinase c-Met phosphoryle RAD51 (**Figure 31**), protéine centrale de la réparation par RH. En combinant la prédiction *in silico*, la spectroscopie de masse et les approches biochimiques (phosphorylation *in vitro* des mutants RAD51 non-phosphorylables), nous avons identifié quatre tyrosines phosphorylables par la kinase c-Met : les tyrosines Y159, Y191, Y205 et Y315 (**Tableau 3 et Figure 37**). Bien que la phosphorylation du résidu Y315 n'ait pas été détectée par spectrométrie de masse, il est tout à fait envisageable que la méthode ne puisse pas détecter la phosphorylation présente sur le fragment peptidique. Nous proposons une explication pour comprendre l'absence de détection de la phosphorylation de la tyrosine Y315. La raison la plus probable serait que la digestion par la trypsine de RAD51 génère des fragments peptidiques « trop » longs et/ou des fragments « trop » chargés négativement (pHi = 4,03) pour être facilement ionisés [527]. En effet, la région C-terminale intégrant la tyrosine Y315 est pauvre en acides aminés basiques (arginine et lysine) mais riche en acides aminés acides. L'absence de détection par spectrométrie de masse de la phosphorylation de Y315 à cause de ces paramètres a déjà été suggérée dans la littérature [223], [224].

Pour observer l'impact des mutations réalisées permettant de révéler les sites phosphorylés par c-Met sur RAD51, nous avons réalisé une étude structure-fonction des différents mutants utilisés. Nous avons réussi à mettre en évidence que la structure secondaire ne varie pas suite aux différentes mutations Y/F (**Figure 32**). En revanche, certaines mutations modifient, de façon non-négligeable, une partie de l'activité de RAD51. Une seule des mutations Y191, Y205, Y216 et Y228 est suffisante pour modifier de manière significative la capacité d'auto-association de la protéine RAD51 (**Figure 33**). Suite à une modélisation d'un dimère de RAD51, nous montrons aussi que les deux tyrosines Y191 ou Y205 se trouvent à l'interface monomère-monomère (**Figure 34**). La position charnière aux interfaces monomères-monomères de RAD51 [190] de ces tyrosines permet d'expliquer la perte d'auto association engendrée par leur mutation. Leurs mutations, suite à la perte d'auto-association, modifient aussi la capacité de la protéine RAD51 à se lier à l'ADN simple brin en nucléofilament (**Figure 35**). L'association de l'ATP est un élément essentiel à la bonne fonction de la recombinaise RAD51 ce qui explique que la mutation de la tyrosine Y228, située à l'entrée de la poche « ATP », diminue la capacité à fixer la molécule énergétique (**Figure 36**).

L'activité de RAD51 implique de nombreuses interactions protéine-protéine dans le contexte de la réparation de l'ADN. La protéine RAD51 présente différentes formes monomériques et oligomériques dans une solution tampon [176], [183], [189]. L'équilibre entre les différentes formes dépend également de la concentration en protéines et de la présence d'autres molécules comme les peptides, le sel ou les cofacteurs [189], [528]. L'auto association de RAD51 implique un motif de polymérisation. Les mutations dans cette région telles que F86E, A89E et A190/192L conduisent exclusivement à des formes monomères de RAD51 [176], [183], [194]–[196]. L'utilisation des mutants F86E et A190/192L a montré que le niveau de phosphorylation de RAD51 par c-Met est fortement lié à l'état de polymérisation de RAD51 (**Figures 39 et 40**). L'utilisation du mutant A190/192L confirme l'importance de la place de la tyrosine Y191 dans l'interface monomère-monomère. Les tyrosines Y191 et Y315 ont, en outre, été décrites dans la littérature comme des positions charnières aux interfaces monomères-monomères de RAD51 [190], [226], [529]. La génération de nouvelles liaisons suite à la phosphorylation entre les monomères RAD51 mettant en jeu ces résidus pourrait expliquer pourquoi la phosphorylation augmente l'oligomérisation de RAD51.

Les quatre résidus tyrosine phosphorylables que nous avons identifiés dans notre étude sont tous impliqués dans des interfaces monomère-monomère N-1/N ou N/N+1 ou situés au voisinage. Leur phosphorylation par c-Met n'est donc pas sans conséquences sur l'activité de RAD51. Certains d'entre eux comme les tyrosines Y159, Y191 et Y205 se trouvent également être à l'interface RAD51-BRC4 (**Figure 38**) [196], [530]. En utilisant des approches de modélisation moléculaire, nous montrons que l'ajout d'un résidu phosphate peut induire des liaisons ioniques avec la lysine ou l'arginine du monomère N+1 (*cf. Annexe 11*).

Bien que nos résultats montrent que la phosphorylation des tyrosines semble renforcer les interactions monomère/monomère en favorisant l'oligomérisation de RAD51, la formation du nucléofilament ne semble pas être affectée par les phosphorylations associées à la kinase c-Met. En effet, nous montrons que la protéine RAD51 phosphorylée se lie à l'ADN simple brin. L'association est équivalente à celle de RAD51 non-phosphorylée et équivalente à celle repérée dans la littérature [528].

Nous montrons également que l'inhibiteur peptidique BRC4 est capable de déstabiliser les formes polymérisées de RAD51, ce qui avait déjà été préalablement décrit [192]. En revanche, nos résultats ont montré que la phosphorylation par c-Met limite l'effet de BRC4 sur la stabilité du nucléofilament (**Figures 40 et 41**). De plus, l'activité recombinaise de RAD51 phosphorylée est moins sensible à l'effet inhibiteur du peptide BRC4 que la protéine RAD51 non-phosphorylée au sein des filaments présynaptiques (**Figure 42**). Il est à noter que ce peptide correspond au motif d'interaction BRC de la protéine BRCA2, qui joue un rôle central lors de la RH en contrôlant la recombinaise RAD51. BRCA2 contient huit motifs BRC (de BRC1 à BRC8) qui sont capables de se lier directement à RAD51 avec une affinité variable. Par

conséquent, les interactions BRCA2-RAD51 ont un rôle essentiel sur les événements biologiques, comme la distribution intracellulaire, le recrutement et l'oligomérisation de RAD51 dans les cellules intactes et endommagées.

La faible sensibilité des formes phosphorylées de RAD51 au peptide BRC4 peut s'expliquer par la localisation du site d'interaction et par la formation de nouvelles liaisons générées par les groupes phosphate sur les résidus de tyrosine. La modélisation moléculaire de RAD51-BRC4 (**Figure 38**) montre que les résidus Y159, Y191 et Y205 sont directement en contact avec le peptide. Deux régions du peptide BRC4 ont été montrées au laboratoire pour avoir une forte affinité avec la protéine RAD51 [197], [530]. La charge négative et la répulsion stérique des résidus phosphorylés peuvent empêcher l'interaction RAD51-BRC4. L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de l'interaction entre le motif BRC4 et RAD51 et par extension entre les protéines BRCA2 et RAD51.

En résumé, nous avons pu montrer la phosphorylation de RAD51 par c-Met sur 4 résidus de la recombinase et leur rôle sur son activité intrinsèque au cours de la RH (**Figure 43**). Nous pouvons penser que cette interaction est également importante dans les cellules, ce qui expliquerait l'impact de l'inhibition de c-Met sur la réparation par recombinaison homologue observée *in vivo* dans la littérature. Il serait néanmoins intéressant de savoir, à l'instar des tyrosines Y315 et Y54 phosphorylées par c-Abl [224], [225], si les tyrosines Y159, Y191, Y205 et Y315 sont également phosphorylées de façon séquentielle. D'autre part, il est difficile d'évaluer la contribution et la proportion de chacune de ces phosphorylations sur l'activité de RAD51. Selon la littérature [531], la phosphorylation de la tyrosine Y315 a peu d'effet sur l'activité de RAD51 *in vitro*. Ainsi, les effets médiés par BRC4 pourraient être associés à une ou plusieurs des 3 autres tyrosines présentes à l'interface N-1/N ou de l'interface RAD51/BRC4. En particulier la tyrosine Y191 dont les preuves s'accroissent quant à son rôle ou tout du moins son importance dans la régulation de l'activité de RAD51.

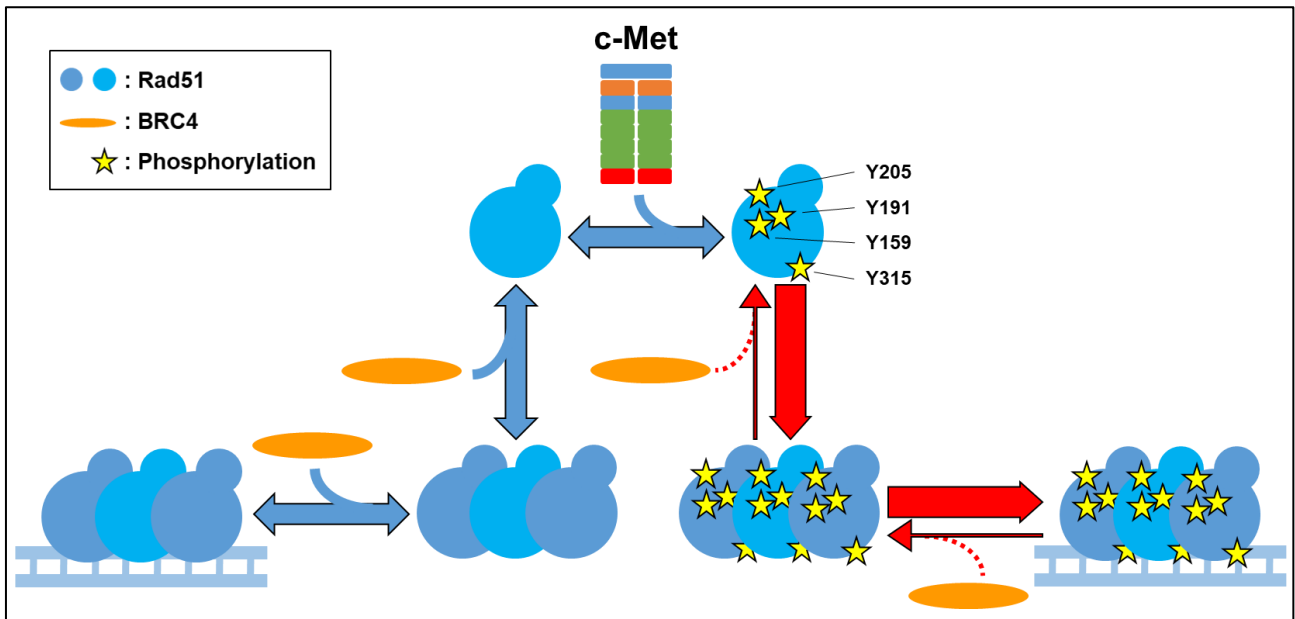


Figure 43 – Schéma récapitulatif du rôle de la phosphorylation de RAD51 par c-Met in vitro

La phosphorylation de RAD51 par c-Met, in vitro, a un impact sur son état de polymérisation, mais aussi sur son interaction avec le peptide BRC4 mimant un motif d'interaction de BRCA2. Nos résultats suggèrent que la phosphorylation de RAD51 sur 4 résidus (Y159, Y191, Y205 et Y315) médiée par le récepteur c-Met pourrait jouer un rôle dans la stabilisation du nucléofilament de RAD51 autour de l'ADN (Thèse T.Chabot, 2020).

Chapitre 2 – Développement d'un nouvel outil de criblage

Le criblage des kinases réalisé par radiométrie, nous a permis d'identifier une cinquantaine de tyrosines kinases susceptibles de reconnaître la protéine RAD51 comme substrat. Il est attendu que les niveaux d'intensité des signaux obtenus soient proportionnels au degré de phosphorylation de RAD51 mais ces données n'apportent aucune information sur le nombre précis et le positionnement des résidus phosphorylés par chacune des kinases testées. C'est pourquoi, parallèlement à notre étude individuelle sur c-Met, nous avons développé un outil de criblage capable d'évaluer et identifier les sites de phosphorylation de RAD51 par chacune des tyrosines kinases sélectionnées. Ce système est basé sur le principe de puces à protéines développées avec la plateforme d'interactions moléculaires et puces activités « IMPACT ».

a. Principe général

Nous déposons une vingtaine de protéines purifiées de RAD51, sauvages et mutantes non phosphorylables, sur un support de nitrocellulose. A partir de ces protéines immobilisées, il s'agira de cribler différentes kinases par phosphorylation *in vitro* sur puce. Ces MPT sont ensuite révélées par des anticorps anti-phosphotyrosine reconnus à leur tour par un anticorps secondaire couplé à un fluorophore ou bien un système Quantum-Dots. Ceci permettra d'obtenir un taux de phosphorylation pour chaque protéine RAD51 et d'établir un profil de phosphorylation de RAD51 caractéristique de chaque kinase

b. Mise en place du système de criblage *in chip*

Sur une lame de verre, 16 micro-membranes de nitrocellulose ou pads sont fixées. Nous avons déposé une combinaison de différentes protéines RAD51 sur chaque pad (**Figure 44**). Chaque pad, défini comme un compartiment d'incubation, peut contenir 64 spots de protéines différentes. Il est donc possible d'incuber 16 kinases différentes pour les testées sur 64 protéines différentes en une seule fois (1000 combinaisons possibles). Les protéines purifiées sont déposées de manière identique par un automate en triplicat. La première étape est de définir un plan de dépôt dans lequel on trouve, une gamme de concentration de notre protéine sauvage RAD51, qui nous permettra de faire notre ligne de base de phosphorylation (**Figure 44**), mais également nos 10 protéines mutantes non-phosphorylables, chacune mutée sur une tyrosine différente de RAD51. Certains dépôts sont des contrôles de phosphorylation positifs (BSA-phosphotyrosine) ou négatif (BSA, BSA-sérine, BSA-thréonine ou le tampon de phosphorylation seul). Enfin, un dépôt de contrôle GST est réalisé afin de s'assurer post phosphorylation de l'absence de kinase active, toutes étiquetées GST, et ainsi de confirmer les détections spécifiques des formes phosphotyrosines de RAD51. Ce dernier contrôle est nécessaire car, par exemple, la kinase active c-Met est phosphorylée en tyrosines Y1234/Y1235 et Y1349/Y1356. Ce signal pourrait ainsi fausser le résultat obtenu quant au profil de phosphorylation de la protéine RAD51 par la kinase c-Met. La révélation du pad avec

un anticorps anti-GST permettra de discriminer l'éventuelle phosphorylation des kinases testées et donc la spécificité de la phosphorylation de RAD51.

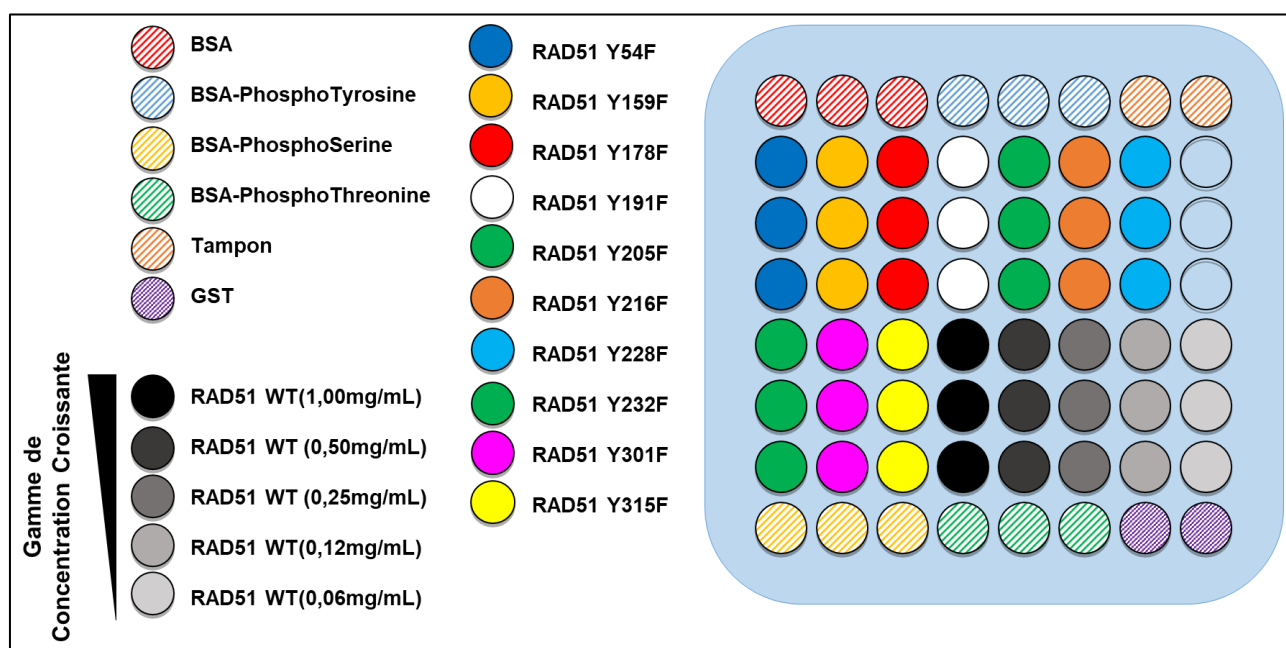


Figure 44 – Plan détaillé des protéines déposées sur chacun des pads de la puce

La protéine RAD51-WT et ses mutants Y/F non-phosphorylables sont déposés de manière ordonnée et en triplicat sur chaque pad. Il contient les protéines d'intérêts, une gamme de concentration de protéine RAD51-WT interne, les contrôles de phosphorylation et de non-phosphorylation par l'utilisation de protéines BSA phosphorylées ou non, les contrôles de tampon et la GST afin de certifier de l'absence de kinase active post phosphorylation (Thèse T.Chabot, 2020).

Chaque pad des puces « phospho-RAD51 » est incubé en présence de nos tyrosines kinases et d'ATP à 37°C (Figure 45). Une fois la phosphorylation « *in vitro/in chip* » réalisée, les lames sont incubées avec différents anticorps (anti- RAD51, anti- phosphotyrosines, anti-GST...). La révélation est possible grâce à un anticorps secondaire marqué avec un fluorophore ou un système Quantum-Dots, les signaux sont mesurés par un scanner à une longueur d'onde adéquat (680 ou 800nm). Trois possibilités s'offrent à nous (Figure 45). Premièrement, la protéine sauvage est phosphorylée, confirmant ainsi une phosphorylation par la kinase étudiée. Cette phosphorylation correspond à l'état de phosphorylation maximale de la protéine par la kinase testée, soit notre 100 % de phosphorylation (Figure 45A). Deuxièmement, un niveau équivalent de l'état de phosphorylation d'une protéine mutante Y/F signifie que la kinase ne phosphoryle pas cette tyrosine de RAD51 (Figure 45B). Troisièmement, et à l'inverse de la situation précédente, si une diminution significative du taux de phosphorylation de RAD51 est observée, cela signifie que le site muté de la protéine est une des cibles de la kinase utilisée (Figure 45C).

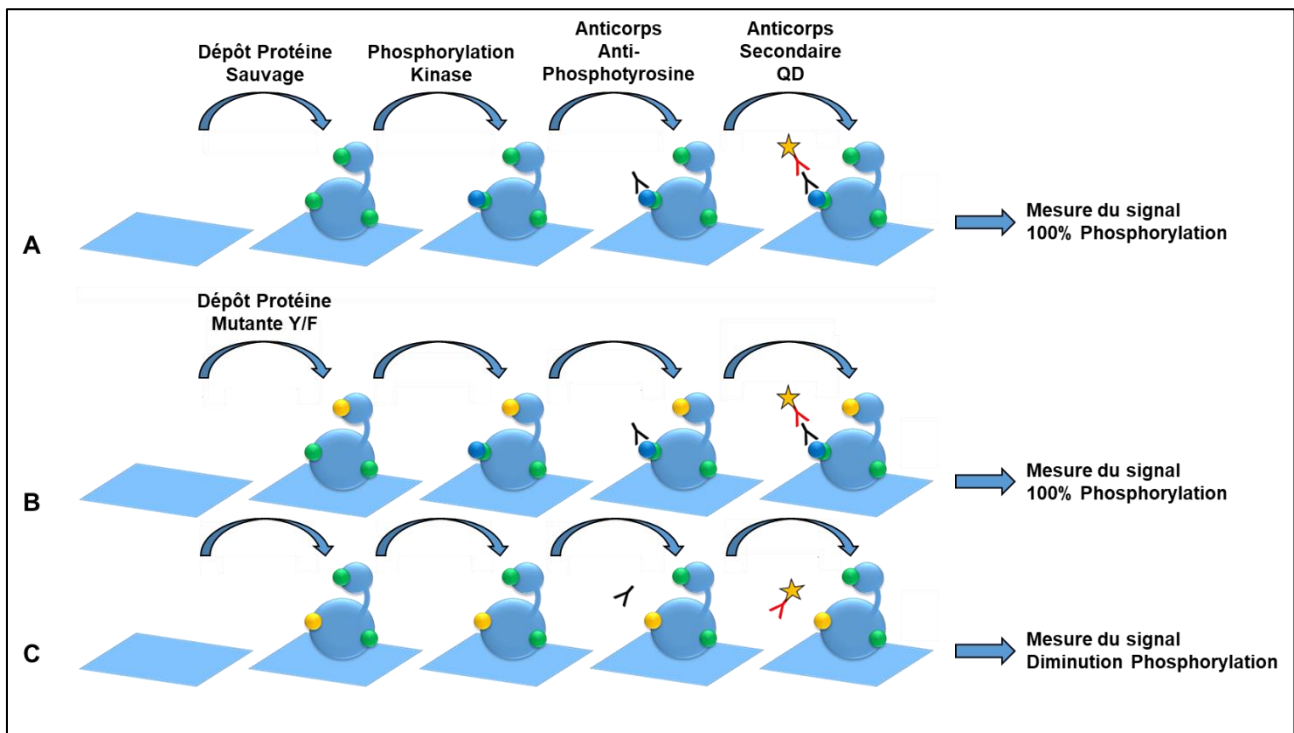


Figure 45 – Méthode de criblage des sites de phosphorylation protéique sur puce

La protéine RAD51-WT et ses mutants Y/F non-phosphorylables sont purifiés et déposés sur chacun des pads (ronds verts – résidus tyrosines, ronds jaunes – mutations Y/F, ronds bleus – formes phosphotyrosines). Les pads sont ensuite incubés en présence de kinase active et d'ATP, puis avec un anticorps dirigé contre les phosphotyrosines. La révélation est obtenue après incubation avec un anticorps secondaire couplé à un quantum-dot. Les signaux sont ensuite quantifiés sur le scanner Odyssey-Licor. **(A)** Le signal de la protéine RAD51 sauvage fixe le seuil de phosphorylation maximale. **(B)** Si la mutation ne modifie pas le signal de phosphorylation, alors le site muté n'est pas visé par la kinase. **(C)** En revanche, si la mutation diminue le signal de phosphorylation, alors le site muté est visé par la kinase (Thèse T.Chabot, 2020).

i. Dépôts des protéines RAD51

Le premier objectif est de vérifier un dépôt identique des quantités protéines RAD51 sauvage ou mutantes ainsi que des protéines de contrôle. Pour cela, après avoir réalisé l'immobilisation des protéines, nous avons incubé les lames avec un anticorps dirigé contre la protéine RAD51. Comme nous pouvons l'observer les dépôts des protéines RAD51, sauvages ou mutantes sont équivalents (**Figure 46A – Cadre Bleu**). Cette observation est confirmée par la quantification des signaux. Elle ne montre aucune différence significative entre les dépôts des protéines RAD51 sauvages et mutantes (**Figure 46B**). Nous pouvons également observer une détection croissante des protéines RAD51 sauvages par l'anticorps en fonction de la concentration (0.062 à 1mg/mL) (**Figure 46A – Cadre Rouge**) ce qui est aussi confirmé par la quantification des signaux (**Figure 46C**). Notre analyse met donc en évidence une relation de proportionnalité linéaire entre la quantité de protéines déposée et le signal obtenu.

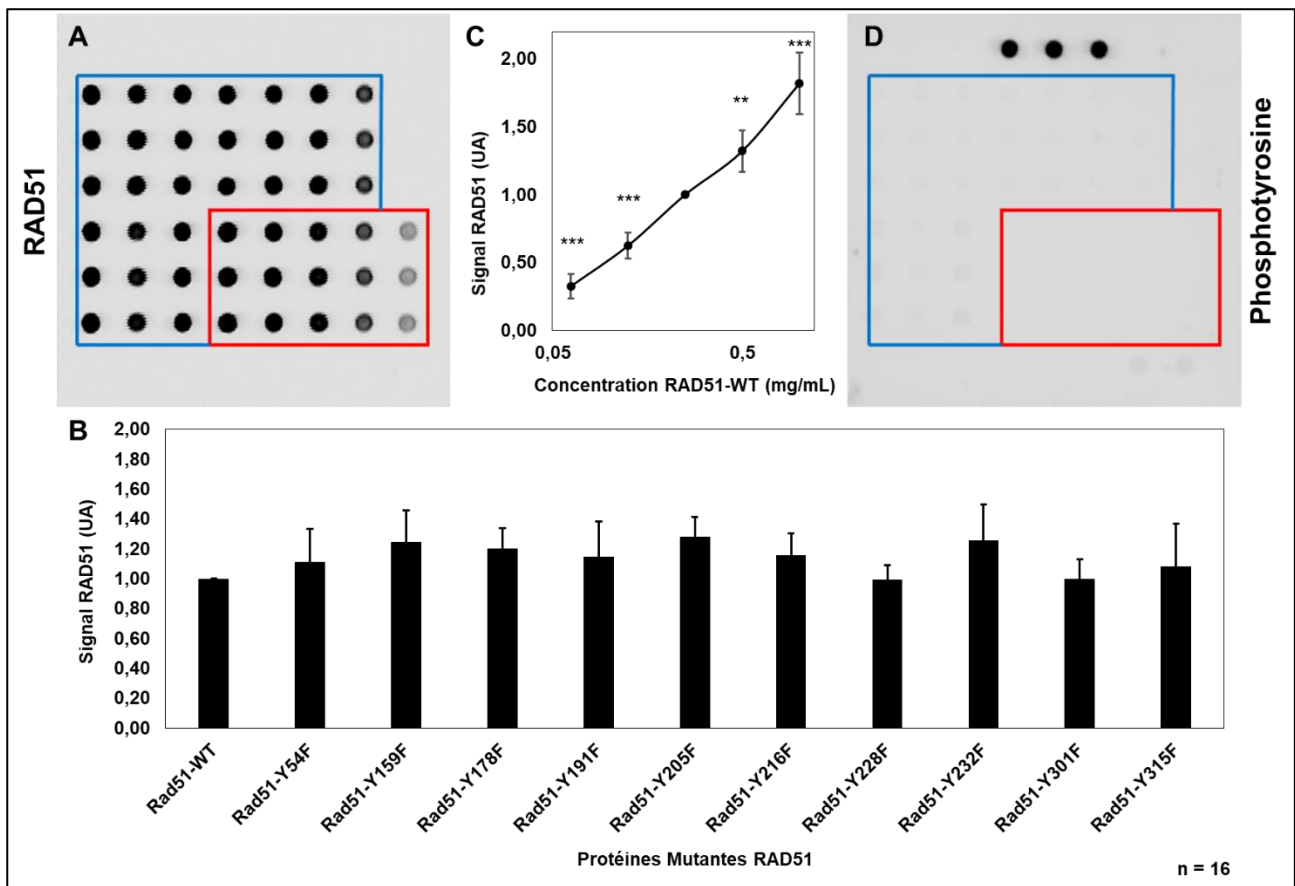


Figure 46 – Mise au point de la méthode de criblage et contrôle des dépôts protéiques

La protéine RAD51-WT et ses mutants Y/F non-phosphorylables, sont purifiés et déposés de manière ordonnée et en triplicat sur chacun des pads. Les pads sont ensuite incubés en présence d'anticorps dirigé contre les protéines RAD51 (A) ou les formes phosphotyrosine (D). Les signaux sont ensuite quantifiés sur le scanner Odyssey-Licor. (C) Le graphique représente le signal de la gamme de concentration la protéine RAD51 allant de 0.06 à 1mg/mL (A et C – Cadres Rouges) selon la concentration de la protéine. (B) Le graphique représente le signal des protéines mutantes RAD51 Y/F en comparaison de la protéine sauvage pour une concentration égale (0.25mg/mL) (A et C – Cadres Bleus). Chacune des expériences a été réalisé seize fois de façon indépendante (n = 16 ; barres d'erreur : s.d).

Nous avons en parallèle évalué le dépôt des protéines en utilisant 2 méthodes différentes. Tout d'abord nous avons utilisé comme précédemment un anticorps dirigé contre la protéine RAD51. Cet anticorps est connu pour avoir comme épitope la partie N-terminale de la protéine. Nous avons également utilisé un anticorps dirigé contre l'étiquette histidine, utilisé pour synthétiser et purifier nos protéines. Cette étiquette est également présente au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine RAD51. Les résultats obtenus montrent tout d'abord que la détection des protéines RAD51 par l'un ou l'autre des anticorps est possible (Figure 47). Ils montrent également de nouveau que le dépôt des protéines est le même quelque soit le mutant étudié. Enfin ces résultats montrent qu'il ne semble pas y avoir une différence significative de détection entre les deux anticorps. Ceci confirme l'accessibilité à la partie N-terminale par l'anticorps RAD51, qui n'est pas impactée par la présence de l'étiquette histidine, et

potentiellement de la kinase. Toutes les protéines sont donc déposées de manière équivalente et suffisante pour être détectées avec les anticorps utilisés.

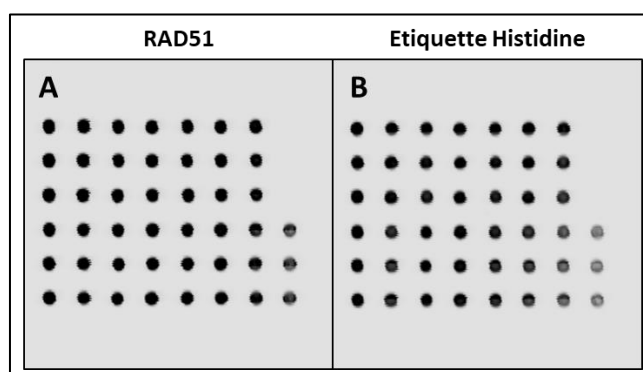


Figure 47 – Contrôle du dépôt des protéines RAD51

La protéine RAD51-WT et ses mutants Y/F non-phosphorylables, sont purifiés et déposés de manière ordonnée et en triplicat sur chacun de pads. Les pads sont ensuite incubés en présence d'anticorps dirigé contre les protéines RAD51 (A) ou contre l'étiquette histidine (B).

ii. Evaluation de la phosphorylation des protéines RAD51

Il est également nécessaire de vérifier l'état de phosphorylation des protéines déposées avant leur incubation avec les différentes kinases. Comme nous pouvons le voir, aucune protéine RAD51 n'est phosphorylée en absence de kinase (**Figure 46D**). Les seuls dépôts détectés par un anticorps dirigé contre les formes phosphotyrosines sont les protéines de contrôle BSA-phosphotyrosine (**Figure 46D**).

c. Criblages des sites de phosphorylation de RAD51

Nous avons tout d'abord utilisé notre système de phosphorylation *in chip* avec la kinase c-Abl reconnue pour phosphoryler RAD51 en Y54 et Y315 [224]. Ceci afin de démontrer la preuve de concept d'une phosphorylation de RAD51 sur puce et déterminer des sites phosphorylés déjà bien établis. Puis nous avons utilisé notre système en présence de la kinase c-Met, de nouveau pour prouver une phosphorylation de RAD51 sur puce et potentiellement confirmer nos résultats obtenus *in vitro*.

i. Criblage de la kinase c-Abl

Comme nous pouvons le voir, la kinase c-Abl (**Figure 48A**) phosphoryle RAD51 lors d'une réaction de phosphorylation *in vitro* réalisée sur puce. Nous observons des variations de l'état de phosphorylation des différentes protéines révélées par l'anticorps dirigé contre les formes phosphotyrosines (**Figure 48A – Cadres Bleus**). Une diminution de la phosphorylation des protéines sauvages RAD51 proportionnelle à la diminution de concentration en protéine (**Figure 48A – Cadres Rouges**) est observée. Les dépôts des protéines sauvages et mutantes, révélés par l'anticorps dirigé contre la protéine RAD51, restent constants (**Figure 48B**). Une fois le ratio signal protéine phosphorylée/signal protéine totale réalisé, une augmentation de l'état de phosphorylation significative, linéaire et proportionnelle à la

concentration en protéine sauvage RAD51 au sein de la gamme de concentration (0.06 à 1mg/mL) est observée pour la kinase c-Abl (**Figure 48C**).

Une fois la quantification des signaux réalisée des protéines mutantes RAD51-Y/F, l'analyse informatique révèle une diminution significative de l'état de phosphorylation des protéines mutantes RAD51-Y54F, RAD51-Y191F et RAD51-Y315F par la kinase c-Abl en comparaison de la protéine RAD51 sauvage (**Figure 48D**). Ceci indiquant donc une phosphorylation de RAD51 par c-Abl sur les tyrosines Y54, Y191 et Y315. Ces résultats sont tout à fait en accord avec les données recueillies de la littérature, tout du moins pour les tyrosines Y54 et Y315, confirmant ainsi l'efficacité de cette technique.

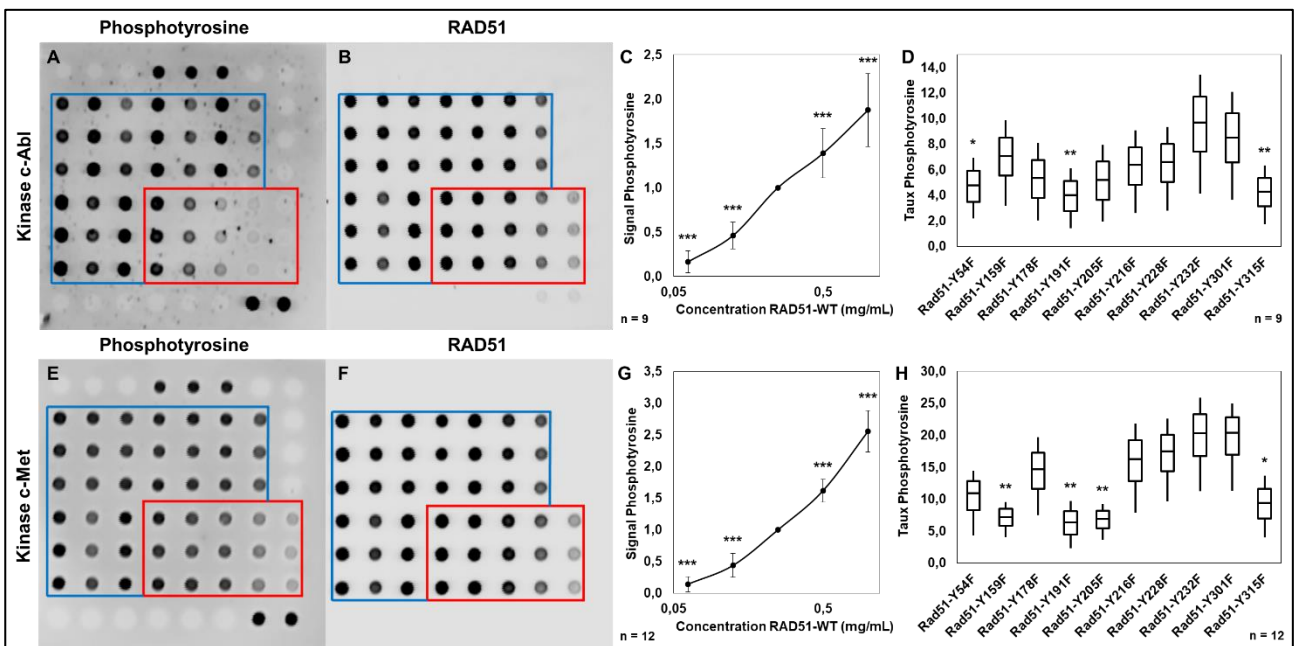


Figure 48 – Le criblage des sites de phosphorylation sur puce confirme les résultats obtenus quant à la phosphorylation de RAD51 par c-Abl sur 2 tyrosines et par c-Met sur 4 tyrosines.

La protéine RAD51-WT et ses mutants Y/F non-phosphorylables sont purifiés et déposés de manière ordonnée et en triplicat sur les pads. Ils sont ensuite incubés en présence de kinase c-Abl (**A à D**) active ou c-Met (**E à H**) active puis en présence d'anticorps dirigé contre les formes phosphotyrosines (**A et E**) ou les protéines RAD51 (**B et F**). Les signaux sont ensuite quantifiés sur le scanner Odyssey-Licor. (**C et G**) Le graphique représente le signal phosphotyrosine de la protéine RAD51 (**A et E – Cadres Rouges**) selon la concentration de la protéine. (**D et H**) Le graphique représente le signal phosphotyrosine moyen des protéines mutantes RAD51 Y/F (**A et E – Cadres Bleus**) en comparaison de la protéine sauvage pour une concentration égale et obtenue après quantification des blots. Tous les signaux ont été normalisés en fonction de la concentration de RAD51 obtenu pour chaque dépôt (**B et F – Cadres Bleus**). Les expériences ont été réalisées neuf ou douze fois de façon indépendante ($n = 9$ et $n = 12$; barres d'erreur : s.d; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$).

ii. Criblage de la kinase c-Met

La kinase c-Met phosphoryle également RAD51 lors d'une réaction de phosphorylation *in vitro* sur puce (**Figure 48E**). Les dépôts des protéines sauvages et mutantes, révélés par l'anticorps dirigé contre la protéine RAD51, sont toujours constants (**Figure 48F**). Après réalisation du ratio signal protéine phosphorylée/signal protéine totale, nous observons encore une fois une augmentation de l'état de phosphorylation significative, linéaire et proportionnelle à la concentration en protéine sauvage RAD51 en ce qui concerne la gamme de concentration (**Figure 48G**).

Nous observons que suite à la quantification des signaux de phosphorylation des protéines mutantes RAD51-Y/F, le criblage révèle une diminution significative de l'état de phosphorylation des protéines RAD51-Y159F, RAD51-Y191F, RAD51-Y205F et RAD51-Y315F par la kinase c-Met en comparaison de la protéine RAD51 sauvage (**Figure 48H**). Ces résultats sont en accord avec les résultats présentés précédemment (*cf. Chapitre 1.a*), obtenus par prédiction *in silico*, par spectrométrie de masse, et par phosphorylation *in vitro*. Ils démontrent que la technique de criblage sur puce est un outil puissant pour déterminer rapidement tous les sites de phosphorylation d'une protéine par une kinase.

De manière plus globale, nous pouvons observer une phosphorylation presque 2 fois plus importante de la protéine RAD51 par la kinase c-Met que par la kinase c-Abl. Cette observation est à corrélérer avec les résultats précédemment obtenus par phosphorylation *in vitro* et criblage radiométrique.

iii. Contrôle de la phosphorylation spécifique de RAD51

Pour confirmer davantage ces résultats, nous avons réalisé une incubation de nos protéines en présence cette fois-ci de kinase inactivée thermiquement. Nous avons également vérifié qu'aucune kinase active ne restait fixée sur la puce après phosphorylation des protéines RAD51. L'objectif est ainsi de confirmer une phosphorylation spécifique des protéines RAD51 par les kinases et que la phosphorylation observée ne soit pas celle des kinases actives utilisées.

Comme nous pouvons le voir, lorsque les kinases c-Abl ou c-Met sont inactivées par la chaleur et incubées avec nos protéines, il n'y a plus de phosphorylation des protéines RAD51 (**Figure 49A et 49B**). Ces résultats prouvent ainsi une phosphorylation spécifique des protéines par les kinases dans les expériences précédentes. Les seuls points phosphorylés observables sont ceux correspondant au contrôle des formes phosphotyrosines : la protéine BSA-phosphotyrosine (**Figure 49A et 49B**).

Nous observons également qu'après avoir réalisé une phosphorylation sur puce avec les kinases actives c-Abl ou c-Met actives, puis incubé les pads avec un anticorps dirigé contre la séquence GST, il n'y a pas de kinase présente sur les pads après phosphorylation in chip

(Figure 49C et 49D). Nous utilisons un anticorps anti-GST comme anticorps de détection, car chacune des kinases utilisées est étiquetée GST. Les seuls points reconnus par l'anticorps anti-GST sont ceux correspondant au contrôle composé de peptide GST (Figure 49C et 49D). Ces résultats confirment une phosphorylation spécifique de RAD51 sur puce par les kinases c-Abl et c-Met.

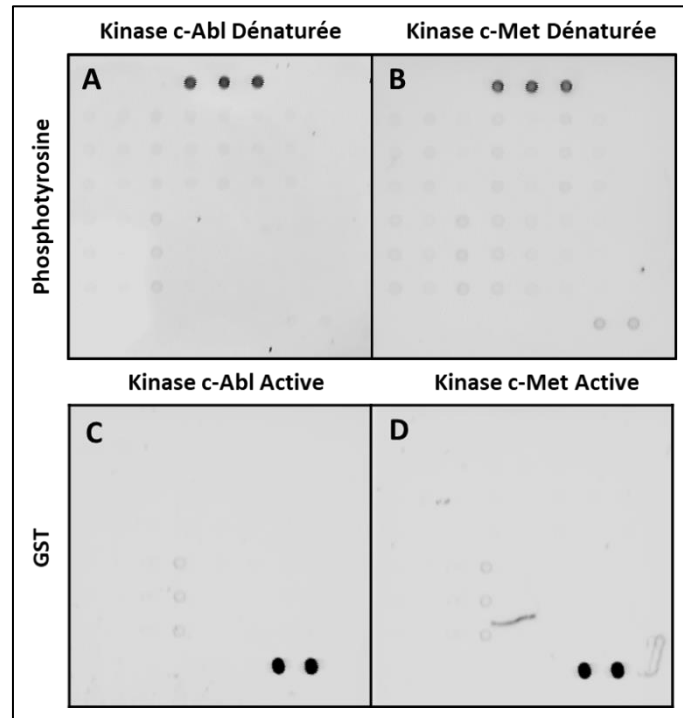


Figure 49 – Contrôle de la spécificité de la phosphorylation des protéines RAD51

La protéine RAD51-WT et ses mutants Y/F non-phosphorylables sont purifiés et déposés de manière ordonnée et en triplicat sur les pads. Ils sont ensuite incubés en présence de kinase c-Abl (A) inactivée thermiquement ou c-Met (B) inactivée thermiquement puis en présence d'anticorps dirigé contre les formes phosphotyrosines. Les pads sont incubés en présence de kinase c-Abl (C) active ou c-Met (D) active puis en présence d'anticorps dirigé contre la séquence GST qui tague chacune des kinases utilisées.

d. Discussion de la deuxième partie

Les systèmes de biopuces sont de toutes sortes (ADN, protéines, sucres, cellules,...). Ils sont basés sur la technologie des « microarray » et sur les interactions biologiques (hybridation ADN/ADN, interaction antigène/anticorps, sucre/protéine, protéine/protéine...) et ont déjà été mis en avant dans de nombreuses publications. Ils correspondent à des tests d'interaction et de criblages miniaturisés à haut débit, rapides et fournissant un grand nombre de signaux en simultanés, ne nécessitant que peu de matériel biologique. Parmi eux, les puces à protéines ou « Protein Chip » permettent d'évaluer le protéome et l'interactome d'un organisme par différentes approches [532].

Au sein de cette famille de puce à protéine, il existe tout d'abord les puces à anticorps. Dans ce cas de figure, le système se base sur l'interaction anticorps/antigène. L'un des deux partenaires de cette interaction est fixé sur la puce, puis incubé en présence du second. Il est

possible de déposer les anticorps sur la puce et les incuber avec les protéines issues d'un organisme. Ces protéines peuvent être marquées ou, à l'instar d'un système ELISA sandwich miniaturisé, être de nouveau incubées avec des anticorps spécifiques marqués une fois fixés aux anticorps de la puce [533]. Ceci afin de déterminer la présence de la protéine d'intérêt de manière plus spécifique ou de modifications post-traductionnelles protéiques au sein de l'extrait cellulaire. Cependant, à la différence du système ELISA, la quantité de protéines immobilisées sur les puces et les volumes d'extraits utilisés sont respectivement 1 000 et 100 fois plus faibles et permettent une sensibilité de détection de 5 fois plus élevée [534]. Cette technique permet de réaliser la recherche de biomarqueurs ou d'établir des profils protéiques. Ce système a notamment été utilisé au sein du laboratoire afin de réaliser une puce « Réparation NHEJ dédiée » et mettre en évidence certaines protéines ou modifications protéiques présentes dans un extrait cellulaire lors d'une réparation par NHEJ comme la protéine DNA-PKcs [535].

A l'inverse, il est possible de déposer les antigènes sur la puce et les incuber avec les anticorps marqués issus de la purification d'un organisme. Comme précédemment le système se base sur l'interaction anticorps/antigène et permet notamment de réaliser le diagnostic de maladies infectieuses par l'utilisation de sérum de patients. Toutes les puces à antigènes et à anticorps sont donc des outils essentiels dans le domaine médical pour le diagnostic et pronostic de maladies infectieuses.

Une autre catégorie de puce à protéines est dite puces à protéines totales où les protéines sont immobilisées et incubées avec d'autres éléments (protéines, molécules, sucres, ...) marquées afin d'évaluer leur interaction [536]. Cette technique permet de valider l'action de molécules thérapeutiques ou de réaliser le suivi de cinétiques d'activation et d'interaction des dites protéines.

À cet arsenal de systèmes de détection et d'interactions moléculaires sur puce, s'ajoute à présent un système de criblage de phosphorylation. C'est la première fois qu'une activité enzymatique par phosphorylation est montrée directement sur puce de nitrocellulose en utilisant non plus la spécificité antigène/anticorps, mais enzyme/substrat. Ce système miniaturisé de criblage à haut débit repose donc sur l'immobilisation de protéines purifiées (substrats) incubées ensuite en présence de kinases actives (enzymes). Les modifications sont ensuite révélées par l'utilisation d'un système non plus d'anticorps marqués, mais de détection par Quantum-Dot.

Les Quantum-Dots sont des nanocristaux d'un matériau semi-conducteur avec des diamètres compris entre 2 et 10 nanomètres considérés comme des « atomes artificiels ». Ils présentent des propriétés électroniques uniques qui sont en partie le résultat des rapports surface/volume inhabituellement élevés pour ces particules. Le résultat le plus apparent est la fluorescence, où les nanocristaux peuvent produire des couleurs distinctives déterminées par la taille des

particules. Les électrons dans ces particules sont confinés dans un petit espace (boîte quantique) et excités énergétiquement par des faisceaux lumineux. A mesure que la taille du cristal diminue, l'énergie nécessaire pour exciter les électrons augmente et plus d'énergie est libérée lorsque le cristal revient à son état fondamental. Cette différence d'énergie selon la taille entraîne un changement de couleur du rouge au bleu dans la lumière émise. Il ne s'agit donc plus de molécules chimiques mais physiques beaucoup plus stables dans le temps, car ils possèdent une durée de vie plus longue, sont plus brillants [537] ce qui les rend attrayants pour de nombreuses applications technologiques et biologiques notamment dans le domaine de l'imagerie. Il a été estimé que les points quantiques sont 20 fois plus brillants et 100 fois plus stables que les molécules fluorescentes traditionnellement utilisées en marquage biologique [538]. Toutes ces données sur les avantages que représentent les Quantum-Dots appuient un peu plus la légitimité de leur utilisation et les résultats que nous avons obtenus en comparaison d'un système de détection basé sur l'utilisation d'anticorps couplé à un fluorophore.

Grâce à ce système de puce de criblage des sites de phosphorylation de RAD51 par les tyrosines kinases, nous avons de nouveau mis en évidence les quatre sites de phosphorylation de RAD51 par c-Met : Y159, Y191, Y205 et Y315 (**Figure 48**). Cette nouvelle méthode innovante permet de façon fiable de détecter les variations des différentes phosphorylations par des kinases testées et ainsi d'établir des profils de phosphorylation selon la kinase testée. Non seulement la technique de puce nous a permis de confirmer des résultats obtenus par les différentes méthodes biochimiques plus « classiques ». Sa fiabilité a également été appuyé par les résultats déjà présents dans la littérature comme la phosphorylation des tyrosines Y54 et Y315 de RAD51 par c-Abl (**Figure 48**). Cette méthode nous a néanmoins permis de mettre en évidence une nouvelle phosphorylation de RAD51 par c-Abl en Y191.

Il est intéressant de noter que ces 3 tyrosines Y54, Y191 et Y315 sont incluses dans une séquence particulière équivalente à la séquence consensus de reconnaissance de c-Abl (I/V/L-Y-X-P/F). La similarité en ce qui concerne la tyrosine Y191 et Y54 va plus loin. En effet, une diminution de phosphorylation peut être causée par la séquence protéique incluant la tyrosine Y191 (Nt-DNVAYARAFN-Ct). Il se trouve qu'elle est extrêmement proche de la séquence de RAD51 incluant la tyrosine Y54 (Nt-EAVAYAPKKE-Ct). En effet, les séquences ont plusieurs similarités : Nt-(-)-X-V-A-Y-A-X- Φ - Φ - δ -Ct ((-) = acide aminé chargé négativement ; Φ = acide aminé hydrophobe ; δ = acide aminé polaire), ce qui explique sans doute les résultats obtenus. En élargissant et en alignant les deux séquences (Clustal Omega) au sein desquelles se trouvent les tyrosines d'intérêt (Y54 – Nt-**AGFHTVEAVAY**APKKELINIK-Ct ; Y191 – Nt-**SGSDVLDNVAY**ARAFNTDHQT-Ct), 10 acides aminés sont fortement conservés ou possèdent des caractéristiques physico-chimiques similaires. Ces observations appuient un peu plus les résultats obtenus et montre l'importance de cette tyrosine Y191. Enfin, il a été montré que la tyrosine Y188 de RAD51 de xénope pouvait également être

phosphorylée par c-Abl [226], [227], il se trouve qu'elle correspond à la tyrosine 191 de la protéine RAD51 humaine que nous étudions.

La faisabilité de la puce de criblage des phosphorylations de protéines de RAD51 par les kinases a donc été démontrée. Pourtant, quelques questions subsistent, notamment l'accessibilité des kinases aux protéines immobilisées et l'état de polymérisation des protéines sur les lames. Nous avons montré que la partie N-terminale de la protéine semblait être toujours accessible malgré la présence de l'étiquette histidine (**Figure 49**), mais quand est-il du reste de la protéine et de son état d'oligomérisation ? En effet, nous avons démontré que l'état de polymérisation jouait sur l'accessibilité de la kinase à ses sites de phosphorylation et que cela variait d'un mutant à l'autre. Or, l'élément essentiel de tout essai basé sur l'utilisation de protéines fonctionnelles est qu'elles doivent conserver leur structure native, de sorte que des interactions fonctionnelles et des modifications significatives puissent avoir lieu. Cette interrogation pourrait être levée par l'utilisation de mutants non-polymérisables comme ceux présentés dans le chapitre précédent, ou bien, dans le cas de RAD51, l'utilisation de tampon avec une concentration en sels plus forte afin de dépolymériser au mieux les formes polymères de la recombinaise.

Une autre limite de cette technique réside dans la nécessité de préparer une collection de protéines sélectionnées, purifiées et organisées. Même si la quantité de matériel nécessaire est faible, il existe un trop grand nombre de combinaisons protéiques possible (sauvages/mutantes). En effet, le nombre de protéines immobilisées est limité et le protéome humain comporte plus de 300 000 protéines. Le criblage des sites de phosphorylation de l'ensemble des protéines est donc difficile à envisager et doit être organisé. Cependant, l'établissement d'un profil de phosphorylation pour une protéine donnée semble être réalisable au vu du nombre moins important de kinases existantes (environ 600). De plus, nous n'avons aucune information quant à la force et la vitesse des interactions enzyme/substrat, ou du moins protéine/protéine qui sont réalisées lors de cette phosphorylation « *in chip* ». Il serait donc intéressant de coupler cette technique à celle de la résonance plasmonique de surface afin d'évaluer ces paramètres.

Enfin, il serait important d'optimiser au mieux la détection des signaux. En effet, même si ces tests sont extrêmement sensibles, des pertes de signaux sont possibles à de nombreuses étapes. Tout d'abord suite au lavage/séchage des puces post-interaction/phosphorylation, pouvant induire une perte de matériel à détecter et donc de signal brut. Ensuite lors de la détection à proprement parler. L'utilisation d'un système Quantum-Dot à la place de fluorochrome permet déjà une optimisation de la détection, mais une absorption de fluorescence par le support reste possible et réduit le signal observé.

Cette technique permet donc un criblage rapide et fiable pour l'analyse à haut débit du « kinome » des protéines d'intérêts. Elle nous a également permis de démontrer une activité

enzymatique par phosphorylation « *in chip* » pour la première fois. A court terme, cette puce de criblage devrait donc permettre de déterminer rapidement et efficacement le « kinome » de la protéine RAD51, de manière complémentaire aux techniques de détection plus classique comme la spectrométrie de masse. Elle pourrait également nous permettre de tester de nouvelles molécules ou différents inhibiteurs de kinases rapidement. L'objectif à long terme étant de développer cette technique de criblage et de détection de kinases actives non plus en utilisant des kinases purifiées *in vitro*, mais les kinases actives présentes au sein d'extraits protéiques issus d'organismes cellulaires. L'objectif de cela est encore une fois afin d'établir un « kinome » cellulaire, modulé selon la lignée, la pathologie et les traitements réalisés comme l'utilisation d'inhibiteurs de kinases.

Chapitre 3 – Impact de la modulation de c-Met dans la réponse aux dommages à l'ADN

Nous savons désormais que la protéine RAD51 peut être phosphorylée par c-Met. Cette phosphorylation entraîne *in vitro* une modulation de son activité intrinsèque. L'objectif de ce chapitre est de définir le rôle du récepteur c-Met sur l'activité de RAD51 *in cellulo* et son action sur la réparation par RH des CDB. L'inactivation de c-Met par des inhibiteurs chimiques ou avec des siRNA conduit à une diminution de la réparation par RH. Dans ces conditions, une diminution de la synthèse de RAD51 et de son interaction avec BRCA2 permettant sa translocation nucléaire lors de dommages à l'ADN a été mise en évidence dans plusieurs travaux [302], [501], [504], [505], [539]–[543]. Nous avons choisi la démarche inverse en activant le récepteur c-Met par son ligand HGF-SF. Le but est de se positionner dans des conditions plus « physiologiques » pour les cellules tumorales afin de comprendre l'importance du récepteur c-Met dans leur développement et leur résistance en lien avec la réparation de l'ADN.

a. Impact de la modulation de c-Met sur la réparation des CDB par RH

Pour commencer, une analyse de l'effet de l'activation du récepteur c-Met par la HGF-SF sur la réparation par RH intracellulaire a été réalisée. Nous avons utilisé pour cela un modèle cellulaire RG37-DRGFP-I-SceI qui nous permet de quantifier la réparation par RH en mesurant la fluorescence de la protéine GFP. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux. La fluorescence de la GFP est plus importante lorsque l'endonucléase I-SceI est exprimée, car elle déclenche des CDB au niveau de la cassette GFP inactivée transfectée stablement. Si la cassure est réparée, la cassette GFP est réactivée et la cellule fluoresce (**Figure 30**). La fluorescence observée est donc directement corrélée au nombre de CDB réparée par RH.

Des travaux similaires utilisant cette technique avait déjà montré une diminution de la RH lorsque le c-Met était inhibé [504], [540]. Nous obtenons le même résultat par l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de c-Met : PHA665752 et BMS777607. En effet, un traitement des cellules par ces inhibiteurs conduit à une diminution de la fluorescence et donc de l'efficacité de réparation des CDB par RH des cellules RG37 de près de 20% (**Figure 50**). La diminution de la fluorescence suite au prétraitement avec les inhibiteurs de c-Met et au traitement au HGF-SF est de près de 50% en comparaison des cellules non traitées (**Figure 50**). A l'inverse, lorsque les cellules sont traitées au HGF-SF (50ng/ml), une augmentation significative d'environ 20% de la fluorescence est observée, suggérant une augmentation la fréquence de réparation par RH des CDB (**Figure 50**).

Ces résultats montrent donc un effet du HGF-SF et du récepteur c-Met sur la réparation des CDB par RH intracellulaire. Ces résultats nous laissent penser que deux phénomènes s'additionnent. L'inactivation par l'utilisation de nos inhibiteurs bloque les récepteurs c-Met

activés par notre traitement au HGF-SF. Ils bloquent également les récepteurs déjà actifs au sein des cellules RG37. En revanche, même si ce modèle cellulaire est intéressant, cet effet pourrait être plus important encore dans un modèle cellulaire où une partie de la population du récepteur ne serait pas déjà activée.

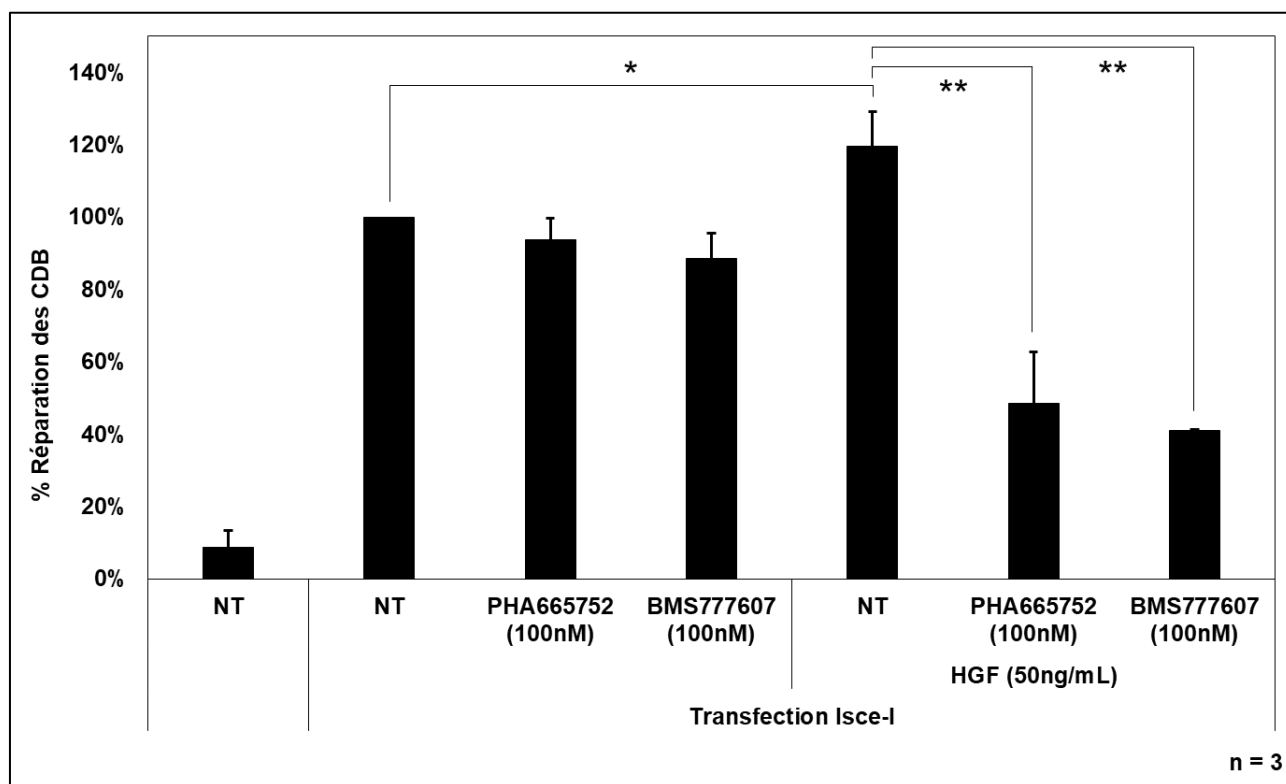


Figure 50 – La kinase c-Met augmente la réparation des CDB par recombinaison homologue suite à l’activation par l’HGF-SF

La fréquence de réparation par RH des cellules RG37 DR-GFP traitées ou non au HGF-SF (50ng/mL ; 12h) et prétraitées avec des inhibiteurs spécifiques de c-Met, PHA665752 et BMS777607 (100nM ; 2h) est estimée l’expression de la GFP dans les cellules grâce à la cytométrie en flux. Le graphique représente la moyenne du pourcentage de fréquence de recombinaison homologue de trois expériences indépendantes (n = 3 ; barres d’erreur : s.d ; * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01) (Modifié d’après Chabot et al., 2019 - cf. Annexe 15).

b. Impact de la modulation de c-Met sur des cellules cancéreuses prostatiques

i. Caractéristiques des lignées cellulaires.

Pour réaliser les expériences suivantes, nous avons fait le choix d’utiliser deux lignées cellulaires semblables : les lignées PC-3 et DU145. Il s’agit de deux lignées tumorales de cancer de la prostate. Le choix de ces deux lignées s’est fait suite à plusieurs tests parmi plusieurs lignées cellulaires du laboratoire et aux caractéristiques développées dans la littérature. Ces deux lignées expriment un niveau semblable d’ARNm codant pour c-Met et de récepteur mature [544]. En revanche elles diffèrent par la présence d’un récepteur c-Met physiologiquement phosphorylé sur les tyrosines Y1234/Y1235 dans les cellules PC-3 [515]. Cette phosphorylation est un marqueur de l’activité du RTK [373] qui est donc actif dans cette

lignée. À l'inverse, les cellules DU145 possèdent un récepteur c-Met non-phosphorylé et donc inactif [515]. Cette activation se fait par l'ajout du ligand d'HGF-SF. Une rapide étude *in cellulo* de l'effet du HGF-SF sur la phosphorylation du récepteur c-Met en tyrosines Y1234/1235 dans nos deux lignées cellulaires modèles a donc été réalisée pour confirmer ces résultats.

En immunofluorescence, dans les cellules DU145, l'ajout de HGF-SF conduit bien à une augmentation de la phosphorylation de c-Met en tyrosines Y1234/1235 (**Figure 51A, 51B et 55A**). En revanche chez les cellules PC-3, le récepteur est déjà phosphorylé en tyrosines Y1234/1235 dans les conditions basales (**Figure 51C et 55B**). Il n'y a pas de modification (augmentation ou diminution) de cette phosphorylation du récepteur c-Met suite au traitement des cellules PC-3 par le HGF-SF (**Figure 51D et 55B**).

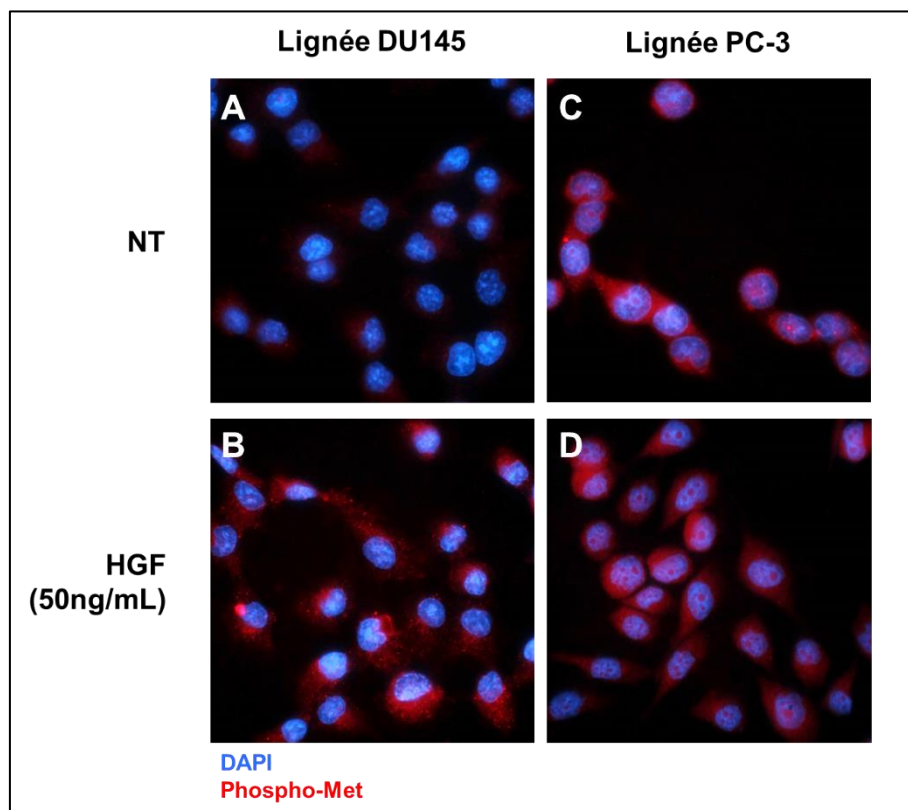


Figure 51 – Etat de phosphorylation de c-Met dans les cellules DU145 et PC-3

Le taux de phosphorylation de la protéine c-Met est évalué par immunofluorescence (bleu – DAPI – Noyau ; rouge - phosphotyrosine Y1234/Y1235 c-Met) dans des cellules DU145 et PC-3 traitées ou non avec du HGF-SF (50ng/mL ; 12h).

Ces résultats nous ont donc permis de voir que le récepteur c-Met n'était pas actif dans la lignée DU145. A l'inverse, comme cela est décrit dans la littérature [515], il est très phosphorylé dans la lignée PC-3 et donc actif. Toutes ces données nous ont donc fait choisir ces lignées comme modèle de travail afin d'évaluer l'impact de l'activation de c-Met sur la réparation des CDB par RH.

ii. Impact de la modulation de c-Met sur la signalisation des dommages à l'ADN

Pour évaluer la signalisation des dommages à l'ADN lors de CDB, l'observation de la formation ou non de foyers γ H2AX a été réalisée. Pour rappel, le variant γ H2AX correspond à une phosphorylation de l'histone H2AX, il s'agit d'un marqueur des CDB de l'ADN [79], [80]. Pour cela, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la phosphorylation de γ H2AX en sérine S139 sur nos deux lignées cellulaires ayant subi ou non des dommages. Ces dommages ont été chimio-induits par utilisation de camptothécine. Pour rappel, la camptothécine stoppe l'action de la protéine topoisomérase I qui empêche la décontraction de l'ADN et provoque des CDB en bloquant la fourche de réplication [24], [25]. Ces dommages sont principalement réparés par RH [26].

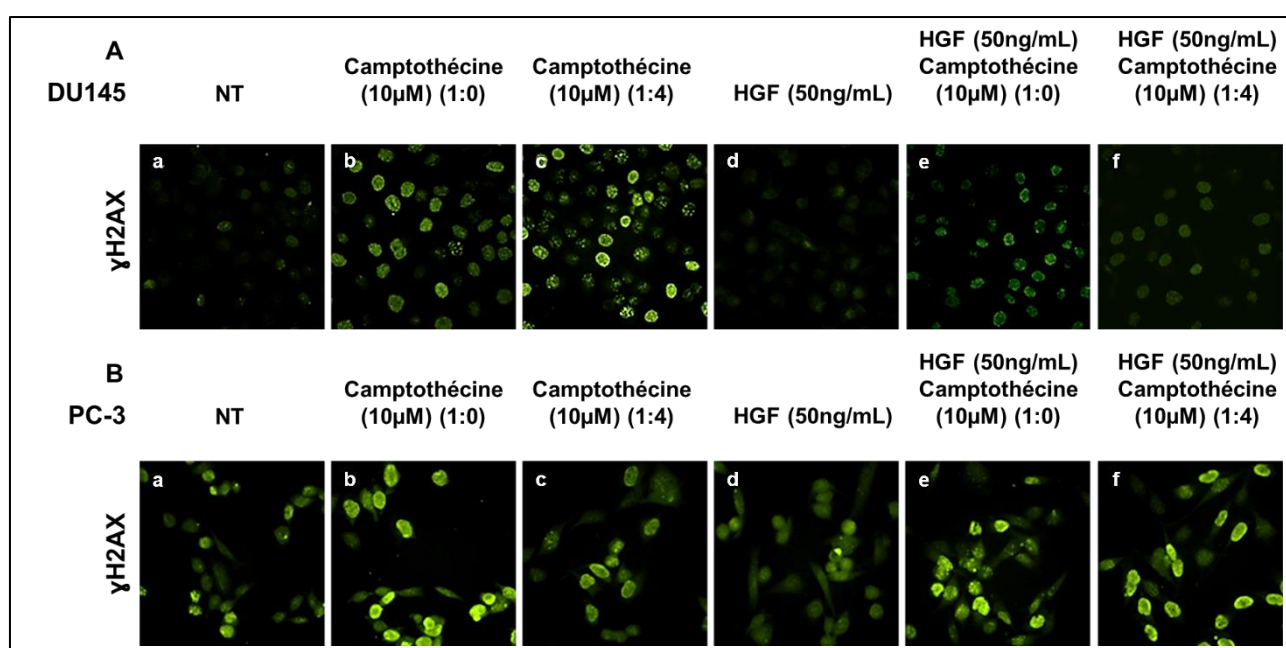


Figure 52 – L'activation de c-Met par HGF-SF réduit les foyers γ H2AX dans les cellules DU145.

La forme phosphorylée de l'histone H2AX en γ H2AX est évaluée par immunofluorescence (vert – γ H2AX) dans des cellules DU145 (A) et PC-3 (B) prétraitées ou non avec du HGF-SF (50ng/mL ; 12h) et de la camptothécine (10 μ M ; 1h de traitement \pm 4h de récupération).

Dans les conditions basales, les cellules DU145 n'ont pas de foyers γ H2AX (Figure 52A.a). Nous pouvons observer que les foyers γ H2AX apparaissent suite au traitement à la camptothécine (Figure 52A.b et 52A.c) et sont bien plus nombreux en comparaison de la condition non-traitée (Figure 52A.a). Suite à un prétraitement des cellules au HGF-SF, une diminution de la quantité de ces foyers γ H2AX dans les cellules DU145 est également observable (Figure 52A.d). Cette diminution du nombre de foyer est aussi visible lors du traitement combiné camptothécine/HGF-SF (Figure 52A.e et 52A.f). Ces résultats montrent bien un impact positif du HGF-SF sur la formation des foyers γ H2AX dans les cellules DU145 soumises à un traitement à la camptothécine, et donc sur la signalisation des dommages par CDB de l'ADN.

En revanche pour les cellules PC-3, nous pouvons observer la formation de nombreux foyers γ H2AX au sein des cellules non traitées (**Figure 52B.a**). Ces résultats montrent donc la présence de CDB et d'une signalisation forte au niveau basal dans les cellules PC-3. De plus, une augmentation des foyers est visible suite au traitement à la camptothécine (**Figure 52B.b et 52B.c**). En ce qui concerne le prétraitement au HGF-SF seul, nous pouvons voir une très légère diminution du signal γ H2AX en comparaison de la condition non-traitée (**Figure 52B.d**). En revanche, il ne semble pas y avoir d'effet suite à l'ajout combiné d'HGF-SF et de camptothécine (**Figure 52B.e et 52B.f**). Nous observons en effet toujours un nombre important de foyers γ H2AX malgré le prétraitement au HGF-SF. Ces résultats ne permettent pas d'affirmer que l'HGF-SF a un impact sur la formation des foyers γ H2AX et donc sur la signalisation cellulaire des dommages à l'ADN dans les cellules PC-3 soumises à un traitement à la camptothécine.

iii. Impact de la modulation de c-Met sur la formation des foyers RAD51 en réponses aux dommages induits par la camptothécine

Nous avons réalisé un marquage *in cellulo* des foyers RAD51 dans les cellules DU145 et PC-3. L'objectif est d'observer et de quantifier le nombre de foyers RAD51 présents dans les noyaux de nos deux modèles cellulaires suite à des CDB de l'ADN causés par la camptothécine (1h de traitement \pm 4h de récupération) et combiné ou non à un prétraitement au HGF-SF. Une macro-instruction de comptage des foyers RAD51 nucléaires après observation au microscope confocal a été développée en collaboration avec la plateforme MicroPICell. Elle nous a permis de quantifier rapidement et facilement le nombre de foyers RAD51 nucléaires observés.

En ce qui concerne la lignée DU145, nous observons une augmentation de la quantité de foyers suite au traitement à la camptothécine, après une récupération de 4h (1:4) en comparaison des cellules non traitées (**Figure 53A**). Suite à un prétraitement au HGF-SF, une légère augmentation du nombre de foyers RAD51 au niveau nucléaire est identifiée (**Figure 53A**). Mais la combinaison d'un prétraitement au HGF-SF suivi d'un traitement à la camptothécine, avec une récupération de 0 ou 4h (1:0 ou 1:4), permet d'observer un nombre bien plus important de foyers RAD51 nucléaires, en comparaison des conditions sans HGF-SF (**Figure 53A**). Nous pouvons en conclure que l'activation de c-Met par son ligand stimule le recrutement de foyers RAD51 dans le noyau. Phénomène d'autant plus important lorsque des dommages à l'ADN sont réalisés.

Après la quantification des foyers, un nombre de foyers RAD51 plus important est présent dans le noyau après traitement des cellules DU145 au HGF-SF par comparaison avec les conditions contrôle (**Figure 53B**). La différence observée entre les deux conditions (camptothécine vs HGF/camptothécine) permet de penser que RAD51 serait davantage recrutée suite à la stimulation du récepteur c-Met (**Figure 53B**).

Nous avons réalisé les mêmes traitements dans les cellules PC-3. Les résultats obtenus ne semblent pas montrer de variations quant à la quantité de foyers RAD51 quelle que soit la condition étudiée (**Figure 53C**). En revanche, nous pouvons observer une quantité déjà importante des foyers RAD51 dans la condition non-traitée (**Figure 53C**). Après réalisation de la quantification des foyers, nous voyons qu'un prétraitement au HGF-SF n'engendre pas de différences significatives (**Figure 53D**). En revanche, le même profil est observé dans les deux lignées cellulaires. En effet, nous voyons une augmentation croissante du nombre de foyers RAD51 au fur et à mesure de la récupération des cellules suite à des dommages à l'ADN induits par camptothécine (**Figure 53D**).

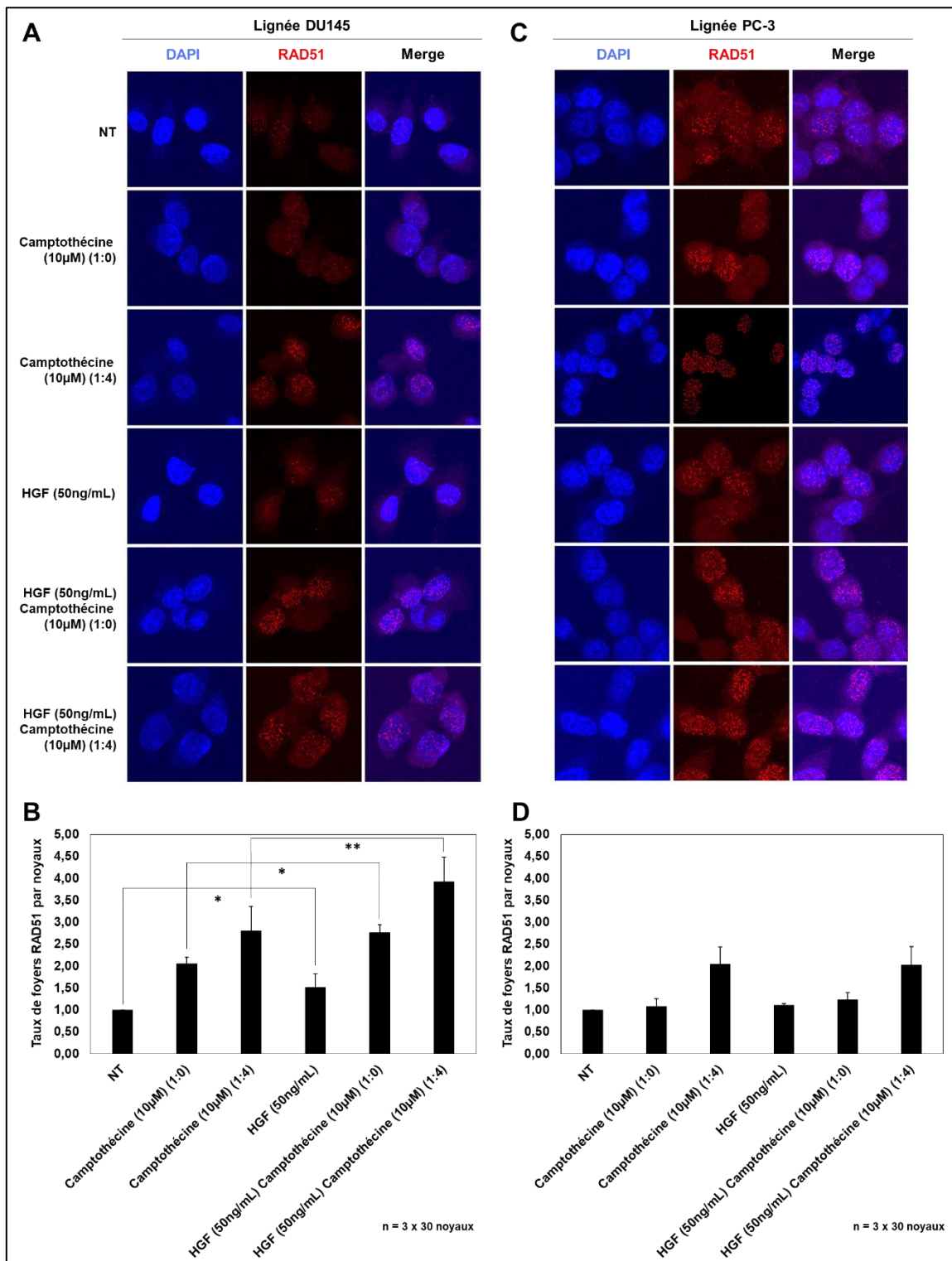


Figure 53 – L'activation de c-Met par HGF-SF stimule le recrutement de RAD51 dans le noyau

La quantité de foyer RAD51 est évaluée par immunofluorescence (bleu – DAPI – Noyau ; rouge – RAD51) dans des cellules DU145 (A) et PC-3 (C) prétraitées ou non avec du HGF-SF (50ng/mL ; 12h) et traitées ou non avec de la camptothécine (10µM ; 1h de traitement ± 4h de récupération). Les graphiques représentent la quantification du taux des foyers RAD51 dans les cellules DU145 (B) et PC-3 (D) observée au microscope confocal en comparaison de la condition contrôle non traitée. Cette quantification est réalisée à l'aide de la macro d'analyse mise au point sur la plateforme MicroPICell. Chaque expérience a été menée trois fois de manière indépendante (n = 3 x 30 noyaux ; barres d'erreur : s.d; * : p < 0.05, ** : p < 0.01).

iv. Impact de la modulation de c-Met sur l'expression et la distribution intracellulaire de RAD51

Nous avons réussi à démontrer que l'activation du récepteur c-Met par son ligand HGF-SF module la capacité des cellules à déclencher la RH intracellulaire. Egalement cette activation engendrait un recrutement plus important des protéines RAD51 au niveau des CDB en réponses aux dommages à l'ADN induits par camptothécine. La question que nous nous posons désormais est de savoir si cette modulation de la RH et de ce recrutement sont dus à une régulation de l'expression du gène et/ou de la synthèse de la protéine centrale de ce mécanisme : RAD51. Nous cherchons également à connaître la distribution de cette protéine au sein de la cellule lorsque le récepteur c-Met est activé.

1. Augmentation de la transcription du gène codant pour RAD51

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la régulation de la transcription de RAD51 suite à la stimulation du récepteur c-Met par son ligand HGF-SF et dans des conditions de dommages à l'ADN. Pour cela, nous avons évalué par qRT-PCR le taux d'expression des ARN codant pour RAD51 dans ces différentes conditions. Nous avons utilisé le gène *rp13a* comme gène référence. Nous observons que suite au traitement par camptothécine dans la lignée DU145, les cellules transcrivent davantage le gène codant pour RAD51 (**Figure 54A**). De plus, nous pouvons voir que la stimulation à l'HGF-SF conduit également à augmenter la transcription de la recombinaise humaine, sans pour autant qu'il y est de dommages chimio-induits (**Figure 54A**). Cette transcription semble restée importante lors d'un prétraitement au HGF-SF suivi d'un traitement à la camptothécine (**Figure 54A**).

Dans la lignée PC-3, nous observons qu'à l'inverse la transcription de l'ARN codant pour RAD51 est déjà fortement réalisée dans les conditions basales et augmente suite à un traitement des cellules à la camptothécine (**Figure 54B**). Lors de l'ajout d'HGF-SF, ce niveau d'expression n'augmente pas (**Figure 54B**). De plus, la transcription du gène *rad51* reste la même suite à l'action de la camptothécine avec ou sans prétraitement au HGF-SF (**Figure 54B**).

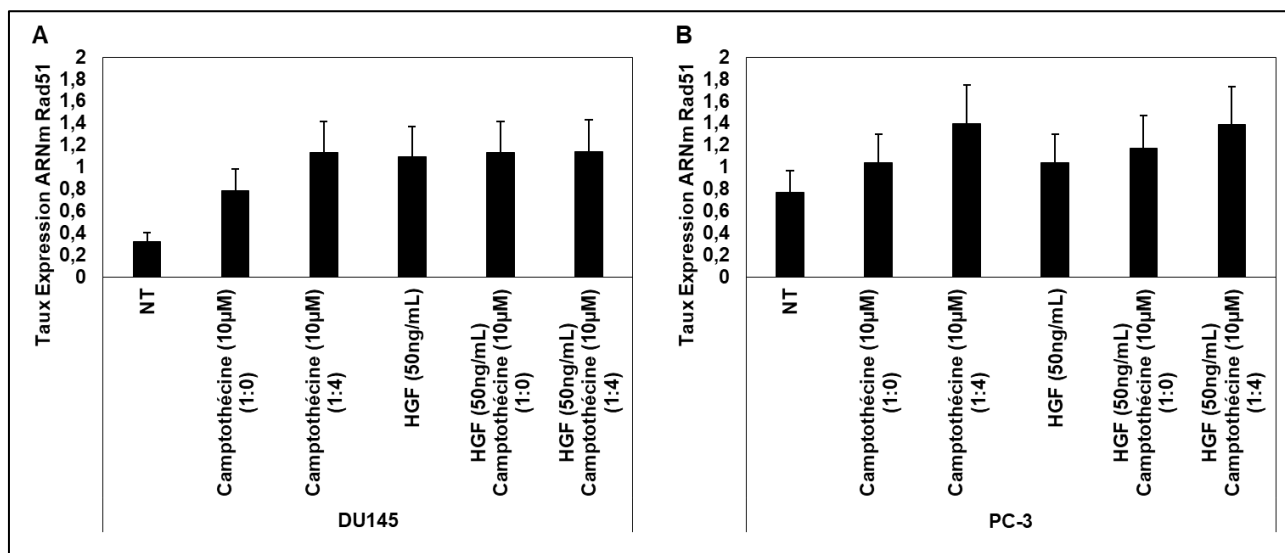


Figure 54 – Transcription de l'ARN de la recombinaise RAD51 en fonction de l'activation par HGF-SF

Les cellules DU145 (A) et PC-3 (B) ont été traitées avec du HGF-SF en concentration croissante (0-100ng/mL ; 12h) puis les ARN ont été purifiés puis rétrotranscrit. La présence des ARNm codant pour RAD51 et RPL13A a été évaluée par qPCR CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System BIORAD (n=2).

2. Augmentation de la synthèse de la recombinaise RAD51

Nous nous sommes ensuite intéressés à la régulation de la synthèse protéique de RAD51 suite à la stimulation du récepteur c-Met. Pour cela, l'évaluation du taux de c-Met phosphorylée en comparaison de l'expression protéique de RAD51 a été réalisée suite à la stimulation du récepteur par une dose croissante de HGF-SF.

En ce qui concerne la lignée DU145, le récepteur c-Met n'est pas phosphorylé en Y1234/Y1235 dans la condition non-traitée (**Figure 55A**). Pour rappel, la phosphorylation des tyrosines Y1234/Y1235 au niveau du domaine à activité tyrosine kinase de c-Met est un marqueur de l'activation du récepteur. En revanche, nous observons l'apparition d'une bande unique suite à l'ajout d'HGF-SF correspondant à phospho-Met Y1234/Y1235 (pMet) (**Figure 55A**). Cette phosphorylation du récepteur c-Met augmente de façon proportionnelle à la stimulation avec des concentrations croissantes de HGF-SF (**Figure 55A**). En parallèle, la quantité de protéine RAD51 augmente pour toutes les concentrations en HGF-SF (**Figure 55A**).

Pour les cellules PC-3, une bande révélée par l'anticorps dirigé contre phospho-Met Y1234/Y1235 (pMet) dans des conditions non-traitées est observable (**Figure 55B**). Ces résultats confirment ceux observés par immunofluorescence dans lesquels une phosphorylation basale du récepteur c-Met est visible. Nous voyons également l'apparition de deux bandes distinctes phospho-Met (pMet) (**Figure 55B**). Ces deux bandes correspondent sans doute à la forme c-Met et à la forme pro-Met immature du récepteur qui est aussi

phosphorylée en Y1234/Y1235 mais de taille plus importante. Cependant, il ne semble y avoir aucune évolution de la phosphorylation en fonction du traitement HGF-SF réalisé (**Figure 55B**). De la même manière, la quantité de protéines RAD51 dans les cellules PC-3 ne varie pas avec l'augmentation de la concentration en HGF-SF utilisée (**Figure 55B**).

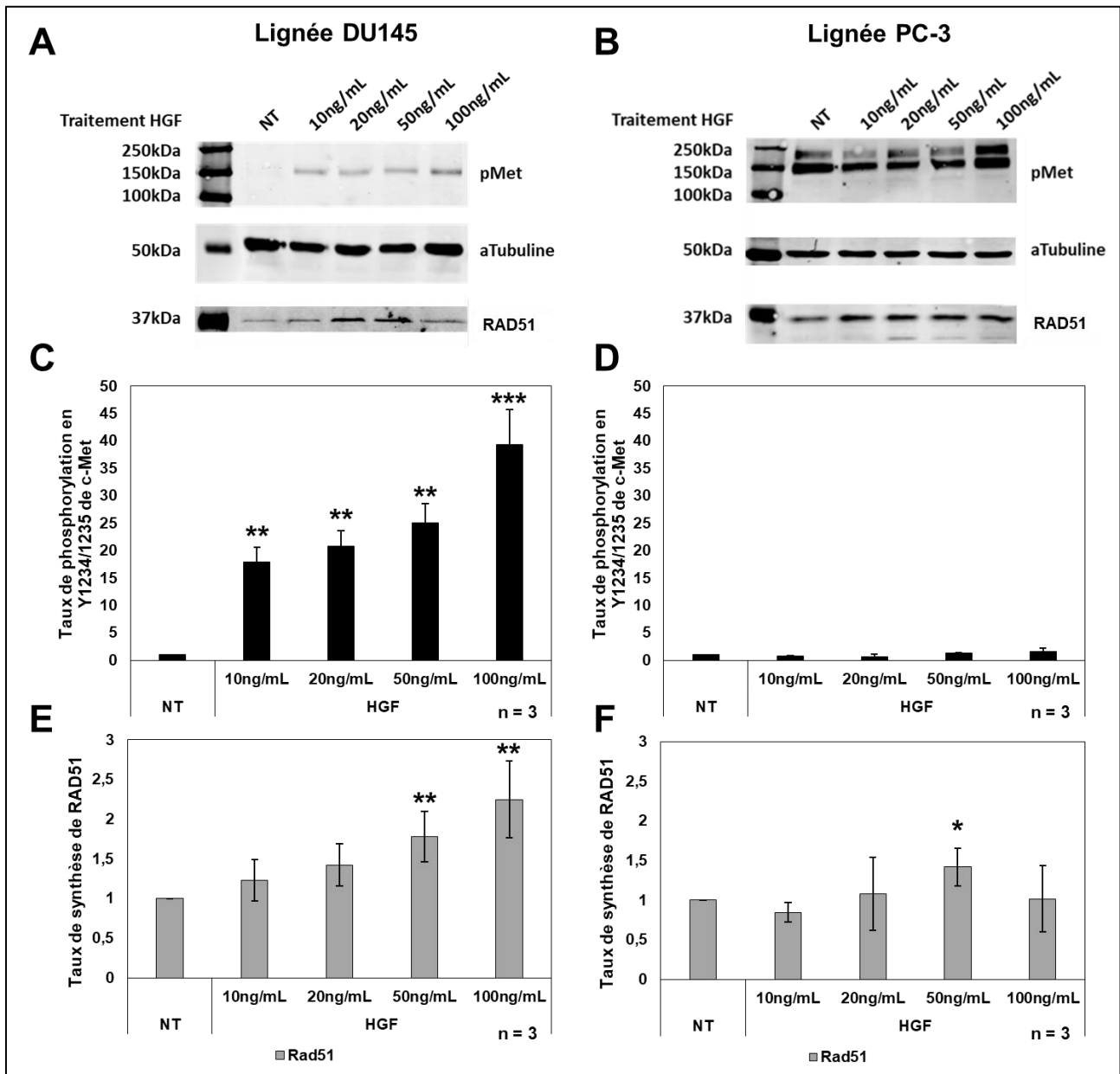


Figure 55 – Phosphorylation de c-Met et expression de la recombinase RAD51 en fonction de l'activation par HGF-SF

Les cellules DU145 (**A**) et PC-3 (**B**) ont été traitées avec du HGF-SF en concentration croissante (0-100ng/mL ; 12h) puis les protéines ont été extraites et séparées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes phosphotyrosines Y1234/Y1235 de c-Met ; contre RAD51 et contre l'aTubuline. (**C et D**) Les signaux de la forme phosphorylée Y1234/Y1235 de c-Met ont été quantifiés avec le scanner Odyssey et comparé au signal des cellules non traitées. (**E et F**) Les signaux de RAD51 ont été quantifiés avec le scanner Odyssey et comparé au signal des cellules non traitées. Chaque expérience a été menée trois fois de manière indépendante (n = 3 ; barres d'erreur : s.d ; ** : p < 0.01 ; *** : p < 0.01).

La quantification des signaux permet de montrer que le traitement au HGF-SF des cellules DU145 provoque l'augmentation de façon significative de l'état de phosphorylation du récepteur c-Met (taux de phosphorylation Y1234/Y1235) en fonction de la concentration (**Figure 55C**). En effet, suite à un traitement au HGF-SF dont la concentration est multipliée par 10, on observe que le récepteur c-Met est deux fois plus phosphorylé en Y1234/Y1235. À l'inverse, la stimulation des cellules PC-3 par des concentrations croissantes en HGF-SF ne modifie pas l'état de phosphorylation du récepteur c-Met (**Figure 55D**).

Après quantification, il est intéressant de noter que la stimulation croissante du récepteur c-Met est corrélée à une augmentation significative de la synthèse de la protéine RAD51 dans les cellules DU145 (**Figure 55E**). En effet, pour de fortes concentrations en HGF-SF (50ng/mL) la quantité de protéine RAD51 dans les cellules est multipliée par 2. À l'inverse, aucune différence significative n'est une nouvelle fois observée dans la synthèse de la protéine RAD51 dans les cellules PC-3 suite à la stimulation du récepteur par l'HGF-SF (**Figure 55F**). Cependant, une très faible augmentation de la synthèse de RAD51 est obtenue suite à l'utilisation d'une concentration supérieure à 20ng/mL de HGF-SF (**Figure 55F**).

3. Impact de l'activation de c-Met sur la distribution cellulaire de RAD51

Nous avons précédemment observé l'impact du HGF-SF sur la phosphorylation et donc l'activation du récepteur c-Met. Nous avons également observé une corrélation de cette activation avec l'augmentation de la synthèse de la protéine RAD51. La protéine RAD51 serait donc synthétisée de manière plus importante suite à l'action du HGF-SF, mais qu'en est-il de sa translocation nucléaire ou de sa localisation cellulaire suite à des dommages à l'ADN ? En effet, la translocation nucléaire est essentielle au bon fonctionnement de RAD51, et par extension au mécanisme de réparation par RH. L'objectif est d'évaluer si l'augmentation de la synthèse de RAD51 suite à un prétraitement au HGF-SF est également associée à une augmentation de la translocation nucléaire dans des conditions de dommages par CDB de l'ADN. Pour cela, nous avons réalisé des tests de fractionnement cellulaire nucléocytoplasmique dans les cellules DU145 et PC-3.

Chez les cellules DU145, le fractionnement nucléocytoplasmique après traitement au HGF-SF et/ou à la camptothécine montre que la quantité de protéine RAD51 présente dans le cytoplasme n'est pas modifiée (**Figure 56A**). En revanche, les traitements modulent la quantité de protéines RAD51 dans le noyau. On observe une augmentation de la quantité de protéine RAD51 après traitement à la camptothécine et une récupération de 4h (1:4) (**Figure 56A**). La même observation est faite lorsque les cellules ont été prétraitées au HGF-SF (**Figure 56A**). La quantification des signaux met en évidence une augmentation significative de la quantité de protéines RAD51 dans le noyau, suite au traitement à la camptothécine (1:4) seule (**Figure 56B**). L'augmentation est encore plus importante avec un prétraitement au HGF-SF. Il semble

donc que l'activation de c-Met stimule la translocation de RAD51 dans le noyau après des dommages à l'ADN causés par la camptothécine, avec une récupération de 0 ou 4h (1:0 ou 1:4) (**Figure 56B**). En parallèle, nous pouvons voir que la quantité de protéines RAD51 cytoplasmique diminue en fonction du temps de récupération cellulaire après traitement à la camptothécine (1:4) (**Figure 56B**). Cet effet s'accroît à la suite d'un prétraitement au HGF-SF (**Figure 56B**). Enfin, nous observons de manière générale une augmentation de la quantité totale de RAD51 intracytoplasmique et intranucléaire (15 à 40%) suite au prétraitement au HGF-SF (**Figure 56B**) confirmant les résultats précédemment obtenus dans les cellules DU145.

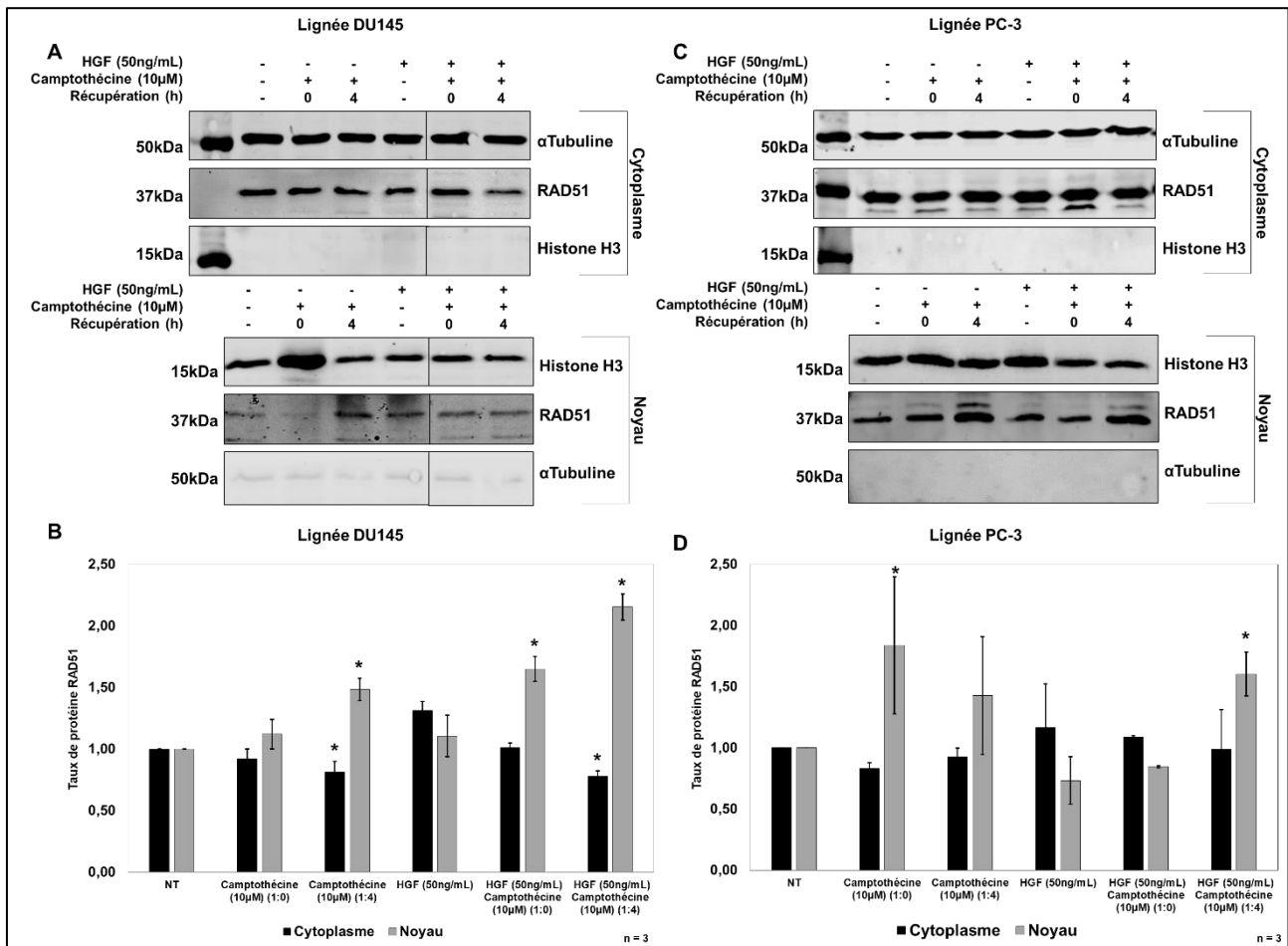


Figure 56 – L'activation de c-Met par HGF-SF stimule la synthèse et la translocation nucléaire des protéines RAD51 post-dommages

Les cellules DU145 (**A**) et PC-3 (**C**) sont prétraitées ou non avec du HGF-SF (50ng/mL ; 12h), puis avec ou sans la camptothécine (10μM ; 1h de traitement ± 4h de récupération). Les protéines sont extraites à la suite d'un fractionnement cellulaire noyau-cytoplasme. Elles sont ensuite séparées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre RAD51, l'Histone H3 et l'αTubuline. (**B et D**) Les signaux de RAD51 ont ensuite été quantifiés avec le scanner Odyssey et comparés au signal des cellules non traitées dans chacun des deux compartiments cellulaires. Chaque expérience a été menée trois fois de manière indépendante (n = 3 ; barres d'erreur : s.d. ; * : p < 0.05).

En ce qui concerne la lignée PC-3, la quantité de protéines RAD51 dans le cytoplasme reste la même quelle que soit la condition étudiée (**Figure 56C**). De plus, nous observons une bande supplémentaire reconnue par l'anticorps RAD51, sous les 37kDa (**Figure 56C**). Il s'agit de protéines RAD51 dégradées. La quantité de protéine RAD51 est en effet très importante. Or, il est connu qu'un excès de protéine RAD51 n'est pas bon pour la cellule, ce qui nécessiterait donc sa dégradation. En ce qui concerne le noyau des cellules PC-3, la quantité de RAD51 reste la même quelle que soit la condition étudiée (**Figure 56C**). De nouveau, nous observons une très nette bande supplémentaire reconnue par l'anticorps RAD51, au-dessus de 37kDa et quasi-exclusivement dans les conditions de traitement à la camptothécine (**Figure 56C**). Des études plus poussées sont nécessaires afin de déterminer leur nature : artéfact, modifications post-traductionnelles... Dans tous les cas, elles ne dépendent pas de l'activation du récepteur c-Met par l'HGF-SF. Après quantification des signaux, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de variation significative de la quantité de RAD51 dans le cytoplasme quelle que soit la condition étudiée (**Figure 56D**). En ce qui concerne la quantité de protéine RAD51 dans le noyau, une augmentation significative dans les conditions de traitement à la camptothécine, avec une récupération de 0h (1:0) (**Figure 56D**) est observée. Des résultats identiques sont observables lors d'un prétraitement au HGF-SF couplé à un traitement à la camptothécine et après une récupération de 4h (1:4) (**Figure 56D**). Ces résultats sont néanmoins à prendre avec précaution au vue de la taille des écartypes.

c. Impact de la modulation de c-Met sur la capacité de réparation des cellules cancéreuses prostatiques

L'objectif suivant est d'observer une différence dans la réparation des CDB par RH suite à l'utilisation de HGF-SF. Il sera intéressant d'observer si ces résultats sont lignée dépendant. La capacité des cellules PC-3 et DU145 à réparer leurs dommages à l'ADN par CDB a été évaluée par la mise en place d'un système de Test Comet (*cf. Chapitre 2.XV.a*).

En ce qui concerne la lignée DU145, dans des conditions normales, les cellules ne semblent pas avoir de dommages génomiques (**Figure 57A.a**). En revanche, l'ajout de camptothécine avec des temps de repos plus ou moins long augmente de manière importante le taux de formation des comètes, ce qui révèle l'augmentation des dommages à l'ADN par CDB (**Figure 57A.b et 57A.c**). La réalisation d'un prétraitement au HGF-SF n'améliore pas la réparation des cellules non-traitées, ou le nombre de dommage à l'ADN en comparaison de la condition non-traitée (**Figure 57A.d**). En revanche, l'utilisation du HGF-SF combinée à un traitement à la camptothécine permet d'observer une réparation plus importante des CDB de l'ADN (**Figure 57A.e et 57A.f**). En effet, la taille et le nombre de comètes observées est bien en deçà des conditions précédentes avec la camptothécine seule (**Figure 57A.b et 57A.c**).

Après mesure et quantification des « Tail Moment » des cellules DU145 (*détail calcul cf. Chapitre 2.XV.a*), nous pouvons déterminer le taux de dommages des cellules DU145. Une

diminution de près de 75% des dommages est observée dans les cellules DU145 suite à un prétraitement au HGF-SF et à la camptothécine, en comparaison aux cellules non prétraitées au HGF-SF et ayant subi des dommages à la camptothécine (**Figure 57B**). Ainsi, nous pouvons conclure que l'HGF-SF prévient et stimule significativement, dans la lignée cellulaire DU145, la réparation des CDB de l'ADN en réponse à des dommages causés par la camptothécine.

Pour ce qui est de la lignée PC-3, dans des conditions basales, les cellules ne semblent pas avoir de dommages au niveau de leur génome (**Figure 57C.a**). L'ajout de camptothécine, dans les mêmes conditions que pour les cellules DU145, augmente le taux de formation des comètes de manière importante, ce qui est révélateur de l'augmentation des dommages par CDB à l'ADN (**Figure 57C.b et 57C.c**). Un prétraitement au HGF-SF seul n'induit pas de réparations des cassures de l'ADN en comparaison aux cellules non-traitées (**Figure 57C.e**), et quelques comètes sont d'ailleurs observables. En revanche, le prétraitement au HGF-SF suivi d'un traitement à la camptothécine entraîne une très légère augmentation de la réparation de l'ADN des cellules PC-3 en comparaison de la condition camptothécine seul (**Figure 57C.e et 57C.f**). La mesure et la quantification des « Tail Moment » des comètes obtenues nous permettent d'avoir une idée de la quantité des dommages par CDB. Le HGF-SF stimule de manière non-significative la réparation des cassures de l'ADN en réponse à des dommages à la camptothécine dans la lignée cellulaire PC-3 (**Figure 57D**). Même si une tendance se dégage, nous ne pouvons malheureusement pas affirmer que l'HGF-SF utilisé stimule de manière efficace la réparation des CDB de l'ADN par RH des cellules PC-3, en prévention de dommages à l'ADN induis par la camptothécine.

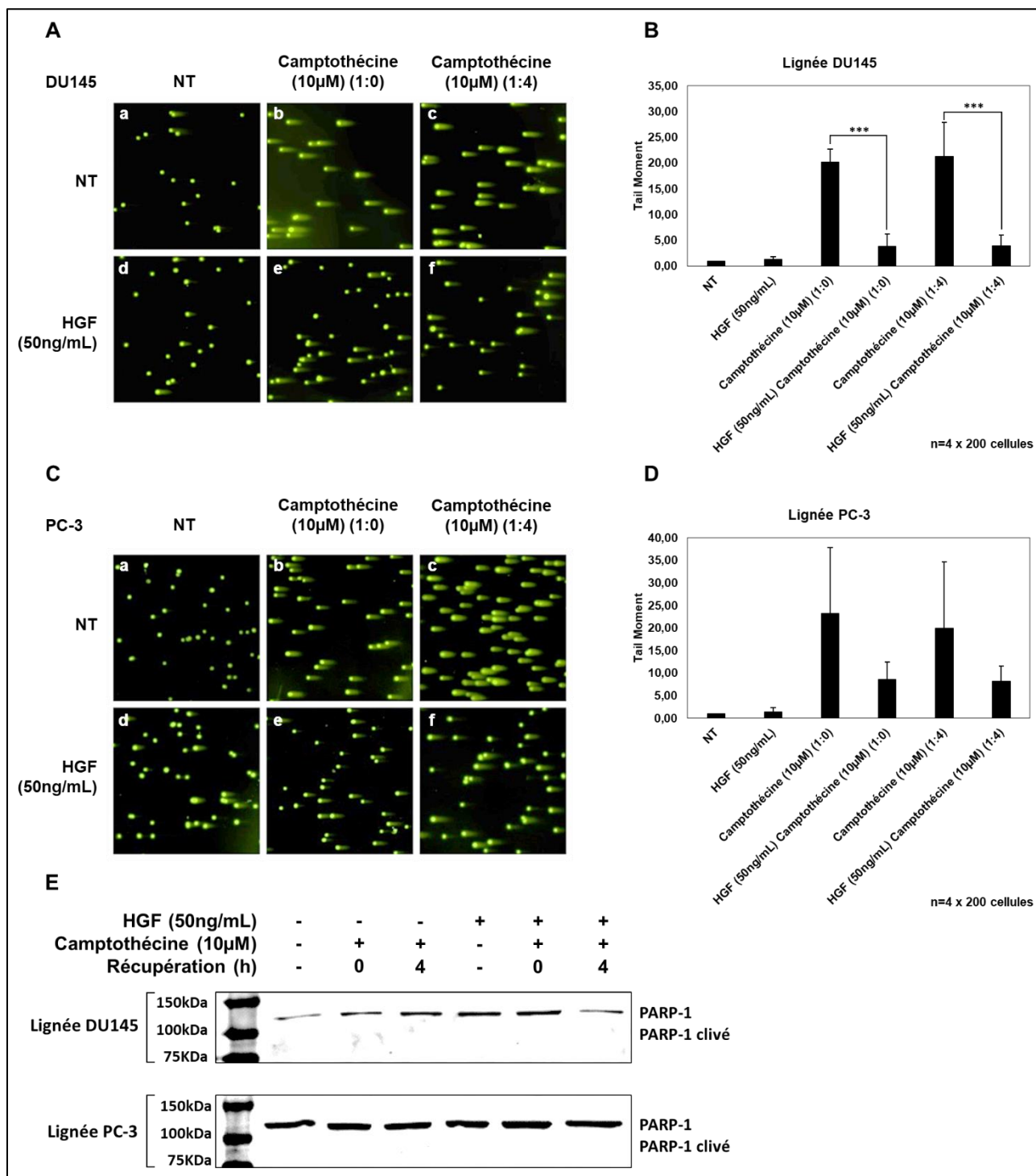


Figure 57 – L'activation de c-Met par HGF-SF réduit les dommages dans les cellules DU145 et PC-3.

Le taux de réparation de l'ADN des cellules DU145 (A) et PC-3 (C) prétraitées ou non avec du HGF-SF (50ng/mL ; 12h) et traitées ou non avec de la camptothécine (10 μ M ; 1h de traitement \pm 4h de récupération) est estimé par test comète. Les graphiques représentent la moyenne du Tail moment (longueur de la comète), directement corrélé avec la quantité de dommages causés à l'ADN (détail calcul cf. Chapitre 2.XIV.a), de trois expériences indépendantes menées chez les cellules DU145 (B) et PC-3 (D) (n = 4 ; barres d'erreur : s.d. ; *** : p < 0.001). (E) Les protéines ont été extraites et séparées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% et analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine PARP-1 et PARP-1 clivées.

Afin de confirmer que ces résultats ne sont pas simplement le fruit d'une apoptose massive des cellules DU145 et PC-3, l'expression de la protéine Poly[ADP-Ribose] polymérase 1 (PARP-1) et de sa forme clivée révélatrice de l'activation de l'apoptose a été évaluée. Comme nous pouvons le voir, PARP-1 est bien présente dans nos cellules et aucune forme clivée de la protéine PARP-1 n'apparaît, quelle que soit la condition observée (**Figure 57E**). Ces résultats nous permettent de dire qu'il n'y a pas eu apoptose des cellules et que la variation des « Tail Moment » observée est bien le résultat d'une modification de l'activité de réparation des CDB par RH. PARP-1 pourrait être un marqueur de réparation des CSB, mais les Test Comet ont été réalisés en conditions neutres pour ne révéler que les CDB.

d. Discussion de la troisième partie

Les résultats de la littérature mettent en évidence le lien possible entre le récepteur c-Met, la RH et la protéine RAD51. En effet, l'inactivation de la kinase c-Met par un inhibiteur spécifique ou un siRNA induit une diminution de la réparation par RH, réduit le niveau de protéines RAD51 et la formation de foyers post-dommages conduisant ainsi à une augmentation des foyers γ H2AX marqueurs de CDB de l'ADN [504], [505], [541]. Dans cette seconde partie, nous démontrons, que l'activation de la kinase c-Met par son ligand spécifique, l'HGF-SF [545] module la RH, la synthèse de RAD51 et sa translocation nucléaire augmentant ainsi son recrutement. En effet, dans nos conditions, le récepteur c-Met n'est pas inhibé, mais activé par son ligand. Nous nous positionnons ainsi dans un contexte plus « physiologique » pour comprendre au mieux les phénomènes de chimiorésistance de certaines cellules tumorales.

Les résultats montrent tout d'abord une différence importante entre les cellules DU145 et PC-3, suite aux différents traitements réalisés. Ces deux lignées de cellules cancéreuses prostatiques sont classiquement utilisées en laboratoire. Elles sont en revanche issues de métastases différentes provenant d'une tumeur prostatique. En effet, les cellules PC-3 dérivent à l'origine du cancer avancé de la prostate métastasée dans les os. Les cellules DU145 dérivent d'une métastase cérébrale. Elles sont différentes par de nombreux points. Les cellules PC-3 ont par exemple un potentiel métastatique supérieur au DU145 [546]. En ce qui concerne les récepteurs à activité kinase, les cellules DU145 sont connues pour exprimer un niveau important de récepteur EGFR en comparaison des cellules PC-3. Ce RTK, à l'instar de c-Met, a également été montré comme pouvant moduler la réparation des CDB de l'ADN dans des travaux antérieurs [314] (*cf. Annexe 14*).

Pour ce qui nous concerne, les deux lignées expriment un niveau semblable d'ARNm codant pour le récepteur c-Met. Elles expriment également un niveau équivalent de protéines réceptrices c-Met mature [544]. Le point important qui différencie les deux lignées est la présence chez les cellules PC-3 d'un récepteur c-Met physiologiquement phosphorylé sur les tyrosines Y1234/Y1235 (**Figure 51A et 51B**) [515]. Cette phosphorylation est définie comme un marqueur de l'activité du RTK [373]. Il est donc actif dans les cellules PC-3. À l'inverse, les

cellules DU145 possèdent un récepteur c-Met inactif [515]. Les tyrosines Y1234/Y1235 dans les cellules DU145 sont phosphorylées suite à l'ajout du ligand d'HGF-SF pour activer le récepteur. Cette différence de phosphorylation et d'activité peut être le résultat d'une addiction au récepteur c-Met. Comme expliqué précédemment, certaines cellules cancéreuses peuvent posséder une addiction à un oncogène qui devient indispensable à la survie des cellules [477]. Ce phénomène d'addiction a été montré dans plusieurs lignées cancéreuses [478], [479].

Il peut aussi être le résultat, non pas d'une déficience du récepteur c-Met, mais du ligand HGF-SF. Dans les cellules DU145, le gène codant pour l'HGF-SF présente 3 mutations (*CCLC – Cancer Cell Line Encyclopedia*). Une première silencieuse qui transforme une guanine en adénosine, mais conserve une alanine dans la séquence protéique (A25A). Une seconde, une mutation « Split Site » conduit à une modification de l'épissage de l'ARNm et donc de la traduction. Elle cause la mutation d'une histidine en asparagine (H482N). Enfin, la troisième est une mutation faux-sens induisant la mutation d'une arginine en lysine (R630L). Si la première ne devrait pas induire une modification protéique, les 2 autres mutations conduisent à une protéine tronquée non-fonctionnelle, car non reconnue par le récepteur c-Met. Ces mutations qui existent dans la lignée DU145, mais pas chez les PC-3, permettent d'expliquer la différence d'activation du récepteur.

La phosphorylation et l'activation de c-Met de manière constitutive dans les cellules PC-3 est donc bien une marque d'activité pro-tumorale durant laquelle c-Met est activé de façon constante par son ligand de manière auto ou paracrine. Le fait qu'aucune mutation ne se produit sur le ligand HGF-SF de ces cellules facilite d'autant plus son activation. Ces données expliquent également la difficulté à observer un impact du HGF-SF exogène sur cette lignée cellulaire PC-3. A l'inverse, les DU145 ne possèdent pas de ligand fonctionnel, il n'y a donc pas de phosphorylation et d'activation du récepteur dans les conditions basales.

Nous avons montré que la modulation de l'activité du récepteur c-Met modulait la réparation des CDB, mais comment le récepteur c-Met peut réguler la RH intracellulaire ? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons stimulé le récepteur c-Met avec son ligand dans les cellules DU145. Nous avons observé que cette stimulation conduisait à une augmentation du nombre de foyers RAD51 post-dommages à l'ADN qui est encore plus important suite à un prétraitement des cellules au HGF-SF dans les cellules DU145. L'activation conduit donc à un recrutement plus important et plus rapide des protéines RAD51 au niveau des CDB signalé par la phosphorylation de l'histone γ H2AX marqueur des dommages à l'ADN par CDB [79], [80].

Ce recrutement plus important peut-être expliqué par une augmentation de la synthèse de la protéine RAD51 suite à l'activation du récepteur par l'HGF-SF (**Figure 55A, 55C et 55E**). Même si c-Met a déjà été montré comme pouvant être transloqué jusqu'au noyau et jouer le rôle d'un possible facteur de transcription [426], il est, pour l'heure, difficile d'associer ce rôle

à notre observation. En revanche, son implication dans la survie cellulaire via la voie PI3K/AKT/mTOR, peut expliquer l'augmentation de synthèse protéique [302], [505]. En effet, il a été montré que cette voie de signalisation module la quantité de protéine RAD51 suite à des dommages à l'ADN [286]. Le lien entre RAD51 et c-Met est d'autant plus probable que la variation de protéine RAD51 dépend de la concentration du ligand HGF-SF utilisée (**Figure 55A, 55C et 55E**).

Cette augmentation de synthèse protéique induite par l'activation du récepteur est accompagnée d'une translocation nucléaire de la recombinaise plus importante dans les cellules DU145 (**Figure 56A et 56B**). Ce passage essentiel au bon déroulement de la RH est majoritairement médié par la protéine BRCA2. En effet, comme décrit précédemment, les motifs BRC permettent la fixation de la protéine RAD51 et son transport aux sites des CDB [148], [183]. Il a été montré que suite à l'inhibition de c-Met, l'interaction et la translocation des protéines RAD51 et BRCA2 sont diminuées [504]. Nous pouvons tout à fait penser que dans des conditions d'activation du récepteur, elle est de nouveau possible. Cette interaction, permettant la translocation, est davantage stimulée par la quantité importante de protéine RAD51 présente dans le cytoplasme [183]. Ces résultats nous permettent d'avancer qu'une augmentation de la translocation des protéines RAD51 est plus importante à la suite d'un prétraitement au HGF-SF. L'observation d'une phosphorylation de RAD51 suite à l'activation du récepteur par son ligand HGF-SF, permettrait d'asseoir le lien entre nos résultats *in vitro* et *in cellulo*, et ainsi expliqué ce mécanisme. Malheureusement, cette MPT n'a pour l'instant toujours pas été mise en évidence. Le récepteur c-Met activé par son ligand jouerait donc un rôle de prévention aux dommages à l'ADN dans les cellules DU145. Il induirait une augmentation de la synthèse et de la translocation de RAD51 facilitant son recrutement au niveau des CDB de l'ADN.

Enfin, nous avons observé par Test Comet dans la lignée DU145, que l'activation de c-Met par le HGF-SF conduit à une meilleure réparation des CDB de l'ADN (**Figure 57A et 57B**). Cette amélioration de la réparation est d'autant plus visible suite à l'utilisation de la camptothécine. Comme nous l'avons expliqué précédemment, la camptothécine stoppe l'action de la protéine topoisomérase I. Cette inhibition empêche la décontraction de l'ADN lors de la réplication en phase S du cycle cellulaire et provoque un blocage de la fourche de réplication qui produit des CDB à l'ADN [24], [25]. Les dommages sont donc produits en amont de la phase S/G2, avant la division cellulaire. A ce moment du cycle, les chromosomes et leur homologue sont présents. Les dommages à l'ADN induiront un arrêt du cycle cellulaire. Les protéines senseurs du complexe MRN activent les protéines ATM et ATR, qui à leur tour activeront les protéines CHK1 et 2. Ces dernières inhibent les éléments du complexe CDC25 empêchant l'activation des protéines CDK1 et 2, ce qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase S/G2. Lors de dommages causés par la camptothécine durant cette phase du cycle, la réparation de l'ADN sera principalement réalisé par RH [26]. Ainsi, un prétraitement au HGF-

SF exogène non muté des cellules DU145 active le récepteur c-Met et conduit à une augmentation de la réparation des CDB de l'ADN par le mécanisme de RH.

Il faut également noter que les résultats observés ne sont pas causés par une apoptose cellulaire massive. L'évaluation de la quantité et de la qualité du clivage de la protéine PARP-1 permet de le démontrer. En effet, PARP-1 participe à la conservation de l'intégrité du génome lors de CSB de l'ADN [64]. L'absence de cette protéine conduit à un blocage de la fourche de réplication qui ne progresse plus et produit une accumulation des lésions double-brins de l'ADN réparés par RH. La présence de PARP-1 dans les cellules nous montre donc bien que les dommages par CDB sont bien causés par l'effet de la camptothécine. De plus, PARP-1 fait partie des protéines visées par les caspases 3 et 7 activées. Son clivage est donc révélateur d'une apoptose cellulaire [65]. Or, nous n'observons pas de clivage de cette protéine, quelle que soit la condition étudiée (**Figure 57E**), indiquant ainsi qu'il s'agit bien de dommages à l'ADN causé par la camptothécine et non des dommages induit par l'apoptose cellulaire. Au vu des conditions dans lesquelles ont été réalisés les Test Comet, nous confirmons le fait que l'activation du récepteur c-Met par l'HGF-SF conduit à stimuler la réparation des CDB par RH dans les cellules DU145.

Tous ces résultats sont bien différents dans les cellules PC-3, ce qui est notamment dû à l'état de phosphorylation du récepteur c-Met montré et décrit comme déjà phosphorylé et activé dans cette lignée cellulaire (**Figure 51C et 51D**). La plupart des expériences mettent en parallèle les cellules non-traitées et les cellules traitées, pour autant, tout comme dans les cellules RG37, l'impact du HGF-SF n'est alors que peu ou pas observable et ne permet pas de mettre en évidence une différence significative de l'activation d'une réparation des CDB par RH suite à la stimulation du récepteur c-Met.

Dans les cellules PC-3, la synthèse de protéines RAD51 n'est pas modifiée par l'utilisation de concentration croissante en HGF-SF dans les cellules PC-3 (**Figure 55B, 55D et 55F**), car les systèmes de réparation par RH récepteur sont déjà sur-stimulés dans les conditions basales. Cette hypothèse est confirmée par le fait que les dommages par CDB à l'ADN sont peu nombreux dans les cellules PC-3 non traitées. Il y a quelques foyers γ H2AX formés dans ces cellules, mais beaucoup moins en comparaison des autres conditions de traitement (**Figure 52B**). En revanche, dans les cellules PC-3 non traitées, nous observons une quantité importante de protéines RAD51 dans le cytoplasme et le noyau qui s'accompagne d'un nombre important de foyers RAD51 nucléaire (**Figure 53C, 53D, 56C, 56D,**), alors même que les cellules n'ont subi aucun traitement au HGF-SF. Ces résultats montrent donc bien une possible sur-activation de la RH dans les conditions basales dû à l'expression d'un ligand HGF-SF fonctionnel, à l'inverse des cellules DU145.

La quantité importante de protéine RAD51 est à double tranchant. En effet, la cellule en a besoin pour réparer les CDB de l'ADN [209]. En revanche, sa surexpression est mauvaise

pour la cellule dans des conditions basales [547], [548]. Elle peut conduire à une instabilité génomique et l'apoptose. Ces données permettent donc d'expliquer pourquoi des dommages à l'ADN sont présents « de base » dans les cellules PC-3 et pourquoi nous observons des bandes de dégradation de la protéine RAD51 reconnues par l'anticorps dirigé contre la recombinaise (**Figure 55D**). Leur présence dans toutes les conditions est associée à une dégradation de RAD51 afin de palier à sa toxicité cellulaire. Le système de dégradation est encore à ce jour très peu étudié, même si certains sites potentiels d'ubiquitylation ont été indentifiés sur la protéine RAD51 [549].

Pour résumé, le traitement des cellules DU145 par l'HGF-SF conduit à une phosphorylation en Y1234/Y1235 du récepteur c-Met qui induit son activation. Le HGF-SF exogène utilisé vient donc remplacé l'HGF-SF endogène muté. Elle permet une meilleure réparation par le mécanisme de RH des CDB causées par chimiothérapie. Suite à un prétraitement au HGF-SF, la réparation plus efficace est médiée par l'augmentation de la synthèse de RAD51 et une augmentation de la translocation nucléaire post-dommage (**Figure 58A et 58B**). En revanche, il nous est impossible de confirmer un véritable effet du prétraitement au HGF-SF sur la réparation des CDB par RH dans les cellules PC-3 (**Figure 58C et 58D**). En effet, dans cette lignée cellulaire, l'HGF-SF endogène n'est pas muté et donc fonctionnel, stimulant au mieux la réparation des CDB de l'ADN de manière basale.

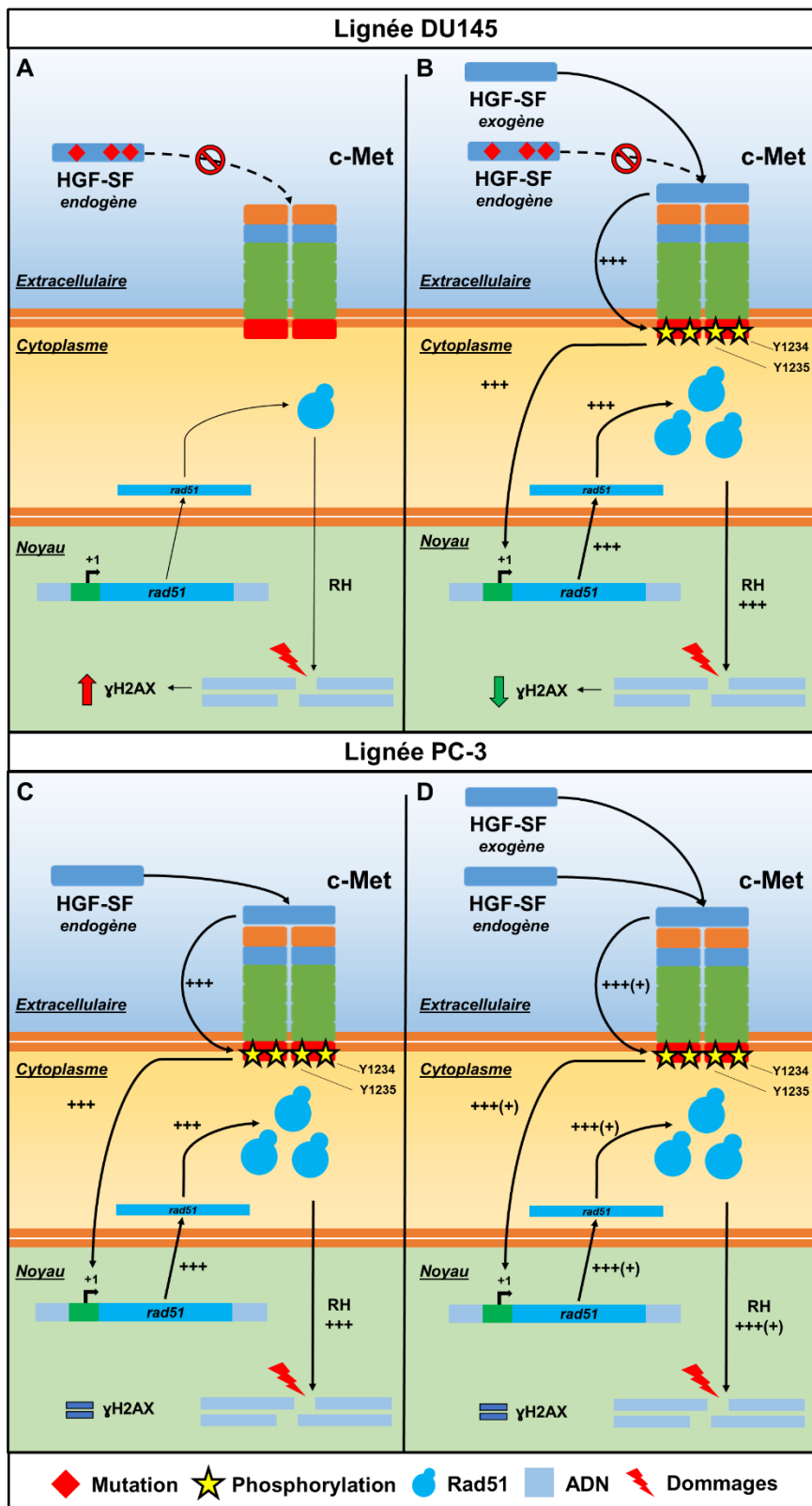


Figure 58 – Schéma récapitulatif de l'action du HGF-SF sur l'activation du récepteur c-Met et la protéine RAD51 lors de dommages à l'ADN par CDB, in cellulo, dans les lignées DU145 et PC-3.

L'HGF-SF active c-Met par autophosphorylation. Cette activation permet l'augmentation de la synthèse de la protéine RAD51, une meilleure translocation nucléaire de la recombinaise lors de dommages à l'ADN et stimule la formation de foyers RAD51 nucléaires. Une réparation plus rapide des CDB est observée par une diminution de la quantité de foyers γ H2AX (Thèse T.Chabot, 2020).

Chapitre 4 – Effet des ions bivalents Ca²⁺ et Mg²⁺ sur la recombinaison

RAD51

La régulation de l'activité des protéines RAD51 est réalisée à différents niveaux. Leur activité est modulée par leur interaction avec différents partenaires (RAD51-RAD51 ; RAD51-BRCA2, RAD51-ADNsb...) qui peut être le résultat d'une modification de la protéine par des MPT comme la phosphorylation (RAD51-pT13, pS14, pY54,...)[221], [222], [224], [225], [229]. D'autres acteurs peuvent jouer un rôle sur la modulation de l'activité de la protéine RAD51 au sein de la RH, comme les cofacteurs. Parmi eux, nous trouvons l'ATP mais également les ions bivalents comme l'ion calcium Ca²⁺ et l'ion magnésium Mg²⁺. Ces cofacteurs ont d'ailleurs déjà montré leur importance dans l'organisation du nucléofilament de RAD51 [155], mais également sur des protéines homologues comme RecA [550].

En effet, chez les procaryotes il a été montré que les ions bivalents tels que Mg²⁺ jouent un rôle important dans la régulation de la recombinaison RecA [551]–[553] et conduisent à une meilleure activité d'échange de brin de la protéine en jouant sur sa partie C-terminale par modulation de sa stabilité et de la formation du nucléofilament. En revanche, en l'absence de la queue C-terminale, l'activité de RecA est indépendante de Mg²⁺ et est identique à celle de la protéine entière en présence d'ions Mg²⁺. Dans la protéine RAD51, l'organisation structurale se trouve être inversée en comparaison de son homologue RecA. En effet, l'extrémité C-terminale de la protéine RecA est homologue à l'extrémité N-terminale de la protéine RAD51, et inversement. Il a été montré que les ions Ca²⁺ stimulent l'activité d'échange de brin de la recombinaison humaine RAD51 en favorisant l'organisation du nucléofilament [554].

Cette quatrième partie a donc eu pour but d'évaluer l'effet des ions bivalents Mg²⁺ et Ca²⁺ sur la protéine RAD51 humaine et la régulation de son activité d'échange de brin. Dans cette optique, nous avons réalisé la production d'une protéine RAD51 humaine tronquée en N-terminale (18 premiers acides aminés). Cette délétion correspond à la séquence homologue de RecA où l'interaction avec Mg²⁺ se réalise. L'étude fonctionnelle en présence d'ions bivalents et en comparaison de la protéine sauvage entière a été réalisée en collaboration entre notre équipe et le Pr Takahashi du laboratoire du Pr Iwasaki de l'Institute of Innovative Research de Tokyo.

a. Conséquence de la mutation de RAD51 sur sa thermostabilité

La première étape est d'évaluer l'impact d'une délétion des 18 premiers acides aminés en N-terminale sur la stabilité de la protéine RAD51. Pour cela, nous avons réalisé une étude par dichroïsme circulaire des protéines RAD51 sauvage et délétée (D18). Ceci nous permet d'évaluer la stabilité des structures secondaires des protéines RAD51 testées, et ce, à différentes températures (15°C à 90°C).

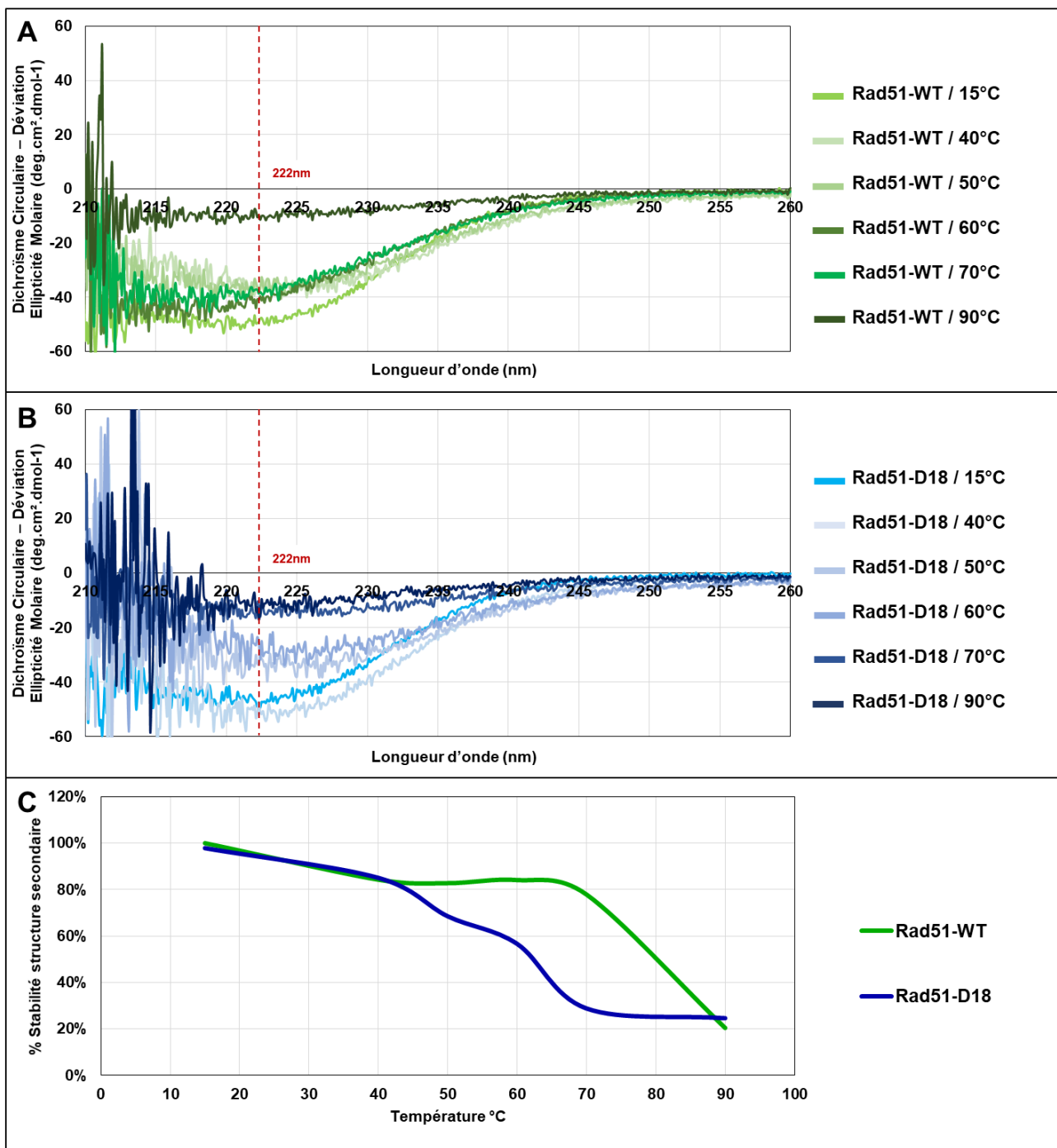


Figure 59 – Spectre de dichroïsme circulaire des protéines RAD51 sauvage et mutante D18 à différentes températures

Les signaux des spectres DC des protéines RAD51-WT (A) et mutante D18 (B) ont été obtenus à des températures comprises entre 15 et 90°C et mesurés entre 210 à 260 nm dans une cellule de quartz Hellma avec une distance optique de 0,2 cm. La concentration finale de chaque protéine RAD51 était de 4 µM dans du PBS à pH 7,4. L'absorbance maximale des protéines RAD51 à 222nm est indiquée en rouge. (C) Normalisation de la stabilité protéique des protéines RAD51-WT et mutante D18 selon la température à une longueur d'onde de 222nm.

Comme nous pouvons le voir, la protéine RAD51 sauvage semble conservée une certaine thermostabilité en deçà d'une température de 70°C (Figure 59A). En effet, l'absorbance à 222nm est toujours maximale, même si au-delà de 40°C on peut observer une perte de 20%,

elle reste relativement thermostable (**Figure 59A et 59C**). Au-delà de 90°C en revanche, l'absorbance est diminuée de plus de 80% à 222nm ce qui montre une dénaturation presque totale de la protéine RAD51 sauvage (**Figure 59A et 59C**). Pour ce qui est de la protéine mutante D18, l'absorbance est maximale à 222nm à une température de 15°C et elle est équivalente à la protéine sauvage (**Figure 59B**). Avec l'augmentation de la température, nous observons une diminution rapide de l'absorbance à 222nm. En effet, une réduction d'environ 50% de l'absorbance à 50°C et de 80% dès 70°C est mise en évidence (**Figure 59B et 59C**). Ces résultats montrent donc bien une perte de l'organisation des structures secondaires et de la thermostabilité de la protéine RAD51 suite à la délétion de ses 18 premiers acides aminés, pour une température supérieure à 40°C.

b. Conséquence de la mutation de RAD51 sur son oligomérisation

La stabilité de la protéine RAD51 est également dépendante de sa capacité à s'auto-associer en nucléofilament. Afin d'évaluer l'impact de la mutation D18 sur cette capacité d'oligomérisation de la protéine RAD51, nous avons réalisé des tests de réticulation des formes polymérisées de RAD51 en utilisant un agent cross-linker BS3 permettant de fixer de manière covalente les formes polymérisées des protéines. Leur révélation se fait par séparation protéique en gel SDS-PAGE puis par révélation par westernblot avec un anticorps dirigé contre RAD51.

Comme nous pouvons le voir, la protéine sauvage RAD51 sans BS3 est présente uniquement sous la forme de monomères à 37kDa (**Figure 60A**). Lors de l'ajout du cross-linker BS3, de nombreuses formes polymères de haut poids moléculaire apparaissent confirmant l'impact du BS3 sur la réticulation des formes polymères de la protéine RAD51 sauvage (**Figure 60A**). En ce qui concerne la protéine mutante D18, nous observons tout d'abord que la délétion induit bien une diminution de 2 à 3kDa de la masse moléculaire de la protéine monomérique en comparaison de la protéine sauvage (**Figure 60A**). De plus nous observons des variations de l'état de polymérisation en comparaison avec la protéine sauvage avec une légère diminution des formes polymères en comparaison de la protéine sauvage (**Figure 60A**).

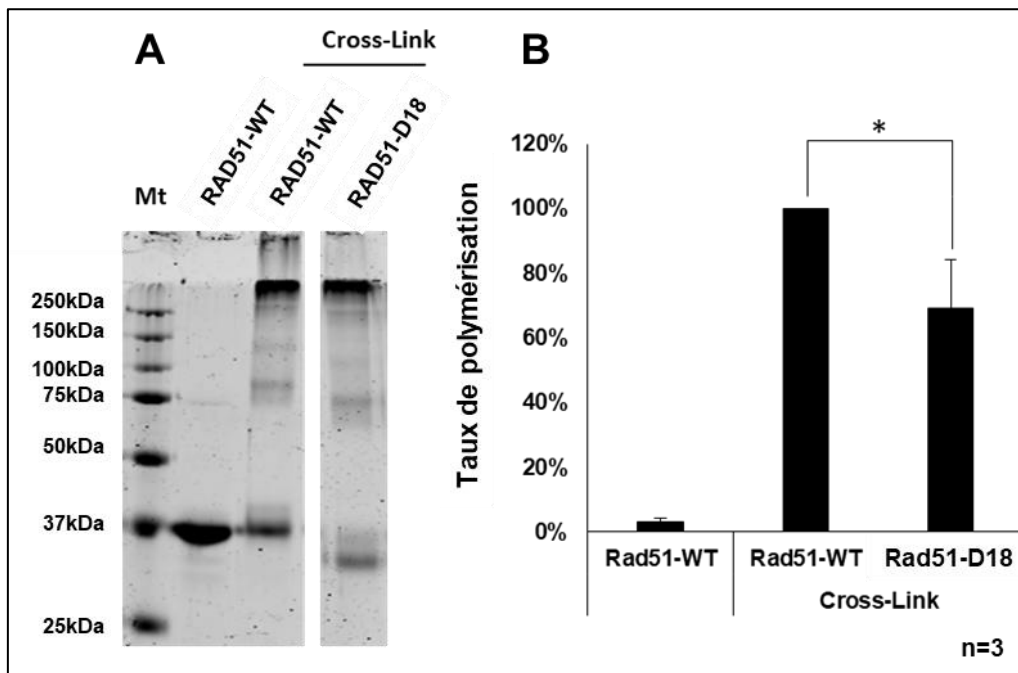


Figure 60 – La délétion D18 réduit l'état de polymérisation de la protéine RAD51

(A) La protéine RAD51-WT (10 μ M) et mutante D18 ont été purifiées et ont ensuite été cross-linkées avec du BS3 puis séparées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE 10% acrylamide et analysées par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines RAD51. Les blots présentés ci-dessus sont issus du même gel. Les signaux ont été quantifiés sur le scanner Odyssey-Licor. (B) Le graphique représente le pourcentage de forme polymère de RAD51 sauvage ou mutée après quantification des blots. Chacune des expériences a été réalisée trois fois de façon indépendante ($n = 3$; barres d'erreur : s.d. ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$).

Après quantification des signaux, et par comparaison avec la protéine sauvage, la variation de l'état de polymérisation est confirmée. Il y a une diminution de près de 30% en ce qui concerne la protéine mutée D18 en comparaison de la protéine RAD51 sauvage (**Figure 33B**). Cette différence significative de capacité d'oligomérisation peut expliquer les résultats précédemment obtenus sur la stabilité de la protéine RAD51.

c. Impact des ions bivalents sur la structure de RAD51

Une fois la stabilité de nos protéines évaluées, nous cherchons à mettre en avant l'impact des ions bivalents Ca²⁺ et Mg²⁺ sur la structure secondaire de nos protéines RAD51 sauvages et mutantes. Une modification de ces structures secondaires pourrait induire un changement de l'activité protéique de RAD51. Les expériences ont été réalisées à 15°C afin de limiter l'effet de la température sur la structure secondaire, comme développé précédemment.

À première vue, les profils des protéines RAD51 sauvages et mutantes semblent être similaires en tous points, avec une absorbance maximale des structures secondaires à 222nm (**Figure 61**). Dans le détail, nous pouvons en effet observer qu'en ce qui concerne les protéines seules, le profil est équivalent. Dans le cas de la protéine RAD51 sauvage, les profils d'absorbance en présence de Ca²⁺ (1 et 5mM) ou de Mg²⁺ (1mM) ne modifient que peu

l'absorbance de la protéine à 222nm (**Figure 61A**). En revanche lors de l'ajout de 10mM de Mg²⁺, nous observons un décalage du profil avec une absorbance maximale aux alentours de 225nm (**Figure 61A**).

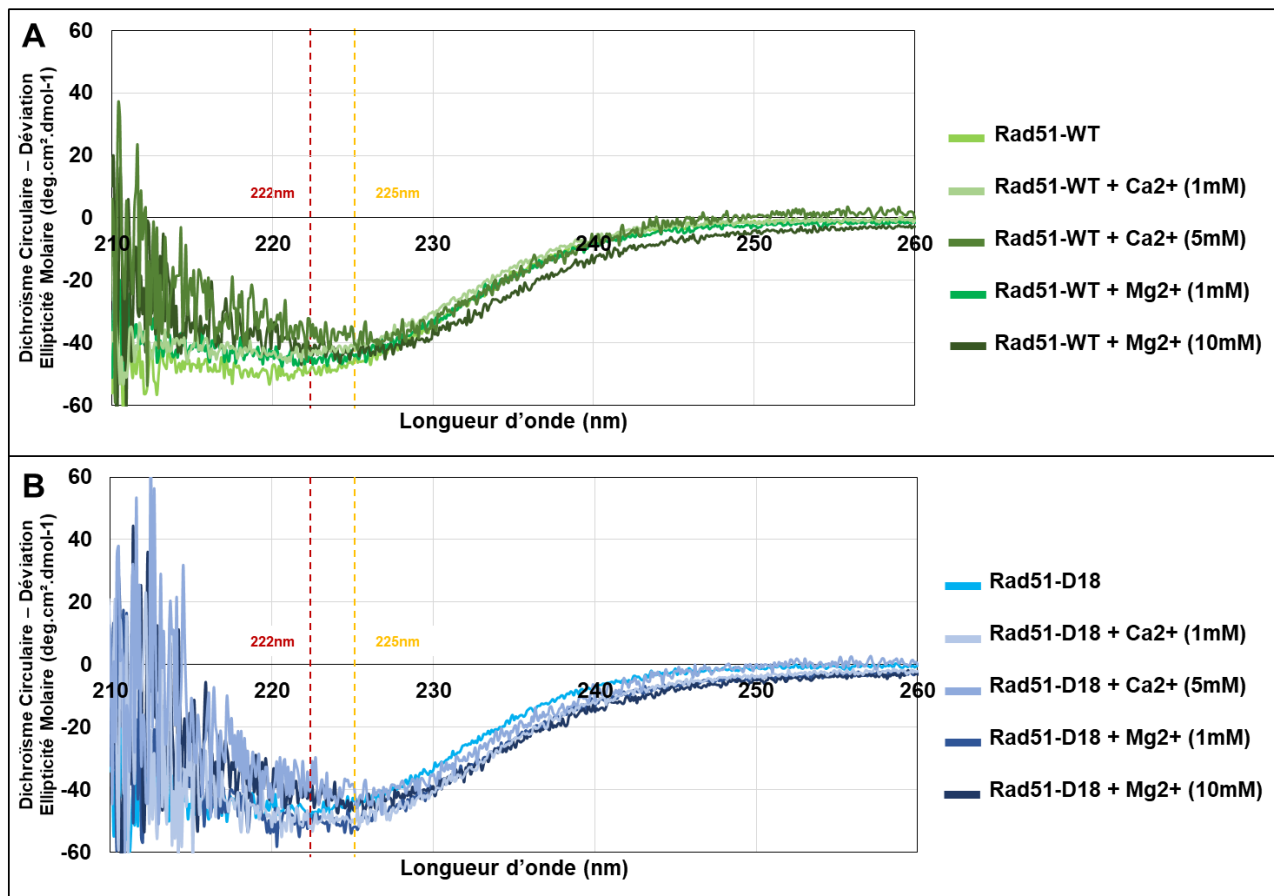


Figure 61 – Spectre de dichroïsme circulaire des protéines RAD51 sauvage et mutante D18 à différentes concentrations en ions bivalents Ca²⁺ et Mg²⁺

Les signaux des spectres DC des protéines RAD51-WT (**A**) et mutante D18 (**B**) ont été obtenus à une température de 15°C avec des concentrations en ions bivalents Ca²⁺ (0-5mM) et Mg²⁺ (0-10mM) croissantes. Ils sont mesurés entre 210 à 260 nm dans une cellule de quartz Hellma avec une distance optique de 0,2 cm. La concentration finale de chaque protéine RAD51 était de 4 µM dans du PBS à pH 7,4. L'absorbance maximale des protéines RAD51 à 222nm est indiquée en rouge.

En ce qui concerne la protéine mutante RAD51-D18, nous observons un léger décalage de profil lors de l'ajout de 1mM ou de 10mM de Mg²⁺, mais également en présence d'ions Ca²⁺ (1 et 5mM). Nous pouvons voir dans ces cas que l'absorbance maximale n'est plus à 222nm mais à 225nm (**Figure 61B**). Les ions bivalents utilisés à de plus ou moins forte concentration ont donc un impact sur la structure secondaire de la protéine mutante D18, en comparaison avec la protéine sauvage qui n'est modifiée que par de forte concentration en Mg²⁺. Les ions bivalents modifient légèrement le profil DC des protéines RAD51 sauvages et mutantes, mais ont-ils un impact sur la stabilité thermique des protéines ?

d. Impact des ions bivalents sur la thermostabilité de RAD51

L'objectif suivant est de réaliser une combinaison des deux phénomènes que sont l'impact de la température et des ions bivalent. Pour cela nous avons donc évalué degré par degré de 15 à 90°C l'impact des ions bivalents Ca^{2+} et Mg^{2+} sur la thermostabilité des protéines RAD51 sauvages et mutantes. Cette technique permet d'observer la thermostabilité protéique, mais également d'évaluer l'organisation de la population protéique, sans doute hétérogène, des protéines RAD51 de l'extrait (mono ou oligomères). L'observation de l'organisation des protéines en oligomère se fait suite à la formation de phases de transitions identiques et répétées au sein du profil de dénaturation.

Tout d'abord, les résultats obtenus confirment ceux montrés précédemment sur la stabilité thermique de la protéine RAD51 sauvage qui est supérieure à celle de la protéine RAD51 mutante D18 (**Figures 59 et 62**). En effet, la dénaturation thermique a un impact plus important sur la protéine mutante que sur la protéine sauvage RAD51. De plus, nous observons une organisation de la population protéique se divisé en 3 phases de transition, chacune correspondant à une organisation oligomérique particulière. Concernant l'utilisation des ions bivalents Ca^{2+} , la protéine RAD51 sauvage est sensible à de fortes concentrations en Ca^{2+} (**Figure 62A**). De plus, nous observons l'apparition des 3 phases de transition préalablement décrites suite à la dénaturation thermique en présence de Ca^{2+} (5mM) (**Figure 62A**). En ce qui concerne la protéine RAD51 mutante D18, l'impact des ions Ca^{2+} semble beaucoup moindre (**Figure 62B**) et nous voyons l'apparition d'une seule phase de transition en présence d'ions Ca^{2+} (5mM), là où 3 phases de transition étaient présentes en absence de Ca^{2+} (5mM) (**Figure 62B**). Deux phases de transition ont donc disparu au profit d'une seule phase. Ces données révèlent qu'il n'y a donc plus qu'une seule population oligomérique au sein des protéines RAD51-D18 suite à une homogénéisation dû à l'ajout d'ions Ca^{2+} .

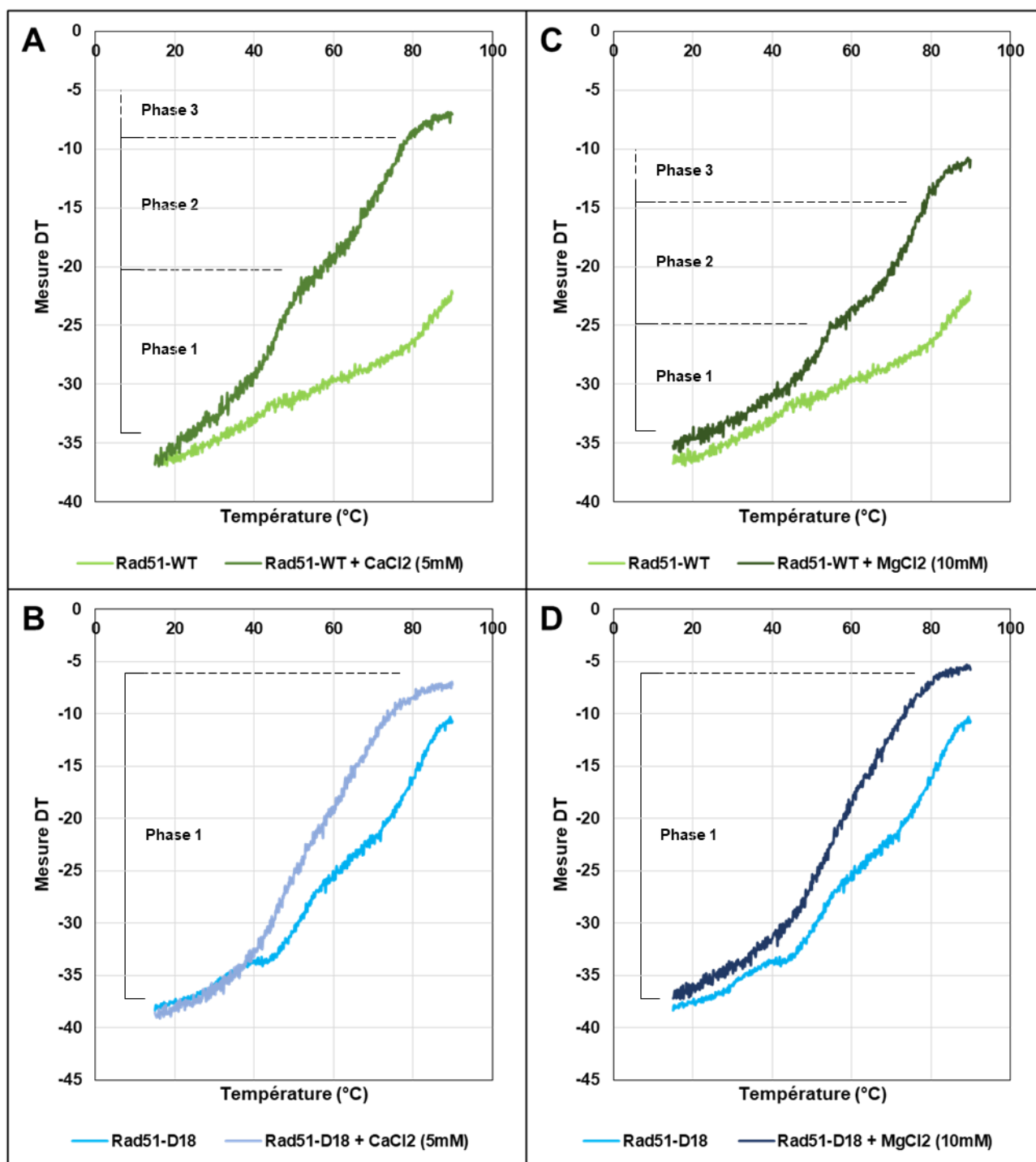


Figure 62 – Spectre de dénaturation thermique des protéines RAD51 sauvage et mutante D18 en présence d’ions bivalents Ca^{2+} et Mg^{2+}

Les signaux des spectres DC des protéines RAD51-WT (A et C) et mutante D18 (B et D) ont été obtenus à des températures comprises entre 15 et 90°C avec des concentrations en ions bivalents Ca^{2+} (5mM) (A et B) et Mg^{2+} (10mM) (C et D). Ils sont mesurés à 222nm dans une cellule de quartz Hellma avec une distance optique de 0,2 cm. La concentration finale de chaque protéine RAD51 était de 4 μM dans du PBS à pH 7,4.

Lors de l’ajout d’ions bivalents Mg^{2+} , une organisation de phase similaire pour la protéine sauvage, avec de nouveau 3 phases de transition suite à la dénaturation thermique en présence de Mg^{2+} (10mM), est observée (Figure 62C). En revanche, le taux de dénaturation est 15% moins élevé en comparaison des conditions Ca^{2+} (5mM) (Figures 62A et 62C). En

ce qui concerne la protéine RAD51 mutante D18, nous observons de nouveau que l'impact des ions Mg^{2+} (10mM) semble beaucoup moindre. En effet, il n'y a apparition que d'une seule phase de transition en présence d'ions Mg^{2+} (10mM) et en comparaison de la protéine seule (**Figure 62D**). Encore une fois, deux phases de transitions ont disparu au profit d'une seule phase et donc d'un seul type de population oligomérique. Nous pouvons donc avancer le fait que les protéines RAD51 sauvage et mutante sont homogénéisées de manière différente suite à l'ajout d'ions bivalents Ca^{2+} ou Mg^{2+} .

e. Impact des ions bivalents sur l'activité intrinsèque de RAD51

La présence d'ions bivalents Ca^{2+} et Mg^{2+} modifient non seulement la thermostabilité, mais également la structure des protéines RAD51 sauvage et mutante D18. Ils permettent aussi une organisation oligomérique différente de la population protéique des protéines RAD51 sauvage et mutante D18. La question qui se pose est de savoir si ces ions bivalents peuvent changer l'activité intrinsèque de RAD51 à savoir la fixation de RAD51 à l'ADN simple brin et la capacité de RAD51 à réaliser l'échange de brin de l'ADN. Nous rappelons encore une fois que ces deux activités sont essentielles à la fonction de la protéine RAD51 au sein de la réparation des CDB par RH.

i. Modulation de la fixation à l'ADN

Une étude de l'activité de fixation de RAD51 à l'ADN simple brin a été réalisée en présence des ions bivalents afin d'observer une éventuelle modification de la capacité de RAD51 à réaliser l'échange de brin. Nous avons tout d'abord déterminé l'impact d'un autre cofacteur, l'ATP, sur l'activité de nos protéines RAD51 sauvages et mutantes. En effet, il s'agit d'un élément essentiel au bon fonctionnement de RAD51 au cours de la RH (polymérisation en nucléofilament, dissociation de l'ADN,...). Afin d'évaluer la fixation et la dissociation à l'ADN simple brin de nos protéines, nous avons utilisé la technique d'interférométrie BLItz™. Un ADN simple brin poly(dT) a été immobilisé sur une pointe de streptavidine, puis incubé dans une solution contenant la protéine RAD51 en présence ou non d'ATP.

En ce qui concerne la protéine sauvage nous pouvons observer que le rôle de l'ATP est essentiel à son activité de fixation à l'ADN (**Figure 63A**). En effet, la présence d'ATP dans le tampon permet de multiplier par 5 la fixation de la protéine RAD51 sauvage à l'ADN. En revanche, l'ajout d'ATP à la protéine mutante RAD51-D18 n'augmente que très légèrement (20%) sa capacité d'association à l'ADN simple brin (**Figure 63A**). Enfin en comparant la protéine mutante et sauvage en présence d'ATP, une diminution de plus de 20% de la capacité de la protéine mutante, déléetée des 18 premiers acides aminés, à fixer l'ADN est mis en évidence (**Figure 63A**). La formation du nucléofilament est très affectée par l'absence d'ATP pour les protéines sauvages RAD51-WT, contrairement à la protéine mutée RAD51-D18. Ces résultats montrent le rôle déterminant des 18 premiers acides aminés dans la régulation ATP dépendante de la fixation à l'ADN.

Pour la suite des expériences, nous avons décidé de rester dans des conditions avec une forte concentration en ATP (2mM) afin d'observer uniquement l'impact de la délétion des 18 premiers acides aminés sur l'activité intrinsèque de la protéine en fonction des ions bivalents utilisés. La présence d'ions Ca^{2+} , à une concentration déjà élevée de 1mM, conduit à une association plus rapide de la protéine RAD51 sauvage à l'ADN simple brin (**Figure 63B**). En revanche, l'association globale est légèrement moins efficace avec une perte de près de 15%. A des concentrations plus élevées de 5mM, l'association à l'ADN est plus lente mais également beaucoup moins efficace avec une diminution de près de 50% (**Figure 63B**). Pour ce qui est de la protéine mutante RAD51-D18, nous pouvons observer que l'augmentation croissante de la concentration en ions Ca^{2+} diminue la capacité d'association de la protéine à l'ADN (**Figure 63C**).

Le rôle des ions Mg^{2+} sur les protéines RAD51-WT et D18 a été étudiée. Ils n'ont finalement que très peu d'impact sur l'association globale de la protéine sauvage à l'ADN (**Figure 63D**). Une légère augmentation de la vitesse d'association à l'ADN avec l'augmentation de concentration en ions Mg^{2+} sont observée. En revanche, en ce qui concerne la protéine mutante D18, l'association globale de la protéine à l'ADN est diminuée de près de 20% (**Figure 63E**).

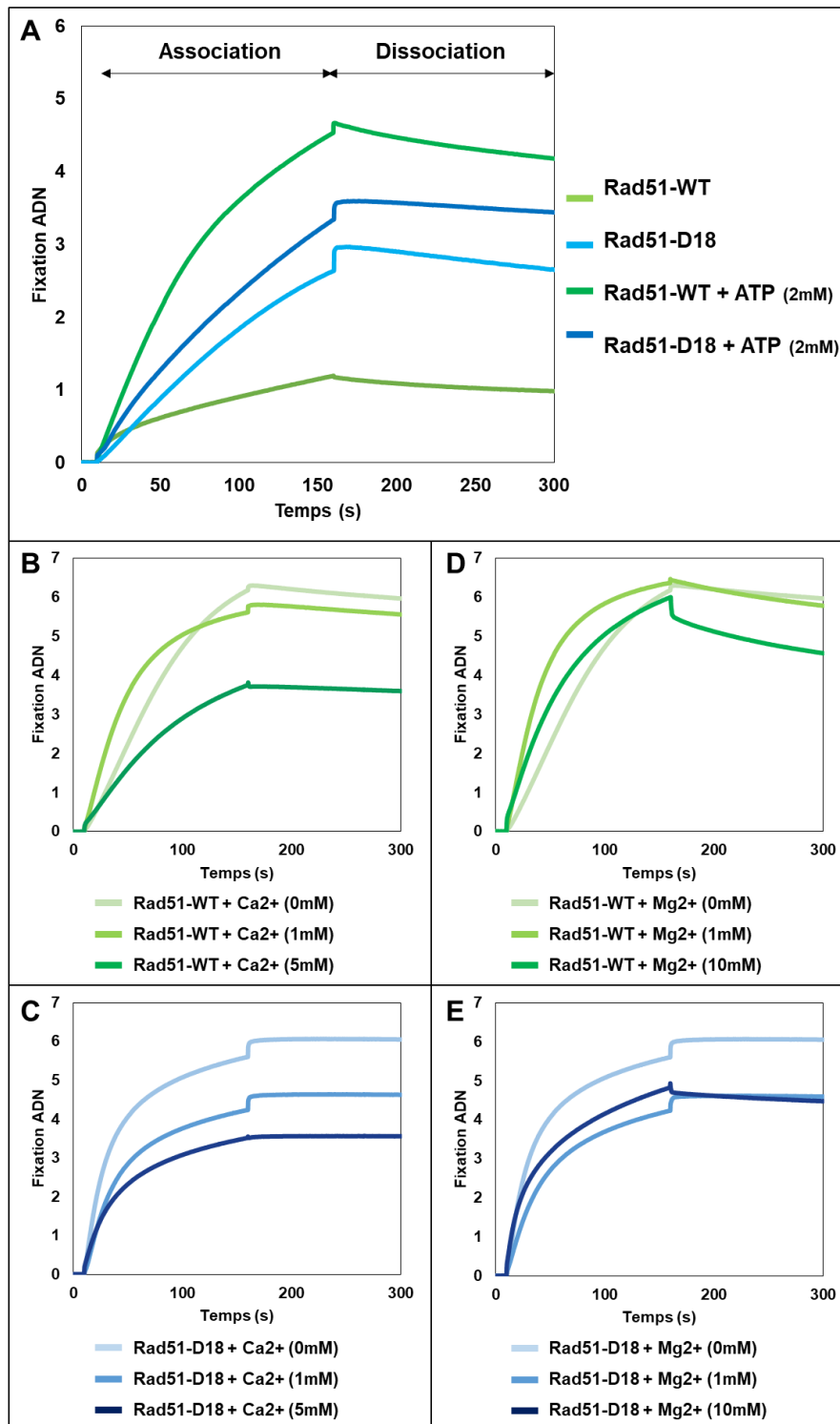


Figure 63 – Mesure d’activité de fixation à l’ADN des protéines RAD51-WT et mutante D18 à différentes concentration en ions bivalents Ca²⁺ et Mg²⁺

(A) Un tip associé à un acide nucléique polydT est incubé dans les extraits de protéines RAD51-WT et mutante D18 (2µM) dans un tampon phosphate contenant ou non de l’ATP (2mM). L’interaction protéine-ADN est mesurée par interférométrie (BLItz®). Après 10 secondes de ligne de base, les extraits sont ajoutés et une phase d’association et de dissociation sont réalisées pendant 150 secondes. (B et C) L’expérience est de nouveau réalisée en présence d’ions bivalents Ca²⁺ (0, 1 ou 5mM). (D et E) L’expérience est de nouveau réalisée en présence d’ions bivalents Mg²⁺ (0, 1, 10mM).

ii. Modulation de l'activité d'échange de brins

Après avoir observé l'impact des ions bivalents sur la capacité d'interaction et d'association des protéines RAD51 sauvages et mutantes D18 à l'ADN, nous nous sommes intéressés à leur capacité d'échange de brins de l'ADN. En effet, au sein de la RH, nous savons que l'étape suivant l'interaction RAD51-ADNsb est la recherche, l'envahissement de la séquence homologue par ce duplexe et l'échange entre les deux séquences d'ADN homologues. Pour évaluer l'impact des ions Ca^{2+} sur cette activité de RAD51, nous avons utilisé une technique de FRET qui permet d'observer en temps réel l'échange de brins. Les ions Mg^{2+} n'ayant que peu d'impact sur l'interaction RAD51-ADN de notre protéine sauvage, seul l'impact des ions Ca^{2+} sur la capacité d'échange de brin de nos protéines a été étudié. L'évolution de l'activité d'échange de brins est réalisée en comparaison de la protéine sans Ca^{2+} .

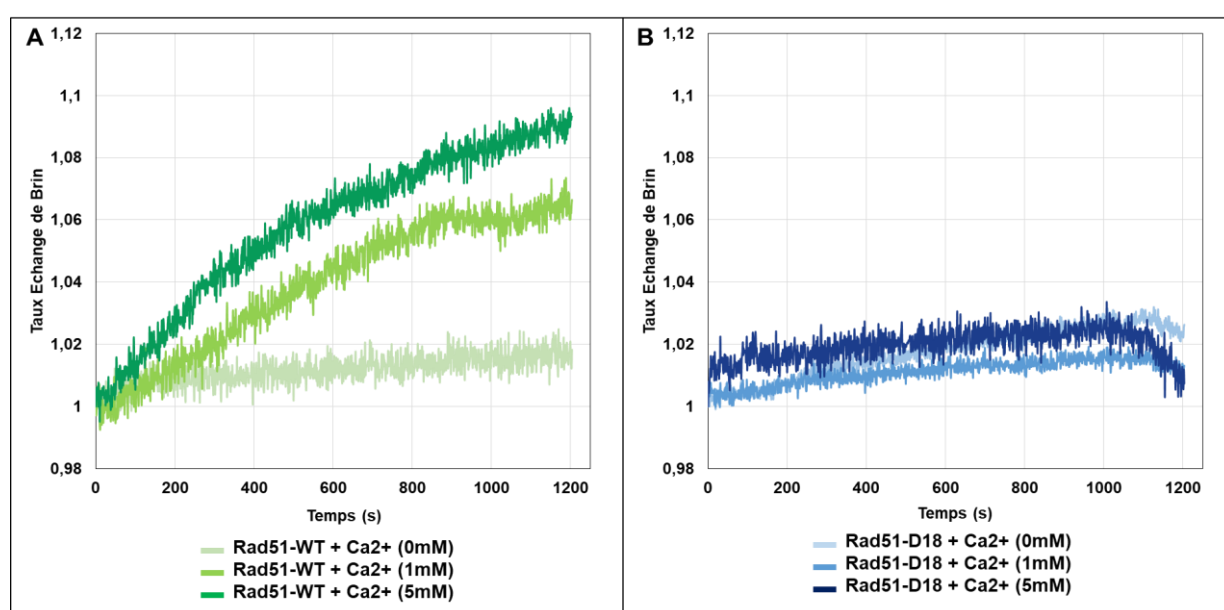


Figure 64 – Mesure d'activité d'échange de brin des protéines RAD51-WT et mutante D18 à différentes concentration en ions bivalents Ca^{2+}

Les protéines RAD51 sauvages (A) et mutantes D18 ($2\mu\text{M}$) (B) sont incubées en présence d'ADN simple brin. Le mélange comportant les complexes ADNsb-RAD51 est ensuite incubé en présence d'ADNdb et la lecture de formation des complexes FRET, directement corrélée à l'activité d'échange de brin, est mesurée à 525nm. L'expérience est réalisée en présence d'ions bivalents Ca^{2+} (0, 1 et 5mM).

Pour la protéine sauvage RAD51, le taux de l'activité d'échange de brin augmente en fonction de la concentration en ions Ca^{2+} (Figure 64A). Il semble donc que les ions Ca^{2+} stimulent l'activité d'échange de brin de la protéine sauvage. Par contre, en ce qui concerne la protéine mutante, l'activité d'échange de brins n'est pas augmentée et reste inexistant, quelque soit la concentration en ions Ca^{2+} utilisée (Figure 64B). Ces derniers résultats montrent donc l'importance des ions Ca^{2+} dans l'activité d'échange de brins de la protéine RAD51. Nous identifions aussi que la zone d'interaction et de modulation de l'activité de RAD51 par les ions Ca^{2+} se trouve au sein de la séquence de 18 acides aminés déléetée sur la protéine mutante RAD51-D18.

f. Discussion de la quatrième partie

Le gène codant pour la recombinaise eucaryote RAD51 a été conservé au cours de l'évolution et ses orthologues sont retrouvés chez les archaebactéries (RadA) et chez les eubactéries (RecA). Ainsi, il existe une homologie importante (20%) entre RAD51 et RecA [172]. Les données structurales de RAD51 ou de son homologue RecA font clairement apparaître une structure conservée avec deux domaines (N-terminal domain et Core domain) reliés par un linker [175]. Cette forte conservation permet de transposer certains résultats de l'une à l'autre. Il s'agit notamment du cas de la réparation par RH dont la compréhension chez les eucaryotes par RAD51 s'est faite en se basant sur des modèles orthologues tel que RecA.

La première étape de l'activité de l'échange de brins dans la RH est la formation d'un nucléofilament de RAD51 [190]. Cette étape est dépendante de la fixation d'ATP et implique un motif de polymérisation présent en partie N-terminale de la protéine [176]. Le même processus existe avec RecA, mais la formation du nucléofilament implique la partie C-terminale de la protéine [551]–[553]. En effet, bien que très homologue, le core domain est positionné en C-terminal pour RAD51 et en N-terminal pour RecA. La deuxième étape, dite synaptique, débute par la recherche de la séquence homologue par le nucléofilament, puis elle se poursuit par l'activité d'échange de brins catalysé par la recombinaise. L'hypothèse retenue est celle d'une fixation primaire de l'ADNsb sur un premier site avec une forte affinité, puis dans un deuxième temps de sa fixation sur un second site avec une affinité beaucoup plus faible [192], [206]. La fixation de plusieurs séquences se fait jusqu'à trouver la séquence homologue [207]. Ces résultats sont en partie inspirés par le mécanisme de formation de l'hétéroduplexe avec RecA [168], [205]. Une fois la séquence homologue trouvée, RAD51 catalyse l'échange de brins. L'ADNsb du site de cassure est alors échangé pour s'associer à sa séquence complémentaire. L'ADNsb extrait de la séquence homologue se retrouve au niveau du site de cassure [209]. La résolution de la jonction par des hélicases et nucléases se fait sans RAD51 qui quitte l'ADN suite à l'hydrolyse de l'ATP. Il faut noter que l'activité de RAD51 dépend de nombreuses interactions protéine/ADNsb, protéine/ADNdb et que leur modulation par des ions bivalents contribue à la régulation de l'activité recombinaise.

Chez les procaryotes, il a été montré que les ions bivalents tels que Mg^{2+} jouent un rôle important dans la régulation de la recombinaise RecA [551], [552] et conduisent à une meilleure activité d'échange de brin de la protéine. L'ion magnésium interagit avec la partie C-terminale de la protéine RecA pour moduler la stabilité de la protéine et la formation du nucléofilament. Il semble que la présence de Mg^{2+} tend à lever l'auto-inhibition de la queue C-terminale de RecA pour faciliter l'échange de brin [555]. En absence de queue C-terminale (RecA tronquée), l'activité de RecA est indépendante de Mg^{2+} , elle est identique à celle de la protéine entière en présence d'ions Mg^{2+} . La thermostabilité de la protéine RecA entière et sa capacité à réaliser l'échange de brin est réduite en absence de Mg^{2+} . D'un autre côté, les ions Ca^{2+}

stimulent l'activité d'échange de brin de la recombinaise humaine RAD51 en favorisant l'organisation du nucléofilament [554].

Dans les expériences réalisées en présence des ions bivalents, il est intéressant de noter que les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} ont un effet important sur l'activité de la recombinaise RAD51. Tout d'abord, la délétion de la partie N-terminale de RAD51 modifie principalement sa thermostabilité (**Figures 59 et 62**). En effet, nous observons une augmentation de la dénaturation de la protéine tronquée pour des températures basses, en comparaison de celle de la protéine sauvage. La protéine RAD51 est une protéine thermosensible, une délétion aussi importante du domaine N-terminale (18 acides aminés sur 82 ~22%) peut donc tout à fait changer sa conformation, sa stabilité. La délétion induit une modification de la capacité de la protéine RAD51 à s'associer à l'ADN (**Figure 63A**). En effet, l'association globale à l'ADN de la protéine tronquée est diminuée de près de 20%. Elle dépend de deux phénomènes : la capacité d'auto-association et la capacité à utiliser l'ATP.

Le premier phénomène est permis grâce à un domaine de polymérisation présent sur le domaine N-terminal-Linker entre les acides aminés 85 à 91 [176]. La partie délétée n'englobe pas cette séquence, mais les tests de polymérisation réalisés au laboratoire montrent une différence significative dans la capacité d'auto-association des deux protéines (tronquée vs sauvage) (**Figure 60**). Cette séquence serait donc importante dans la formation d'oligomère de RAD51 sans pour autant être présente dans le domaine de polymérisation. Elle permettrait de stabiliser la structure protéique de RAD51 et de ses formes oligomériques. Ceci explique pourquoi une fois cette séquence délétée, la structure protéique de RAD51 devient plus sensible aux variations de chaleur.

L'autre possibilité est la fixation à l'ATP, nécessaire à toutes activités intrinsèques de la protéine RAD51. En effet, la délétion modifie l'utilisation de l'ATP par RAD51 (**Figure 63A**). La protéine tronquée ne semble plus avoir besoin de l'ATP pour fixer l'ADNsb. Cependant, sa présence augmente tout de même légèrement cette association (**Figure 63A**). Les motifs de Walker A et B où se loge l'ATP semble être affecté par la délétion. En effet, le motif Walker B établit une liaison covalente de coordination avec le cation Mg^{2+} afin de permettre l'hydrolyse de l'ATP et l'activité intrinsèque de RAD51 [186]. Ces capacités seraient modifiées chez le RAD51 D18. Nous montrons aussi que les ions Mg^{2+} ont un impact sur la structure secondaire des protéines RAD51-D18 (**Figure 61**), alors que ce n'est pas le cas pour la protéine sauvage où ils jouent un rôle de cofacteurs dans la stabilisation du nucléofilament.

Pour nos deux protéines, le Mg^{2+} induit une modification de la thermostabilité (**Figure 62**). En effet, dans les 2 cas, plusieurs phases de transitions apparaissent plus nettement au sein du profil de dénaturation protéique en présence de cet ion bivalent. Chacune de ces phases correspond à des formes oligomériques de protéines RAD51 différentes. En revanche, le nombre de phase de transition et donc de type de population protéique est différent selon la

protéine étudiée. En ce qui concerne la protéine sauvage, 3 phases et donc 3 populations protéiques différentes sont observables (**Figure 62C**). Le profil est différent pour la protéine tronquée avec la disparition de 2 phases de transition au profit d'une seule phase (**Figure 62D**). Cette organisation de RAD51 sauvage conduit à la stabilisation du nucléofilament. Elle permet, en coordination avec l'ATP, une fixation plus rapide de la protéine RAD51 à l'ADN (**Figure 63D**) [186], contrairement à ce qui se passe pour la protéine tronquée (**Figure 63E**) où le Mg^{2+} tend à homogénéiser la population protéique en un seul type d'oligomère et à diminuer la capacité d'association de la protéine à l'ADN. Ainsi, un parallèle d'autant plus important entre la protéine RAD51 et son homologue RecA au niveau de leurs extrémités respectivement N et C-terminale existe. En effet, les ions bivalents tels que Mg^{2+} jouent un rôle important dans la régulation de la recombinaison RecA par son extrémité C-terminale [551], [552], ce qui semble être également le cas en ce qui concerne la protéine RAD51 et son extrémité N-terminale.

Nous montrons que les ions bivalents Ca^{2+} ont un impact sur la structure et la thermostabilité de la protéine sauvage et tronquée (**Figure 61**). Au même titre que les ions Mg^{2+} , les ions Ca^{2+} induisent l'apparition de phases au sein du profil de dénaturation protéique. Un système d'organisation plus complexe en 3 phases apparaît plus nettement pour la protéine sauvage en présence de Ca^{2+} (**Figure 62A**), alors que pour la protéine tronquée (**Figure 62B**) nous observons de nouveau la disparition de 2 phases de transition au profit d'une seule phase de transition. Nous montrons aussi, comme décrits dans la littérature, que les ions calcium facilitent l'association de RAD51 à l'ADNsb (**Figure 63B**). Une amélioration de la capacité de la protéine à réaliser l'échange de brin est mise en évidence (**Figure 64A**) [556]. En effet, l'échange de brin est nul en l'absence de Ca^{2+} . L'ajout de sel de calcium conduit à une augmentation progressive de cette activité. En revanche, les capacités d'interaction à l'ADN et d'échange de brin sont fortement modifiées si ce n'est abolies pour la protéine RAD51 tronquée. La capacité de la protéine mutante à fixer l'ADN est diminuée malgré l'ajout de Ca^{2+} (**Figure 63C**). Nos résultats illustrent également une abolition complète du mécanisme d'échange de brin de RAD51-D18 en comparaison de la protéine sauvage, quel que soit la concentration en ions Ca^{2+} utilisée (**Figure 64B**). Tous ces résultats montrent pour la première fois le rôle des 18 acides aminés en N-terminal dans l'interaction de la recombinaison avec les ions Ca^{2+} , dont la présence est essentielle à son activité et la structuration de la population protéique. Couplés à l'ATP, ils permettent l'interaction de RAD51 avec l'ADN et l'activation de l'activité d'échange de brin de l'ADN [554], [556]. Or, en absence du peptide de 18 acides aminés présent à l'extrémité N-terminal, l'activité est fortement inexistante, ce qui prouve l'importance des ions Ca^{2+} dans l'activité de la protéine RAD51. Cette séquence peptidique (Nt-MAMQMQLLEANADTSVEEE-Ct) riche en acides aminés acides (5/18) et en acides aminés polaires (5/18) pourrait tout à fait correspondre à un site d'interaction avec les

ions Ca^{2+} . Des recherches plus poussées afin de déterminer la séquence exacte d'interaction sont à réaliser.



Quatrième Partie :

Conclusion et Perspectives

Le maintien de la stabilité génomique est primordial pour la survie des cellules, mais de nombreuses agressions exogènes et endogènes endommagent l'ADN et compromettent sa stabilité. Les CDB sont les plus létales des lésions à l'ADN. Leur réparation efficace est assurée par le mécanisme de recombinaison homologue avec comme matrice la chromatide sœur du chromosome lésé. La protéine centrale de ce processus est la protéine RAD51. Son expression et son activité doivent être finement régulées dans les cellules. Des variations de son niveau d'expression sont observées dans différents types de cancers [557]–[559]. La phosphorylation de la recombinaison RAD51 est bien connue pour moduler l'activité de la protéine et la réparation de l'ADN par RH. La régulation de son activité passe également par l'implication de nombreux cofacteurs comme l'ATP ou les ions Ca^{2+} . Au cours de ce manuscrit, nous avons d'ailleurs démontré que l'interaction RAD51- Ca^{2+} se situe au niveau de la région N-terminale de la protéine et module fortement sa capacité d'échange de brin. De plus, la surexpression de RAD51 est associée à la résistance de cellules cancéreuses aux chimiothérapies et radiothérapies. Ceci en fait une cible intéressante dans la compréhension de cette résistance cellulaire tumorale et la lutte contre le cancer.

En effet, les CDB induits par les traitements anti-cancéreux sont réparées par l'activité élevée de la recombinaison homologue liée notamment à la surexpression de RAD51. Ainsi, au cours de la dernière décennie, les voies de réparation de l'ADN comme la RH ont été décrites comme étant des cibles prometteuses dans le traitement du cancer [560]. La compréhension de la régulation des protéines de réparation de l'ADN telle que RAD51 est essentielle pour vaincre les cancers radiorésistants ou chimiorésistants. Certaines kinases sont capables de phosphoryler RAD51. Parmi ces kinases, certains membres de la famille des récepteurs tyrosines kinases semblent agir sur les voies de réparation de l'ADN, y compris la RH. Il est intéressant de noter que la surexpression et l'activation constitutive de RTK sont courantes dans un certain nombre de cancer et sont soupçonnées d'avoir des effets sérieux sur les voies de réparation de l'ADN.

Les résultats de la littérature mettent en évidence le lien possible entre le récepteur c-Met et RAD51 puisque l'inhibition de la kinase réduit le niveau de protéine RAD51 [302] et induit une diminution de la réparation des RH en réponse aux lésions de l'ADN [504]. L'activation du récepteur c-Met implique sa capacité d'autophosphorylation et conduit à la phosphorylation de nombreux partenaires protéiques qui jouent un rôle dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire telles que la prolifération et la survie des cellules par les voies MAPK, GAB1, STAT3 et PI3K/AKT [374], [545], [561]. Au cours de cette thèse, nous apportons pour la première fois la preuve d'une relation directe entre c-Met et RAD51 et son rôle dans la modulation de la voie de réparation de l'ADN par RH. Ces données pourraient ouvrir de nouvelles perspectives pour la stratégie thérapeutique anticancéreuse.

Nous démontrons tout d'abord pour la première fois que la phosphorylation de la recombinaise RAD51 par le récepteur tyrosine kinase c-Met est possible *in vitro*. Nous avons également montré la localisation des résidus tyrosines phosphorylés, grâce à l'utilisation de mutants Y/F non-phosphorylables. Cette méthode, couplée à d'autres techniques biochimiques, a permis de mettre en évidence 4 tyrosines de RAD51 phosphorylées par c-Met : Y159, Y191, Y205 et Y315 [229]. Nous avons pu montrer que cette phosphorylation de RAD51 par c-Met *in vitro* était fortement liée à l'état de polymérisation de la protéine RAD51 et ainsi son importance dans l'oligomérisation de la protéine et dans la stabilité du nucléofilament sur l'ADNsb, étape essentielle de la réparation par RH.

Même s'il paraît évident que ces résultats étaient notamment dus à la localisation des différentes tyrosines, notre travail ne nous permet pas d'affirmer avec certitude l'implication de l'une ou l'autre des phosphorylations identifiées dans les différentes étapes de la RH. En effet, nous pouvons avancer l'importance de la phosphorylation Y191 au cours de la polymérisation, de par notamment sa localisation au niveau de l'interface monomère-monomère. Également l'importance de la phosphorylation Y315, déjà fortement décrite comme jouant un rôle essentiel dans la modulation de l'activité de RAD51. En revanche, nous ne connaissons pas la proportion de chacune d'elles, ni ne savons si ces phosphorylations sont présentes au même moment au sein de la structure protéique de RAD51.

Afin de déterminer le rôle de toutes ces phosphorylations, il sera tout d'abord essentiel de définir si elles se produisent simultanément ou de façon séquentielle sur RAD51. L'utilisation de plusieurs mutants, correspondant à différentes combinaisons de mutation et notamment d'un quadruple mutant sur chacune des tyrosines présentées précédemment, a été envisagée. Une fois toutes les structures génomiques réalisées, l'idée de les utiliser a été mise de côté au vue de la difficulté pour purifier les protéines correspondantes. L'incapacité à produire ces pluri-mutants laisse la question en suspens.

Nous pourrions y répondre par l'optimisation et l'utilisation de la spectrométrie de masse [527] en tandem (MS/MS ou MS²) sur les protéines sauvages phosphorylées, ou bien la réalisation d'électrophorèses natives en 2D afin de définir la proportion et la présence simultanée de plusieurs phosphorylations. La création d'anticorps anti-phosphotyrosine reconnaissant spécifiquement chacune des phosphorylations pourraient également donner un aperçu supplémentaire de la proportion de chacune des phosphorylations. Cette méthode a d'ailleurs déjà été utilisée pour des travaux antérieurs réalisés au laboratoire dans le cadre de l'étude de la phosphorylation de RAD51 par c-Abl [224].

Pour définir le rôle propre de chacune des phosphorylations préalablement décrites, la réalisation de mutants phospho-mimétiques sera un atout majeur. L'utilisation de mutants Y/E [225] ou d'un système d'incorporation d'acides aminés non-naturels phosphomimétiques par adaptation de la chimie du click, développée au laboratoire, ou bien par détournement du

codon Ambre [531], [562] pourra certainement répondre à cette question. L'avantage de cette seconde technique en comparaison d'un mutant Y/E est le fait que l'acide aminé non naturel utilisé (pCMF) est structurellement bien plus proche d'une phosphotyrosine qu'un résidu glutamate (**cf. Annexe 12**). Des contacts avec l'équipe de Maria Spies, ayant déjà démontré l'efficacité de cette technique sur les tyrosines Y54 et Y315 de RAD51 [531], ont d'ailleurs été pris dans ce sens. L'ensemble des constructions, couplé à nos capacités au laboratoire d'évaluer chaque étape de la RH *in vitro* permettra de définir non seulement le « kinome » de la protéine RAD51, mais également l'implication de chaque phosphorylation dans la régulation de l'activité de RAD51.

Afin de réaliser une analyse à haut débit des sites de phosphorylation de RAD51 par les tyrosines kinases, une puce de criblage des sites de phosphorylation a été conçue. Cette technique rapide et innovante utilisant la phosphorylation *in vitro* sur puce est une première. En effet, jamais auparavant la réalisation d'une puce à protéine à activité enzymatique par phosphorylation n'avait été réalisée. Nous avons tout d'abord démontré que la phosphorylation sur puce de protéines purifiées était possible. Associée à une détection par système Quantum-Dots, plus sensible et stable que l'utilisation de fluorochromes, cette technique est un outil puissant permettant de réaliser des profils de phosphorylation de manière fiable et rapide.

La preuve de concept a été faite en utilisant la kinase c-Abl dont les sites de phosphorylation sur RAD51 sont déjà définis, les tyrosines Y54 et Y315. Elle nous a également permis de mettre en évidence une nouvelle phosphorylation en tyrosine Y191, donc la séquence est fortement semblable à celle de la tyrosine Y54. Cette phosphorylation avait déjà été suspectée dans des travaux antérieurs du laboratoire et dans la littérature [227]. Cette technologie nous a également permis de confirmer les résultats que nous avons obtenus *in vitro*. En effet, la phosphorylation sur puce des protéines RAD51 par c-Met a de nouveau mis en évidence les sites Y159, Y191, Y205 et Y315 comme cible de la kinase. A ces résultats, s'ajoutent des résultats préliminaires, non développés dans ce manuscrit, concernant les kinases IGF1R et CSF1R.

Cependant, la question de l'accessibilité des kinases à leur site, dépendant notamment de l'état de polymérisation des protéines immobilisées, reste en suspens. L'utilisation de protéines mutantes non-polymérisables, telque les mutants A190/192L ou F86E, permettrait de normaliser cet état d'oligomérisation sur la puce. L'utilisation de tampon avec de fortes concentrations en sel pourrait aussi permettre d'homogénéiser l'état de polymérisation des protéines RAD51 [183], [189], [194], pour faciliter cette accessibilité. En effet, la concentration en protéine et en sels, influent sur l'état de polymérisation de la protéine RAD51. Une optimisation du signal perçu est également à envisager toujours en se basant sur la technologie Quantum-Dots. L'évaluation de la vitesse de phosphorylation et de la force

d'interaction enzyme/substrat est également à définir. Dans cette optique, le couplage à un système de résonance plasmonique de surface est à envisager.

Cette technique innovante devrait permettre, à moyen terme, d'établir rapidement le profil de phosphorylation ou le « kinome » de RAD51 en identifiant précisément les sites phosphorylés par l'ensemble des tyrosines kinases. Elle permettrait également de tester différentes molécules et inhibiteurs de protéines à activité tyrosine kinases sur leur capacité de phosphorylation de cette protéine centrale de la réparation par RH qu'est RAD51. Enfin, cette biopuce de criblage permettrait, à plus long terme, d'établir le « kinome » actif de lignées cellulaires, comme les cellules cancéreuses où certaines kinases sont fortement activées, dans des conditions où les protéines analysées sont présentes sous forme native. Ceci est un avantage en comparaison de la spectrométrie de masse au cours de laquelle une perte d'information peut se produire, notamment lors de la fragmentation comme expliqué précédemment.

Les résultats obtenus *in vitro* permettent de mieux comprendre ceux observés *in cellulo*. En effet, dans les cellules cancéreuses de prostate DU145, nous montrons, dans des conditions inverses à celles de la littérature [504], [505], [541], [543], que l'activation du récepteur c-Met par son ligand HGF-SF conduit à une augmentation de la réparation des CDB par RH. Cette réparation plus efficace, suite à l'activation du récepteur et dans des conditions de CDB chimio-induite est à associer à une augmentation de la synthèse de la protéine RAD51, suivie d'une augmentation de la translocation nucléaire. Cette activation conduit à une diminution des foyers γ H2AX et donc de la signalisation des dommages par CDB de l'ADN, qui sont alors réparés. D'une certaine manière, l'activation de c-Met conduit à prévenir les cellules DU145 des dommages à l'ADN. Un des objectifs futurs sera donc de démontrer la phosphorylation de RAD51 par c-Met *in cellulo* afin de corréliser au mieux nos observations aux données recueillies *in vitro*. Jusqu'ici, nos résultats ne l'ont pas clairement identifiée. Cependant, nous pensons que l'utilisation d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifique [224] de chaque phosphorylation permettra sa mise en évidence.

Notons également que toutes les cellules ne se trouvent pas dans la même phase du cycle cellulaire. Or comme nous l'avons présenté, le type de réparation et la phase du cycle cellulaire sont deux éléments étroitement liés. La synchronisation cellulaire pour homogénéiser la population observée sera aussi à réaliser. Elle permettra d'observer les MPT potentielles de RAD51, sa localisation et son expression à chaque étape du cycle cellulaire et plus particulièrement au moment le plus opportun comme lors de la phase S/G2. Différentes approches sont envisageables [563] avec notamment l'utilisation de nocodazole qui est un inhibiteur rapidement réversible de la polymérisation des microtubules et peut être utilisé pour arrêter les cellules avant l'anaphase de la phase M. Il agit en bloquant la formation des fuseaux mitotiques qui se fixent et séparent les chromatides sœurs dans les cellules en division. Les

cellules resteront arrêtées jusqu'à ce que le nocodazole soit retiré [564]. Pour un arrêt en phase M, l'inhibition de CDK1 nécessaire pour la transition de la phase G2 à la phase M peut aussi être envisagée [565]. L'utilisation d'un double blocage à des concentrations élevées de thymidine stoppera le cycle cellulaire en phase S. L'ajout de thymidine interrompt le métabolisme des désoxynucléotides par inhibition compétitive, bloquant la réplication de l'ADN et donc de la cellule [566]. Cette technique sera privilégiée, car déjà mise en place au laboratoire.

Une investigation plus poussée du rôle de BRCA2 par immuno-précipitation ou co-immuno-marquage est également à réaliser dans ce sens afin de comprendre le rôle de ce partenaire essentiel au recrutement de RAD51 sur les CDB. De manière générale, la découverte des acteurs impliqués dans la modulation de la RH par l'activation de c-Met est un des points importants de ce sujet. La mise en place d'un système de détection des différents partenaires de la recombinaison est donc à réaliser. L'immunoprécipitation de la protéine RAD51 couplée à la spectrométrie de masse permettra de répondre à cette question. L'utilisation du système BioID, actuellement mis en place au laboratoire, couplé également à la spectrométrie de masse, sera un outil précieux pour la détection des partenaires proches mais indirects de la protéine RAD51 (**cf. Annexe 13**) [567], [568]. L'objectif étant d'établir des profils de partenaires protéiques de la réparation par recombinaison selon les traitements réalisés et le moment du cycle étudié. Ceci afin de mieux comprendre la signalisation existante entre c-Met et RAD51.

Ce système repose sur la création d'un plasmide codant pour une protéine fusion RAD51-Biotine-Ligase qui est transfecté dans les cellules. L'ajout de biotine au milieu de culture permet la biotinylation des protéines proches de RAD51 par la biotine ligase. Les protéines cellulaires biotinylées sont ensuite purifiées par pull-down. Elles sont ensuite analysées par électrophorèse, western blot et spectrométrie de masse. Cette technique permettra d'obtenir des profils protéiques biotinylés et donc des partenaires potentiels différents selon les traitements réalisés.

L'objectif est aussi d'établir la signalisation entre RAD51 et c-Met, si l'on part du principe que la phosphorylation *in cellulo* n'est pas directe. Cette signalisation peut se faire via la voie PI3K/AKT, ou suite à la translocation du récepteur activé via la protéine ERK par exemple. Nous pouvons également imaginer une interaction directe entre RAD51 et c-Met au niveau du cytoplasme mais également au niveau nucléaire. En effet, ce récepteur fait parti des RTK dont les preuves s'accumulent quant à leur translocation dans certains compartiments intracellulaires [426], [498] (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, noyau,...) où ils phosphorylent leurs protéines effectrices traditionnelles et des protéines substrats non-canoniques [569]. Parmi ces substrats, on trouve des cofacteurs de transcription et des protéines de la réponse aux dommages de l'ADN.

Dans la continuité, il sera intéressant de réaliser un travail similaire sur les autres acteurs majeurs de la réparation par RH comme le complexe MRN ou les protéines PALB2, BRCA1 et BRCA2. Ceci afin encore une fois d'établir au mieux la signalisation RTK/Réparation et comprendre l'impact de l'activation de c-Met dans la réparation de l'ADN des cellules cancéreuses.

En résumé, notre compréhension de la modulation de l'activité de la protéine recombinaise RAD51 par le récepteur tyrosine kinase c-Met dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN n'en est qu'au commencement. Elle mérite d'être poursuivie et approfondie pour ensuite être transposé à d'autres axes RTK/Réparation afin de mieux comprendre la signalisation cellulaire et lutter efficacement contre le développement, la résistance et l'échappement tumoral.

Bibliographie

- [1] T. Lindahl and D. E. Barnes, "Repair of endogenous DNA damage," in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2000, vol. 65, pp. 127–133.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1. pp. 57–70, 07-Jan-2000.
- [3] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5. pp. 646–674, 04-Mar-2011.
- [4] J. Bartkova *et al.*, "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis," *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 864–870, Apr. 2005.
- [5] C. G. Fraga, M. K. Shigenaga, J. W. Park, P. Degan, and B. N. Ames, "Oxidative damage to DNA during aging: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 12, pp. 4533–4537, 1990.
- [6] B. Chance, H. Sies, and A. Boveris, "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs," *Physiol. Rev.*, vol. 59, no. 3, pp. 527–605, 1979.
- [7] S. Loft and H. E. Poulsen, "Cancer risk and oxidative DNA damage in man," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 74, no. 6. Springer Verlag, pp. 297–312, 1996.
- [8] H. Sumimoto, "Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species," *FEBS Journal*, vol. 275, no. 13. pp. 3249–3277, Jul-2008.
- [9] R. A. Ross, A. B. Judd, V. M. Pickel, T. H. Joh, and D. J. Reis, "Strain-dependent variations in number of midbrain dopaminergic neurones," *Nature*, vol. 264, no. 5587, pp. 654–656, 1976.
- [10] A. L. Tappel, "Vitamin E and Selenium Protection From in Vivo Lipid Peroxidation*," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 355, no. 1, pp. 18–31, 1980.
- [11] M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, and J. Lunec, "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease," *FASEB J.*, vol. 17, no. 10, pp. 1195–1214, Jul. 2003.
- [12] H. Kasai and S. Nishimura, "Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents," *Nucleic Acids Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 2137–2145, 1984.
- [13] K. C. Cheng, D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura, and L. A. Loeb, "8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 1, pp. 166–172, 1992.
- [14] M. R. Lieber, "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 79, no. 1, pp. 181–211, Jun. 2010.
- [15] A. Skoneczna, A. Kaniak, and M. Skoneczny, *Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms*, vol. 39, no. 6. 2015.
- [16] X. L. and W.-D. Heyer, "Homologous recombination in DNA repair and DNA," *Cell Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 99–113, 2011.
- [17] O. Hyrien, "Mechanisms and consequences of replication fork arrest," *Biochimie*, vol. 82, no. 1, pp. 5–17, Jan. 2000.
- [18] M. van Kregten and M. Tijsterman, "The repair of G-quadruplex-induced DNA damage," *Exp. Cell Res.*, vol. 329, no. 1, pp. 178–183, 2014.
- [19] C. M. Wickramasinghe, H. Arzouk, A. Frey, A. Maiter, and J. E. Sale, "Contributions of the specialised DNA polymerases to replication of structured DNA," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 29, pp. 83–90, 2015.
- [20] N. Kim, A. L. Abdulovic, R. Gealy, M. J. Lippert, and S. Jinks-Robertson, "Transcription-associated mutagenesis in yeast is directly proportional to the level of gene expression and influenced by the direction of DNA replication," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 6, no. 9, pp. 1285–1296, Sep. 2007.
- [21] S. Hamperl and K. A. Cimprich, "The contribution of co-transcriptional RNA: DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 19, pp. 84–94, 2014.
- [22] J. Sollier and K. A. Cimprich, "R-Loops Breaking Bad," *Trends Cell Biol.*, vol. 25, no. 9, pp. 514–522, 2016.
- [23] E. R. Jamieson and S. J. Lippard, "Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts," *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 9, pp. 2467–2498, Sep. 1999.
- [24] Y. Pommier, "Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond," in *Nature Reviews Cancer*, 2006, vol. 6, no. 10, pp. 789–802.
- [25] Y. H. Hsiang, M. G. Lihou, and L. F. Liu, "Arrest of Replication Forks by Drug-stabilized Topoisomerase I-DNA Cleavable Complexes as a Mechanism of Cell Killing by Camptothecin," *Cancer Res.*, vol. 49, no. 18, pp. 5077–5082, Sep. 1989.
- [26] N. Saleh-Gohari, H. E. Bryant, N. Schultz, K. M. Parker, T. N. Cassel, and T. Helleday, "Spontaneous Homologous Recombination Is Induced by Collapsed Replication Forks That Are Caused by Endogenous DNA Single-Strand Breaks," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 16, pp. 7158–7169, Aug. 2005.
- [27] M. A. Bookman *et al.*, "Topotecan for the treatment of advanced epithelial ovarian cancer: An open-label phase II study in patients treated after prior chemotherapy that contained cisplatin or carboplatin and paclitaxel," *J. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 10, pp. 3345–3352, 1998.
- [28] J. Weekes, A. K. Y. Lam, S. Sebesan, and Y. H. Ho, "Irinotecan therapy and molecular targets in colorectal cancer: A systemic review," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 15, no. 29. pp. 3597–3602, 07-Aug-2009.
- [29] S. P. Jackson, "Sensing and repairing DNA double-strand breaks," *Carcinogenesis*, vol. 23, no. 5, pp. 687–696, May 2002.
- [30] S. P. Jackson and J. Bartek, "Europe PMC Funders Group The DNA-damage response in human biology and disease," *Nature*, vol. 461, no. 7267, pp. 1071–1078, 2010.
- [31] J. L. Ravanat, T. Douki, and J. Cadet, "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 63, no. 1–3, pp. 88–102, Oct. 2001.
- [32] R. P. Rastogi, Richa, A. Kumar, M. B. Tyagi, and R. P. Sinha, "Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair," *Journal of Nucleic Acids*, vol. 2010. 2010.
- [33] R. P. Sinha and D. P. Häder, "UV-induced DNA damage and repair: A review," *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 1, no. 4. pp. 225–236, 01-Apr-2002.
- [34] *Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation: BEIR VII Phase 2*. National Academies Press, 2006.
- [35] G. van Waeg, F. Niklasson, and C. H. de Verdier, "Deamination of guanine to xanthine: a metabolic pathway of underestimated importance in human purine catabolism?," in *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 195 Pt A, 1986, pp. 425–430.
- [36] O. Davies, P. Mendes, K. Smallbone, and N. Malys, "Characterisation of multiple substrate-specific (d)ITP/(d)XTPase and modelling of deaminated purine nucleotide metabolism," *BMB Rep.*, vol. 45, no. 4, pp. 259–264, Apr. 2012.
- [37] B. Kavli, M. Otterlei, G. Slupphaug, and H. E. Krokan, "Uracil in DNA-General mutagen, but normal intermediate in acquired immunity,"

- DNA Repair (Amst)*, vol. 6, no. 4, pp. 505–516, Apr. 2007.
- [38] B. Sedgwick, P. A. Bates, J. Paik, S. C. Jacobs, and T. Lindahl, "Repair of alkylated DNA: Recent advances," *DNA Repair (Amst)*, vol. 6, no. 4, pp. 429–442, Apr. 2007.
- [39] J. Nakamura and J. A. Swenberg, "Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 11, pp. 2522–2526, 1999.
- [40] R. De Bont and N. van Larebeke, "Endogenous DNA damage in humans: A review of quantitative data," *Mutagenesis*, vol. 19, no. 3, pp. 169–185, 2004.
- [41] M. D. Wyatt, J. M. Allan, A. Y. Lau, T. E. Ellenberger, and L. D. Samson, "3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance," *BioEssays*, vol. 21, no. 8, pp. 668–676, 1999.
- [42] A. B. Robertson, A. Klungland, T. Rognes, and I. Leiros, "Base excision repair: The long and short of it," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 6, pp. 981–993, Mar. 2009.
- [43] S. Obeid *et al.*, "Replication through an abasic DNA lesion: Structural basis for adenine selectivity," *EMBO J.*, vol. 29, no. 10, pp. 1738–1747, May 2010.
- [44] G. T. Wondrak, M. K. Jacobson, and E. L. Jacobson, "Endogenous UVA-photosensitizers: Mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection," *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 5, no. 2, pp. 215–237, 2006.
- [45] L. A. Lipscomb *et al.*, "X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 3, pp. 719–723, Jan. 1995.
- [46] R. Drouin and J. P. Therrien, "UVB-induced Cyclobutane Pyrimidine Dimer Frequency Correlates with Skin Cancer Mutational Hotspots in p53," *Photochem. Photobiol.*, vol. 66, no. 5, pp. 719–726, 1997.
- [47] S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, and T. Douki, "Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells," *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 556, no. 1–2, pp. 135–142, Nov. 2004.
- [48] T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, and E. Sage, "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation," *Biochemistry*, vol. 42, no. 30, pp. 9221–9226, Aug. 2003.
- [49] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, and T. Douki, "Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 37, pp. 13765–13770, Sep. 2006.
- [50] D. Perdiz, P. Gróf, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi, and E. Sage, "Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells: Possible role of dewar photoproducts in solar mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 35, pp. 26732–26742, Sep. 2000.
- [51] E. Otsushi *et al.*, "Respective roles of cyclobutane pyrimidine dimers, (6-4)photoproducts, and minor photoproducts in ultraviolet mutagenesis of repair-deficient xeroderma pigmentosum a cells," 2000.
- [52] D. L. Mitchell, "Effects of Cytosine Methylation on Pyrimidine Dimer Formation in DNA," *Photochem. Photobiol.*, vol. 71, no. 2, pp. 162–165, May 2007.
- [53] M. D. Topal and J. R. Fresco, "Complementary base pairing and the origin of substitution mutations," 1976.
- [54] M. M. Vilenchik and A. G. Knudson, "Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 22, pp. 12871–12876, Oct. 2003.
- [55] A. Grabarz, A. Barascu, J. Guirouilh-Barbat, and B. S. Lopez, "Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining.," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 2, no. 3, pp. 249–68, 2012.
- [56] A. Mehta and J. E. Haber, "Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 6, no. 9, pp. 1–19, 2014.
- [57] W. J. Graham, C. D. Putnam, and R. D. Kolodner, "DNA mismatch repair: Mechanisms and cancer genetics," in *Encyclopedia of Cancer*, Elsevier, 2018, pp. 530–538.
- [58] G. M. Li, "Mechanisms and functions of DNA mismatch repair," *Cell Research*, vol. 18, no. 1, pp. 85–98, Jan-2008.
- [59] T. Nospikel, "Nucleotide excision repair: Variations on versatility," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 6, pp. 994–1009, Mar-2009.
- [60] J. A. Martijn, H. Lans, W. Vermeulen, and J. H. J. Hoeijmakers, *Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing*, vol. 15, no. 7. Nature Publishing Group, 2014, pp. 465–481.
- [61] N. Le May, J. M. Egly, and F. Coin, "True lies: The double life of the nucleotide excision repair factors in transcription and DNA repair," *Journal of Nucleic Acids*, vol. 2010. Hindawi Limited, 2010.
- [62] G. Spivak, "Nucleotide excision repair in humans," *DNA Repair*, vol. 36. Elsevier B.V., pp. 13–18, 2015.
- [63] H. E. Krokan and M. Bjørås, "Base excision repair," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 1–22, Apr. 2013.
- [64] A. Bürkle, C. Brabeck, J. Diefenbach, and S. Beneke, "The emerging role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in longevity," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 37, no. 5 SPEC. ISS. Elsevier Ltd, pp. 1043–1053, 01-May-2005.
- [65] G. V. Chaitanya, J. S. Alexander, and P. P. Babu, "PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration," 2010.
- [66] M. Bétermier, P. Bertrand, and B. S. Lopez, "Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process?," *PLoS Genetics*, vol. 10, no. 1. PLoS Genet, Jan-2014.
- [67] J. H. J. Hoeijmakers, "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer," *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 366–374, 17-May-2001.
- [68] T. Lindahl and R. D. Wood, "Quality control by DNA repair," *Science*, vol. 286, no. 5446, pp. 1897–1905, 03-Dec-1999.
- [69] M. Jasin and R. Rothstein, "Repair of strand breaks by homologous recombination," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 11, pp. 1–18, 2013.
- [70] M. Frankenberg-Schwager, A. Gebauer, C. Koppe, H. Wolf, E. Pralle, and D. Frankenberg, "Single-strand annealing, conservative homologous recombination, nonhomologous DNA end joining, and the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by sparsely or densely ionizing radiation," *Radiat. Res.*, vol. 171, no. 3, pp. 265–273, Mar. 2009.
- [71] R. Elango *et al.*, "Break-induced replication promotes formation of lethal joint molecules dissolved by Srs2," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2017.
- [72] A. Fouquin, J. Guirouilh-Barbat, B. Lopez, J. Hall, M. Amor-Guétet, and V. Pennaneach, "PARP2 controls double-strand break repair pathway choice by limiting 53BP1 accumulation at DNA damage sites and promoting end-resection," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 21, pp. 12325–12339, Dec. 2017.
- [73] D. A. Ronato, S. Y. Mersaoui, F. F. Busatto, E. B. Affar, S. Richard, and J. Y. Masson, "Limiting the DNA Double-Strand Break

- Resectosome for Genome Protection," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 45, no. 9. Elsevier Ltd, pp. 779–793, 01-Sep-2020.
- [74] B. D. Price and A. D. D'Andrea, "Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks," *Cell*, vol. 152, no. 6, pp. 1344–1354, Mar. 2013.
- [75] S. E. Polo and G. Almouzni, "Dynamique de la chromatine lors de la reparation des lésions de l'ADN," *Medecine/Sciences*, vol. 23, no. 1, pp. 29–31, Jan. 2007.
- [76] M. J. Smerdon, "DNA repair and the role of chromatin structure," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 422–428, 1991.
- [77] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond, "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution," *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 251–260, 1997.
- [78] J. Lukas, C. Lukas, and J. Bartek, "More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance," *Nature Cell Biology*, vol. 13, no. 10, pp. 1161–1169, Oct-2011.
- [79] K. Heo *et al.*, "FACT-Mediated Exchange of Histone Variant H2AX Regulated by Phosphorylation of H2AX and ADP-Ribosylation of Spt16," *Mol. Cell*, vol. 30, no. 1, pp. 86–97, Apr. 2008.
- [80] J. S. Iacovoni *et al.*, "High-resolution profiling of γH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome," *EMBO J.*, vol. 29, no. 8, pp. 1446–1457, Apr. 2010.
- [81] E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner, "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 10, pp. 5858–5868, Mar. 1998.
- [82] E. P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, and W. M. Bonner, "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo," *J. Cell Biol.*, vol. 146, no. 5, pp. 905–915, 1999.
- [83] S. Burma, B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D. J. Chen, "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 45, pp. 42462–42467, Nov. 2001.
- [84] T. Stiff, M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Löbrich, and P. A. Jeggo, "ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 7, pp. 2390–2396, Apr. 2004.
- [85] J. Guirouilh-Barbat, C. Redon, and Y. Pommier, "Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex," *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 9, pp. 3969–3981, Sep. 2008.
- [86] H. Keskin *et al.*, "Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair," *Nature*, vol. 515, no. 7527, pp. 436–439, Nov. 2014.
- [87] M. P. Crossley, M. Bocek, and K. A. Cimprich, "R-Loops as Cellular Regulators and Genomic Threats," *Molecular Cell*, vol. 73, no. 3. Cell Press, pp. 398–411, 07-Feb-2019.
- [88] W. T. Lu *et al.*, "Drosha drives the formation of DNA:RNA hybrids around DNA break sites to facilitate DNA repair," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2018.
- [89] H. Chen *et al.*, "m5C modification of mRNA serves a DNA damage code to promote homologous recombination," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 3–14, 2020.
- [90] T. Yasuhara *et al.*, "Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair," *Cell*, vol. 175, no. 2, pp. 558-570.e11, Oct. 2018.
- [91] C. Zhang *et al.*, "METTL3 and N6-Methyladenosine Promote Homologous Recombination-Mediated Repair of DSBs by Modulating DNA-RNA Hybrid Accumulation," *Mol. Cell*, vol. 79, no. 3, pp. 425-442.e7, Jul. 2020.
- [92] Y. Sun, T. J. McCorvie, L. A. Yates, and X. Zhang, "Structural basis of homologous recombination," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 77, no. 1. Springer, pp. 3–18, 01-Jan-2020.
- [93] J. Falck, J. Coates, and S. P. Jackson, "Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage," *Nature*, vol. 434, no. 7033, pp. 605–611, Mar. 2005.
- [94] H. Lempiäinen and T. D. Halazonetis, "Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks," *EMBO J.*, vol. 28, no. 20, pp. 3067–3073, 2009.
- [95] M. Laplante and D. M. Sabatini, "mTOR signaling in growth control and disease," *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 274–293, 13-Apr-2012.
- [96] D. Baretic and R. L. Williams, "The structural basis for mTOR function," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 36. Academic Press, pp. 91–101, 01-Dec-2014.
- [97] C. J. Bakkenist and M. B. Kastan, "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation," *Nature*, vol. 421, no. 6922, pp. 499–506, Jan. 2003.
- [98] B. L. Sibanda, D. Y. Chirgadze, D. B. Ascher, and T. L. Blundell, "DNA-PKcs structure suggests an allosteric mechanism modulating DNA double-strand break repair," *Science (80-.)*, vol. 355, no. 6324, pp. 520–524, Feb. 2017.
- [99] J. H. Lee and T. T. Paull, "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex," *Science (80-.)*, vol. 308, no. 5721, pp. 551–554, Apr. 2005.
- [100] K. A. Cimprich and D. Cortez, "ATR: An essential regulator of genome integrity," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 8, pp. 616–627, Aug-2008.
- [101] H. L. Ball, J. S. Myers, and D. Cortez, "ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation," *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 2372–2381, May 2005.
- [102] A. Kumagai, J. Lee, H. Y. Yoo, and W. G. Dunphy, "TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex," *Cell*, vol. 124, no. 5, pp. 943–955, Mar. 2006.
- [103] Q. Liu *et al.*, "Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint," *Genes Dev.*, vol. 14, no. 12, pp. 1448–1459, Jun. 2000.
- [104] L. L. Parker and H. Piwnicka-Worms, "Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase," *Science (80-.)*, vol. 257, no. 5078, pp. 1955–1957, 1992.
- [105] T. Riley, E. Sontag, P. Chen, and A. Levine, "Transcriptional control of human p53-regulated genes," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 402–412, May 2008.
- [106] M. B. Kastan and J. Bartek, "Cell-cycle checkpoints and cancer," *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 316–323, 18-Nov-2004.
- [107] E. J. Brown and D. Baltimore, "Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance," *Genes Dev.*, vol. 17, no. 5, pp. 615–628, Mar. 2003.
- [108] H. Mokrani-Benhelli *et al.*, "Primary Microcephaly, Impaired DNA Replication, and Genomic Instability Caused by Compound Heterozygous ATR Mutations," *Hum. Mutat.*, vol. 34, no. 2, pp. 374–384, Feb. 2013.
- [109] J. S. Myers and D. Cortez, "Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 14, pp. 9346–9350, Apr. 2006.
- [110] R. Buisson *et al.*, "Coupling of Homologous Recombination and the Checkpoint by ATR," *Mol. Cell*, vol. 65, no. 2, pp. 336–346, Jan. 2017.
- [111] A. M. Weber and A. J. Ryan, "ATM and ATR as therapeutic targets in cancer," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 149. Elsevier Inc.,

- pp. 124–138, 01-May-2015.
- [112] Z. Mao, M. Bozzella, A. Seluanov, and V. Gorbunova, "Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 7, no. 10, pp. 1765–1771, Oct. 2008.
- [113] J. Guirouilh-Barbat *et al.*, "Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells," *Mol. Cell*, vol. 14, no. 5, pp. 611–623, Jun. 2004.
- [114] J. Guirouilh-Barbat, E. Rass, I. Plo, P. Bertrand, and B. S. Lopez, "Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 52, pp. 20902–20907, Dec. 2007.
- [115] H. H. Y. Chang, N. R. Pannunzio, N. Adachi, and M. R. Lieber, "Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 18, no. 8, Nature Publishing Group, pp. 495–506, 01-Aug-2017.
- [116] J. Guirouilh-Barbat, S. Huck, and B. S. Lopez, "S-phase progression stimulates both the mutagenic KU-independent pathway and mutagenic processing of KU-dependent intermediates, for nonhomologous end joining," *Oncogene*, vol. 27, no. 12, pp. 1726–1736, Mar. 2008.
- [117] J. R. Walker, R. A. Corpina, and J. Goldberg, "Structure of the Ku heterodimer bound to dna and its implications for double-strand break repair," *Nature*, vol. 412, no. 6847, pp. 607–614, Aug. 2001.
- [118] S. A. Nick McElhinny, C. M. Snowden, J. McCarville, and D. A. Ramsden, "Ku Recruits the XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends," *Mol. Cell Biol.*, vol. 20, no. 9, pp. 2996–3003, May 2000.
- [119] P. R. Blier, A. J. Griffith, J. Craft, and J. A. Hardin, "Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 10, pp. 7594–7601, 1993.
- [120] A. Shibata, "Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks," *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 803–805, no. July, pp. 51–55, 2017.
- [121] A. Shibata *et al.*, "Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase," *EMBO J.*, vol. 30, no. 6, pp. 1079–1092, Mar. 2011.
- [122] D. Gell and S. P. Jackson, "Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex," *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 17, pp. 3494–3502, Sep. 1999.
- [123] K. K. Leuther, O. Hammarsten, R. D. Kornberg, and G. Chu, "Structure of DNA-dependent protein kinase: Implications for its regulation by DNA," *EMBO J.*, vol. 18, no. 5, pp. 1114–1123, Mar. 1999.
- [124] D. Moshous *et al.*, "Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency," *Cell*, vol. 105, no. 2, pp. 177–186, Apr. 2001.
- [125] J. M. Pryor *et al.*, "Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 33, pp. E4537–E4545, Aug. 2015.
- [126] U. Grawunder *et al.*, "Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells," *Nature*, vol. 388, no. 6641, pp. 492–495, 1997.
- [127] T. Ochi *et al.*, "PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair," *Science (80-.)*, vol. 347, no. 6218, pp. 185–188, Jan. 2015.
- [128] K. J. Lee *et al.*, "Phosphorylation of Ku dictates DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice in S phase," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 4, pp. 1732–1745, Dec. 2015.
- [129] T. Le Guen, S. Ragu, J. Guirouilh-Barbat, and B. S. Lopez, "Role of the double-strand break repair pathway in the maintenance of genomic stability," *Molecular and Cellular Oncology*, vol. 2, no. 1. Taylor and Francis Ltd., 02-Jan-2015.
- [130] T. H. Stracker and J. H. J. Petrini, "The MRE11 complex: Starting from the ends," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 12, no. 2, pp. 90–103, Feb-2011.
- [131] R. Tisi, J. Vertemara, G. Zampella, and M. P. Longhese, "Functional and structural insights into the MRX/MRN complex, a key player in recognition and repair of DNA double-strand breaks," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 18, pp. 1137–1152, 2020.
- [132] B. J. Lamarche, N. I. Orazio, and M. D. Weitzman, "The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance," *FEBS Letters*, vol. 584, no. 17, pp. 3682–3695, Sep-2010.
- [133] L. R. Myler *et al.*, "Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair," *Mol. Cell*, vol. 67, no. 5, pp. 891-898.e4, Sep. 2017.
- [134] S. Gravel, J. R. Chapman, C. Magill, and S. P. Jackson, "DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection," *Genes Dev.*, vol. 22, no. 20, pp. 2767–2772, Oct. 2008.
- [135] A. V. Nimonkar, A. Z. Özsoy, J. Genschel, P. Modrich, and S. C. Kowalczykowski, "Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 44, pp. 16906–16911, Nov. 2008.
- [136] M. Isono *et al.*, "BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation," *Cell Rep.*, vol. 18, no. 2, pp. 520–532, Jan. 2017.
- [137] P. Langerak, E. Mejia-Ramirez, O. Limbo, and P. Russell, "Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks," *PLoS Genet.*, vol. 7, no. 9, p. e1002271, Sep. 2011.
- [138] G. G. Oakley, K. Tillison, S. A. Opiyo, J. G. Glanzer, J. M. Horn, and S. M. Patrick, "Physical interaction between replication protein A (RPA) and MRN: Involvement of RPA2 phosphorylation and the N-terminus of RPA1," *Biochemistry*, vol. 48, no. 31, pp. 7473–7481, Aug. 2009.
- [139] G. G. Oakley, S. M. Patrick, J. Yao, M. P. Carty, J. J. Turchi, and K. Dixon, "RPA phosphorylation in mitosis alters DNA binding and protein-protein interactions," *Biochemistry*, vol. 42, no. 11, pp. 3255–3264, Mar. 2003.
- [140] I. Deshpande, A. Seeber, K. Shimada, J. J. Keusch, H. Gut, and S. M. Gasser, "Structural Basis of Mec1-Ddc2-RPA Assembly and Activation on Single-Stranded DNA at Sites of Damage," *Mol. Cell*, vol. 68, no. 2, pp. 431-445.e5, Oct. 2017.
- [141] L. Zou and S. J. Elledge, "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes," *Science (80-.)*, vol. 300, no. 5625, pp. 1542–1548, Jun. 2003.
- [142] C. A. Brosey *et al.*, "A new structural framework for integrating replication protein A into DNA processing machinery," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 4, pp. 2313–2327, Feb. 2013.
- [143] A. Maréchal and L. Zou, "RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response," *Cell Research*, vol. 25, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 9–23, 05-Jan-2015.
- [144] F. Zhang *et al.*, "PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response," *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 6, pp. 524–529, Mar. 2009.
- [145] S. M. H. Sy, M. S. Y. Huen, and J. Chen, "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 17, pp. 7155–7160, Apr. 2009.
- [146] A. K. Murphy *et al.*, "Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery," *J. Cell Biol.*, vol. 206, no. 4, pp. 493–507, 2014.

- [147] E. Dray *et al.*, "Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1255–1259, 2010.
- [148] M. K. K. Shivji, O. R. Davies, J. M. Savill, D. L. Bates, L. Pellegrini, and A. R. Venkitaraman, "A region of human BRCA2 containing multiple BRC repeats promotes RAD51-mediated strand exchange," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 14, pp. 4000–4011, 2006.
- [149] T. Thorslund *et al.*, "The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1263–1265, Oct. 2010.
- [150] C. J. Lord and A. Ashworth, "RAD51, BRCA2 and DNA repair: A partial resolution," *Nature Structural and Molecular Biology*, vol. 14, no. 6, pp. 461–462, Jun-2007.
- [151] T. Sugiyama and N. Kantake, "Dynamic Regulatory Interactions of Rad51, Rad52, and Replication Protein-A in Recombination Intermediates," *J. Mol. Biol.*, vol. 390, no. 1, pp. 45–55, Jul. 2009.
- [152] C. J. Ma, B. Gibb, Y. Kwon, P. Sung, and E. C. Greene, "Protein dynamics of human RPA and RAD51 on ssDNA during assembly and disassembly of the RAD51 filament," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 749–761, 2017.
- [153] A. V. Nimmonkar, R. A. Sica, and S. C. Kowalczykowski, "Rad52 promotes second-end DNA capture in double-stranded break repair to form complement-stabilized joint molecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 9, pp. 3077–3082, Mar. 2009.
- [154] C. J. Ma, Y. Kwon, P. Sung, and E. C. Greene, "Human RAD52 interactions with replication protein a and the RAD51 presynaptic complex," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 28, pp. 11702–11713, Jul. 2017.
- [155] G. Schay *et al.*, "Without Binding ATP, Human Rad51 Does Not Form Helical Filaments on ssDNA," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 9, pp. 2165–2178, Mar. 2016.
- [156] J. B. Crickard, C. J. Moevus, Y. Kwon, P. Sung, and E. C. Greene, "Rad54 Drives ATP Hydrolysis-Dependent DNA Sequence Alignment during Homologous Recombination," *Cell*, vol. 181, no. 6, pp. 1380-1394.e18, 2020.
- [157] C. Wiese *et al.*, "Promotion of Homologous Recombination and Genomic Stability by RAD51AP1 via RAD51 Recombinase Enhancement," *Mol. Cell*, vol. 28, no. 3, pp. 482–490, Nov. 2007.
- [158] J. Matos and S. C. West, "Holliday junction resolution: Regulation in space and time," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 19, pp. 176–181, Jul. 2014.
- [159] R. S. Punatar, M. J. Martin, H. D. M. Wyatt, Y. W. Chan, and S. C. West, "Resolution of single and double Holliday junction recombination intermediates by GEN 1," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 3, pp. 443–450, Jan. 2017.
- [160] U. Rass *et al.*, "Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein," *Genes Dev.*, vol. 24, no. 14, pp. 1559–1569, Jul. 2010.
- [161] I. M. Muñoz *et al.*, "Coordination of Structure-Specific Nucleases by Human SLX4/BTBD12 Is Required for DNA Repair," *Mol. Cell*, vol. 35, no. 1, pp. 116–127, Jul. 2009.
- [162] J. M. Svendsen *et al.*, "Mammalian BTBD12/SLX4 Assembles A Holliday Junction Resolvase and Is Required for DNA Repair," *Cell*, vol. 138, no. 1, pp. 63–77, Jul. 2009.
- [163] A. Malkova and G. Ira, "Break-induced replication: Functions and molecular mechanism," *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 23, no. 3. NIH Public Access, pp. 271–279, Jun-2013.
- [164] T. Miura, Y. Yamana, T. Usui, H. I. Ogawa, M. T. Yamamoto, and K. Kusano, "Homologous recombination via synthesis-dependent strand annealing in yeast requires the IRC20 and SRS2 DNA helicases," *Genetics*, vol. 191, no. 1, pp. 65–78, May 2012.
- [165] M. S. McMahonill, C. W. Sham, and D. K. Bishop, "Synthesis-dependent strand annealing in meiosis," *PLoS Biol.*, vol. 5, no. 11, pp. 2589–2601, Nov. 2007.
- [166] J. W. Szostak, T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, and F. W. Stahl, "The double-strand-break repair model for recombination," *Cell*, vol. 33, no. 1, pp. 25–35, 1983.
- [167] P. Chi, S. Van Komen, M. G. Sehorn, S. Sigurdsson, and P. Sung, "Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 5, no. 3, pp. 381–391, 2006.
- [168] P. R. Bianco, R. B. Tracy, and S. C. Kowalczykowski, "DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison," *Front. Biosci.*, vol. 3, pp. D570-603, Jun. 1998.
- [169] S. V. Chintapalli *et al.*, "Reevaluation of the evolutionary events within recA/RAD51 phylogeny," *BMC Genomics*, vol. 14, no. 1, p. 240, 2013.
- [170] Z. Lin, H. Kong, M. Nei, and H. Ma, "Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 27, pp. 10328–10333, Jul. 2006.
- [171] A. J. Clark and A. D. Margulies, "Isolation and Characterization of Recombination-Deficient Mutants of," *Proc. Natl. Acad. Sci. United States*, vol. 53, pp. 451–459, 1965.
- [172] X. Gu, "The age of the common ancestor of eukaryotes and prokaryotes: Statistical inferences," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 14, no. 8, pp. 861–866, Aug. 1997.
- [173] J. Y. Masson *et al.*, "Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 24, pp. 3296–3307, Dec. 2001.
- [174] J. Y. Park, H. W. Yoo, B. R. Kim, R. Park, S. Y. Choi, and Y. Kim, "Identification of a novel human Rad51 variant that promotes DNA strand exchange," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 10, pp. 3226–3234, 2008.
- [175] C. Wyman, D. Ristic, and R. Kanaar, "Homologous recombination-mediated double-strand break repair," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 3, no. 8–9, pp. 827–833, Aug. 2004.
- [176] L. Pellegrini *et al.*, "Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex," *Nature*, vol. 420, no. 6913, pp. 287–293, 2002.
- [177] Y. Matsuo, I. Sakane, Y. Takizawa, M. Takahashi, and H. Kurumizaka, "Roles of the human Rad51 L1 and L2 loops in DNA binding," *FEBS J.*, vol. 273, no. 14, pp. 3148–3159, Jul. 2006.
- [178] K. Ito, Y. Murayama, M. Takahashi, and H. Iwasaki, "Two three-strand intermediates are processed during Rad51-driven DNA strand exchange," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 25, no. 1, pp. 29–36, Jan. 2018.
- [179] K. Ito *et al.*, "Real-time tracking reveals catalytic roles for the two DNA binding sites of Rad51," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–7, 2020.
- [180] R. M. Story, I. T. Weber, and T. A. Steitz, "The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer," *Nature*, vol. 355, no. 6358, pp. 318–325, 1992.
- [181] A. D. Jeyasekharan *et al.*, "A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 20, no. 10, pp. 1191–1201, Oct. 2013.
- [182] T. Lo, L. Pellegrini, A. R. Venkitaraman, and T. L. Blundell, "Sequence fingerprints in BRCA2 and RAD51: Implications for DNA repair and cancer," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 2, no. 9, pp. 1015–1028, 2003.

- [183] O. R. Davies and L. Pellegrini, "Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 475–483, Jun. 2007.
- [184] J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay, "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold," *EMBO J.*, vol. 1, no. 8, pp. 945–951, Aug. 1982.
- [185] L. Brocchieri and S. Karlin, "A symmetric-iterated multiple alignment of protein sequences," *J. Mol. Biol.*, vol. 276, no. 1, pp. 249–264, Feb. 1998.
- [186] R. B. Robertson *et al.*, "Structural transitions within human Rad51 nucleoprotein filaments," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 31, pp. 12688–12693, 2009.
- [187] C. Wiese *et al.*, "Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 9, pp. 2833–2843, 2006.
- [188] I. Brouwer *et al.*, "Two distinct conformational states define the interaction of human RAD 51- ATP with single-stranded DNA," *EMBO J.*, vol. 37, no. 7, p. e98162, 2018.
- [189] A. Candelli *et al.*, "Visualization and quantification of nascent RAD51 filament formation at single-monomer resolution," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 42, pp. 15090–15095, 2014.
- [190] A. Reymer, K. Frykholm, K. Morimatsu, M. Takahashi, and B. Nordén, "Structure of human Rad51 protein filament from molecular modeling and site-specific linear dichroism spectroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 32, pp. 13248–13253, 2009.
- [191] P. Sung, "Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein," *Science (80-.)*, vol. 265, no. 5176, pp. 1241–1243, Aug. 1994.
- [192] D. S. Shin *et al.*, "Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: Mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2," *EMBO J.*, vol. 22, no. 17, pp. 4566–4576, 2003.
- [193] A. Stasiak and E. H. Egelman, "Structure and function of RecA-DNA complexes," *Experientia*, vol. 50, no. 3. Birkhäuser-Verlag, pp. 192–203, Mar-1994.
- [194] D. S. Yu *et al.*, "Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2," *Mol. Cell*, vol. 12, no. 4, pp. 1029–1041, 2003.
- [195] V. E. Galkin, F. Esashi, X. Yu, S. Yang, S. C. West, and E. H. Egelman, "BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 24, pp. 8537–8542, 2005.
- [196] D. Zhao and K. Lu, "Design, synthesis, and characterization of BRC4 mutants based on the crystal structure of BRC4-RAD51(191–220)," *J. Mol. Model.*, vol. 21, no. 11, pp. 1–7, 2015.
- [197] J. Nomme *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.*, vol. 53, no. 15, pp. 5782–5791, Aug. 2010.
- [198] J. Miné, L. Disseau, M. Takahashi, G. Cappello, M. Dutreix, and J. L. Viovy, "Real-time measurements of the nucleation, growth and dissociation of single Rad51-DNA nucleoprotein filaments," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 21, pp. 7171–7187, 2007.
- [199] T. Van der heijden, R. Seidel, M. Modesti, R. Kanaar, C. Wyman, and C. Dekker, "Real-time assembly and disassembly of human RAD51 filaments on individual DNA molecules," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 17, pp. 5646–5657, 2007.
- [200] M. Modesti *et al.*, "Fluorescent Human RAD51 Reveals Multiple Nucleation Sites and Filament Segments Tightly Associated along a Single DNA Molecule," *Structure*, vol. 15, no. 5, pp. 599–609, 2007.
- [201] S. Subramanyam, C. D. Kinz-Thompson, R. L. Gonzalez, and M. Spies, "Observation and Analysis of RAD51 Nucleation Dynamics at Single-Monomer Resolution," in *Methods in Enzymology*, vol. 600, Academic Press Inc., 2018, pp. 201–232.
- [202] G. Tomblin and R. Fishel, "Biochemical characterization of the human RAD51 protein. I. ATP hydrolysis," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 17, pp. 14417–14425, Apr. 2002.
- [203] E. M. Zaitseva, E. N. Zaitsev, and S. C. Kowalczykowski, "The DNA binding properties of *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 5, pp. 2907–2915, Jan. 1999.
- [204] S. Atwell *et al.*, "Probing Rad51-DNA interactions by changing DNA twist," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 22, pp. 11769–11776, Dec. 2012.
- [205] A. I. Roca and M. M. Cox, "RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair.," *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, vol. 56, pp. 129–223, 1997.
- [206] Y. Liu, A. Z. Stasiak, J. Y. Masson, M. J. McIlwraith, A. Stasiak, and S. C. West, "Conformational changes modulate the activity of human RAD51 protein," *J. Mol. Biol.*, vol. 337, no. 4, pp. 817–827, Apr. 2004.
- [207] S. Sigurdsson, K. Trujillo, B. W. Song, S. Stratton, and P. Sung, "Basis for Avid Homologous DNA Strand Exchange by Human Rad51 and RPA," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 12, pp. 8798–8806, Mar. 2001.
- [208] J. San Filippo, P. Sung, and H. Klein, "Mechanism of eukaryotic homologous recombination," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 229–257, Jun. 2008.
- [209] A. Barzel and M. Kupiec, "Finding a match: How do homologous sequences get together for recombination?," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 9, no. 1, pp. 27–37, 2008.
- [210] S. P. Tsai *et al.*, "Rad51 presynaptic filament stabilization function of the mouse Swi5-Sfr1 heterodimeric complex," *Nucleic Acids Research*, Aug-2012. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492707>. [Accessed: 03-Apr-2020].
- [211] R. B. Jensen, A. Carreira, and S. C. Kowalczykowski, "Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination," *Nature*, vol. 467, no. 7316, pp. 678–683, Oct. 2010.
- [212] A. Sidhu *et al.*, "OUP accepted manuscript," *Nucleic Acids Res.*, no. 1, 2020.
- [213] S. C. Kowalczykowski, "An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 11, p. a016410, 2015.
- [214] H.-Y. Chang *et al.*, "Microcephaly family protein MCPH1 stabilizes RAD51 filaments," *Nucleic Acids Res.*, no. 1, 2020.
- [215] J. Wesoly *et al.*, "Differential Contributions of Mammalian Rad54 Paralogs to Recombination, DNA Damage Repair, and Meiosis," *Mol. Cell Biol.*, vol. 26, no. 3, pp. 976–989, Feb. 2006.
- [216] M. Lisby and R. Rothstein, "Cell biology of mitotic recombination," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 3, 2015.
- [217] J. Simandlova *et al.*, "FBH1 helicase disrupts RAD51 filaments in vitro and modulates homologous recombination in mammalian cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 47, pp. 34168–34180, Nov. 2013.
- [218] S. Inano *et al.*, "RFWD3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination," *Mol. Cell*, vol. 66, no. 5, pp. 622-634.e8, 2017.
- [219] W. K. Chu, M. J. Payne, P. Beli, K. Hanada, C. Choudhary, and I. D. Hickson, "FBH1 influences DNA replication fork stability and homologous recombination through ubiquitylation of RAD51," *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 5931, 2015.

- [220] K. Luo *et al.*, "A phosphorylation–deubiquitination cascade regulates the BRCA2–RAD51 axis in homologous recombination," *Genes Dev.*, vol. 30, no. 23, pp. 2581–2595, 2016.
- [221] C. S. Sørensen *et al.*, "The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair," *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 195–201, Feb. 2005.
- [222] K. Yata *et al.*, "Plk1 and CK2 Act in Concert to Regulate Rad51 during DNA Double Strand Break Repair," *Mol. Cell.*, vol. 45, no. 3, pp. 371–383, 2012.
- [223] Z. M. Yuan *et al.*, "Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 7, pp. 3799–3802, 1998.
- [224] M. Popova, H. Shimizu, K. ichi Yamamoto, M. Lebechech, M. Takahashi, and F. Fleury, "Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependent on that of Y315," *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 12, pp. 1867–1872, 2009.
- [225] B. Alligand, M. Le Breton, D. Marquis, F. Vallette, and F. Fleury, "Functional effects of diphosphomimetic mutations at cAbl-mediated phosphorylation sites on Rad51 recombinase activity," *Biochimie*, vol. 139, pp. 115–124, 2017.
- [226] S. Conilleau, Y. Takizawa, H. Tachiwana, F. Fleury, H. Kurumizaka, and M. Takahashi, "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.*, vol. 339, no. 4, pp. 797–804, 2004.
- [227] T. Selmane *et al.*, "Identification of the Subunit-Subunit Interface of Xenopus Rad51.1 Protein: Similarity to RecA," *J. Mol. Biol.*, vol. 335, no. 4, pp. 895–904, Jan. 2004.
- [228] S. Flott, Y. Kwon, Y. Z. Pigli, P. A. Rice, P. Sung, and S. P. Jackson, "Regulation of Rad51 function by phosphorylation," *EMBO Rep.*, vol. 12, no. 8, pp. 833–839, 2011.
- [229] T. Chabot *et al.*, "New phosphorylation sites of rad51 by c-met modulates presynaptic filament stability," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 3, p. 413, Mar. 2019.
- [230] C. Depienne *et al.*, "RAD51 haploinsufficiency causes congenital mirror movements in humans," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 90, no. 2, pp. 301–307, Feb. 2012.
- [231] A. T. Wang *et al.*, "A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination," *Mol. Cell.*, vol. 59, no. 3, pp. 478–490, Aug. 2015.
- [232] N. Ameziane *et al.*, "A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51," *Nat. Commun.*, vol. 6, Dec. 2015.
- [233] T. Tsuzuki *et al.*, "Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 13, pp. 6236–6240, Jun. 1996.
- [234] S. Nissar, S. M. Baba, T. Akhtar, R. Rasool, Z. A. Shah, and A. S. Sameer, "RAD51 G135C gene polymorphism and risk of colorectal cancer in Kashmir," *Eur. J. Cancer Prev.*, vol. 23, no. 4, pp. 264–268, Jul. 2014.
- [235] W. Wang *et al.*, "Association between the RAD51 135 G>C Polymorphism and Risk of Cancer: A Meta-Analysis of 19,068 Cases and 22,630 Controls," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, Sep. 2013.
- [236] L. Kadouri *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*, vol. 90, no. 10, pp. 2002–2005, May 2004.
- [237] H. O. King *et al.*, "RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells," *Stem Cell Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 125–139, Jan. 2017.
- [238] A. Balbous *et al.*, "A radiosensitizing effect of RAD51 inhibition in glioblastoma stem-like cells," *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, p. 604, Dec. 2016.
- [239] X. Zhang, N. Ma, W. Yao, S. Li, and Z. Ren, "RAD51 is a potential marker for prognosis and regulates cell proliferation in pancreatic cancer," *Cancer Cell Int.*, vol. 19, no. 1, Dec. 2019.
- [240] D. A. Alagpulinsa, S. Ayyadevara, and R. J. Shmookler Reis, "A small molecule inhibitor of RAD51 reduces homologous recombination and sensitizes multiple myeloma cells to doxorubicin," *Front. Oncol.*, vol. 4, no. OCT, pp. 976–986, 2014.
- [241] S. C. Short *et al.*, "Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells," *Neuro. Oncol.*, vol. 13, no. 5, pp. 487–499, 2011.
- [242] J. Chen *et al.*, "Tumor-associated mutations in a conserved structural motif alter physical and biochemical properties of human RAD51 recombinase," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 2, pp. 1098–1111, Jan. 2015.
- [243] M. Kato *et al.*, "Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer," *J. Hum. Genet.*, vol. 45, no. 3, pp. 133–137, 2000.
- [244] C. G. Marsden *et al.*, "The Tumor-Associated Variant RAD51 G151D Induces a Hyper-Recombination Phenotype," *PLoS Genet.*, vol. 12, no. 8, p. e1006208, Aug. 2016.
- [245] D. Yoon, Y. Wang, K. Stapleford, L. Wiesmüller, and J. Chen, "p53 Inhibits Strand Exchange and Replication Fork Regression Promoted by Human Rad51," *J. Mol. Biol.*, vol. 336, no. 3, pp. 639–654, Feb. 2004.
- [246] S. Buchhop, M. K. Gibson, X. W. Wang, P. Wagner, H. W. Stürzbecher, and C. C. Harris, "Interaction of p53 with the human Rad51 protein," *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, no. 19, pp. 3868–3874, Oct. 1997.
- [247] M. C. Silva *et al.*, "Defects in recombination activity caused by somatic and germline mutations in the multimerization/BRCA2 binding region of human RAD51 protein," *DNA Repair (Amst)*, vol. 60, pp. 64–76, Dec. 2017.
- [248] M. C. Silva *et al.*, "RAD51 variant proteins from human lung and kidney tumors exhibit DNA strand exchange defects," *DNA Repair (Amst)*, vol. 42, pp. 44–55, Jun. 2016.
- [249] C. Song *et al.*, "Systematic analysis of protein phosphorylation networks from phosphoproteomic data," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 11, no. 10, pp. 1070–1083, Oct. 2012.
- [250] S. Ullah *et al.*, "DbPAF: An integrative database of protein phosphorylation in animals and fungi," *Sci. Rep.*, vol. 6, Mar. 2016.
- [251] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam, "The protein kinase complement of the human genome," *Science*, vol. 298, no. 5600, pp. 1912–1934, 06-Dec-2002.
- [252] E. D. Scheeff and P. E. Bourne, "Structural Evolution of the Protein Kinase–Like Superfamily," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 1, no. 5, p. e49, Oct. 2005.
- [253] S. K. Hanks, A. M. Quinn, and T. Hunter, "The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains," *Science (80-)*, vol. 241, no. 4861, pp. 42–52, 1988.
- [254] T. Hunter, "Protein Kinase Classification," *Methods Enzymol.*, vol. 200, no. C, pp. 3–37, 1991.
- [255] P. V. Attwood, "Histidine kinases from bacteria to humans," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 41, no. 4, pp. 1023–1028, Aug. 2013.
- [256] F. Cuello *et al.*, "Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer via nucleoside diphosphate kinase (NDPK)

- B and G β subunits. Complex formation of NDPK B with G $\beta\gamma$ dimers and phosphorylation of his-266 in G β ," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 9, pp. 7220–7226, Feb. 2003.
- [257] S. Srivastava *et al.*, "Histidine Phosphorylation of the Potassium Channel KCa3.1 by Nucleoside Diphosphate Kinase B Is Required for Activation of KCa3.1 and CD4 T Cells," *Mol. Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 665–675, 2006.
- [258] X. Cai, S. Srivastava, S. Surindran, Z. Li, and E. Y. Skolnik, "Regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 by reversible histidine phosphorylation mediated by NDPK-B and PHPT1," *Mol. Biol. Cell*, vol. 25, no. 8, pp. 1244–1250, Apr. 2014.
- [259] S. R. Fuhs and T. Hunter, "pHisphorylation: the emergence of histidine phosphorylation as a reversible regulatory modification," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 45. Elsevier Ltd, pp. 8–16, 01-Apr-2017.
- [260] A. Diallo and C. Prigent, "Les sérine/thréonine kinases contrôlant la progression du cycle cellulaire comme cibles thérapeutiques," *Bulletin du Cancer*, vol. 98, no. 11. John Libbey Eurotext, pp. 1335–1345, 2011.
- [261] A. D. Levinson, H. Oppermann, H. E. Varmus, and J. M. Bishop, "The purified product of the transforming gene of avian sarcoma virus phosphorylates tyrosine," *J. Biol. Chem.*, vol. 255, no. 24, pp. 11973–11980, 1980.
- [262] J. Grassot, M. Gouy, G. Perrière, and G. Mouchiroud, "Origin and molecular evolution of receptor tyrosine kinases with immunoglobulin-like domains," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 23, no. 6, pp. 1232–1241, Jun. 2006.
- [263] W. J. Fantl, D. E. Johnson, and L. T. Williams, "Signalling by receptor tyrosine kinases," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 62, no. 1, pp. 453–481, Jun. 1993.
- [264] T. Hunter, "The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease The Salk Institute 10010 North Torrey Pines Road La Jolla , California 92037," no. January 2000, 2017.
- [265] A. Ullrich and J. Schlessinger, "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity," *Cell*, vol. 61, no. 2, pp. 203–212, 1990.
- [266] M. N. Pollak, E. S. Schernhammer, and S. E. Hankinson, "Insulin-like growth factors and neoplasia," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 7, pp. 505–518, Jul. 2004.
- [267] C. W. Ward, M. C. Lawrence, V. A. Streltsov, T. E. Adams, and N. M. McKern, "The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 32, no. 3, pp. 129–137, Mar. 2007.
- [268] M. A. Lemmon and J. Schlessinger, "Cell signaling by receptor tyrosine kinases," *Cell*, vol. 141, no. 7, pp. 1117–1134, Jun. 2010.
- [269] S. Yuzawa, Y. Opatowsky, Z. Zhang, V. Mandiyan, I. Lax, and J. Schlessinger, "Structural Basis for Activation of the Receptor Tyrosine Kinase KIT by Stem Cell Factor," *Cell*, vol. 130, no. 2, pp. 323–334, Jul. 2007.
- [270] T. Wehrman, X. He, B. Raab, A. Dukipatti, H. Blau, and K. C. Garcia, "Structural and Mechanistic Insights into Nerve Growth Factor Interactions with the TrkA and p75 Receptors," *Neuron*, vol. 53, no. 1, pp. 25–38, Jan. 2007.
- [271] A. W. Burgess *et al.*, "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors," *Mol. Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 541–552, Sep. 2003.
- [272] A. L. Frattali, J. L. Treadway, and J. E. Pessine, "Transmembrane Signaling by the Human Insulin Receptor Kinase," vol. 261, no. 21, pp. 19521–19528, 1992.
- [273] M. Huse and J. Kuriyan, "The conformational plasticity of protein kinases," *Cell*, vol. 109, no. 3, pp. 275–282, 2002.
- [274] J. Griffith *et al.*, "The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain," *Mol. Cell*, vol. 13, no. 2, pp. 169–178, 2004.
- [275] C. D. Mol *et al.*, "Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 31655–31663, 2004.
- [276] J. H. Till *et al.*, "Crystal structure of the MuSK tyrosine kinase: Insights into receptor autoregulation," *Structure*, vol. 10, no. 9, pp. 1187–1196, 2002.
- [277] S. Lehr *et al.*, "Identification of tyrosine phosphorylation sites in human Gab-1 protein by EGF receptor kinase in vitro," *Biochemistry*, vol. 38, no. 1, pp. 151–159, Jan. 1999.
- [278] M. F. White, R. Maron, and C. R. Kahn, "Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells," *Nature*, vol. 318, no. 6042, pp. 183–186, 1985.
- [279] E. J. Lowenstein *et al.*, "The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling," *Cell*, vol. 70, no. 3, pp. 431–442, Aug. 1992.
- [280] K. Zenonos, "RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer," *World J. Gastrointest. Oncol.*, vol. 5, no. 5, p. 97, May 2013.
- [281] R. Yao and G. M. Cooper, "Regulation of the Ras signaling pathway by GTPase-activating protein in PC12 cells," *Oncogene*, vol. 11, no. 8, pp. 1607–1614, Oct. 1995.
- [282] R. J. Orton, O. E. Sturm, V. Vyshemirsky, M. Calder, D. R. Gilbert, and W. Kolch, "Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway," *Biochem. J.*, vol. 392, no. 2, pp. 249–261, 2005.
- [283] G. Scita, "NEW EMBO MEMBERS' REVIEW: Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs," *EMBO J.*, vol. 19, no. 11, pp. 2393–2398, Jun. 2000.
- [284] D. Cho, J. W. Mier, and M. B. Atkins, "PI3K/Akt/mTOR pathway: A growth and proliferation pathway," in *Renal Cell Carcinoma: Molecular Targets and Clinical Applications*, Totowa, NJ: Humana Press, 2009, pp. 267–285.
- [285] H. Guo *et al.*, "The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma," *J. Genet. Genomics*, vol. 42, no. 7, pp. 343–353, Jul. 2015.
- [286] C. A. Philip *et al.*, "Inhibition of PI3K-AKT-mTOR pathway sensitizes endometrial cancer cell lines to PARP inhibitors," *BMC Cancer*, vol. 17, no. 1, p. 638, Sep. 2017.
- [287] F. M. Foster, C. J. Traer, S. M. Abraham, and M. J. Fry, "The phosphoinositide (PI) 3-kinase family," *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. 15, pp. 3037–3040, Mar. 2003.
- [288] M. Toulany *et al.*, "Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 13, pp. 4119–4126, Jul. 2006.
- [289] G. D. Kao, Z. Jiang, A. M. Fernandes, A. K. Gupta, and A. Maity, "Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 29, pp. 21206–21212, Jul. 2007.
- [290] E. Fayard, G. Xue, A. Parcellier, L. Bozulic, and B. A. Hemmings, "Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway," in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 346, no. 1, Springer, Berlin, Heidelberg, 2010, pp. 31–56.
- [291] M. Toulany *et al.*, "Akt1 and Akt3 but not Akt2 through interaction with DNA-PKcs stimulate proliferation and post-irradiation cell survival of K-RAS-mutated cancer cells," *Cell Death Discov.*, vol. 3, no. 1, p. 17072, Dec. 2017.
- [292] L. F. Povirk, R. Z. Zhou, D. A. Ramsden, S. P. Lees-Miller, and K. Valerie, "Phosphorylation in the serine/threonine 2609-2647 cluster promotes but is not essential for DNA-dependent protein kinase-mediated nonhomologous end joining in human whole-cell extracts," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 12, pp. 3869–3878, Jun. 2007.
- [293] P. Liu *et al.*, "Akt-mediated phosphorylation of XLF impairs non-homologous end-joining DNA repair," *Mol. Cell*, vol. 57, no. 4, pp. 648–

- 661, Feb. 2015.
- [294] K. Mueck, S. Rebholz, M. D. Harati, H. P. Rodemann, and M. Toulany, "Akt1 stimulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks in a Rad51-dependent manner," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 11, Nov. 2017.
- [295] I. Plo, C. Laulier, L. Gauthier, F. Lebrun, F. Calvo, and B. S. Lopez, "AKT1 inhibits homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of BRCA1 and RAD5," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 22, pp. 9404–9412, Nov. 2008.
- [296] J. K. Guirouilh-Barbat, T. Wilhelm, and B. S. Lopez, "AKT1/BRCA1 in the control of homologous recombination and genetic stability: the missing link between hereditary and sporadic breast cancers," *Oncotarget*, vol. 1, no. 8, pp. 691–699, 2010.
- [297] A. Collin de l'Hortet, H. Gilgenkrantz, and J.-E. Guidotti, "EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration," *Int. J. Hepatol.*, vol. 2012, pp. 1–9, 2012.
- [298] A. Tomas, C. E. Futter, and E. R. Eden, "EGF receptor trafficking: Consequences for signaling and cancer," *Trends Cell Biol.*, vol. 24, no. 1, pp. 26–34, Jan. 2014.
- [299] V. L. Bodiga, S. Thokala, P. K. Vemuri, and S. Bodiga, "Zinc pyrithione inhibits caspase-3 activity, promotes ErbB1-ErbB2 heterodimerization and suppresses ErbB2 downregulation in cardiomyocytes subjected to ischemia/reperfusion," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 153, pp. 49–59, Dec. 2015.
- [300] K. J. Kurppa, K. Denessiouk, M. S. Johnson, and K. Elenius, "Activating ERBB4 mutations in non-small cell lung cancer," *Oncogene*, vol. 35, no. 10, pp. 1283–1291, Mar. 2016.
- [301] C. Wallasch, F. Ulrich Weiß, G. Niederfellner, B. Jallal, W. Issing, and A. Ullrich, "Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3," *EMBO J.*, vol. 14, no. 17, pp. 4267–4275, Sep. 1995.
- [302] A. Guo *et al.*, "Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 2, pp. 692–697, 2008.
- [303] J. Riedemann, M. Takiguchi, M. Sohail, and V. M. Macaulay, "The EGF receptor interacts with the type 1 IGF receptor and regulates its stability," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 355, no. 3, pp. 707–714, 2007.
- [304] P. Maggiora *et al.*, "The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness," *Exp. Cell Res.*, vol. 288, no. 2, pp. 382–389, Aug. 2003.
- [305] K. L. Mueller, L. A. Hunter, S. P. Ethier, and J. L. Boerner, "Met and c-Src cooperate to compensate for loss of epidermal growth factor receptor kinase activity in breast cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 9, pp. 3314–3322, May 2008.
- [306] K. L. Mueller, Z. Q. Yang, R. Haddad, S. P. Ethier, and J. L. Boerner, "EGFR/Met association regulates EGFR TKI resistance in breast cancer," *J. Mol. Signal.*, vol. 5, p. 8, Jul. 2010.
- [307] F. Morgillo, J. K. Woo, E. S. Kim, W. K. Hong, and H. Y. Lee, "Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 20, pp. 10100–10111, Oct. 2006.
- [308] M. Toulany, "Targeting DNA double-strand break repair pathways to improve radiotherapy response," *Genes*, vol. 10, no. 1. MDPI AG, 01-Jan-2019.
- [309] G. Carpenter and H. J. Liao, "Receptor tyrosine kinases in the nucleus," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 10, p. a008979, Oct. 2013.
- [310] L. Myllynen *et al.*, "In tumor cells regulation of DNA double strand break repair through EGF receptor involves both NHEJ and HR and is independent of p53 and K-Ras status," *Radiother. Oncol.*, vol. 101, no. 1, pp. 147–151, Oct. 2011.
- [311] K. Kryeziu *et al.*, "Synergistic anticancer activity of arsenic trioxide with erlotinib is based on inhibition of EGFR-mediated DNA double-strand break repair," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 12, no. 6, pp. 1073–1084, 2013.
- [312] J. C. Ko, J. H. Hong, L. H. Wang, and Y. W. Lin, *The role of repair protein Rad51 in synergistic cytotoxicity and mutagenicity induced by epidermal growth factor receptor inhibitor (Gefitinib, IressaR) and benzo[a]pyrene in human lung cancer*, vol. 314, no. 8. Academic Press Inc., 2008, pp. 1881–1891.
- [313] B. J. Friedman *et al.*, "Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 209–218, 2006.
- [314] V. A. O. Silva *et al.*, "Rapid diminution in the level and activity of DNA-dependent protein kinase in cancer cells by a reactive nitro-benzoxadiazole compound," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 5, pp. 1–16, 2016.
- [315] X. Wang, Y. Gu, H. Liu, L. Shi, and X. Sun, "Icotinib hydrochloride enhances chemo- and radiosensitivity by inhibiting EGFR signaling and attenuating RAD51 expression and function in hela S3 cells," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 11, pp. 1245–1258, 2018.
- [316] S. Nowsheen, T. Cooper, J. A. Stanley, and E. S. Yang, "Synthetic Lethal Interactions between EGFR and PARP Inhibition in Human Triple Negative Breast Cancer Cells," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, 2012.
- [317] K. Dittmann *et al.*, "Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 35, pp. 31182–31189, 2005.
- [318] S. Nowsheen *et al.*, "Cetuximab augments cytotoxicity with poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition in head and neck cancer," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, 2011.
- [319] M. Saki *et al.*, "EGFR mutations compromise hypoxia-associated radiation resistance through impaired replication fork-associated DNA damage repair," *Mol. Cancer Res.*, vol. 15, no. 11, pp. 1503–1516, 2017.
- [320] X. Zhong *et al.*, "Rad51 in regulating the radiosensitivity of non-small cell lung cancer with different epidermal growth factor receptor mutation status," *Thorac. Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 50–60, 2016.
- [321] A. K. Das *et al.*, *Somatic mutations in the tyrosine kinase domain of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) abrogate EGFR-mediated radioprotection in non-small cell lung carcinoma*, vol. 67, no. 11. 2007, pp. 5267–5274.
- [322] C. M. Cabello *et al.*, "Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection," *Nat. Med.*, vol. 46, no. 2, pp. 220–231, 2010.
- [323] Y. cai Zhu *et al.*, "EGFR-RAD51 fusion variant in lung adenocarcinoma and response to erlotinib: A case report," *Lung Cancer*, vol. 115, pp. 131–134, Jan. 2018.
- [324] K. Konduri *et al.*, "EGFR fusions as novel therapeutic targets in lung cancer," *Cancer Discov.*, vol. 6, no. 6, pp. 601–611, Jun. 2016.
- [325] A. Craparo, R. Freund, and T. A. Gustafson, "14-3-3 (ϵ) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 17, pp. 11663–11669, 1997.
- [326] S. Parvaresch, T. Yesilkaya, K. Baer, H. Al-Hasani, and H. W. Klein, "14-3-3 Binding to the IGF-1 receptor is mediated by serine autophosphorylation," *FEBS Lett.*, vol. 532, no. 3, pp. 357–362, 2002.
- [327] A. Waraky *et al.*, "Nuclear insulin-like growth factor 1 receptor phosphorylates proliferating cell nuclear antigen and rescues stalled replication forks after DNA damage," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 44, pp. 18227–18239, 2017.
- [328] M. Guerard *et al.*, "Nuclear translocation of IGF1R by intracellular amphiregulin contributes to the resistance of lung tumour cells to EGFR-TKI," *Cancer Lett.*, vol. 420, pp. 146–155, 2018.

- [329] Y. Wang *et al.*, "Inhibition of Both EGFR and IGF1R Sensitized Prostate Cancer Cells to Radiation by Synergistic Suppression of DNA Homologous Recombination Repair," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, 2013.
- [330] R. Oberthür *et al.*, *Simultaneous inhibition of IGF1R and EGFR enhances the efficacy of standard treatment for colorectal cancer by the impairment of DNA repair and the induction of cell death*, vol. 407. Elsevier Ireland Ltd, 2017, pp. 93–105.
- [331] S. Venkatachalam, E. Mettler, C. Fottner, M. Miederer, B. Kaina, and M. M. Weber, "The impact of the IGF-1 system of cancer cells on radiation response – An in vitro study," *Clin. Transl. Radiat. Oncol.*, vol. 7, pp. 1–8, 2017.
- [332] M. M. Chitnis, K. A. Lodhia, T. Aleksic, S. Gao, A. S. Protheroe, and V. M. Macaulay, "IGF-1R inhibition enhances radiosensitivity and delays double-strand break repair by both non-homologous end-joining and homologous recombination," *Oncogene*, vol. 33, no. 45, pp. 5262–5273, 2014.
- [333] K. A. Lodhia, S. Gao, T. Aleksic, F. Esashi, and V. M. Macaulay, "Suppression of homologous recombination sensitizes human tumor cells to IGF-1R inhibition," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 12, pp. 2961–2966, 2015.
- [334] M. M. Loesch *et al.*, "Insulin-like growth factor-1 receptor regulates repair of ultraviolet B-induced DNA damage in human keratinocytes in vivo," *Mol. Oncol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1245–1254, 2016.
- [335] N. G. Manila, A. Kaida, K. ichi Nakahama, and M. Miura, "Insulin-like growth factor I receptor regulates the radiation-induced G2/M checkpoint in HeLa cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 503, no. 4, pp. 2977–2983, 2018.
- [336] X. Liu *et al.*, *Insulin-like growth factor-1 receptor knockdown enhances radiosensitivity via the HIF-1 α pathway and attenuates ATM/H2AX/53BP1 DNA repair activation in human lung squamous carcinoma cells*, vol. 16, no. 1. Spandidos Publications, 2018, pp. 1332–1340.
- [337] S. Peretz, R. Jensen, R. Baserga, and P. M. Glazer, "ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 4, pp. 1676–1681, 2001.
- [338] V. M. Macaulay, A. J. Salisbury, E. A. Bohula, M. P. Playford, N. I. Smorodinsky, and Y. Shiloh, *Downregulation of the type 1 insulin-like growth factor receptor in mouse melanoma cells is associated with enhanced radiosensitivity and impaired activation of Atm kinase*, vol. 20, no. 30. 2001, pp. 4029–4040.
- [339] J. Trojaneek *et al.*, "Role of the Insulin-Like Growth Factor I/Insulin Receptor Substrate 1 Axis in Rad51 Trafficking and DNA Repair by Homologous Recombination," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 21, pp. 7510–7524, 2003.
- [340] S. Yang *et al.*, "Activated IGF-1R inhibits hyperglycemia-induced DNA damage and promotes DNA repair by homologous recombination," *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 289, no. 5 58-5, pp. F1144–F1152, 2005.
- [341] H. Y. Chang *et al.*, "Hypoxia promotes nuclear translocation and transcriptional function in the oncogenic tyrosine kinase RON," *Cancer Res.*, vol. 74, no. 16, pp. 4549–4562, 2014.
- [342] H. Y. Chang *et al.*, "RON nuclear translocation under hypoxia potentiates chemoresistance to DNA double-strand break-inducing anticancer drugs," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 15, no. 2, pp. 276–286, 2016.
- [343] C. S. Cooper *et al.*, "Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line," *Nature*, vol. 311, no. 5981, pp. 29–33, 1984.
- [344] M. Park *et al.*, "Mechanism of met oncogene activation," *Cell*, vol. 45, no. 6, pp. 895–904, Jun. 1986.
- [345] G. A. Rodrigues and M. Park, "Dimerization mediated through a leucine zipper activates the oncogenic potential of the met receptor tyrosine kinase," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, no. 11, pp. 6711–6722, 1993.
- [346] J. C. Lin, M. Naujokas, H. Zhu, S. Nolet, and M. Park, "Intron-exon structure of the MET gene and cloning of an alternatively-spliced Met isoform reveals frequent exon-skipping of a single large internal exon," *Oncogene*, vol. 16, no. 7, pp. 833–842, Feb. 1998.
- [347] P. R. Tempest, C. S. Cooper, and G. N. Major, "The activated human met gene encodes a protein tyrosine kinase," *FEBS Lett.*, vol. 209, no. 2, pp. 357–361, Dec. 1986.
- [348] M. Komada, K. Hatsuzawa, S. Shibamoto, F. Ito, K. Nakayama, and N. Kitamura, "Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin," *FEBS Lett.*, vol. 328, no. 1–2, pp. 25–29, Aug. 1993.
- [349] S. Giordano, M. F. Di Renzo, R. P. Narsimhan, C. S. Cooper, C. Rosa, and P. M. Comoglio, "Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene," *Oncogene*, vol. 4, no. 11, pp. 1383–1388, 1989.
- [350] E. Gherardi *et al.*, "Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 21, pp. 12039–12044, Oct. 2003.
- [351] P. R. Tempest, M. R. Stratton, and C. S. Cooper, "Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumour cell lines," *Br. J. Cancer*, vol. 58, no. 1, pp. 3–7, 1988.
- [352] S. Benvenuti and P. M. Comoglio, "The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 213, no. 2, pp. 316–325, Nov-2007.
- [353] C. Birchmeier, W. Birchmeier, E. Gherardi, and G. F. Vande Woude, "Met, metastasis, motility and more," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4, no. 12, pp. 915–925, Dec-2003.
- [354] H. H. Niemann, "Structural insights into Met receptor activation," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 90, no. 11, pp. 972–981, 2011.
- [355] N. Schiering *et al.*, "Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 22, pp. 12654–12659, 2003.
- [356] T. Nakamura, K. Nawa, and A. Ichihara, "Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 122, no. 3, pp. 1450–1459, Aug. 1984.
- [357] M. Stoker, E. Gherardi, M. Perryman, and J. Gray, "Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility," *Nature*, vol. 327, no. 6119, pp. 239–242, 1987.
- [358] K. M. Weidner *et al.*, "Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 16, pp. 7001–7005, 1991.
- [359] T. Seid, M. Hagiya, M. Shimonishi, T. Nakamura, and S. Shimizu, "Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene," *Gene*, vol. 102, no. 2, pp. 213–219, Jun. 1991.
- [360] J. A. García-Vilas and M. Á. Medina, "Updates on the hepatocyte growth factor/c-Met axis in hepatocellular carcinoma and its therapeutic implications," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 24, no. 33. Baishideng Publishing Group Co., Limited, pp. 3695–3706, 07-Sep-2018.
- [361] M. Lyon, J. A. Deakin, K. Mizuno, T. Nakamura, and J. T. Gallagher, "Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants," 1994.
- [362] L. Naldini *et al.*, "Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor," *EMBO J.*, vol. 11, no. 13, pp. 4825–4833, Dec. 1992.
- [363] E. Gherardi, W. Birchmeier, C. Birchmeier, and G. Vande Woude, "Targeting MET in cancer: Rationale and progress," *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, no. 2, pp. 89–103, Feb-2012.
- [364] G. Hartmann *et al.*, "A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and

- induces cell dissociation but not mitogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 23, pp. 11574–11578, 1992.
- [365] J. Stamos, R. A. Lazarus, X. Yao, D. Kirchhofer, and C. Wiesmann, "Crystal structure of the HGF β -chain in complex with the Sema domain of the Met receptor," *EMBO J.*, vol. 23, no. 12, pp. 2325–2335, 2004.
- [366] A. G. Sigurdardottir *et al.*, "Exploring the chemical space of the lysine-binding pocket of the first kringle domain of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) yields a new class of inhibitors of HGF/SF-MET binding," *Chem. Sci.*, vol. 6, no. 11, pp. 6147–6157, Jul. 2015.
- [367] E. Gherardi *et al.*, "Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 11, pp. 4046–4051, Mar. 2006.
- [368] C. Basilico, A. Arnesano, M. Galluzzo, P. M. Comoglio, and P. Michieli, "A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of met," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 30, pp. 21267–21277, Jul. 2008.
- [369] P. Michieli *et al.*, "Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor," *Cancer Cell*, vol. 6, no. 1, pp. 61–73, Jul. 2004.
- [370] N. A. Lokker *et al.*, "Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: Identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding," *EMBO J.*, vol. 11, no. 7, pp. 2503–2510, Jul. 1992.
- [371] P. Longati, A. Bardelli, C. Ponzetto, L. Naldini, and P. M. Comoglio, "Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor)," *Oncogene*, vol. 9, no. 1, pp. 49–57, Jan. 1994.
- [372] A. Bardelli, C. Ponzetto, and P. M. Comoglio, "Identification of functional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering," *J. Biotechnol.*, vol. 37, no. 2, pp. 109–122, 1994.
- [373] R. Ferracini, P. Longati, L. Naldini, E. Vigna, and P. M. Comoglio, "Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 29, pp. 19558–19564, 1991.
- [374] C. Ponzetto *et al.*, "A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family," *Cell*, vol. 77, no. 2, pp. 261–271, Apr. 1994.
- [375] L. Gandino, P. Longati, E. Medico, M. Prat, and P. M. Comoglio, "Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 3, pp. 1815–1820, 1994.
- [376] V. Sangwan *et al.*, "Regulation of the met receptor-tyrosine kinase by the protein-tyrosine phosphatase 1B and T-cell phosphatase," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 49, pp. 34374–34383, 2008.
- [377] Y. Xu *et al.*, "Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase β (RPTP- β) directly dephosphorylates and regulates Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR/Met) function," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 18, pp. 15980–15988, May 2011.
- [378] H. L. Palka, M. Park, and N. K. Tonks, "Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase Met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 8, pp. 5728–5735, 2003.
- [379] K. Catlow *et al.*, "Hepatocyte growth factor/scatter factor and its interaction with heparan sulphate and dermatan sulphate," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 31, no. 2, pp. 352–353, Apr. 2003.
- [380] A. Tate *et al.*, "Met-independent Hepatocyte Growth Factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells," *BMC Cancer*, vol. 6, p. 197, Jul. 2006.
- [381] H. Ponta, L. Sherman, and P. A. Herrlich, "CD44: From adhesion molecules to signalling regulators," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4, no. 1, pp. 33–45, 01-Jan-2003.
- [382] R. Van Der Voort *et al.*, "Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 10, pp. 6499–6506, Mar. 1999.
- [383] V. J. M. Wielenga *et al.*, "Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer," *Am. J. Pathol.*, vol. 157, no. 5, pp. 1563–1573, Nov. 2000.
- [384] A. Matzke *et al.*, "Haploinsufficiency of c-Met in cd44^{-/-} Mice Identifies a Collaboration of CD44 and c-Met In Vivo," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 24, pp. 8797–8806, Dec. 2007.
- [385] P. M. Comoglio, C. Boccaccio, and L. Trusolino, "Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: Breaking the rules," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 15, no. 5, Elsevier Ltd, pp. 565–571, 01-Oct-2003.
- [386] A. Bertotti, P. M. Comoglio, and L. Trusolino, " β 4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth," *J. Cell Biol.*, vol. 175, no. 6, pp. 993–1003, Dec. 2006.
- [387] K. Wilhelmson, S. H. M. Litjens, and A. Sonnenberg, "Multiple Functions of the Integrin α 6 β 4 in Epidermal Homeostasis and Tumorigenesis," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 8, pp. 2877–2886, Apr. 2006.
- [388] S. Hiscox and W. G. Jiang, "Association of the HGF/SF receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 261, no. 2, pp. 406–411, Aug. 1999.
- [389] G. Reshetnikova, S. Troyanovsky, and D. L. Rimm, "Definition of a direct extracellular interaction between Met and E-cadherin," *Cell Biol. Int.*, vol. 31, no. 4 SPEC. ISS., pp. 366–373, Apr. 2007.
- [390] G. Muharram *et al.*, "Tensin-4-dependent MET stabilization is essential for survival and proliferation in carcinoma cells," *Dev. Cell*, vol. 29, no. 4, pp. 421–436, May 2014.
- [391] E. Gherardi, C. A. Love, R. M. Esnouf, and E. Y. Jones, "The sema domain," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 14, no. 6, pp. 669–678, Dec-2004.
- [392] G. Neufeld, A. D. Sabag, N. Rabinovicz, and O. Kessler, "Semaphorins in angiogenesis and tumor progression," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 1, p. a006718, Jan. 2012.
- [393] P. Conrotto *et al.*, "Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1," *Blood*, vol. 105, no. 11, pp. 4321–4329, Jun. 2005.
- [394] P. Conrotto, S. Corso, S. Gamberini, P. M. Comoglio, and S. Giordano, "Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth," *Oncogene*, vol. 23, no. 30, pp. 5131–5137, Jul. 2004.
- [395] G. Valente *et al.*, "Co-expression of plexin-B1 and Met in human breast and ovary tumours enhances the risk of progression," *Cell. Oncol.*, vol. 31, no. 6, pp. 423–436, 2009.
- [396] L. Stevens, L. McClelland, A. Fricke, M. Williamson, I. Kuo, and G. Scott, "Plexin B1 suppresses c-met in melanoma: A role for plexin B1 as a tumor-suppressor protein through regulation of c-met," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 130, no. 6, pp. 1636–1645, Jun. 2010.
- [397] J. Soong and G. Scott, "Plexin B1 inhibits MET through direct association and regulates Shp2 expression in melanocytes," *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. 2, pp. 688–695, Jan. 2013.
- [398] J. Soong, Y. Chen, E. M. Shustef, and G. A. Scott, "Sema4D, the ligand for plexin B1, suppresses C-met activation and migration and promotes melanocyte survival and growth," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 132, no. 4, pp. 1230–1238, 2012.
- [399] X. Wang *et al.*, "A mechanism of cell survival: Sequestration of Fas by the HGF receptor Met," *Mol. Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 411–421, 2002.

- [400] L. A. Smyth and H. J. M. Brady, "cMet and Fas receptor interaction inhibits death-inducing signaling complex formation in endothelial cells," *Hypertension*, vol. 46, no. 1, pp. 100–106, Jul. 2005.
- [401] A. Follenzi, S. Bakovic, P. Gual, M. C. Stella, P. Longati, and P. M. Comoglio, "Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron," *Oncogene*, vol. 19, no. 27, pp. 3041–3049, Jun. 2000.
- [402] W. Y. Lee, H. H. W. Chen, N. H. Chow, W. C. Su, P. W. Lin, and H. R. Guo, "Prognostic significance of co-expression of RON and MET receptors in node-negative breast cancer patients," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 6, pp. 2222–2228, Mar. 2005.
- [403] A. Popsueva *et al.*, "GDNF promotes tubulogenesis of GFR α 1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase," *Journal of Cell Biology*, 14-Apr-2003. [Online]. Available: <https://rupress.org/jcb/article/161/1/119/33299/GDNF-promotes-tubulogenesis-of-GFR-1-expressing>. [Accessed: 06-Apr-2020].
- [404] A. Varkaris *et al.*, "Ligand-independent activation of MET through IGF-1/IGF-1R signaling," *Int. J. Cancer*, vol. 133, no. 7, pp. 1536–1546, Oct. 2013.
- [405] P. H. Huang *et al.*, "Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 31, pp. 12867–12872, Jul. 2007.
- [406] M. Jo, D. B. Stolz, J. E. Esplen, K. Dorko, G. K. Michalopoulos, and S. C. Strom, "Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 12, pp. 8806–8811, Mar. 2000.
- [407] A. Z. Lai, J. V. Abella, and M. Park, "Crosstalk in Met receptor oncogenesis," *Trends Cell Biol.*, vol. 19, no. 10, pp. 542–551, Oct. 2009.
- [408] Z. Zhang, S. Yang, and Q. Wang, "Impact of MET alterations on targeted therapy with EGFR-tyrosine kinase inhibitors for EGFR-mutant lung cancer," *Biomarker Research*, vol. 7, no. 1. BioMed Central Ltd., 21-Nov-2019.
- [409] T. W. Bauer *et al.*, "Regulatory role of c-Met in insulin-like growth factor-I receptor - Mediated migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 7, pp. 1676–1682, Jul. 2006.
- [410] S. Salian-Mehta, M. Xu, and M. E. Wierman, "AXL and MET crosstalk to promote gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuronal cell migration and survival," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 374, no. 1–2, pp. 92–100, Jul. 2013.
- [411] H. Zhu, M. A. Naujokas, E. D. Fixman, K. Torossian, and M. Park, "Tyrosine 1356 in the carboxyl-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 47, pp. 29943–29948, 1994.
- [412] F. Maina *et al.*, "Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development," *Cell*, vol. 87, no. 3, pp. 531–542, Nov. 1996.
- [413] C. Boccaccio *et al.*, "Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway," *Nature*, vol. 391, no. 6664, pp. 285–288, 1998.
- [414] E. D. Fixman, T. M. Fournier, D. M. Kamikura, M. A. Naujokas, and M. Park, "Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the Tpr-Met oncoprotein," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 22, pp. 13116–13122, May 1996.
- [415] U. Schaefer, N. H. Gehring, K. P. Fuchs, M. Sachs, B. Kempkes, and W. Birchmeier, "Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses," *J. Cell Biol.*, vol. 149, no. 7, pp. 1419–1432, Jun. 2000.
- [416] K. M. Weidner, S. Di Cesare, M. Sachs, V. Brinkmann, J. Behrens, and W. Birchmeier, "Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis," *Nature*, vol. 384, no. 6605, pp. 173–176, 1996.
- [417] E. D. Fixman *et al.*, "Efficient cellular transformation by the Met oncoprotein requires a functional Grb2 binding site and correlates with phosphorylation of the Grb2-associated proteins, Cb1 and Gab1," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 32, pp. 20167–20172, Aug. 1997.
- [418] M. Garcia-Guzman, F. Dolfi, K. Zeh, and K. Vuori, "Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1-Crk signaling complex formation," *Oncogene*, vol. 18, no. 54, pp. 7775–7786, Dec. 1999.
- [419] L. S. Lock, I. Royal, M. A. Naujokas, and M. Park, "Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 40, pp. 31536–31545, Oct. 2000.
- [420] L. S. Lock, M. M. Frigault, C. Saucier, and M. Park, "Grb2-independent recruitment of Gab1 requires the C-terminal lobe and structural integrity of the met receptor kinase domain," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 32, pp. 30083–30090, Aug. 2003.
- [421] G. Pellicci *et al.*, "The mitogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein," *Oncogene*, vol. 10, no. 8, pp. 1631–1638, 1995.
- [422] L. Ménard, P. J. Parker, and S. Kermorgant, "Receptor tyrosine kinase c-Met controls the cytoskeleton from different endosomes via different pathways," *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–14, May 2014.
- [423] A. Palamidessi *et al.*, "Endocytic Trafficking of Rac Is Required for the Spatial Restriction of Signaling in Cell Migration," *Cell*, vol. 134, no. 1, pp. 135–147, Jul. 2008.
- [424] S. Kermorgant and P. J. Parker, "c-Met signalling: Spatio-temporal decisions," *Cell Cycle*, vol. 4, no. 3. Taylor and Francis Inc., pp. 352–355, 2005.
- [425] Z. X. Liu, C. F. Yu, C. Nickel, S. Thomas, and L. G. Cantley, "Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 12, pp. 10452–10458, Mar. 2002.
- [426] E. Matteucci, P. Bendinelli, and M. A. Desiderio, "Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 6, pp. 937–945, 2009.
- [427] L. Trusolino and P. M. Comoglio, "Scatter-factor and semaphorin receptors: Cell signalling for invasive growth," *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 4. pp. 289–300, Apr-2002.
- [428] S. Potempa and A. J. Ridley, "Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly," *Mol. Biol. Cell*, vol. 9, no. 8, pp. 2185–2200, 1998.
- [429] A. J. Ridley, P. M. Comoglio, and A. Hall, "Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 1110–1122, Feb. 1995.
- [430] A. Monvoisin *et al.*, "Direct evidence that hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells is mediated by urokinase," *J. Hepatol.*, vol. 30, no. 3, pp. 511–518, 1999.
- [431] G.-H. Xiao, "Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 1, pp. 247–252, Jan. 2001.
- [432] Q. Zeng *et al.*, "Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NF κ B," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 28, pp. 25203–25208, Jul. 2002.
- [433] A. Weber *et al.*, "Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice," *Hepatology*, vol. 51, no. 4, pp. 1226–1236, Apr. 2010.
- [434] C. Schmidt *et al.*, "Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development," *Nature*, vol. 373, no. 6516, pp. 699–702, Feb. 1995.
- [435] C. Birchmeier and E. Gherardi, "Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-met tyrosine kinase," *Trends in Cell Biology*, vol. 8, no. 10. Elsevier Ltd, pp. 404–410, 01-Oct-1998.

- [436] F. Bladt, D. Riethmacher, S. Isenmann, A. Aguzzi, and C. Birchmeier, "Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud," *Nature*, vol. 376, no. 6543, pp. 768–771, 1995.
- [437] E. Andermarcher, M. A. Surani, and E. Gherardi, "Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis," *Dev. Genet.*, vol. 18, no. 3, pp. 254–266, 1996.
- [438] E. Sonnenberg, D. Meyer, K. M. Weidner, and C. Birchmeier, "Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development," *J. Cell Biol.*, vol. 123, no. 1, pp. 223–235, 1993.
- [439] C. Prunotto *et al.*, "Analysis of Mlc-lacZ met mutants highlights the essential function of met for migratory precursors of hypaxial muscles and reveals a role for met in the development of hyoid arch-derived facial muscles," *Dev. Dyn.*, vol. 231, no. 3, pp. 582–591, Nov. 2004.
- [440] S. Ishibe *et al.*, "Met and the epidermal growth factor receptor act cooperatively to regulate final nephron number and maintain collecting duct morphology," *Development*, vol. 136, no. 2, pp. 337–345, Jan. 2009.
- [441] F. Maina, M. C. Hilton, C. Ponzetto, A. M. Davies, and R. Klein, "Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons," *Genes Dev.*, vol. 11, no. 24, pp. 3341–3350, Dec. 1997.
- [442] G. J. Martins, M. Shahrokhi, and E. M. Powell, "Genetic disruption of Met signaling impairs GABAergic striatal development and cognition," *Neuroscience*, vol. 176, pp. 199–209, Mar. 2011.
- [443] D. B. Campbell *et al.*, "A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 45, pp. 16834–16839, Nov. 2006.
- [444] Y. Peng, M. Huentelman, C. Smith, and S. Qiu, "MET receptor tyrosine kinase as an autism genetic risk factor," in *International Review of Neurobiology*, vol. 113, Academic Press Inc., 2013, pp. 135–165.
- [445] M. Prat, T. Crepaldi, L. Gandino, S. Giordano, P. Longati, and P. Comoglio, "C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 11, no. 12, pp. 5954–5962, Dec. 1991.
- [446] M. F. Di Renzo *et al.*, "Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues," *Oncogene*, vol. 6, no. 11, pp. 1997–2003, 1991.
- [447] F. Bussolino *et al.*, "Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth," *J. Cell Biol.*, vol. 119, no. 3, pp. 629–641, 1992.
- [448] T. E. I. Taher, E. P. M. Tjin, E. A. Beuling, J. Borst, M. Spaargaren, and S. T. Pals, "c-Cbl Is Involved in Met Signaling in B Cells and Mediates Hepatocyte Growth Factor-Induced Receptor Ubiquitination," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 7, pp. 3793–3800, Oct. 2002.
- [449] C. G. Huh, V. M. Factor, A. Sánchez, K. Uchida, E. A. Conner, and S. S. Thorgeirsson, "Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 13, pp. 4477–4482, Mar. 2004.
- [450] J. Chmielowiec *et al.*, "c-Met is essential for wound healing in the skin," *J. Cell Biol.*, vol. 177, no. 1, pp. 151–162, Apr. 2007.
- [451] S. Mizuno, K. Matsumoto, and T. Nakamura, "HGF as a renoprotective and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease," *Front. Biosci.*, vol. 13, no. 18, pp. 7072–7086, May 2008.
- [452] H. Ohmichi, K. Matsumoto, and T. Nakamura, "In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: Pulmotrophic role in lung regeneration," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 270, no. 6, pp. 14–6, Jun. 1996.
- [453] M. Shimamura, N. Sato, M. Sata, K. Wakayama, T. Ogihara, and R. Morishita, "Expression of hepatocyte growth factor and c-Met after spinal cord injury in rats," *Brain Res.*, vol. 1151, no. 1, pp. 188–194, Sep. 2007.
- [454] L. Schmidt *et al.*, "Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas," *Oncogene*, vol. 18, no. 14, pp. 2343–2350, Apr. 1999.
- [455] M. Tokunou *et al.*, "c-MET expression in myfibroblasts: Role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma," *Am. J. Pathol.*, vol. 158, no. 4, pp. 1451–1463, Apr. 2001.
- [456] M. Jeffers *et al.*, "Activating mutations for the Met tyrosine kinase receptor in human cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 21, pp. 11445–11450, Oct. 1997.
- [457] L. Schmidt *et al.*, "Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas," *Nat. Genet.*, vol. 16, no. 1, pp. 68–73, 1997.
- [458] F. Chiara, P. Michieli, L. Pugliese, and P. M. Comoglio, "Mutations in the met oncogene unveil a 'dual switch' mechanism controlling tyrosine kinase activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 31, pp. 29352–29358, Aug. 2003.
- [459] C. Cristiani *et al.*, "Regulation of the wild-type and Y1235D mutant met kinase activation," *Biochemistry*, vol. 44, no. 43, pp. 14110–14119, Nov. 2005.
- [460] M. Kong-Beltran *et al.*, "Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of Met in lung cancer," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 1, pp. 283–289, Jan. 2006.
- [461] Y. Asaoka *et al.*, "Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 394, no. 4, pp. 1042–1046, Apr. 2010.
- [462] J. Lee *et al.*, "Gastrointestinal malignancies harbor actionable MET exon 14 deletions," *Oncotarget*, vol. 6, no. 29, pp. 28211–28222, 2015.
- [463] P. C. Ma, E. Schaefer, J. G. Christensen, and R. Salgia, "A selective small molecule c-MET inhibitor, PHA665752, cooperates with rapamycin," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 6, pp. 2312–2319, 2005.
- [464] R. Onozato, T. Kosaka, H. Kuwano, Y. Sekido, Y. Yatabe, and T. Mitsudomi, "Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 4, no. 1, pp. 5–11, Jan. 2009.
- [465] P. Peschard *et al.*, "Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein," *Mol. Cell*, vol. 8, no. 5, pp. 995–1004, Nov. 2001.
- [466] C. Greenman *et al.*, "Patterns of somatic mutation in human cancer genomes," *Nature*, vol. 446, no. 7132, pp. 153–158, Mar. 2007.
- [467] M. G. Ponzio *et al.*, "Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 31, pp. 12903–12908, Aug. 2009.
- [468] R. Wang, L. D. Ferrell, S. Faouzi, J. J. Maher, and J. Michael Bishop, "Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice," *J. Cell Biol.*, vol. 153, no. 5, pp. 1023–1033, May 2001.
- [469] S. Garcia *et al.*, "Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype," *Hum. Pathol.*, vol. 38, no. 6, pp. 830–841, Jun. 2007.
- [470] R. A. D. Ghossein, D. A. Dillon, T. D'Aquila, E. B. Rimm, E. R. Fearon, and D. L. Rimm, "Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma," *Cancer*, vol. 82, no. 8, pp. 1513–1520, Apr. 1998.
- [471] Z. Peng *et al.*, "Prognostic significance of MET amplification and expression in gastric cancer: A systematic review with meta-analysis," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, Jan. 2014.

- [472] G. Gambarotta, C. Boccaccio, S. Giordano, M. Andö, M. C. Stella, and P. M. Comoglio, "Ets up-regulates MET transcription," *Oncogene*, vol. 13, no. 9, pp. 1911–1917, 1996.
- [473] Y. F. Gu *et al.*, "miR-30b and miR-30c expression predicted response to tyrosine kinase inhibitors as first line treatment in non-small cell lung cancer," *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 126, no. 23, pp. 4435–4439, Dec. 2013.
- [474] J. Herrick, X. Michalet, C. Conti, C. Schurra, and A. Bensimon, "Quantifying single gene copy number by measuring fluorescent probe lengths on combed genomic DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 1, pp. 222–227, Jan. 2000.
- [475] L. Toschi and F. Cappuzzo, "Clinical implications of MET gene copy number in lung cancer.," *Future oncology (London, England)*, vol. 6, no. 2, pp. 239–247, Feb-2010.
- [476] Z. S. Zeng *et al.*, "c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases," *Cancer Lett.*, vol. 265, no. 2, pp. 258–269, Jul. 2008.
- [477] I. B. Weinstein and A. Joe, "Oncogene addiction," *Cancer Research*, vol. 68, no. 9, pp. 3077–3080, 01-May-2008.
- [478] G. V. Scagliotti, S. Novello, and J. von Pawel, "The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 39, no. 7, pp. 793–801, Nov-2013.
- [479] J. G. Christensen *et al.*, "A Selective Small Molecule Inhibitor of c-Met Kinase Inhibits c-Met-Dependent Phenotypes in Vitro and Exhibits Cytoreductive Antitumor Activity in Vivo," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 21, pp. 7345–7355, Nov. 2003.
- [480] G. A. Smolen *et al.*, "Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 7, pp. 2316–2321, Feb. 2006.
- [481] U. McDermott *et al.*, "Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 50, pp. 19936–19941, Dec. 2007.
- [482] A. Bertotti *et al.*, "Only a subset of met-activated pathways are required to sustain oncogene addiction," *Sci. Signal.*, vol. 2, no. 100, p. ra80, Dec. 2009.
- [483] M. Niki *et al.*, "Serum human hepatocyte growth factor (hHGF) is elevated in patients with metastatic gastric carcinoma," *Hepatogastroenterology.*, vol. 45, no. 24, pp. 2458–2463, 1998.
- [484] J. M. Siegfried, L. A. Weissfeld, P. Singh-Kaw, R. J. Weyant, J. R. Testa, and R. J. Landreneau, "Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 3, pp. 433–439, 1997.
- [485] Y. Toyama, C. Miki, Y. Inoue, Y. Okugawa, K. Tanaka, and M. Kusunoki, "Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients," *Int. J. Cancer*, vol. 125, no. 7, pp. 1657–1662, Oct. 2009.
- [486] S. Shin, M. Ogawa, S. I. Yamashita, K. Nomura, M. Kuramoto, and T. Saishoji, "Immunoreactive Hepatocyte Growth Factor Is a Strong and Independent Predictor of Recurrence and Survival in Human Breast Cancer," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 7, pp. 1630–1633, 1994.
- [487] H. Takayama *et al.*, "Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 2, pp. 701–706, Jan. 1997.
- [488] M. I. Gallego, B. Bierie, and L. Hennighausen, "Targeted expression of HGF/SF in mouse mammary epithelium leads to metastatic adenocarcinomas through the activation of multiple signal transduction pathways," *Oncogene*, vol. 22, no. 52, pp. 8498–8508, Nov. 2003.
- [489] R. Ferracini *et al.*, "The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit," *Oncogene*, vol. 10, no. 4, pp. 739–749, 1995.
- [490] R. Navab *et al.*, "Co-overexpression of met and hepatocyte growth factor promotes systemic metastasis in NCI-H460 non-small cell lung carcinoma cells," *Neoplasia*, vol. 11, no. 12, pp. 1292–1300, 2009.
- [491] M. Park, H. Park, W. H. Kim, H. Cho, and J. H. Lee, "Presence of autocrine hepatocyte growth factor-Met signaling and its role in proliferation and migration of SNU-484 gastric cancer cell line," *Exp. Mol. Med.*, vol. 37, no. 3, pp. 213–219, Jun. 2005.
- [492] S. Rong, S. Segal, M. Anver, J. H. Resau, and G. F. Vande Woude, "Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 11, pp. 4731–4735, May 1994.
- [493] W. Jiang, S. Hiscox, K. Matsumoto, and T. Nakamura, "Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 29, no. 3, pp. 209–248, Feb. 1999.
- [494] H. Amemiya *et al.*, "c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis," *Oncology*, vol. 63, no. 3, pp. 286–296, 2002.
- [495] G. Cortesina *et al.*, "Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases," *Int. J. Cancer*, vol. 89, no. 3, pp. 286–292, 2000.
- [496] D. Uchida *et al.*, "Role of HGF/C-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance," *Int. J. Cancer*, vol. 93, no. 4, pp. 489–496, Aug. 2001.
- [497] S. Meiners, V. Brinkmann, H. Naundorf, and W. Birchmeier, "Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells," *Oncogene*, vol. 16, no. 1, pp. 9–20, Jan. 1998.
- [498] M. K. Chen *et al.*, "H2O2 induces nuclear transport of the receptor tyrosine kinase c-MET in breast cancer cells via a membrane-bound retrograde trafficking mechanism," *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 21, pp. 8516–8528, 2019.
- [499] Y. Xie *et al.*, "Systematic analysis of NLMP suggests nuclear localization of RTK/MET kinases resemble cancer cell clearance," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 38, no. 1, p. 43, Dec. 2019.
- [500] F. De Bacco *et al.*, "MET inhibition overcomes radiation resistance of glioblastoma stem-like cells," *EMBO Mol. Med.*, vol. 8, no. 5, pp. 550–568, 2016.
- [501] F. De Bacco *et al.*, "Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 103, no. 8, pp. 645–661, 2011.
- [502] G. Z. Chen *et al.*, "Foretinib Enhances the Radiosensitivity in Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Inhibiting Phosphorylation of c-Met," *J. Cancer*, vol. 8, no. 5, pp. 983–992, 2017.
- [503] H. Yu, X. Li, S. Sun, X. Gao, and D. Zhou, "C-Met inhibitor SU11274 enhances the response of the prostate cancer cell line DU145 to ionizing radiation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 427, no. 3, pp. 659–665, 2012.
- [504] M. Medová, D. M. Aebersold, and Y. Zimmer, "MET inhibition in tumor cells by PHA665752 impairs homologous recombination repair of DNA double strand breaks," *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 3, pp. 728–734, 2012.
- [505] J. W. Welsh, D. Mahadevan, R. Ellsworth, L. Cooke, D. Bearss, and B. Stea, "The c-Met receptor tyrosine kinase inhibitor MP470 radiosensitizes glioblastoma cells," *Radiat. Oncol.*, vol. 4, no. 1, p. 69, 2009.
- [506] Y. Du *et al.*, "Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors," *Nat. Med.*, vol. 22, no. 2, pp. 194–201, Feb. 2016.
- [507] A. J. Miles and B. A. Wallace, "Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 39–51, Dec. 2006.
- [508] K. Ito, B. Argunhan, H. Tsubouchi, and H. Iwasaki, "Real-time Observation of the DNA Strand Exchange Reaction Mediated by Rad51,"

- J. Vis. Exp.*, no. 144, p. e59073, Feb. 2019.
- [509] T. Hiratsuka and K. Uchida, "Preparation and properties of 2'(or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate, an analog of adenosine triphosphate," *BBA - Gen. Subj.*, vol. 320, no. 3, pp. 635–647, Oct. 1973.
- [510] M. L. Kilkenny, G. De Piccoli, R. L. Perera, K. Labib, and L. Pellegrini, "A conserved motif in the C-terminal tail of DNA polymerase α tethers primase to the eukaryotic replisome," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 28, pp. 23740–23747, Jul. 2012.
- [511] J. M. Short *et al.*, "High-resolution structure of the presynaptic RAD51 filament on single-stranded DNA by electron cryo-microscopy," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 19, pp. 9017–9030, 2016.
- [512] Y. Xue, F. Zhou, M. Zhu, K. Ahmed, G. Chen, and X. Yao, "GPS: A comprehensive www server for phosphorylation sites prediction," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. SUPPL. 2, 2005.
- [513] H. Horn *et al.*, "KinomeXplorer: An integrated platform for kinome biology studies," *Nature Methods*, vol. 11, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 603–604, 29-May-2014.
- [514] A. Shevchenko, A. Loboda, W. Ens, B. Schraven, K. G. Standing, and A. Shevchenko, "Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry," *Electrophoresis*, vol. 22, no. 6, pp. 1194–1203, Apr. 2001.
- [515] Y. Dai and D. W. Siemann, "Constitutively active c-Met kinase in PC-3 cells is autocrine-independent and can be blocked by the Met kinase inhibitor BMS-777607," *BMC Cancer*, vol. 12, no. 1, p. 198, 2012.
- [516] R. Dulbecco and G. Freeman, "Plaque production by the polyoma virus," *Virology*, vol. 8, no. 3. Virology, pp. 396–397, 1959.
- [517] J. Mössinger, "In vitro cultivation of adult *Litomosoides carinii*: Evaluation of basic culture media, gas phases and supplements," *Parasitology*, vol. 103, no. 1, pp. 85–95, 1991.
- [518] G. E. Moore, R. E. Gerner, and H. A. Franklin, "Culture of Normal Human Leukocytes," *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, vol. 199, no. 8, pp. 519–524, Feb. 1967.
- [519] J. J. Cui *et al.*, "Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK)," *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 18, pp. 6342–6363, Sep. 2011.
- [520] G. M. Schroeder *et al.*, "Discovery of N-(4-(2-amino-3-chloropyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-4-ethoxy-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (BMS-777607), a selective and orally efficacious inhibitor of the met kinase superfamily," *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 5, pp. 1251–1254, Mar. 2009.
- [521] O. Ostling and K. J. Johanson, "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 123, no. 1, pp. 291–298, Aug. 1984.
- [522] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 175, no. 1, pp. 184–191, 1988.
- [523] A. J. Pierce, P. Hu, M. Han, N. Ellis, and M. Jasin, "Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 24, pp. 3237–3242, Dec. 2001.
- [524] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976.
- [525] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [526] H. E. Crosswell *et al.*, "PHA665752, a small-molecule inhibitor of c-Met, inhibits hepatocyte growth factor-stimulated migration and proliferation of c-Met-positive neuroblastoma cells," *BMC Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 411, 2009.
- [527] R. Raggiaschi, S. Gotta, and G. C. Terstappen, "Phosphoproteome analysis," *Biosci. Rep.*, vol. 25, no. 1–2, pp. 33–44, Feb. 2005.
- [528] K. I. Yoshioka, Y. Yumoto-Yoshioka, F. Fleury, and M. Takahashi, "ph- and salt-dependent self-assembly of human Rad51 protein analyzed as fluorescence resonance energy transfer between labeled proteins," *J. Biochem.*, vol. 133, no. 5, pp. 593–597, May 2003.
- [529] Y. Takizawa, T. Kinebuchi, W. Kagawa, S. Yokoyama, T. Shibata, and H. Kurumizaka, "Mutational analyses of the human Rad51-Tyr315 residue, a site for phosphorylation in leukaemia cells," *Genes to Cells*, vol. 9, no. 9, pp. 781–790, Sep. 2004.
- [530] J. Nomme *et al.*, "Inhibition of filament formation of human Rad51 protein by a small peptide derived from the BRC-motif of the BRCA2 protein," *Genes to Cells*, vol. 13, no. 5, pp. 471–481, 2008.
- [531] S. Subramanyam, M. Ismail, I. Bhattacharya, and M. Spies, "Tyrosine phosphorylation stimulates activity of human RAD51 recombinase through altered nucleoprotein filament dynamics," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 41, pp. E6045–E6054, Oct. 2016.
- [532] V. Sakanyan, "High-throughput and multiplexed protein array technology: Protein-DNA and protein-protein interactions," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 815, no. 1–2. Elsevier, pp. 77–95, 05-Feb-2005.
- [533] M. Feron *et al.*, "PTEN contributes to profound PI3K/Akt signaling pathway deregulation in dystrophin-deficient dog muscle," *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 4, pp. 1459–1470, Apr. 2009.
- [534] R. Wiese, Y. Belosludtsev, T. Powdrill, P. Thompson, and M. Hogan, "Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform," 2001.
- [535] F. Lafont *et al.*, "Assessment of DNA-PKcs kinase activity by quantum dot–based microarray," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018.
- [536] L. Dupuy *et al.*, "A highly sensitive near-infrared fluorescent detection method to analyze signalling pathways by reverse-phase protein array," *Proteomics*, vol. 9, no. 24, pp. 5446–5454, Dec. 2009.
- [537] X. Michalet *et al.*, "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics," *Science*, vol. 307, no. 5709. NIH Public Access, pp. 538–544, 28-Jan-2005.
- [538] M. A. Walling, J. A. Novak, and J. R. E. Shepard, "Quantum dots for live cell and in vivo imaging," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 10, no. 2. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), pp. 441–491, Feb-2009.
- [539] Y. Dai and D. W. Siemann, "BMS-777607, a small-molecule Met kinase inhibitor, suppresses hepatocyte growth factor-stimulated prostate cancer metastatic phenotype in vitro," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 9, no. 6, pp. 1554–1561, 2010.
- [540] Y. Dai, K. Bae, C. Pampo, and D. W. Siemann, "Impact of the small molecule Met inhibitor BMS-777607 on the metastatic process in a rodent tumor model with constitutive c-Met activation," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 29, no. 3, pp. 253–261, 2012.
- [541] S. S. Ganapathipillai *et al.*, "Coupling of mutated met variants to DNA repair via Abl and Rad51," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 14, pp. 5769–5777, 2008.
- [542] D. Leiser *et al.*, "Targeting of the MET receptor tyrosine kinase by small molecule inhibitors leads to MET accumulation by impairing the receptor downregulation," *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 5, pp. 653–658, Mar. 2014.
- [543] M. Medová *et al.*, "MET inhibition results in DNA breaks and synergistically sensitizes tumor cells to DNA-damaging agents potentially by breaching a damage-induced checkpoint arrest," *Genes and Cancer*, vol. 1, no. 10, pp. 1053–1062, 2010.
- [544] B. Yin *et al.*, "RON and c-Met facilitate metastasis through the ERK signaling pathway in prostate cancer cells," *Oncol. Rep.*, vol. 37, no. 6, pp. 3209–3218, Jun. 2017.
- [545] F. Cecchi, D. C. Rabe, and D. P. Bottaro, "Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol.

- 16, no. 6, pp. 553–572, 2012.
- [546] S. M. K. Pulukuri *et al.*, “RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 43, pp. 36529–36540, Oct. 2005.
- [547] J. Flygare *et al.*, “Effects of HsRad51 overexpression on cell proliferation, cell cycle progression, and apoptosis,” *Exp. Cell Res.*, vol. 268, no. 1, pp. 61–69, Aug. 2001.
- [548] S. Yoo and B. D. McKee, “Overexpression of *Drosophila* Rad51 protein (DmRad51) disrupts cell cycle progression and leads to apoptosis,” *Chromosoma*, vol. 113, no. 2, pp. 92–101, Sep. 2004.
- [549] V. Akimov *et al.*, “Ubisite approach for comprehensive mapping of lysine and n-terminal ubiquitination sites,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 25, no. 7, pp. 631–640, Jul. 2018.
- [550] B. Zhao *et al.*, “ATPase activity tightly regulates RecA nucleofilaments to promote homologous recombination,” *Cell Discov.*, vol. 3, p. 16053, Jan. 2017.
- [551] S. L. Lusetti, J. J. Shaw, and M. M. Cox, “Magnesium ion-dependent activation of the RecA protein involves the C terminus,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 18, pp. 16381–16388, May 2003.
- [552] S. L. Lusetti *et al.*, “C-terminal deletions of the *Escherichia coli* RecA protein: Characterization of in vivo and in vitro effects,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 18, pp. 16372–16380, May 2003.
- [553] A. L. Egger, S. L. Lusetti, and M. M. Cox, “The C terminus of the *Escherichia coli* RecA protein modulates the DNA binding competition with single-stranded DNA-binding protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 18, pp. 16389–16396, May 2003.
- [554] L. H. Fornander, K. Frykholm, A. Reymer, A. Renodon-Cornière, M. Takahashi, and B. Nordén, “Ca²⁺ improves organization of single-stranded DNA bases in human Rad51 filament, explaining stimulatory effect on gene recombination,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 11, pp. 4904–4913, Jun. 2012.
- [555] R. Kim *et al.*, “RecA requires two molecules of Mg²⁺ ions for its optimal strand exchange activity in vitro,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 2548–2559, Mar. 2018.
- [556] D. V. Bugreev and A. V. Mazin, “Ca²⁺ activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 27, pp. 9988–9993, Jul. 2004.
- [557] H. Maacke *et al.*, “DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma,” *Oncogene*, vol. 19, no. 23, pp. 2791–2795, May 2000.
- [558] J. A. F. Hannay *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.*, vol. 6, no. 5, pp. 1650–1660, 2007.
- [559] A. P. Wiegman *et al.*, “Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 10, pp. 3261–3272, 2014.
- [560] D. Velic *et al.*, “DNA damage signalling and repair inhibitors: The long-sought-after achilles’ heel of cancer,” *Biomolecules*, vol. 5, no. 4, MDPI AG, pp. 3204–3259, 20-Nov-2015.
- [561] S. L. Organ and M. S. Tsao, “An overview of the c-MET signaling pathway,” 2011.
- [562] J. Xie, L. Supekova, and P. G. Schultz, “A genetically encoded metabolically stable analogue of phosphotyrosine in *Escherichia coli*,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 2, no. 7, pp. 474–478, Jul. 2007.
- [563] G. Banfalvi, “Overview of cell synchronization,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 761, pp. 1–23, 2011.
- [564] G. W. Zieve, D. Turnbull, J. M. Mullins, and J. R. McIntosh, “Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor Nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells,” *Exp. Cell Res.*, vol. 126, no. 2, pp. 397–405, 1980.
- [565] L. T. Vassilev, “Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1,” *Cell Cycle*, vol. 5, no. 22, Taylor and Francis Inc., pp. 2555–2556, 15-Nov-2006.
- [566] G. Banfalvi, “Synchronization of mammalian cells and nuclei by centrifugal elutriation,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 761, pp. 25–45, 2011.
- [567] D. I. Kim *et al.*, “An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, no. 8, pp. 1188–1196, 2016.
- [568] K. J. Roux, D. I. Kim, B. Burke, and D. G. May, “BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions,” *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. 91, no. 1, pp. 19.23.1–19.23.15, Jan. 2018.
- [569] M. K. Chen, J. L. Hsu, and M. C. Hung, *Nuclear receptor tyrosine kinase transport and functions in cancer*, 1st ed., vol. 147. Elsevier Inc., 2020.

Annexes

Annexe 1 – Construction plasmidique pET-15b

Annexe 2 – Séquence du gène *RAD51* inséré

Annexe 3 – Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée

Annexe 4 – Contrôle purification mutants Y/F

Annexe 5 – Séquence FASTA Q06609 de l'isoforme 1 de RAD51

Annexe 6 – Protocole de la plateforme 3P5 pour l'identification des MPT par spectrométrie de masse

Annexe 7 – Tableaux des anticorps utilisés & dilution

Annexe 8 – Contrôle de la puce de criblage

Annexe 9 – Interactions mises en jeu entre les inhibiteurs PHA665752, BMS777607 et le domaine tyrosine kinase du récepteur c-Met

Annexe 10 – Constructions plasmidiques pour le système de réparation RH par cytométrie

Annexe 11 – Modélisation moléculaire des tyrosines Y191 et Y315 dans l'interaction monomère-monomère

Annexe 12 – Mécanisme de détournement du codon Ambre/Stop pour la formation de protéines phosphomimétiques - pCMF

Annexe 13 – Mécanisme du système de détection de partenaires protéiques indirects - BioID

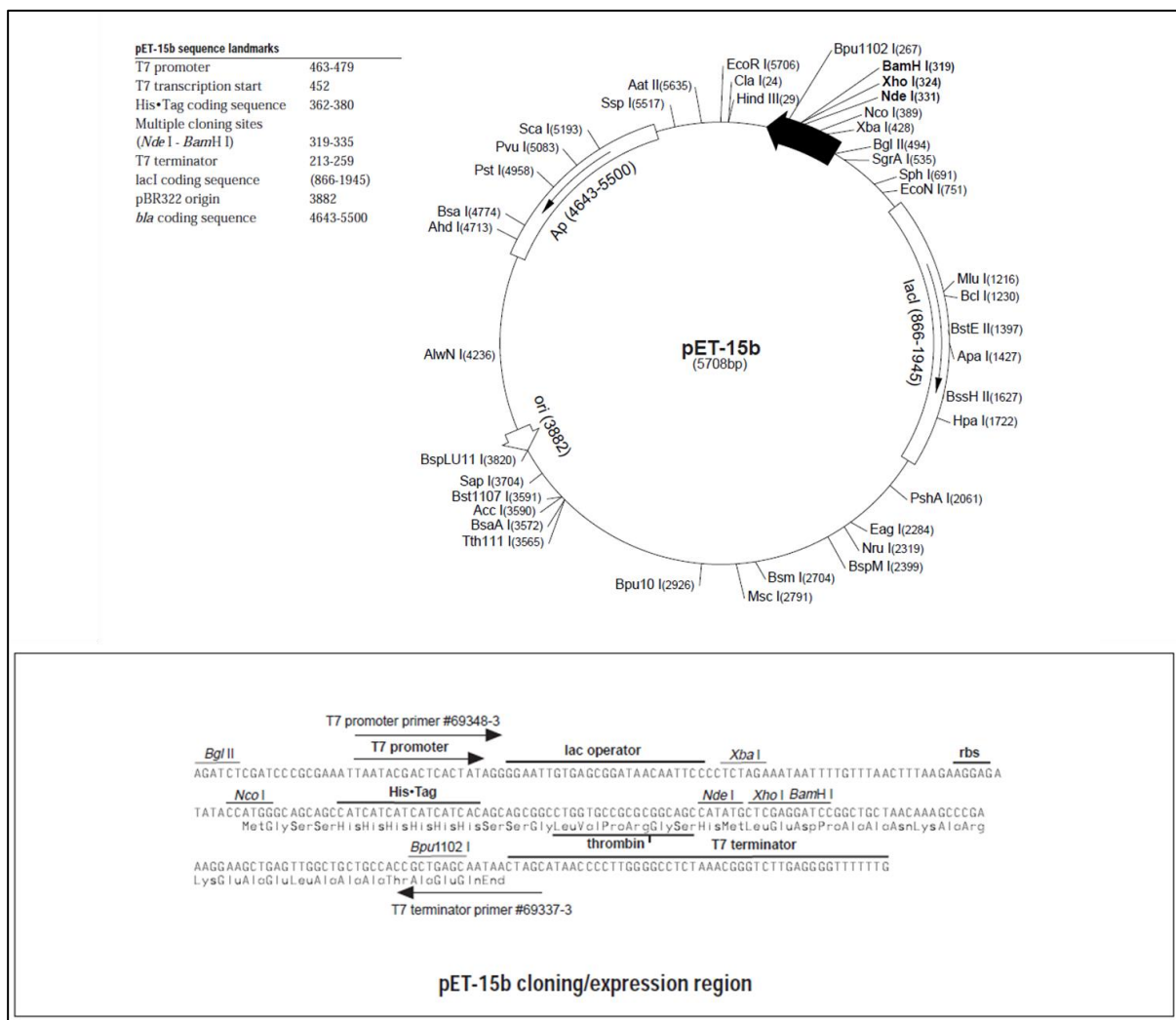
Articles

Annexe 14 – « Rapid diminution in the level and activity of DNA-dependent protein kinase in cancer cells by a reactive nitro-benzoxadiazole compound ». Silva, V. A. O. et al., Int. J. Mol. Sci. 17, 1–16 (2016).

Annexe 15 – « New phosphorylation sites of Rad51 by c-Met modulates presynaptic filament stability ». Chabot, T. et al., Cancers. 11, 413 (2019)

Annexe 16 – « Relationships between DNA repair and RTK-mediated signaling pathways ». Chabot et al., (soumise à Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer)

Annexe 1 – Construction plasmidique pET-15b



Annexe 2 – Séquence du gène *rad51* inséré

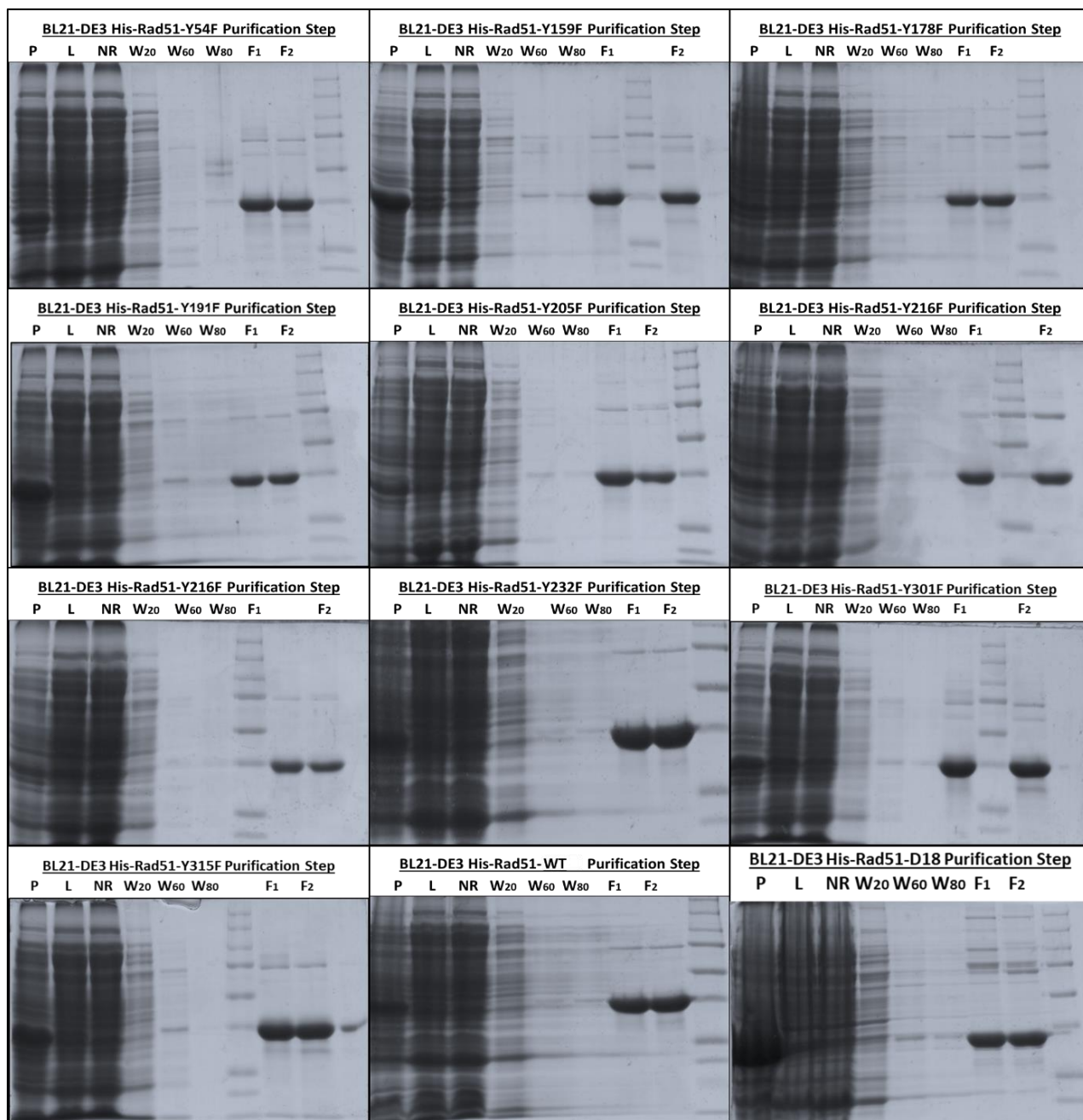
ATG GGC AGC AGC **CAT CAT CAT CAT CAT CAC** AGC AGC GGC **CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT GCA**
Start His-Tag Site Thrombine

ATG CAG ATG CAG CTT GAA GCA AAT GCA GAT ACT TCA GTG GAA GAA GAA AGC TTT GGC CCA CAA
CCC ATT TCA CGG TTA GAG CAG TGT GGC ATA AAT GCC AAC GAT GTG AAG AAA TTG GAA GAA GCT
GGA TTC CAT ACT GTG GAG GCT GTT GCC TAT GCG CCA AAG AAG GAG CTA ATA AAT ATT AAG GGA ATT
AGT GAA GCC AAA GCT GAT AAA ATT CTG GCT GAG GCA GCT AAA TTA GTT CCA ATG GGT TTC ACC
ACT GCA ACT GAA TTC CAC CAA AGG CGG TCA GAG ATC ATA CAG ATT ACT ACT GGC TCC AAA GAG
CTT GAC AAA CTA CTT CAA GGT GGA ATT GAG ACT GGA TCT ATC ACA GAA ATG TTT GGA GAA TTC CGA
ACT GGG AAG ACC CAG ATC TGT CAT ACG CTA GCT GTC ACC TGC CAG CTT CCC ATT GAC CGG GGT
GGA GGT GAA GGA AAG GCC ATG TAC ATT GAC ACT GAG GGT ACC TTT AGG CCA GAA CGG CTG CTG
GCA GTG GCT GAG AGG TAT GGT CTC TCT GGC AGT GAT GTC CTG GAT AAT GTA GCA TAT GCT CGA
GCG TTC AAC ACA GAC CAC CAG ACC CAG CTC CTT TAT CAA GCA TCA GCC ATG ATG GTA GAA TCT
AGG TAT GCA CTG CTT ATT GTA GAC AGT GCC ACC GCC CTT TAC AGA ACA GAC TAC TCG GGT CGA
GGT GAG CTT TCA GCC AGG CAG ATG CAC TTG GCC AGG TTT CTG CGG ATG CTT CTG CGA CTC GCT
GAT GAG TTT GGT GTA GCA GTG GTA ATC ACT AAT CAG GTG GTA GCT CAA GTG GAT GGA GCA GCG
ATG TTT GCT GCT GAT CCC AAA AAA CCT ATT GGA GGA AAT ATC ATC GCC CAT GCA TCA ACA ACC AGA
TTG TAT CTG AGG AAA GGA AGA GGG GAA ACC AGA ATC TGC CAA ATC TAC GAC TCT CCC TGT CTT
CCT GAA GCT GAA GCT ATG TTC GCC ATT AAT GCA GAT GGA GTG GGA GAT GCC AAA GAC

Annexe 3 – Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée

Rad51-Y54F	Rad51-Y54F-for: ggaggctgttgcccttgcgccaagaagg Rad51-Y54F-rev: ccttcttggcgcaaaggcaacagcctcc
Rad51-Y159F	Rad51-Y159F-for: gaaggaaaggccatgttcattgacactgaggg Rad51-Y159F-rev: ccctcagtgcaatgaacatggccttccttc
Rad51-Y178F	Rad51-Y178F-for: ggcaaggctgagaggttggctctctggcagt Rad51-Y178F-rev: cactgccagagagaccaaaccctcagccactgcc
Rad51-Y191F	Rad51-Y191F-for: cctggataatgtagcatttgcgagcgttcaacac Rad51-Y191F-rev: gtgttgaacgctcgagcaaatgctacattatccagg
Rad51-Y205F	Rad51-Y205F-for: cagaccagctccttttcaagcatcagccatg Rad51-Y205F-rev: catggctgatgctgaaaaggagctgggtctg
Rad51-Y216F	Rad51-Y216F-for: gccatgatggtagaatctaggttgactgcttattgtagactg Rad51-Y216F-rev: cagtctacaataagcagtgcaaacctagattctaccatcatggc
Rad51-Y228F	Rad51-Y228F-for: gtgccaccgccctttcagaacagactactcg Rad51-Y228F-rev: ccgagtagtctgttctgaaaagggcggtggcac
Rad51-Y232F	Rad51-Y232F-for: cccttacagaacagacttctcgggtcgaggtgagc Rad51-Y232F-rev: gctcacctcgacccgagaagtctgttctgtaaaggg
Rad51-Y301F	Rad51-Y301F-for: cccatgcatcaacaaccagattgttctgaggaaaggaagagggg Rad51-Y301F-rev: cccctctccttctcagaaacaatctggtgttgatgcatggg
Rad51-Y315F	Rad51-Y315F-for: cagaatctgccaatcttcgactctccctgtcttc Rad51-Y315F-rev: gaagacagggagagtcgaagattggcagattctg
Rad51-F86E	Rad51-F86E-for: ctcgtgccatgggagagaccacggcgacggag Rad51-F86E-rev: ctccgtcgccgtggtctcgccatgggcaagag
Rad51-A190-192L	Rad51-A190/192L-for: cctggataatgtactgtatctgcgagcgttcaacac Rad51-A190/192L-rev: gtgttgaacgctcgagatacagtacattatccagg

Annexe 4 – Contrôle de purification des mutants Y/F



P : Cellular Pellet

L : Cellular Lysate

NR : Not Retained

W₂₀ : Washing 20mM imidazole

W₆₀ : Washing 60mM imidazole

W₈₀ : Washing 80mM imidazole

F₁ : Elution Fraction 1

F₂ : Elution Fraction 2

Annexe 5 – Séquence FASTA Q06609 de l'isoforme 1 de RAD51

D'après Uniprot.org

>Q06609|RAD51 HUMAN DNA repair protein RAD51 homolog 1

MAMQMQLLEANADTSVEEESFGPQPISRLEQCGINANDVKKLEEAGFHTVEAVA**Y**APKKELINIKGISE
AKADKILAEAAKLVPMG**F**TTATEFHQRRSEIIQITTGSKELDKLLQGGIETGSITEMFGEFRTGKTQICHT
LAVTCQLPIDRGGGEGKAM**Y**IDTEGTFRPERLLAVAER**Y**GLSGSDVLDNV**Y**ARAFNTDHQTQL**Y**Q
ASAMMVESR**Y**ALLIVDSATAL**Y**RTD**Y**SGRGELSARQMHLARFLRMLLRLADEFQVAVVITNQVVAQVD
GAAMFAADPKKPIGGNIIAHASTTRL**Y**LRKGRGETRICKI**Y**DSPCLPEAEAMFAINADGVGDAKD

Annexe 6 – Protocole de la plateforme 3P5 pour l'identification des MPT par MS-MS

Bands were manually excised from gels and were cut into cubes. Then, in-gel digestion was carried out with trypsin, according to a published procedure with minor adjustments (**Shevchenko et al. 2001**): sample were destained twice with a mixture of 100 mM ammonium bicarbonate (ABC) and 50 % (vol/vol) acetonitrile (ACN) for 30 min at room temperature and then dehydrated using 100 % ACN for 20 min, before being reduced with 25 mM ABC containing 10 mM DTT for 1 h at 57 °C and alkylated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ABC for 30 min in the dark at room temperature. Gel pieces were washed twice with 25 mM ABC and dehydrated (twice, 20 min) and dried (20 min) with 100% ACN. Gel cubes were incubated with sequencing grade-modified trypsin (Promega, USA; 12.5 ng/μl in 40 mM ABC with 10% ACN, pH 8.0) overnight at 37 °C. After digestion, peptides were extracted from gel pieces twice with a mixture of 50 % ACN – 5 % formic acid (FA) and after with 100% ACN. Extracts were dried using a vacuum centrifuge concentrator plus (Eppendorf).

Mass spectrometry analyses were performed using an Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatographic nano-LC-system coupled to a LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer, all from Thermo Fisher Scientific. Briefly, peptides were solubilized in 3.5 μL of 10 % ACN - 0.1 % TriFluoroAcetic acid (TFA). Then, peptides were loaded and washed on a C18 reverse-phase precolumn (3 μm particle size, 100 Å pore size, 150 μm i.d., 1 cm length). The loading buffer contained 98% H₂O, 2% ACN and 0.1% TFA. Peptides were then separated on a C18 reverse-phase resin (2 μm particle size, 100 Å pore size, 75 μm i.d., 15 cm length) with a 30 min gradient from 99 % A (0.1 % FA and 100 % H₂O) to 40 % B (80 % ACN, 0.085 % FA and 20% H₂O).

The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in a data-dependent scheme with full MS scans acquired with the Orbitrap, followed by up to 20 MS/MS CID spectra in the Velos linear trap (LTQ). For the spectral processing, the software used to generate .mgf files was Proteome discoverer 1.4. Database searches were carried out using Mascot version 2.5.1 (Matrix Science, London, UK) on 'human' proteins (20,268 sequences) from the SwissProt databank containing 550,116 sequences (196,219,159 residues) (December 2015). The search parameters were as follows: the enzyme specificity as Trypsin, carbamidomethylation as a variable modification for cysteins and oxidation as a variable modification for methionines. Up to 1 missed cleavage was tolerated, and mass accuracy tolerance levels of 5 ppm for precursors and 0.56 Da for fragments were used for all tryptic mass searches. Positive identification was based on a Mascot score above the significance level (i.e. 5%). The reported proteins were always those with the highest number of peptide matches.

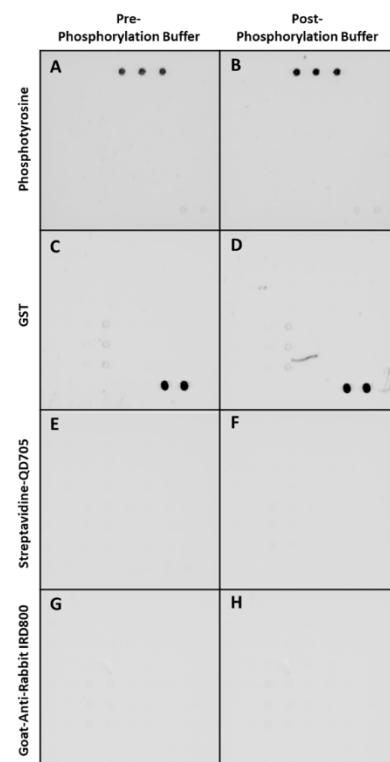
D'après : Shevchenko A, Loboda A, Werner E, Schraven B, Standing KG. (2001) Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry. Electrophoresis 22:1194–1203. doi:10.1002/1522-2683(200106)22:6<1194::AID-ELPS1194>3.0.CO;2-A

Annexe 7 – Tableaux des anticorps utilisés & dilution

Type d'anticorps	Protéine/Modification ciblée	Clone/Immuno-gène de référence	Utilisation	Dilution	Fournisseur
Primaire Monoclonale	c-Met	D-1C2	WB	1:1000 ^{ème}	CellSignaling
	γ-H2AX Serine S139	JBW301	WB	1:1000 ^{ème}	Merck-Milipore - Sigma-Aldrich
			IF	1:1000 ^{ème}	Merck-Milipore - Sigma-Aldrich
	GST	26H1	Chip	1:2000 ^{ème}	CellSignaling
	HA(-Tag)	HA-7	WB	1:1000 ^{ème}	Merck-Milipore - Sigma-Aldrich
	His(-Tag)	4E3D10H2	WB	1:1000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen
	PARP-1	C-2-10	WB	1:1000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen
	pMet Tyrosine Y1234/1235	D-26	IF	1:1000 ^{ème}	CellSignaling
			WB	1:1000 ^{ème}	CellSignaling
	pTyrosine	P-Tyr-100	WB	1:1000 ^{ème}	CellSignaling
Chip			1:2000 ^{ème}	CellSignaling	
Rad51	JM54-26	WB	1:1000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen	
		IF	1:1000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen	
α-Tubuline	TU-01	WB	1:5000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen	
Primaire Polyclonale	Histone H3	Ab1791	WB	1:2000 ^{ème}	Abcam
	Rad51	Prestige	WB	1:1000 ^{ème}	Merck-Milipore - Sigma-Aldrich
			Chip	1:1000 ^{ème}	Merck-Milipore - Sigma-Aldrich
Secondaire Polyclonale	Chaîne lourde et légère IgG Souris	Alexa Fluor® Plus 488	IF	1:10000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen
	Chaîne lourde et légère IgG Lapin	Alexa Fluor® Plus 555	IF	1:10000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen
	Chaîne lourde et légère IgG Souris	Alexa Fluor® Plus 680	WB	1:10000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen
	Chaîne lourde et légère IgG Souris	Alexa Fluor® Plus 800	WB	1:10000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen
	Chaîne lourde et légère IgG Lapin	Alexa Fluor® Plus 680	WB	1:10000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen
	Chaîne lourde et légère IgG Lapin	Alexa Fluor® Plus 800	WB	1:10000 ^{ème}	ThermoFisher Scientific - Invitrogen
	Chaîne lourde et légère IgG Souris	IRDye® 680	WB	1:20000 ^{ème}	LiCor
	Chaîne lourde et légère IgG Souris	IRDye® 800	WB	1:20000 ^{ème}	LiCor
	Chaîne lourde et légère IgG Lapin	IRDye® 680	WB	1:20000 ^{ème}	LiCor
Chaîne lourde et légère IgG Lapin	IRDye® 800	WB	1:20000 ^{ème}	LiCor	

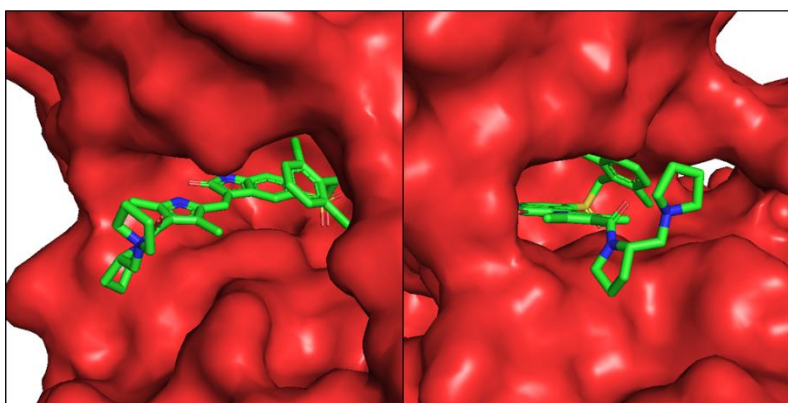
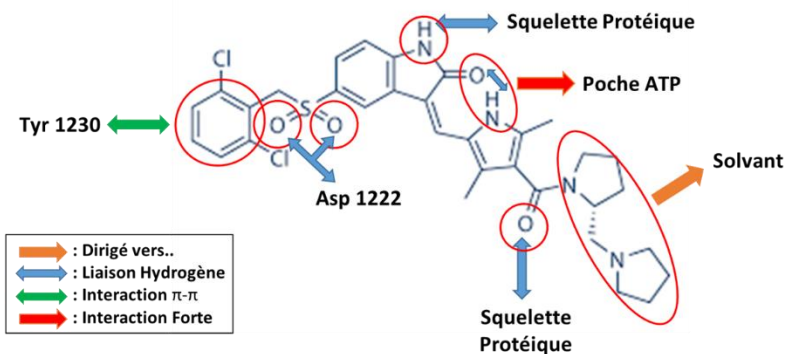
Annexe 8 – Contrôle de la puce de criblage

- A. Control PhosphoTyrosine pre-phosphorylation buffer incubation
- B. Control PhosphoTyrosine post-phosphorylation buffer incubation
- C. Control GST pre-phosphorylation buffer incubation
- D. Control GST post-phosphorylation buffer incubation
- E. Control Secondary antibody Strepta-QDOT705 Only pre-phosphorylation buffer incubation
- F. Control Secondary antibody Strepta-QDOT705 Only post-phosphorylation buffer incubation
- G. Control Secondary antibody Goat Anti-Rabbit IRD800 Only pre-phosphorylation buffer incubation
- H. Control Secondary antibody Goat Anti-Rabbit IRD800 Only post-phosphorylation buffer incubation

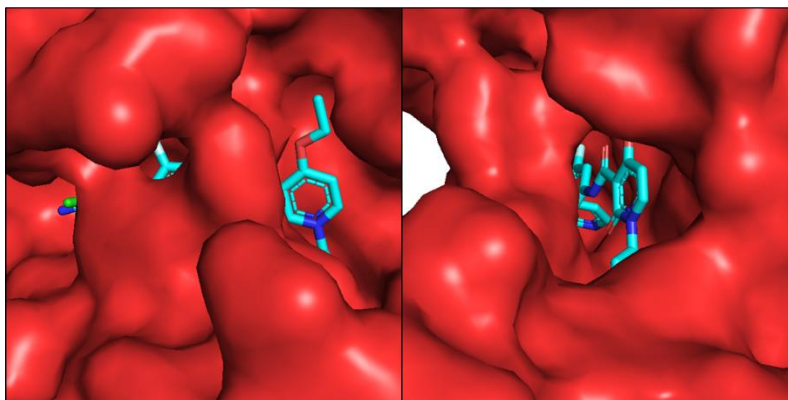
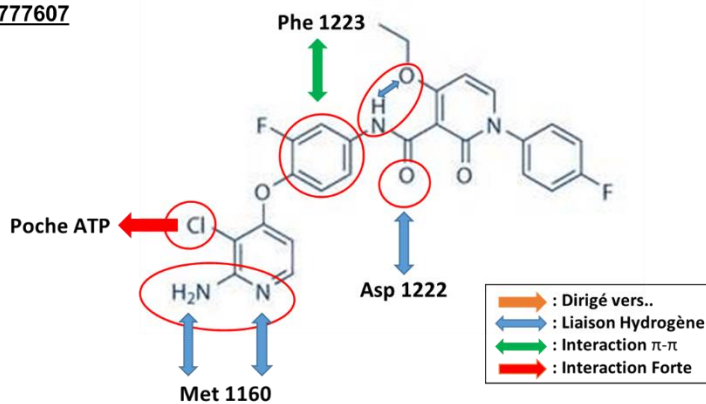


Annexe 9 – Interactions mises en jeu entre les inhibiteurs PHA665752, BMS777607 et le domaine tyrosine kinase du récepteur c-Met

PHA665752



BMS777607



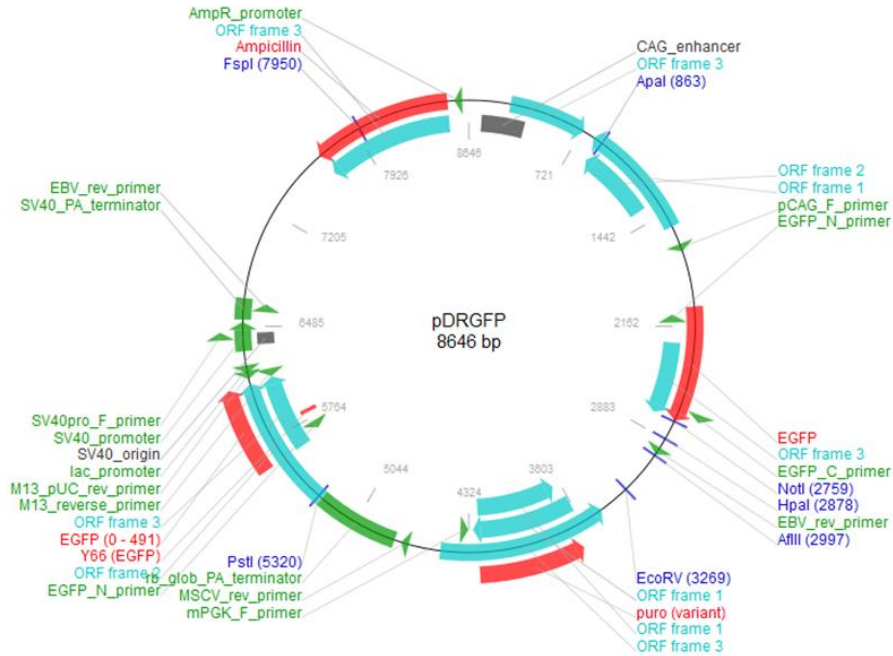
Nous avons représenté chacune des molécules inhibitrices utilisées pour inactiver le récepteur c-Met, ainsi que les différentes interactions entrant en jeu. Suite à l'utilisation du logiciel PyMOL et de la structure du domaine tyrosine kinase de c-Met (rouge) avec les inhibiteurs PHA665752 (PDB : 2wkm) (vert) [519] et BMS777607 (PDB : 3f82) (bleu) [520] nous pouvons observer que de nombreuses interactions entre le TDK et les inhibiteurs se réalisent au niveau de la poche ATP du récepteur.

Annexe 10 – Constructions plasmidiques pour le système de réparation RH par cytométrie

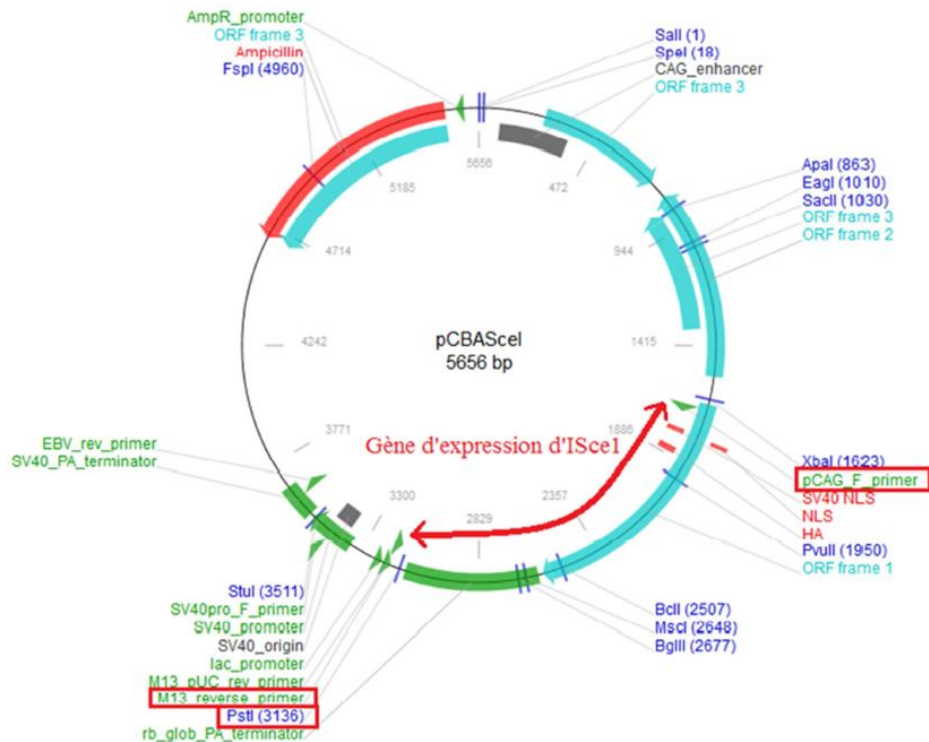
A – Plasmide utilisé pour la transfection stable des cellules RG37 – pDRGFP

B - Plasmide utilisé pour la transfection transitoire de l'enzyme de restriction IScel – pCBAScel

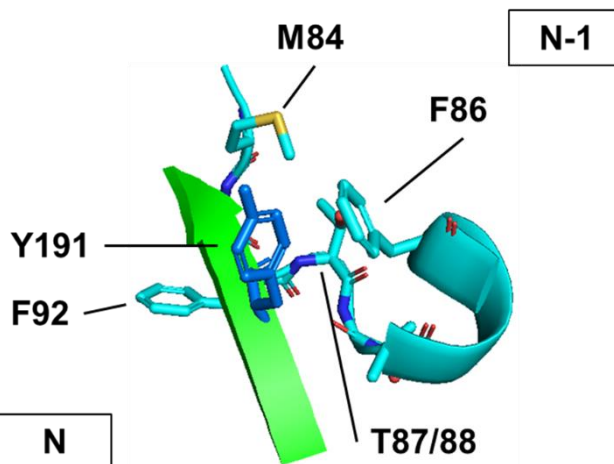
A



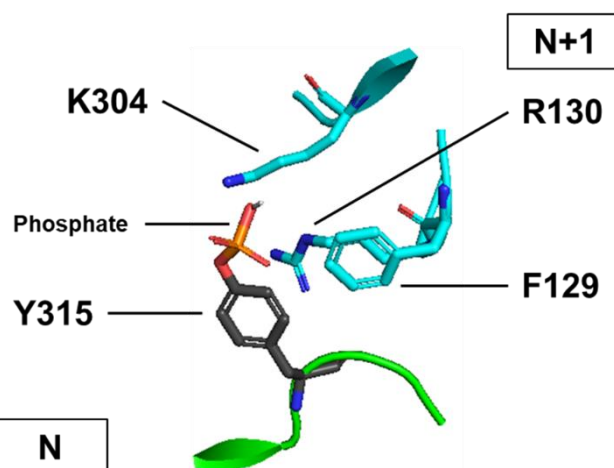
B



Annexe 11 – Modélisation moléculaire des tyrosines Y191 et Y315 dans l'interaction monomère-monomère



Sites Rad51 phosphorylés	Interface Monomère/Monomère	Résidus du Monomère N-1 ou N+1 à moins de 5Å
Y191	N/N-1	83 – PMGFTTATEFH – 93



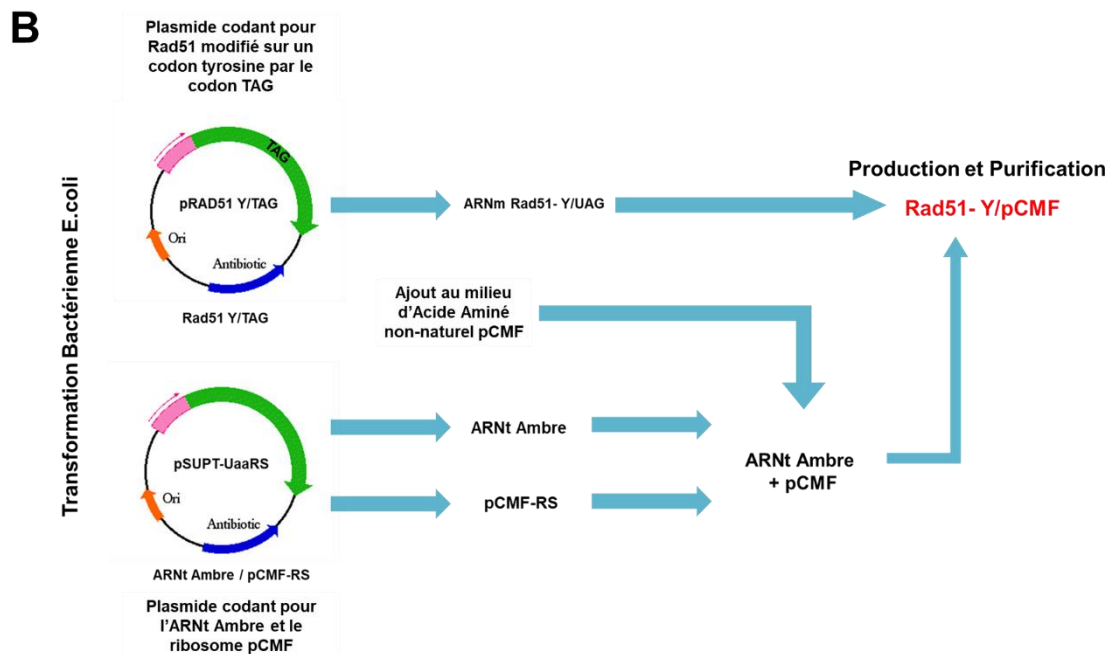
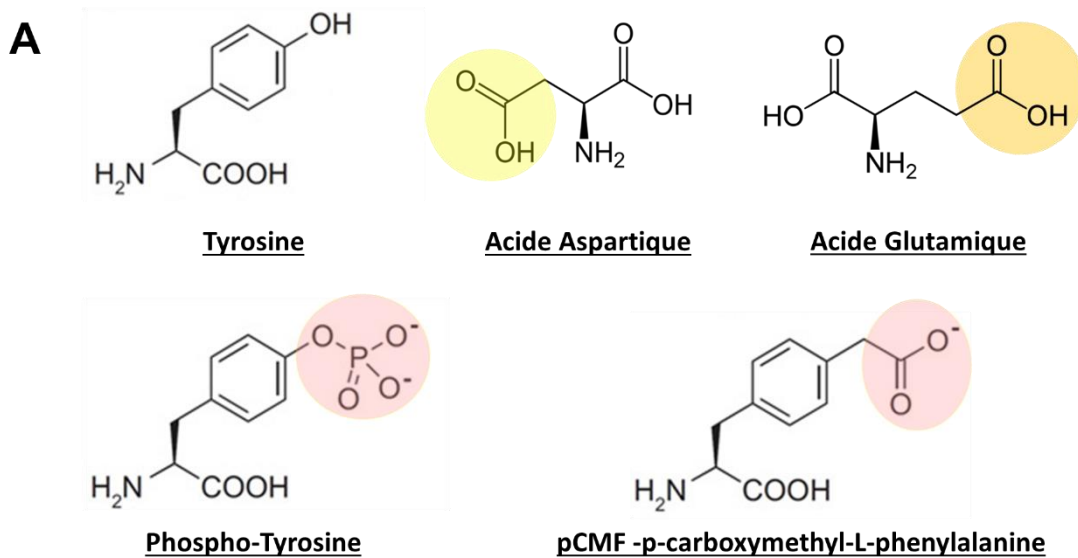
Sites Rad51 phosphorylés	Interface Monomère/Monomère	Résidus du Monomère N-1 ou N+1 à moins de 5Å
Y315	N/N+1	127 – GEFRTGKTQI – 136 303 – RKG – 305

Suite à l'utilisation du logiciel PyMOL et de la structure de RAD51 (vert) [188], Y191 (bleu) et Y315 (noir) d'un monomère de RAD51 (vert) ont été indiquées. Sont également indiqués les résidus des monomères N+1 et N-1 situés à moins de 5Å des résidus Y191 ou Y315. Dans le cas de la tyrosine Y191, la modélisation nous montre que 2 phénylalanines se trouvent dans l'entourage de la tyrosine pouvant ainsi induire des interactions Π -stacking, également des résidus méthionine et thréonine permettant également certaines interactions ioniques. En revanche l'ajout d'un phosphate ne semble pas ajouter d'interactions supplémentaires mais renforcer celles existantes. En ce qui concerne la tyrosine Y315, la phosphorylation permet en revanche d'ajouter des interactions inexistantes, notamment des interactions ioniques fortes entre le phosphate et les résidus arginine et lysine.

Annexe 12 – Mécanisme de détournement du codon Ambre/Stop pour la formation de protéines phosphomimétiques pCMF

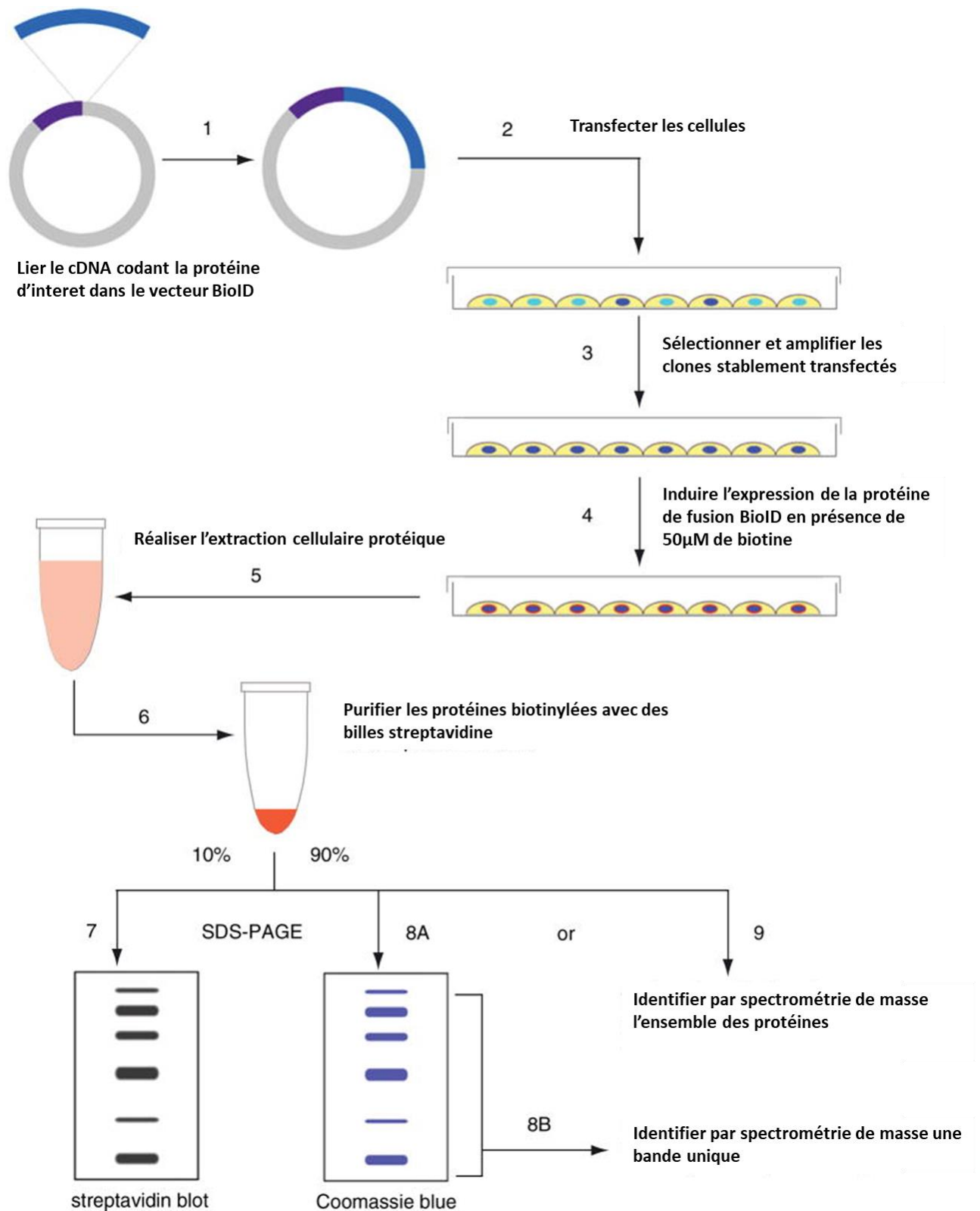
A – Comparaison des différentes formes phosphomimétiques utilisables pour remplacer la forme phospho-tyrosine

B – Mécanisme de détournement du codon Ambre/Stop pour la formation de protéines phosphomimétiques pCMF



Modifié d'après : Xie J, Supekova L, Schultz PG. A genetically encoded metabolically stable analogue of phosphotyrosine in *Escherichia coli*. *ACS Chem Biol*. 2007;2(7):474-478. doi:10.1021/cb700083w

Annexe 13 – Mécanisme du système de détection de partenaires protéiques indirects - BioID



Modifié d'après : Roux KJ, Kim DI, Burke B, May DG. BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Curr Protoc Protein Sci.* 2018;91(1):19.23.1-19.23.15. doi:10.1002/cpps.51



Articles

- **« *Rapid diminution in the level and activity of DNA-dependent protein kinase in cancer cells by a reactive nitro-benzoxadiazole compound* ».** Silva et al., 2016
- **« *New phosphorylation sites of rad51 by c-met modulates presynaptic filament stability* ».** Chabot et al., 2019
- **« *Relationships between DNA repair and RTK-mediated signaling pathways* ».** Chabot et al., soumis à BBA - Reviews on Cancer



Article

Rapid Diminution in the Level and Activity of DNA-Dependent Protein Kinase in Cancer Cells by a Reactive Nitro-Benzoxadiazole Compound

Viviane A. O. Silva ^{1,†}, Florian Lafont ^{1,‡}, Houda Benhelli-Mokrani ^{1,‡}, Magali Le Breton ¹, Philippe Hulin ², Thomas Chabot ¹, François Paris ³, Vehary Sakanyan ^{4,5,*} and Fabrice Fleury ^{1,*}

¹ UFIP CNRS UMR 6286, Mechanism and Regulation of DNA Repair Team, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France; vivianeaos@gmail.com (V.A.O.S.); florian.lafont@etu.univ-nantes.fr (F.L.); houda.benhelli@univ-nantes.fr (H.B.-M.); magali.lebreton@univ-nantes.fr (M.L.B.); thomas.chabot1@etu.univ-nantes.fr (T.C.)

² Plate-forme MicroPICell SFR Santé F. Bonamy-FED 4203/Inserm UMS016/CNRS UMS3556, 44007 Nantes, France; philippe.hulin@univ-nantes.fr

³ UMR 892 Inserm-6299 CNRS, team 14, 44007 Nantes, France; francois.paris@inserm.fr

⁴ IICiMed EA-1155, Faculté de Pharmacie, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France

⁵ ProtNeteomix, 29 rue de Provence, 44700 Orvault, France

* Correspondence: vehary.sakanyan@univ-nantes.fr (V.S.); fabrice.fleury@univ-nantes.fr (F.F.); Tel.: +33-2-51-12-56-20 (V.S.); +33-2-51-12-56-38 (F.F.)

† Current address: Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, 1331 Barretos, Sao Paulo, Brazil.

‡ These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 28 February 2016; Accepted: 21 April 2016; Published: 11 May 2016

Abstract: The expression and activity of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) is related to DNA repair status in the response of cells to exogenous and endogenous factors. Recent studies indicate that Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is involved in modulating DNA-PK. It has been shown that a compound 4-nitro-7-[(1-oxidopyridin-2-yl)sulfanyl]-2,1,3-benzoxadiazole (NSC), bearing a nitro-benzoxadiazole (NBD) scaffold, enhances tyrosine phosphorylation of EGFR and triggers downstream signaling pathways. Here, we studied the behavior of DNA-PK and other DNA repair proteins in prostate cancer cells exposed to compound NSC. We showed that both the expression and activity of DNA-PKcs (catalytic subunit of DNA-PK) rapidly decreased upon exposure of cells to the compound. The decline in DNA-PKcs was associated with enhanced protein ubiquitination, indicating the activation of cellular proteasome. However, pretreatment of cells with thioglycerol abolished the action of compound NSC and restored the level of DNA-PKcs. Moreover, the decreased level of DNA-PKcs was associated with the production of intracellular hydrogen peroxide by stable dimeric forms of Cu/Zn SOD1 induced by NSC. Our findings indicate that reactive oxygen species and electrophilic intermediates, generated and accumulated during the redox transformation of NBD compounds, are primarily responsible for the rapid modulation of DNA-PKcs functions in cancer cells.

Keywords: DNA-PKcs; DNA repair; hydrogen peroxide; SOD1; nitro-benzoxadiazole; chemosensitization; protein targeting; prostate cancer

1. Introduction

DNA damage caused by different endogenous and exogenous factors triggers signaling and repair pathways, which are vital for the maintenance of genome integrity [1]. DNA double-strand breaks (DSBs) are considered the most cytotoxic DNA lesions; they result from endogenous events such as V(D)J recombination and the production of reactive oxygen species (ROS) during cellular metabolism, as well as from exogenous sources such as ionizing radiation and radiomimetic drugs [2]. The two main mechanisms by which cells repair DSBs are non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). During NHEJ, the two broken ends of DNA are pieced together, sometimes after limited processing of these ends, resulting in quick error-prone repair [3]. The core components of NHEJ include DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), which is composed of DNA-binding subunits (Ku70 and Ku86) and a catalytic subunit (DNA-PKcs), DNA ligase IV, the nuclease Artemis, and XRCC4 [4].

The 450-kDa DNA-PKcs is a key protein in the NHEJ pathway of DSB repair [2]. On the basis of sequence comparison, DNA-PKcs has been classified as a member of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3-K)-related kinase (PIKK) super family of proteins [5], which also includes the ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM-Rad3 related (ATR) proteins [6,7]. The role of DNA-PKcs in DNA-damage NHEJ and HR repair pathways, and its more recently discovered role in the regulation of the homeostasis of cell proliferation, have been extensively studied [8]. DNA-PKcs, along with ATM and ATR, is regarded more as a sensor of primary DNA damage than an inducible downstream effector of DNA damage signaling. The activation of DNA-PKcs may involve interactions with DNA and other proteins [9]. DNA-PKcs is abundantly expressed in almost all mammalian cells, is considered to be a predominantly nuclear protein, and appears to be present together with the Ku70/80 heterodimer in lipid rafts [10]. DNA-PKcs is subject to autophosphorylation and is involved in the phosphorylation of a range of protein substrates, including H2AX, p-53, Replication Protein A (RPA), and Artemis [4,11–14]. Recent findings indicate that the epidermal growth factor receptor (EGFR) is involved in modulating DNA double-strand break repair by NHEJ beyond modifying proliferation, survival, metastasis, and angiogenesis [15,16]. This modulation is especially important in tumors characterized by substantial over-expression of EGFR [17,18], including prostate cancer, in which the progression of the normal epithelium to an androgen-dependent tumor involves the activation of EGFR [19]. The efficiency of NHEJ is stimulated by a truncated EGFRvIII variant of the receptor, and reduced by EGFR-specific inhibitors in treated cells [20]. Experimental results have indicated that EGFR activation by various stimuli, such as ionizing radiation, ligand stimulation, heat shock, H₂O₂, and cisplatin, leads to the internalization of the receptor and its nuclear translocation, together with DNA-PK subunits [15]. The EGFR-mediated stimulation of DSB rejoining could be due to an increase in the nuclear content of DNA-PK subunits and hence an increase in the activity of the DNA-PK-dependent non-homologous end-joining (D-NHEJ) system [20]. Furthermore, it has been demonstrated that blocking EGFR-mediated signaling by cetuximab, an anti-EGFR monoclonal antibody, or by BIBX1382BS, a tyrosine kinase inhibitor of ErbB, results in a decrease in DNA-PK activity and sequestration of DNA-PK into the cytosol [21–24].

Recently, we have developed small molecule microarrays to screen chemical compound libraries with the goal of selecting molecules able to bind to the extracellular region of EGFR [25]. Among these small molecule binders, the compound NSC 228155 (referred to as NSC hereafter, Figure S1) carrying a nitro-benzoxadiazole (NBD) ring has been identified as an attractive non-peptide molecule that rapidly enhances tyrosine phosphorylation of EGFR and triggers downstream signaling pathways in cancer cells. However, the enhanced tyrosine phosphorylation of EGFR by NSC has been shown to be associated with the inhibition of protein phosphatase activity, suggesting that reactive oxygen species (ROS) contribute to activating the receptor [25].

In this study, we focus on the action of NSC on DNA damage repair proteins in prostate cancer cells. We show that exposure of cells to NSC leads to the rapid modulation of DNA-PKcs and other PIKK proteins. Our results reveal that the response of DNA repair proteins is primarily caused

by reactive molecules generated during redox transformation of NSC in exposed cells. We also demonstrate that pretreatment of cancer cells with NSC sensitizes them to camptothecin-induced DNA breaks.

2. Results

2.1. NSC Treatment Rapidly Affects the Amount of DNA-PKcs Protein

The amounts of major DNA repair proteins were assessed in prostate cancer cell lines PC-3 and DU145 treated by the small molecule NSC using Western immunoblotting. No difference was detected in the amounts of the DNA-binding subunits KU70 and KU80 of DNA-PK compared to the control and EGF treatment (Figure 1A). However, a clear decrease was found in the amount of the catalytic subunit of the protein, DNA-PKcs, in the same cells after exposure to 100 μ M NSC for 5, and especially for 10 min. The relative amount of DNA-PKcs was lower in PC-3 than in DU145-treated cells, corresponding to a decrease of 40% and 20%, respectively (Figure 1B). None of the other DNA repair proteins tested, namely RAD51, PARP, PCNA, and MRE11, showed a significant difference in NSC-treated PC-3 and DU145 cells compared to untreated cells after 5 and 10 min of exposure (see Figure 1A). Meanwhile, the level of phosphorylated EGFR at Y1068 was enhanced in cells exposed to NSC or EGF (control), whereas the total amount of the receptor was not affected (Figure 1B).

In addition, the level of DNA-PKcs expression was assessed in PC-3 cells after exposure to NSC at lower concentrations and longer incubation times, up to 72 h. In contrast to EGFR, a gradual decrease in the DNA-PKcs protein level was observed (Figure 1C), indicating that the small molecule action on DNA-PKcs is dose-dependent and might have a cumulative effect on NHEJ repair efficiency and the viability of treated cells.

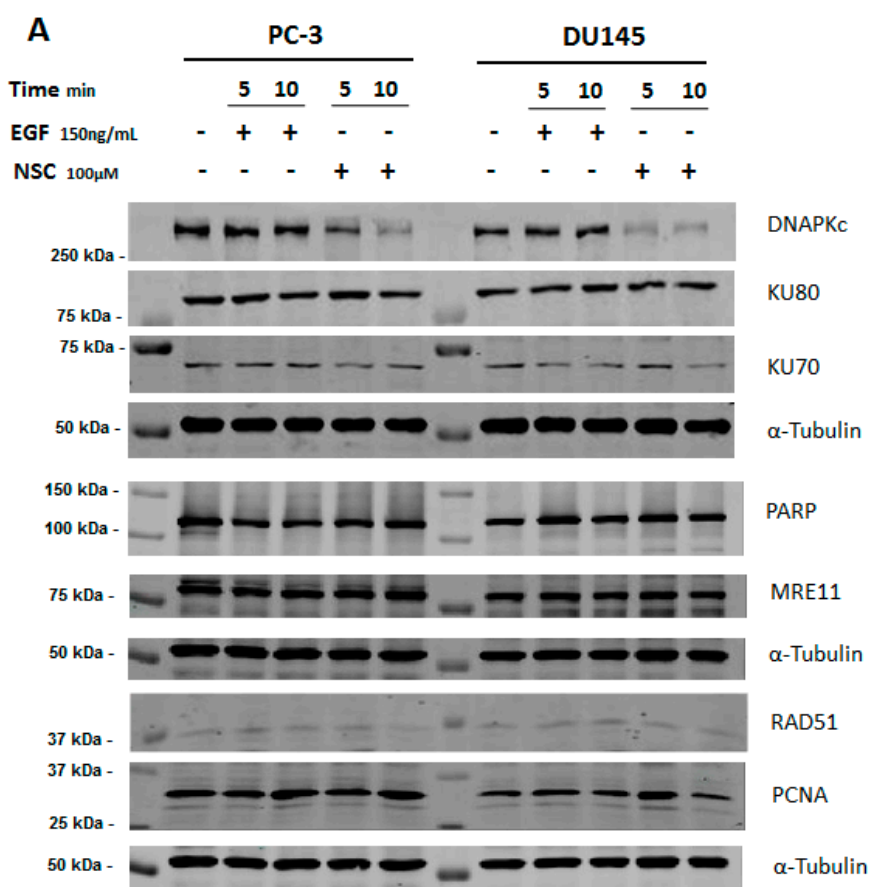


Figure 1. Cont.

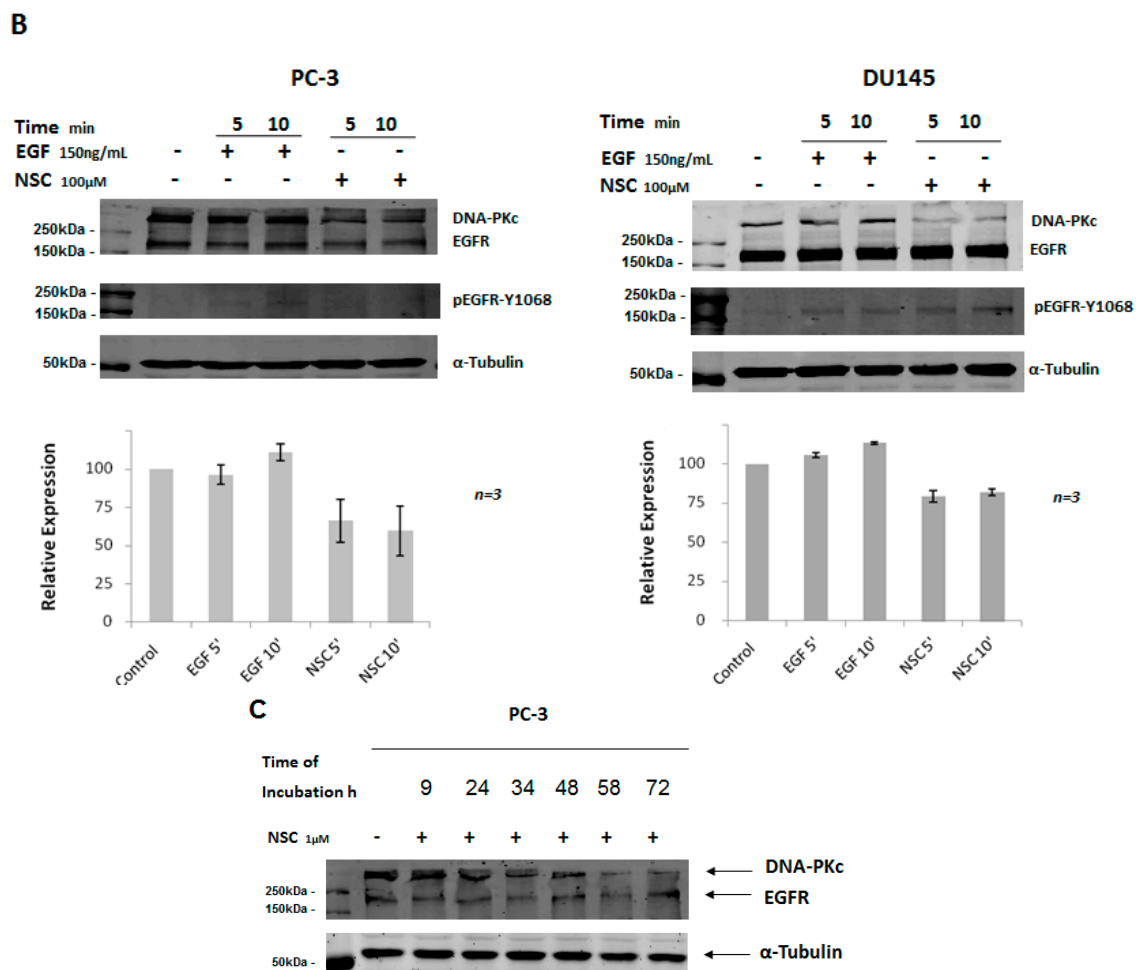


Figure 1. Relative level of DNA repair proteins in prostate cancer cells after exposure to compound NSC. (A) Levels of Rad51, PARP, MRE11, PCNA, EGFR, DNA-PKcs and KU DNA-binding subunits of DNA-PK were assessed in serum-starved PC-3 and DU145 cells, which were incubated with NSC (100 μ M), or EGF (150 ng/mL), or vehicle (DMSO) for 5 and 10 min; (B) Quantitative analysis of the fluorescent signal intensity of protein bands shows that the decrease in the amount of DNA-PKcs is more pronounced in PC-3 than in DU145 cells briefly exposed to NSC; (C) Longer exposure of PC-3 cells to low concentrations of NSC (1 μ M in this assay) also caused a gradual decrease in the DNA-PKcs expression level, but had almost no effect on the expression of EGFR in these conditions.

The rapid and selective decrease in the amount of DNA-PKcs in NSC-treated cells led us to assume that the protein might be subjected to degradation rather than the down-regulation of its expression under the conditions used. This assumption was first verified by RT-PCR analysis, which revealed that the amount of DNA-PKcs mRNA was not reduced in NSC-treated cells (Figure S2).

2.2. Subcellular Distribution of DNA-PKcs

The subcellular distribution of DNA-PKcs in PC-3 and DU145 cells exposed to NSC was examined by immunostaining with an antibody specifically recognizing the catalytic subunit of the protein. Before NSC treatment, DNA-PKcs was mainly localized in the nucleus, which was stained with DAPI. After NSC incubation for 10 min, there was a visible decrease in DNA-PKcs protein levels in PC-3 and DU145 cells compared to non-treated control cells (Figure 2A,B). This result is consistent with the Western-blot analysis showing a weak fluorescence signal from DNA-PKcs in NSC-treated cells (Figure 1A). There was no apparent change in the subcellular distribution of DNA-PKcs under the measurement conditions used in Figure 2A,B. However, when a higher-resolution imaging was used,

DNA-PKcs appeared to be distributed inside PC-3 cells shortly after exposure to NSC (Figure 2C). The fluorescent signal from DNA-PKcs had an essentially nuclear localization in control cells, whereas as little as a 5-min exposure to NSC resulted in the appearance of the protein-specific signal from the cytoplasm of many cells. This tendency became more clearly visible after a 10-min, 20-min and 30-min of exposure to NSC, indicating that DNA-PKcs was diffused in the cells.

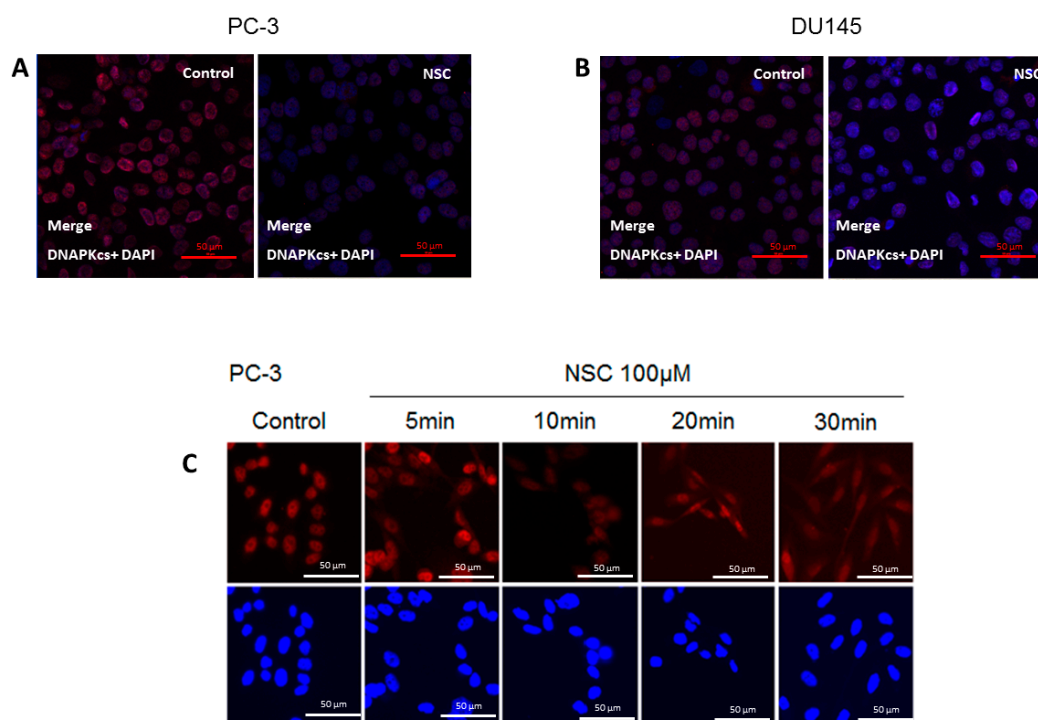


Figure 2. Intracellular localization of DNA-PKcs in prostate cells exposed to NSC. PC-3 (A) and DU145 (B) cells exposed to 100 μM NSC (NSC) or to vehicle (Control) for 10 min; (C) DNA-PKcs intracellular distribution in PC-3 was also analyzed after NSC treatment at 100 μM for 5, 10, 20 and 30 min. The treated and untreated cells were fixed and stained with anti-DNA-PKcs antibody (red color). The nuclei were stained with DAPI (blue color).

Thus, a short exposure of cells to NSC results in a rapid decrease in the amount of nuclear DNA-PKcs, which is accompanied by delocalization of the protein into the cytoplasm of treated cells.

2.3. Exposure to NSC Alters the Activity of DNA-PKcs

Because of the low yield of phosphorylated forms of DNA-PKcs, the phosphorylation level of the protein was difficult to assess by Western blotting (Figure S3). Therefore, DNA-PKcs activity was evaluated indirectly by estimating the phosphorylation level of its substrate-protein RPA2. To address this, camptothecin (CPT), a selective topoisomerase I poison, was used as it promotes DNA-PK activation and subsequent RPA2 phosphorylation after treatment [26].

As shown in Figure 3A, 1-h of treatment of PC-3 cells with 100 μM induced the phosphorylation of RPA2, which could be detected as bands with different migration velocities. These bands correspond to the intermediate and hyperphosphorylation status of RPA2 and the latter (the band with a lower migration) is directly related to DNA-PKcs activity [27]. In fact, pre-incubation with the inhibitor NU7441 strongly decreased this phosphorylated form of RPA2 indicating that DNA-PKcs activity was reduced in cells after CPT treatment (Figure 3A).

Next, PC-3 cells were pre-incubated with 0.1 mM CPT for 20 h, and then incubated with NSC at 10 μM for 1 h, or at 100 μM for 10 min. Western blotting analysis revealed that exposure to NSC remarkably decreased the phosphorylation of RPA2 in CPT pretreated cells in the conditions used

(Figure 3B). These data indicate that NSC leads to rapid attenuation of the kinase activity of DNA-PK after CPT treatment in prostate cancer cells.

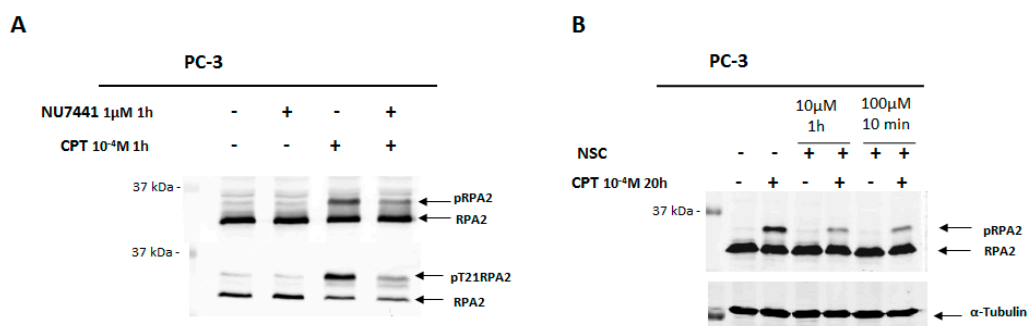


Figure 3. Assessment of DNA-PKs activity through phosphorylation of a substrate protein RPA2 in PC-3 cells exposed to NSC. (A) PC-3 cells were incubated with 1 μ M NU7441 (DNA-PKs inhibitor) for 1 h, and then incubated with 100 μ M CPT (topoisomerase I inhibitor) for 1 h. Phosphorylated forms of RPA were detected with anti-RPA2 and anti-pT21-RPA2; (B) After pre-incubation of serum-starved cells with 10⁻⁴ M CPT for 20 h and further incubation with 10 μ M NSC for 1 h or 100 μ M NSC for 10 min, the DNA-PKs activity was analyzed by comparing the fluorescent intensity of phosphorylated RPA2 (hyperphosphorylation status) with anti-pT21-RPA2 antibody. α -Tubulin was used as an internal control.

2.4. Exposure to NSC Promotes Protein Ubiquitination

Previously, we showed that tyrosine phosphorylation (Tyr774) of the adaptor protein c-CBL located downstream of EGFR in the ubiquitination cascade was slightly increased in breast cancer cells shortly after exposure to compound NSC [25]. The proteasome-mediated proteolytic pathway is characterized by polyubiquitin chain formation on target proteins [27]. To find out whether the decrease in the amount of DNA-PKs in cells after exposure to NSC is related to protein degradation, total protein ubiquitination was compared in non-treated and treated cells. Cell lysates of the samples obtained after exposure to NSC or EGF (control) were analyzed by Western blotting using an anti-ubiquitin antibody. It was observed that a 5-min and 10-min exposure to NSC in PC-3 or DU145 cells increased the fluorescence intensity of protein bands, especially for the higher molecular weight proteins, compared to control cells and those having been exposed to the peptide ligand EGF (Figure 4). The ubiquitination level was more pronounced in PC-3 cells than in DU145 cells.

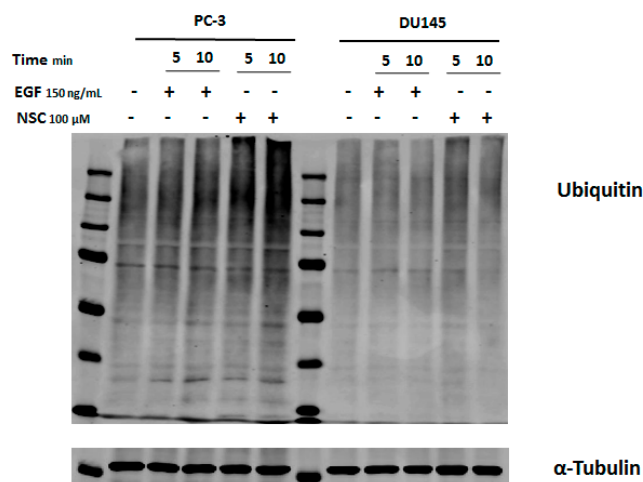


Figure 4. Assessment of protein ubiquitination in cancer cells exposed to EGF and NSC. Serum-starved PC-3 and DU145 cells were exposed to NSC (100 μ M), or to EGF (150 ng/mL) for 5 or 10 min. Cell lysates were analyzed with anti-ubiquitin antibody recognizing ubiquitinated sites in proteins.

These results show that NSC exposure rapidly promotes protein ubiquitination, which can activate the cellular proteasome and further degradation of DNA-PKcs.

2.5. NSC Inhibits DNA-PK Activity Differently from a Proteasome Inhibitor

To better understand the mode of modulation of DNA-PKcs activity by NSC, protein degradation was inhibited by pre-incubation of cells with a specific proteasome inhibitor. Previously, it was shown that the compound MG-132 suppresses CPT-induced DNA-PKcs autophosphorylation, which is specifically regulated by the proteasome in response to CPT [28]. PC-3 cells were incubated with one of these compounds, *i.e.*, CPT, NSC, or MG-132, or pretreated with CPT and then exposed to NSC or MG-132, or treated consecutively with NSC and then MG-132 (Figure 5). CPT treatment alone enhanced the phosphorylation of RPA2, as observed for the p-RPA2 intermediate and hyperphosphorylated forms, and increased ATM phosphorylation, but did not affect the amount of DNA-PKcs synthesized in the cells (Figure 5A, lane 3). As expected, incubation of cells with MG-132 strongly inhibited RPA2 phosphorylation in the CPT-pretreated culture (Figure 5A, lane 6) and a similar inhibition was detected after NSC exposure (Figure 5A, lane 7). Moreover, exposure to MG-132 or NSC decreased the phosphorylation level of ATM in CPT-pretreated cells. However, as judged by comparing the signal intensity recorded from the DNA-PKcs band in different samples, MG-132 pretreatment prevented the NSC-promoted decline in this key repair protein in the cells (Figure 5A, lane 5). The suppression of the action of NSC by the proteasome inhibitor is consistent with the assumption that NSC results in the degradation of DNA-PKcs through proteasome activation in cells. CPT-associated NSC treatment also decreased the ATM phosphorylation level (Figure 5A, lane 7), thus confirming the effect of NSC on the PIKK protein family.

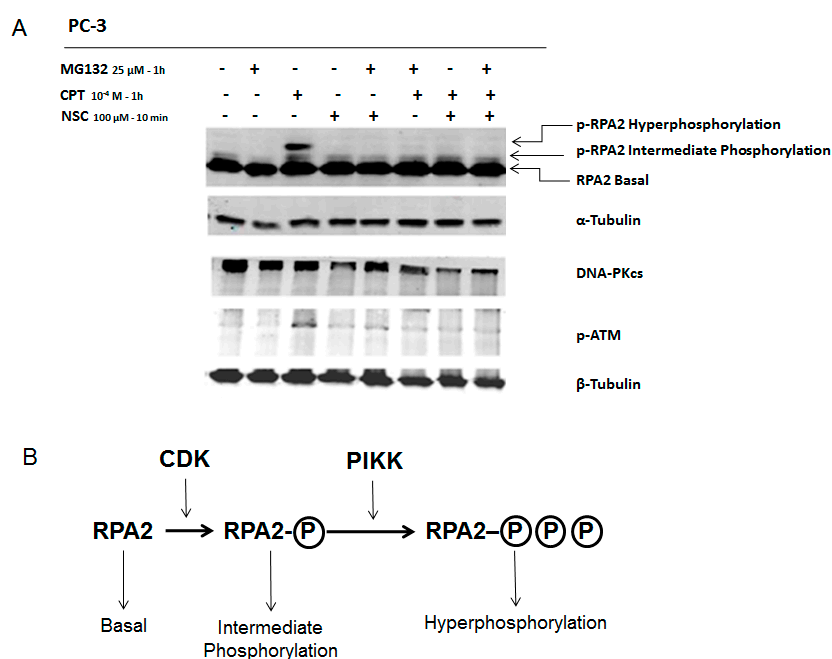


Figure 5. Response of DNA-PKcs and ATM to exposure to NSC and proteasome inhibitor MG-132 in CPT-treated PC-3 cells. **(A)** Serum-starved cells were incubated with 10⁻⁴ M CPT alone for 20 h and further exposed to NSC (100 μ M for 10 min) or MG132 (25 μ M for 1 h) alone or successively to the two compounds. Two phosphorylated forms of RPA2 are indicated; hyperphosphorylated and intermediate phosphorylated, which present high and middle bands, respectively. α -Tubulin was used as an internal control; **(B)** Schematic presentation of RPA2 phosphorylation routes through Cyclin-dependent kinases (CDKs) and PIKKs. CDKs contribute to RPA2 phosphorylation in a cell cycle-specific manner. Hyperphosphorylation of RPA2 is dependent on PIKKs, including ATM and DNA-PKcs.

2.6. Thioglycerol Prevents the Action of NSC on DNA-PKcs

When this study was nearing completion, we revealed that the enhanced phosphorylation of EGFR by NBD compounds is a result of the generation and action of hydrogen peroxide on the receptor in breast cancer cells [29]. In particular, it was shown that lipophilic NBD compounds rapidly bind to intracellular Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) and thereby induce its dimerization and the production of H₂O₂ in cells. Pre-incubation of cells with thioglycerol prevented SOD1 dimerization, and the inactive enzyme was no longer able to convert the superoxide ion into H₂O₂.

To ascertain whether ROS are involved in the modulation of DNA-PKcs expression, the PC-3 culture was first pretreated with thioglycerol for 30 min and then exposed to NSC for 5 or 15 min. Western-blot analysis showed that pre-incubation with the antioxidant almost completely restored the amount of DNA-PKcs after 5-min of exposure to NSC, which was still clearly visible after 15-min of exposure (Figure 6). It is noteworthy that the preventative effect of thioglycerol was accompanied by the complete disappearance of SOD1 dimers. Besides, the decrease in the amount of DNA-PKcs after pretreatment with thioglycerol was also accompanied by a decrease in the proteasome-specific bands after 15-min of exposure to NSC that was not yet visible after 5-min of exposure. Meanwhile, the amounts of the proteins Ku70 and gamma-H2AX remained unchanged in the cells pre-incubated with thioglycerol, regardless of exposure to NSC.

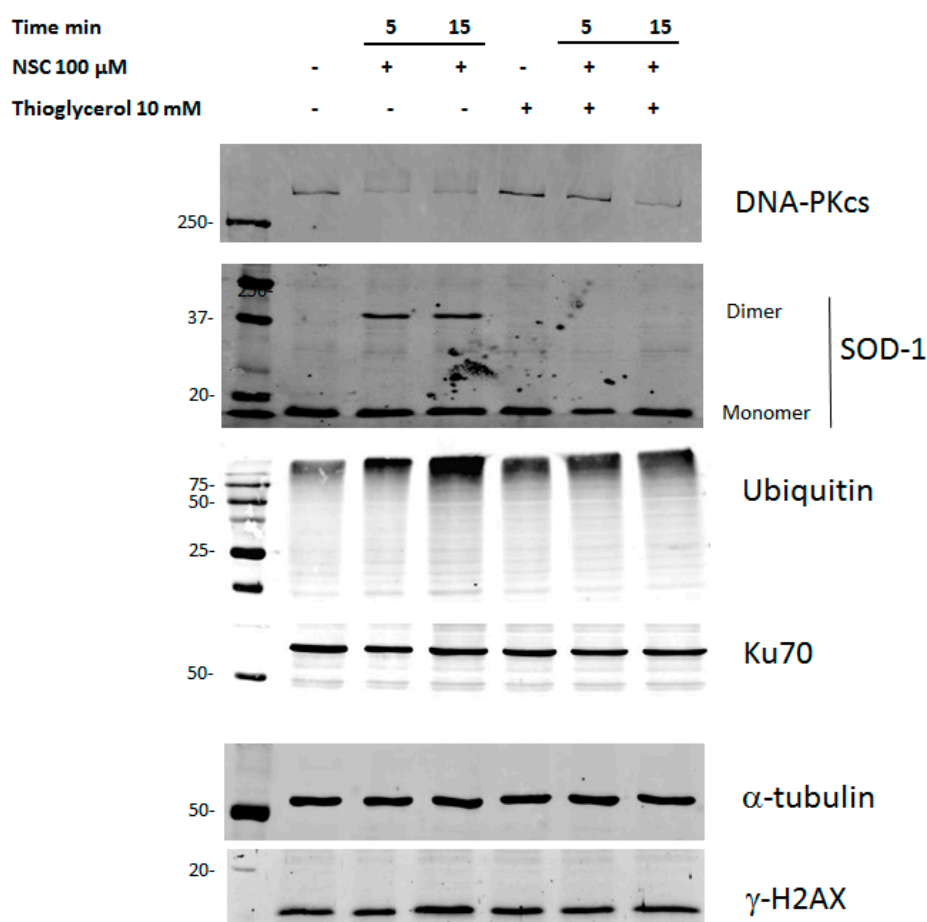


Figure 6. Pre-incubation with thioglycerol restores the level of DNA-PKcs by preventing dimerization of SOD1 in cancer cells exposed to NSC. PC-3 cells were pre-incubated with 10 mM thioglycerol for 15 min then incubated with 100 μ M NSC for 5 or 10 min. Proteins were analyzed by Western blotting with the corresponding antibodies to detect DNA-PKcs, anti-SOD-1, ubiquitinated targets and γ H2AX. Ku70 was used as a negative control (see above) and α -tubulin as a loading control.

To confirm the role of SOD1 in the diminution of DNA-PKcs expression after exposure to NSC, we addressed MDA MB468 breast cancer cells, in which SOD1 was the knockdown with siRNA [29]. Western blotting revealed the presence of two bands corresponding to DNA-PKcs monomer and dimer forms (or large complexes formed with other partners) in cells transfected with SOD1 siRNA or scrambled siRNA (Figure S4). The amount of DNA-PKcs monomer forms prevails over dimers in cells treated with vehicle, whereas the amount of DNA-PKcs dimers prevails over monomers after exposure to NSC. However, the amount of both forms of DNA-PKcs was remarkably lower in cells transfected with scrambled siRNA than with SOD1 siRNA after exposure to NSC. The diminution in the level of DNA-PKcs in cells exposed to NSC correlated with the dimerization rate of SOD1 (see Figure S4). Thus, these data indicate that the decrease in the level of DNA-PKcs occurs via rapid dimerization of SOD1 by NSC. SOD1 is required to produce hydrogen peroxide, which is the reactive oxygen species that modulates the expression level of DNA-PKcs.

2.7. NSC Can Sensitize Cancer Cell Lines to Camptothecin-Mediated DNA Damage

DNA-PKcs has been widely used as a target to sensitize cancer cells to small molecules exhibiting anticancer potency [30–32]. Given that exposure to NSC attenuated the kinase activity of DNA-PK in PC-3 cells pretreated with CPT (see above), it was tempting to improve the sensitivity of prostate cancer cells to the topoisomerase I poison by pre-incubation of cells with NSC.

The viability of cancer cells was determined by incubating PC-3 and DU145 cells with different concentrations of NSC for 72 h. This resulted in a significant reduction in the survival of cells with IC_{50} values of 2.65 μ M and 1.25 μ M for PC-3 and DU145 cells, respectively (Figure 7). PC-3 cells were more resistant to NSC exposure and were characterized by a higher amount of DNA-PK protein in comparison to DU145 cells (see Figure 1A,B).

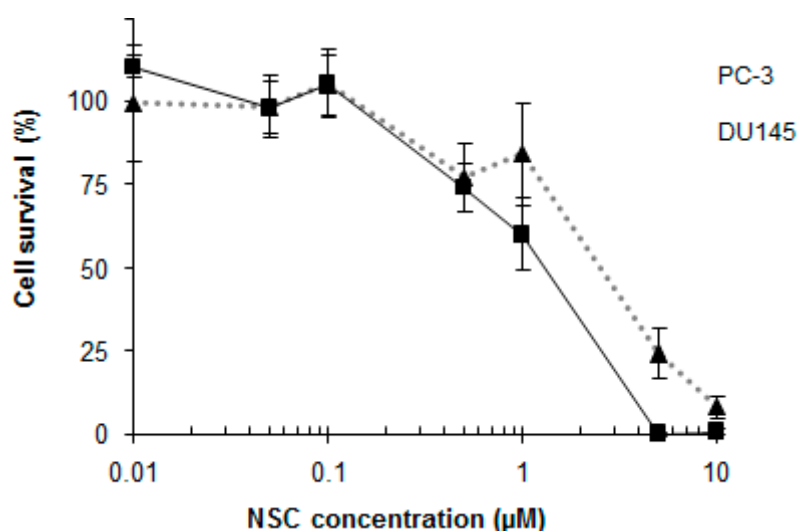


Figure 7. PC-3 and DU145 cell survival is dose-dependent in NSC-treated cells. PC-3 cells (dashed gray line) and DU145 cells (black line) were incubated with different concentrations of NSC for 72 h and cellular viability was measured by the MTT method. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of NSC was calculated by nonlinear regression analysis using GraphPad Prism software. The bars represent the mean \pm SD of 3 independent experiments.

Next, PC-3 cells were treated with 100 μ M NSC for 10 min and then incubated with CPT for 48 h. Cell viability was assessed by the MTT method. As shown in Figure 8, CPT treatment after exposure to NSC decreased the viability of PC-3 cells in comparison with CPT treatment alone. This chemosensitizing effect was especially pronounced at 1 μ M CPT. The ability of NSC to increase the cytotoxicity of CPT in PC-3 cells leads us to suggest that this small compound acts through the

modulation of DNA-PKcs functions and levels, apparently by altering the NHEJ repair system in cells sensitized by camptothecin. However, the sensitization of PC-3 cells by NSC could be related with targeting other vital proteins.

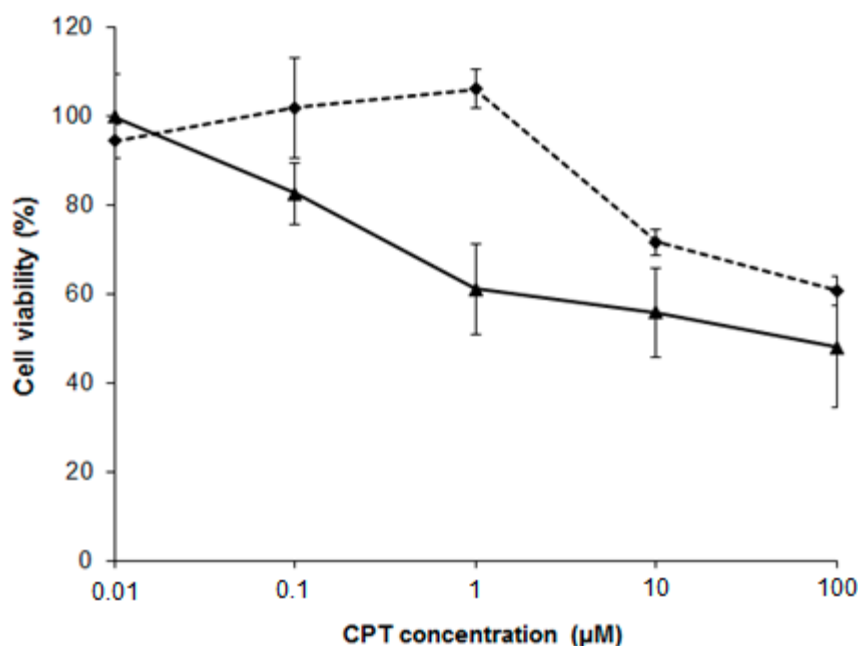


Figure 8. NSC pretreatment improves the cytotoxic effect of camptothecin on PC-3 cells. Cells were pretreated with 100 µM NSC for 10 min (solid line) or untreated (dashed line), washed, and further exposed to camptothecin at different concentrations for 48 h.

3. Discussion

Recently, we have described a new class of nitro-benzoxadiazole derivatives, which activate EGFR and thereby trigger downstream signaling circuits in the cytoplasm and apparently in the nucleus of breast cancer cells [25]. Here, we show that exposure of prostate cancer cell lines DU145, and especially PC-3, to the compound NSC rapidly (within 5–10 min) reduced the amount and activity of DNA-PKcs protein. Exposure to NSC sensitized prostate cancer cells to camptothecin-mediated DNA damage in a time-dependent manner. The decrease in the amount of DNA-PK protein is not related to the delocalization of DNA-PK subunits into the nucleus, unlike in EGF-induced cells [20]. In contrast, this decrease is accompanied by a nuclear delocalization of DNA-PKcs into the cytoplasm, which probably promotes rapid protein ubiquitination in cells exposed to NSC compared to a cognate ligand EGF. Therefore, ubiquitin-mediated degradation of DNA-PKcs, the key partner of NHEJ, might affect the functions of the protein required for interactions with DNA and other repair proteins.

DNA-PKcs is involved in the phosphorylation of a range of substrates, including H2AX, p-53, RPA, and Artemis [4]. DNA-PKcs undergoes autophosphorylation within two distinct regions known as the ABCDE (T2609, S2612, T2620, S2624, T2638, and T2647) and PQR (S2023, S2029, S2041, S2051, S2053, and S2056) clusters [11–14]. Mutations of these phosphorylation sites result in ablated DSBs repair and radiosensitivity *in vitro* and *in vivo*, suggesting that the autophosphorylation of DNA-PKcs is critical for NHEJ efficiency. It therefore seems that other kinases are involved in its phosphorylation, the main one being ATM, a member of the PIKK protein super family [33]. In addition, ATR is responsible for the phosphorylation of T2609 and T2647 but phosphorylation of these residues, in contrast to that of serine 2056, is not an appropriate marker for the activation of DNA-PKcs [33–36]. It is worth noting that all three proteins, *i.e.*, ATM, ATR, and DNA-PK, are considered sensors of primary DNA damage rather than inducible downstream effectors of DNA damage signaling [6,7].

In this study, a remarkable diminution in RPA2 phosphorylation was observed upon NSC treatment combined with CPT, indicating that the nitro-benzoxadiazole scaffold attenuates DNA-PKcs kinase activity. Moreover, ATM phosphorylation (S1981) decreased upon NSC exposure in response to DNA damage. Because of the low yield of DNA-PKcs phosphorylated protein forms, DNA-PKcs activity was assessed by the phosphorylation rate of its substrate, RPA2, when cells were induced by a selective topoisomerase I poison, CPT [26]. It has been demonstrated that RPA2 can be phosphorylated in two ways: by a cyclin-dependent kinase (CDK) and by PIKKs (Figure 5B). CDKs contribute to RPA2 phosphorylation in a cell cycle-specific manner [28]. In addition, several PIKKs, including ATM and DNA-PK, are involved in the hyperphosphorylation of RPA2 [37,38]. The analysis of the phosphorylated bands of RPA2 indicates that MG-132 suppresses RPA2 phosphorylation by PIKKs (absence of a hyperphosphorylated RPA2 band in Figure 5A, lane 6, and explained in Figure 5B), but not by CDK in CPT-treated cells, in agreement with the observations of other authors [28]. This is also supported by findings that MG-132 pretreatment prevents RPA2 phosphorylation by CDK after further exposure to NSC in CPT-incubated cells; on the contrary, when MG-132 is added to CPT-incubated cells after NSC exposure, RPA2 phosphorylation by CDK is suppressed (Figure 5C). These results suggest that NSC modulates CDK activity in addition to DNA-PKcs by the proteasome machinery in cancer cells.

We have recently shown that lipophilic NBD compounds rapidly move through the cytoplasm membrane and bind to Cu/Zn SOD1 leading to dimerization of the protein [29]. Stable dimers of SOD1 are active and produce H_2O_2 that, in the absence of adequate modulation of catalase and peroxidase activities, is accumulated within exposed cells (*ibid*). Note that hydrogen peroxide promotes sulfonylation of a cysteine in the catalytic site of the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B), leading to the inactivation of the enzyme [39], and also promotes the sulfonylation of a cysteine in the catalytic site of EGFR leading to the activation of the enzyme [40]; hence, both enzymes determine the phosphorylation status of the receptor in cells. Therefore, the enhanced phosphorylation of EGFR is a result of hydrogen peroxide action on the catalytic site of EGFR and that of PTP-1B in cells exposed to NBD compounds [29].

Similarly, our data highlight that hydrogen peroxide is generated and accumulates during redox transformation of the NBD compounds [29,41], and is involved in the decline in the level and activity of DNA-PKcs in prostate cancer cells. In fact, given that thioglycerol prevents SOD1 dimerization by NSC, the inactive enzyme cannot convert superoxide ions into H_2O_2 and, therefore the amount of DNA-PKcs is almost restored in cells. This data is supported by SOD1 RNA interference in breast cancer cells. Thus, we conclude that rapid modulation of this DNA-repair protein by NSC is primarily related to the action of reactive H_2O_2 , without involvement of EGFR functions.

Several scenarios can be suggested to explain the decrease in DNA-PKcs level in prostate cancer cells due to the action of H_2O_2 , which is rapidly accumulated within cells exposed to NSC. Firstly, large quantities of intracellular H_2O_2 could immediately and directly target and degrade DNA-PKcs; Secondly, hydrogen peroxide stimulates protein degradation by up-regulation of the ubiquitin system [42]. In particular, it causes down-regulation of DNA-PKcs, which involves trapping the DNA-topoisomerase II complex and the induction of DNA double-strand breaks in salivine-treated cells [43]. In this context, the cellular proteasome, which is activated by NSC, could essentially contribute to the degradation of DNA-PKcs and other DNA repair protein targets; Thirdly, the reduction of the nitro group in NBD compounds during redox cycling results in the formation of two types of reactive molecules, *i.e.*, ROS and electrophilic NBD intermediates [29,41].

Therefore, the decrease in the level of DNA-PKcs could be caused by electrophilic intermediates of NSC during redox transformations. The binding of electrophiles to the protein-protein interaction interface of DNA-PKcs could lead to the dimerization of the protein or the formation of a protein complex with other partners. Such a large and stable protein complex is degraded as could be suggested from observations in cells transfected with scrambled siRNA. Lastly, a reduction in the amount of DNA-PKcs might be caused by other factors that still need to be identified. In any event, the function

of DNA-PKcs, one of the key players in DNA repair, would be impaired, along with impaired functions of SOD1 and EGFR, which must lead to aberrant signaling and aggravate oxidative and electrophilic stress in cells exposed to NBD compounds, and probably to some reactive environmental pollutants.

Due to its broad protective role, alterations in DNA-PK activity correlate with a variation in cell survival after radio- and chemotherapy, making this protein of great interest as a promising target for drug development [15]. Given that cell exposure to NSC affects proteins important in DNA damage signaling, it is plausible that a DNA repair defect may contribute to enhancing the cytotoxicity of damaging agents like topoisomerase I poisons. In this context, we have shown that exposure to NSC sensitizes PC-3 cells to CPT treatment. It is known that the activation of DNA-PK by CPT is strictly S-phase specific, suggesting that DNA-PK might promote NHEJ repair of CPT-induced damage in the S phase. Although the overall contribution of NHEJ to genomic stability in the S phase is still not clear, several reports have shown that DNA-PKcs-deficient cells are sensitive to UV and CPT [26,44], implying that DNA-PK might be required for stalled fork repair through HR or checkpoint activation, which is necessary for cell survival. In addition to its role in NHEJ repair, DNA-PKcs is also involved in the oxidative clustered DNA lesion repair [45] that could explain the ROS-mediated effect of NSC.

Further studying the action of reactive NBD compounds on DNA repair and related functions could help in elucidation of the complexity of events involved in the sensitization of cancer cells to anticancer agents.

4. Experimental Section

4.1. Chemicals and Antibodies

NSC 228155 (NSC) was obtained from the Drug Synthesis and Chemistry Branch of NCI (Figure S1). Camptothecin (CPT), NU7441, MG132 and thioglycerol were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). The anti-ATM and anti-RPA2 antibodies were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The anti-phospho(T21)RPA and anti-phospho(S2056)DNA-PKcs antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK); all others were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

4.2. Cell Culture

The prostate cancer cell lines, PC-3 and DU145, were grown in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) containing 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. If necessary, PC-3 and DU145 cells ($1.0\text{--}1.2 \times 10^6$ /mL) were serum-starved for 24 h, then seeded into 60-mm culture dishes and treated with NSC alone or MG132 or camptothecin for the desired periods as described below.

4.3. Cell Viability Assay and Chemical Treatments

Cell viability was assessed by the MTT assay (Sigma) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded at 5×10^3 /well in a 96-well plate for 18 h, and then incubated in serum-starved RPMI 1640 medium for 24 h. Cell cultures were then treated with increasing concentrations of NSC for 72 h. MTT was added to each well for 2 h, before being aspirated and replaced with DMSO. The absorbance was recorded at 560 nm with a spectrophotometer system (Tecan, Männedorf, Switzerland). Results were analyzed using Microsoft Excel by standardizing treated groups to the untreated control. The IC₅₀ was determined as the compound concentration leading to 50% growth inhibition.

Cells were also treated with 0.1 mM camptothecin (CPT) for 2 h at 37 °C or 10 µM MG132 for 1 h at 37 °C and then exposed to NSC as described in the corresponding sections. The ROS effect was investigated on cells pre-incubated with 10 mM thioglycerol for 15 min before exposure to 100 µM NSC for 5 or 15 min.

4.4. Western Blotting

Cells were washed twice with ice-cold PBS and then lysed in lysis buffer (NP-40) on ice for 30 min. The soluble fraction of proteins was collected by centrifugation at $13,000\times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The protein concentration was determined with the Bicinchoninic acid protein assay kit (BioRad, Hercules, CA, USA) and samples were either used immediately for assays or stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Equal amounts of cellular lysate proteins ($40\text{ }\mu\text{g}$ of total proteins) were separated by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Membranes were blocked for 1 h in 0.1% TBS-Tween 20 containing 2.5% BSA and then incubated with mouse monoclonal antibodies (anti-DNA-PKcs, anti-RPA2, anti-tubulin) or rabbit antibodies (anti-pATM, anti-ubiquitin). Protein bands were resolved by fluorescence with anti-mouse Alexa-Fluor680 or anti-rabbit Alexa-Fluor680 secondary antibodies (Life Technologies-Invitrogen). The signal intensity ($\text{pixel}\cdot\text{mm}^{-2}$) of protein bands was quantified using Odyssey software version 1.1 (Li-COR, Biosciences, Lincoln, NE, USA). α -Tubulin was used as a loading control.

4.5. Immunofluorescence Microscopy

Cells were grown on coverslips (Life Technologies) at a density of 5×10^3 cells per well in medium (RPMI) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco-Invitrogen) as described above, then serum-starved for 24 h and treated with NSC for 10 min. Cells were washed once in PBS for 5 min and fixed with 4% paraformaldehyde in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 for 10 min. After three 5-min washes in PBS, cells were permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 for 30 min, washed three times in PBS for 5 min, and then blocked in 2% BSA in PBS at room temperature for 25 min. The fixed cells were incubated overnight in the same buffer containing 1:100 diluted anti-DNA-PKcs antibody at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. After three 5-min washes in PBS, slides were incubated in a 1:400 TRITC anti-mouse fluorescent secondary antibody solution (Jackson, Lansing, MI, USA) for 1 h at room temperature in the dark. The slides were washed three times in PBS, counterstained and mounted with ProLong Antifade with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Life Technologies) and coverslips were applied. The slides were viewed with a confocal microscope (Nikon A1RSi, Minato-ku, Tokyo, Japan) and epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E800). The images were recorded with NIS Element software (Version 3.6, Nikon, Tokyo, Japan) and processed with the software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). The specificity of the antibody staining was confirmed by incubating the adjacent sections in the absence of the primary antibody.

4.6. Statistical Analysis

The results represent the average and standard deviation of three independent experiments. Data are presented as means \pm standard error of mean. Differences between the control and the treated cells were assessed with the paired Student's *t*-test, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Data analysis was performed with Microsoft Excel.

5. Conclusions

Our results indicate that a reactive NBD compound rapidly and drastically reduces the level and activity of DNA-PKcs and, alters the DNA repair system in cancer cells. The mechanism of action relies on the generation of ROS and electrophilic species leading to the activation of protein degradation. Notably, that NBD compound sensitizes prostate cancer cells to camptothecin. Therefore, developing NBD derivatives that selectively target DNA-PKcs might be a promising way to sensitize cancer cells in order to improve the efficiency of anticancer agents from a therapeutic perspective.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/5/703/s1>.

Acknowledgments: Viviane Aline Oliveira Silva thanks Région Pays de la Loire for postdoctoral fellowship support. This work was initially funded by the Agence National de la Recherche grants ANR-07-RIB-012 and ANR-07-PNANO-051-02, and further funded by the Ligue Contre le Cancer (Comités 44 and 85).

Author Contributions: Viviane A. O. Silva, Florian Lafont, Houda Benhelli-Mokrani, Magali Le Breton, Philippe Hulin, Thomas Chabot, François Paris performed the experiments. Viviane A. O. Silva, Vehary Sakanyan, Fabrice Fleury wrote the manuscript. Fabrice Fleury designed and supervised the research. All authors reviewed the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM-Rad3 Related
CDKs	Cyclin-dependent kinases
CPT	Camptothecin
DNA-PKcs	DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
DSBs	DNA double-strand breaks
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
HR	Homologous Recombination
NBD	Nitro-BenzoxaDiazole
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NSC	4-Nitro-7-[(1-oxidopyridin-2-yl)sulfanyl]-2,1,3-benzoxadiazole
PIKK	Phosphatidylinositol 3' kinase-related kinases
PTP-1B	Protein Tyrosine Phosphatase 1B
RPA	Replication Protein A
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD1	Superoxide Dismutase 1

References

1. Hoeijmakers, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **2001**, *411*, 366–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Burma, S.; Chen, B.P.; Chen, D.J. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair* **2006**, *5*, 1042–1048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lieber, M.R.; Ma, Y.; Pannicke, U.; Schwarz, K. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair* **2004**, *3*, 817–826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Collis, S.J.; DeWeese, T.L.; Jeggo, P.A.; Parker, A.R. The life and death of DNA-PK. *Oncogene* **2005**, *24*, 949–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chan, D.W.; Mody, C.H.; Ting, N.S.; Lees-Miller, S.P. Purification and characterization of the double-stranded DNA-activated protein kinase, DNA-PK, from human placenta. *Biochem. Cell Biol.* **1996**, *74*, 67–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Abraham, R.T. PI 3-kinase related kinases: “Big” players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair* **2004**, *3*, 883–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bakkenist, C.J.; Kastan, M.B. Initiating cellular stress responses. *Cell* **2004**, *118*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kong, X.; Shen, Y.; Jiang, N.; Fei, X.; Mi, J. Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair. *Cell Signal.* **2011**, *23*, 1273–1280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lee, S.E.; Mitchell, R.A.; Cheng, A.; Hendrickson, E.A. Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 1425–1433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Lucero, H.; Gae, D.; Taccioli, G.E. Novel localization of the DNA-PK complex in lipid rafts: A putative role in the signal transduction pathway of the ionizing radiation response. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22136–22143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Chan, D.W.; Chen, B.P.; Prithivirajasingh, S.; Kurimasa, A.; Story, M.D.; Qin, J.; Chen, D.J. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2333–2338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cui, X.; Yu, Y.; Gupta, S.; Cho, Y.M.; Lees-Miller, S.P.; Meek, K. Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 10842–10852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ding, Q.; Reddy, Y.V.; Wang, W.; Woods, T.; Douglas, P.; Ramsden, D.A.; Lees-Miller, S.P.; Meek, K. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 5836–5848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Douglas, P.; Moorhead, G.B.; Ye, R.; Lees-Miller, S.P. Protein phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18992–18998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chen, D.J.; Nirodi, C.S. The epidermal growth factor receptor: A role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 6555–6560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kriegs, M.; Kasten-Pisula, U.; Rieckmann, T.; Holst, K.; Saker, J.; Dahm-Daphi, J.; Dikomey, E. The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA Repair* **2010**, *9*, 889–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hynes, N.E.; MacDonald, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mendelsohn, J.; Baselga, J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin. Oncol.* **2006**, *33*, 369–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Szumiel, I. Epidermal growth factor receptor and DNA double strand break repair: The cell's self-defence. *Cell Signal.* **2006**, *18*, 1537–1548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Golding, S.E.; Morgan, R.N.; Adams, B.R.; Hawkins, A.J.; Povirk, L.F.; Valerie, K. Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells. *Cancer Biol. Ther.* **2009**, *8*, 730–738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Bandyopadhyay, D.; Mandal, M.; Adam, L.; Mendelsohn, J.; Kumar, R. Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 1568–1573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Dittmann, K.; Mayer, C.; Fehrenbacher, B.; Schaller, M.; Raju, U.; Milas, L.; Chen, D.J.; Kehlback, R.; Rodemann, H.P. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31182–31189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dittmann, K.; Mayer, C.; Rodemann, H.P. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother. Oncol.* **2005**, *76*, 157–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Toulany, M.; Kasten-Pisula, U.; Brammer, I.; Wang, S.; Chen, J.; Dittmann, K.; Baumann, M.; Dikomey, E.; Rodemann, H.P. Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells *in vitro* by affecting DNA repair. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 4119–4126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sakanyan, V.; Angelini, M.; Le Behec, M.; Lecocq, M.F.; Benaiteau, F.; Rousseau, B.; Gyulkhandanyan, A.; Gyulkhandanyan, L.; Loge, C.; Reiter, E.; *et al.* Screening and discovery of nitro-benzoxadiazole compounds activating epidermal growth factor receptor (EGFR) in cancer cells. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Shao, R.G.; Cao, C.X.; Zhang, H.; Kohn, K.W.; Wold, M.S.; Pommier, Y. Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1397–1406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kouranti, I.; Peyroche, A. Protein degradation in DNA damage response. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2012**, *23*, 538–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Sakasai, R.; Teraoka, H.; Tibbetts, R.S. Proteasome inhibition suppresses DNA-dependent protein kinase activation caused by camptothecin. *DNA Repair* **2010**, *9*, 76–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sakanyan, V.; Hulin, P.; de Sousa, R.; Silva, V.; Hambardsumyan, A.; Nedellec, S.; Tomasoni, C.; Loge, C.; Pineau, C.; Roussakis, C.; *et al.* Activation of EGFR by small compounds through coupling the generation of hydrogen peroxide to stable dimerization of Cu/Zn SOD1. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

30. Davidson, D.; Amrein, L.; Panasci, L.; Aloyz, R. Small Molecules, Inhibitors of DNA-PK, Targeting DNA Repair, and Beyond. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Ma, C.C.; Li, H.; Wan, R.Z.; Liu, Z.P. Developments of DNA-dependent Protein Kinase Inhibitors as Anticancer Agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **2014**, *14*, 884–895. [[CrossRef](#)]
32. Dolman, M.E.; van der Ploeg, I.; Koster, J.; Bate-Eya, L.T.; Versteeg, R.; Caron, H.N.; Molenaar, J.J. DNA-dependent protein kinase as molecular target for radiosensitization of neuroblastoma cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0145744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chen, B.P.; Uematsu, N.; Kobayashi, J.; Lerenthal, Y.; Krempler, A.; Yajima, H.; Lobrich, M.; Shiloh, Y.; Chen, D.J. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 6582–6587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jiang, X.; Sun, Y.; Chen, S.; Roy, K.; Price, B.D. The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 15741–15746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mukherjee, B.; Kessinger, C.; Kobayashi, J.; Chen, B.P.; Chen, D.J.; Chatterjee, A.; Burma, S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair* **2006**, *5*, 575–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wu, P.Y.; Frit, P.; Malivert, L.; Revy, P.; Biard, D.; Salles, B.; Calsou, P. Interplay between Cernunnos-XLF and nonhomologous end-joining proteins at DNA ends in the cell. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31937–31943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Anantha, R.W.; Vassin, V.M.; Borowiec, J.A. Sequential and synergistic modification of human RPA stimulates chromosomal DNA repair. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35910–35923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sakasai, R.; Shinohe, K.; Ichijima, Y.; Okita, N.; Shibata, A.; Asahina, K.; Teraoka, H. Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinases in hyperphosphorylation of replication protein A2 in response to replication-mediated DNA double-strand breaks. *Genes Cells* **2006**, *11*, 237–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Salmeen, A.; Andersen, J.N.; Myers, M.P.; Meng, T.C.; Hinks, J.A.; Tonks, N.K.; Barford, D. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **2003**, *423*, 769–773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Paulsen, C.E.; Truong, T.H.; Garcia, F.J.; Homann, A.; Gupta, V.; Leonard, S.E.; Carroll, K.S. Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 57–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Patridge, E.V.; Eriksson, E.S.; Penketh, P.G.; Baumann, R.P.; Zhu, R.; Shyam, K.; Eriksson, L.A.; Sartorelli, A.C. 7-Nitro-4-(phenylthio)benzofurazan is a potent generator of superoxide and hydrogen peroxide. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 1613–1625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Li, Y.P.; Chen, Y.; Li, A.S.; Reid, M.B. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2003**, *285*, C806–C812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lu, H.R.; Zhu, H.; Huang, M.; Chen, Y.; Cai, Y.J.; Miao, Z.H.; Zhang, J.S.; Ding, J. Reactive oxygen species elicit apoptosis by concurrently disrupting topoisomerase II and DNA-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 983–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Muller, C.; Calsou, P.; Frit, P.; Cayrol, C.; Carter, T.; Salles, B. UV sensitivity and impaired nucleotide excision repair in DNA-dependent protein kinase mutant cells. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1382–1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Peddi, P.; Loftin, C.W.; Dickey, J.S.; Hair, J.M.; Burns, K.J.; Aziz, K.; Francisco, D.C.; Panayiotidis, M.I.; Sedelnikova, O.A.; Bonner, W.M.; *et al.* DNA-PKcs deficiency leads to persistence of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 1435–1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

New Phosphorylation Sites of Rad51 by c-Met Modulates Presynaptic Filament Stability

Thomas Chabot¹, Alain Defontaine², Damien Marquis¹, Axelle Renodon-Corniere³,
Emmanuelle Courtois¹, Fabrice Fleury^{1,*} and Yvonnick Cheraud¹

¹ Group of Mechanism and Regulation of DNA Repair, UFIP UMR CNRS 6286/University of Nantes, 44322 Nantes, France; thomas.chabot1@univ-nantes.fr (T.C.); damien.marquis@univ-nantes.fr (D.M.); emmanuelle.courtois@univ-nantes.fr (E.C.); yvonnick.cheraud@univ-nantes.fr (Y.C.)

² Group of Molecular Engineering and Glycobiology, UFIP UMR CNRS 6286/University of Nantes, 44322 Nantes, France; alain.defontaine@univ-nantes.fr

³ CRCINA, INSERM, CNRS, University of Angers, University of Nantes, 44007 Nantes, France; axelle.renodon-corniere@univ-nantes.fr

* Correspondence: fleury-f@univ-nantes.fr

Received: 15 February 2019; Accepted: 20 March 2019; Published: 23 March 2019



Abstract: Genomic instability through deregulation of DNA repair pathways can initiate cancer and subsequently result in resistance to chemo and radiotherapy. Understanding these biological mechanisms is therefore essential to overcome cancer. RAD51 is the central protein of the Homologous Recombination (HR) DNA repair pathway, which leads to faithful DNA repair of DSBs. The recombinase activity of RAD51 requires nucleofilament formation and is regulated by post-translational modifications such as phosphorylation. In the last decade, studies have suggested the existence of a relationship between receptor tyrosine kinases (RTK) and Homologous Recombination DNA repair. Among these RTK the c-MET receptor is often overexpressed or constitutively activated in many cancer types and its inhibition induces the decrease of HR. In this study, we show for the first time that c-MET is able to phosphorylate the RAD51 protein. We demonstrate in vitro that c-MET phosphorylates four tyrosine residues localized mainly in the subunit-subunit interface of RAD51. Whereas these post-translational modifications do not affect the presynaptic filament formation, they strengthen its stability against the inhibitor effect of the BRC peptide obtained from BRCA2. Taken together, these results confirm the role of these modifications in the regulation of the BRCA2-RAD51 interaction and underline the importance of c-MET in DNA damage response.

Keywords: RAD51 recombinase; HGFR kinase; post-translational modification; DNA repair; cancer outcomes

1. Introduction

The study of the mechanisms of DNA repair is a major challenge in the fight against cancer. Indeed, these mechanisms are often exacerbated in cancer cells. Thus, they provide radio- and chemotherapy resistance properties. Understanding DNA repair pathways allows us to consider new methods to limit this phenomenon in order to reduce tumor progression.

Homologous recombination (HR) is one of the mechanisms of DNA repair. Very well preserved during the evolution, it allows faithful repair. It is a precise and highly complex mechanism that is finely regulated. It involves many proteins whose central actor is the RAD51 recombinase. RAD51 is distributed between the cytoplasm and the nucleus but its nuclear translocation is increased in response to DNA damage with the help of the BRCA2 protein [1,2]. Following a double strand break (DSB), the resection of the 5' end forms free 3' end on which RAD51 is placed. Search and hybridization

of the single-stranded end with the homologous sequence is ensured by the formation around the DNA of a RAD51-ATP filament essential for faithful repair [3,4]. This helical nucleofilament consists of a set of RAD51 monomers polymerized around the DNA. HR is ensured by the double association: monomer-monomer and protein-DNA.

The activity of RAD51 is precisely regulated by post-translational modifications (PTM) as well as by its association with other protein partners such as BRCA2 [5]. Among these PTMs, phosphorylation plays a major role in the regulation of the recombinase activity and may be involved in cell cycle regulation, chemoresistance and DNA damage response (DDR). Different phosphorylation sites on human RAD51 have already been identified and can involve the serine, threonine or tyrosine residues.

Indeed, a sequential phosphorylation of RAD51 on S14 by CK2 and then on T13 by Plk1 has been proven demonstrated [6]. This double phosphorylation appears to be essential for the interaction with NSB1 partner and for the recruitment of RAD51 to DNA damage sites.

Similarly, RAD51 phosphorylation on T309 by Chk1 seems to be required for the formation of RAD51 nuclear foci on DNA damage site. Interestingly, the absence of this phosphorylation increases cell sensitivity to DNA damage suggesting the importance of these PTM in the DDR biological process [7].

Actually, only one tyrosine kinase family has been described to phosphorylate RAD51 and it concerns c-ABL or its oncogenic fusion protein BCR/ABL which are able to phosphorylate RAD51 on Y315 and Y54 residues. Thus, the phosphorylation of RAD51 by c-ABL modulates its recruitment on DSB sites and its strand exchange activity [8]. In cellular context, phosphorylation of tyrosine 315 seems to promote the formation of RAD51 nucleofilament foci at the DSB site and also its nuclear translocation within the cell in response to DNA damage [9]. By using phosphomimetic approach, Subramanyam et al., have demonstrated in vitro that Y54 phosphorylation promotes RAD51 activity while Y315 phosphorylation seems to have little effect on RAD51 activities [10]. From our previous work, we have provided evidence that the phosphorylation of RAD51 by c-ABL was sequential on Y315 then Y54 which may play a pivotal role in the regulation of HR by modulating the first step of recombinase activity [8,11].

Several studies suggest that the HR pathway is modulated by receptor tyrosine kinases (RTK). For example, the inhibition of EGFR, overexpressed in many cancers, leads to a decrease in homologous recombinant repair by acting on the Ras/Raf or IRS1 [12]. Another member of the RTK family is described to affect HR, the c-MET membrane receptor (HGFR) [13,14].

HGFR is expressed in a large number of cell types (epithelial, endothelial, neural...) and plays a role mainly in embryonic development but also in carcinogenesis. It is activated by its HGF ligand, which is mainly expressed in the placenta. Ligand binding allows dimerization of the receptor and leads to its autophosphorylation on intracellular tyrosines of the receptor. This autophosphorylation triggers the tyrosine kinase activity of the receptor. Then, many signaling channels are activated in the cell. They affect mostly cell proliferation and survival.

The overexpression or the presence of constitutive mutations of the c-MET receptor, but also the overexpression of the ligand in many human cancers such as carcinomas, sarcomas and glioblastomas is related to significant morbidity [15–18]. In addition, c-MET and EGFR are able to heterodimerize to induce cross-activation of the two receptors by one of the two ligands, resulting in an even greater number of activated signaling pathways [19]. Finally, endocytosis of the c-MET tyrosine kinase receptor is also observed following its activation that would explain the phosphorylation of cytosolic proteins [20]. With regard to the homologous recombination repair mechanism, it has been shown that c-MET inhibition decreases the formation of the RAD51/BRCA2 complex [13] to lead to a reduction in HR DSB repair. Other experiments have also shown that the use of c-MET phosphorylation inhibitors reduces the half-life of proteins that play a role in DNA repair, such as RAD51 [21].

Our study shows, for the first time, the existence of a direct link between RAD51, the key protein for DNA repair by HR, and a membrane receptor with tyrosine kinase activity, c-MET. By combining in vitro and in silico approaches, we show that c-MET is able to phosphorylate RAD51 on

several tyrosine residues. These phosphorylations are closely related to the oligomeric state of RAD51 and to its interaction with the BRC motif of BRCA2. Our results suggest that c-MET-mediated RAD51 phosphorylation could play a potential role in the BRCA2-dependent regulation of RAD51.

2. Results

2.1. c-MET Kinase Is Able to Phosphorylate RAD51 in Vitro

To evaluate the phosphorylation of RAD51 in vitro, we used purified RAD51-WT recombinant proteins and the C-terminal catalytic domain of c-MET. This catalytic domain is indeed constitutively active even in the absence of the HGF ligand because tyrosines of the catalytic domain are phosphorylated [22]. Interestingly, HGF ligand binding promotes dimerization and cellular internalization of the receptor which is then degraded in the cell [23]. Moreover the presence of the C-terminal domain of c-MET receptor into the nucleus has been shown [22] that supports our biochemical approach. In the Figure 1, the anti-phosphotyrosine does not recognize RAD51 in absence of c-MET or in presence of denatured c-MET, confirming the absence of phosphorylated RAD51 form. In addition, purified RAD51 proteins were expressed in bacterial system (*E. coli*) that ensures the production of non-phosphorylated RAD51.

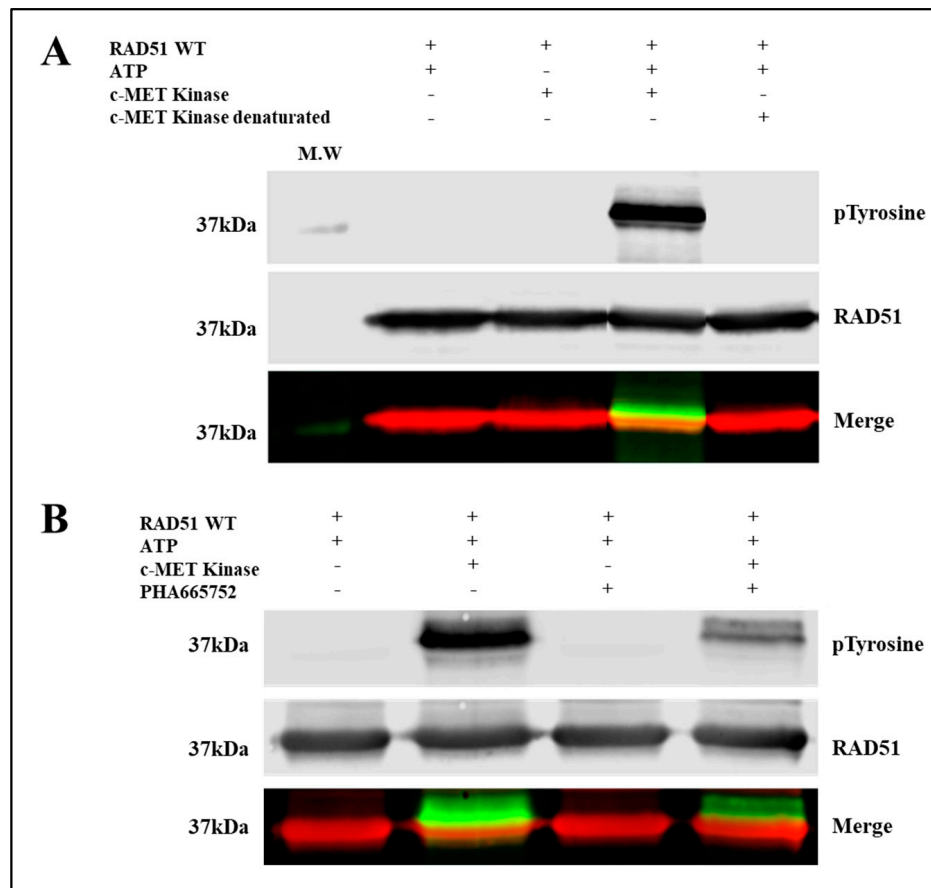


Figure 1. c-MET phosphorylates RAD51 in vitro. (A) Purified RAD51 WT protein (10 μ M) was incubated with ATP (2 mM) and with or without the active C-terminal part of the c-MET kinase (0.1 μ M). Then the proteins were separated by SDS-PAGE 12% gel and analyzed by western blot using antibodies (red: anti-RAD51, green: anti-phosphotyrosine) (M.W: molecular weight). (B) The same experiment was performed with or without a specific c-MET kinase inhibitor, PHA665752 (1 μ M). Each of the experiments was conducted three times independently ($n = 3$) and the blots presented above correspond to a representative experiment.

Immunoblot analysis showed a significant increase in the phosphorylation state of a protein at 37 kDa, revealed by both the anti-phosphotyrosine antibody and the antibody directed against the RAD51 protein (Figure 1A). This superposition of signals suggests that the c-MET kinase phosphorylates the RAD51 protein in the presence of ATP. The absence of kinase or the use of inactivated kinase by thermal denaturation or the absence of ATP leads to the disappearance of the phosphorylated form of RAD51 confirming the direct phosphorylation of the RAD51 protein by the c-MET kinase *in vitro*.

A specific c-MET kinase inhibitor, PHA665752, was also used to test the specificity of this phosphorylation. PHA665752 is a competitive ATP inhibitor that fits into the ATP pocket of the c-MET receptor at residues I1084-K1110 [13]. A significant decrease of approximately 60% in the phosphorylation level of the RAD51 protein was observed when 1 μ M inhibitor was used (Figure 1B). These results confirm that phosphorylation of RAD51 is directly related to c-MET activity. RAD51 is therefore a substrate that is recognized and phosphorylated by the c-MET kinase *in vitro*.

2.2. c-MET Phosphorylates Four Tyrosines on RAD51

Figure 1 shows the presence of several phosphorylated RAD51 delayed bands suggesting the existence of several phosphorylations of RAD51. Therefore, we found it is interesting to identify the number and positions of tyrosines phosphorylated by c-MET.

We first used several phosphorylation prediction softwares (see Materials and Methods section). The results suggest that among all RAD51 tyrosines, six are potentially phosphorylatable by c-MET: Y159, Y178, Y191, Y205, Y301 and Y315.

To verify and validate these bioinformatic prediction results, two experimental approaches were used, the first by site-directed mutagenesis of tyrosine residues of RAD51 and the second by mass spectrometry.

Using site-directed mutagenesis, each tyrosine residue of interest was replaced by a phenylalanine residue. This leads to the production and purification of non-phosphorylatable RAD51 mutants with a purity of over 95% (Figure S1). Indeed, the replacement of a tyrosine residue with a phenylalanine residue makes the addition of a phosphate group to this residue impossible. In addition, the structure of these two aromatic residues is extremely close, consequently the secondary structure of the mutant proteins remains identical to the wild form. Moreover, we verified the conservation of the secondary structure of all the mutants by circular dichroism and we confirmed the absence of structural changes of the mutated forms compared to the wild form (Figure S2).

Each of the mutant and wild type proteins tagged with a Histidine tag was produced in *E. coli* BL21-DE3 bacteria and then purified on a NiNTA column. After the production of 11 proteins (mutants and wild type), *in vitro* phosphorylation assays using the c-MET kinase were performed (Figure 2).

The phosphorylation signals, revealed by the anti-phosphotyrosine antibody, were qualified. We observed a significant decrease of phosphorylation of about 25% for 4 non-phosphorylatable Y/F mutants, compared to the wild-type RAD51 protein. The mutated tyrosines were Y159, Y205, Y191 and Y315.

The second approach was to confirm the phosphorylation of these sites on the RAD51 protein by mass spectrometry (MS). A migration of RAD51 phosphorylated by c-MET was carried out on SDS-PAGE gel. Staining with Coomassie blue G-250 allowed the identification of the bands which were then stored in a H₂O/Acetic acid 10% medium. MS analysis confirmed the phosphorylation of 3 of the 4 previously obtained sites: Y159, Y191 and Y205.

By combining all the results obtained by these different methods of biostatistics, biochemistry and biophysics, we concluded that the *in vitro* phosphorylation of RAD51 by the c-MET kinase occurs at four tyrosines: Y159, Y191, Y205 and Y315.

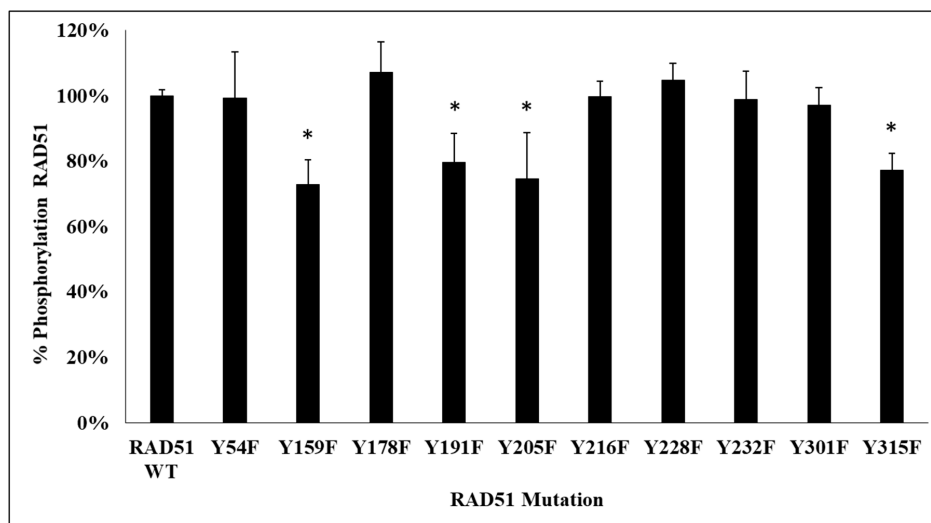


Figure 2. Decrease in RAD51 phosphorylation level in 4 RAD51 mutants. RAD51 WT protein and all non-phosphorylatable mutants of RAD51 (10 μ M) were purified and incubated in the presence of kinase-active c-MET (0.1 μ M) and ATP (2 mM). Then, the proteins were separated by SDS-PAGE 12% gel and analyzed by western blot using anti-RAD51 and anti-phosphotyrosine antibodies. The signals were quantified with the Odyssey scanner and compared with the signal from RAD51 WT. The graph represents the phosphorylation percentage of each mutant compared to the wild protein and obtained from the quantification of blots. Each experiment was conducted three times independently ($n = 3$; error bars: s.d.; * $p < 0.05$).

2.3. C-MET Phosphorylation is Dependent on the Structural Organization of RAD51

The crystallographic data of the RAD51 nucleofilament obtained by Brouwer et al. [24], led us to localize the four tyrosine residues potentially phosphorylatable by c-MET. They are all present in the C-terminal domain of the RAD51 protein (Figure 3).

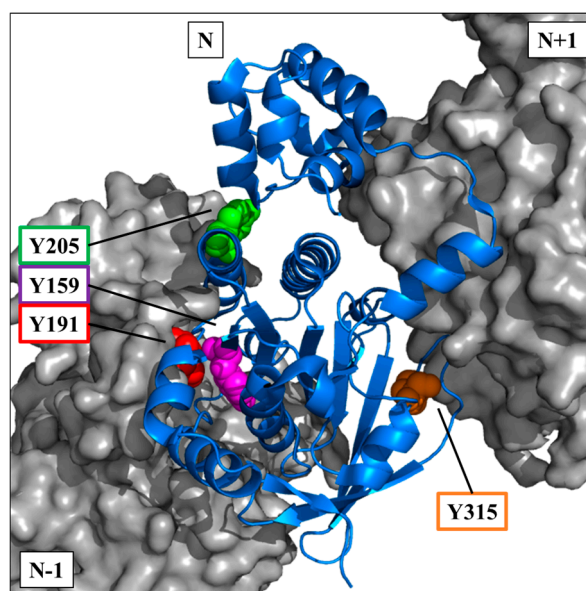


Figure 3. Position of potential phospho-tyrosine residues in the RAD51 filament. Using the PyMOL software and with the nucleofilament structure of RAD51 [24], tyrosines Y159 (magenta), Y191 (red), Y205 (green) and Y315 (orange) of a monomer N of RAD51 (blue—cartoon) are indicated. The monomers N+1 and N-1 are also represented (grey—surface).

The visualization on a trimer of RAD51 allowed us to position the four residues in the central monomer (indicated as N in the Figure 3). Three of four sites are in the vicinity of the monomer-monomer interface of RAD51 in the nucleofilament. Residues Y159, Y191 and Y205 appear to be at the interface of the N-1/N monomers, while Y315 appears to be at the interface of the N/N+1 monomers (Figure 3).

The position of these residues suggests that their exposure and therefore accessibility depend on the structural organization of RAD51. Therefore, tyrosine residues would be more exposed in the monomeric forms than in the oligomeric forms of RAD51.

To test and confirm this hypothesis, we evaluated the effect of the oligomeric state of RAD51 on its phosphorylation by in vitro phosphorylation experiments using the RAD51 F86E and A190/192L mutants, which are described as no-self associated mutants [25,26].

After quantification of the RAD51 phosphorylation rate signals by western blot, we observed a significant (3.5 fold) increase in the phosphorylation of the two mutants compared to the RAD51-WT protein (Figure 4).

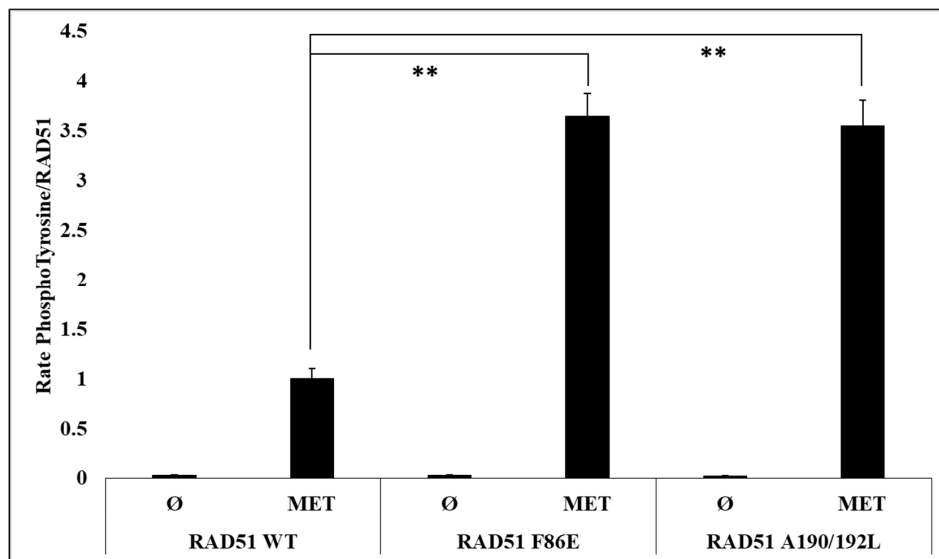


Figure 4. Phosphorylation level is promoted for monomeric RAD51 mutant variants. The RAD51 WT protein (10 μ M) and all non-polymerizable mutants of RAD51: F86E and A190/192L [26] were purified and incubated in the presence of kinase-active c-MET (0.1 μ M) and ATP (2 mM). Then, the proteins were separated by SDS-PAGE 12% gel and analyzed by western blot using anti-RAD51 and anti-phosphotyrosine antibodies. The signals were quantified with the Odyssey scanner and compared with the signal from RAD51 WT. The graph represents the phosphorylation rate of each mutant compared to the wild type protein following the quantification of blots from three independent experiments (\emptyset : without kinase) ($n = 3$; error bars: s.d.; ** $p < 0.01$).

The RAD51 protein is normally present in monomer-oligomer equilibrium [25]. We used the BRC4-28 peptide which is an inhibitor of the polymerization of RAD51. It is able to shift the equilibrium in favor of the monomeric form of RAD51 [27–30]. We then performed supplementary in vitro phosphorylation tests with RAD51-WT protein in presence of BRC4-28. The PhosphoRAD51/RAD51 ratios were calculated from the anti-phosphotyrosine and anti-RAD51 immunoblots (Figure 5A). We observed that the incubation with increasing concentrations of BRC4-28 peptide increased the proportion of phosphorylation of RAD51 to reach the maximum value of 4 (Figure 5D). This result suggests that peptide-induced depolymerization of RAD51 promotes its phosphorylation by c-MET.

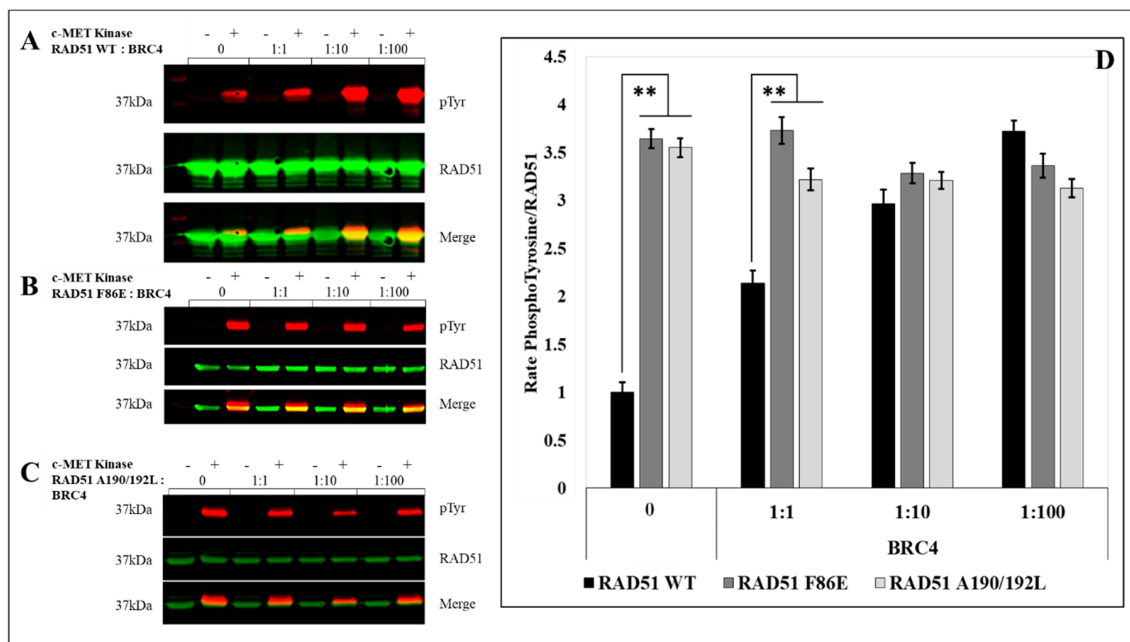


Figure 5. c-MET-mediated RAD51 phosphorylation is related to its oligomeric state. (A) The RAD51 WT protein (10 μ M) and all non-polymerizable mutants of RAD51: (B) F86E and (C) A190/192L were purified and incubated with ATP (2 mM), with or without kinase-active c-MET (0.1 μ M), and an increasing concentration of BRC4 peptide. Then the proteins were separated by SDS-PAGE 12% gel and analyzed by western blot using anti-RAD51 (green) and anti-phosphotyrosine (red) antibodies. The signals were quantified by Odyssey scanner and compared with the signal from RAD51 WT. (D) The graph represents the phosphorylation rate of each mutant compared to the wild protein following the quantification of blots from three independent experiments ($n = 3$; errors bars: s.d.; ** $p < 0.01$).

We also performed the same type of experiment with the no-polymerizable mutants F86E (Figure 5B) and A190/192L (Figure 5C). While the BRC4-28 peptide promotes the phosphorylation of RAD51-WT, no significant variation was observed with RAD51 F86E and A190/192L non-polymerizable mutants. It is interesting to note that the increase in RAD51-WT phosphorylation tends to similar values to those observed for the two non-polymerizable mutants (Figure 5D).

This convergence of phospho/non-phospho ratios demonstrates that the phosphorylation of RAD51 by c-MET is increased with the monomeric forms and emphasizes the importance of the polymerization state on the phosphorylation level of RAD51 by c-MET.

2.4. RAD51 Phosphorylation by c-MET Promotes its Multimeric State

There is a tight relationship between the oligomerization and phosphorylation state of RAD51. To find out whether the level of oligomerization of RAD51 changes when the protein is phosphorylated, we carried out a crosslinking assay of the oligomer forms of RAD51 before and after phosphorylation. The proteins were then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Revelation with an anti-RAD51 antibody shows that RAD51 phosphorylation by c-MET leads to an increase in multimer forms of RAD51 (Figure 6A). Indeed, after quantification, the proportion of multimer forms of RAD51 is 1.6 times higher after phosphorylation (Figure 6B). Moreover as shown in Figure 6, the inhibition of kinase activity of c-MET by PHA665752 inhibitor restores the polymerization status of RAD51 in comparison of RAD51 with active c-MET. This experiment confirms that the c-MET-mediated phosphorylation of RAD51 promotes the oligomer form. These results suggest that tyrosine phosphorylation of RAD51 by c-MET leads to an increase in the polymerization state of the recombinase.

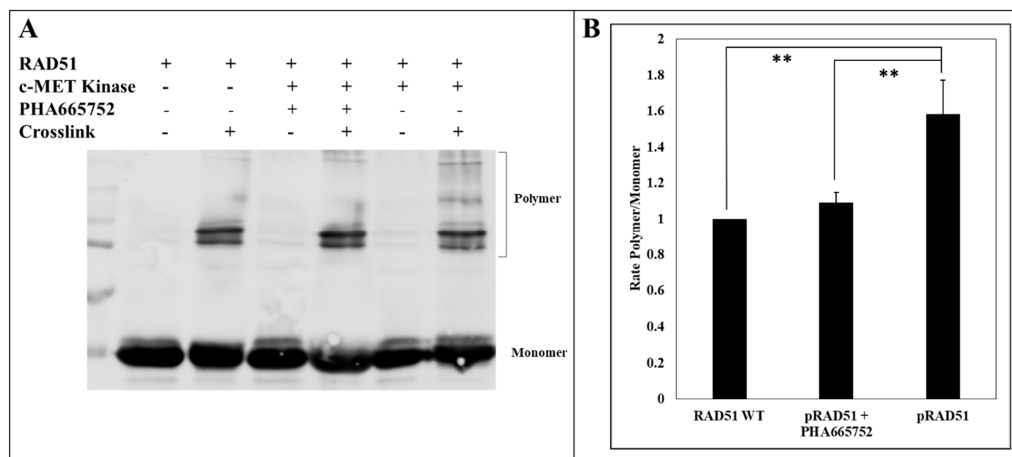


Figure 6. c-MET-mediated RAD51 phosphorylation promotes the formation of high-molecular-weight RAD51 oligomers. **(A)** The RAD51 WT protein (10 μ M) was purified and incubated with ATP (2 mM) and with or without kinase-active c-MET (0.1 μ M) and PHA665752 inhibitor (1 μ M). Then, the proteins were crosslinked with BS3, separated by SDS-PAGE 10% gel and analyzed by western blot using anti-RAD51 antibodies. The signals were quantified by Odyssey scanner. **(B)** The graph represents the average of the ratios of the polymer forms of RAD51 phosphorylated or not by c-MET. The ratios were obtained after quantification of the blots from three independent experiments ($n = 3$; error bars: s.d.; ** $p < 0.01$).

2.5. RAD51 Phosphorylation by c-MET Does not Influence the Formation of the Presynaptic Filament but Enhances its Stability Against the BRC4 Peptide

Is the structural equilibrium of RAD51 closely related to its phosphorylation, what could be the effect of phosphorylation on the RAD51 nucleofilament? Nucleofilament formation, which is highly dependent on the self-association capacity of RAD51, is indeed an essential step in HR.

To analyze the effect of RAD51 phosphorylation by the c-MET kinase on this step, we used an interferometry interaction test (BLItz[®]). A biotinylated single-stranded DNA was immobilized on a streptavidin tip, and then incubated in a solution containing phosphorylated or non-phosphorylated RAD51 protein. This approach enabled us not only to evaluate the association of the phosphorylated RAD51 protein with the DNA but also to follow the dissociation of the DNA with or without the BRC4 peptide. Concerning the association phase of RAD51 with DNA, we observed that there is no difference between the phosphorylated and non-phosphorylated form (Figure 7A). This is also the case when dissociating phosphorylated and non-phosphorylated RAD51 from DNA using a dissociation buffer. This result is confirmed by measuring the dissociation constants K_D of each protein regarding its interaction with DNA. We estimated similar K_D values: K_D RAD51 = 1.28×10^{-7} M and K_D pRAD51 = 1.41×10^{-7} M.

By contrast, Figure 7 shows that there is a difference in the dissociation of the RAD51 nucleofilament induced by the BRC4-28 peptide depending on whether RAD51 is phosphorylated or not. Quantification of phosphorylated and non-phosphorylated RAD51 binding on the DNA in percentage after 200 sec shows that the dissociation is two times lower when RAD51 is phosphorylated (Figure 7B). This is confirmed by the determination of the dissociation rate constants. It is lower for the phosphorylated form k_{off} pRAD51 = 3.32×10^{-7} M than for the unphosphorylated form k_{off} RAD51 = 4.56×10^{-7} M.

The nucleofilament or presynaptic filament of RAD51 is capable of locating a homologous duplex DNA molecule and catalyzing the invasion of the duplex to form a DNA displacement loop called the “D-loop” [31]. We have estimated the effect of phosphorylation on the performance of RAD51 by performing a D-loop test which allows the estimation of the invasion and homologous pairing step of RAD51 activity.

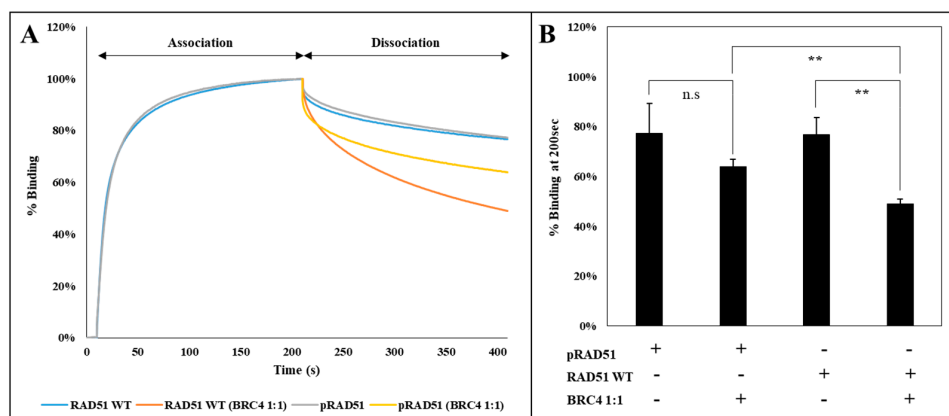


Figure 7. BRC4-mediated nucleofilament dissociation is less effective when RAD51 is phosphorylated. The RAD51 WT protein (10 μ M) was purified and phosphorylated in vitro by kinase-active c-MET (0.1 μ M). Then, we incubated a streptavidin associated-tip with polydT nucleic acids to the extracts diluted in a phosphate-ATP buffer. The protein-DNA interaction was measured by interferometry (Blitz®). After 10 s of baseline, the different RAD51 protein samples were added and the association and dissociation phase were then recorded for 200 s. Dissociation was performed with a conventional phosphate buffer with or without BRC4 peptide (1:1). **(A)** The experiment was repeated four times to obtain the curve representing the average of the performed experiments ($n = 4$). **(B)** The impact of BRC4 on the dissociation of RAD51 to DNA was achieved at $t = 200$ s of dissociation. The graph shows the percentage of association of the different RAD51 proteins with nucleic acids after the addition or not of BRC4. The average values of the each experiments were compared to the wild protein ($n = 4$; error bars: s.d.; ** $p < 0.01$; n.s: $p > 0.05$).

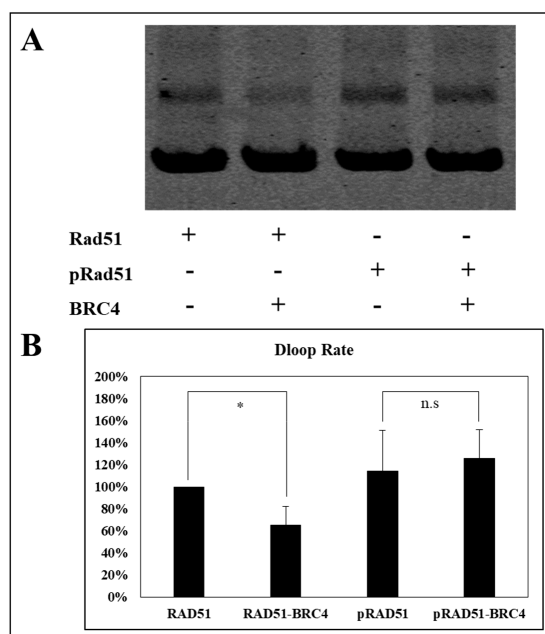


Figure 8. Invasion and homologous pairing steps are less sensitive to the BRC4 peptide when RAD51 is phosphorylated. **(A)** The RAD51 WT protein (10 μ M) was purified and phosphorylated in vitro by kinase-active c-MET (0.1 μ M). The protein was incubated with the D-loop mix containing fluorophore labelled ssDNA to allow nucleofilament formation. The BRC4 peptide was then added (1:1) before the addition of the unlabelled plasmid allowing the formation of a D-loop. The whole was separated on 1% agarose gel. The signals were quantified by Odyssey scanner. **(B)** The graph represents the percentage of formed D-loop complexes following the phosphorylation or not of RAD51 by c-MET. Blots from three independent experiments were used for quantification ($n = 3$; error bars: s.d.; * $p < 0.05$; n.s: $p > 0.05$).

As shown in Figure 8, the BRC4-28 peptide decreased the percentage of D-loop activity (about 40%) with the non-phosphorylated RAD51 form. This inhibitory effect is significantly abrogated when RAD51 was phosphorylated by c-MET. Indeed, we observed no change of D-loop activity of phosphorylated RAD51 in the presence and in absence of the BRC4-28 peptide (Figure 8). These results suggest that the presynaptic filament involving phosphorylated RAD51 is more stable and less sensitive to the BRC4-28 peptide than the non-phosphorylated RAD51 form.

2.6. Activation of c-MET by HGF Increases the Repair of Double-Strand Breaks by Homologous Recombination

An analysis of the effect of c-MET receptor activation by HGF on HR was performed. We used a cell model RG37 I-SceI that allows us to quantify HR by measuring the fluorescence of the “repaired” GFP protein. Cells are analyzed with a cytometer, GFP fluorescence is more important when the I-SceI endonuclease is expressed (Figure 9).

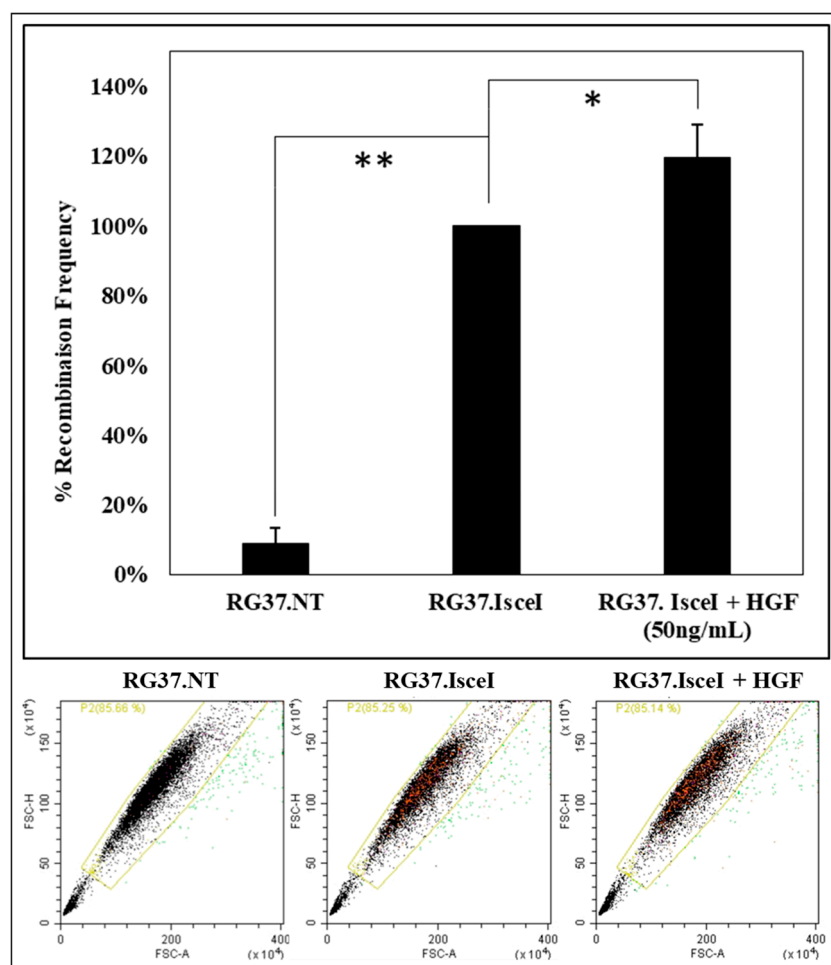


Figure 9. Activation of c-MET by HGF increases the repair of double-strand breaks by homologous recombination. Frequency of HR in DR-GFP RG37 cells pre-treated or not with HGF (50ng/mL for 24h) is estimated by DR-GFP assay. The data represent the mean of the percentage recombination frequency of three independent experiments ($n = 3$; error bars: s.d; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Representative diagrams of RG37 expressing reconstituted GFP protein (population in green) and cells negative for GFP (main population).

If the cells are pretreated for 24 h with HGF (50 ng/mL), a significant increase of about 20% of recombination frequency is observed (Figure 9). Similar work has also shown a decrease in HR when c-MET is inhibited [13]. Therefore, this result provides evidence of the relation between this RTK and HR, suggesting a key role of RAD51.

3. Discussion

In the last decade, DNA repair pathways have been described as promising targets in cancer therapy [31]. Understanding the regulation of DNA repair proteins is essential to overcome anticancer resistance. The phosphorylation of the RAD51 recombinase is a well-established factor that could modulate HR in DNA repair. Among the kinases capable of phosphorylating RAD51, the receptor tyrosine kinase family appears to act on the DNA repair pathways including HR. Interestingly, overexpression and constitutive activation of RTK are common in a number of cancer types and are suspected to have serious effects on the DNA repair pathways.

Previous results highlight the possible connection between c-MET receptor and RAD51 since kinase inhibition reduces the protein level of RAD51 [19] and induces a decrease of HR repair in response to DNA damage [13]. Activation of the c-MET receptor involves its ability to self-phosphorylate and leads to the phosphorylation of many protein partners that play a role in a large number of cell signaling pathways such as cell proliferation and survival via the MAPK, GAB1, STAT3 and PI3K/AKT pathways [32–34]. Our results demonstrate that c-MET kinase can also phosphorylate RAD51 at four tyrosines: Y159, Y191, Y205 and Y315 (Figures 1 and 2).

The activity of RAD51 involves many protein-protein interactions which determine the function and the role of RAD51 in the DNA repair context. The RAD51 protein presents different oligomeric forms in buffer solution [35,36]. Structure resolutions of RAD51 in different organisms show that it is frequently organized in a ring with 6 to 8 monomers [37,38], and even in short filaments depending on the buffer composition [39]. The equilibrium between these different forms is also dependent on the protein concentration [35] and the presence of other molecules like peptides, salt or co-factors.

Nucleotide cofactors are also important elements to consider as they modulate the equilibrium and configuration of RAD51 oligomers. Schay et al. [39] demonstrate the role of ATP in the specific conformation of RAD51. By electron microscopy, they show that the binding of ATP modifies the protein-protein interfaces and leads mainly to oligomeric structures in the form of rings or short helices. These filament and ring structures were also observed by Baumann [40] in the absence of ATP. The ring structure was predominant when the salt concentration was increased. All our experiments were carried out in saturating concentrations of ATP (2 mM) in order to avoid the formation of disordered filaments as described by Shay et al. [39]. Moreover, the biologically active oligomer form requires ATP [41].

The self-association of RAD51 involves a polymerization motif located in its N-terminal domain. Mutations in this region such as F86E, A89E lead exclusively to monomeric forms and thus to the abrogation of the self-association of RAD51 [25,26].

By using non-polymerizable mutants, we have shown that the level of RAD51 phosphorylation by c-MET is strongly related to the oligomeric state of RAD51 (Figures 4 and 6).

This RAD51 monomer-monomer self-association property holds a prominent place in the formation of the RAD51 filament on single-stranded DNA (ssDNA). Disturbance in the monomer-monomer interface may impact nucleofilament formation and thus recombinase activity.

By combining *in silico* prediction, mass spectroscopy (MS) and biochemical approaches, we identified four phosphorylatable tyrosines (Y159, Y191, Y205, and Y315) by c-MET kinase.

It is interesting to note that the Y315 phosphorylation detection failed by MS method. In our previous work, we proposed an explanation of this absence of detection. After proteolysis of RAD51 by trypsin, the length (28 amino acids) of Tyr315-containing peptide and its negative charge (pHi = 4.03) could interfere with its detection by MS [8]. Besides, in another work [42], Y315 phosphorylation mediated by c-ABL kinase was not detected by MS while the Y54 phosphorylation was done, highlighting the difficulty to analyze this singular peptide.

The four phosphorylatable tyrosine residues that we identified in this study are all located in these monomer-monomer interfaces N-1/N or N/N+1 or in their vicinity (Figure 3). The Y191 and Y315 tyrosines have, moreover, been described in the literature as hinge positions at the monomer-monomer interfaces of RAD51 [43,44]. Using molecular modelling approaches, the addition

of a phosphate residue can be carried out through ionic bond with the lysine or the arginine of monomer $N + 1$ as described in Alligand et al. [11]. The generation of new bonds between RAD51 monomers could explain why phosphorylation increases the oligomer state of RAD51.

Although our findings show that the phosphorylation of tyrosine residues seems to strengthen monomer/monomer interactions by promoting the oligomeric state of RAD51, the nucleofilament formation does not seem to be affected by these phosphorylations. Indeed phosphorylated RAD51 binds to single stranded DNA and exhibits a dissociation constant ($K_D = 140$ nM) similar to the binding affinity of non-phosphorylated RAD51 ($K_D = 128$ nM). These K_D values are in the same order of magnitude and are consistent with the data in the literature [45].

The BRC4-28 peptide inhibitor is able to destabilize the multimeric forms of RAD51. It is derived from the BRCA2 protein and it is capable of mimicking monomer-monomer interfaces and causes also the dissociation of the nucleofilament of RAD51 [38]. Our results have shown that phosphorylation abrogates the inhibitor effect of BRC4-28 on the nucleofilament stability (Figures 5 and 7).

It is noteworthy that this peptide corresponds to the BRC interaction motif of the BRCA2 protein, which has a central role during HR through controlling the RAD51 recombinase. BRCA2 contains eight BRC motifs (from BRC1 to BRC8) which are able to bind directly to RAD51 with varying affinity [46]. Therefore, BRCA2-RAD51 interactions have an essential role on biological events including the intracellular distribution of RAD51 in undamaged and damaged cells, the recruitment of RAD51 on DNA damage sites and on RAD51 oligomerization.

The low sensitivity of the phosphorylated RAD51 forms to the BRC4-28 inhibitor can be explained by the localization of the RAD51 interaction site and by the formation of new bonds generated by phosphate groups on tyrosine residues. Molecular modelling of RAD51-BRC4 (Figure 10) shows that the Y159, Y191 and Y205 residues localized at the N-1/N interface (Figure 3) are directly in contact with the peptide. Two regions of the BRC4 peptide (Zone 1: F1524–K1530; Zone 2: K1541–E1548) are known to have high affinity with RAD51 protein (yellow, Figure 10). The negative charge and the steric repulsion of phosphotyrosine residues can prevent RAD51-BRC4 interaction.

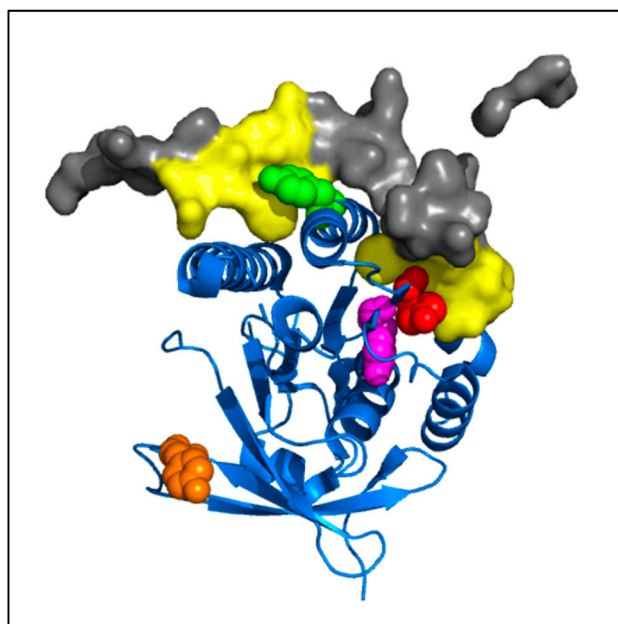


Figure 10. Modeling of tyrosine residues of RAD51 involved in the RAD51-BRC4 interface. Using the PyMOL software and the structure of the C-terminal part of RAD51 with BRC4 [25], tyrosines (Y159, magenta; Y191, red; Y205, green; Y315, orange) were indicated. The BRC4 peptide [26] and its high interaction areas with RAD51 are also represented (BRC4, grey, surface; high interaction with RAD51, yellow, surface).

This study shows that the recombinase activity of RAD51 of presynaptic filaments containing phosphorylated RAD51 was less sensitive to the inhibitory effect of the BRC4 peptide. These results highlight the importance of the BRCA2-RAD51 interaction in cells and can explain the impact of c-MET activation on homologous recombination repair where BRCA2 and RAD51 are confidentially connected.

On the other hand, it is difficult to assess the contribution and effects of each of the four phosphorylatable sites on RAD51 activity. According to the literature Y315 phosphorylation has little effect on the in vitro RAD51 activities [10] suggesting that BRCA2-mediated effects could be associated with one or more of the three sites of the N-1/N interface or the RAD51/BRC4-28 interface.

Our preliminary cellular result (Figure 9) shows that the c-MET activation by its natural ligand HGF increases the DNA repair by HR through the phosphorylation of RAD51. For the first time, we provide evidence that the direct relationship between c-MET and RAD51 could modulate the DNA repair pathway by HR and that could open new perspectives for anticancer therapeutic strategy.

4. Materials and Methods

4.1. Phosphorylation Site Prediction

The FASTA Sequence of RAD51 was uploaded on 3 web sites (GPS 3.0—gps.biocuckoo.org, Phosphonet—phosphonet.ca, Networkin—networkin.info) to predict six RAD51 phosphorylation sites induced by c-MET kinase activity after data compilation.

4.2. In Silico Modelisation

PyMOL 2.0 software was used for modelling of RAD51 and its mutation or phosphorylation. We used PDB Structure 5nwl [24] and 1n0w [25].

4.3. Production and Purification of RAD51 Proteins

The cDNA of His-tagged RAD51 was cloned in pET15b vector (Novagen-Merck, Darmstadt, Germany). All RAD51 Y/F, RAD51 F86E and RAD51 A190/192L were generated by site-directed mutagenesis using overlapping oligo-nucleotides. The DNA sequences of the mutant clones were checked and validated. RAD51-WT and RAD51 mutants were then over-expressed in *Escherichia coli* BL21- DE3 strain at 37 °C. The bacteria are then lysed in buffer (Tris HCl 50 mM, NaCl 500 mM, glycerol 10%, β-mercaptoethanol 5 mM, imidazole 5 mM). His-tagged RAD51-proteins were purified on a NiNTA resin (#P6611, Sigma, St Louis, MO, USA) (washing buffer: Tris HCl 50 mM, NaCl 500 mM, glycerol 10%, β-mercaptoethanol 5 mM, increasing imidazole concentration). Imidazole used for purification was removed by dialysis (dialysis buffer: Tris HCl 50 mM, NaCl 500 mM, glycerol 10%, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, decreasing imidazole concentration). Protein concentrations were determined by the Bradford assay. The purity of proteins was analyzed by SDS- PAGE followed by Coomassie staining. All His-tagged RAD51 proteins were kept at −80 °C prior to use.

```

RAD51-Y54F-for: ggaggctgttcctttgcgccaagaagg
RAD51-Y54F-rev: ccttcttggcgcaaaggcaacagcctcc
RAD51-Y159F-for: gaaggaaaggccatgttcattgacactgaggg
RAD51-Y159F-rev: ccctcagtgtcaatgaacatggcctttccttc
RAD51-Y178F-for: ggcagtggtgagaggtttgtctctctggcagtg
RAD51-Y178F-rev: cactgccagagaccaaacctcagccactgcc
RAD51-Y191F-for: cctggataatgtagcatttctcgagcgttcaaac
RAD51-Y191F-rev: gtgttgaacgctcgagcaaatgctacattatccagg
RAD51-Y205F-for: cagaccagctccttttcaagcatcagccatg
RAD51-Y205F-rev: catggctgatgcttgaagaggagctgggtctg
RAD51-Y216F-for: gccatgatgtagaatctaggtttgactgctattgtagactg
RAD51-Y216F-rev: cagtctacaataagcagtgcaaacctagattctaccatcatggc

```

RAD51-Y228F-for: gtgccaccgcccctttcagaacagactactcg
 RAD51-Y228F-rev: ccgagtagtctgttctgaaaaggcggtggcac
 RAD51-Y232F-for: ccctttacagaacagacttctcgggtcgaggtgagc
 RAD51-Y232F-rev: gctcacctcgaccgagaagtctgttctgtaaaggg
 RAD51-Y301F-for: cccatgcatcaacaaccagattgtttctgaggaaaggaagagggg
 RAD51-Y301F-rev: cccctcttcttctcagaacaactctggtggtgatgcatggg
 RAD51-Y315F-for: cagaatctgccaatcttcgactctcctgtcttc
 RAD51-Y315F-rev: gaagacagggagagtcgaagatttggcagattctg
 RAD51-F86E-for: ctctgtcccatggcgagaccacggcgacggag
 RAD51-F86E-rev: ctccgtcgcgtggtctcggcggcggcagcag
 RAD51-A190/192L-for: cctggataatgtactgtatctcgagcgttcaacac
 RAD51-A190/192L-rev: gtgttgaacgctcgagatacattatccagg

4.4. RAD51 Protein Sequence and Position of Tyrosine Residues

MAMQMQLLEANADTSVEEESFGPQPISRLEQCGINANDVKKLEEAGFHTVEAVAYAPKKELINI
 KGISEAKADKILAEAAKLVPMGFTTATEFHQRRSEIIQITTGSKELDKLLQGGIETGSITEMFGEFRTGK
 TQICHTLAVTCQLPIDRGGGEGKAMYIDTEGTFRPERLLAVAERYGLSGSDVLDNVAYARAFNTDHF
 TQLLYQASAMMVESRYALLIVDSATALYRTDYSGRGELSARQMHLARFLRMLLRLADEFGVAVVITN
 QVVAQVDGAAMFAADPKPIGGNIIAHASTTRLYLKRG ETRICKIYDSPCLPEAEAMFAINADG
 VGDAKD.

4.5. Circular Dichroism Measurement

The circular dichroism (CD) spectra of purified RAD51 protein were measured using a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Mary's Court Easton, MD, USA) and a mini-quartz cell with a path length of 0.2 cm. The spectra were recorded in the range from 210 to 260 nm and averaged over five scans to increase the signal-to-noise ratio (response time, 0.125 s; resolution, 0.1 nm). The final concentration of each RAD51 protein was 4 μM in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4.

4.6. c-MET Kinase Assay

Recombinant active c-MET (0.1 μM) (#0171-0000-1, ProQinase, Freiburg, Germany) was incubated with 2 mM of ATP and 10 μM of recombinant RAD51 (WT or mutant) in 25 μL kinase buffer (60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5; 3 mM MgCl_2 ; 3 mM MnCl_2 ; 3 μM Na-orthovanadate; 1.2 mM DTT; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PEG20.000). Reactions were incubated at 30 $^\circ\text{C}$ for 1 h and terminated by addition of Laemmli SDS sample dilution buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE 12% gel, and phosphorylation was visualized by immunoblot. The c-MET inhibitor, PHA665752 (#S1070, Selleckchem, Houston, TX, USA) was used during the c-MET kinase Assay at 1 μM .

4.7. Chemical Cross-Linking and Polymerization Assay

RAD51 protein (10 μM) was cross-linked by incubation with 20 mM BS3 (#21580, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) at room temperature for 30 min. Cross-linking was terminated by adding Tris 1M pH 8.0 for 15 min and analyzed by SDS-PAGE 10% gel and western blot.

4.8. Immunoblot Analyses

Samples were separated by electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (GEHealthcare, Little Chalfont, UK). Membranes were blocked for 1 h in 0.1% TBS-Tween20 containing 5% BSA. Primary antibodies were rabbit anti-RAD51 (ABE257, Merck Millipore, Darmstadt, Germany & Prestige, Sigma, St Louis, MO, USA) or mouse anti-pTyr (#9411S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Membranes were washed three times with 0.1% TBS-Tween20 for 10 min and incubated for 1 h with anti-mouse Alexa-Fluor680-conjugated or

anti-rabbit Alexa-Fluor800-conjugated secondary antibodies (#A-32735, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Membranes were scanned at 700 nm and 800 nm, respectively, using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Images were treated and proteins were quantified with the Odyssey software. The amounts of phospho-RAD51 on the blot were normalized to the amount of RAD51 and the ratio of phospho-RAD51 to total RAD51 was determined from three independent experiments.

4.9. *Blitz®DNA Binding Assay*

Biotinylated DNA polydT (100 mM) was bound on a streptavidin coated biosensor (tip). RAD51 proteins (4 μ M) were prepared in reaction buffer made of PBS buffer 1 \times and ATP 2 mM. Kinetics were divided in three steps. Firstly, baseline of the buffer was measured for 10 s, then the association step between ssDNA and RAD51 at 4 μ M was monitored for 200 s and finally the dissociation step of the bound RAD51 was monitored for 200 s in buffer with or without BRC4. Tip was regenerated in NaOH (50 mM) twice for 40 s before reuse.

4.10. *D-Loop Assay*

100-ssDNA labeled IRD700 (1 μ M) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) was incubated with 0.5 μ M RAD51 in the presence or absence of the indicated amounts of the corresponding molecule in 10 μ L of standard reaction buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM ATP, 1 mM DTT, 1 mM CaCl₂ at 37 °C for 20 min. The reaction was initiated by adding supercoiled pPB4.3 DNA (200 μ M in bp). After incubation of 30 min at 37 °C, the reactions were stopped and deproteinized by a stop solution (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 1% SDS, and 1 mg/mL proteinase K). The reaction mixtures were further incubated for 15 min at 37 °C. After adding 5-fold loading dye (0.05% bromophenol blue, 8% glycerol, 1 mM EDTA), the reaction products were separated by electrophoresis on 1% agarose gel. The electrophoresis was carried out in 0.5 \times TAE buffer (20 mM Tris, 10 mM acetic acid and 1 mM EDTA) at 100 V for 2 h. The labeled products (100-ssDNA and D-loop) were visualized and quantified by the detection of the IRD-700 dye with the 700 nm infrared fluorescent detection channel of an Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences) [47].

4.11. *HR-GFP Assay*

RG37 cells stably expressing the direct-repeat (DR)-GFP construct were generously given by Dr LOPEZ B. (IGR, Paris, France). RG37 cells were plated into 12-well plates, 1 day later pretreated by HGF (50 ng/mL) and subsequently transiently transfected with pCBA-HA-I-SceI (functional endonuclease) using Lipofectamine2000 (#11668019, Invitrogen). Transient expression of I-SceI endonuclease generated a DNA double strand break at the integrated GFP gene sequences and stimulated HR. GFP signal was assayed 72-hr post-transfection on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). For each experiment, 10,000 cells were scored per treatment group, and the recombination percentage was calculated in comparison with the number of GFP-positive cells of the control condition RG37 I-SceI.

4.12. *Statistical Analysis*

Statistical analysis was performed using paired Student's *t*-test. Statistical significance was assumed at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ or Non-Significant NS for $p > 0.05$. Each error bars represents s.d. Statistical analysis and signal values representations were performed using the Microsoft Excel 2013 software.

5. Conclusions

This study demonstrates the direct link between RAD51 and c-MET wherein the phosphorylation of RAD51 impact its oligomeric state but also its interaction with the BRC motif of BRCA2. Our

results suggest that c-MET-mediated RAD51 phosphorylation could play a potential role in the BRCA2-dependent regulation of RAD51. Given our encouraging in vitro findings, the next step should be to expand our investigations in cells to assess the RAD51 phosphorylation level according to c-MET inhibition in the DNA damage response pathway. The expected results could pave an attractive therapeutic strategy to overcome resistance by combining the modulation of c-MET and RAD51 activity with anticancer treatments.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/3/413/s1>, Figure S1: Purification of RAD51 mutants, Figure S2: CD spectra of ten RAD51 Y/F mutants and RAD51-wt.

Author Contributions: Conceptualization, F.F. and Y.C.; Methodology, Validation, Investigation, T.C., A.D., D.M., A.R.-C., E.C.; Writing—Original draft preparation, T.C. and F.F.; Writing—Review and editing, T.C. F.F. and Y.C.; Supervision, Funding acquisition, F.F.

Funding: This work was supported by Ligue Contre le Cancer (Comité 44).

Acknowledgments: We are grateful to M. Popova for critical reading of the manuscript. We thank the IMPACT platform (University of Nantes) which provides the access of LI-COR technology and A. Demeyer, D. Velic and J-Y Masson for technical information on the D-loop formation assay. The authors thank Bernard Lopez for the HR DR-GFP system.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AKT/PKB	protein kinase B
BRCA2	Breast Cancer 2
BRC4/BRC4-28	28 aa of the BRC motifs
c-MET: HGFR	hepatocyte growth factor receptor
DSB	double strand break
EGFR	Epidermal growth factor receptor
GAB1	GRB2 Associated Binding Protein 1/Growth Factor Receptor Bound Protein 2-Associated Protein 1
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HR	Homologous recombination
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
pRAD51	phospho-RAD51
RTK	Receptor tyrosine kinase
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
ssDNA	single strand DNA

References

1. Mladenov, E.; Anachkova, B.; Tsaneva, I. Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage. *Genes Cells* **2006**, *11*, 513–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Park, J.Y.; Yoo, H.W.; Kim, B.R.; Park, R.; Choi, S.Y.; Kim, Y. Identification of a novel human Rad51 variant that promotes DNA strand exchange. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 3226–3234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Barzel, A.; Kupiec, M. Finding a match: How do homologous sequences get together for recombination? *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 27–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Krogh, B.O.; Symington, L.S. Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 233–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sanchez, H.; Paul, M.W.; Grosbart, M.; van Rossum-Fikkert, S.E.; Lebbink, J.H.G.; Kanaar, R.; Houtsmuller, A.B.; Wyman, C. Architectural plasticity of human BRCA2-RAD51 complexes in DNA break repair. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 4507–4518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yata, K.; Lloyd, J.; Maslen, S.; Bleuyard, J.Y.; Skehel, M.; Smerdon, S.J.; Esashi, F. Plk1 and CK2 act in concert to regulate Rad51 during DNA double strand break repair. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 371–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Sorensen, C.S.; Hansen, L.T.; Dziegielewski, 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Popova, M.; Shimizu, H.; Yamamoto, K.; Lebecqec, M.; Takahashi, M.; Fleury, F. Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependent on that of Y315. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1867–1872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Slupianek, A.; Dasgupta, Y.; Ren, S.Y.; Gurdek, E.; Donlin, M.; Nieborowska-Skorska, M.; Fleury, F.; Skorski, T. Targeting RAD51 phosphotyrosine-315 to prevent unfaithful recombination repair in BCR-ABL1 leukemia. *Blood* **2011**, *118*, 1062–1068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Subramanyam, S.; Ismail, M.; Bhattacharya, I.; Spies, M. Tyrosine phosphorylation stimulates activity of human RAD51 recombinase through altered nucleoprotein filament dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E6045–E6054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Alligand, B.; Le Breton, M.; Marquis, D.; Vallette, F.; Fleury, F. Functional effects of diphosphomimetic mutations at cAbl-mediated phosphorylation sites on Rad51 recombinase activity. *Biochimie* **2017**, *139*, 115–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wang, Y.; Yuan, J.L.; Zhang, Y.T.; Ma, J.J.; Xu, P.; Shi, C.H.; Zhang, W.; Li, Y.M.; Fu, Q.; Zhu, G.F.; et al. Inhibition of both EGFR and IGF1R sensitized prostate cancer cells to radiation by synergistic suppression of DNA homologous recombination repair. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Medova, M.; Aebersold, D.M.; Zimmer, Y. MET inhibition in tumor cells by PHA665752 impairs homologous recombination repair of DNA double strand breaks. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 728–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Medova, M.; Aebersold, D.M.; Zimmer, Y. The Molecular Crosstalk between the MET Receptor Tyrosine Kinase and the DNA Damage Response-Biological and Clinical Aspects. *Cancers* **2013**, *6*, 1–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Garcia, S.; Dales, J.P.; Charafe-Jauffret, E.; Carpentier-Meunier, S.; Andrac-Meyer, L.; Jacquemier, J.; Andonian, C.; Lavaut, M.N.; Allasia, C.; Bonnier, P.; et al. Overexpression of c-Met and of the transducers PI3K, FAK and JAK in breast carcinomas correlates with shorter survival and neoangiogenesis. *Int. J. Oncol.* **2007**, *31*, 49–58. [[CrossRef](#)]
16. Ghossub, R.A.; Dillon, D.A.; D'Aquila, T.; Rimm, E.B.; Fearon, E.R.; Rimm, D.L. Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* **1998**, *82*, 1513–1520. [[CrossRef](#)]
17. Ma, P.C.; Jagadeeswaran, R.; Jagadeesh, S.; Tretiakova, M.S.; Nallasura, V.; Fox, E.A.; Hansen, M.; Schaefer, E.; Naoki, K.; Lader, A.; et al. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1479–1488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Peng, J.; Qi, S.; Wang, P.; Li, W.; Liu, C.; Li, F. Diagnosis and Prognostic Significance of c-Met in Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *Dis. Mark.* **2016**, *2016*, 6594016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Guo, A.; Villen, J.; Kornhauser, J.; Lee, K.A.; Stokes, M.P.; Rikova, K.; Possemato, A.; Nardone, J.; Innocenti, G.; Wetzel, R.; et al. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 692–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kermorgant, S.; Zicha, D.; Parker, P.J. PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *EMBO J.* **2004**, *23*, 3721–3734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Welsh, J.W.; Mahadevan, D.; Ellsworth, R.; Cooke, L.; Bearss, D.; Stea, B. The c-Met receptor tyrosine kinase inhibitor MP470 radiosensitizes glioblastoma cells. *Radiat. Oncol.* **2009**, *4*, 69. [[CrossRef](#)]
22. Matteucci, E.; Bendinelli, P.; Desiderio, M.A. Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 937–945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Barrow-McGee, R.; Kermorgant, S. Met endosomal signalling: In the right place, at the right time. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *49*, 69–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Brouwer, I.; Moschetti, T.; Candelli, A.; Garcin, E.B.; Modesti, M.; Pellegrini, L.; Wuite, G.J.; Peterman, E.J. Two distinct conformational states define the interaction of human RAD51-ATP with single-stranded DNA. *EMBO J.* **2018**, *37*, e98162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Yu, D.S.; Sonoda, E.; Takeda, S.; Huang, C.L.; Pellegrini, L.; Blundell, T.L.; Venkitaraman, A.R. Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1029–1041. [[CrossRef](#)]
27. Esnault, C.; Renodon-Corniere, A.; Takahashi, M.; Casse, N.; Delorme, N.; Louarn, G.; Fleury, F.; Pilard, J.F.; Chenais, B. Assessment of DNA binding to human Rad51 protein by using quartz crystal microbalance and atomic force microscopy: Effects of ADP and BRC4-28 peptide inhibitor. *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 3753–3760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Martinez, S.F.; Renodon-Corniere, A.; Nomme, J.; Eveillard, D.; Fleury, F.; Takahashi, M.; Weigel, P. Targeting human Rad51 by specific DNA aptamers induces inhibition of homologous recombination. *Biochimie* **2010**, *92*, 1832–1838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Nomme, J.; Renodon-Corniere, A.; Asanomi, Y.; Sakaguchi, K.; Stasiak, A.Z.; Stasiak, A.; Norden, B.; Tran, V.; Takahashi, M. 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.* **2010**, *53*, 5782–5791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Nomme, J.; Takizawa, Y.; Martinez, S.F.; Renodon-Corniere, A.; Fleury, F.; Weigel, P.; Yamamoto, K.; Kurumizaka, H.; Takahashi, M. Inhibition of filament formation of human Rad51 protein by a small peptide derived from the BRC-motif of the BRCA2 protein. *Genes Cells* **2008**, *13*, 471–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Velic, D.; Couturier, A.M.; Ferreira, M.T.; Rodrigue, A.; Poirier, G.G.; Fleury, F.; Masson, J.Y. DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer. *Biomolecules* **2015**, *5*, 3204–3259. [[CrossRef](#)]
32. Boccaccio, C.; Ando, M.; Tamagnone, L.; Bardelli, A.; Michieli, P.; Battistini, C.; Comoglio, P.M. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* **1998**, *391*, 285–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ponzetto, C.; Bardelli, A.; Zhen, Z.; Maina, F.; dalla Zonca, P.; Giordano, S.; Graziani, A.; Panayotou, G.; Comoglio, P.M. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* **1994**, *77*, 261–271. [[CrossRef](#)]
34. Weidner, K.M.; Di Cesare, S.; Sachs, M.; Brinkmann, V.; Behrens, J.; Birchmeier, W. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* **1996**, *384*, 173–176. [[CrossRef](#)]
35. Candelli, A.; Holthausen, J.T.; Depken, M.; Brouwer, I.; Franker, M.A.; Marchetti, M.; Heller, I.; Bernard, S.; Garcin, E.B.; Modesti, M.; et al. Visualization and quantification of nascent RAD51 filament formation at single-monomer resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 15090–15095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Davies, O.R.; Pellegrini, L. Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 475–483. [[CrossRef](#)]
37. Du, L.; Luo, Y. Structure of a hexameric form of RadA recombinase from *Methanococcus voltae*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2012**, *68 Pt 5*, 511–516. [[CrossRef](#)]
38. Shin, D.S.; Pellegrini, L.; Daniels, D.S.; Yelent, B.; Craig, L.; Bates, D.; Yu, D.S.; Shivji, M.K.; Hitomi, C.; Arvai, A.S.; et al. Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: Mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *EMBO J.* **2003**, *22*, 4566–4576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Schay, G.; Borka, B.; Kernya, L.; Bulyaki, E.; Kardos, J.; Fekete, M.; Fidy, J. Without Binding ATP, Human Rad51 Does Not Form Helical Filaments on ssDNA. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 2165–2178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Baumann, P.; Benson, F.E.; Hajibagheri, N.; West, S.C. Purification of human Rad51 protein by selective spermidine precipitation. *Mutat. Res.* **1997**, *384*, 65–72. [[CrossRef](#)]
41. 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* **2006**, *5*, 381–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Yuan, Z.M.; Huang, Y.; Ishiko, T.; Nakada, S.; Utsugisawa, T.; Kharbanda, S.; Wang, R.; Sung, P.; Shinohara, A.; Weichselbaum, R.; et al. Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3799–3802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Conilleau, S.; Takizawa, Y.; Tachiwana, H.; Fleury, F.; Kurumizaka, H.; Takahashi, M. 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.* **2004**, *339*, 797–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Selmane, T.; Camadro, J.M.; Conilleau, S.; Fleury, F.; Tran, V.; Prevost, C.; Takahashi, M. Identification of the subunit-subunit interface of *Xenopus* Rad51.1 protein: Similarity to RecA. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 895–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yoshioka, K.; Yumoto-Yoshioka, Y.; Fleury, F.; Takahashi, M. pH- and salt-dependent self-assembly of human Rad51 protein analyzed as fluorescence resonance energy transfer between labeled proteins. *J. Biochem.* **2003**, *133*, 593–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Rajendra, E.; Venkitaraman, A.R. Two modules in the BRC repeats of BRCA2 mediate structural and functional interactions with the RAD51 recombinase. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 82–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Normand, A.; Riviere, E.; Renodon-Corniere, A. Identification and characterization of human Rad51 inhibitors by screening of an existing drug library. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *91*, 293–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

BBA - Reviews on Cancer

Relationships between DNA repair and RTK-mediated signaling pathways --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BBACAN-D-20-00136
Article Type:	Review Article
Keywords:	cancer; Receptor tyrosine Kinase; DNA repair; Inhibition
Corresponding Author:	fabrice fleury, Ph.D University of Nantes CNRS UMR 6286 Nantes, FRANCE
First Author:	fabrice fleury, Ph.D
Order of Authors:	fabrice fleury, Ph.D Thomas Chabot, Dr Yvonnick Cheraud, Dr
Abstract:	Receptor Tyrosine Kinases (RTK) form an important family involved in numerous signaling pathways essential for proliferation, cell survival, transcription or cell-cycle regulation. Their role and involvement in cancer cell survival have been widely described in the literature, and are generally associated with an overexpression and / or excessive activity in the cancer pathology. Because of these characteristics, RTKs are relevant targets in the fight against cancer. In the last decade, increasing numerous works describe the role of RTK signaling in the modulation of DNA repair thus providing evidence of the relationship between RTKs and the protein actors of the repair pathways. In this review, we propose a summary of the RTKs described as potential modulators of DNA double strand break repair pathways and a new therapeutic strategy by targeting both DNA repair and RTK-mediated signaling pathways.
Suggested Reviewers:	<p>benoit chenais, Professor Le Mans Universite benoit.chenais@univ-lemans.fr He has a good expertise in cancer domain and in signaling pathway</p> <p>Hamid Morjani, Professor Universite de Reims Champagne-Ardenne UFR Pharmacie hamid.morjani@univ-nantes.fr He has an excellent expertise in the cancer and the mechanisms of signaling pathways.</p> <p>masayuki Takahashi, Dr Tokyo Institute of Technology akahashi.m.ay@m.titech.ac.jp He has an excellent expertise in molecular mechanism of DNA repair including homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) pathways.</p> <p>Jean-Yves masson, Dr Head of laboratory, CHU de Quebec-Universite Laval Jean-Yves.Masson@crchudequebec.ulaval.ca He is a researcher at the CHU of Quebec-Laval University Research Centre, Oncology axis. He is full professor and responsible of the laboratory (Stability of genome". He has an excellent expertise in signaling and DNA repair pathways related to cancer domain.</p>

Relationships between DNA repair and RTK-mediated signaling pathways

Thomas Chabot^a, Yvonnick Cheraud^a, Fabrice Fleury^{a,*}

^a Mechanism and regulation of DNA repair team, UFIP, CNRS UMR 6286, rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France Université de Nantes, France.

* Corresponding author E-mail: fleury-f@univ-nantes.fr

Abstract

Receptor Tyrosine Kinases (RTK) form an important family involved in numerous signaling pathways essential for proliferation, cell survival, transcription or cell-cycle regulation. Their role and involvement in cancer cell survival have been widely described in the literature, and are generally associated with an overexpression and / or excessive activity in the cancer pathology. Because of these characteristics, RTKs are relevant targets in the fight against cancer. In the last decade, increasing numerous works describe the role of RTK signaling in the modulation of DNA repair thus providing evidence of the relationship between RTKs and the protein actors of the repair pathways. In this review, we propose a summary of the RTKs described as potential modulators of DNA double strand break repair pathways and a new therapeutic strategy by targeting both DNA repair and RTK-mediated signaling pathways.

Abbreviation

53BP1	p53-Binding Protein 1	MDM2	Mouse Double Minute 2 homolog
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	MMR	Mismatch Repair
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related	MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
ATRIP	ATR-Interacting Protein	MST1R	Macrophage Stimulating 1 Receptor
BAD	Bcl-2-Associated Death promoter	mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
BER	Base Excision Repair	NER	Nucleotide Excision Repair
BLM	BLoom syndrome Mutated protein	NFκB	Nuclear Factor-Kappa B
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2	NHEJ	Non Homologous Ends Joining
CDC25a/c	Cell Division Cycle 25a/c	NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
CHK1	Checkpoint Kinase 1	NTKR	Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor
CHK2	Checkpoint Kinase 2	NTP	Nucleotid Triphosphate
CtIP	CtBP-Interacting Protein	PALB2	Partner And Localizer of BRCA2
DDR	DNA Damage Repair	PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
DNA-PKcs	DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit	PAXX	Paralog of XRCC4 and XLF
DSB	Double-Strand Break	PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
EfnB1	Ephrin-B1	PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase)
EGFR/HER1	Epidermal Growth Factor Receptor/Human Epidermal Growth Factor Receptor-1	PKC	Protein kinase C
EphA/B	Ephrin type-A/B	PLCγ	Phospholipase C, Gamma
EPHR	Erythropoietin-Producing human Hepatocellular Receptors	PSI	Plexins, Semaphorins and Integrins
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases	PTB	Phosphotyrosine Binding Domain
EXO1	Exonuclease 1	Rad51AP1	Rad51-Associated Protein 1
FGFR2/4	Fibroblast Growth Factor Receptor 2/4	RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
FOXO1	Forkhead Box Protein O1	RM11	RecQ-Mediated genome Instability protein 1
GAB1	GRB2-Associated-Binding protein 1	RON	Recepteur d'Origine Nantaise
GRB2	Growth factor Receptor-Bound protein 2	ROS	Reactive Oxygen Specie
GSK3β	Glycogen Syn-thase Kinase 3 Beta	RPA	Replication Protein A)
HGFR	Hepathocyte Growth Factor Receptor	RTK	Receptor Tyrosine Kinase
HIF1	Hypoxia Inducible Factor 1	SH2/3	Src Homology 2/3
HR	Homologous Recombination	STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
IGF1R	Insulin like growth factor 1 receptor	TIE2	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
InsR	Insulin Receptor	TKD	Tyrosine Kinase Domain
IRS1/2	Insulin Receptor Substrate 1/2	TOPIII3	DNA Topoisomerase III α
ITD	Internal Tandem Duplication	TrkA/B/C	Tropomyosin receptor kinase A/B/C
JAK	Janus Kinase	VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
Lig4	Ligase 4	XLF	XRCC4-like factor
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases	XRCC4	X-ray Repair Cross-Complementing protein 4

1. Introduction

Every day cells undergo approximately 10,000 lesions in their genomic DNA¹. These lesions have to be repaired to avoid mutations that can lead to cellular dysfunctions and carcinogenesis. If the level of nucleic acid alteration remains too high despite of the cell cycle being stopped and repair attempts being made, programmed death by apoptosis is triggered. In a pathological context like cancer, DNA damage repair (DDR) systems can be hijacked to counteract the action of genotoxic therapy, thus favoring the radio- or chemo-resistance of cancer cells. In a physiological context, these DDR perform are closely related to the chromatin structure to restore genetic integrity². Various mechanisms are involved and depend on factors such as the nature of the damage (single-strand break, double-strand break, basic mismatch, etc.) but also on the stage of the cell cycle. Thus, errors due to genome replication will essentially involve the MMR repair pathway³; basic modifications, such as chemical bypass, will be repaired by BER or NER⁴. Among DNA damage, DSBs are the most deleterious² and can be induced by replication errors and stress⁵, a high rate of gene transcription⁶, the formation of reactive oxygen species (ROS)⁷ by metabolism, natural or therapeutical radiations². These DSBs are repaired by 2 major mechanisms: Non Homologous Ends Joining (NHEJ) and Homologous Recombination (HR). To achieve the most effective repair, the choice of the repair pathway depends on the stage of the cell cycle during which the damage occurs⁸ and on the nature of the damage⁹.

When a DSB occurs the MRN complex allows the relocation of the ATM protein to the break site. This promotes its activation by auto phosphorylation¹⁰. The ATM protein also phosphorylates CHK2 in order to activate cell cycle checkpoints. Deregulation of the cell cycle leads to genome instability due to the proliferation and anarchic and excessive division of cells. ATR, regulated by its ATRIP subunit, is recruited at the DSB site at the same time as ATM¹⁰ by the RPA proteins already present at the break site. ATR promotes the phosphorylation and activation of CHK1 which mainly regulates the S / G2 phases of the cell cycle. Thus, the phosphorylation of the CDC25a protein by its degradation and reduces replication during S phase, while the phosphorylation of CDC25c stops the cycle in G2 phase. The ATM and ATR pathways act respectively on CHK1 and CHK2 proteins to stop the cell cycle which triggers different DSB repair mechanisms mediated by 53BP1 and MRN / CtIP. The activation of ATM then leads to the phosphorylation of other actors involved in the repair of DSBs such as histone H2AX into γ H2AX, a direct marker of these DSBs¹¹. Simultaneously, structural modulation of the DNA is observed to release and open the chromatin surrounding the DSB. This chromatin remodeling facilitates the opening of the double-stranded DNA to expose or hide nucleic sequences and to replace histones by specialized variants¹¹. The repair begins with the recognition of the DSB by damage sensor proteins. Thus MRN complexes and Ku70 / 80 recognize the damage and act as a recruitment platform for both HR and NHEJ pathways.

2. Major pathways involved in DSB repair

2.1 Non-Homologous Ends Joining - Rapid repair through the cell cycle

Because NHEJ is faster and more efficient than HR, NHEJ is the major repair mechanism used by human eukaryotic cells during the cell cycle. However, this repair is often accompanied by the deletion or insertion of bases which leads to the rapid but not very faithful repair of the damaged DNA. Indeed, the addition or loss of bases can induce a shift in the reading frame of the gene leading to inactivation or mutation in the genome. The NHEJ mechanism and the structures of the involved actors have recently been reviewed¹². During the NHEJ process, a recognition step is mediated by the Ku70/80 complex which directly associates with DNA DSBs (**Figure 1A, 1B**). These heterodimeric proteins are characterized by high intracellular levels and a strong affinity for DNA (10^{-9} M / 10^{-10} M), which are additional factors in favor of the repair of DSBs by NHEJ¹³. This heterodimeric complex acts as a recruitment platform for various proteins, like the DNA-PKcs protein (**Figure 1C**). This kinase interacts with the C-terminal domain of Ku80 and thus increases its affinity for DNA¹⁴. Its activity is triggered by its auto-phosphorylation and is regulated by the Ku70 / 80 complex. The DNA-PKcs / Ku70 / 80 / DNA complex phosphorylates C-terminal domain of the Artemis endonuclease which then releases the activated N-terminal domain (**Figure 1D**). Depending on the nature of the DNA damage, it is necessary to remove or add nucleotides by the action of nucleases like Artemis. Poly μ and λ polymerases then intervene. They interact with Ku70 / 80 and can incorporate NTP bases (**Figure 1E**). Finally, Lig4, XRCC4, XLF and PAXX form a ligation complex (**Figure 1F**). Once the ligation is complete, DNA-PKcs phosphorylates the Ku70 / 80 complex to trigger the release of the various protein actors from the repair site (**Figure 1G**).

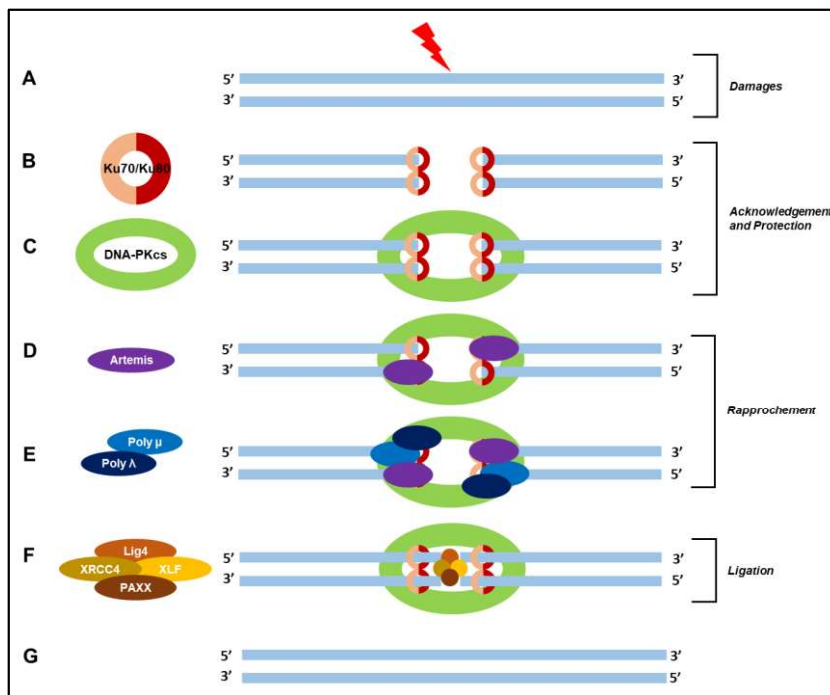


Figure 1 – The DSB repair by the non-homologous end joining mechanism. The NHEJ is the most present DSB repair mechanism in the cell because it can intervene at any time of the cycle. It results in a simple ligation, it involves many actors and in particular its central protein: DNA-PKcs. Following the damage (A), the DSB is recognized by the Ku70/80 complex (B) which allows the recruitment of DNA-PKcs (C). The resection of the ends of the DSB is carried out by the Artemis protein (D) before the neosynthesis of the DNA by the polymerases (E). The DSB is then bound by the Lig4-XRCC4-XLF-PAXX protein complex (F). The departure of all NHEJ actors marks the end of DSB repair (G).

2.2 Homologous Recombination – Faithful repair at a specific time

The faithful repair mechanism of HR takes place during the S/G2 phase of the cell cycle. Indeed, during the process of repair the copy of the gene present on the sister chromatid of the damaged chromosome serves as a model, which ensures the fidelity of the DNA repair. This mechanism and the structures of the involved actors have also recently been reviewed¹⁵. First, HR begins with the recognition of the DSB by the MRN complex and the resection of its ends (Figure 2A, 2B). The newly formed ends of the DSB then undergo a primary limited resection of the 5' to 3' end, in particular by the Mre11 protein of the MRN complex and the CtIP protein to allow the formation of outgoing 3' OH ends (Figure 2B). A second resection is performed over a longer distance, either by EXO1 or by the DNA2 endonuclease involving the BLM-RMI1-TOPBP1 complex (Figure 2C). The created outgoing 3'OH ends are protected by the RPA proteins to prevent the binding of Rad51 (Figure 2D), but also to eliminate the formation of potential secondary structures by the single-stranded DNA. BRCA1 and BRCA2, the mediators of the repair of DSBs by HR are then activated. The BRCA1 protein facilitates the recruitment of BRCA2 and PALB2 to the DSB, in particular by the interaction of PALB2 with BRCA1 following the phosphorylation of PALB2 by ATR¹⁶. The BRCA2 mediator allows the recruitment of Rad51 on the break site by ensuring its nuclear translocation (Figure 2F). The Rad51-BRCA2 interaction is essential for the proper functioning of the HR. The Rad52 protein also serves as a recruitment platform. It forms a multimeric ring around the 3'OH end of the single strand of the DNA (Figure 2E) and promotes the replacement of RPA by Rad51 (Figure 2F). Because of its homo-oligomerization property, Rad51 can form a nucleofilament around the single-stranded DNA at the DNA break site. Although the recognition mechanism is still unclear, the Rad51 nucleofilament is able to search and invade the homologous sequence of the sister chromatid to form a D-loop complex (Figure 2G). This displacement loop is stabilized by Rad51 and Rad51AP1¹⁷. The polymerases and ligases then reconstruct the lost sequence based on the homologous sequence of the complementary DNA of the sister chromatid (Figure 2H). Once HR is completed, strand exchange causes the formation of Holliday junctions which are removed by the action of a resolvase (Figure 2H). Finally, the hydrolysis of ATP by Rad51 allows the dissociation of the nucleofilament and the release of the proteins associated with DNA (Figure 2I).

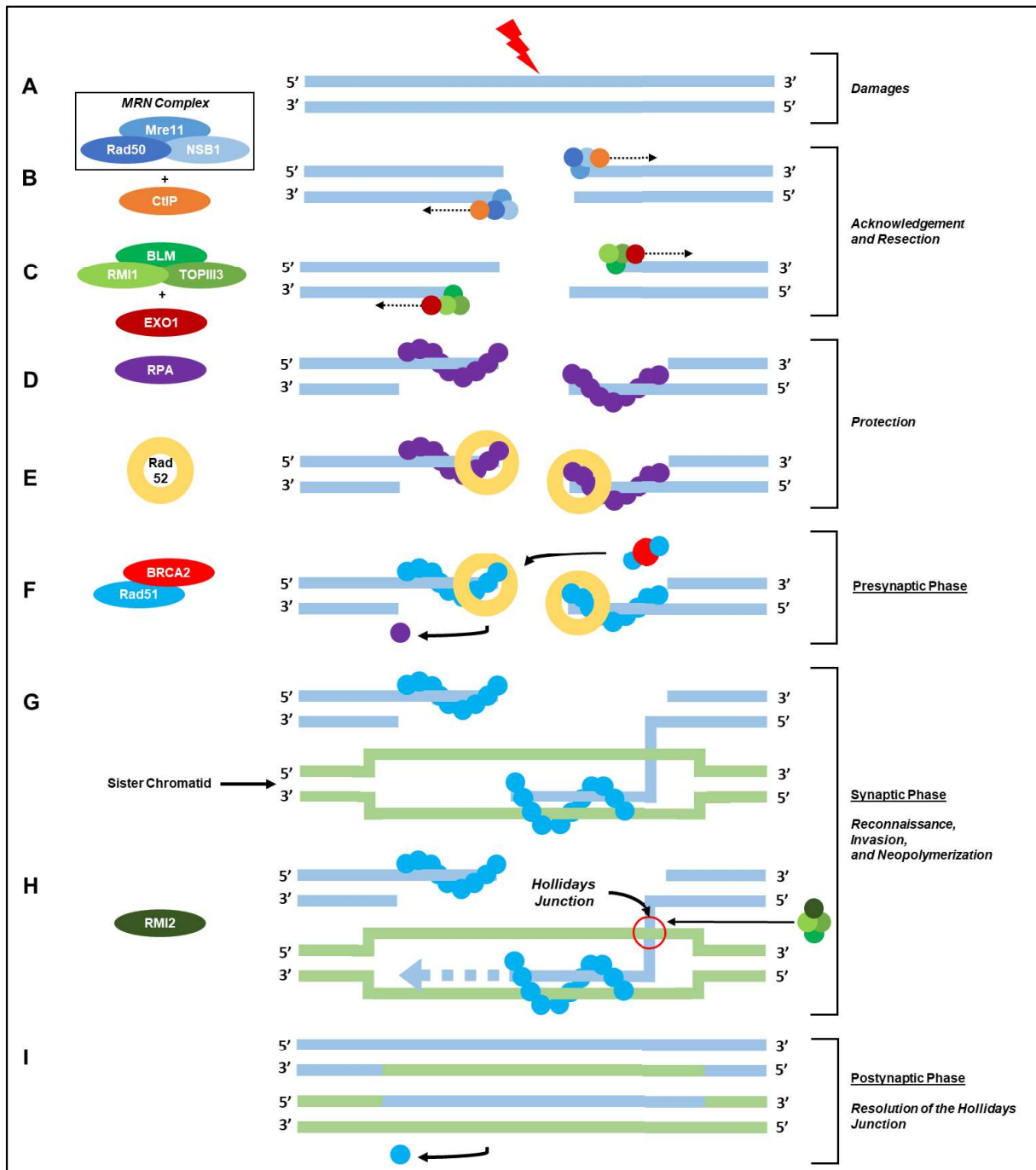


Figure 2 – The DSB repair by the homologous recombination mechanism. The HR is the DSB repair mechanism mainly used during S/G2 phase cell cycle arrest. It is a fine and complex mechanism involving many actors and in particular its core protein: Rad51. Following the damage (A), the DSB is recognized by the MRN complex which, in partnership with the CtIP protein, allows DNA resection (B). A longer resection is then performed by the BLM-RMI1-TOPIII3-EXO1 complex to form a 3' single-stranded end at the DSB (C). RPA proteins are then recruited to protect this outgoing end (D). The Rad52 protein is then placed on the 3' outgoing end (E) and exchanges between the RPA and Rad51 proteins which are recruited at the break site by BRCA2 (F). The nucleofilament of Rad51 then scans the sister chromatid for a sequence homologous to the damaged sequence (G) and invades the homologous chromosome. Neopolymerization is then performed and the Hollidays junctions formed are resolved by the BLM-RMI1-TOPIII3-RMI2 complex (H). The departure of Rad51 from the DNA marks the end of repair by HR (I).

3. Modulation of DNA repair by RTK-mediated signaling pathways

The majority of proteins involved in the HR and NHEJ repair pathways are highly regulated by post-translational modifications such as kinase-mediated phosphorylation. RTKs constitute an important family involved in numerous signaling pathways essential for proliferation, cell survival, transcription or cell cycle regulation. Their role and involvement in cancer cell survival following irradiation have been widely described in the literature, and are frequently associated with their overexpression and / or excessive activity in the cancer pathology. Because of these characteristics, RTKs are relevant targets in the fight against cancer. Overall, the role of RTK signaling in the modulation of DNA repair appears more and more evident and direct interactions between RTKs and the main actors of the different repair pathways such as Rad51 and DNA-PKcs are also possible. Indeed,

although most RTKs are membrane-bound, some receptors can be internalized in cellular medium by endocytosis and even reach the nucleus. This intracellular mobility may explain how RTKs interact and act on DNA repair proteins in response to DNA damage. In this perspective, we propose here to identify all of the RTKs described as potential modulators of DNA DSB repair pathways by acting directly or indirectly on the DNA repair proteins.

3.1 Activation of RTK signaling pathways

Discovered in the 1980s¹⁸, the RTK family is encoded by 58 genes, which are divided into 20 subfamilies (**Figure 3**). RTKs are classified mainly according to the structure of the extracellular part of the receptor. All RTKs have a relatively similar structure which comes from the Ig-Like RTK model¹⁹. RTKs are composed of an extracellular domain specific to each subfamily (**Figure 3**), which interacts with their specific or non-specific extracellular ligands. Like cell receptors, RTKs present an α helix transmembrane region (**Figure 3**), composed of around twenty hydrophobic amino acids crossing the cell membrane and connected to the extracellular and intracellular media. Between the transmembrane region and the kinase activity domain, there is an intracellular juxta membrane part (**Figure 3**) involved in the activation of various cytoplasmic signaling pathways. The C-terminal domain of all RTKs is intracellular and presents a kinase activity (**Figure 3**)²⁰. This tyrosine kinase domain (TKD) is activated by phosphorylation. Its ATPase activity allows the transfer of ATP γ phosphate onto the tyrosine of target proteins which ensures the phosphorylation cascade of different signaling pathways²⁰. The activation mechanism of RTKs is also similar, although some exceptions exist concerning the activation or inhibition steps²¹. First of all, for most RTKs, the interaction of the extracellular part of the receptor with its ligand promotes the dimerization (homo or hetero) of the receptor in a non-covalent manner. Indeed, there is no direct contact between the monomers, but an association mediated by the ligand²².

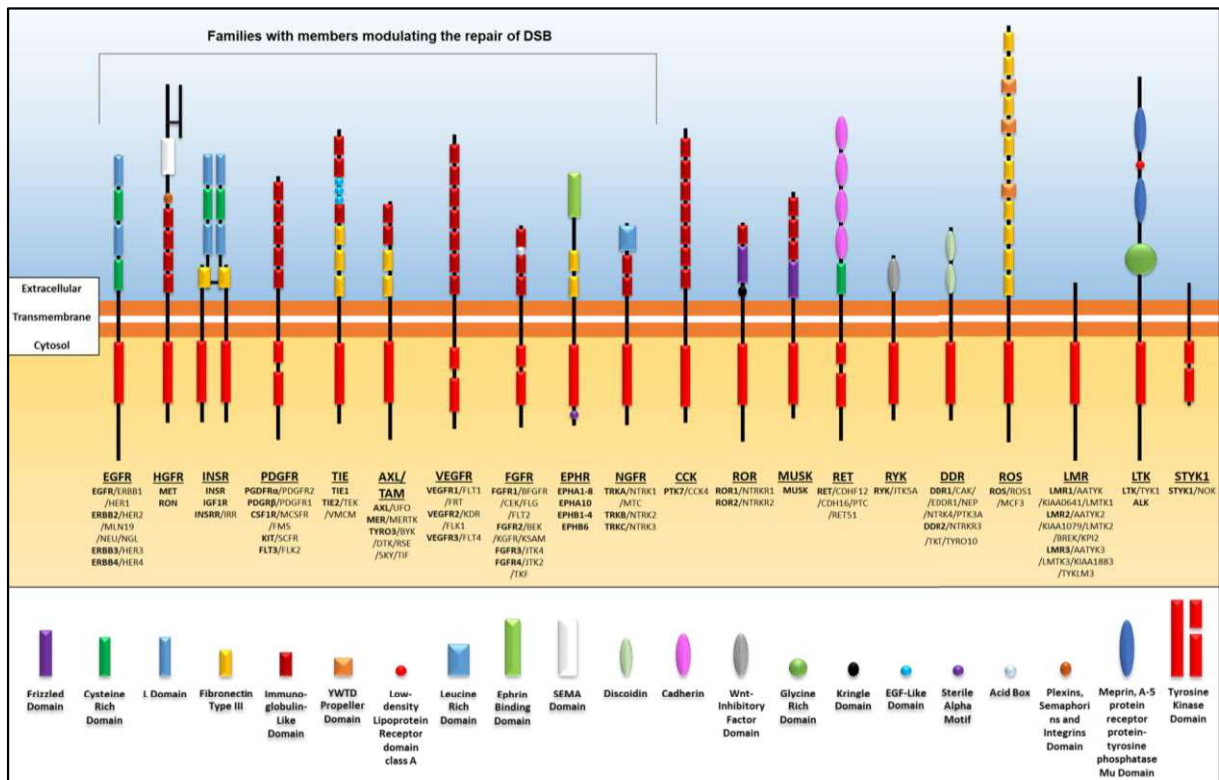


Figure 3 – The 20 families of human receptor tyrosine kinase activity & their structure. The schematic representation of the 20 families of receptors with tyrosine kinase activity is shown above. All the members of each family, and their different names given through the literature, are detailed under each of the receptors. As all receptors have a very similar intracellular part, with a domain with tyrosine kinase activity, they differ and are therefore classified according to their extracellular part. The composition of the different extracellular parts is detailed. The RTK families, some members of which are involved in the modulation of the repair of DSB emitted in evidence (Inspired et modified by Lemmon et al. 2010).

In most cases, the dimerization of the RTK receptor by the ligand provokes a series of trans-auto-phosphorylation in the intracellular region of the TKD which activates the receptor after a structural modification (**Figure 4**). At first, the trans-auto-phosphorylation on tyrosine residues of the previously mentioned juxta membrane region enables the removal of its cis-inhibition by modifying the conformation (**Figure 4**). Then, a second wave of phosphorylations on the TKD and the C-terminal regions generate a phosphotyrosines binding domain (PTB) on the RTK which interacts with adaptor proteins of different signaling pathways. Among these adaptors, we can mention GRB2 able to interact through its SH2 domain with the RTK or PTB domains of other partners. TKDs can also phosphorylate other proteins involved in signaling pathways (GAB1, IRS1...)²³.

Many signaling pathways regulated by RTKs, begin by the interaction of TKD with protein adaptors like GRB2²⁴. This promotes Ras-GTP activated form which is responsible for the activation of central intracellular signaling pathways. The first, the Ras / RAF or MAPK / ERK pathway (**Figure 4**), leads in particular to the differentiation and modulation of the cell cycle²⁵. The PLC γ / PKC pathway (**Figure 4**) interacts directly with the RTK to then activate ERK and the MAPK pathway mentioned above²⁵. The second, the Ras / Rac pathway (**Figure 4**), leads to the reorganization of the cytoskeleton²⁶. The third, the Ras / PI3K or PI3K / Akt pathway (**Figure 4**) is essential in many functions, such as angiogenesis via HIF1. It is also involved in the regulation of the cell cycle via the proteins Wee1, p21 and GSK3 β , and the development and protein synthesis via the Akt / mTOR pathway (**Figure 4**). It also controls cell survival and apoptosis via MDM2, FOXO1, BAD and NF κ B^{27,28}. In parallel, the JAK / STAT pathway interacts directly with TKD and leads to cell differentiation (**Figure 4**)²⁹. After the activation of these pathways, a negative feedback system is set up by the interaction of Ras-GAP with the RTK through its SH3 domain. This restores the inactive Ras-GDP form from the active Ras-GTP form and stops the signaling pathways (**Figure 4**). The MAPK / ERK and PI3K / Akt pathways are thus involved in cell survival in which the maintenance of genomic integrity and the repair of DNA play an important role.

These pathways are often over-activated in tumors. In fact, the inhibition of PI3K induces radio-sensitization of the treated tumors by decreasing the HR and NHEJ DNA repair pathways^{30,31}. The PI3K kinase regulates many cellular mechanisms such as DNA repair. The Akt protein is a key kinase substrate and is involved in the repair of irradiation-induced DSB by HR and NHEJ. It has been shown that isoforms Akt1 and 3 can phosphorylate DNA-PKcs which activates the repair of DSBs by NHEJ³². The knockdown of Akt1 decreases the level of Rad51 and reduces HR repair. After irradiation, an increase of BRCA1foci and a diminution of Rad51 foci colocalized with γ H2AX foci are observed that impairs DNA repair by HR³³. A decrease in Rad51 protein is also observed following inhibition of PI3K²⁸.

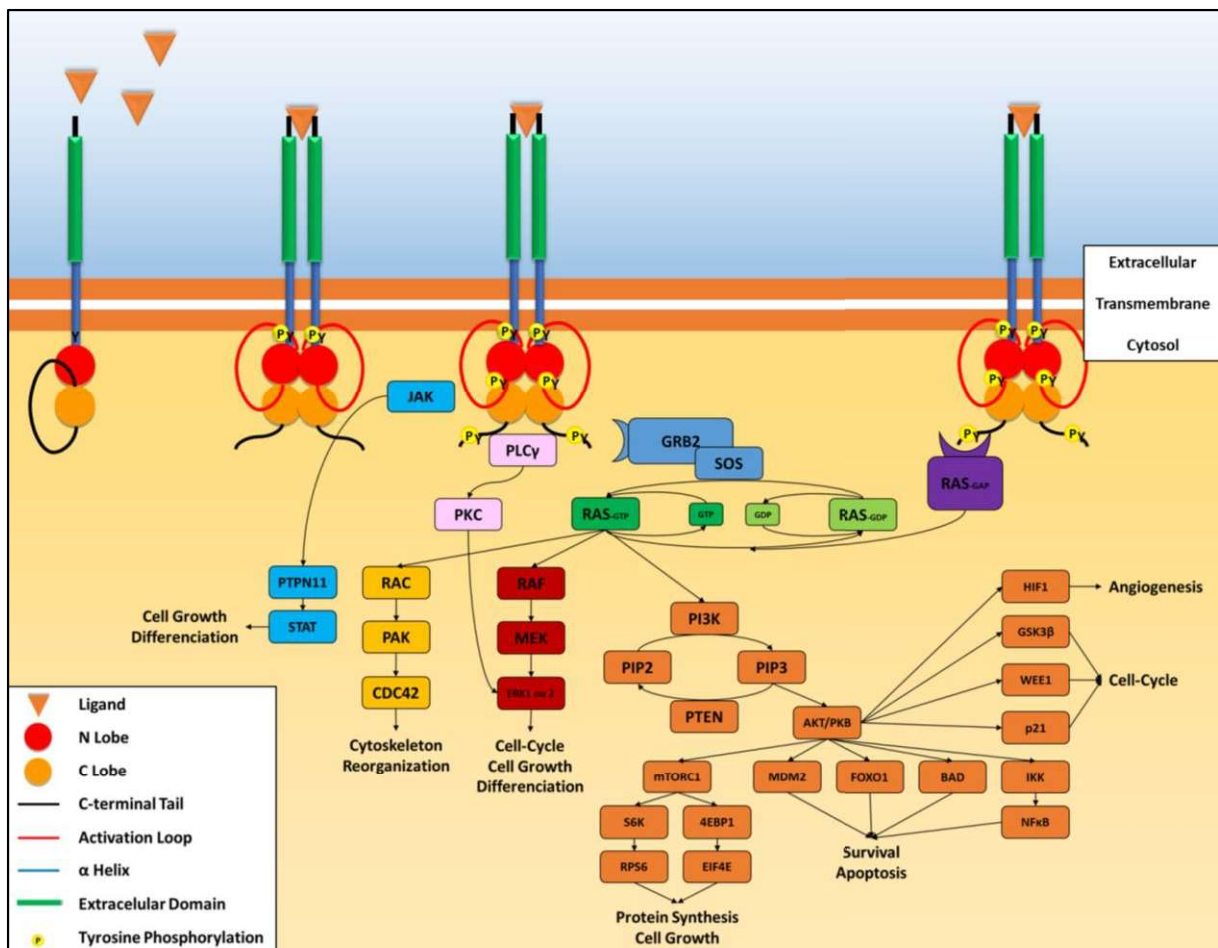


Figure 4 – Activation of receptors with tyrosine kinase activity and the resulting intracellular signaling pathways. The schematic representation of a receptor with ligand-binding tyrosine kinase activity is shown above. The interaction with their ligand leads the majority of RTKs to dimerize. This dimerization leads to the activation of the receptors by trans-auto-phosphorylation of their tyrosine kinase domain. This domain will allow the activation of different cell signaling pathways essential for cell survival and proliferation.

3.2 EGFR/HER1 - Epidermal Growth Factor Receptor/Human Epidermal Growth Factor Receptor-1

The EGFR receptor (134kDa) is undoubtedly the most studied of RTKs. In humans, it is encoded by the EGFR gene located on chromosome 7p11.2 and belongs to the ERBB receptor family. Its extra-cellular part is composed of 2 domains rich in cysteines and 2 ligand interaction domains (**Figure 3**). The activation of this receptor is slightly different from that of the other RTKs presented above. Indeed, in this case the ligand does not connect to the two receptors but binds to the monomers to unmask monomer-monomer dimerization sites³⁴. The change in conformation leading to activation is due to the allosteric interaction between the two TKDs of the two monomers. Indeed, following dimerization, lobe C of the activating TKD interacts with lobe N of the receiving TKD and leads to the release of the active site by structural modification (**Figure 4**). It activates the different signaling pathways mentioned above by interacting with numerous ligands. The complexity of EGFR-mediated signaling is also increased by the fact that the receptor can be homo-dimerized or hetero-dimerized with other receptors such as c-Met³⁵ or IGF1R³⁶. These possibilities lead to the activation of an even larger number of signaling pathways. EGFR is thus expressed in many cancers in which the prognosis for survival is unfavorable, such as in urothelial cancers.

The involvement of EGFR in the repair of DSBs has been highlighted many times in the past 15 years. The development of numerous inhibitors directed against this receptor has particularly helped to understand its action. The modulation of EGFR activity affects both NHEJ and HR DNA repair pathways. In particular, the use of erlotinib in a model of NSCLC A549 and H1299 cell lines stops the repair of DSBs by HR or NHEJ, mediated by the EGFR receptor following its activation by different ligands (EGF, TGF α , etc.)³⁷. DNA repair is therefore generally less effective when EGFR is inhibited by erlotinib. Following the prior use of arsenic trioxide, the authors observed an accumulation of γ H2AX foci, characteristic of a decrease in repair of DNA DSBs, but more particularly a decrease in the quantity of Rad51 and Rad50 proteins (**Figure 5**) which play a central role in HR for the first and in the MRN complex for the second³⁸. A decrease in phosphorylation of the BRCA1 protein, essential for the activation of the HR mechanism, has also been observed. In contrast, the simple use of arsenic trioxide without inhibiting EGFR increases the effectiveness of EGFR-mediated repair via the PI3K / Akt and MAPK / ERK pathways. The involvement of EGFR has also been shown in a model of MCF-7 breast cancer cells, following the inhibition of the receptor by erlotinib. An increase in γ H2AX foci, a decrease in Rad51 foci and cytoplasmic retention of BRCA¹⁶ have been observed. Another EGFR inhibitor, gefitinib, has also shown interesting results in NSCLC A549 and H1650 cell lines. Inhibition of EGFR leads to limit the ERK pathway and to decrease the Rad51 level³⁹ (**Figure 5**). In MCF7 and AR42J mammary gland cancer cells, the inhibitor induces significant interaction between the EGFR receptor and the DNA-PKcs, a protein essential to the repair mechanism by NHEJ. DNA-PKcs is retained in the cytoplasm (**Figure 5**), thus reducing its nuclear activity⁴⁰. Finally, it increases the radiosensitivity of stem-like gliomaspheres cells by decreasing the activation of the EGFR / Akt pathway. Other inhibitors such as NSC have shown an impact on NHEJ due to a decrease in DNA-PKcs phosphorylation and its activity (**Figure 5**) in PC3 and DU145 prostate cancer line⁴¹. Nicotinib combined with radiation-induced damage prevents the nuclear translocation of EGFR and decreases the expression and the activity of Rad51⁴². Finally, lapatinib which prevents the formation of the BRCA1 / EGFR complex and its entry into the nucleus, inhibits HR (**Figure 5**) in MDA-MB-231, 453 and 458 triple negative breast cancer lines⁴³.

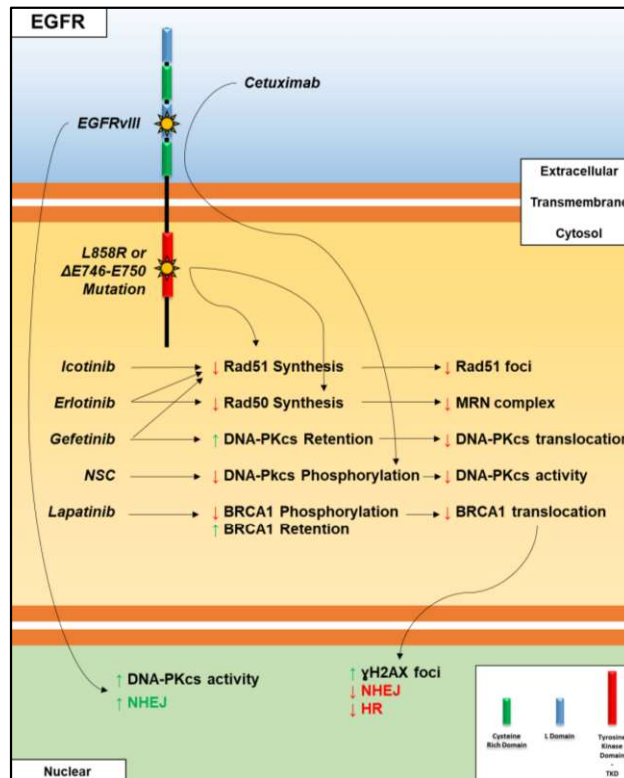


Figure 5 – Involvement of the EGFR receptor in the modulation of DSB repair. The schematic representation of the EGF receptor (EGFR) is shown above. All known links between this RTK and DSB repair are also detailed. We can see that this receptor modulates both HR and NHEJ repair following some of these mutations or its inhibition.

In clinical applications, antibodies directed against the EGFR receptor such as cetuximab C225 are used. They inhibit its activity in NSCLC A549 cell lines and abolish NHEJ repair after radio-mimetics (H₂O₂ peroxide or cisplatin) treatment⁴⁴. In the absence of the EGFR inhibitor, the damage caused by these effectors increases the nuclear translocation of EGFR complexed with DNA-PKcs (**Figure 5**). Thus, an increase in DNA-PKcs activity and therefore an increase of NHEJ repair are observed. Conversely, inhibition of NHEJ induces radio-sensitization of squamous cell carcinoma cells of the head and neck (UMSCC1 and 6)⁴⁵.

Mutant forms of the EGFR receptor are characterized by excessive activity. This is the case of the EGFRvIII variant which has a mutation in the extracellular domain, but also of mutations L858R and ΔE746-E750 in the TKD region which induce the activation of receptor-dependent signaling pathways in a ligand-independent manner. When these mutations are present in a NSCLC cell line model, hypoxia leads to an increase in the number of γH2AX foci and a decrease in the Rad51 and 50 proteins involved in HR and NHEJ in comparison with non-mutated cells^{46,47} (**Figure 5**). This phenomenon is potentially due to the inability of the receptor to be transported in the nucleus and to interact with DNA-PKcs, thereby promoting the radio- and chemo-sensitization of cancer cells. Regarding the EGFRvIII mutant, the cells become radioresistant. Indeed, its presence leads to an increase in the repair of DSBs through the DNA-PKcs and the PI3K pathway⁴⁸.

An EGFR-Rad51 fusion protein has been described in the NSCLC lung cancer line^{49,50}. This chimeric protein is composed of the TKD of EGFR and a large part of Rad51. It is able to activate the EGFR-mediated MAPK and PI3K / Akt pathway. However, this fusion protein has no interaction site for the c-Cbl protein involved in the degradation of EGFR, therefore increasing its stability and promoting its pro-metastatic and onco-genetic properties. The fusion protein has been shown to be sensitive to EGFR inhibitor treatments such as erlotinib, but its involvement in the response to DNA damage through its Rad51 domain has still not been studied^{49,50}.

3.3 HGFR family/ Hepatocyte Growth Factor Receptor

The HGFR family is composed of two receptors: RON (MST1R gene chr.3p21.31) and c-Met (MET gene chr.7q31.2). They have a 34% sequence homology in humans, the intracellular part being 60% homologous. The extracellular part, common to the two receptors, is composed of an interaction zone with the ligand in which we find the SEMA α and β domains linked by a disulfide bridge, followed by a PSI domain and four Ig-like domains (**Figure 3**). RON and c-Met are involved in cell survival and proliferation through the MAPK and PI3K pathways (**Figure 4**).

The 152kDa RON receptor, also known as MST1R, is involved in cell survival. The binding of its ligand MST1 activates the cell through the PI3K / Akt pathway. The RON receptor is an unfavorable marker in the survival prognosis of patients with urothelial cancers, such as bladder cancer. It is also often expressed in many cancers including thyroid, liver, breast and ovarian cancer. It has been demonstrated that following nuclear translocation this receptor has a role in the repair of DSBs by NHEJ. In response to hypoxia, the receptor is also transported to the nucleus⁵¹, especially in TSGH8301 bladder cancer cells. Immunoprecipitation of the nuclear RON receptor reveals a link with 2 NHEJ players, Ku70 via its TKD and DNA-PKcs⁵². In cancer cells, overexpression of the receptor promotes chemoresistance associated with activation of DSB repair s by NHEJ.

The c-Met receptor (155kDa) is also an unfavorable marker of the survival prognosis of patients suffering from pancreatic cancers and squamous carcinomas of the head and neck. It is also expressed in many other types of cancer (colorectal, thyroid, cervical, etc.). Recently the nuclear translocation of c-Met has been shown in a primary breast cancer cell model (MCF10A and 12A) after peroxide H₂O₂ treatment⁵³. Likewise it has also been described that an active nuclear form of the c-Met receptor is able to stimulate the transcription of certain genes in a breast cancer line MDA-MB231⁵⁴. The nuclear translocation of the receptor in response to damage is therefore largely proven⁵⁵, and its colocalization with the γ H2AX marker has also been demonstrated. Nuclear translocation is perhaps the first step in its role in DSBs repair by HR. The c-Met receptor stimulates the radioresistance of glioblastoma cancer cells. Indeed, its post-irradiation overexpression is correlated with an increase in the expression of proteins belonging to the HR repair pathway: ATM, CHK2 and Rad51 (**Figure 6**). All of these proteins are associated with rapid repair of radiation damage.

Conversely, inhibition of c-Met decreases the phosphorylation of ATM, the expression of Rad51 and impairs post-irradiation DNA repair⁵⁶. On the other hand, following irradiation the c-Met receptor is overexpressed by activation of the ATM pathway⁵⁷. Inhibition of c-Met reduces the radio-resistance of certain cancer cells^{58,59}, notably in a model of gastric adenocarcinoma GTL-16 cells and DU145 prostate cancer cells. The inhibition or activation by different molecules such as the HGF-SF ligand or the PHA665752inhibitor leads to a respectively positive or negative modulation of the repair of DSBs by HR (**Figure 6**)^{60,61}. In particular, when chemotherapy is associated with radiation, a decrease in the expression of Rad51 and in the formation of γ H2AX foci, a marker of DSBs, is observed^{60,62}. The inhibition of c-Met also decreases the nuclear translocation of Rad51, an essential step in repair by HR, no doubt due to a decrease in interaction with the BRCA2 protein⁹⁷. The activity of Rad51 is modulated by its phosphorylation by c-Met. Indeed, the *in cellulo* phosphorylation of Rad51 by c-Met has been shown using the M1250T c-Met mutant, an over-activated form of the protein kinase⁶⁰. Our team has demonstrated *in vitro* the direct phosphorylation of Rad51 using the wild-type c-Met kinase and unphosphorylatable Rad51 mutants⁶¹ (**Figure 6**). Phosphorylation leads to an increase of Rad51 monomer-monomer interaction and to the stabilization of the Rad51 nucleofilament. Inhibition of the c-Met receptor also blocks the phosphorylation of Akt and MAPK, proteins regulating cell survival signaling and DNA repair, in a concentration-dependent manner (**Figure 6**). It is interesting to note that both the c-Met and the RON receptors belong to the same family and are complementary since they are able to activate the two major mechanisms of DSB repair.

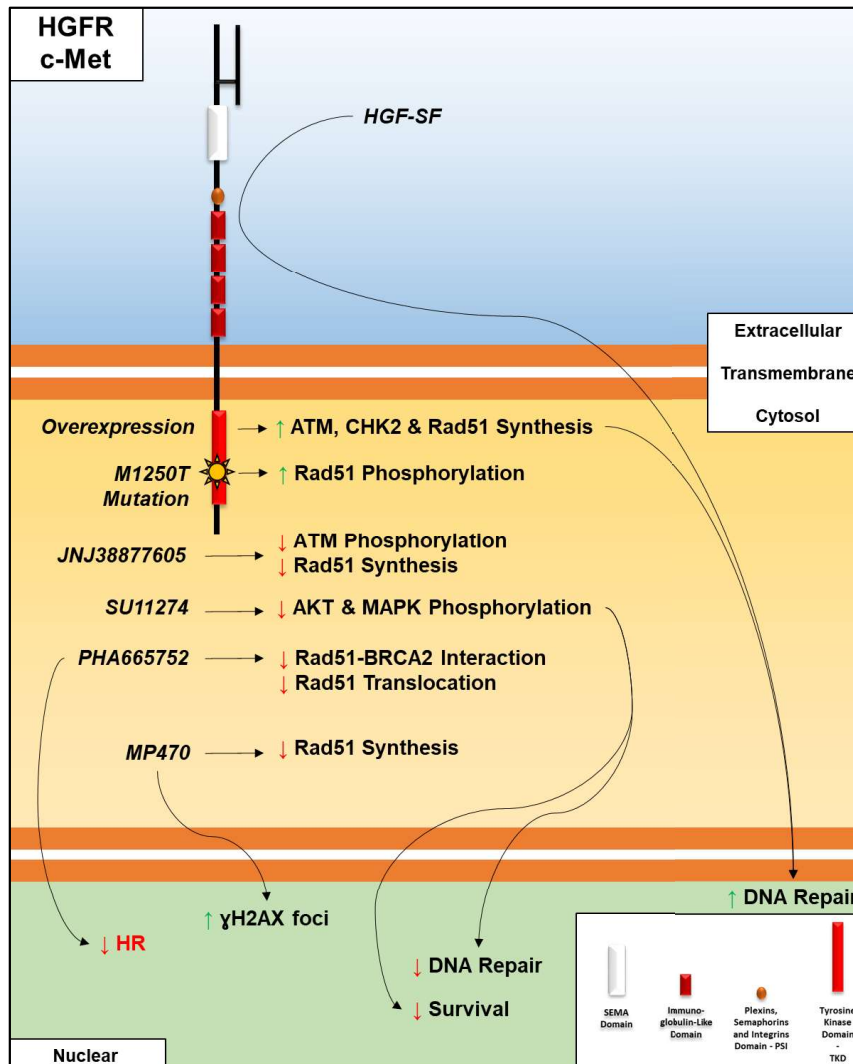


Figure 6 – Involvement of the HGFR receptor c-Met in the modulation of DSB repair. The schematic representation of the HGF receptor (HGFR) c-Met is shown above. All known links between this RTK and DSB repair are also detailed. We can see that this receptor mainly modulates the repair by HR by playing on the synthesis and activation of the major players in this field, such as Rad51. This modulation was shown as a result of these mutations, inhibition or activation with its ligand HGF-SF.

3.4 IGF1R/Insulin Growth Factor 1 Receptor

The 154kDa IGF1R dimeric receptor, encoded by the IGF1R gene on chromosome 15q26.3, belongs to the InsR family. Each monomer has an extracellular region with two ligand interaction sites separated by a cysteine-rich domain. The whole is terminated by a fibronectin III domain where the α and β chains are connected by a disulfide bridge. Its mode of activation is different from the other RTKs because the dimeric receptor is already formed (**Figure 3**). Its activation is associated with a structural change triggered by the interaction with a ligand. IGF1R directly phosphorylates the IRS1 / 2 proteins activating the PI3K / Akt and MAPK pathways (**Figure 4**). This receptor is mainly involved in cell proliferation and survival. IGF1R is a favorable prognostic marker in renal cancers, but it is also highly expressed in thyroid, colorectal and prostate cancers.

IGF1R is suspected to contribute to the modulation of DSB repair because of its inhibition modulates the response to DNA damage. IGF1R interacts with different nuclear partners such as the 14-3-3 protein, H4 histone and PCNA in an H1 hESC embryonic stem cell model^{63,64}. IGF1R directly phosphorylates PCNA at positions Y60, Y133 and Y250 which leads to its ubiquitination after DNA damage⁶⁵. Indeed, in a mouse model of primary lung cancer cells, the use of an EGFR inhibitor (gefitinib) induces the accumulation of IGF1R in the nucleus in addition to the increase of IGF1R nuclear translocation mediated by amphiregulin (**Figure 7**)⁶⁶. Translocation and nuclear accumulation stop the cell cycle by activating p21. It should be noted that this step is essential for DSB repair and for the increase in cellular resistance to DNA damage³⁶. It has been shown that the formation of a heterodimer is possible between the two receptors leading to the double inhibition of IGF1R and EGFR⁶⁷. In colorectal cancer cell models (SW837, DLD1 and CaCo2), using the AEW541 inhibitor for IGF1R (**Figure 7**), and erlotinib or EGFR (**Figure 5**) respectively, the authors show an increase in radiation-induced DSBs, but also an increase in cell death by apoptosis. All of these phenomena are notably correlated with a decrease in Akt phosphorylation. In a PC3 and DU145 prostate cancer

model, the double inhibition of EGFR and IGF1R using erlotinib and AG1024 has a synergistic effect. An increase in cell radio-sensitivity, due inter alia to the inhibition of HR, is observed (**Figure 7**)⁶⁸. When IGF1R or EGFR is inhibited after irradiation, cell survival is decreased as apoptosis increases. The combination of the two inhibitors has showed a greater efficacy of the post-irradiation treatment suggesting a synergistic effect of the inhibition of the both IGFR1 and EGFR receptors¹⁰⁷. An increase in radio-sensitivity as well as a decrease in the amount of BRCA2 transcripts (an essential protein in HR) have been observed in irradiated CaCo2 cells, in which a K / R mutation (lysine-arginine substitution in the ATP binding domain of the β subunit) is introduced in the GF1R receptor (**Figure 7**)⁶⁹.

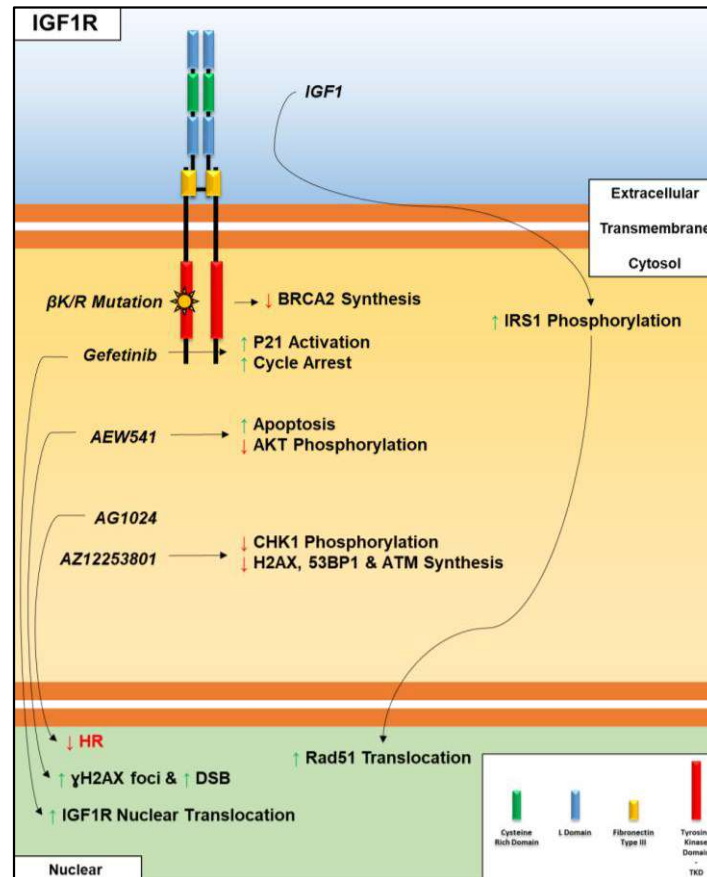


Figure 7 – Involvement of the IGF1R receptor in the modulation of DSB repair. The schematic representation of the IGF1 receptor (IGF1R) is shown above. All known links between this RTK and DSB repair are also detailed. We can see that this receptor mainly modulates the repair by HR by playing on the synthesis and activation of the major players in this field, such as Rad51. This modulation was shown as a result of these mutations, inhibition or activation with its ligand IGF1.

Although several studies illustrate the impact of IGF1R on the repair of DNA DSBs^{70,71}, its involvement in HR is much better described than in NHEJ. In general, the use of siRNA⁷² or specific inhibitors such as AZ12253801^{70,73,74} increases cellular radio-sensitivity, DNA damage and the number of γ H2AX foci. After irradiation, the extinction of IGF1R activity also leads to a stop in the cell cycle in G2 / M phase, because the receptor is able to regulate this checkpoint by modulating the activity of CHK1 via the PI3K / Akt pathways (**Figure 7**). Indeed, its inhibition leads to a decrease in the phosphorylation of serine 345 and 296 of CHK1 reducing its activity. Inhibition of IGF1R after induced radio damage also leads to HIF1 α -mediated radio-sensitivity in a lung cancer cell model⁷⁵, associated with a decrease in repair proteins such as H2AX, 53BP1 and ATM. The relationship between ATM and IGF1R has also been described. ATM regulates the expression of IGF1R which modulates ATM activity following damage⁷⁵⁻⁷⁷. The implication of IGF1R in HR has already been demonstrated several times in a fairly general manner^{78,79}. The receptor acts on specific HR proteins and in particular on Rad51. Indeed, the activation of IGF1R by its ligand promotes the phosphorylation of IRS1 which interacts directly with the Rad51 recombinase by its N-Terminal part and allows the nuclear translocation of Rad51 in response to DNA damage (**Figure 7**)⁷⁸.

3.5 Flt3/Fms-like tyrosine kinase 3

The Flt3 receptor (112kDa) belongs to the PDGFR family. It is composed of a succession of 5 Ig-like domains (**Figure 3**) and is encoded by the FLT3 gene on chromosome 13q12.2. Through the different signaling pathways it controls, it plays a role in proliferation, cell survival and cell differentiation. The involvement of the wild type receptor in the repair of DSBs has not yet

been demonstrated. However, the Flt3-ITD mutant receptor has been shown to modulate some of these mechanisms. This genetic mutation leads to a duplication of the juxtamembrane domain and is present in cases of acute myeloid leukemia⁸⁰. Its presence is associated with a bad prognosis for survival. Inhibition of the Flt3-ITD form in acute myeloid leukemia cells by Flt3 inhibitors (AC220 and PKC412) showed a decrease in DNA repair, the disappearance of γ H2AX foci and affected the levels of DSB repair proteins like BRCA1, BRCA2, PALB2, Rad51 for HR and Lig4 for NHEJ^{81,82}. The decrease in the expression of these proteins leads to a deficiency in DSB repair. Conversely, the overexpression of the mutant form of the Flt3 receptor in the same cells increases the repair by HR⁸³, the synthesis of Rad51 and the phosphorylation of the Akt and γ H2AX proteins. In contrast, DNA repair by conventional NHEJ appears to be slowed or decreased in the presence of this form of the Flt3 receptor. This is particularly the case in mouse B lymphocytes in which NHEJ is essential for the V(D)J reorganization of the genes coding for antibodies⁸⁴. This slowdown leads to the activation of the alternative pathway by increasing the synthesis of DNA ligase III α , which favors the introduction of errors in the genome by Alt-NHEJ⁸⁵.

3.6 TIE2/Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2

TIE2 is a 122kDa RTK which belongs to the TIE family. It has an extracellular part composed of 3 Ig-like domains, 3 fibronectin III domains and 3 EGF-like domains allowing interaction with its ligand (**Figure 3**). Encoded by the TEK gene on chromosome 9p21.2, the receptor is expressed mainly in liver, urothelial and cervical cancers. It is a favorable prognostic marker in hepatic and renal cancers. TIE2 plays a role in many biological processes: angiogenesis, survival of endothelial cells, proliferation, migration, adhesion, reorganization of the actin cytoskeleton. Its role in the repair of DSBs was described by the Gomez-Manzano team in 2017⁸⁶. The activation of the TIE2 receptor allows its nuclear translocation via caveolin 1 in a U251 glioma model⁸⁶. TIE2 can thus interact with major players in DNA repair such as DNA-PKcs and the Ku70 / 80 complex at the break sites. This results in increased radiation-induced damage repair by NHEJ⁸⁷. The phosphorylation of histone H4 by TIE2 on tyrosine 51 is recognized by the Abl1 kinase thus allowing its recruitment. The role of c-Abl in HR DNA repair is well known, it allows in particular the phosphorylation of Rad51⁸⁸⁻⁹².

3.7 Axl/Tyrosine-protein kinase receptor UFO

Axl, a 98kDa receptor from the Axl / TAM family, has an extracellular part composed of two Ig-like domains ensuring interaction with its ligand and two fibronectin III domains (**Figure 3**). RTK Axl is encoded by the Axl gene on chromosome 19q13.2. It is mainly involved in cell survival, in particular by modulating the repair of DSBs. Axl is known to be overexpressed in endometrial, urothelial, prostate, ovarian, breast, hepatic and renal cancers and is an unfavorable marker for survival. Inhibition of Axl in cells from squamous cell carcinoma of the head and neck reduces the repair of DSBs⁹³, observed in particular by the absence of disappearance of the γ H2AX marker. More specifically, NHEJ is decreased because a reduction in the phosphorylation of DNA-PKcs is observed after irradiation. Its involvement in HR was also highlighted. The inactivation of Axl reduces the expression of HR proteins as Rad51 and Mre11⁹⁴, which leads in particular to the reduction of the formation of Rad51 foci after DNA damage.

3.8 VEGFR2/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

The VEGFR2 receptor is encoded by the KDR gene on chromosome 4q12. It belongs to the VEGFR group with VEGFR1 and 3. This 151kDa protein has an extracellular part composed of a succession of 7 Ig-like domains interacting with its ligand (**Figure 3**). It plays a central role in angiogenesis, in the development of the vascular system, in cell survival and development. VEGFR is expressed in skin, cervical head and neck, urothelial and prostate cancers. It is an unfavorable survival marker in kidney cancer. Its involvement in the repair of DSBs has been suggested by the use SU5416, a specific VEGFR inhibitor, in HCT116 and HT-29 colorectal cancer cells following irradiation⁹⁵. The authors show that the inhibitor, combined with irradiation, reduces the rate of formation of γ H2AX foci and that DSB repair is reduced. The actors involved in the MAPK signaling pathways which ensure cellular radio-resistance, phospho-ERK and phospho-p38, are inhibited.

3.9 FGFR family

The FGFR group (Fibroblast Growth Factor Receptor) is composed of four members (called FGFR1 to 4). The extracellular part of these receptors is composed of 3 Ig-like domains that interact with the ligand and a region called acid box (AB) (**Figure 3**). FGFR is involved in the regulation of cell proliferation, differentiation, survival and angiogenesis. Among the four members, two receptors have been shown to be capable of modulating the repair of genomic DNA: FGFR2 and FGFR4.

FGFR2 (92kDa) is encoded by the FGFR2 gene on chromosome 10q26.13. It is expressed in lymphoma and breast cancer, but it is a favorable marker of survival in cervical, head and neck cancers. In a MCF-7 breast cancer line, FGFR2 interacts directly with the transcription factor POU1F1, which represses the promoter of the Mre11 gene coding for a protein of the MRN complex,

essential for the repair of DNA DSB⁹⁶. A reduction in the repair of DSBs, in particular by NHEJ is observed following overexpression of FGFR2 or activation of the receptor.

Another FGFR4 receptor (87kDa), encoded by the FGFR4 gene on chromosome 5q35.2, is expressed in many cancers: colorectal, thyroid, hepatic, pancreatic, renal, mammary, ovarian and pulmonary. It has been shown to regulate the level of expression of the core protein of HR, Rad51. Inhibition or lack of receptor expression decreases the radio-resistance of HT29 cells from colorectal cancer⁹⁷. In another colorectal cancer cell line, SW480, an increase in the efficiency of DSB repair, more particularly by HR, is observed following the overexpression of FGFR4. Indeed, under these conditions, a decrease in the γ H2AX foci and an increase in the expression of the Rad51 protein in response to radiation-induced damage are highlighted.

3.10 EPHR family

The EPHR family is composed of 16 members divided into two subclasses EphA (1 to 10) and EphB (1 to 6) which makes it the biggest family of RTKs. The genes of the EPHR family are encoded by different loci and they show sequence similarities. The receptors all have the same affinity for their ligand. The extra-cellular structure is composed of a binding domain for the Eph ligand, followed by a cysteine-rich domain and 2 fibronectin III domains (**Figure 3**). They are involved in different biological processes, particularly during embryogenesis (cell migration, segmentation, etc.) but also in adulthood (angiogenesis, differentiation, etc.). Among these receptors, two have been shown to modulate the repair of DSBs.

EphA5 is a 114kDa receptor encoded by the EPHA5 gene on chromosome 4q13.1-q13.2. It modulates the cell cycle checkpoints, which are essential for choosing the appropriate repair pathway. It also interacts directly with ATM, a critical protein for initiating DNA repair at the site of the DSB. In H460 cells, a lung cancer cell line, it has been shown that the receptor is overexpressed in comparison with the other 15 members of the EPHR family. It confers radio-resistance to these cells. Following simple cell irradiation, the nuclear translocation of EphA5 allows its interaction with the ATM protein at the sites of DSBs⁹⁸. When irradiation is associated with the extinction of the receptor expression by shRNA, the cell cycle does not stop in the G1 / S phase compared to untreated cells. The treated cell appears to lose its ability to detect radiation-induced DNA damage. ATM and EphA5 no longer interact, reducing the detection and repair of DSBs. These results are confirmed in cells which do not overexpress the receptor and which are treated under the same conditions. They become more radio-sensitive than cells treated with a shRNA-EphA5. In addition, the Pasqualini team⁹⁹ showed that the involvement of the receptor in the radio-resistance of cells is due to its nuclear translocation and to its interaction with the phospho-ATM kinase at the sites of DNA damage.

A second member of the EPHR family, the EphB1 receptor, also modulates the repair of DNA DSBs. The EPHB1 gene on chromosome 3q22.2 codes for a 109kDa protein which is expressed in kidney and ovarian cancer. In a specific lung cancer cell model (LAM THP-1), it has been shown that transcription of the receptor is inversely proportional to the degree of methylation of the promoter of the gene coding for EphB1⁹⁹. In response to DNA damage, activation of the receptor by its ligand EfnB1 leads to the initialization of signaling cascades involving essential actors such as ATR, CHK1 and p21. In fact, stimulation of the receptor by its ligand EfnB1 blocks the cell cycle in the G2 / M phase and consequently DNA repair, in particular via the ATR-CHK1 proteins. In LAM cells, where the promoter of the gene is hyper-methylated thus preventing the synthesis of the receptor, the re-expression of the active receptor by transfection leads to the reactivation of the previously mentioned pathways.

3.11 TrkA / Tropomyosin receptor kinase A

The TrkA receptor belongs to the family of NTKRs with the TrkB and C receptors. The NTRK1 gene on chromosome 1q23.1 codes for an 87kDa protein. NGF, the main ligand of TrkA, binds with strong affinity to^{100,101} the interaction domain of the extra-cellular region of the receptor. This region is framed by two cysteine-rich domains followed by two Ig-like domains (**Figure 3**)¹⁰². TrkA is involved in the development of the central and peripheral nervous system by ensuring the migration of neuronal cells. It is also a major player in the pathways of cell survival and differentiation, and is expressed in many cancers, the main ones being those of the liver, prostate, breast and stomach. About ten years ago, its involvement in repairing DSBs was demonstrated by the Eggert team¹⁰³. In a cellular model of human neuroblastoma (SH-SY5Y) in which the TrkA or B receptors are overexpressed, the authors show that the appearance of γ H2AX foci in response to irradiation is faster when TrkA is overexpressed, compared to the overexpression of the TrkB receptor or to normal conditions. This is correlated with a three times more efficient DNA repair by NHEJ when TrkA is overexpressed in comparison with wild cells. It is also shown that this TrkA receptor overexpression is associated with an overexpression of a key factor of NHEJ and XRCC4 that could explain this differential DNA repair.

4. Conclusions and therapeutic perspectives

Conventional chemotherapy and radiotherapy treatments offer weak discrimination between normal tissue cells and tumor cells. This lack of specificity generates many secondary effects thus limiting the use of these treatments. New strategies to target tumor cells need to be developed in the fight against cancer. Tyrosine kinase inhibitors (imatinib mesylate - Gleevec, gefitinib - Iressa, erlotinib - Tarceva, lapatinib...) mainly target overexpressed or reactivated proteins located on the surface or in tumor cells and their environment. Tyrosine kinase inhibitors belong to a family of therapeutic arsenals called targeted therapy. Targeted therapies have a greater specificity of action towards tumor cells thus reducing toxicity. However, targeting a receptor is not enough. Indeed, the interaction of EGFR with several ligands (EGF, TGF α or others, etc.) can induce the activation of different signaling pathways^{104,105}. These cross-activations also exist in many receptors within the same RTK family. For example in the ErbB family, an interaction of ErbB2 with ErbB1¹⁰⁶, ErbB4¹⁰⁷, or ErbB3¹⁰⁸ is possible. Interactions can also be observed between different RTK families, as is the case of the dimerization of the EGFR receptor and c-Met³⁵ or of EGFR and IGF1R³⁶. Cross-activations thus lead to a multiplication of activated pathways, in particular in cancer cells. RTKs are therefore capable of activating many signaling pathways. This is the case of c-Met and RON¹⁰⁹ or c-Met and EGFR¹¹⁰. In anticancer therapy, these possibilities reduce the impact of inhibitors directed against a single RTK³⁶, or of specificity of targeted therapy.

All this information therefore invites us to take into account the global system. We have to understand all the signaling pathways by analyzing them well beyond the simple homo-dimeric receptor, but taking into account the complexity and the overlapping of the different receptors and signaling pathways involved.

At the same time, DNA repair is also one of the prime targets in the fight against tumor cells. In fact, intracellular signaling dependent on RTKs can result in modulation, by stimulation or inhibition, of the HR or NHEJ DSB repair pathways. This is mainly the case for the PI3K pathway, which is strongly involved in cell survival. The overexpression of receptors, often proto-oncogenes as c-Met, or of their ligand constitute excellent markers of cancer and confirms the interest of targeting these proteins by the development of inhibitors. This is why additional targeting of DNA repair proteins would increase therapeutic efficacy. Indeed, the combined inhibition of single and double strand break repair pathways in addition to cytotoxic treatment of tumors is an interesting approach, the accumulation of non-repairable breaks leading to programmed cell death of cancer cells. It is in this research perspective that many chemical or biological inhibitors are created in order for their target to stop tumor progression. It is also in this context that a precise understanding of the mechanisms involved is essential.

Reference

1. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993;362(6422):709-715. doi:10.1038/362709a0
2. Grabarz A, Barascu A, Guirouilh-Barbat J, Lopez BS. Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res*. 2012;2(3):249-268. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679557><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3365807>. Accessed May 16, 2019.
3. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 2008;18(1):85-98. doi:10.1038/cr.2007.115
4. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. Base excision repair: The long and short of it. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(6):981-993. doi:10.1007/s00018-009-8736-z
5. Hyrien O. Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie*. 2000;82(1):5-17. doi:10.1016/S0300-9084(00)00344-8
6. Kim N, Abdulovic AL, Gealy R, Lippert MJ, Jinks-Robertson S. Transcription-associated mutagenesis in yeast is directly proportional to the level of gene expression and influenced by the direction of DNA replication. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(9):1285-1296. doi:10.1016/j.dnarep.2007.02.023
7. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003;17(10):1195-1214. doi:10.1096/fj.02-0752rev
8. Kass EM, Jasin M. Break Repair Pathways. 2014;584(17):3703-3708. doi:10.1016/j.febslet.2010.07.057.Collaboration
9. 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(18):2902-2906. doi:10.4161/cc.7.18.6679
10. Rivera-Calzada A, López-Perrote A, Melero R, et al. Structure and assembly of the PI3K-like protein kinases (PIKKs) revealed by electron microscopy. *AIMS Biophys*. 2015;2(2):36-57. doi:10.3934/biophys.2015.2.36
11. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Res*. 2004;64(7):2390-2396. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3207
12. Chaplin AK, Blundell TL. Structural biology of multicomponent assemblies in DNA double-strand-break repair through non-homologous end joining. *Curr Opin Struct Biol*. 2020;61:9-16. doi:10.1016/j.sbi.2019.09.008

13. Blier PR, Griffith AJ, Craft J, Hardin JA. Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J Biol Chem.* 1993;268(10):7594-7601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463290>. Accessed January 9, 2020.
14. Gell D, Jackson SP. Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(17):3494-3502. doi:10.1093/nar/27.17.3494
15. Sun Y, McCorvie TJ, Yates LA, Zhang X. Structural basis of homologous recombination. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(1):3-18. doi:10.1007/s00018-019-03365-1
16. Murphy AK, Fitzgerald M, Ro T, et al. Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery. *J Cell Biol.* 2014;206(4):493-507. doi:10.1083/jcb.201404111
17. Wiese C, Dray E, Groesser T, et al. Promotion of Homologous Recombination and Genomic Stability by RAD51AP1 via RAD51 Recombinase Enhancement. *Mol Cell.* 2007;28(3):482-490. doi:10.1016/j.molcel.2007.08.027
18. Levinson AD, Oppermann H, Varmus HE, Bishop JM. The purified product of the transforming gene of avian sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *J Biol Chem.* 1980;255(24):11973-11980. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC348484/pdf/pnas00666-0088.pdf>.
19. Grassot J, Gouy M, Perrière G, Mouchiroud G. Origin and molecular evolution of receptor tyrosine kinases with immunoglobulin-like domains. *Mol Biol Evol.* 2006;23(6):1232-1241. doi:10.1093/molbev/msk007
20. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by Receptor Tyrosine Kinases. *Annu Rev Biochem.* 1993;62(1):453-481. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.002321
21. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010;141(7):1117-1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
22. Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J. Structural Basis for Activation of the Receptor Tyrosine Kinase KIT by Stem Cell Factor. *Cell.* 2007;130(2):323-334. doi:10.1016/j.cell.2007.05.055
23. Lehr S, Kotzka J, Herkner A, et al. Identification of tyrosine phosphorylation sites in human Gab-1 protein by EGF receptor kinase in vitro. *Biochemistry.* 1999;38(1):151-159. doi:10.1021/bi9818265
24. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell.* 1992;70(3):431-442. doi:10.1016/0092-8674(92)90167-B
25. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J.* 2005;392(2):249-261. doi:10.1042/BJ20050908
26. Scita G. NEW EMBO MEMBERS' REVIEW: Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *EMBO J.* 2000;19(11):2393-2398. doi:10.1093/emboj/19.11.2393
27. Guo H, German P, Bai S, et al. The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *J Genet Genomics.* 2015;42(7):343-353. doi:10.1016/j.jgg.2015.03.003
28. Philip CA, Laskov I, Beauchamp MC, et al. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR pathway sensitizes endometrial cancer cell lines to PARP inhibitors. *BMC Cancer.* 2017;17(1):638. doi:10.1186/s12885-017-3639-0
29. Foster FM, Traer CJ, Abraham SM, Fry MJ. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci.* 2003;116(15):3037-3040. doi:10.1242/jcs.00609
30. Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, et al. Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):4119-4126. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2454
31. Kao GD, Jiang Z, Fernandes AM, Gupta AK, Maity A. Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. *J Biol Chem.* 2007;282(29):21206-21212. doi:10.1074/jbc.M703042200
32. Toulany M, Maier J, Iida M, et al. Akt1 and Akt3 but not Akt2 through interaction with DNA-PKcs stimulate proliferation and post-irradiation cell survival of K-RAS-mutated cancer cells. *Cell Death Discov.* 2017;3(1):17072. doi:10.1038/cddiscovery.2017.72
33. Mueck K, Rebholz S, Harati MD, Rodemann HP, Toulany M. Akt1 stimulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks in a Rad51-dependent manner. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11). doi:10.3390/ijms18112473
34. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 2003;12(3):541-552. doi:10.1016/S1097-2765(03)00350-2
35. Guo A, Villén J, Kornhauser J, et al. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(2):692-697. doi:10.1073/pnas.0707270105
36. Morgillo F, Woo JK, Kim ES, Hong WK, Lee HY. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res.* 2006;66(20):10100-10111. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1684
37. Myllynen L, Rieckmann T, Dahm-Daphi J, et al. In tumor cells regulation of DNA double strand break repair through EGF receptor involves both NHEJ and HR and is independent of p53 and K-Ras status. *Radiother Oncol.* 2011;101(1):147-151. doi:10.1016/j.radonc.2011.05.046
38. Kryeziu J, Jungwirth U, Hoda MA, et al. Synergistic anticancer activity of arsenic trioxide with erlotinib is based on inhibition of EGFR-mediated DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(6):1073-1084. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0065

39. Ko JC, Hong JH, Wang LH, Lin YW. *The Role of Repair Protein Rad51 in Synergistic Cytotoxicity and Mutagenicity Induced by Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor (Gefitinib, IressaR) and Benzo[a]Pyrene in Human Lung Cancer*. Vol 314. Academic Press Inc.; 2008:1881-1891. doi:10.1016/j.yexcr.2008.02.013
40. Friedman BJ, Caplin M, Savic B, et al. Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(2):209-218. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0239
41. Silva VAO, Lafont F, Benhelli-Mokrani H, et al. Rapid diminution in the level and activity of DNA-dependent protein kinase in cancer cells by a reactive nitro-benzoxadiazole compound. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):1-16. doi:10.3390/ijms17050703
42. Wang X, Gu Y, Liu H, Shi L, Sun X. Icotinib hydrochloride enhances chemo- and radiosensitivity by inhibiting EGFR signaling and attenuating RAD51 expression and function in hela S3 cells. *Onco Targets Ther*. 2018;11:1245-1258. doi:10.2147/OTT.S152613
43. Nowsheen S, Cooper T, Stanley JA, Yang ES. Synthetic Lethal Interactions between EGFR and PARP Inhibition in Human Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2012;7(10). doi:10.1371/journal.pone.0046614
44. Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, et al. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2005;280(35):31182-31189. doi:10.1074/jbc.M506591200
45. Nowsheen S, Bonner JA, LoBuglio AF, et al. Cetuximab augments cytotoxicity with poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition in head and neck cancer. *PLoS One*. 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0024148
46. Saki M, Makino H, Javvadi P, et al. EGFR mutations compromise hypoxia-associated radiation resistance through impaired replication fork-associated DNA damage repair. *Mol Cancer Res*. 2017;15(11):1503-1516. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0136
47. Zhong X, Luo G, Zhou X, et al. Rad51 in regulating the radiosensitivity of non-small cell lung cancer with different epidermal growth factor receptor mutation status. *Thorac Cancer*. 2016;7(1):50-60. doi:10.1111/1759-7714.12274
48. Das AK, Chen BP, Story MD, et al. *Somatic Mutations in the Tyrosine Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Abrogate EGFR-Mediated Radioprotection in Non-Small Cell Lung Carcinoma*. Vol 67.; 2007:5267-5274. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0242
49. Zhu Y cai, Wang W xian, Xu C wei, et al. EGFR-RAD51 fusion variant in lung adenocarcinoma and response to erlotinib: A case report. *Lung Cancer*. 2018;115:131-134. doi:10.1016/j.lungcan.2017.12.001
50. Konduri K, Gallant JN, Chae YK, et al. EGFR fusions as novel therapeutic targets in lung cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(6):601-611. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0075
51. Chang HY, Liu HS, Lai MD, et al. Hypoxia promotes nuclear translocation and transcriptional function in the oncogenic tyrosine kinase RON. *Cancer Res*. 2014;74(16):4549-4562. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3730
52. Chang HY, Chang TC, Huang WY, et al. RON nuclear translocation under hypoxia potentiates chemoresistance to DNA double-strand break-inducing anticancer drugs. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(2):276-286. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0311
53. Chen MK, Du Y, Sun L, et al. H2O2 induces nuclear transport of the receptor tyrosine kinase c-MET in breast cancer cells via a membrane-bound retrograde trafficking mechanism. *J Biol Chem*. 2019;294(21):8516-8528. doi:10.1074/jbc.RA118.005953
54. Matteucci E, Bendinelli P, Desiderio MA. Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2009;30(6):937-945. doi:10.1093/carcin/bgp080
55. Xie Y, Nurkesh AA, Ibragimova N, et al. Systematic analysis of NLMP suggests nuclear localization of RTK/MET kinases resemble cancer cell clearance. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):43. doi:10.1186/s13046-018-1004-z
56. De Bacco F, D'Ambrosio A, Casanova E, et al. MET inhibition overcomes radiation resistance of glioblastoma stem-like cells. *EMBO Mol Med*. 2016;8(5):550-568. doi:10.15252/emmm.201505890
57. De Bacco F, Luraghi P, Medico E, et al. Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(8):645-661. doi:10.1093/jnci/djr093
58. Chen GZ, Dai WS, Zhu HC, et al. Foretinib Enhances the Radiosensitivity in Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Inhibiting Phosphorylation of c-Met. *J Cancer*. 2017;8(5):983-992. doi:10.7150/jca.18135
59. Yu H, Li X, Sun S, Gao X, Zhou D. C-Met inhibitor SU11274 enhances the response of the prostate cancer cell line DU145 to ionizing radiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427(3):659-665. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.117
60. Medová M, Aebbersold DM, Zimmer Y. MET inhibition in tumor cells by PHA665752 impairs homologous recombination repair of DNA double strand breaks. *Int J Cancer*. 2012;130(3):728-734. doi:10.1002/ijc.26058
61. Chabot T, Defontaine A, Marquis D, et al. New phosphorylation sites of rad51 by c-met modulates presynaptic filament stability. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3):413. doi:10.3390/cancers11030413
62. Welsh JW, Mahadevan D, Ellsworth R, Cooke L, Bearss D, Stea B. The c-Met receptor tyrosine kinase inhibitor MP470 radiosensitizes glioblastoma cells. *Radiat Oncol*. 2009;4(1):69. doi:10.1186/1748-717X-4-69
63. Craparo A, Freund R, Gustafson TA. 14-3-3 (ϵ) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *J Biol Chem*. 1997;272(17):11663-11669. doi:10.1074/jbc.272.17.11663
64. Parvaresh S, Yesilkaya T, Baer K, Al-Hasani H, Klein HW. 14-3-3 Binding to the IGF-1 receptor is mediated by serine autophosphorylation. *FEBS Lett*. 2002;532(3):357-362. doi:10.1016/S0014-5793(02)03708-0
65. Waraky A, Lin Y, Warsito D, et al. Nuclear insulin-like growth factor 1 receptor phosphorylates proliferating cell nuclear antigen and rescues stalled replication forks after DNA damage. *J Biol Chem*. 2017;292(44):18227-18239. doi:10.1074/jbc.M117.781492
66. Guerard M, Robin T, Perron P, et al. Nuclear translocation of IGF1R by intracellular amphiregulin contributes to the resistance of

- lung tumour cells to EGFR-TKI. *Cancer Lett.* 2018;420:146-155. doi:10.1016/j.canlet.2018.01.080
67. Wang Y, Yuan JL, Zhang YT, et al. Inhibition of Both EGFR and IGF1R Sensitized Prostate Cancer Cells to Radiation by Synergistic Suppression of DNA Homologous Recombination Repair. *PLoS One.* 2013;8(8). doi:10.1371/journal.pone.0068784
 68. Oberthür R, Seemann H, Gehrig J, et al. *Simultaneous Inhibition of IGF1R and EGFR Enhances the Efficacy of Standard Treatment for Colorectal Cancer by the Impairment of DNA Repair and the Induction of Cell Death.* Vol 407. Elsevier Ireland Ltd; 2017:93-105. doi:10.1016/j.canlet.2017.08.009
 69. Venkatachalam S, Mettler E, Fottner C, Miederer M, Kaina B, Weber MM. The impact of the IGF-1 system of cancer cells on radiation response – An in vitro study. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2017;7:1-8. doi:10.1016/j.ctro.2017.09.006
 70. Chitnis MM, Lodhia KA, Aleksic T, Gao S, Protheroe AS, Macaulay VM. IGF-1R inhibition enhances radiosensitivity and delays double-strand break repair by both non-homologous end-joining and homologous recombination. *Oncogene.* 2014;33(45):5262-5273. doi:10.1038/onc.2013.460
 71. Turney BW, Kerr M, Chitnis MM, et al. Depletion of the type 1 IGF receptor delays repair of radiation-induced DNA double strand breaks. *Radiother Oncol.* 2012;103(3):402-409. doi:10.1016/j.radonc.2012.03.009
 72. Lodhia KA, Gao S, Aleksic T, Esashi F, Macaulay VM. Suppression of homologous recombination sensitizes human tumor cells to IGF-1R inhibition. *Int J Cancer.* 2015;136(12):2961-2966. doi:10.1002/ijc.29327
 73. Loesch MM, Collier AE, Southern DH, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor regulates repair of ultraviolet B-induced DNA damage in human keratinocytes in vivo. *Mol Oncol.* 2016;10(8):1245-1254. doi:10.1016/j.molonc.2016.06.002
 74. Manila NG, Kaida A, Nakahama K ichi, Miura M. Insulin-like growth factor I receptor regulates the radiation-induced G2/M checkpoint in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(4):2977-2983. doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.080
 75. Liu X, Chen H, Xu X, et al. *Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Knockdown Enhances Radiosensitivity via the HIF-1 α Pathway and Attenuates ATM/H2AX/53BP1 DNA Repair Activation in Human Lung Squamous Carcinoma Cells.* Vol 16. Spandidos Publications; 2018:1332-1340. doi:10.3892/ol.2018.8705
 76. Macaulay VM, Salisbury AJ, Bohula EA, Playford MP, Smorodinsky NI, Shiloh Y. *Downregulation of the Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor in Mouse Melanoma Cells Is Associated with Enhanced Radiosensitivity and Impaired Activation of Atm Kinase.* Vol 20.; 2001:4029-4040. doi:10.1038/sj.onc.1204565
 77. Peretz S, Jensen R, Baserga R, Glazer PM. ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1676-1681. doi:10.1073/pnas.98.4.1676
 78. Trojanek J, Ho T, Del Valle L, et al. Role of the Insulin-Like Growth Factor I/Insulin Receptor Substrate 1 Axis in Rad51 Trafficking and DNA Repair by Homologous Recombination. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7510-7524. doi:10.1128/mcb.23.21.7510-7524.2003
 79. Yang S, Chintapalli J, Sodagum L, et al. Activated IGF-1R inhibits hyperglycemia-induced DNA damage and promotes DNA repair by homologous recombination. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2005;289(5 58-5):F1144-F1152. doi:10.1152/ajprenal.00094.2005
 80. Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V. FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. *Med Oncol.* 2017;34(6):114. doi:10.1007/s12032-017-0970-x
 81. Maifrede S, Nieborowska-Skorska M, Sullivan-Reed K, et al. Tyrosine kinase inhibitor-induced defects in DNA repair sensitize FLT3(ITD)-positive leukemia cells to PARP1 inhibitors. *Blood.* 2018;132(1):67-77. doi:10.1182/blood-2018-02-834895
 82. Seedhouse et al. 2006 - DNA repair contributes to the drug-resistant phenotype of primary acute myeloid leukaemia cells with FLT3 internal tandem duplications and is reversed by the FLT3 inhibitor PKC412.pdf.
 83. Gaymes et al. 2017 - FLT3 and JAK2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Promote Interchromosomal Homologous Recombination and the Potential for Copy Neutral Loss of Heterozygosity.pdf.
 84. Li L, Zhang L, Fan J, et al. Defective nonhomologous end joining blocks B-cell development in FLT3/ITD mice. *Blood.* 2011;117(11):3131-3139. doi:10.1182/blood-2010-05-286070
 85. Fan et al. 2010 - Cells expressing FLT3-ITD mutations exhibit elevated repair errors generated through alternative NHEJ pathways implications for genomic instability and therapy.pdf.
 86. Hossain MB, Shifat R, Li J, et al. TIE2 Associates with Caveolae and Regulates Caveolin-1 To Promote Their Nuclear Translocation. *Mol Cell Biol.* 2017;37(21):1-14. doi:10.1128/mcb.00142-17
 87. Hossain MB, Shifat R, Johnson DG, et al. TIE2-mediated tyrosine phosphorylation of H4 regulates DNA damage response by recruiting ABL1. *Sci Adv.* 2016;2(4):e1501290. doi:10.1126/sciadv.1501290
 88. Alligand B, Le Breton M, Marquis D, Vallette F, Fleury F. Functional effects of diphosphomimetic mutations at cAbl-mediated phosphorylation sites on Rad51 recombinase activity. *Biochimie.* 2017;139:115-124. doi:10.1016/j.biochi.2017.05.020
 89. Popova M, Shimizu H, Yamamoto K ichi, Lebecqec M, Takahashi M, Fleury F. Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependent on that of Y315. *FEBS Lett.* 2009;583(12):1867-1872. doi:10.1016/j.febslet.2009.04.044
 90. Slupianek A, Dasgupta Y, Ren SY, et al. Targeting RAD51 phosphotyrosine-315 to prevent unfaithful recombination repair in BCR-ABL1 leukemia. *Blood.* 2011;118(4):1062-1068. doi:10.1182/blood-2010-09-307256
 91. Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, et al. Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 1998;273(7):3799-3802. doi:10.1074/jbc.273.7.3799
 92. Ganapathipillai SS, Medová M, Aebersold DM, et al. Coupling of mutated met variants to DNA repair via Abl and Rad51. *Cancer*

93. Brand TM, Iida M, Stein AP, et al. AXLs a logical molecular target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(11):2601-2612. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2648
94. Balaji K, Vijayaraghavan S, Diao L, et al. AXL inhibition suppresses the DNA damage response and sensitizes cells to PARP inhibition in multiple cancers. *Mol Cancer Res.* 2017;15(1):45-58. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0157
95. Kim EH, Lee H, Jeong YK, Jung WG. Mechanisms of SU5416, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor, as a radiosensitizer for colon cancer cells. *Oncol Rep.* 2016;36(2):763-770. doi:10.3892/or.2016.4868
96. Huang YL, Chou WC, Hsiung CN, Hu LY, Chu HW, Shen CY. FGFR2 regulates Mre11 expression and double-strand break repair via the MEK-ERK-POU1F1 pathway in breast tumorigenesis. *Hum Mol Genet.* 2015;24(12):3506-3517. doi:10.1093/hmg/ddv102
97. Ahmed MA, Selzer E, Dörr W, et al. Fibroblast growth factor receptor 4 induced resistance to radiation therapy in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7(43):69976-69990. doi:10.18632/oncotarget.12099
98. Staquicini FI, Qian MD, Salameh A, et al. Receptor tyrosine kinase EphA5 is a functional molecular target in human lung cancer. *J Biol Chem.* 2015;290(12):7345-7359. doi:10.1074/jbc.M114.630525
99. Kampen KR, Scherpen FJG, Garcia-Manero G, et al. EphB1 suppression in acute myelogenous leukemia: Regulating the DNA damage control system. *Mol Cancer Res.* 2015;13(6):982-992. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0660-T
100. Klein R, Jing S, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell.* 1991;65(1):189-197. doi:10.1016/0092-8674(91)90419-Y
101. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao M V. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature.* 1991;350(6320):678-683. doi:10.1038/350678a0
102. Schneider R, Schweiger M. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene.* 1991;6(10):1807-1811. <https://www.semanticscholar.org/paper/A-novel-modular-mosaic-of-cell-adhesion-motifs-in-Schneider-Schweiger/9bb77808798070cae2ad1bc2c8908fd57c5244d5>. Accessed May 9, 2019.
103. Schulte JH, Kuhfittig-Kulle S, Klein-Hitpass L, et al. Expression of the TrkA or TrkB receptor tyrosine kinase alters the double-strand break (DSB) repair capacity of SY5Y neuroblastoma cells. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(10):1757-1764. doi:10.1016/j.dnarep.2008.07.004
104. Collin de l'Hortet A, Gilgenkrantz H, Guidotti J-E. EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration. *Int J Hepatol.* 2012;2012:1-9. doi:10.1155/2012/476910
105. Tomas A, Futter CE, Eden ER. EGF receptor trafficking: Consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* 2014;24(1):26-34. doi:10.1016/j.tcb.2013.11.002
106. Bodiga VL, Thokala S, Vemuri PK, Bodiga S. Zinc pyrithione inhibits caspase-3 activity, promotes ErbB1-ErbB2 heterodimerization and suppresses ErbB2 downregulation in cardiomyocytes subjected to ischemia/reperfusion. *J Inorg Biochem.* 2015;153:49-59. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.09.010
107. Kurppa KJ, Denessiouk K, Johnson MS, Elenius K. Activating ERBB4 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2016;35(10):1283-1291. doi:10.1038/onc.2015.185
108. Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J.* 1995;14(17):4267-4275. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb00101.x
109. Maggiora P, Lorenzato A, Fracchioli S, et al. The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness. *Exp Cell Res.* 2003;288(2):382-389. doi:10.1016/S0014-4827(03)00250-7
110. Mueller KL, Hunter LA, Ethier SP, Boerner JL. Met and c-Src cooperate to compensate for loss of epidermal growth factor receptor kinase activity in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(9):3314-3322. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0132

Relationships between DNA repair and RTK-mediated signaling pathways

Thomas Chabot^a, Yvonnick Cheraud^a, Fabrice Fleury^{a,*}

^a *Mechanism and regulation of DNA repair team, UFIP, CNRS UMR 6286, rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France Université de Nantes, France.*

* *Corresponding author E-mail: fleury-f@univ-nantes.fr*

Conflicts of Interest:

The authors declare no conflict of interest.

T. Chabot, H. Benhelli-Mokrani, F. Fleury, Y. Cheraud

Mechanism and Regulation of DNA Repair team, UFIP, CNRS UMR 6286, UFR Sciences & Techniques, Université de Nantes, Nantes, France

Introduction

Human cells are subjected to environmental and endogenous stresses that can damage DNA and affect genomic integrity. Among the induced damages, DNA double strand breaks (DSB) are the most severe and can be repaired by the homologous recombination (HR) pathway involving key protein RAD51. Some kinases (1,2,3) can act directly on RAD51 activity through several post-translational modifications by phosphorylation, thereby lead to the modulation of the HR (4).

In the last decade, many studies have provided evidence that receptor tyrosine kinases (RTK) c-MET can affect the repair of DNA repair pathways by HR (5).

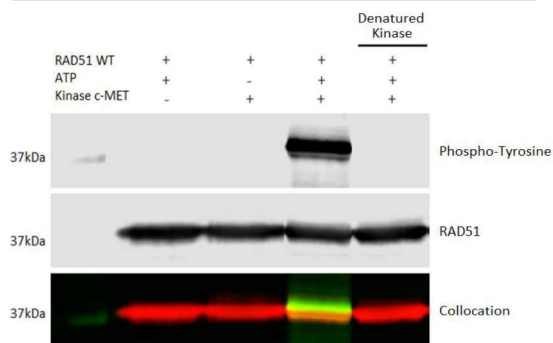
In this work, we identified several phosphorylations of RAD51 induced by c-MET by combining *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches. Then we estimated the phosphorylation effects on its activity and on HR pathway.

I - Phosphorylation site Prediction

Kinase	c-MET					
Substrate	RAD51					
Phosphorylation Site <i>In silico</i> Prediction	Y159	Y178	Y191	Y205	Y301	Y315

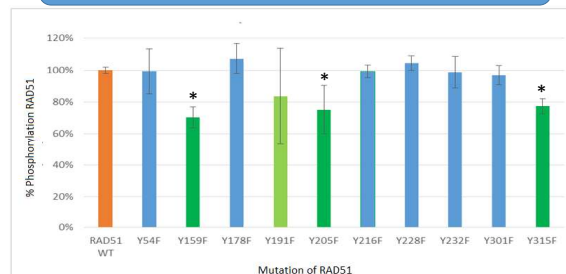
The GPS (6), Phosphonet (7) and NetWorking (8) web sites allowed us to predict 6 RAD51 phosphorylation sites induced by c-MET kinase activity

II - *In vitro* phosphorylation of RAD51 by c-MET



c-MET kinase is able to phosphorylate RAD51 protein *in vitro*. We demonstrated that RAD51 has been phosphorylated on Tyrosine residues by active purified C-MET.

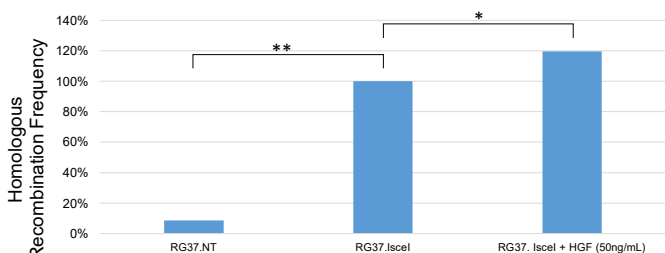
III - Determination of phosphorylation sites by site-directed mutagenesis



RAD51 is phosphorylated at least on 4 tyrosine residues by c-MET. We have successfully generated 10 RAD51 mutants in which one specific tyrosine is replaced by phenylalanine residue. By *in vitro* phosphorylation and Western blot analysis, we determined the percent of phosphorylated Rad51 for each mutant and we identified 4 phosphorylation sites of RAD51 (green color): Y159, Y191, Y205 and Y315. This finding was confirmed by mass spectrometry analysis.

*: The data represent the mean \pm SD of three experiments, $p < 0.05$

IV - Effect of c-MET activation on Homologous Recombination DNA repair pathway

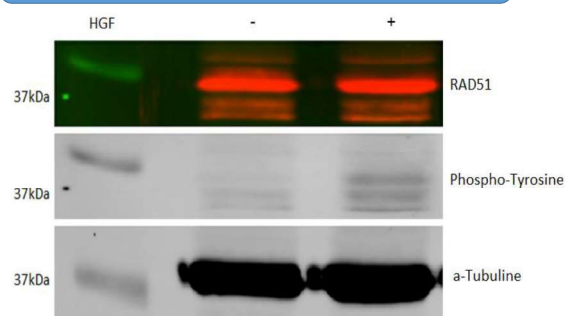


HGF ligand promotes the HR process. We used a GFP/Iscel cassette system inserted in fibroblast cells to evaluate the HR. In the cellular context, HR DNA repair was increased by 20% when c-MET receptor has been activated by its HGF ligand.

*: The data represent the mean \pm SD of three experiments, $p < 0.05$

** : The data represent the mean \pm SD of three experiments, $p < 0.005$

V - Effect of c-MET activation on Phosphorylation of RAD51 *In cellulo*



c-MET activation induces the phosphorylation of RAD51 in cells. HeLa cells were treated or untreated with HGF and cellular extract were analyzed by Western blot. When c-MET receptor was activated by the HGF ligand, a significant phosphorylation of RAD51 was observed.

Conclusion

In this work, we provide first *in vitro* and *in cellulo* evidence of phosphorylation of RAD51 by the c-MET tyrosine kinase receptor. Four phosphorylations were clearly identified on tyrosine residues Y159, Y191, Y205, Y315 of RAD51 and they could be involved in the modulation of DNA repair pathway by homologous recombination.

Perspectives

The elucidation of the physiological role of Rad51 phosphorylation by receptor tyrosine protein kinases could allow the identification of the interaction networks involved in the resistance to anticancer therapy. Therefore understanding and targeting HR DNA repair through Rad51 and RTK signaling offers a new strategy for chemo- and radio-sensitization of resistant cancer cells.

- (1) Yata K, et al. (2012) Mol. Cell 45, 371–383
- (2) Sørensen CS, et al. 2005 Nat. Cell Biol. 7:195-201
- (3) Popova M, et al; 2009 FEBS Lett. 583(12):1867-72.
- (4) Wang Y, et al. 2013 PLoS One. 8(8):e68784
- (5) Medová M, et al. 2011 Int J Cancer. 130(3):728-34
- (6) GPS 3.0 [online] : <http://gps.biocuckoo.org/> (accessed on 25.07.2017)
- (7) PhosphoNet [online] : <http://www.phosphonet.ca/> (accessed on 25.07.2017)
- (8) NetworkKIN [online] : <http://networkin.info/> (accessed on 25.07.2017)

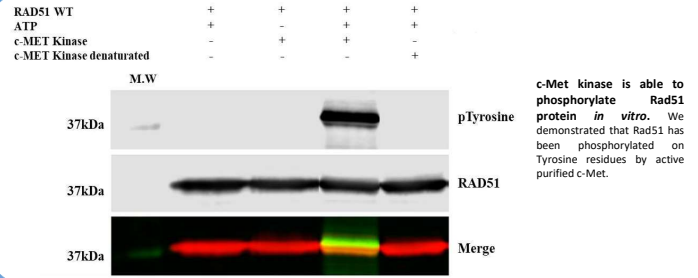
T. Chabot, A. Defontaine, D. Marquis, A. Renodon-Corniere, E. Courtois, F. Fleury and Y. Cheraud

DNA Repair team, UFIP, CNRS UMR 6286, UFR Sciences & Techniques, Université de Nantes, NANTES, France
thomas.chabot1@univ-nantes.fr

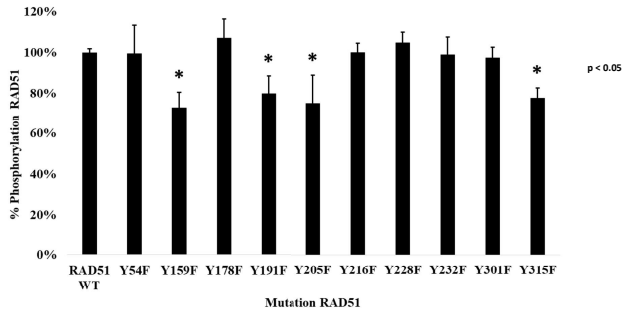
Introduction

Genomic instability through deregulation of DNA repair pathways can initiate cancer and subsequently result in resistance to chemo and radiotherapy. Understanding these biological mechanisms is therefore essential to overcome cancer. RAD51 is the central protein of the Homologous Recombination (HR) DNA repair pathway, which leads to faithful DNA repair of DSBs. The recombinase activity of RAD51 requires nucleofilament formation and is regulated by post-translational modifications such as phosphorylation. In the last decade, studies have suggested the existence of a relationship between receptor tyrosine kinases (RTK) and DNA repair by Homologous Recombination. Among these RTK the c-MET receptor is often overexpressed or constitutively activated in many cancers and its inhibition induces the decrease of HR. In this study, we show for the first time that c-MET is able to phosphorylate the RAD51 protein. We demonstrate *in vitro* that c-MET phosphorylates four tyrosine residues localized mainly in the subunit-subunit interface of RAD51. Whereas these post-translational modifications do not affect the presynaptic filament formation, they strengthen its stability against the inhibitor effect of the BRC peptide obtained from BRCA2. Taken together, these results suggest the possible role of these modifications in the regulation of the BRCA2-RAD51 interaction and underline the importance of c-MET in DDR.

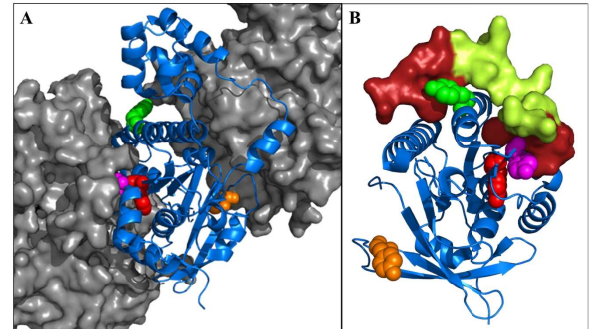
In vitro phosphorylation of Rad51 by c-Met



Determination of phosphorylation sites by site-directed mutagenesis

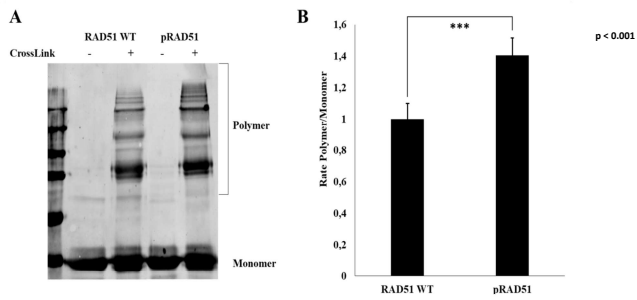


Position of phosphorylatable tyrosine residues in the Rad51 filament and Rad51-BRC4 interface



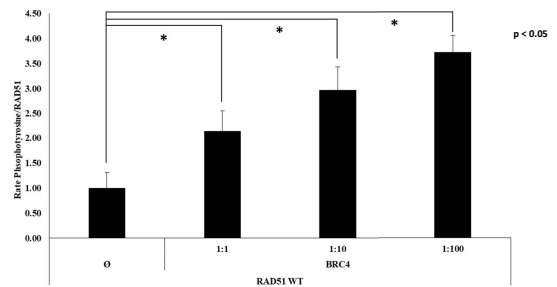
3 of the 4 c-Met phosphorylated residues are at the monomer-monomer interface of the nucleofilament (A) or at Rad51-BRC4 interface (B). From the Rad51 nucleofilament structure and Rad51-BRC4 structure, tyrosines Y159 (Red), Y191 (Violet), Y205 (Green) and Y315 (Orange) of a monomer of Rad51 (Blue) are indicated. The monomers n + 1 and n-1 are represented in grey. The BRC4 peptide is represented in yellow (low interaction with Rad51) and Red (strong interaction with Rad51).

Impact of Rad51 phosphorylation on its polymerization



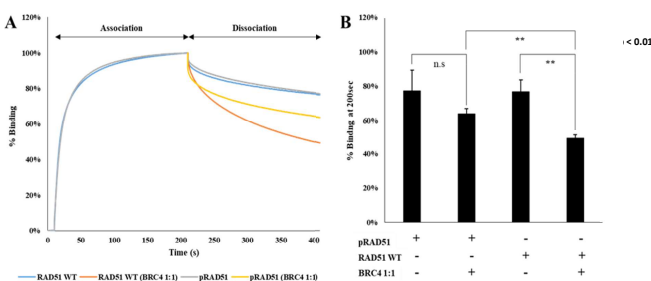
c-Met-mediated Rad51 phosphorylation promotes the high-molecular-weight Rad51 oligomers. Following the phosphorylation of Rad51 by the receptor tyrosine kinase *in vitro*, a polymerization assay was realized by using BS3-crosslinker compound. We can observe a significant increase of the high molecular weight forms following the phosphorylation corresponding to polymeric forms of Rad51 (A). After quantification of the signals we can confirm that the phosphorylation of Rad51 by c-Met induces a significant increase in the polymerization state of Rad51 (B).

Impact of BRC4 on Rad51 phosphorylation



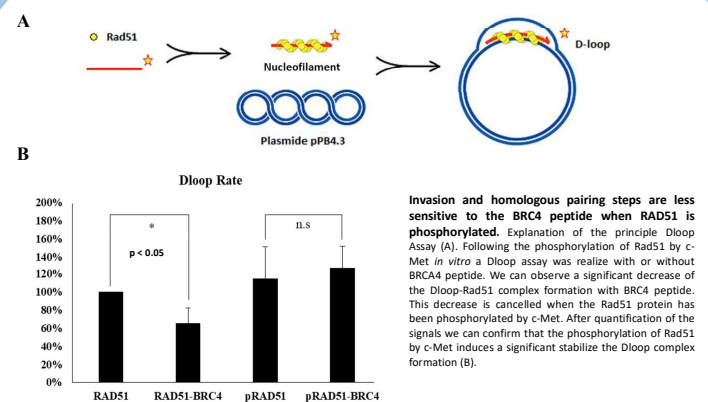
c-MET-mediated RAD51 phosphorylation is related to its oligomeric state. Rad51 is incubated with the peptide BRC4 and then phosphorylated *in vitro* by c-Met. Following the action of BRC4, leading to its depolymerization, a significant increase in the phosphorylation state of Rad51 is observed by c-Met.

Impact of Rad51 phosphorylation on nucleofilament formation & stability



c-Met-mediated Rad51 phosphorylation promotes stabilization of nucleofilament against BRC4-mediated dissociation. Following the phosphorylation of Rad51 by the receptor tyrosine kinase *in vitro*, a kinetic study shows that the formation of the Rad51 nucleofilament around the DNA and its dissociation are not modified (A). In contrast, the nucleofilament dissociation induced by BRC4 peptide is weaker when Rad51 is phosphorylated (B), which suggests a higher stability of nucleofilament stability following c-Met phosphorylation.

Impact of Rad51 phosphorylation on Dloop formation



Conclusion

This study demonstrates the direct link between RAD51 and c-MET wherein the phosphorylation of RAD51, on tyrosine residues Y159, Y191, Y205 and Y315, impact its oligomeric state but also its interaction with the BRC motif of BRCA2 (BRC4). Our results suggest that c-MET-mediated RAD51 phosphorylation could play a potential role in the BRCA2-dependent regulation of RAD51. Given our encouraging *in vitro* findings, the next step should be to expand our investigations in cells to assess the RAD51 phosphorylation level according to c-MET inhibition in the DNA damage response pathway. The expected results could pave an attractive therapeutic strategy to overcome resistance by combining the modulation of c-MET and RAD51 activity with anticancer treatments.

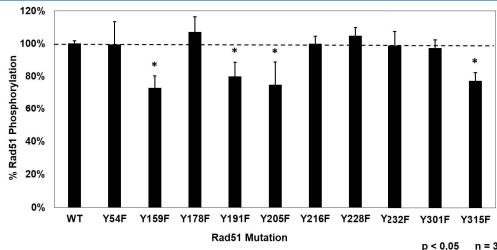
T. Chabot, A. Defontaine, D. Marquis, A. Renodon-Corniere, E. Courtois, F. Fleury and Y. Cheraud

DNA Repair team, UFIP, CNRS UMR 6286, UFR Sciences & Techniques, Université de Nantes, NANTES, France

Introduction

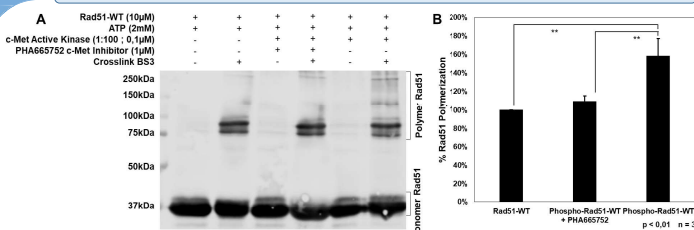
Genomic instability through deregulation of DNA repair pathways can initiate cancer and subsequently result in resistance to chemo and radiotherapy. Understanding these biological mechanisms is therefore essential to overcome cancer. Rad51 is the central protein of the Homologous Recombination (HR) DNA repair pathway, which leads to faithful DNA repair of DSBs. The recombinase activity of Rad51 requires nucleofilament formation and is regulated by post-translational modifications such as phosphorylation. In the last decade, studies have suggested the existence of a relationship between receptor tyrosine kinases (RTK) and DNA repair by Homologous Recombination. Among these RTK the c-Met receptor is often overexpressed or constitutively activated in many cancers and its inhibition induces the decrease of HR. In this study, we show for the first time that c-Met is able to phosphorylate the Rad51 protein. We demonstrate *in vitro* that c-Met phosphorylates four tyrosine residues localized mainly in the subunit-subunit interface of Rad51. Whereas these post-translational modifications do not affect the presynaptic filament formation, they strengthen its stability against the inhibitor effect of the BRC peptide obtained from BRCA2. Taken together, these results suggest the possible role of these modifications in the regulation of the BRCA2-Rad51 interaction and underline the importance of c-Met in DDR. In addition, the *in cellulo* activation of c-Met leads to better DSB repair by HR by playing on the localization and synthesis of Rad51.

Determination of phosphorylation sites by site-directed mutagenesis



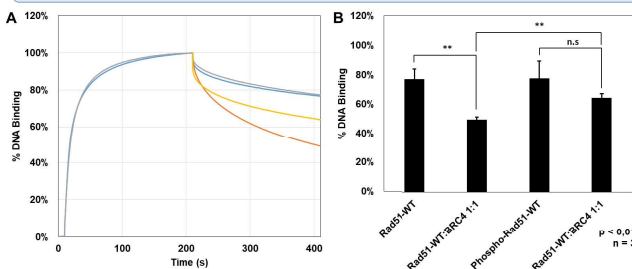
Rad51 is phosphorylated at least on 4 tyrosine residues by c-Met. We have generated 10 Rad51 mutants in which one specific tyrosine is replaced by phenylalanine residue. By *in vitro* phosphorylation and Western blot analysis, we determined the percent of phosphorylated Rad51 for each mutant and we identified 4 phosphorylation sites of Rad51 : Y159, Y191, Y205 and Y315.

Impact of Rad51 phosphorylation on its polymerization



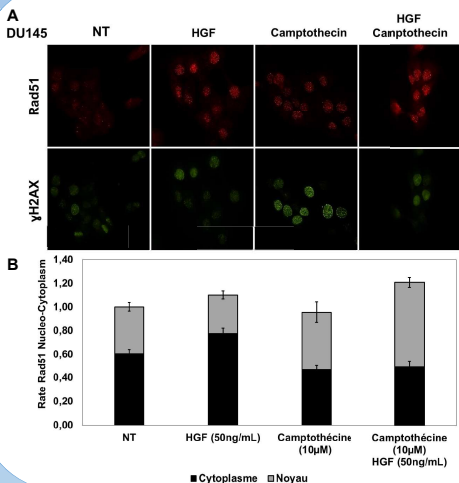
c-Met-mediated Rad51 phosphorylation promotes the high-molecular-weight Rad51 oligomers. Following the phosphorylation of Rad51 by the receptor tyrosine kinase *in vitro*, a polymerization assay was realized by using BS3-crosslinker compound. We can observe a significant increase of the high molecular weight forms following the phosphorylation corresponding to polymeric forms of Rad51 (A). After quantification of the signals we can confirm that the phosphorylation of Rad51 by c-Met induces a significant increase in the polymerization state of Rad51 (B).

Impact of Rad51 phosphorylation on nucleofilament formation & stability



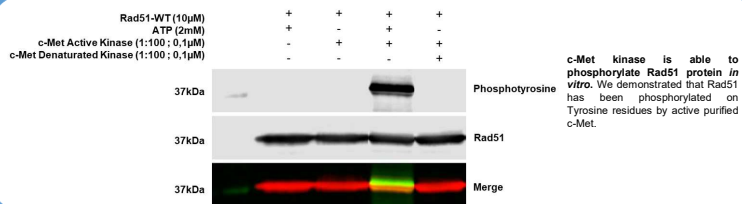
c-Met-mediated Rad51 phosphorylation promotes stabilization of nucleofilament against BRC4-mediated dissociation. Following the phosphorylation of Rad51 by the receptor tyrosine kinase *in vitro*, a kinetic study shows that the formation of the Rad51 nucleofilament around the DNA and its dissociation are not modified (A). In contrast, the nucleofilament dissociation induced by BRC4 peptide is weaker when Rad51 is phosphorylated (B), which suggests a higher stability of nucleofilament stability following c-Met phosphorylation.

Activation of c-Met leads to a modification of the distribution of the Rad51 protein



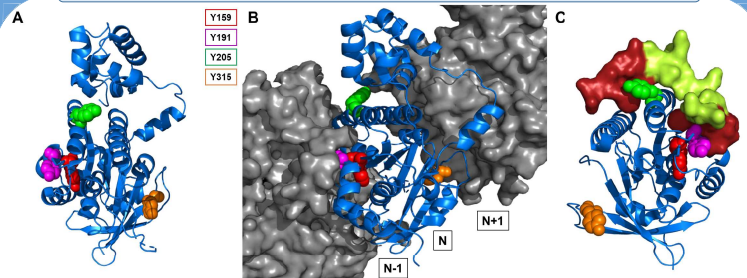
The translocation of Rad51 is increased following the activation of c-Met. (A) Camptothecin treatment induced not only by DNA damage, revealed by the increase in γH2AX foci, but also by a significant recruitment of Rad51 in nuclear foci at the DSB. HGF receptor activation only appears to increase the overall amount of Rad51 and the recruitment of focal recombinase into the nucleus. Pre-treatment with HGF followed by damage induction increases the quantity and recruitment of nuclear Rad51, but reduces the number of damages. (B) The distribution of Rad51 is studied after nucleocytoplasmic fractionation of the treated cells, we observed an increase in the synthesis of Rad51 post-activation to HGF, post-damage nuclear translocation and synergy of the 2 mechanisms by combining HGF and camptothecin.

In vitro phosphorylation of Rad51 by c-Met



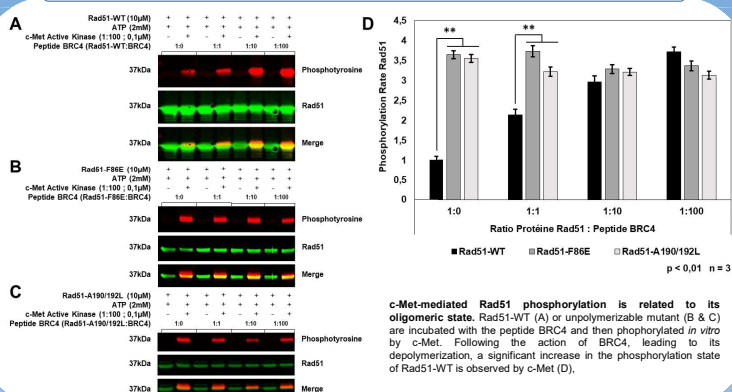
c-Met kinase is able to phosphorylate Rad51 protein *in vitro*. We demonstrated that Rad51 has been phosphorylated on Tyrosine residues by active purified c-Met.

Position of phosphorylable tyrosine residues in the Rad51 filament and Rad51-BRC4 interface



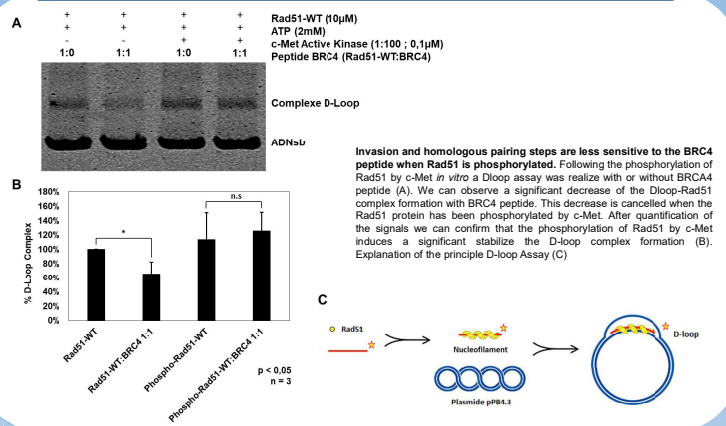
3 of the 4 c-Met phosphorylated residues are at the Rad51 monomer (A), at monomer-monomer interface of the nucleofilament (B) or at Rad51-BRC4 interface (C). From the Rad51 nucleofilament structure and Rad51-BRC4 structure, tyrosines Y159 (Red), Y191 (Purple), Y205 (Green) and Y315 (Orange) of a monomer of Rad51 (Blue) are indicated. The monomers n + 1 and n - 1 are represented in grey. The BRC4 peptide is represented in yellow (low interaction) and Red (strong interaction).

Impact of Rad51 polymerization on its phosphorylation



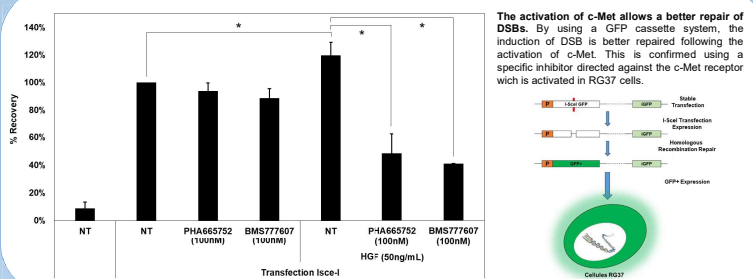
c-Met-mediated Rad51 phosphorylation is related to its oligomeric state. Rad51-WT (A) or unpolymerizable mutant (B & C) are incubated with the peptide BRC4 and then phosphorylated *in vitro* by c-Met. Following the action of BRC4, leading to its depolymerization, a significant increase in the phosphorylation state of Rad51-WT is observed by c-Met (D).

Impact of Rad51 phosphorylation on D-loop formation



Invasion and homologous pairing steps are less sensitive to the BRC4 peptide when Rad51 is phosphorylated. Following the phosphorylation of Rad51 by c-Met *in vitro* a Dloop assay was realized with or without BRC4 peptide (A). We can observe a significant decrease of the Dloop-Rad51 complex formation with BRC4 peptide. This decrease is cancelled when the Rad51 protein has been phosphorylated by c-Met. After quantification of the signals we can confirm that the phosphorylation of Rad51 by c-Met induces a significant stabilize the D-loop complex formation (B). Explanation of the principle D-loop Assay (C).

Activation of c-Met leads to a modification of the repair by HR



The activation of c-Met allows a better repair of DSBs. By using a GFP cassette system, the induction of DSB is better repaired following the activation of c-Met. This is confirmed using a specific inhibitor directed against the c-Met receptor which is activated in RG37 cells.

Conclusion

This study demonstrates that phosphorylation of Rad51 by c-Met – on tyrosine residues Y159, Y191, Y205 and Y315 – impact its oligomeric state but also its interaction with the BRC motif of BRCA2 (BRC4 peptide). Our results show that c-Met-mediated Rad51 phosphorylation could play a potential role in the BRCA2-dependent regulation of Rad51. Given our encouraging *in vitro* findings, the next step should be to expand our investigations at the cellular level to assess the relationship between Rad51 phosphorylation and c-Met inhibition in the response to DNA damage. Our preliminary results show the possible effect of c-Met activation on the repair and localization of Rad51. The expected results could pave an attractive therapeutic strategy to overcome anticancer resistance by combining inhibition of c-Met and Rad51 activity.

Titre : Modulation de l'activité de RAD51 par le récepteur tyrosine kinase c-Met dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN.

Mots clés : RAD51, Phosphorylation, Réparation ADN, Recombinaison Homologue, c-Met, Récepteur Tyrosine Kinase

Résumé : L'instabilité génomique due à la dérégulation des voies de réparation de l'ADN peut être à l'initiation de cancer et entraîner par la suite une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. La compréhension de ces mécanismes biologiques est donc essentielle dans la lutte contre le cancer. RAD51 est la protéine centrale de la voie de réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue. Cette réparation conduit à une réparation fidèle de l'ADN. L'activité recombinase de la protéine RAD51 est finement régulée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. Au cours de la dernière décennie, de plus en plus d'études, suggèrent l'existence d'une relation entre les récepteurs à activité tyrosine kinases, souvent suractivés et impliqués dans l'agressivité et la prolifération cancéreuse, et la réparation de l'ADN.

Parmi ces récepteurs à activité tyrosine kinases, le duo c-Met/HGF-SF est souvent muté, sur exprimé ou activé constitutivement dans de nombreux cancers et son inhibition a été montrée comme induisant une diminution de la réparation par recombinaison homologue. Au travers de cette thèse, nous montrons pour la première fois que c-Met est capable de phosphoryler la protéine RAD51 sur quatre résidus tyrosine localisés principalement dans l'interface monomère-monomère du nucléofilament de la recombinase humaine. Nous montrons l'implication de ces phosphorylations sur l'activité de RAD51 dans les différentes étapes de la recombinaison homologue. L'ensemble des résultats obtenus suggère le rôle possible de ces modifications dans la régulation de RAD51 et souligne l'importance de c-Met dans la réponse aux lésions de l'ADN.

Title : Modulation of RAD51 activity by the c-Met receptor tyrosine kinase in the repair of DNA double-strand breaks.

Keywords : RAD51, Phosphorylation, DNA Repair, Homologous Recombination , c-Met, Tyrosine Kinase Receptor

Abstract : Genomic instability due to deregulation of DNA repair pathways may be at the onset of cancer and subsequently lead to resistance to chemotherapy and radiotherapy. Understanding these biological mechanisms is therefore essential in the fight against cancer. RAD51 is the core protein of the homologous recombinant double-stranded DNA repair pathway. This repair leads to faithful DNA repair. The recombinase activity of the RAD51 protein is finely regulated by post-translational modifications such as phosphorylation. Over the last decade, more and more studies have suggested the existence of a relationship between receptors with tyrosine kinase activity, which are often overactivated and involved in aggressiveness and cancer proliferation; and DNA repair.

Among these receptors with tyrosine kinase activity, the c-Met/HGF-SF duo is often mutated, over-expressed or constitutively activated in many cancers and its inhibition has been shown to induce a decrease in repair by homologous recombination. Through this thesis, we show for the first time that c-Met is able to phosphorylate the RAD51 protein on four tyrosine residues located mainly in the human recombinase nucleofilament monomer-monomer interface. We show the implication of these phosphorylations on the activity of RAD51 in the different steps of homologous recombination. All the results obtained suggest the possible role of these modifications in the regulation of RAD51 and underline the importance of c-Met in the response to DNA damage.