

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Année 2009

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Caractérisation et rôle de la phosphorylation de la protéine Rad51

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biochimie
Spécialité : Biochimie et Biologie Cellulaire

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Milena POPOVA

Le 06 juillet 2009, devant le jury ci-dessous

Président Dr Josiane FONTAINE-PERUS, Directeur de Recherche - CNRS, Nantes
Rapporteurs Dr Evdokia PASHEVA, Professeur Associé - IMB BAS, Sofia
Dr Bernard LOPEZ, Directeur de Recherche - CNRS, Paris
Examineurs Dr Hamid MORJANI, Maître de Conférences - Université de Reims Champagne-Ardenne
Dr Masayuki TAKAHASHI, Directeur de Recherche - CNRS, Nantes
Dr Fabrice FLEURY, Maître de Conférences - Université de Nantes

Directeur de thèse : Dr Masayuki TAKAHASHI, Directeur de Recherche - CNRS, Nantes

Co-encadrant : Dr Fabrice FLEURY, Maître de conférence - Université de Nantes

Remerciements

Pendant la thèse on a parfois des moments difficiles et la bonne ambiance au laboratoire et le soutien des collègues, des amis et de la famille nous aident à les surmonter et à aller en avant. J'ai eu énormément de chance car j'ai eu ce soutien durant toute ma thèse. J'ai eu des encadrants très sympathiques, des collègues et des amis formidables et une famille présente même de loin. Je suis très reconnaissante à tous ceux qui m'ont aidé et soutenu durant ces quatre ans.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse Dr Masayuki Takahashi de m'avoir accueilli dans son équipe, pour ses conseils et sa confiance.

Un très grand merci à mon co-encadrant Dr Fabrice Fleury qui est devenu également un ami au cours des années. Je lui suis très reconnaissante pour sa confiance en moi et dans le projet, sa disponibilité, ses conseils et discussions scientifiques, son aide pour l'enseignement, sa bonne humeur. Sans oublier les pots de Nutella pour me remonter le moral. Merci aussi de m'avoir soutenu pour partir en congrès dans la ville lointaine de Taos, d'avoir été toujours présent et d'avoir supporté mon petit chauffage en hiver.

Je remercie Dr Josiane Fontaine-Pérus d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je suis très reconnaissante à mes rapporteurs Dr Evdokia Pasheva, qui m'a accueilli dans son laboratoire au cours d'une collaboration et avec qui j'ai eu des discussions très enrichissantes, et Dr Bernard Lopez qui j'ai rencontré au congrès à Taos. Je remercie également Dr Hamid Morjani, d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire parti du jury. Leurs commentaires et questions ont contribué à améliorer de manière significative ce manuscrit.

Je remercie Dr Valérie Trichet pour ses conseils sur les transfections et l'établissement de lignées stables.

Mes remerciements s'adressent à tous les membres des trois équipes du laboratoire : Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, où j'ai réalisé les cultures cellulaires, pour leur sympathie et leurs conseils qui m'ont aidé au cours de mon travail.

Je remercie Nicole pour la correction orthographique du manuscrit.

J'ai toujours pu compter sur mes amis au labo pour me faire rire au point d'en pleurer. Un énorme merci à Susan, Coraline, Julian, Jullien, Marie, Damien, Mickael, Audrey, Julie, Adrien, Stefanie, Emilie pour les repas animés à la cafet', les pauses gouter, les soirées Wii et tous les bons moments passés ensemble. Merci aussi pour les discussions plus ou moins sérieuses et d'avoir été là pour m'écouter et me remonter le moral. Je pense à Anthony et Sébastien qui assurent la relève tant dans les manips qu'à la cafet'.

Merci également à mes amies Maria et Boryana, toutes les deux Docteurs aujourd'hui, avec qui j'ai passé de très bon moments mais aussi de longues heures à nous plaindre de nos thèses. Finalement ces quatre ans ont passé plus vite que l'on pensait.

Je suis très reconnaissante à ma famille qui a toujours cru en moi et qui m'a toujours soutenu de près ou de loin. Quelques mots (ou quelques heures) au téléphone ou un bon gâteau au chocolat, chacun a su me faire sourire. J'ai aussi la chance d'avoir la meilleure belle-famille que l'on puisse souhaiter. Je les remercie pour leur soutien et leur encouragement.

Enfin, un très grand merci à Ivo d'être à côté de moi et de m'épauler dans tout ce que j'entreprends. Son soutien, sa patience, et son amour sont irremplaçables.

Table des matières

Liste des figures	vii
Liste des tableaux	x
Abréviations	xi
Introduction générale	1
I. Introduction.....	5
1 Les dommages de l'ADN et les voies de leur réparation.....	7
1.1 Voies de réparation des dommages de l'ADN	8
1.1.1 Réparation par excision de base (BER).....	9
1.1.2 Réparation par excision de nucléotide (NER)	10
1.1.3 Réparation des mésappariements de bases (MMR)	10
1.1.4 Réparation de CDB par jonction des extrémités non homologues (NHEJ)	11
1.1.5 Réparation de CDB par Recombinaison Homologue (RH).....	12
1.1.5.1 Etape présynaptique	14
1.1.5.2 Etape synaptique	15
1.1.5.3 Etape postsynaptique.....	16
1.1.6 Réparation par hybridation de simples brins (SSA).....	17
1.2 Réponses aux CDB	17
1.2.1 Les cassures double brin.....	17
1.2.2 Reconnaissance des CDB	19
1.2.3 Activation de checkpoints du cycle cellulaire	19
1.2.4 Choix de la voie de réparation	21
1.2.5 Activation de l'apoptose.....	23
1.2.6 Maladies liées à une recombinaison défectueuse.....	25
2 La protéine Rad51.....	27
2.1 Structure	27
2.2 Activités biochimiques.....	28
2.3 Expression	29
2.4 Localisation intra-cellulaire.....	29
2.5 Interactions protéiques	30
2.5.1 Les protéines BRCA.....	30

2.5.1.1	BRCA1	31
2.5.1.2	BRCA2	33
2.5.2	p53.....	36
2.5.3	Les paralogues de HsRad51.....	39
3	Régulation de Rad51.....	40
3.1	Modifications post-traductionnelles de Rad51	42
3.2	Phosphorylation de Rad51.....	43
3.2.1	Tyrosine Kinases.....	44
3.2.2	c-Abl.....	44
3.2.2.1	Structure et localisation intracellulaire.....	45
3.2.2.2	Régulation.....	46
3.2.2.3	Rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN	48
3.2.3	Arg.....	49
3.2.4	BCR/Abl	50
3.2.4.1	Structure.....	50
3.2.4.2	Traitement de leucémies avec Glivec.....	51
3.2.4.3	Rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN	52
3.2.5	Phosphorylation de Y54	53
3.2.6	Phosphorylation de Y315	54
3.2.6.1	par c-Abl.....	54
3.2.6.2	par BCR/Abl	54
3.2.7	Etude de Y315.....	54
3.2.8	Phosphorylation par Arg.....	55
3.2.9	Phosphorylation de Rad51 sur Thréonine	55
3.3	Clivage par la caspase-3.....	57
II.	Matériel et Méthodes	59
1.	Produits	61
2.	Cellules.....	62
3.	Bactéries et plasmides.....	62
4	Préparation de bactéries compétentes par la méthode SEM	63
5	Transformation de bactéries par choc thermique	63
6	Préparation de plasmides	64
7	Electrophorèse en gel d'agarose.....	64
8	Détermination de la concentration de l'ADN	64

9	Génération d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques	64
9.1	Peptides	65
9.2	Immunisation des lapins	65
9.3	Préparation de puces à peptides	66
9.4	Purification d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques	67
9.4.1	Couplage peptide – colonne.....	67
9.4.2	Purification des anticorps anti-pY54 et anti-pY315.....	68
9.4.2.1	Principe de purification	69
10	Test de viabilité cellulaire au MTT	69
11	Transfection de cellules	69
11.1	Transfection transitoire	69
11.1.1	DreamFect Gold.....	69
11.1.2	FuGENE 6	70
11.2	Transfection stable	70
11.2.1	Détermination de la sensibilité des cellules HeLa au G418.....	70
11.2.2	Sélection de clone transfecté.....	71
12	Fixation de cellules	71
13	Lyse des cellules	71
14	Fractionnement cellulaire.....	72
15	Immunoprécipitation.....	72
16	Précipitation de protéines au TCA.....	73
17	Dosage protéique	73
18	SDS-PAGE / WB.....	73
19	Précipitation au GST.....	75
20	Purification de HsRad51	76
20.1	Culture bactérienne	76
20.2	Sonication des bactéries transformées	76
20.3	Chromatographie sur colonne NiNTA	76
20.3.1	Purification sur colonne échangeuse d'anions.....	77
III.	Résultats et Discussion	79
1	Elaboration d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques	85
1.1	Synthèse des peptides.....	85
1.2	Réalisation de puces à peptides	87
1.3	Choix du sérum pour la purification des anticorps	87

1.3.1	Sérums anti-pY54.....	88
1.3.2	Sérums anti-pY315.....	90
1.4	Purification d'anticorps anti-phosphoTyrosine spécifiques.....	91
1.4.1	Couplage peptide - colonne.....	91
1.4.2	Types d'anticorps générés après immunisation d'un animal avec un phosphopeptide.....	93
1.4.3	Principe de purification.....	93
1.4.4	Purification des anticorps anti-pY54.....	94
1.4.5	Purification des anticorps anti-pY315.....	96
2	Evaluation de Rad51 phosphorylée et non phosphorylée dans différentes lignées.....	99
2.1	Niveau d'expression de Rad51 dans différentes lignées.....	99
2.2	Recherche de phosphorylation de Rad51 dans des lellules BCR/Abl.....	101
2.3	Recherche de phosphorylation dans des cellules traités.....	101
2.3.1	Détermination des IC50.....	102
2.3.2	Traitement avec VP16.....	103
2.3.3	Traitement avec CLB.....	105
2.4	Immunoprécipitation de Rad51 - optimisation.....	107
2.4.1	Tampon de lyse.....	108
2.4.2	Preclearing.....	109
2.4.3	Protéine A / Protéine G.....	109
2.4.4	Quantité d'anticorps monoclonal.....	110
2.4.5	Temps d'incubation antigène - anticorps.....	111
2.4.6	Volume de dissociation du complexe immun.....	112
2.4.7	Conditions d'immunoprécipitation.....	113
2.5	Immunoprécipitation de Rad51.....	114
3	Surexpression de Rad51 par transfection - optimisation.....	116
3.1	Amplification des plasmides.....	117
3.2	Choix de la lignée cellulaire.....	118
3.3	Choix du réactif de transfection.....	118
3.4	Optimisation du ratio FuGENE 6 : ADN.....	120
3.4.1	Rad51wt.....	120
3.4.2	Rad51 mutée – Y54F, Y301F, Y315F.....	122
3.4.3	c-Abl.....	123
3.5	Quantité de plasmide pour les co-tranfections.....	124

3.6	Temps d'incubation après transfection	125
3.7	Niveau d'expression de la protéine HA-Rad51 transfectée seule.....	127
3.8	Niveau d'expression de la protéine Rad51 co-transfectée avec c-Abl.....	128
3.9	Conditions de transfection retenues	131
4	Evaluation de la phosphorylation de Rad51 dans des cellules transfectées.....	132
4.1	Confirmation de l'activité kinase de c-Abl surexprimée	132
4.2	Confirmation de la phosphorylation de Rad51	133
4.3	Phosphorylation de Y315	136
4.3.1	Phosphorylation de Rad51 exogène sur Y315	137
4.3.2	Phosphorylation de Rad51 endogène sur Y315	139
4.4	Phosphorylation de Y54	140
4.5	Phosphorylation séquentielle de Rad51	142
5	Rôle de la phosphorylation de Rad51	145
5.1	Fractionnement cellulaire	146
5.1.1	Efficacité du fractionnement cellulaire	146
5.1.2	Localisation intracellulaire de Rad51 endogène et exogène.....	147
5.1.3	Localisation intracellulaire de Rad51 phosphorylée	149
5.1.3.1	Rad51 pY315	150
5.1.3.2	Rad51 pY54.....	151
5.1.3.3	Formes de phospho-Rad51 et localisation.....	153
5.1.4	Localisation intracellulaire de Rad51 mutée	154
5.1.5	Rôle de la phosphorylation de Rad51.....	156
5.2	Elaboration d'une lignée stable EGFP-Rad51	158
5.2.1	Sélection du clone transfecté	158
5.2.2	Observation de foci	159
IV.	Conclusions et Perspectives	163
	Bibliographie.....	173

Liste des figures

1.1: Réponses cellulaires aux différents dommages de l'ADN.....	8
1.2 : Voies de réparation en fonction des différents dommages de l'ADN.....	9
1.3 : Réparation de l'ADN par excision de base (BER) et par excision de nucléotides (NER)	10
1.4 : Voies de réparation des CDB par NHEJ canonique et alternative.....	12
1.5 : Rôles biologiques de la RH.....	13
1.6 : Etapes de la RH et les différents modèles de l'étape postsynaptique.....	14
1.7 : Etapes présynaptique et synaptique de la RH.....	15
1.8 : Voie de réparation des CDB par SSA.....	17
1.9 : Régulation des checkpoints G1/S, intra-S et G2/M du cycle cellulaire après CDB de l'ADN.....	20
1.10 : Choix de la voie de réparation des CDB en fonction du cycle cellulaire.....	22
1.11 : Induction de l'apoptose suite à des lésions irréparables de l'ADN.....	24
1.12 : Foci nucléaires de Rad51 suite à un traitement avec MMC de cellules SW480.....	30
1.13 : Régulation du cycle cellulaire par BRCA1.....	32
1.14 : Structure de la protéine BRCA2.....	34
1.15 : Régulation de Rad51 par BRCA2.....	36
1.16 : Contrôle du devenir de la cellule par p53 en fonction de l'importance des dommages de l'ADN.....	37
1.17 : Régulation transcriptionnelle et non-transcriptionnelle de la RH par p53.....	38
1.18: Régulation de Rad51 par des modifications post-traductionnelles.....	41
1.19 : Structure des isoformes 1a et 1b de la kinase c-Abl et de la kinase de fusion BCR/Abl.....	45
1.20: Conformation inactive (autoinhibée) et active de la kinase c-Abl.....	47
1.21 : Implication de Chk1 dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.....	56
2.1 : Plan des puces à peptides.....	67
2.2 : Immobilisation de peptide sur le gel de couplage.....	68
3.1 : Structure d'un monomère de Rad51.....	81
3.2 : Spécificité des sérums des lapins immunisés avec le peptide pY54.....	89
3.3 : Spécificité des sérums des lapins immunisés avec le peptide pY315.....	90
3.4 : Types d'anticorps générés après immunisation d'un animal avec un phosphopeptide....	93

3.5 : Purification des anticorps anti-pY54.....	95
3.6 : Purification des anticorps anti-pY315.....	97
3.7 : Expression de Rad51 dans les lignées HL60S, HL60/DNR, HL60/DOX, HeLa et K562.....	100
3.8 : Expression de Rad51 dans les lignées HL60S, HL60/DNR et HL60/DOX après traitement au VP16.....	104
3.9 : Expression de Rad51 dans les lignées HL60S, HL60/DNR et HL60/DOX après traitement avec du CLB.....	105
3.10 : Effet de la composition du tampon de lyse sur l'immunoprécipitation de Rad51	108
3.11 : Nécessité d'étape de preclearing pour l'immunoprécipitation de Rad51.....	109
3.12 : Efficacité de la protéine A ou la protéine G pour l'immunoprécipitation de Rad51...110	
3.13 : Quantité optimale d'anticorps anti-Rad51 pour l'immunoprécipitation de Rad51.....111	
3.14 : Effet du temps de couplage antigène - anticorps sur l'immunoprécipitation de Rad51.....	112
3.15 : Effet du volume de dissociation du complexe immunitaire sur l'immunoprécipitation de Rad51.....	112
3.16 : Immunoprécipitation de Rad51 après traitement de cellules HL60S, HL60/DNR et HL60/DOX avec VP16 et CLB.....	114
3.17 : Electrophorèse en gel d'agarose des plasmides c-Ablwt, c-Abl KD, Rad51wt, Rad51 Y54F, Rad51 Y301F et Rad51 Y315F	117
3.18 : Co-transfection de cellules Hela avec les réactifs DreamFect Gold et FuGENE 6.....	119
3.19 : Optimisation du ratio FuGENE 6 : plasmide Rad51wt.....	121
3.20 : Optimisation du ratio FuGENE 6 : plasmides Rad51 Y54F, Y301F, Y315F.....	122
3.21 : Optimisation du ratio FuGENE 6 : plasmide c-Abl.....	123
3.22 : Optimisation de la quantité de plasmide à co-transfecter.....	124
3.23 : Optimisation du temps d'incubation des cellules après transfection.....	126
3.24 : Niveau d'expression de Rad51wt, Rad51 Y54F, Rad51 Y301F et Rad51 Y315F transfectées dans des cellules HeLa	128
3.25 : Niveau d'expression de Rad51 sauvage ou mutée dans des cellules co-transfectées avec c-Abl.....	129
3.26 : Vérification de l'activité kinase de c-Abl.....	133
3.27 : Vérification de la phosphorylation de Rad51 sur tyrosine.....	134
3.28 : Sites de coupure de la protéine Rad51 humaine par la trypsine	135
3.29 : Phosphorylation de Rad51 sauvage ou mutée sur Y315.....	138

3.30 : Phosphorylation de la protéine Rad51 endogène sur Y315.....	140
3.31 : Phosphorylation de Rad51 sauvage ou mutée sur Y54.....	141
3.32 : Séquence de Rad51 et sites de reconnaissance de c-Abl.....	143
3.33: Interaction du domaine SH2 de c-Abl avec Rad51 phosphorylée sur Y315.....	144
3.34 : Vérification de l'efficacité du fractionnement cellulaire.....	147
3.35 : Localisation intracellulaire de Rad51 endogène et exogène.....	148
3.36 : Localisation intracellulaire de Rad51 pY315.....	150
3.37 : Localisation intracellulaire de Rad51 pY54.....	152
3.38 : Formes de Rad51.....	153
3.39 : Localisation intracellulaire de Rad51 mutée Y54F, Y301F et Y315F.....	154
3.40 : Expression d'EGFP-Rad51 dans des cellules HeLa transfectées stablement.....	159
3.41 : Cellules HeLa EGFP-Rad51 non traitées.....	160
3.42 : Formation de foci nucléaires de EGFP-Rad51 après traitement de cellules HeLa EGFP-Rad51 à la CPT ou à la MMC.....	161

Liste des tableaux

1.1 : Défauts, syndromes et type de cancer induits par des mutations dans les gènes impliqués dans la réparation de CDB par RH	25
2.1 : Anticorps commerciaux utilisés pour la révélation de Western Blots.....	62
2.2 : Programme d'immunisation des lapins avec les peptides pY54 et pY315.....	66
2.3 : Quantité de peptide déposée sur la puce à peptides.....	67
2.4 : Anticorps et dilutions utilisés pour la révélation des Western blots.....	75
2.5 : Conditions de chromatographie sur colonne NiNTA.....	76
2.6 : Conditions de chromatographie sur colonne MonoQ.....	77
3.1 : Caractéristiques des peptides synthétisés.....	86
3.2 : Pourcentage de peptide couplé aux colonnes SulfoLink.....	92
3.3 : IC50 des lignées HL60S, HL60/DNR et HL/DOX pour le VP15 et CLB.....	102
3.4 : Conditions testées et retenues pour la mise en oeuvre de l'immunoprécipitation de Rad51.....	113
3.5 : Conditions optimales de transfection de Rad51 sauvage ou mutée et de co-transfection de Rad51 avec c-Abl dans des cellules HeLa.....	131

Abréviations

ADNsb : ADN simple brin

ADNdb : ADN double brin

BER : base excision repair

BIR : break-induced replication

CDB : cassure double brin

CLB : chlorambucile

CPT : camptothécine

CSB : cassure simple brin

DSBR : double-strand break repair

DNR : daunorubicine

DOX : doxorubicine

HJ : jonction de Holliday

LMB : leptomycin B

MMC : mitomycine C

MMR : mismatch repair

NES : signal d'export nucléaire

NER : nucleotide excision repair

NLS : signal de localisation nucléaire

NHEJ : nonhomologous end joining

RH : recombinaison homologue

ROS : espèces réactives d'oxygène

SDSA : synthesis-dependant strand annealing

SSA : simple strand annealing

VP16 : étoposide

Introduction générale

De nombreux facteurs exogènes mais également endogènes endommagent l'ADN des cellules qui ont développé des réponses efficaces pour s'opposer à leurs effets délétères. En cas de dommages d'ADN, les cellules arrêtent leur progression dans le cycle cellulaire et activent des voies de réparation en fonction du type de dommage. Parmi les lésions de l'ADN les cassures double brin sont les plus létales car si elles ne sont pas réparées elles créent une instabilité génomique qui peut aboutir au développement de cancer. La réparation fidèle des CDB est assurée par recombinaison homologue (RH) dont le rôle central est joué par la protéine Rad51. Cette recombinase catalyse la recherche d'homologie et l'échange de brin avec une séquence homologue. Ainsi l'activité de Rad51 est indispensable pour la survie des cellules et pour le maintien de leur stabilité génomique. Cependant cette protéine a également un rôle dans la cancérogenèse et la résistance de cancers aux chimio et radiothérapies. Le niveau élevé de RH qui résulte de la surexpression de Rad51 induit l'instabilité génomique des cellules et peut ainsi être impliqué dans le développement de cancers. D'autre part, dans les cellules cancéreuses un niveau élevé de RH assure la réparation des CDB induites par les traitements anti-cancéreux et leur confère une résistance à ces traitements.

La phosphorylation de Rad51 est impliquée dans sa régulation. Deux tyrosines semblent être phosphorylées en position 54 et 315, cependant il existe peu de données sur le mécanisme et le rôle de ces phosphorylations. Une seule étude montre la phosphorylation de Y54 et la phosphorylation des deux sites ensemble n'a pas été observée auparavant. De plus, les résultats antérieurs sont contradictoires. La phosphorylation de Y54 serait inhibitrice pour l'activité de Rad51, alors que celle de Y315 stimulerait l'activité de la protéine et par conséquent la recombinaison homologue. La phosphorylation de Y315 serait également liée à la résistance de cellules leucémiques aux chimiothérapies.

La phosphorylation d'une protéine sur plusieurs sites peut être un moyen efficace de régulation de son activité. L'objectif de ce travail a été donc tout d'abord de déterminer avec certitude les sites de phosphorylation de Rad51. Nous avons étudié ensuite le mécanisme de ces phosphorylations et nous avons abordé l'étude de son rôle. Cette étude pourrait apporter une meilleure compréhension de l'implication de la phosphorylation de la protéine Rad51 dans la cancérogenèse et la résistance aux traitements anti-cancéreux.

La première partie de ce manuscrit présente un rappel bibliographique des voies de réparation de l'ADN chez l'Homme. L'implication de la protéine Rad51 dans la RH, les kinases responsables de sa phosphorylation, ainsi que les informations connues sur la phosphorylation sont décrites.

Ensuite les méthodes utilisées pendant cette étude sont décrites.

Les résultats sont présentés dans la troisième partie de ce manuscrit. Dans un premier temps l'élaboration d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques est décrite. Un modèle cellulaire et une approche adaptés à l'étude de la phosphorylation de Rad51 ont été recherchés. Nous avons ensuite évalué et déterminé le mécanisme de phosphorylation de Rad51. Un rôle possible de cette phosphorylation a été recherchée.

Le manuscrit se termine par un résumé et les perspectives de ce travail.

CHAPITRE I

I. Introduction

1 Les dommages de l'ADN et les voies de leur réparation

Les processus de réplication et de réparation de l'ADN sont strictement régulés dans les cellules afin de maintenir un niveau de mutation acceptable et d'assurer que la stabilité génomique ne soit pas compromise. Un grand nombre de facteurs endogènes et exogènes représentent des menaces pour la stabilité de l'ADN et peuvent induire son endommagement. Parmi les facteurs endogènes capables d'induire des lésions de l'ADN, on trouve les radicaux libres et les espèces réactives d'oxygène, qui induisent la méthylation non contrôlée, la perte spontanée de bases, l'alkylation. Les facteurs exogènes incluent la chaleur, l'ultraviolet, les irradiations ionisantes, des produits chimiques de l'environnement.

L'irradiation ionisante produit des dommages divers au niveau de l'ADN tels que l'endommagement des bases (sites abasiques ou des modifications de bases), des cassures simple brin (CSB), des cassures double brin (CDB), des dommages du sucre, des pontages chimiques entre l'ADN et une protéine (Kao et al, 2005; Vijayakumar & Hellman, 1997).

Il a été estimé qu'une cellule peut subir 10 000 lésions par jour (Lindahl, 1993; Wogan et al, 2004). Lorsqu'une cellule subit des dommages de l'ADN, elle peut avoir trois types de réponses. Le plus souvent la cellule répare les dommages et survit sans en garder des conséquences majeures. Si le dommage n'est pas réparé, la cellule peut mourir par apoptose ou arrêter définitivement son cycle cellulaire. Cependant dans le cas d'une mauvaise réparation la cellule peut survivre mais avec des changements génétiques qui peuvent aboutir au développement de cancer (fig. 1.1) (Kao et al, 2005; Shiloh, 2003).

Nous allons faire un bref rappel des différentes voies de réparation de l'ADN chez l'Homme. La réparation de CDB par recombinaison homologue sera décrite en détail.

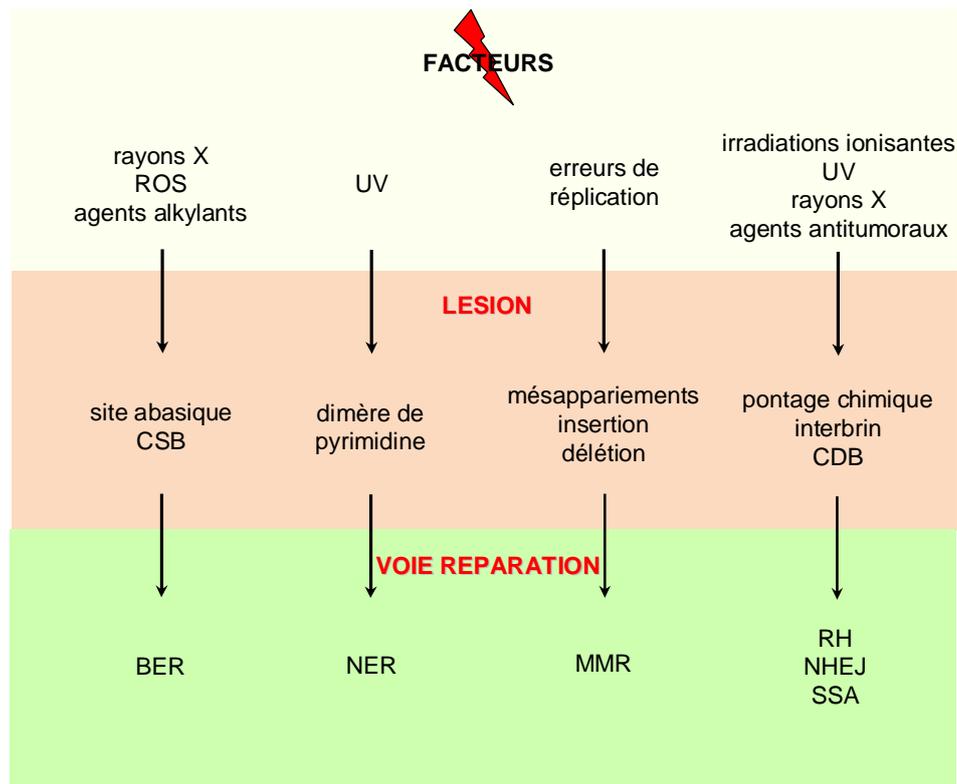


Figure 1.2 : Voies de réparation en fonction des différents dommages de l'ADN.

1.1.1 Réparation par excision de base (BER)

La réparation par excision de base (BER) est la voie principale de reconnaissance et réparation de dommages d'une seule base de l'ADN. La base mutée est éliminée ce qui conduit à la formation d'un site apurique/apyrimidique. Ce site est reconnu par une endonucléase et avec l'aide d'une phosphodiesterase la chaîne sucre-phosphate de l'ADN est clivée. Le brin complémentaire est utilisé comme matrice, le site est complété avec la base correspondante et elle est liée par une ADN ligase (fig. 1.3a) (Kao et al, 2005).

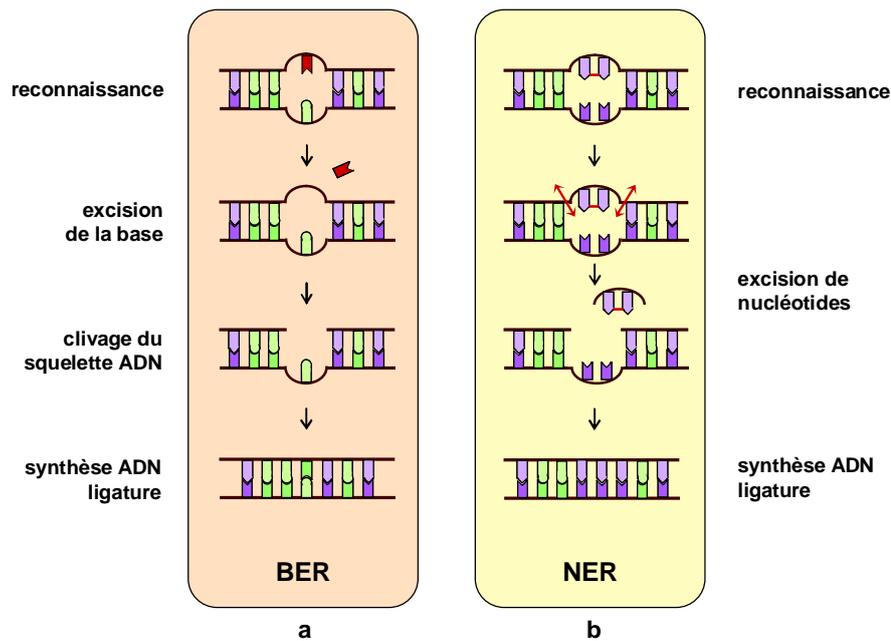


Figure 1.3 : Réparation de l'ADN par excision de base (BER) (a) et par excision de nucléotides (NER) (b).

1.1.2 Réparation par excision de nucléotide (NER)

La voie de réparation par excision de nucléotide (NER) répare des lésions induites par l'UV tels que les dimères de pyrimidine, des lésions induites par des toxines ou des médicaments anti-cancéreux tels que le cisplatine (Reardon & Sancar, 2005). Cette voie de réparation reconnaît les modifications chimiques de l'ADN souvent accompagnées par des distorsions de la double hélice de l'ADN (Hoeijmakers, 2001). Le squelette phosphodiester du brin endommagé est clivé des deux côtés du dommage et l'oligonucléotide résultant est éliminé. Le brin complémentaire est utilisé comme matrice pour compléter la séquence manquante (fig. 1.3b) (Altieri et al, 2008; Kao et al, 2005).

1.1.3 Réparation des mésappariements de bases (MMR)

Pendant la réplication de l'ADN ou le processus de recombinaison homologue des mésappariements de bases, c'est-à-dire l'insertion d'une base incorrecte, ou des insertions ou délétions de bases peuvent se produire. Si elles ne sont pas réparées, elles sont responsables de l'accumulation de mutations spontanées permanentes du génome. Les mésappariements sont reconnus et excisés. De plus les protéines impliquées dans les voies BER et NER reconnaissent également ces mésappariements (Kao et al, 2005).

1.1.4 Réparation de CDB par jonction des extrémités non homologues (NHEJ)

Les cassures double brin (CDB) sont situées à la fois sur les deux brins de l'ADN et sont plus difficiles à réparer que les lésions qui se situent sur un des deux brins. Dans ce cas aucun des brins n'étant entier, ils ne peuvent pas être utilisés comme matrice pour la réparation. La cellule répare ces lésions soit en ligaturant les extrémités de la cassure, soit en recherchant et en recopiant une séquence homologue dans le génome.

La voie de réparation des CDB de l'ADN par jonction des extrémités non homologues (non homologous end joining - NHEJ) consiste dans la ligature des extrémités de la CDB, qu'elles soient complémentaires ou non (fig. 1.4). Les extrémités de la CDB peuvent être "nettes" ou "sales". Les extrémités "nettes" possèdent un groupement phosphate en 5' et un groupement hydroxyle en 3'. Dans le cas où il n'y a pas eu de perte de nucléotides lors de la cassure, la réparation de la CDB est fidèle. Les extrémités "sales" ont perdu l'un ou les deux de ces groupements et très souvent des nucléotides lors de la cassure. La réparation des extrémités "sales" implique une faible résection de la cassure. Ainsi des séquences peuvent être deletées ou des nucléotides ajoutés au niveau de la cassure pendant la réparation en induisant ainsi des erreurs. La réparation est donc infidèle, d'autant plus qu'elle n'utilise pas de matrice pour la réparation (Cann and Hicks, 2007; Shrivastav et al., 2008). Malgré son imprécision, cette voie est importante pour le maintien de la stabilité génomique car elle restaure rapidement l'intégrité structurale des chromosomes et prévient ainsi la perte de segments ou un bras entier du chromosome (Lieber, 2008).

Il existe différents mécanismes de NHEJ. La réparation par NHEJ canonique nécessite la fixation des sous-unités régulatrices Ku70 et Ku80 aux extrémités de la CDB. Elles recrutent la sous-unité catalytique de la DNA-PK (DNA-PKcs) qui facilite l'alignement d'extrémités non complémentaires (Shrivastav et al., 2008). L'holoenzyme DNA-PK est ainsi formé et l'activité Ser/Thr kinase de DNA-PKcs est activée. Elle s'autophosphoryle et phosphoryle l'hétérodimère Ku70/80 ainsi que d'autres protéines telles que RPA et Artemis (Cann & Hicks, 2007). Le complexe Ligase IV/XRCC4 assure la ligature des deux extrémités des brins. La résection des extrémités lors de la voie canonique est minimale et la fidélité de réparation dépend de la structure des extrémités de la CDB (fig. 1.4a) (Guirouilh-Barbat et al, 2007).

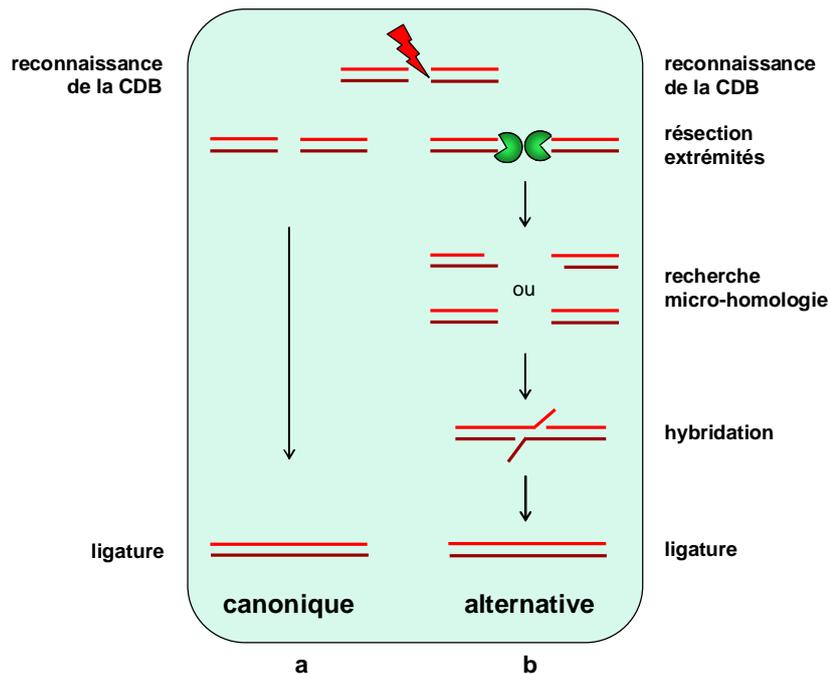


Figure 1.4 : Voies de réparation des CDB par NHEJ canonique (a) et alternative (b) (d'après (Guirouilh-Barbat et al, 2007))

La voie NHEJ alternative (fig. 1.4b) est indépendante de la protéine Ku (Feldmann et al, 2000; Guirouilh-Barbat et al, 2004). Elle nécessite des micro-homologies internes de 2 à 4 nucléotides, révélées par résection des extrémités de la cassure (Guirouilh-Barbat et al, 2007). Les micro-homologies sont hybridées ensemble et les séquences qui les séparent sont éliminées. Une voie alternative indépendante de XRCC4 a également été décrite et elle utilise des micro-homologies de 7 nucléotides (Kabotyanski et al, 1998) . Ces voies alternatives sont infidèles et pourraient générer de l'instabilité génomique (Kuhfittig-Kulle et al, 2007).

1.1.5 Réparation de CDB par Recombinaison Homologue (RH)

Le processus de recombinaison homologue (RH) intervient non seulement dans la réparation de CDB de l'ADN mais a également d'autres rôles essentiels dans la cellule. Pendant la méiose la RH assure la diversité génétique dans la descendance de parents identiques en stimulant l'échange d'information entre les allèles maternels et paternels dans les cellules précurseurs des gamètes. La RH assure également le maintien de la stabilité karyotypique des organismes en régulant la ségrégation des chromosomes homologues lors de la première division de la méiose (Neale & Keeney, 2006).

Dans les cellule somatiques la RH maintient la stabilité génomique grâce à son rôle dans la réparation de différentes lésions de l'ADN tel que les pontages chimiques entre les brins, les télomères incomplets générés par une telomérase non fonctionnelle et les CDB de l'ADN (San Filippo et al, 2008) (fig. 1.5). Un rôle essentiel de la RH est le redémarrage des fourches de réplication bloqués (Kuzminov, 1995), ainsi que la régulation de la vitesse de progression des fourches (Daboussi et al, 2008). Les fourches de réplication peuvent être bloquées par différents stress génotoxiques mais également au niveau de zones difficiles à répliquer (Hyrien, 2000) et l'inhibition prolongée de la réplication peut générer des CDB (Saintigny et al, 2001a).

La RH peut cependant générer de l'instabilité génomique et provoquer des maladies lorsque ce processus se fait entre des séquences répétées dispersées dans le génome. Dans ce cas la RH peut induire des réarrangements génomiques (Purandare & Patel, 1997).

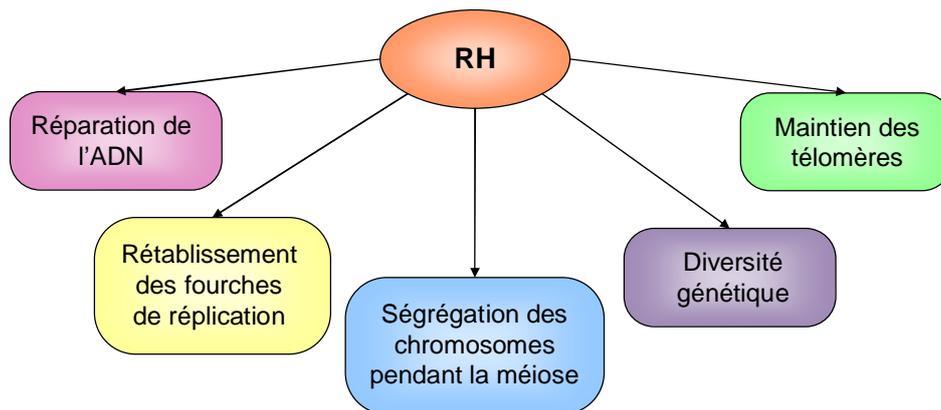


Figure 1.5 : Rôles biologiques de la RH (d'après (Sung & Klein, 2006)).

La réparation des CDB par RH est considérée comme un processus précis et fidèle. Dans cette voie de réparation des séquences homologues (présentes de préférence sur la chromatide sœur ou le chromosome homologue mais aussi des régions répétées sur le même ou un autre chromosome) sont utilisées pour reconstituer l'information manquante au niveau de la CDB. Si la matrice utilisée est parfaitement homologue, la réparation est fidèle. Cependant à l'exception des chromatides sœurs, les matrices utilisées ne sont pas parfaitement homologues et dans ce cas la RH résulte dans la perte d'hétérozygoté avec un transfert d'information du locus donneur entier au locus accepteur cassé. Ce transfert non réciproque d'information génétique est appelé conversion génique (Shrivastav et al., 2008).

Le processus de RH peut être divisé en trois étapes : présynaptique pendant lequel les CDB sont reconnus et pris en charge, synaptique caractérisé par la recherche de séquence homologe et postsynaptique pendant lequel la séquence homologe est recopiée et les jonctions de Holliday (HJ) sont résolues (fig. 1.6).

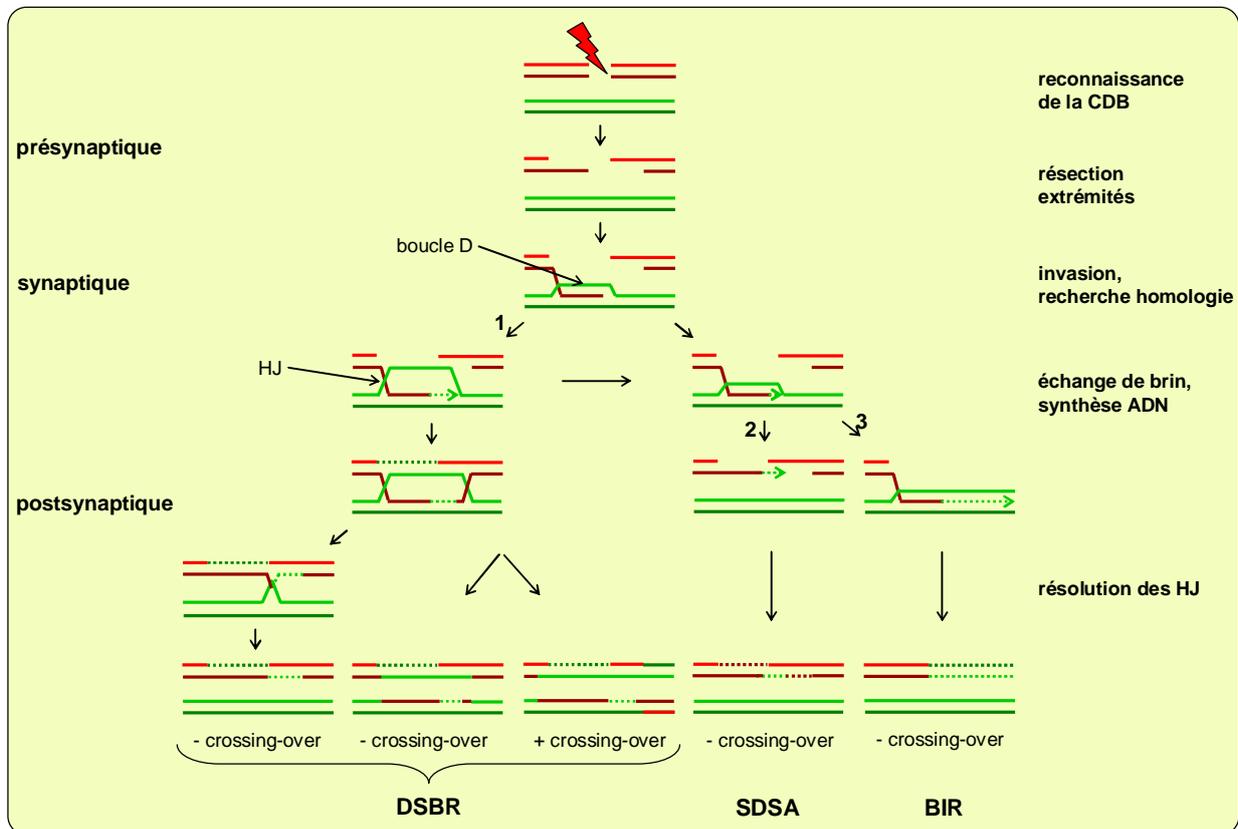


Figure 1.6 : Etapes de la RH et les différents modèles de l'étape postsynaptique (d'après (Li & Heyer, 2008))

1.1.5.1 Etape présynaptique

Pendant l'étape présynaptique les CDB sont reconnues par le complexe MRN en association avec la protéine CtIP, l'orthologue des mammifères de Sae2 de levure (fig. 1.7). Le complexe MRN, composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1, sera décrit plus en détail dans le chapitre "Reconnaissance des CDB", page 19. Les extrémités de la cassure sont digérées vraisemblablement par l'activité exonucléase de Mre11 pour générer des extrémités simple brin 3' sortantes. La protéine hétérotrimérique RPA (replication protein A) se lie à ses extrémités simple brin et facilite l'assemblage du filament synaptique en éliminant les structures secondaires sur l'ADNsb. L'activité exonucléase de Mre11 et le recrutement de

RPA nécessitent la présence de CtIP (Huertas & Jackson, 2009; Sartori et al, 2007). Rad51 se fixe sur l'ADNsb et forme avec lui des filaments nucléoprotéiques. Cet étape nécessite des cofacteurs tels que Rad52, qui chez la levure se fixe sur RPA et recrute Rad51 ou BRCA2 chez les mammifères qui assure le transport de Rad51 au niveau de la cassure et régule sa polymérisation. La fonction des paralogues de Rad51 - Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 et XRCC3, comme cofacteurs dans cette étape de la RH n'est pas connue. Ils forment deux complexes et tous les cinq paralogues sont nécessaires *in vivo* pour la formation du filament de Rad51 (Li and Heyer, 2008; San Filippo et al., 2008; West, 2003).

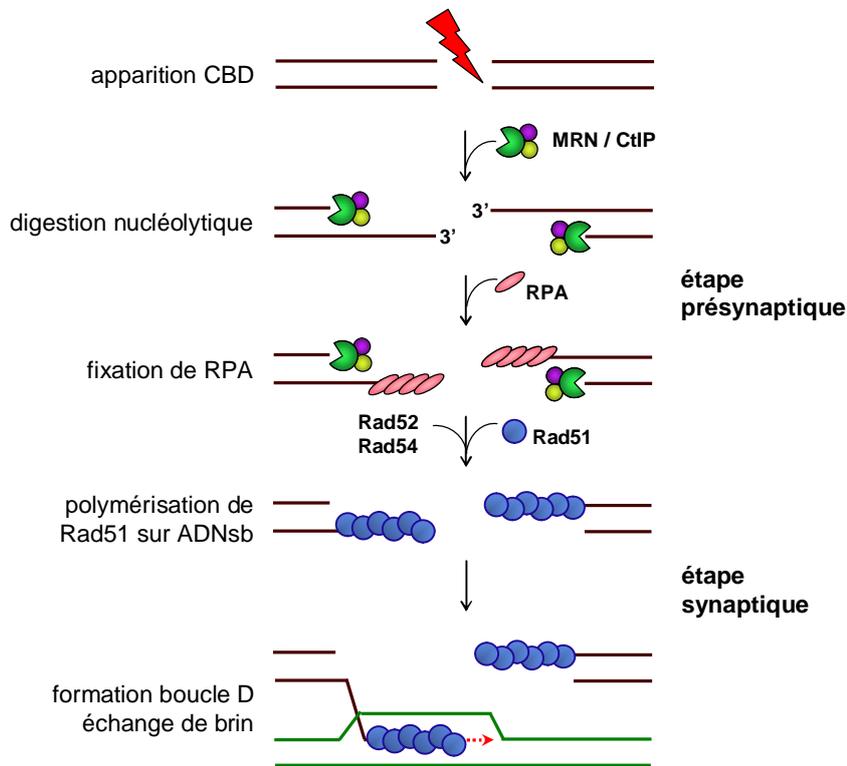


Figure 1.7 : Etapes présynaptique et synaptique de la RH (d'après (Hoeijmakers, 2001))

1.1.5.2 Etape synaptique

Pendant l'étape synaptique, Rad51 catalyse la recherche d'homologie et l'échange de brin avec une séquence homologue (fig.1.7). L'ADN homologue est envahi par le filament nucléoprotéique et forme une boucle D. Rad54 facilite cette réaction en induisant des changements topologiques dans l'ADNdb qui favorisent l'invasion par le simple brin. Cette protéine stabilise ainsi la formation du duplex (Sigurdsson et al, 2002; West, 2003). L'extrémité 3' du brin envahissant sera utilisée comme amorce pour l'extension de l'ADN

envahissant par des ADN polymérase qui recopient la séquence du brin envahi. Ceci permettra de restaurer l'information perdue au niveau de la CDB.

1.1.5.3 Etape postsynaptique

Il existe différents modèles pour expliquer l'étape postsynaptique qui peut être réalisée avec ou sans crossing-overs : DSBR, SDSA, BIR. Le modèle de DSBR se différencie du SDSA et du BIR par la formation et la résolution de structures à quatre branches, appelés jonctions de Holliday (HJ). Rad54 aurait un rôle dans l'étape postsynaptique en favorisant le recyclage de Rad51 liée au duplex et en libérant ainsi l'accès à l'extrémité 3' envahissant pour les ADN polymérase (Li & Heyer, 2008; Solinger et al, 2002).

Dans le modèle de réparation de cassures double brin **DSBR** (double-strand break repair) l'extrémité non engagée dans la boucle D de la CDB s'hybride à la boucle D formée par la molécule envahie (fig. 1.6.1). L'élongation et la ligature du brin sont ensuite réalisées. Il en résulte un intermédiaire comportant deux jonctions de Holliday, qui après résolution donne des produits avec ou sans crossing-over (Li & Heyer, 2008; San Filippo et al, 2008).

Dans la voie de **SDSA** (synthesis-dependant strand annealing) la deuxième extrémité de la CDB n'est pas capturée dans la boucle D (fig. 1.6.2). La boucle D disparaît après l'élongation du brin envahissant, qui se libère et s'hybride avec la deuxième extrémité de la CDB. Cette voie n'implique pas la formation de crossing-overs car il n'y a pas de formation de jonctions de Holliday. La RH mitotique, lors de laquelle des crossing-overs ne se produisent pas, est effectuée selon ce modèle (Li & Heyer, 2008; Sung & Klein, 2006).

Dans la voie **BIR** (break-induced replication) le brin envahissant établit une fourche de réplication et toute la longueur de la partie distale du chromosome matrice est recopiée (fig. 1.6.3). La deuxième extrémité n'est pas engagée et l'information génétique de ce fragment est remplacée par celle de la matrice, ce qui conduit à la perte d'hétérozygotie. Lorsque la chromatide sœur ou le chromosome homologue est utilisé comme matrice, la réparation est fidèle. Cependant si des séquences répétées sur un chromosome non homologue sont utilisées, une translocation non réciproque se produit. Ce mécanisme est utilisé pour la réparation de CDB qui n'ont qu'une extrémité et qui apparaissent au niveau des télomères ou des fourches de réplication cassées (Li & Heyer, 2008; San Filippo et al, 2008).

1.1.6 Réparation par hybridation de simples brins (SSA)

Si la CDB est entourée de séquences homologues, elle est réparée par un processus d'hybridation de simples brins SSA (simple-strand annealing) (fig. 1.8). Les extrémités de la CDB sont digérées, ce qui expose des simples brins complémentaires. Au lieu d'envahir une séquence homologue présente sur une autre molécule d'ADN, ces extrémités s'hybrident entre elles. Ce processus est facilité par Rad52. Les extrémités simple brin qui dépassent sont coupées ce qui provoque la délétion de l'information entre les séquences répétées et une de ces séquences. La voie est non conservative et conduit à la perte de matériel génétique. Etant donné que la recherche de séquences homologues et l'envahissement de brin ne sont pas impliqués dans cette voie, les protéines telles que Rad51 n'y participent pas (San Filippo et al, 2008).

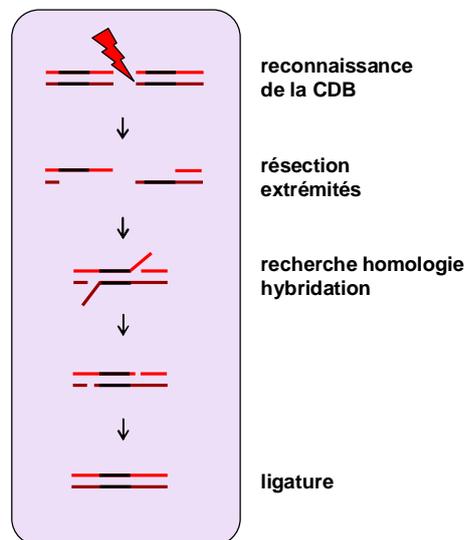


Figure 1.8 : Voie de réparation des CDB par SSA (d'après (Agarwal et al, 2006))

1.2 Réponses aux CDB

1.2.1 Les cassures double brin

Parmi les lésions de l'ADN, les CDB sont considérés comme les plus dangereuses et les plus létales. Si elles ne sont pas réparées, il peut en résulter la cassure de chromosomes, la perte de matériel génétique, des altérations génomiques ou la mort de la cellule (Aylon & Kupiec, 2004). Leur réparation erronée peut induire des délétions, des translocations, la perte de matériel génétique. Cette instabilité génomique peut aboutir à la

mort de la cellule ou à sa transformation conduisant à un possible développement de cancer (Cann & Hicks, 2007). Les CDB sont oncogènes mais paradoxalement elles représentent un moyen efficace de combattre les cancers lorsqu'elles ciblent des cellules cancéreuses. En effet, beaucoup de traitements anticancéreux (médicaments anticancéreux et irradiation) agissent en induisant de manière directe ou indirecte une multitude de CDB dans les cellules cancéreuses conduisant à leur élimination (Helleday et al, 2008).

Des facteurs exogènes mais également endogènes induisent des CDB. Elles résultent d'agressions exogènes par interaction directe avec un agent génotoxique tels que les irradiations ionisantes ou des agents radiomimétiques. En effet la collision de particules radioactives avec l'ADN génère différents types de dommages y compris des CSB, des modifications de bases et du squelette phosphate, des CDB (Bonner et al, 2008). Des facteurs endogènes qui provoquent des CDB sont les espèces réactives d'oxygène, les radicaux libres ou la réparation défectueuse. Les espèces réactives d'oxygène générées par le métabolisme de la cellule induisent essentiellement des dommages au niveau des bases de l'ADN. Des CDB sont rarement induits directement par les espèces réactives d'oxygène. Cependant elles peuvent apparaître spontanément lorsque deux CSB sont très proches (Jeggo & Lobrich, 2007), lors d'erreurs dans la réparation d'autres types de dommages de l'ADN ou la réplication. Les CDB sont vraisemblablement le dommage final induit par une grande variété d'agents endommageant l'ADN (Bonner et al., 2008; Jeggo and Lobrich, 2007)

Des processus métaboliques tels que la réplication ou des processus biologiques programmés génèrent également des CDB. Le ralentissement ou l'arrêt des fourches de réplication induits par des médicaments anticancéreux tels que le melphalan et la cisplatine, produisent également des CDB (Bonner et al., 2008). Des CDB sont générées aussi de façon programmé dans les cellules pendant le développement du système immunitaire et la méiose (Richardson et al, 2004; Soulas-Sprauel et al, 2007).

Les cellules répondent aux CDB en activant plusieurs voies de signalisation pour réparer l'ADN, arrêter la progression du cycle cellulaire et si cela est nécessaire induire la mort cellulaire programmée. La voie de réparation et d'activation de checkpoints du cycle cellulaire peuvent coopérer entre elles par des facteurs protéiques impliqués dans les deux voies.

1.2.2 Reconnaissance des CDB

Les CDB sont reconnues par le complexe MRN composé des protéines Nbs1, Mre11 et Rad50 (Iijima et al, 2008) en association avec la protéine CtIP. Le complexe MRN séquestre les deux extrémités cassées de l'ADN et prévient ainsi leur séparation. MRN recrute la sérine kinase ATM appartenant à la famille PIKK (phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases) sur le site de dommage via son interaction avec Nbs1 (Lee & Paull, 2005). En absence de CDB ATM se trouve sous forme de dimères et est inactive. Lorsque ATM est recrutée sur un site de CDB, l'interaction avec Nbs1 permet son activation et son autophosphorylation sur la sérine 1981. Cette autophosphorylation est responsable de la dissociation des dimères et de la libération de monomères actives (Bakkenist & Kastan, 2003). Une fois ATM activée, elle phosphoryle Nbs1 et de son côté le complexe MRN augmente l'activité de la kinase et contribue au recrutement de substrats spécifiques de ATM (Cann & Hicks, 2007; Lee & Paull, 2007). Parmi les substrats de ATM, un certain nombre de protéines sont impliquées dans la réparation des CDB par RH telles que BRCA1, protéine souvent mutée dans le cancer du sein, et la kinase c-Abl qui phosphoryle Rad51, protéine centrale de la réparation de CDB par RH.

Une autre kinase de la famille PIKK, ATR est activée en cas de différents dommages de l'ADN y compris des CDB. Cette kinase est recrutée et activée avec l'aide de la protéine ATRIP sur les extrémités simple brin recouvertes de RPA (Cimprich & Cortez, 2008). ATM active en coopération avec ATR et DNA-PK, kinase impliquée dans la réparation de CDB par NHEJ, phosphorylent l'histone H2AX (noté alors γ H2AX). Cette phosphorylation s'étend sur plusieurs mégabases dans les cellules eucaryotes (Hoeijmakers, 2001; Williams et al, 2007) et est considérée comme marqueur de CDB de l'ADN. γ H2AX permet le recrutement d'un grand nombre de protéines impliquées dans la réponse aux CDB et ces protéines forment des complexes subnucléaires observables sous microscope appelés foci (Cann & Hicks, 2007).

1.2.3 Activation de checkpoints du cycle cellulaire

Afin de donner suffisamment de temps à la cellule pour réparer les CDB et d'éviter leur propagation pendant la réplication et la mitose, des checkpoints sont activés et arrêtent temporairement le cycle cellulaire (Sancar et al, 2004) (fig. 1.9).

Dans les cellules ayant subi des dommages de l'ADN pendant la phase G1, le checkpoint G1/S est activé dans les minutes qui suivent l'apparition d'une CDB. Ce checkpoint repose sur des modifications post-traductionnelles de protéines (Sancar et al, 2004). Les Ser/Thr kinases ATM et ATR activent Chk2 et Chk1 par phosphorylation. Chk1 et Chk2 phosphorylent la phosphatase Cdc25A qui est ainsi marquée pour ubiquitination et protéolyse. Ceci assure le maintien de l'inhibition du complexe Cdk2/Cyclin E et le blocage de la transition G1/S. Cette voie est p53 indépendante (Nyberg et al, 2002; Schmitt et al, 2007).

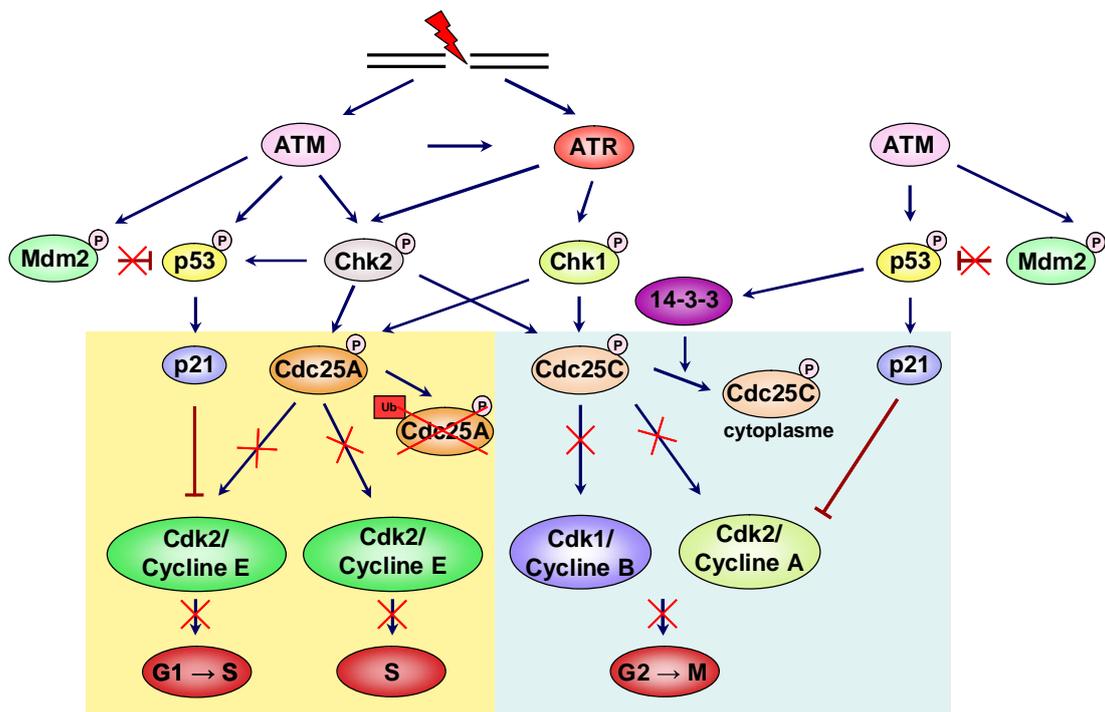


Figure 1.9 : Régulation des checkpoints G1/S, intra-S et G2/M du cycle cellulaire après CDB de l'ADN

Un deuxième mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 nécessite quelques heures pour s'activer et s'effectue au niveau transcriptionnel. Ce mécanisme implique la voie ATM-p53-p21-Cdk2. Les kinases ATM et Chk2 phosphorylent et stabilisent p53 qui est libéré de son régulateur négatif Mdm2. ATM peut également phosphoryler Mdm2 directement ce qui inhibe son interaction avec p53. p53 actif peut alors induire la transcription de gènes cibles dont p21 qui inhibe le complexe Cdk2/Cycline E. Ceci aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire. Le blocage dépendant de p53 maintient l'arrêt provoqué par Cdc25A pour assurer à la cellule suffisamment de temps pour la réparation (Nyberg et al, 2002).

La progression en phase S est également régulée par Cdk2/Cycline E. La phosphorylation de la phosphatase Cdc25A par Chk2 et Chk1 activés par ATM et ATR bloque l'activation de Cdk2/Cycline E et active ainsi le checkpoint intra-S. Ce checkpoint ralentit la progression du cycle cellulaire pendant la phase S ce qui se manifeste par une diminution de la synthèse de l'ADN (Cann & Hicks, 2007; Schmitt et al, 2007)

Le checkpoint G2/M qui régule l'entrée en mitose dépend également de l'activation des kinases Chk2 et Chk1 par ATM et ATR. En cas de dommage de l'ADN, ces checkpoints kinases phosphorylent la phosphatase Cdc25C qui est ainsi séquestrée dans le cytoplasme et ne peut pas activer Cdk1/Cycline B nécessaire à la progression du cycle cellulaire. Un rôle de p53 dans ce checkpoint a également été proposé mais il est controversé par le fait que des cellules déficientes en p53 retiennent leur capacité d'arrêter le cycle cellulaire en phase G2/M. Comme dans le checkpoint G1/S, p53 est stabilisé par phosphorylation par Chk1 ainsi que par l'inactivation de Mdm2 par ATM. p53 peut ainsi stimuler la transcription de p21 et les protéines 14-3-3. p21 inhibe le complexe Cdk2/Cyclin A, alors que 14-3-3 se lie à Cdk1/Cyclin B et à Cdc25C et les séquestre dans le cytoplasme. Le cycle cellulaire est alors arrêté en phase G2/M (Cann & Hicks, 2007; Schmitt et al, 2007).

1.2.4 Choix de la voie de réparation

Dans les cellules eucaryotes plusieurs voies existent pour la réparation des CDB : la recombinaison homologue (RH), la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et l'hybridation du simple brin (SSA). Afin d'assurer une réparation la plus fidèle possible des CDB, la voie de réparation la plus appropriée doit être utilisée. Le choix de la voie de réparation dépend non seulement des caractéristiques de la cassure mais également de la phase de cycle cellulaire pendant laquelle se produit la lésion, ainsi que de la présence et la disponibilité des facteurs nécessaires à chaque voie. Les facteurs influençant le choix de la voie de réparation en fonction du cycle cellulaire sont représentés sur la figure 1.10.

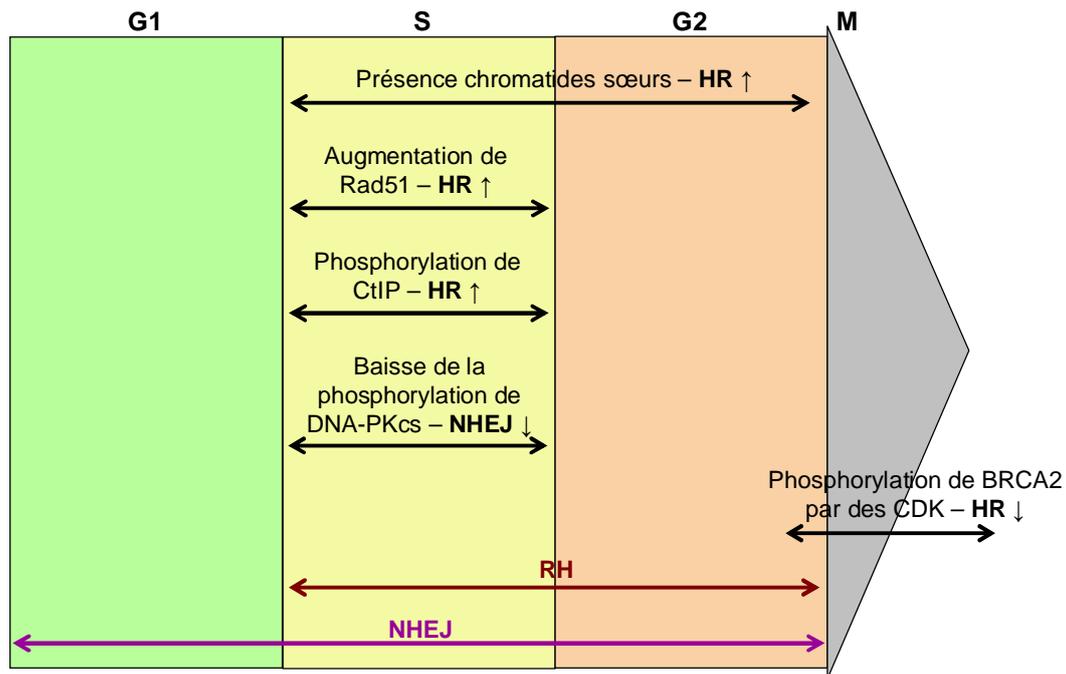


Figure 1.10 : Choix de la voie de réparation des CDB en fonction du cycle cellulaire.

La voie de réparation par RH est utilisée préférentiellement en phases S et G2 du cycle cellulaire. En phase S la RH utilise préférentiellement la chromatide sœur comme matrice pour la réparation du fait de sa proximité et de la cohésion structurale avec la chromatide cassée. Les deux chromatides sœurs étant identiques, la réparation est fidèle même dans le cas où un crossing-over se produit (Delacote & Lopez, 2008). Le niveau d'expression de Rad51 est également augmenté pendant la phase S (Chen et al, 1997). De plus la phosphorylation de DNA-PKcs nécessaire pour le processus de NHEJ est réduit dans des cellules irradiées en phase S. Ceci pourrait être un mécanisme de régulation négative de la NHEJ en phase S (Shrivastav et al, 2008).

La voie NHEJ est fonctionnelle pendant tout le cycle cellulaire mais est plus utilisée pendant les phases G0/G1. En phase G1 les CDB résultent de facteurs exogènes et non de stress de réplication. Pendant cette phase les chromatides sœurs ne sont pas présentes. L'utilisation de la voie de RH n'est pas adaptée car des séquences homologues ectopiques seront utilisées comme matrice ce qui aboutirait à des altérations génomiques. La réparation par NHEJ est donc plus adaptée pendant cette phase du cycle cellulaire. La majeure partie du génome étant non codant, l'utilisation de cette voie ne devrait que peu affecter la stabilité génomique (Delacote & Lopez, 2008). La voie de NHEJ reste cependant active pendant les

phases S et G2, ce qui montre qu'il existe une compétition entre ces deux voies même lorsque les chromosomes homologues sont présents (Shrivastav et al., 2008). BRCA2, protéine nécessaire pour le transport de Rad51 au niveau de la cassure et pour la formation du filament nucléoprotéique avec l'ADN, est phosphorylée avant l'entrée en mitose. Cette phosphorylation du domaine C-terminal de BRCA2 inhibe son interaction avec Rad51 et inhibe ainsi la RH, ce qui favorise la voie NHEJ (Esashi et al, 2005; Esashi et al, 2007).

Le choix de la voie de réparation dépendrait également du degré de résection des extrémités de la CDB. En cas de résection et de génération d'extrémités 3'-sortantes, la CDB est réparée par RH ou SSA (Takeda et al, 2007). Rad52 peut orienter la réparation vers la RH ou la SSA en fonction de la disponibilité de Rad51 qui est le facteur limitant pour le processus de RH (Van Dyck et al, 1999). La résection des extrémités est favorisée par Cdk en phases S et G2 du cycle cellulaire (Ira et al, 2004). Des travaux récents ont montré l'implication de CtIP dans le contrôle de la résection des extrémités et dans le choix de la voie de réparation (Huertas & Jackson, 2009; Yun & Hiom, 2009). La phosphorylation de CtIP par Cdk est nécessaire pour son activité et pour son interaction avec BRCA1 qui assure son recrutement sur les sites de cassure. En phase G1, CtIP est non phosphorylé et sa phosphorylation se fait lorsque la cellule rentre en phase S du cycle cellulaire. La résection et donc la RH seraient ainsi favorisées en phases S/G2, alors qu'en absence de résection la voie NHEJ serait utilisée (Huertas & Jackson, 2009; Yun & Hiom, 2009).

1.2.5 Activation de l'apoptose

En fonction de l'importance des dommages de l'ADN et le type cellulaire, la cellule peut être amenée à mourir par apoptose au lieu de tenter de réparer le dommage. La voie apoptotique est initiée par ATM qui active p53 et inhibe Mdm2 (fig. 1.11). Ceci induit l'activation de la transcription ou l'inhibition de protéines de la famille Bcl2. Cette famille de régulateurs de l'apoptose comprend des protéines anti-apoptotiques ainsi que des protéines pro-apoptotiques. La plupart de ces protéines exercent leur activité régulatrice de l'apoptose en régulant la perméabilité de la membrane mitochondriale. L'espace intermembranaire des mitochondries contient des facteurs apoptogéniques dont la libération dans le cytosol induit l'apoptose de la cellule. De multiples stimuli induisant l'apoptose convergent vers la mitochondrie qui constitue un "centre de contrôle" de la survie ou la mort de la cellule par le choix de la libération des facteurs apoptogéniques.

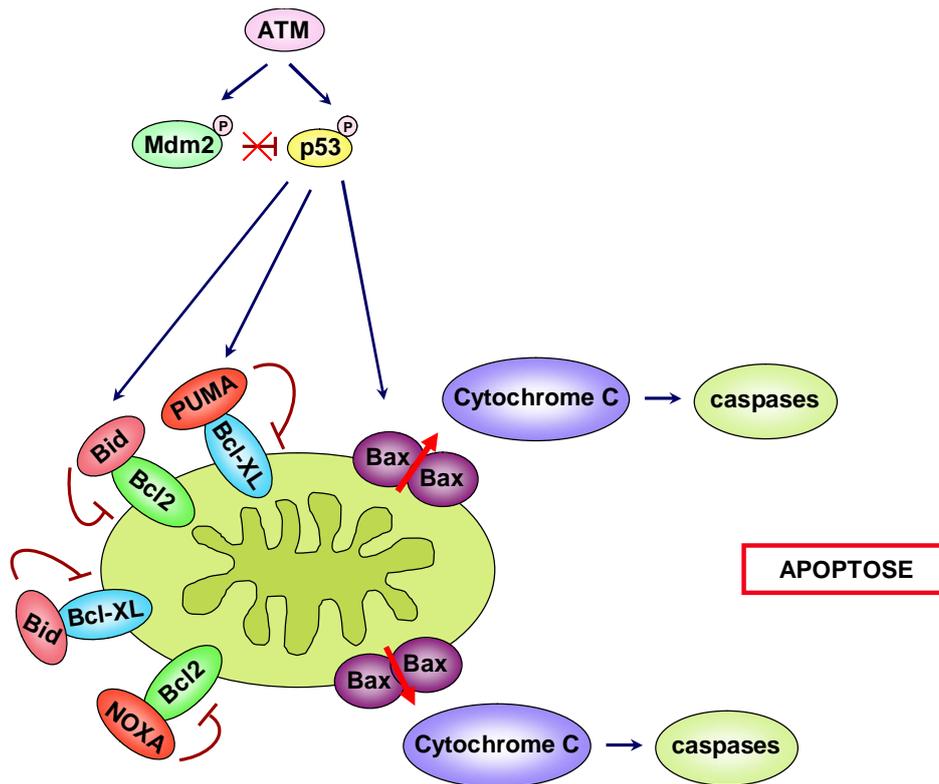


Figure 1.11 : Induction de l'apoptose suite à des lésions irréparables de l'ADN

Lorsque les dommages de l'ADN sont irréparables, p53 activé par ATM augmente la transcription de protéines telles que Bid, PUMA et NOXA qui vont inhiber les protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-XL situées au niveau de la membrane mitochondriale. p53 stimule également la transcription de Bax qui forme des canaux dans la membrane mitochondriale. Ceci provoque la perte du potentiel membranaire mitochondrial, la libération de cytochrome *c* ainsi que d'autres facteurs apoptotiques qui activent la voie des caspases. Ces processus provoquent l'induction de l'apoptose (Cann & Hicks, 2007; Schmitt et al, 2007). Les protéines Bcl-2, Bcl-XL, Bax et Bid inhibent la RH indépendamment de l'apoptose (Dumay et al, 2006; Saintigny et al, 2001b). De plus, Rad51 et DNA-PK, protéines majeures des deux voies de réparation de CDB, sont clivées par des caspases ce qui empêche la réparation de l'ADN et oriente la cellule vers l'apoptose (Huang et al., 1999).

1.2.6 Maladies liées à une recombinaison défectueuse

L'importance de la réparation des CDB est démontrée par les syndromes provoqués par des défauts dans les processus de réparation de l'ADN. Les mutations dans les gènes de réparation provoquent une instabilité génomique et une réparation défectueuse de l'ADN qui induisent une hypersensibilité aux agents endommageant l'ADN et un risque accru de développement de cancer. Quelques exemples de maladies liées à des mutations dans des gènes impliqués dans la RH sont présentés dans le tableau 1.1.

Gène	Défaut	Syndrome héréditaire	Cancer
ATM	CDB	Ataxia-telangiectasia	lymphome, leucémie, sein
BRCA1	RH	Cancer du sein familial 1	sein, ovaire, prostate, colon
BRCA2	RH	Cancer du sein familial 2	sein, ovaire, prostate, pancréas
Nbs1	CDB	Nijmegen breakage syndrome	Lymphome
Mre11	RH	Ataxia-telangiectasia-like disorder	pas connu
Blm	RH	Bloom	Différents
Wrn	RH	Werner	Progéria

Tableau 1.1 : Défauts, syndromes et types de cancer induits par des mutations dans les gènes impliqués dans la réparation de CDB par RH.

La mutation de la kinase ATM provoque le syndrome ataxia-telangiectasia (AT), maladie autosomale récessive caractérisée par une ataxie (trouble de coordination) cérébelleuse, des troubles oculomoteurs, une déficience immunitaire, des télangiectasies (dilatation vasculaire anormale), un vieillissement accéléré, des désordres neurologiques et une susceptibilité élevée au développement de cancer (Shiloh, 2003). Les cellules dérivées de ces patients présentent une hypersensibilité aux irradiations, des checkpoints du cycle cellulaire défectueux et une instabilité chromosomique (Reliene et al, 2007).

Des mutations dans les gènes de BRCA1 et BRCA2 prédisposent au cancer du sein, des ovaires, et autres et sont responsables des cas familiaux de ces cancers.

La mutation de Nbs provoque le syndrome de Nijmegen caractérisé par une microcéphalie, associé à un retard mental, un retard dans la croissance, un déficit immunitaire et une prédisposition au cancer (Iijima et al, 2004).

Le syndrome Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD) est très rare et les patients présentent des symptômes semblable à ceux des patients atteints du syndrome AT, notamment l'ataxie cérébelleuse mais sans télangiectasies. Étant donné la rareté de ce syndrome, on ne connaît pas si il y a une prédisposition au développement de cancer. Le syndrome ATLD est dû à la mutation du gène de la protéine Mre11 (Taylor et al, 2004).

Le syndrome de Bloom est provoqué par une mutation dans le gène de l'hélicase Blm. Cette protéine interagit avec Rad51 et intervient dans l'étape postsynaptique de la RH pour faciliter l'élimination des jonctions de Holliday. Le syndrome de Bloom est caractérisé par un retard dans la croissance, une photosensibilité, un déficit immunitaire et le développement de différents cancers (Reliene et al., 2007).

Les patients souffrant du syndrome de Werner dû à des mutations de l'hélicase Wrn, présentent un vieillissement prématuré associé à une susceptibilité élevée au développement de cancer. La protéine Wrn a un rôle dans la résolution des intermédiaires de la RH (Reliene et al., 2007).

2 La protéine Rad51

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, les étapes centrales de la RH sont réalisées par la recombinaise Rad51 qui catalyse la recherche d'une séquence homologue et l'échange de brin. Cette protéine est essentielle pour la prolifération et la survie des cellules des vertébrés. Le rôle indispensable de Rad51 est démontré par des expériences d'inactivation du gène *rad51* dans des souris et dans des cellules de poulet. Deux études indépendantes montrent l'impossibilité d'établir des souris déficientes pour Rad51. Les souris dans lesquelles le gène *rad51* a été invalidé meurent pendant les stades initiaux du développement embryonnaire. Les cellules de ces embryons montrent des anomalies cytologiques et une prolifération cellulaire ralentie. L'établissement de lignées cellulaires stables déficientes en *rad51* à partir de ces embryons a été impossible (Lim & Hastay, 1996; Tsuzuki et al, 1996). Sonoda et collaborateurs ont établi une lignée cellulaire DT40 de poulet dans laquelle le gène *rad51* est contrôlé par un promoteur répressible. L'inhibition de l'expression de Rad51 dans ces cellules aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M suivi de leur mort. Les cellules présentent des taux élevés de cassures de chromosomes (Sonoda et al, 1998). Cette étude montre l'importance de Rad51 non seulement dans la prolifération cellulaire mais aussi dans le maintien de l'intégrité du génome. Lambert et Lopez ont cependant caractérisé des formes dominantes négatives de Rad51 qui n'affectent pas la viabilité ou la prolifération cellulaire (Lambert & Lopez, 2000).

2.1 Structure

Rad51, homologue eucaryote de la protéine RecA d'*E. coli*, est la protéine centrale du processus de RH. La Rad51 humaine (HsRad51) est une protéine de 339 acides aminés et 37 kDa (Benson et al, 1994; Shinohara et al, 1993; Yoshimura et al, 1993). Cette protéine possède un long domaine N-terminal, un domaine central appelé "core" et un court domaine C-terminal (Shinohara et al, 1993). Le domaine central possède deux motifs de liaison de nucléotides, appelés Walker A et B, qui lient et hydrolysent l'ATP (Kawabata et al, 2005). Un motif de polymérisation qui assure le contact entre les monomères de Rad51 pour la formation du filament se situe au niveau du linker entre le domaine N-terminal et le domaine central. Ce motif de polymérisation interagit avec les motifs BRC de BRCA2 (Pellegrini et al, 2002). Deux boucles flexibles L1 et L2 sont situées au niveau du domaine central et seraient

impliquées dans l'interaction avec l'ADN. L'ADN interagit également avec le domaine N-terminal de la protéine (Aihara et al, 1999; Matsuo et al, 2006; Prasad et al, 2006).

2.2 Activités biochimiques

La protéine Rad51 catalyse les réactions de recherche d'homologie et d'échange de brin du processus de RH (Baumann et al, 1996; West, 2003). Cette protéine possède une activité ATP-ase qui est activée par sa liaison à l'ADN avec lequel Rad51 forme des filaments nucléoprotéiques hélicoïdaux droits. Rad51 peut lier l'ADNsb ainsi que l'ADNdb (Baumann & West, 1998; Benson et al, 1994). L'affinité pour l'ADNdb semble supérieure à celle pour l'ADNsb (Mazin et al, 2000) ce qui est surmonté *in vivo* grâce aux protéines partenaires telles que BRCA2 et Rad54 qui assurent le recrutement de Rad51 au niveau de la CDB. Cependant, dans une étude récente Miné et collaborateurs ont montré que Rad51 se polymérise plus rapidement sur l'ADNsb que sur l'ADNdb mais que la vitesse de dépolymérisation est également beaucoup plus rapide (Mine et al, 2007). Cette dépolymérisation plus rapide serait responsable de la meilleure affinité apparente pour l'ADNdb.

Lorsque Rad51 se lie à l'ADN, elle l'étire, ce qui est corrélé avec une activité d'échange de brin. La présence d'un cofacteur nucléotidique tel que l'ATP n'est pas nécessaire pour la formation des filaments de Rad51 sur l'ADN. Toutefois en absence de cofacteur le filament est inactif et condensé et la présence d'un cofacteur est nécessaire pour la formation d'un filament actif étiré (Chi et al, 2006). L'hydrolyse de l'ATP par Rad51 est relativement rapide et la dissociation de l'ADP lente. Le filament Rad51-ATP-ADNsb actif est donc rapidement converti en filament Rad51-ADP-ADNsb inactif. Les ions Ca^{2+} jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de Rad51. Ca^{2+} ralentit la vitesse d'hydrolyse de l'ATP ce qui permet de préserver le nucléofilament actif. Les ions Ca^{2+} stimulent ainsi l'activité d'échange de brin de Rad51 (Bugreev & Mazin, 2004). Bien que l'hydrolyse de l'ATP ne soit pas nécessaire à la formation du nucléofilament, elle est indispensable à l'étape de dissociation de Rad51, ce qui permet la restauration de la protéine. Ceci assurerait une disponibilité maximale de la protéine dans la cellule pour la réparation de CDB (Chi et al, 2006).

2.3 Expression

La protéine Rad51 est exprimée dans toutes les cellules, cependant son taux d'expression est plus important dans les cellules en prolifération ou les cellules présentant une recombinaison élevée, telles que les cellules du thymus, de la rate, de l'intestin, des testicules et des ovaires (Morita et al, 1993; Shinohara et al, 1993) . L'irradiation ionisante ne semble pas influencer le niveau d'expression de Rad51 (Chen et al., 1997).

Le niveau d'expression de la protéine Rad51 est régulé durant le cycle cellulaire avec un niveau d'expression minimal en phases G0/G1, et un niveau maximal en phase S (Chen et al., 1997; Flygare et al., 1996; Yamamoto et al., 1996). La RH est facilitée pendant les phases d'expression maximale de Rad51 par la présence et l'association étroite des chromatides sœurs. Ceci contribue à la fidélité de réparation en évitant la RH avec des séquences ectopiques présentes sur d'autres chromosomes qui peut conduire à des réarrangements génomiques. Saintigny et collaborateurs ont cependant observé un niveau d'expression constant de Rad51 durant tout le cycle cellulaire dans des cellules irradiées (Saintigny et al, 2007).

2.4 Localisation intra-cellulaire

La protéine Rad51 a une localisation nucléoplasmique, elle est quasi absente du cytoplasme et du nucléole (Haaf et al., 1995). En absence de dommage de l'ADN, Rad51 se trouve en état diffus dans le nucléoplasme et un petit nombre de cellules présentent des foci de Rad51. Ces foci sont spécifiques de la phase S du cycle cellulaire, ce qui est en corrélation avec l'expression plus élevée de la protéine durant cette phase (Tashiro et al, 1996). Lorsque des dommages de l'ADN sont induits par différents traitements génotoxiques, des foci de Rad51 sont détectés dans les minutes qui suivent le traitement (fig. 1.12). Ces foci sont localisés au niveau de l'ADNsb qui résulte de la digestion des extrémités de la cassure (Raderschall et al, 1999). Leur formation n'est pas due à la synthèse de nouvelles molécules de Rad51 mais à leur relocalisation (Haaf et al, 1995). Le nombre de foci de Rad51 est maximal en phase S du cycle cellulaire (Kobayashi et al, 2008). Un certain nombre d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que ATM (Kobayashi et al, 2008), RPA (Raderschall et al, 1999), BRCA1 et BRCA2 (Chen et al, 1999c), Rad52 (Essers et al, 2002; Liu & Maizels, 2000; Raderschall et al, 1999), Rad54 (Essers et al, 2002) sont

co-localisées avec Rad51 dans les foci. Leur recrutement se fait avec des cinétiques différentes, ce qui montre que l'assemblage des foci est un processus séquentiel et que le recrutement d'une protéine dépend de celle d'une autre (West, 2003).

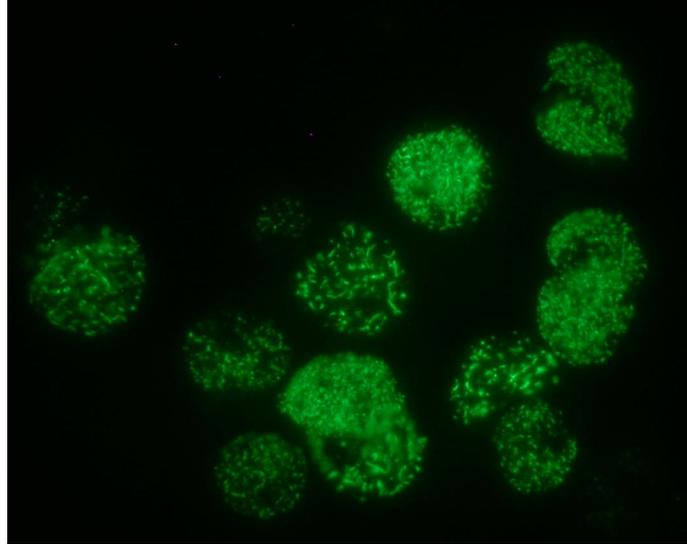


Figure 1.12 : Foci nucléaires de Rad51 suite à un traitement avec MMC de cellules SW480

2.5 Interactions protéiques

Rad51 interagit avec différentes protéines impliquées dans la RH. Ces interactions vont moduler son activité, sa localisation cellulaire et vont assurer son recrutement au niveau des CDB ou sa dégradation.

La protéine Rad54 facilite la dissociation de Rad51 de l'ADN et son renouvellement. BRCA2 permet la localisation de la protéine au niveau de la CDB et régule sa polymérisation, alors que p53 est impliqué dans l'inhibition de sa transcription, ainsi que de son activité. L'interaction de Rad51 avec les protéines BRCA et p53 sera exposée plus en détail ci-dessous.

2.5.1 Les protéines BRCA

Les mutations des protéines BRCA1 et BRCA2 sont très souvent associées au cancer et elles prédisposent au cancer du sein et/ou des ovaires (Miki et al, 1994; Welsh & King, 2001; Wooster et al, 1995). Une copie défectueuse de BRCA1 ou BRCA2 dans le génome est suffisante pour conférer une prédisposition au cancer et la perte du deuxième allèle est

souvent observé chez les patients prédisposés (West, 2003). Les femmes portant des mutations héréditaires dans les gènes de BRCA1 et BRCA2 et une incidence familiale de cancer de sein ou des ovaires, ont un risque de 50 à 85% de développer un tel cancer (Shamoo, 2003).

Les protéines BRCA1 et BRCA2 sont nécessaires pour le maintien de la stabilité génomique par le maintien d'un niveau adéquat de RH et de réparation de CDB (Moynahan et al, 1999; Moynahan et al, 2001a; Moynahan et al, 2001b). Les cellules déficientes pour ces deux protéines montrent des réarrangements génomiques et des cassures de chromosomes (Xu et al, 1999; Yu et al, 2000). Les cellules déficientes en BRCA2 présentent une hypersensibilité aux facteurs endommageant l'ADN telles que les irradiations ionisantes. BRCA1 et BRCA2 participent également dans beaucoup d'autres processus cellulaires tels que le contrôle du cycle cellulaire, le remodelage de la chromatine, la transcription, l'apoptose et forment des complexes avec d'autres protéines (West, 2003).

2.5.1.1 BRCA1

80% des individus portant des mutations dans le gène de BRCA1 développent un cancer du sein et/ou des ovaires. La mutation du gène *brca1* sur un allèle est trouvée dans environ 10% des cas sporadiques de cancer du sein et dans pratiquement tous les cas familiaux (Durant & Nickoloff, 2005). De plus la mauvaise localisation de la protéine sauvage qui ne porte pas de mutations est trouvée dans de nombreux cas de cancer de sein sporadique. L'implication de la protéine BRCA1 dans le processus de RH est démontrée par plusieurs études. Les cellules déficientes en BRCA1 montrent une hypersensibilité à différents agents de pontage de l'ADN. De plus la déficience en BRCA1 réduit de cinq fois la RH liée à des CDB (Moynahan et al, 2001a; Sgagias et al, 2004). La protéine BRCA1 est colocalisée avec Rad51 dans les foci nucléaires de cellules mitotiques (Scully et al, 1997). L'interaction entre ces deux protéines n'est pas directe mais se fait par l'intermédiaire de la protéine BRCA2 qui est également localisée dans ces foci. Le complexe formé par l'association de Rad51 avec BRCA1 et BRCA2 contient d'autres facteurs protéiques et est appelé BRCC (BRCA1 BRCA2 Containing Complex). Ce complexe possède une activité E3 ubiquitine ligase qui est impliquée dans la régulation de facteurs de la réparation de l'ADN (Dong et al, 2003).

BRCA1 fait partie également d'un complexe appelé BASC (BRCA1 Associated Genome Surveillance Complex) qui inclut des suppresseurs de tumeurs, des protéines de détection et de signalisation de dommages de l'ADN, tels que le complexe MRN et la kinase ATM, des protéines de réparation des mésappariements. Ce complexe aurait un rôle de détection et de signalisation des dommages de l'ADN (Wang et al, 2000). BRCA1 peut également lier directement des structures d'ADN à trois branches (Paull et al, 2001).

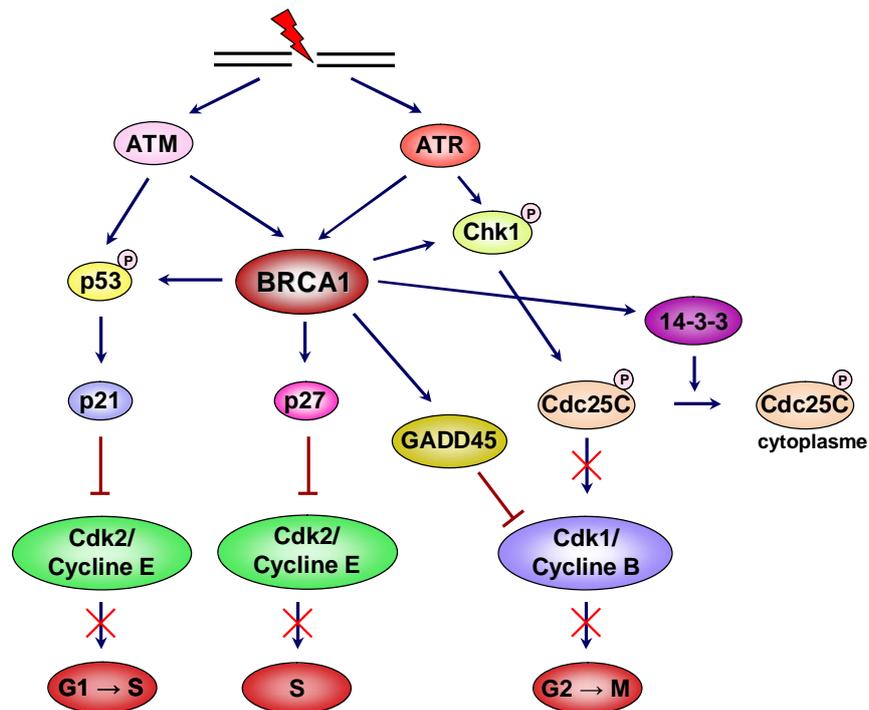


Figure 1.13 : Régulation du cycle cellulaire par BRCA1.

BRCA1 joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire en cas de dommage de l'ADN. Cette protéine est activée par phosphorylation par les kinases ATM et ATR. Ces phosphorylations sont nécessaires à l'activation des checkpoints G1/S, intra-S et G2/M (Gudmundsdottir & Ashworth, 2006). Lorsqu'un dommage apparaît en phase G1, BRCA1 activée stimule la transcription de p21 via p53 (fig. 1.13). L'accumulation de p21 assure l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S. BRCA1 est aussi nécessaire pour la phosphorylation de Chk2 et de p53 par ATM/ATR (Fabbro et al, 2004; Foray et al, 2003; Somasundaram et al, 1997; Zhang et al, 1998). L'activation du checkpoint en phase S suite à des irradiations ionisantes est assurée par p27 dont la transcription est stimulée par BRCA1 (Williamson et al., 2002; Xu et al., 2002). La régulation du checkpoint G2/M par BRCA1 se fait à plusieurs niveaux. BRCA1 est nécessaire à l'activation de Chk1 qui inhibe la phosphatase Cdc25C. La

kinase Cdk1 reste phosphorylée, le complexe Cdk1/Cycline B reste inactif et ne peut pas initier la mitose. BRCA1 stimule également l'expression de protéines qui inhibent Cdc25C telle que 14-3-3 ou le complexe Cdk1/Cycline B telle que GADD45 (Gudmundsdottir & Ashworth, 2006; Mullan et al, 2001; Yarden et al, 2002).

BRCA1 peut également être phosphorylée par Chk2, qui est activée par ATM en réponse à des irradiations ionisantes (Lee et al, 2000). Cette phosphorylation serait importante pour favoriser la réparation de CDB par RH et par NHEJ fidèle et pour inhiber la voie non-précise de NHEJ (Wang et al, 2006; Zhang et al, 2004; Zhuang et al, 2006) par l'inhibition du complexe MRN et de l'activité nucléolytique de Mre11. Ceci empêcherait la résection des extrémités de la CDB et inhiberait ainsi la réparation par NHEJ non précis (Durant and Nickoloff, 2005; Paull et al., 2001).

2.5.1.2 BRCA2

Parmi les personnes qui développent un cancer du sein, 5 à 10% sont génétiquement prédisposées et 10 à 30% parmi ces cas ont été attribués à des mutations dans le gène *BRCA2*. Les porteurs de mutations dans ce gène ont un risque de 50% de développer un cancer avant l'âge de 50 ans et 80% avant l'âge de 70 ans (Thorslund & West, 2007).

Les premières indications de l'implication de la protéine BRCA2 dans la réparation de CDB par RH, provenaient du fait que cette protéine interagit et se co-localise avec Rad51 dans des foci nucléaires suite à des dommages de l'ADN. Par son interaction avec Rad51, BRCA2 favorise la stabilité génomique (Chen et al, 1998; Sharan et al, 1997). L'interaction entre Rad51 et BRCA2 est essentielle pour la fidélité de la RH et il a été montré que BRCA2 stimule l'activité d'échange de brin de Rad51 *in vitro* (Shivji et al, 2006). Dans sa partie centrale la protéine BRCA2 possède huit motifs BRC (fig. 1.14) (Bork et al, 1996) parmi lesquels les motifs BRC 1 à 4, 7 et 8 interagissent avec HsRad51 (Wong et al, 1997). Les mutations dans les motifs BRC sont associées avec une prédisposition au cancer. Un autre site de liaison à Rad51 se trouve dans la partie C-terminale de la protéine BRCA2 appelé TR2 (Esashi et al, 2005) . Cette région est hautement conservée dans les protéines BRCA2 des vertébrés et sa délétion dans les souris provoque une apparition élevée de tumeurs (Donoho et al, 2003; McAllister et al, 2002).

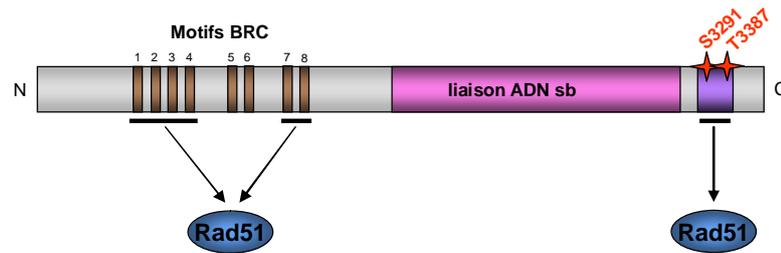


Figure 1.14 : Structure de la protéine BRCA2.

Les motifs BRC et la région C-terminale de BRCA2 ont des effets antagonistes sur Rad51. L'interaction entre Rad51 et les motifs BRC3 et BRC4 bloque la formation du filament nucléoprotéique sur l'ADN et dissocie les filaments formés (Davies et al, 2001). Pellegrini et collègues ont montré que le motif BRC4 mime la structure du domaine d'interaction du monomère suivant, ce qui empêche l'interaction entre les monomères de Rad51 et donc la formation du filament (Pellegrini et al, 2002). De plus *in vivo* la surexpression des motifs BRC inhibe la formation de foci de Rad51 après dommage de l'ADN (Chen et al, 1999a). Une étude de Galkin et collaborateur montre que le site de liaison du motif BRC3 serait différent de celui du motif BRC4 et se situerait au niveau du domaine N-terminal de Rad51. BRC3 interagirait avec le filament de Rad51 et le stabiliserait contrairement au motif BRC4 qui interagit avec les monomères et inhibe la formation du filament (Galkin et al, 2005). Ces données suggèrent que BRCA2 pourrait jouer un rôle dans la polymérisation et dans la dépolymérisation de Rad51.

Contrairement aux motifs BRC, le domaine C-terminal de BRCA2 stimule la RH médiée par Rad51 (Yang et al, 2002). Ce domaine est nécessaire pour le transport de Rad51 dans le noyau et au niveau des sites de dommages de l'ADN. En effet, BRCA2 possède dans son domaine C-terminal un site de localisation nucléaire (NLS) contrairement à Rad51 (Davies et al., 2001) et peut interagir de manière directe avec l'ADNsb (Yang et al., 2002). La région C-terminale de BRCA2 peut être phosphorylée sur la sérine 3291 par des CDK en fonction du cycle cellulaire. Cette phosphorylation empêche l'interaction entre cette région C-terminale et Rad51. La phosphorylation est minimale en phase G1 et augmente avec la progression de la cellule vers la mitose. La RH est active en phase S et les faibles taux de phosphorylation de la Ser3291 pendant cette phase sont importants pour la réparation de cassures induites lors de la réplication. La phosphorylation du domaine C-terminal de BRCA2 pendant la mitose prévient l'interaction avec Rad51 et pourrait être responsable de

l'inactivation de la RH. Cependant les dommages de l'ADN induits par irradiation diminuent le niveau de phosphorylation de BRCA2 et stimulent ainsi l'interaction avec Rad51 (Esashi et al., 2005). Le domaine C-terminal interagit uniquement avec les formes multimériques de Rad51 et ne peut pas lier les monomères. L'association du domaine C-terminal au filament le stabilise et prévient l'action déstabilisatrice des motifs BRC (Esashi et al, 2007).

Un autre site de phosphorylation se trouve dans la région C-terminale de BRCA2. La thréonine 3387 localisée dans un site putatif de localisation nucléaire, peut être phosphorylée par Chk1 et Chk2. Cette phosphorylation pourrait avoir un rôle dans la régulation de la localisation nucléaire de BRCA2 et régule la fixation de Rad51 au domaine C-terminal de BRCA2. La phosphorylation de BRCA2 par Chk1 et Chk2 pourrait être impliquée dans la libération de Rad51 du domaine C-terminal de BRCA2 (Bahassi et al, 2008).

Ces données suggèrent un modèle de régulation de Rad51 par BRCA2 selon lequel BRCA2 est impliqué à la fois dans la séquestration et la mobilisation de Rad51 (fig. 1.15). En absence de dommage de l'ADN, Rad51 serait inactivé par liaison aux motifs BRC de BRCA2. L'interaction entre les motifs BRC et Rad51 maintient Rad51 sous forme monomérique. Le domaine C-terminal de BRCA2 serait phosphorylé par des CDK, ce qui empêche son interaction avec Rad51. En cas de dommage de l'ADN, Rad51 est relocalisée sur le site de dommage par BRCA2 qui lie l'ADNsb. L'activité réduite des CDK conduit à une baisse de la phosphorylation sur serine du domaine C-terminal, ce qui permettrait son interaction avec Rad51 et la stabilisation des filaments nucléoprotéiques. En conséquence, la RH est activée pour réparer la CDB de l'ADN. Une baisse de phosphorylation de la sérine 3291 est également observée pendant la phase S et le début de la phase G2 du cycle cellulaire. Une fois la réparation terminée, les motifs BRC seraient importants pour le désassemblage du filament (Esashi et al., 2005; Esashi et al., 2007; Thorslund and West, 2007).

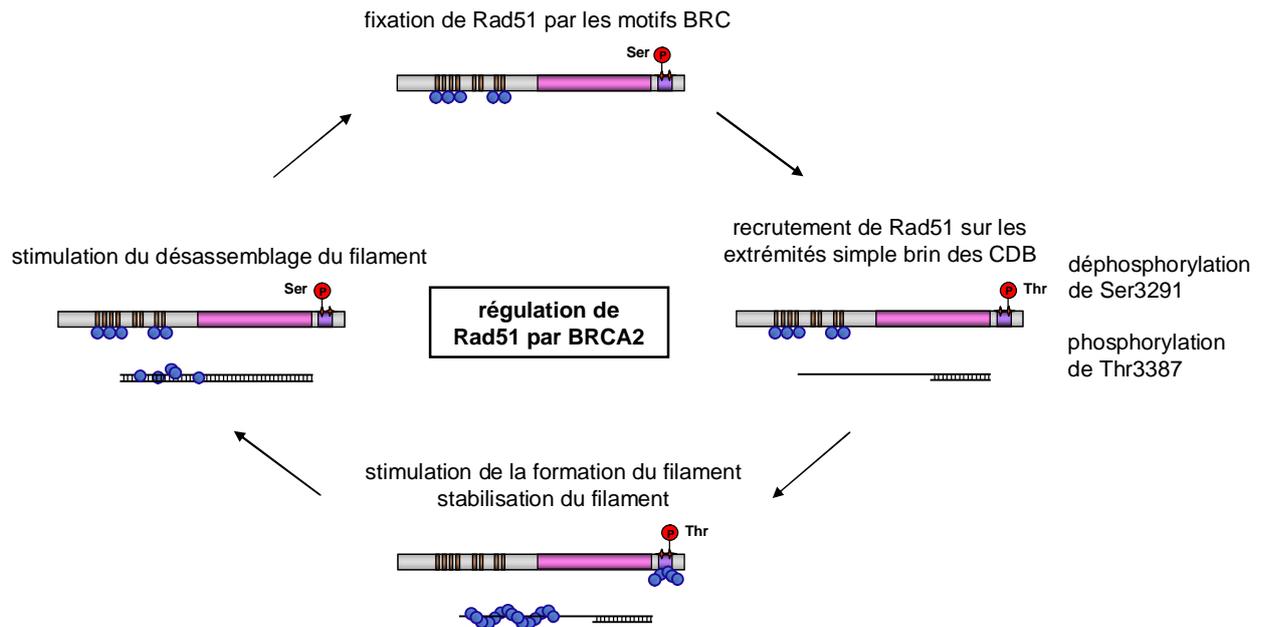


Figure 1.15 : Régulation de Rad51 par BRCA2 (d'après (Thorslund & West, 2007))

2.5.2 p53

p53 est un des gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains. Les mutations se situent le plus souvent au niveau du domaine de liaison à l'ADN, ce qui interfère avec les fonctions primaires de la protéine en tant que facteur de transcription qui active ou réprime un grand nombre de gènes (Hollstein et al, 1991; Zhao et al, 2000). p53 a un rôle primordial dans la réponse cellulaire à différents signaux de stress tels que l'hypoxie, la prolifération aberrante et les dommages de l'ADN. En cas de dommage de l'ADN la protéine Mdm2 qui inhibe et assure la protéolyse de p53 est dégradée. p53 subit également des modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations par ATM, c-Abl et Chk2 (Schmitt et al, 2007). Ainsi la protéine est stabilisée et activée et son niveau protéique augmente.

L'implication de p53 dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN est à la fois dépendante et indépendante de son activité transcriptionnelle. D'une part, p53 active la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la réponse apoptotique (Riley et al, 2008). D'autre part, p53 a un rôle direct dans le processus de réparation de l'ADN par son interaction avec la protéine Rad51 (Linke et al, 2003). p53 participe ainsi dans le choix entre la réparation du dommage et la survie de la cellule ou son

élimination par apoptose si les dommages sont excessifs et irréparables. Ceci permet de protéger l'organisme de cellules génétiquement instables qui peuvent déclencher un cancer (fig. 1.16).

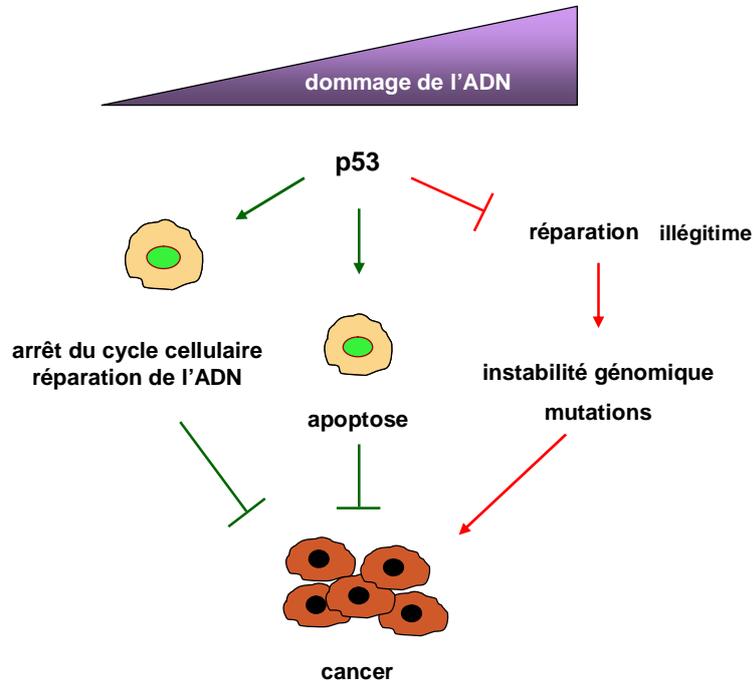


Figure 1.16 : Contrôle du devenir de la cellule par p53 en fonction de l'importance des dommages de l'ADN (Lazaro-Trueba et al, 2006).

L'activité transcriptionnelle de p53 est importante pour l'arrêt du cycle cellulaire et l'initiation de l'apoptose. En cas de dommage de l'ADN des checkpoints sont activés et la progression du cycle cellulaire est arrêté. Ceci permet à la cellule de réparer son ADN et évite la réplication de l'ADN endommagé. p53 assure l'arrêt en phase G1 par l'activation de la transcription de p21 qui inhibe le complexe Cdk2/Cycline E, comme décrit dans le chapitre "Activation des checkpoints du cycle cellulaire", page 19 (Schmitt et al, 2007). Indépendamment de son rôle dans la régulation du cycle cellulaire, p53 intervient dans la réparation des CDB par RH. p53 inhibe la transcription du gène de Rad51 par liaison sur son promoteur, ainsi que la formation de foci de Rad51 (fig. 1.17) (Arias-Lopez et al, 2006).

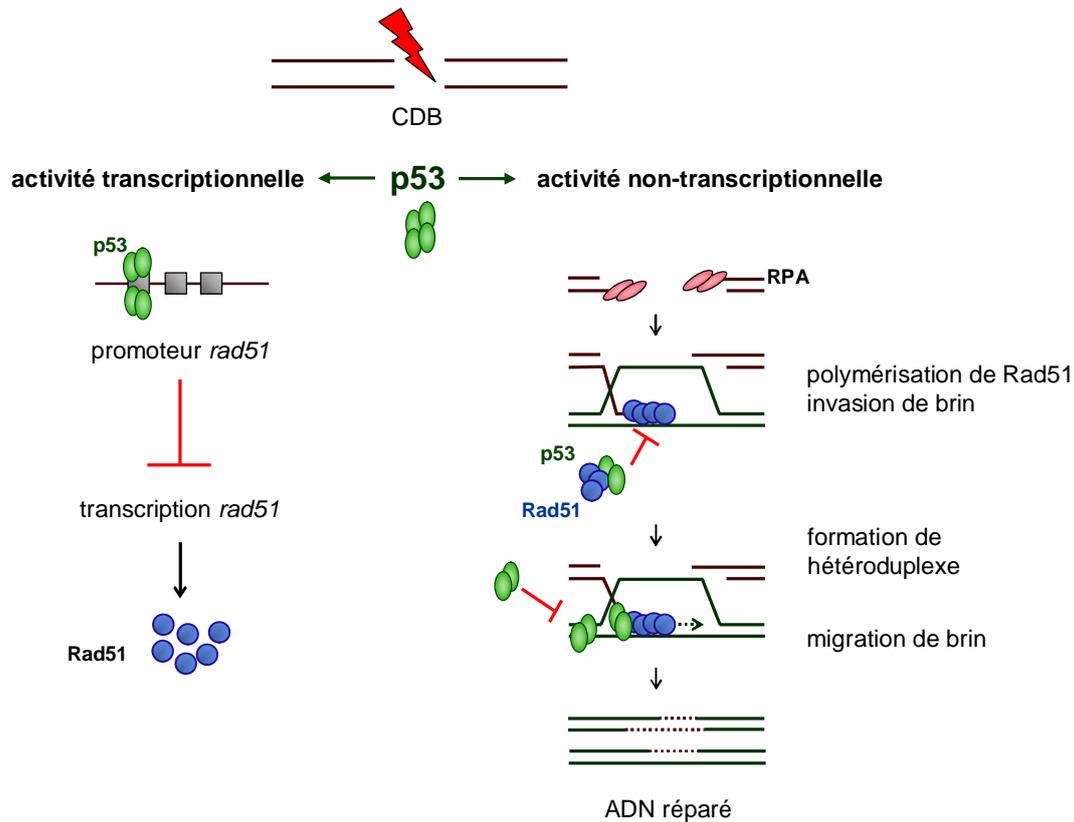


Figure 1.17 : Régulation transcriptionnelle et non-transcriptionnelle de la RH par p53 (Lazaro-Trueba et al, 2006).

Lorsque les dommages de l'ADN sont irréparables, p53 active la transcription de certaines protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2 telles que Bax et Bid et inhibe des protéines anti-apoptotiques telle que Bcl2. Ceci provoque la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération de facteurs apoptotiques (voir chapitre "Activation de l'apoptose", page 23). Ainsi p53 active des voies pro-apoptotiques et déclenche la mort cellulaire (Zhivotovsky & Kroemer, 2004).

Lors de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, p53 possède également des fonctions indépendantes de son activité transcriptionnelle (fig. 1.17). Cette protéine intervient directement dans les étapes précoces et tardives de la réparation de CDB de l'ADN par RH par son interaction avec l'ADN et avec des protéines de la RH. La protéine p53 sauvage inhibe la RH, alors que la forme inactive de p53 favorise la RH (Bertrand et al, 1997; Mekeel et al, 1997; Saintigny et al, 1999; Wiesmuller et al, 1996). p53 interagit de manière directe avec Rad51 et inhibe la formation du filament sur l'ADNsb, ce qui inhibe l'initiation de l'échange de brin (fig. 1.15) (Buchhop et al, 1997; Linke et al, 2003; Sturzbecher et al, 1996). Le site

d'interaction avec p53 se trouve dans le domaine central de Rad51 et comprend une région nécessaire à la polymérisation et à l'hydrolyse de l'ATP (Arias-Lopez et al, 2006). p53 interagit également directement avec l'ADN au cours des étapes précoces ou tardives de la RH et présente *in vitro* une activité 3'-5' exonucléase (Mummenbrauer et al, 1996). Cette protéine se fixe sur les hétéroduplexes formés par le brin envahissant avec le brin matrice et inhibe la RH si ces structures portent des mésappariements de bases (Dudenhoffer et al, 1998). Lors de la phase post-synaptique de la RH, p53 se fixe sur les jonctions de Holliday (Lee et al, 1997) et inhibe la migration de brin (Prabhu et al, 2002).

2.5.3 Les paralogues de HsRad51

Les paralogues de Rad51 – Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 et XRCC3 possèdent 20 – 30% d'homologie avec HsRad51. Ces protéines forment des hétérodimères. Deux complexes indépendants ont été isolés, constitués de Rad51C-XRCC3 et Rad51B-Rad51C-Rad51D-XRCC2 . Rad51 interagit avec le complexe Rad51C-XRCC3 (Liu et al, 2002; Masson et al, 2001). La plupart des paralogues possèdent une activité ATPase ADN dépendante et lient préférentiellement l'ADNsb. Ces protéines ont un rôle dans les étapes primaires ainsi que dans les étapes tardives de la RH et sont nécessaires à la formation du filament synaptique et la formation de foci de Rad51 en réponse aux dommages de l'ADN (Thacker, 1999; Thacker, 2005).

3 Régulation de Rad51

Le niveau d'expression et l'activité de la protéine Rad51 doivent être finement régulés dans les cellules car Rad51 est une protéine essentielle pour le développement embryonnaire et la survie de la cellule, mais sa surexpression est liée au cancer. Une dérégulation de cette protéine par une sous-expression ou une surexpression a des effets néfastes pour les cellules et pour l'organisme entier.

La surexpression de Rad51 est liée au cancer puisqu'elle est souvent observée dans de nombreux cancers, tels que l'adénocarcinome du pancréas (Maacke et al., 2002; Maacke et al., 2000a), le cancer du sein (Maacke et al, 2000b), dans des cellules de leucémie myéloïde chronique (Slupianek et al, 2001) et dans des lignées cellulaires cancéreuses provenant de différentes leucémies et lymphomes, de mélanomes, de cancers des testicules, des ovaires, du col de l'utérus, du colon (Raderschall et al, 2002), dans des cellules de cancer de prostate (Fan et al, 2004). De plus, un nombre élevé de foci de Rad51 est observé dans ces cellules tumorales comparé aux cellules normales. La surexpression de Rad51 ne serait pas due à l'amplification du gène mais plutôt à sa transcription élevée et des modifications post-traductionnelles qui stabilisent la protéine (Raderschall et al, 2002).

Les changements du niveau de Rad51 dans les cellules tumorales est corrélé avec une radio- et chimiorésistance. Ainsi la surexpression de Rad51 confère la résistance à l'étoposide (VP16) et aux irradiations ionisantes (Hansen et al, 2003a; Hansen et al, 2003b; Lundin et al, 2003; Vispe et al, 1998). La quantité plus importante de Rad51 et de foci de Rad51 renforce la résistance des cellules cancéreuses. La surexpression de Rad51 dans des cellules peut stimuler le processus de RH (Arnaudeau et al, 1999; Vispe et al, 1998). Ceci augmente la réparation de l'ADN après traitement du cancer et réduit ainsi le nombre de CDB et donc l'effet du traitement. La RH augmente aussi la survie de la cellule après dommage de l'ADN en la protégeant de l'apoptose. D'autres études ont cependant montré que la surexpression de Rad51 stimule la RH mais sans conférer aux cellules la résistance aux irradiations (Lambert & Lopez, 2000). De plus la surexpression de Rad51 pourrait également diminuer le taux de RH (Kim et al, 2001; Paffett et al, 2005)

La sous-expression de Rad51 peut également avoir des effets néfastes pour la cellule. L'expression d'une protéine Rad51 négative dominante qui inhibe la RH dans des cellules p53

déficiences conduit à la formation de tumeurs après injection de ces cellules dans des souris nude (Bertrand et al, 2003). Une sous-expression de Rad51 a été observée dans 30% des carcinomes du sein (Yoshikawa et al, 2000).

Ces données soulignent donc l'importance du maintien d'un niveau adéquat de Rad51 et de la régulation de son activité. Dans les cellules eucaryotes, le niveau de transcription de la plupart des gènes codant des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN est très peu touché par un stress génotoxique. La régulation de la réparation des CDB se fait essentiellement par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, par la relocalisation intracellulaire, la formation de complexes, la dégradation (Daboussi et al, 2002). L'activation et la régulation de Rad51 sont assurées par un réseau complexe afin d'assurer la réparation appropriée de différentes lésions de l'ADN et de limiter la réparation illégitime. L'expression de la protéine Rad51 est régulée durant le cycle cellulaire et par la protéine p53. Les niveaux et l'activité de la protéine sont régulés par des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitination, par l'interaction avec les motifs BRC et le domaine C-terminal de la protéine BRCA2, par la localisation cellulaire, le clivage et la dégradation. Ces mécanismes sont conditionnés par les nombreuses interactions protéiques qu'établit la protéine Rad51 (fig. 1.18).

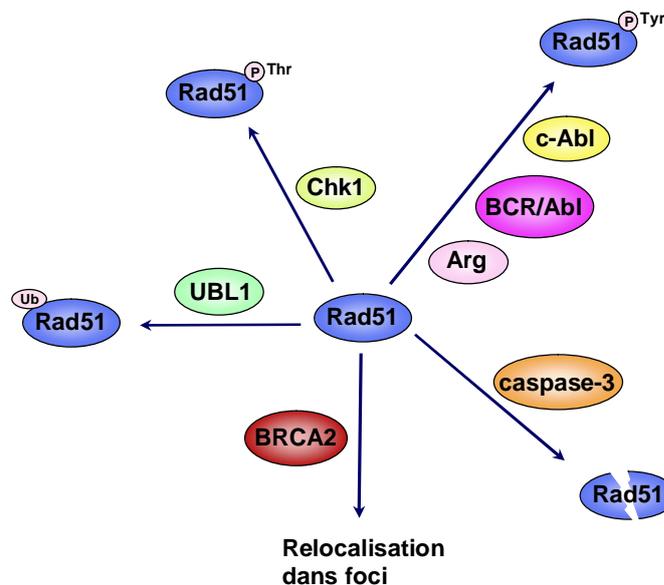


Figure 1.18 : Régulation de Rad51 par des modifications post-traductionnelles (d'après (Daboussi et al, 2002)).

3.1 Modifications post-traductionnelles de Rad51

Les modifications post-traductionnelles des protéines sont considérées comme une des complexités majeures des organismes supérieurs. Au moins 200 types de modifications post-traductionnelles sont connus parmi lesquels la plupart ne sont pas réversibles (Raggiaschi et al, 2005). Ces modifications peuvent être très diverses – acétylation, méthylation, glycosylation, phosphorylation, SUMOylation, ubiquitination.

La protéine Rad51 subit différentes modifications post-traductionnelles parmi lesquelles la phosphorylation est la plus étudiée et sera développée dans un chapitre séparé. A part la phosphorylation, la protéine Rad51 peut subir l'ubiquitination et la SUMO-ylation. Il a été montré que l'enzyme HsUbc9, appelée par la suite UBE21, interagit avec la Rad51 dans des essais de double hybride chez la levure (Kovalenko et al, 1996; Shen et al, 1996a). Cette enzyme est l'homologue humain de UBC9, enzyme de conjugaison d'ubiquitine chez la levure *S. cerevisiae* (Kovalenko et al., 1996). La déplétion nucléaire de HsUbc9/UBE21 bloque le trafic intracellulaire de Rad51 et inhibe ainsi la formation de foci après dommage de l'ADN (Saitoh et al, 2002). Rad51 interagit également avec UBL1 (ubiquitine-like protein 1), appelée également PIC1 (PML-interacting clone-1), GMP1 (GAP mogifying protein-1), SUMO-1 (small ubiquitin-regulated modifier-1) et Sentrin. L'homologue de UBL1 chez la levure inhibe une protéine du centrosome impliquée dans la ségrégation des chromosomes (Shen et al, 1996b). UBL1 interagit également avec HsUbc9/UBE21 (Shen et al, 1996a). HsUbc9/UBE21 serait non pas une enzyme de conjugaison d'ubiquitine mais plutôt une enzyme de conjugaison de UBL1 (Li et al, 2000). La forme non conjuguée de UBL1 co-immunoprécipite avec Rad51 et l'interaction entre les deux protéines est facilitée par Rad52 et/ou HsUbc9, ce qui suggère que HsUbc9/UBE21 est capable de conjuguer Rad51 à UBL1 (Daboussi et al, 2002; Li et al, 2000). La surexpression de UBL1 dans des cellules CHO réduit l'efficacité de RH induite par des CDB. De plus, la surexpression de UBL1 dans des cellules réduit leur résistance à des irradiations (Li et al, 2000). Les rôles exacts de HsUbc9 et de UBL1 ne sont pas connus.

3.2 Phosphorylation de Rad51

La phosphorylation est un processus réversible d'ajout d'un groupement phosphate sur un acide aminé d'une protéine. Les phosphorylations les plus fréquentes sont des O-phosphorylations sur le groupement hydroxyle d'un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. Des phosphorylations sont également possibles sur des résidus histidine, arginine, lysine, acide aspartique, acide glutamique et cystéine mais sont beaucoup moins fréquentes et moins étudiées car elles sont chimiquement instables (Sickmann & Meyer, 2001).

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle très fréquente dans les cellules eucaryotes. Tous les processus régulés par phosphorylation sont en fait régulés de manière réversible par l'action combinée de deux classes d'enzymes : les protéines kinases qui catalysent la phosphorylation des protéines et les protéines phosphatases qui catalysent leur déphosphorylation par hydrolyse de la liaison phosphodiester avec le groupement phosphate. La phosphorylation concerne des protéines de classes diverses – protéines structurales, protéines chaperones, enzymes, facteurs de transcription. Ainsi un très grand nombre de processus biologiques tels que le métabolisme, la transcription, la traduction, le cycle cellulaire, les réarrangements du cytosquelette, la mobilité des cellules, l'apoptose, la différenciation sont régulés par la phosphorylation de protéines directement impliquées dans ces processus. La phosphorylation joue également un rôle majeur dans le transfert d'information dans la cellule en régulant des voies de signalisation. Il est estimé que 30 % des protéines cellulaires sont phosphorylées, souvent sur plusieurs sites (Raggiaschi et al, 2005) et qu'il existerait approximativement 100 000 sites de phosphorylation potentiels dans le génome humain (Zhang et al, 2002). Les protéines kinases et les protéines phosphatases constituent 2% du génome humain qui coderait pour environ 518 protéines kinases parmi lesquelles seulement 90 sont des tyrosine kinases (Manning et al, 2002).

L'étude de la phosphorylation de la protéine Rad51 a montré l'existence de deux sites de phosphorylation sur tyrosine et un sur thréonine. Il existe à ce jour une demi-douzaine d'articles publiés concernant la mise en évidence et le rôle possible de ces phosphorylations. La première publication concernant la phosphorylation de Rad51 a été publiée en 1997 par l'équipe de Yuan et collaborateurs, démontrant la phosphorylation de Y54 par la kinase c-Abl. Aucune autre étude n'a permis la détection de la phosphorylation de ce résidu. En 1999, Chen et collaborateurs ont démontré la phosphorylation du résidu Y315 par la kinase

c-Abl. Deux ans plus tard, la phosphorylation de ce résidu par la kinase oncogène de fusion BCR/Abl a été mise en évidence par Slupianek et collaborateurs. Il existe donc une incertitude concernant les sites exacts de phosphorylation sur tyrosine de la protéine Rad51. La phosphorylation sur thréonine a été observée dans une étude réalisée par Sorensen et collaborateurs.

3.2.1 Tyrosine Kinases

Les protéines tyrosine kinases sont des enzymes qui catalysent le transfert du groupement phosphate en position γ de l'ATP à un résidu tyrosine d'une protéine. Ces kinases jouent des rôles essentiels dans la régulation de la croissance, la différenciation et l'apoptose des cellules des mammifères. La fidélité de ces processus dépend d'interactions spécifiques entre les tyrosine kinases et leur substrat. Les tyrosine kinases sont le plus souvent strictement régulées et ont une activité basale faible. Elles sont activées transitoirement par des stimuli différents (Miller, 2003). L'activation constitutive ou non appropriée de protéine tyrosine kinases est trouvée dans de nombreux cancers, par exemple la kinase de fusion BCR/Abl exprimée dans un grand nombre de leucémies myéloïdes chroniques.

Il existe deux types de tyrosine kinases – des tyrosine kinases récepteurs et des tyrosine kinases nonrécepteurs. Chez les mammifères il existe environ 10 familles de tyrosine kinases non récepteurs (Robinson et al, 2000). Seules les tyrosines kinases directement impliquées dans la phosphorylation de Rad51 seront discutées ici.

3.2.2 c-Abl

c-Abl est une tyrosine kinase non récepteur de 145 kDa. Le gène c-abl a été découvert comme l'homologue de l'oncogène v-abl du virus murin de leucémie Abelson (Abelson & Rabstein, 1970). Ce gène est exprimé de manière ubiquitaire et un épissage alternatif donne deux isoformes de la protéine (1a et 1b) de même taille (Ben-Neriah et al, 1986) (fig. 1.19).

Abl joue un rôle important dans l'homéostasie de la cellule comme démontré par des essais de knock out chez la souris. L'inactivation du gène abl provoque un développement fœtal normal, mais après leur naissance, les souris montrent des anomalies au niveau de la tête et des yeux, une ostéoporose et meurent d'une lymphopoïèse défectueuse (Schwartzberg et al,

1991). De plus, dans des cellules n'exprimant pas c-Abl, l'activation des checkpoints du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN est maintenue, tandis que la réponse apoptotique est diminuée.

La kinase c-Abl régule des voies de signalisation dans différents compartiments cellulaires en fonction de sa localisation. Dans le cytoplasme c-Abl est impliquée dans la régulation du cytosquelette de par son interaction avec la F et la G-actine (Kadlec & Pendergast, 1997). Dans le noyau c-Abl a un rôle dans la transcription (Goga et al, 1995) et la progression du cycle cellulaire (Sawyers et al, 1994). c-Abl a également un rôle important dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN via son interaction avec Rad51 et DNA-PK (Kharbanda et al, 1995) et est impliquée dans le processus d'apoptose (Shaul, 2000).

3.2.2.1 Structure et localisation intracellulaire

Comme tous les transducteurs de signaux, c-Abl effectue ses fonctions biologiques par des interactions avec d'autres composants cellulaires. Ces interactions se font avec les multiples domaines fonctionnels de c-Abl (fig. 1.19).

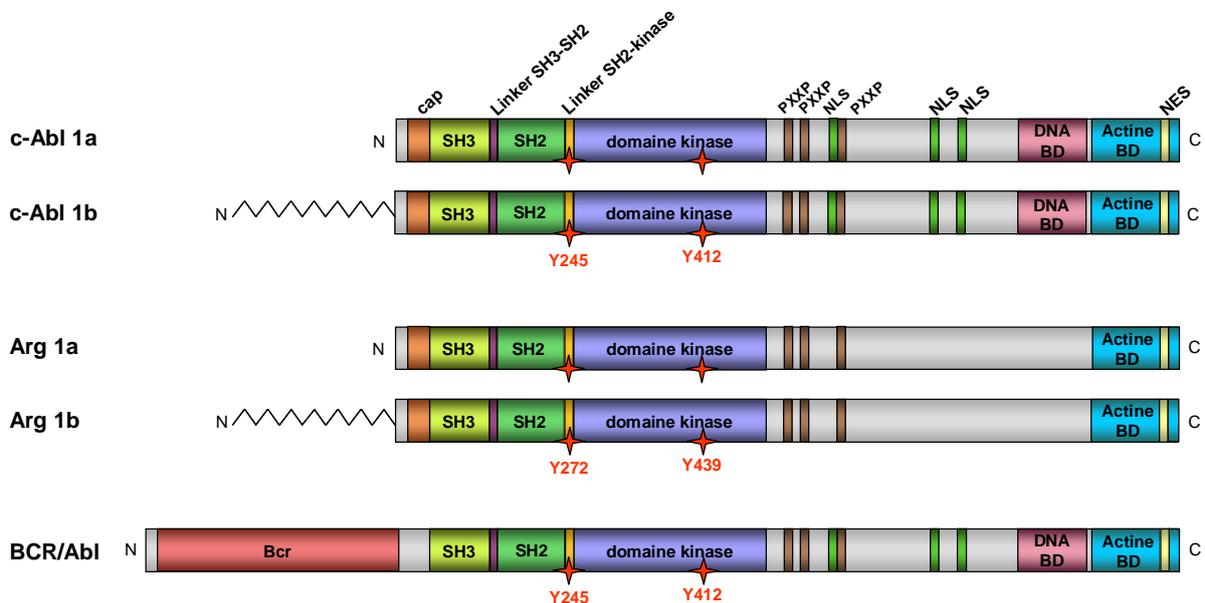


Figure 1.19 : Structure des isoformes 1a et 1b kinases c-Abl et de la kinase de fusion BCR/Abl (d'après (Hantschel & Superti-Furga, 2004; Sirvent et al, 2008)).

La kinase c-Abl possède un domaine SH3 (Src-homology-3) et un domaine SH2 dans la région N-terminale (Pawson & Schlessingert, 1993). Le domaine SH3 reconnaît préférentiellement des régions riches en proline contenant la séquence PXXP où X peut être n'importe quel acide aminé (Shaul, 2000). Le domaine SH2 interagit avec des peptides contenant la séquence Y(p)XXP. Un court linker relie ces deux domaines. Un autre linker relie le domaine SH2 au domaine kinase (Pawson & Schlessingert, 1993). L'isoforme 1b est myristoylée *in vivo* en N-terminale. La partie N-terminale précédant le domaine SH3 est appelée le "cap" et il comprend le myristate de l'isoforme 1b (fig. 1.19).

La région C-terminale de c-Abl contient plusieurs domaines et contribue à la régulation de la kinase et à sa localisation cellulaire. La localisation intracellulaire de la kinase est régulée par trois signaux de localisation nucléaire (NLS) (Van Etten et al, 1989; Wen et al, 1996) et un signal d'export nucléaire (NES) (Taagepera et al, 1998). Cette région C-terminale contient aussi trois séquences riches en proline PXXP qui lient des protéines à domaines SH3 (Feller et al, 1994; Ren et al, 1994), trois HMG-like boxes qui lient l'ADN (Kipreos & Wang, 1992), ainsi que des domaines de liaison à l'actine (Van Etten et al, 1994).

La présence de NLS et de NES permet à la kinase c-Abl de "faire la navette" entre le cytoplasme et le noyau, ce qui souligne que les fonctions biologiques de la kinase sont influencées par sa localisation intracellulaire. Le NLS de c-Abl serait actif uniquement lorsque la kinase est inactive et se trouve en conformation autoinhibée. Le fait que c-Abl ne puisse entrer dans le noyau que sous forme inactive suggère un mécanisme de régulation évitant l'entrée de molécules c-Abl déjà activées (Zhu & Wang, 2004). Trois sites de clivage par caspase sont présents dans la région C-terminale de c-Abl (Zhu & Wang, 2004).

3.2.2.2 Régulation

Les effets de l'activité de c-Abl étant potentiellement dangereux pour la cellule, son activité kinase est strictement régulée. La régulation est effectuée par auto-inhibition, par phosphorylation, par l'interaction avec d'autres protéines ainsi que par la localisation intracellulaire de la protéine.

L'auto-inhibition de la kinase est assurée par des interactions intermoléculaires complexes entre le domaine kinase et les domaines SH2 et SH3 qui donnent une conformation inactive à

En plus de cette auto-inhibition l'activité de la kinase c-Abl est inhibée par des interactions protéiques. Dans le cytoplasme la liaison de c-Abl au F-actine inhibe son activité (Woodring et al, 2001). Un autre inhibiteur de l'activité kinase de c-Abl est la protéine cellulaire Pag qui catalyse la destruction du peroxyde (Wen & Van Etten, 1997). Il a été montré que c-Abl est maintenue dans le cytoplasme par les protéines 14-3-3 qui masquent le NLS et empêchent ainsi l'entrée de la kinase dans le noyau. Leur phosphorylation par JNK libèrerait c-Abl ce qui conduirait à l'accumulation de c-Abl dans le noyau et l'induction de l'apoptose (Yoshida, 2008).

Dans le noyau, l'inhibition de c-Abl est renforcée par l'interaction avec des protéines nucléaires telles que Rb et BRCA1. Rb se lie au site de liaison de l'ATP pendant la phase G1 et inhibe ainsi l'activité kinase de c-Abl. L'activation de c-Abl nécessite la phosphorylation et/ou la dégradation de Rb afin que la kinase soit libérée (Zhu & Wang, 2004). L'interaction de c-Abl avec BRCA1 est également inhibitrice et l'activation se fait après séparation des deux protéines suite à leur phosphorylation par ATM en cas d'endommagement de l'ADN. L'activation de c-Abl suite à des dommages de l'ADN nécessite non seulement ATM mais également DNA-PK. De son côté, c-Abl peut phosphoryler et ainsi désactiver DNA-PK (Pendergast, 2002). Un stress oxydatif peut également activer c-Abl dans le noyau (Sun et al, 2000).

L'activité kinase de c-Abl est rapidement diminuée par la dégradation de la protéine par le système ubiquitine/protéasome, ce qui empêche la présence dans la cellule d'un niveau élevé d'activité kinase de c-Abl qui pourrait être nocif (Dai et al, 1998).

3.2.2.3 Rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN

c-Abl est activée dans le noyau par ATM suite à la formation de CDB par des irradiations (Kharbanda et al, 1995). ATM ainsi que DNA-PK sont constitutivement liés au domaine SH3 de c-Abl et peuvent phosphoryler et ainsi activer la kinase. La phosphorylation sur la sérine 465 est indispensable pour l'activation de c-Abl (Baskaran et al, 1997; Kharbanda et al, 1997).

c-Abl intervient dans plusieurs aspects de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. L'interaction avec BRCA1 et ATM implique c-Abl dans la réparation de CDB par RH.

De plus, il a été montré que c-Abl interagit avec Rad51 et Rad52, protéines clés de la RH et les phosphoryle (Chen et al., 1999b). L'interaction avec la DNA-PK relie c-Abl à la voie de réparation de CDB par NHEJ. c-Abl est également activée par la cisplatine dans le système de réparation MMR (Zhu & Wang, 2004). De plus, c-Abl reconnaît des structures déformées de l'ADN telles que les jonctions cruciformes (David-Cordonnier et al, 1998).

c-Abl intervient également dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réponse apoptotique. c-Abl peut activer p53 et p73 qui interviennent dans des voies apoptotiques parallèles. L'interaction de c-Abl avec p53 induit une légère augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53. D'autre part, c-Abl phosphoryle Mdm2 et exerce ainsi un effet positif sur la fonction de p53 (Chene, 2003). c-Abl phosphoryle et active p73, membre de la famille p53 et active ainsi la réponse apoptotique p73 dépendante (Zhu & Wang, 2004). Un rôle de c-Abl dans le checkpoint G1/S a été proposé car la surexpression de c-Abl arrête les cellules en phase G1 (Sawyers et al, 1994). c-Abl jouerait aussi un rôle dans la progression du cycle cellulaire via son interaction avec la protéine Rb. La phosphorylation de Rb par la cycline D conduit à la libération et l'activation de c-Abl en phase S pendant laquelle c-Abl est capable de stimuler l'activité de certains facteurs de transcription et de l'ARN Polymerase II (Welch & Wang, 1993).

3.2.3 Arg

Arg ou Abl2 est le seul autre membre connu de la famille c-Abl. La structure de Arg est très semblable à celle de c-Abl avec deux isoformes 1a et 1b, le dernier étant myristoylé en N-terminal. La séquence des domaines SH3 et SH2 est quasi identique entre les deux kinases, ce qui suggère que les motifs de reconnaissance sont également identiques. La partie C-terminale est peu conservée entre les deux kinases. Les séquences des NLS et le NES sont partiellement conservées mais la fonction de localisation nucléaire n'a pas été observée. Arg est détectée essentiellement dans le cytoplasme et peu dans le noyau. Le domaine de liaison à l'ADN est spécifique à c-Abl et n'est pas conservé (Pendergast, 2002).

Il a été montré que Arg interagit avec la protéine Rad51 et la phosphoryle (Li et al, 2002). Ceci relie la kinase Arg aux voies de réparation de l'ADN par RH.

3.2.4 BCR/Abl

Une autre kinase capable de phosphoryler Rad51 est BCR/Abl. Cette tyrosine kinase de fusion résulte de la translocation réciproque de la séquence de c-Abl du chromosome 22 dans la région BCR (breakpoint cluster region) du chromosome 9 t(9 ;22), ce qui produit le chromosome de Philadelphie (fig. 1.19) (Groffen et al, 1984). La tyrosine kinase de fusion BCR/Abl est exprimée dans la plupart des leucémies myéloïdes chroniques (CML) et une partie des leucémies lymphocytiques aiguës (ALL). Cette protéine de fusion présente une activité kinase constitutive.

3.2.4.1 Structure

La protéine de fusion BCR/Abl est constituée d'une partie BCR suivie de la séquence de Abl. La partie Abl de la protéine de fusion possède tous les domaines fonctionnels de c-Abl, excepté une région en N-terminale correspondante aux 26 premiers codons du gène qui donne les isoformes 1a et 1b de c-Abl (Chissoe et al, 1995). Cette région comporte le premier et une partie du deuxième exon et contient la séquence codante le cap. Ainsi BCR/Abl ne possède pas de cap ou de groupement myristate et leur absence conduit à une conformation tridimensionnelle de la tyrosine kinase de fusion différente de celle de c-Abl. Dans cette conformation les interactions entre les différents domaines ne sont pas maintenues et la kinase se trouve en conformation ouverte et active (Pluk et al, 2002). De plus BCR/Abl possède le domaine d'oligomérisation de BCR. L'oligomérisation induit l'autophosphorylation permanente de la protéine. Les tyrosines 245 du linker SH2 et 412 dans la boucle d'activation sont sûrement autophosphorylées, ce qui contribue à la conformation ouverte et l'activité constitutive de BCR/Abl (Zhu & Wang, 2004).

La région BCR peut être de longueur différente en fonction de l'endroit du point de cassure sur le chromosome 9, produisant majoritairement trois variants de la protéine de fusion : P190, P210 et P230. Les trois variants de BCR/Abl sont associés à des phénotypes différents en partie à cause de leur pouvoir transformant différent. En fonction du variant, la région BCR contient un domaine d'oligomérisation, un domaine sérine/thréonine, quelques sites de phosphorylation sur tyrosine et sérine/thréonine, des sites de liaison pour le domaine SH2 de c-Abl (Inokuchi, 2006).

La localisation de la kinase de fusion est exclusivement cytoplasmique. Sa conformation active bloque l'importation nucléaire. Dans le cytoplasme BCR/Abl se lie aux domaines SH3 de nombreuses protéines en activant ainsi plusieurs voies de signalisation telles que la Ras/MAP kinase, JNK, STAT1 et STAT5, PI3K/Akt, NF- κ B, MYC. De plus BCR/Abl induit l'accumulation d'espèces réactives d'oxygène dans les cellules. Ainsi BCR/Abl via son activité kinase constitutive provoque l'augmentation de la prolifération cellulaire, une différenciation cellulaire dérégulée, une diminution de l'apoptose et une prédisposition à l'instabilité génomique (Zhu & Wang, 2004). Il existe une relation directe entre l'activité de la tyrosine kinase BCR/Abl et son pouvoir transformant. Ceci suggère que l'activité enzymatique de BCR/Abl est le facteur clé dans l'induction et le maintien du phénotype néoplastique des cellules leucémiques (Saglio & Cilloni, 2004).

3.2.4.2 Traitement de leucémies avec Glivec

Puisque BCR/Abl possède un pouvoir transformant et est surexprimé dans de nombreuses leucémies, un inhibiteur efficace de cette kinase a été recherché. Un tel inhibiteur est le Glivec, appelé encore STI571 ou Imatinib.

Le traitement avec le Glivec est efficace chez un très grand nombre de patients atteints de CML en phase chronique. Cette molécule interagit avec le site de liaison à l'ATP du domaine kinase de la partie Abl et provoque un changement conformationnel de la kinase. La boucle d'activation se replie dans le lobe C-terminale du domaine kinase ce qui verrouille BCR/Abl dans une conformation inactive (Schindler et al., 2000; Zhu and Wang, 2004). De cette façon l'autophosphorylation et la phosphorylation de substrats sont inhibées, ce qui inhibe la prolifération des cellules leucémiques et induit leur élimination par apoptose (Druker et al, 1996). Des études *in cellulo* ont montré que lorsque des cellules leucémiques sont traitées avec Glivec en présence de leptomycine B (LMB), BCR/Abl est accumulé dans le noyau. Le Glivec est rapidement éliminée *in vivo*, alors que l'effet de LMB qui agit sur l'exportine 1, récepteur nucléaire de NES, est irréversible. Lorsque les deux drogues sont éliminées des cellules, BCR/Abl retrouve son activité mais est piégé dans le noyau. Contrairement au cytoplasme où BCR/Abl induit la prolifération cellulaire, dans le noyau la kinase de fusion active l'apoptose et les cellules leucémiques sont éliminées (Vigneri & Wang, 2001; Zhu & Wang, 2004).

Malgré la bonne efficacité du traitement avec le Glivec, il existe de nombreux patients qui développent une résistance au cours du traitement. La réponse positive chez ces derniers est donc de courte durée. De plus, chez les patients avec des résultats satisfaisants toutes les cellules exprimant BCR/Abl ne sont pas éliminées, ce qui représente un risque permanent de rechute (Graham et al, 2002). La résistance acquise au Glivec est le plus souvent induite par des mutations au niveau de BCR/Abl ou par l'amplification du gène de la kinase de fusion qui provoque sa surexpression (Inokuchi, 2006).

3.2.4.3 Rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN

Dans les cellules exprimant BCR/Abl la réparation des CDB est compromise. Des mutations et des délétions sont introduites dans les produits de RH et de NHEJ et la fidélité de réparation par NER des lésions induites par l'UV est réduite. De plus BCR/Abl induit la formation de nombreuses CDB de l'ADN qui résultent des dommages oxydatifs induits par l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules leucémiques.

Les tumeurs exprimant des tyrosine kinases oncogéniques telles que BCR/Abl sont relativement résistants à des traitements induisant des lésions de l'ADN (Bedi et al, 1995). Slupianek et al. ont montré que cette résistance est médiée par la protéine Rad51 (Slupianek et al, 2001). En effet, il existe une corrélation entre l'expression de Rad51 et la résistance aux traitements anticancéreux (Vispe et al., 1998). BCR/Abl régule la transcription, la dégradation et la phosphorylation de Rad51. La surexpression de Rad51 est le résultat, d'une part, de l'activation de STAT5 par BCR/Abl, et d'autre part de l'inhibition de son clivage par la caspase-3 dont l'activation est inhibée par BCR/Abl. De plus BCR/Abl phosphoryle Rad51 de manière constitutive ce qui pourrait favoriser son interaction avec d'autres protéines impliquées dans la RH et stimuler ainsi ce processus. La surexpression de Rad51 par BCR/Abl facilite la réparation par RH des CDB et induit la résistance aux traitements dans les cellules leucémiques (Slupianek et al, 2001). Toutefois la résistance aux traitements anticancéreux induite par BCR/Abl ne repose pas seulement sur la surexpression et la stabilisation de Rad51. Au moins deux mécanismes supplémentaires agissent en synergie pour conférer la résistance aux traitements : la surexpression de Bcl-XL et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. La surexpression de Bcl-XL inhibe l'apoptose par l'inhibition de la libération du cytochrome *c* des mitochondries et l'activation de la caspase-3 qui en résulterait (Amarante-Mendes et al, 1998; Salomoni et al, 2000; Slupianek et al, 2002). De plus, BCL-

XL inhibe le processus de RH (Saintigny et al, 2001b). La prolongation de la phase G2/M du cycle cellulaire assure à la cellule plus de temps pour la réparation de lésions de l'ADN potentiellement létales (Chan et al, 1999). De plus BCR/Abl inhibe les voies de NHEJ (Deutsch et al, 2001) via l'inhibition de la DNA-PK et de NER (Maru et al, 2001), ce qui suggère que la balance entre les différents mécanismes de réparation peut être dérégulée par cette kinase (Daboussi et al, 2002). Les lésions de l'ADN seraient donc réparées par des voies inappropriées, ce qui augmenterait l'instabilité génomique.

Les kinases c-Abl, Arg et BCR/Abl phosphorylent la protéine Rad51 sur les tyrosines en position 54 et/ou 315. Les données connues sur ces phosphorylations seront décrites dans les chapitres suivants.

3.2.5 Phosphorylation de Y54

Yuan et collaborateurs ont montré par co-immunoprécipitation et GST pull-down que la kinase c-Abl interagit de manière constitutive et directe avec la protéine humaine Rad51 via le domaine SH3. Ce domaine SH3 reconnaît spécifiquement des séquences PXXP au niveau des protéines cibles. Deux motifs PXXP sont présents dans la région C-terminale de Rad51 entre les résidus 283 – 266 et 318 – 321.

Les auteurs ont incubé la protéine Rad51 et la kinase c-Abl purifiées et ont ainsi démontré que Rad51 est phosphorylée *in cellulo* par cette kinase. La co-transfection de cellules HeLa avec des plasmides contenant les gènes de Rad51 et c-Abl et l'analyse du lysat de ces cellules avec un anticorps anti-phosphotyrosine a confirmé la phosphorylation de HsRad51 *in cellulo*. Afin de déterminer le site de phosphorylation, la protéine phosphorylée *in cellulo* a été purifiée et analysée par spectroscopie de masse. Les résultats ont montré que la phosphorylation se situe au niveau de la tyrosine en position 54. Le même résultat a été obtenu pour la protéine phosphorylée *in cellulo*. Des essais d'échange de brin ont montré que la protéine phosphorylée inhibe la fixation de Rad51 sur l'ADN simple brin et selon les auteurs inhibe ainsi la fonction de la protéine (Yuan et al, 1998).

3.2.6 Phosphorylation de Y315

3.2.6.1 *par c-Abl*

Deux ans après l'étude de Yuan et collaborateurs, l'équipe de Chen a confirmé l'interaction de Rad51 et c-Abl et a trouvé que ATM est également lié à ce complexe. En immunoprécipitant Rad51 et en réalisant un immunoblot avec un anticorps anti-phosphotyrosine, les auteurs ont observé que l'irradiation de cellules augmente de trois fois le niveau de phosphorylation de Rad51 sans induire des changements dans son niveau d'expression. Cette phosphorylation est effectuée par la kinase c-Abl. Une étude de différents mutants nonphosphorylables sur tyrosine co-transfectés avec la kinase c-Abl dans des cellules a montré que la mutation de Y315 par une phénylalanine abolit la phosphorylation, indiquant ainsi la position de phosphorylation par c-Abl. Cette phosphorylation de Rad51 sur Y315 faciliterait l'interaction de Rad51 avec Rad52 *in vitro* en augmentant ainsi l'efficacité de réparation de l'ADN (Chen et al, 1999b).

3.2.6.2 *par BCR/Abl*

La tyrosine 315 peut également être phosphorylée par la tyrosine kinase de fusion BCR/Abl. Slupianek et collaborateurs ont trouvé que la localisation de la protéine Rad51 coïncide en partie avec la localisation de BCR/Abl et que les deux protéines forment des complexes périnucléaires et/ou cytoplasmiques. L'analyse de l'état de phosphorylation de Rad51 dans des cellules surexprimant la kinase de fusion a montré que Rad51 est constitutivement phosphorylée. La co-transfection de BCR/Abl avec des mutants de Rad51 non phosphorylables sur Y54 et Y315 et l'utilisation d'un antisérum dirigé contre un peptide pY315 a montré que la kinase BCR/Abl phosphoryle Y315. La phosphorylation de ce résidu aurait un effet positif sur la réparation de l'ADN et la résistance aux traitements anti-cancéreux. En effet, la surexpression de Rad51 Y315F en combinaison avec BCR/Abl diminue la résistance de cellules aux médicaments mitomycine C et cisplatine jusqu'au niveau de résistance des cellules exprimant une kinase non active (Slupianek et al, 2001).

3.2.7 Etude de Y315

L'importance de la tyrosine en position 315 a été étudiée à l'aide de mutants de Rad51 par Takizawa et collaborateurs. La tyrosine 315 a été remplacée par les acides aminés Asp, Glu,

Arg, Ala et Phe pour obtenir les mutants Rad51 Y315D, Y315E, Y315R, Y315A et Y315F respectivement. Les cinq mutants gardent la même efficacité d'hydrolyse d'ATP que la protéine sauvage, ce qui indique que ces mutations n'induisent pas de modifications significatives dans la structure monomérique de Rad51. Dans des essais d'échange de brin les mutants Rad51 Y315A, Y315R et Y315F ont la même efficacité que la protéine Rad51wt. Le mutant Y315E est légèrement moins actif alors que Y315D présente une activité très réduite par rapport à celle de la protéine sauvage. Les mutants Y315D et Y315E présentent des affinités pour l'ADNsb très réduites, alors que les autres mutants ont des affinités inchangées. Ceci indique que la charge négative portée par les résidus mutés pourrait interférer dans la liaison de Rad51 avec l'ADNsb en créant des forces de répulsion avec le squelette phosphaté de l'ADN. L'efficacité de liaison à l'ADNdb des cinq mutants est comparable à celle de la protéine sauvage. La capacité de ces mutants à dérouler l'ADN a également été testée. Les mutants Y315D, Y315E et Y315R étaient déficients pour cette activité. Ces résultats montrent l'importance de la tyrosine 315 dans la liaison de Rad51 à l'ADNsb et la formation du filament sur l'ADNdb (Takizawa et al, 2004). Le remplacement du résidu 315 par un tryptophane a démontré que ce résidu Y315 se trouve au bord de l'interface monomère-monomère. La phosphorylation de Y315 pourrait donc influencer la formation et la structure du filament de Rad51, ainsi que l'interaction avec des protéines partenaires telles que BRCA2, Rad52, Rad54 (Conilleau et al, 2004).

3.2.8 Phosphorylation par Arg

Li et collaborateurs ont mis en évidence la phosphorylation de Rad51 par l'autre membre de la famille c-Abl – la tyrosine kinase Arg. L'équipe a démontré l'interaction des deux protéines par co-immunoprécipitation des lysats de cellules co-transfectées avec leurs gènes respectifs. Un anticorps anti-phosphotyrosine a révélé la phosphorylation de Rad51 par la kinase c-Abl et cette phosphorylation était plus intense que celle réalisée par la kinase c-Abl. Aucune conclusion sur les effets de cette phosphorylation n'a été proposée par les auteurs (Li et al, 2002).

3.2.9 Phosphorylation de Rad51 sur Thréonine

La protéine Rad51 peut également être phosphorylée sur thréonine. Cette phosphorylation est beaucoup moins étudiée que celle des tyrosines.

Sorensen et collègues ont montré qu'un signal dépendant de Chk1 est nécessaire pour une RH efficace (Sorensen et al, 2005). En effet, le traitement de cellules avec un inhibiteur spécifique de cette kinase ou avec une siRNA diminue le niveau de RH et ralentit la réparation des CDB. L'inhibition de Chk1 inhibe également la formation de foci de Rad51 qui n'est pas due à une diminution de son niveau protéique et serait nécessaire pour l'association de Rad51 avec la chromatine. Chk1 interagit directement avec Rad51 et le phosphoryle sur la Thréonine 309. La transfection de cellules avec un mutant non phosphorylable sur T309 augmente leur sensibilité à l'hydroxyurée. Cette phosphorylation serait donc nécessaire pour une RH efficace et la survie des cellules après endommagement de l'ADN. L'effet de cette phosphorylation sur l'activité de Rad51 et sur l'interaction avec ses partenaires protéiques n'est pas connu.

Chk1 serait ainsi impliqué dans plusieurs aspects de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (fig. 1.21). D'une part Chk1 participe à l'arrêt du cycle cellulaire par l'inhibition de Cdc25A et CDC25C (voir chapitre "Activation de checkpoints du cycle cellulaire", page 19). D'autre part Chk1 participe à la régulation de la réparation par la phosphorylation de la recombinaise Rad51.

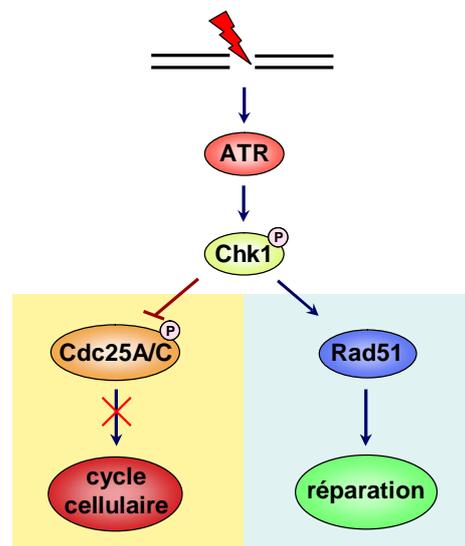


Figure 1.21 : Implication de Chk1 dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (Sorensen et al, 2005).

3.3 Clivage par la caspase-3

Le clivage de la protéine Rad51 a été observée pour la première fois par Flygare et collègues dans des cellules apoptotiques (Flygare et al, 1998). Ce clivage est réalisé *in vivo* par la caspase-3 (Feller et al, 1994; Huang et al, 1999). Les caspases sont des cystéine protéases activées lors de la réponse apoptotique et sont responsables du clivage de protéines lors de l'induction de l'apoptose. Un grand nombre de ces protéines cibles sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et les mécanismes de réparation (Stroh & Schulze-Osthoff, 1998). La caspase-3 clive Rad51 mais également DNA-PK (nueda, 1991) et ATM (Smith et al, 1999) . Ainsi cette caspase non seulement active l'apoptose mais inhibe la réparation de l'ADN.

Rad51 est clivé *in cellulo* par la caspase-3 au niveau de deux sites. Un premier site de clivage se situe au niveau des acides aminés 184 à 188 et possède une séquence "typique" : DVLD/N (Huang et al, 1999). En effet, le site de clivage conventionnel de la caspase-3 est constitué de quatre résidus avec des aspartates en première et quatrième positions. Le clivage de ce site de Rad51 produit deux fragments de 23 et 18 kDa (Flygare et al, 2000; Huang et al, 1999). Un deuxième site de clivage qui est nonconventionnel possède la séquence AQVD/G et se situe entre les résidus 270 et 274. Son clivage produit deux fragments de 33 et 8 kDa (Flygare et al, 1998; Flygare et al, 2000). Les quatre produits de clivage peuvent être générés directement à partir de la protéine Rad51 entière, ce qui indique qu'il n'y a pas d'interconnexion dans le mode de clivage.

Le clivage de Rad51 au niveau du site DVLD/N n'affecte pas la capacité de fixation à l'ADNsb des fragments résultant mais inhibe l'activité recombinase dans des cellules (Huang et al, 1999). *In cellulo* ce clivage réduit l'activité d'échange de brin de Rad51 (Brown et al, 2008). Des cellules surexprimant un mutant non clivable de Rad51 montrent une réponse apoptotique diminuée suite à des irradiations ionisantes (Huang et al, 1999). Le clivage de Rad51 est inhibé par BRCA2 qui bloque la fixation de la caspase-3 à la protéine. L'inhibition de la caspase-3 *in cellulo* augmente le niveau protéique de Rad51 ainsi que la formation de foci après irradiation (Brown et al, 2008).

CHAPITRE II

II. Matériel et Méthodes

1. Produits

Les produits utilisés pour la culture cellulaire ont été fournis par Gibco (France) : Dulbecco's Minimum Essential Medium DMEM, RPMI 1640, SVF, Antibiotiques (penicilline/streptomycine), PBS. Le PMSF, EDTA, Na₃VO₄, NaF, DTT, glycérol, le Protease Inhibitor Cocktail constitué de AEBSF 104 mM, Aprotinin 80 μM, Bestatin 4 mM, E-64 1,4 mM, Leupeptin 2 mM, Pepstain A 1,5 mM ont été achetés chez Sigma. Le kit SulfoLink utilisé pour la purification des anticorps provient de Pierce. Le réactif de transfection DreamFect Gold a été obtenu par OZ Biosciences, le FuGENE 6 a été fourni par Roche. Les billes d'agarose couplées à la Protéine A ou la Protéine G utilisées pour réaliser des immunoprécipitations, la membrane de nitrocellulose Hybond ECL, l'agent de blocage à base de lait utilisé pour la saturation des sites de liaison non spécifiques des membranes proviennent de Amersham. Le réactif de Bradford pour le dosage des protéines, le marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein Standards) sont de Bio-Rad. La BSA, utilisée également pour saturer les sites de liaison non spécifiques des membranes, provient de Sigma. La Geneticine G418, utilisée pour la sélection et le maintien des cellules transfectées stablement, a été achetée chez Invitrogen. Le kit Miniprep a été fourni par QIAgen. Le peptide de fusion GST-domaine SH2 de c-Abl a été acheté chez Marligen et les billes glutathione-agarose chez GE Healthcare.

Les anticorps commerciaux utilisés pour réaliser des immunoprécipitations ou pour la révélation de Western blots sont regroupés dans le tableau suivant :

	Anticorps	Fournisseur
Anticorps primaires monoclonaux	Ac anti Rad51 Ac anti-c-Abl Ac anti- α -tubuline Ac anti-topoisomerase I Ac anti- β -actine	NeoMarkers NeoMarkers Sigma NeoMarkers Sigma
Anticorps primaires polyclonaux	Ac anti-H2AX Ac anti-HA Ac anti-FLAG Ac anti-GST	Bethyl Laboratories NeoMarkers ABGENT Sigma
Anticorps secondaires	Ac anti-souris AlexaFluor 700 Ac anti-lapin IRDye 800	Molecular probes Rockland

Tableau 2.1 : Anticorps commerciaux utilisés pour la révélation de Western Blots

2. Cellules

Les cellules K562, HL60S, HL60/DNR et HL60/DOX ont été maintenues dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF et 1% d'antibiotiques à 37°C, dans une atmosphère humidifiée et en présence de 5% de CO₂. Ces lignées cellulaires nous ont été données par Dr. Hamid Morjani de l'Université de Reims.

Les cellules HeLa qui nous ont été données par Dr. Pitard de l'Université de Nantes, ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF et 1% d'antibiotiques à 37°C, dans une atmosphère humidifié et en présence de 5% de CO₂.

La lignée HeLa EGFP-Rad51 établie au laboratoire a été maintenue dans du milieu DMEM complet additionné de 1 mg/ml de G418.

3. Bactéries et plasmides

Les souches bactériennes suivantes ont été utilisées :

- XL1 Blue pour l'amplification des plasmides pEF-BOS-3xHA contenant le gène de Rad51 sauvage ou mutée et des plasmides pFLAG-CMV-2 c-Abl contenant le gène de c-Abl sauvage ou mutée ;

- BL21 (DE3) pLys pour l'expression de la protéine Rad51 à purifier
- SURE pour l'amplification du plasmide PS2141 EGFP-Rad51 contenant le gène de EGFP-Rad51.

Les plasmides pEF-BOS-3xHA Rad51 et pFLAG-CMV-2 c-Abl nous ont été fournis dans le cadre d'une collaboration par l'équipe du Pr. Yamamoto, Université de Kanazawa, Japon. Le vecteur pEF-BOS a été modifié par l'ajout de trois tags HA suivis de la séquence du gène Rad51 sauvage. Cette construction a servi à l'élaboration des protéines mutantes Y54F, Y301F et Y315F dans lesquelles la tyrosine est remplacée par une phénylalanine. Ceci permet l'expression de la protéine de fusion HA-Rad51 sauvage ou mutée en position 54, 301 ou 315 dans des cellules eucaryotes. Le plasmide PS2141 EGFP-Rad51 a été acheté chez Bioimage.

4 Préparation de bactéries compétentes par la méthode SEM

Les bactéries ont été striées sur boîte LB agar à partir du stock glycérol et incubées toute la nuit à 37°C. Une colonie isolée a été inoculée dans 10 ml de milieu LB et incubée la nuit à 37°C sous agitation. 25 ml de LB ont été inoculés avec cette pré-culture et incubés sous agitation à température ambiante jusqu'à une DO de 0,6 à 600 nm. Après 10 minutes d'incubation sur la glace pour arrêter la croissance, les bactéries ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Les étapes suivantes ont été réalisées à 4°C et stérilement. Après élimination du surnageant, le culot a été repris dans 8ml de TB froid (Transformation Buffer : 10 mM PIPES ; 15 mM CaCl₂ ; 250 mM KCl ; 55 mM MnCl₂ ; pH 6,7) et incubé 10 minutes sur la glace. Les bactéries ont été ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 20 minutes à 4°C, le surnageant a été éliminé et le culot repris dans 2 ml de TB froid avec 7 % de DMSO. Après incubation sur glace pendant 10 minutes, les bactéries ont été aliquotées et stockées à -80°C.

5 Transformation de bactéries par choc thermique

Des bactéries chimiocompétentes ont été décongelées sur glace et environ 50 ng d'ADN plasmidique ont été ajoutés. Après incubation pendant 30 minutes sur glace, un choc thermique a été réalisé à 42°C pendant 1 minute suivi de 2 minutes sur glace. 1 ml de milieu LB a été ajouté et les bactéries ont été incubées 1 heure à 37°C sous agitation. Après centrifugation 5 minutes à 4000 rpm, 900 µl du surnageant ont été éliminés. Le culot a été

remis en suspension dans le surnageant restant et étalé sur boîte de LB agar contenant un agent de sélection approprié. Les bactéries ont été ensuite incubées à 37°C pendant la nuit.

6 Préparation de plasmides

Tous les plasmides ont été préparés en utilisant le kit Miniprep QIA (Qiagene) en suivant les conditions préconisées par le fournisseur.

7 Electrophorèse en gel d'agarose

Les plasmides ont été migrés sur gel d'agarose à 2% (2 g/l Agarose dans TAE 1x, composé de 40 mM TrisHCl ; 1 mM EDTA ; 20 mM Acide acétique) contenant 5 µg/ml de Bromure d'Ethidium. La migration a été effectuée dans du tampon TAE pendant 25 minutes à 100V.

8 Détermination de la concentration de l'ADN

La concentration de l'ADN plasmidique ainsi que sa pureté ont été déterminées par lecture de l'absorbance de la solution à 260 nm. Une unité de DO correspond à 50 µg d'ADN double brin.

La pureté de la solution a été déterminée par le ratio de la DO_{260nm} / DO_{280nm} . Une solution d'ADN est considérée pure lorsque ce ratio est compris entre 1,8 et 1,9. Un ratio inférieur à 1,8 indique la présence de protéines alors qu'un ratio supérieur à 1,9 montre la présence d'ARN. Nous avons obtenu des ratios de DO_{260}/DO_{280} entre 1.8 et 1.9, ce qui indique que les plasmides ne contiennent pas de contaminants protéiques ou d'ARN et que leur degré de pureté permet leur utilisation pour des transfections de cellules eucaryotes.

9 Génération d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques

Des lapins ont été immunisés avec des phospho-peptides afin d'induire la production d'anticorps anti-phosphotyrosine.

9.1 Peptides

La séquence de la protéine Rad51 humaine est présentée ci-dessous :

1	MAMQMQLLEAN	ADTSVEEESF	GPQPISRLEQ	CGINANDVKK	LEEAGFHTVE
51	AVAYAPKKEL	INIKGISEAK	ADKILAEAAK	LVPMGFTTAT	EFHQRRSEII
101	QITTGSKELD	KLLQGGIETG	SITEMFGEFR	TGKTQICHTL	AVTCQLPIDR
151	GGGEGKAMYI	DTEGTFRPER	LLAVAERYGL	SGSDVLDNVA	YARAFNTDHQ
201	TQLLYQASAM	MVESRYALLI	VDSATALYRT	DYSGRGELSA	RQMHLARFLR
251	MLLRLADEFG	VAVVITNQVV	AQVDGAAMFA	ADPKKPIGGN	IIAHASTTRL
301	YLRKGRGETR	ICKIYDSPCL	PEAEAMFAIN	ADGVGDAKD	

Des peptides pY54, pY301 et pY315 contenant dans leur séquence respectivement les tyrosines en position 54, 301 et 315 phosphorylées ont été choisis dans la séquence de Rad51. Ces trois peptides sont représentés en couleur dans la séquence de Rad51. La synthèse des phosphopeptides ainsi que les peptides non phosphorylés correspondants et un peptide pY315 plus court (pY315c) a été réalisée par la société NéoMPS (Néosystem). La séquence du peptide pY315c est la suivante : KIYDSPC.

Les peptides phosphorylés pY54 et pY315 ont été utilisés par la même société pour l'immunisation de lapins afin de générer des anticorps anti-phosphotyrosine. Ces peptides, ainsi que les peptides non phosphorylés correspondants et le peptide pY315c, ont servi par la suite à la purification de ces anticorps anti-phosphotyrosine par chromatographie d'affinité et à l'évaluation de leur spécificité. Le peptide pY301 a été utilisé comme peptide contrôle.

9.2 Immunisation des lapins

Les peptides ont été couplés à une protéine porteuse, l'ovalbumine. Le peptide pY54 a été conjugué à l'ovalbumine en utilisant le réactif MBS (m-Maleimido benzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) qui réagit avec le groupement thiol de la cystéine ajoutée à l'extrémité C-terminale du peptide pendant la synthèse. Un résidu tyrosine a été ajouté du côté carboxyterminal du peptide pY315. Le groupement phénol de cette tyrosine sert au couplage de ce peptide à l'ovalbumine grâce au réactif BDB (bis diazo-benzidine).

Deux lapins ont été immunisés avec chaque peptide phosphorylé. L'immunisation s'est déroulée selon le programme suivant:

Peptide	Immunisation		Prélèvement de sang	
	Jour	Date	Jour	Date
Y54P	1. J0	29/01/04	1. pré-immun J0	29/01/04
	2. J14	12/02/04		
	3. J28	26/02/04	2. petit J39	08/03/04
	4. J55	25/03/04	3. grand J67	05/04/04
Y315P			4. final J82	20/04/04
	1. J0	05/06/03	1. pré-immun J0	05/06/03
	2. J14	19/06/03		
	3. J28	03/07/03	2. petit J39	14/07/03
	4. J56	31/07/03	3. grand J67	11/08/03
	5. J70	14/08/03	4. final J82	26/08/05

Tableau 2.2 : Programme d'immunisation des lapins avec les peptides pY54 et pY315

La présence et l'évolution de la spécificité des anticorps anti-phosphotyrosine ont été suivies sur puces à peptides après chaque prélèvement de sang des lapins. La purification des anticorps a été réalisée à partir de la saignée finale.

9.3 Préparation de puces à peptides

Les puces à peptides ont été préparées avec le spotteur manuel MicroCASTER 8-Pin System (Schleicher&Schnell). Des concentrations croissantes des peptides d'immunisation pY54 et pY315, ainsi que des peptides non phosphorylés correspondants, ont été déposés sur membrane de nitrocellulose. Deux contrôles ont également été déposés : le peptide pY301 et la phospho-BSA. Le peptide non phosphorylé Y301 et la BSA non phosphorylée ont également été spottés sur la puce. Pour chaque concentration deux spots avec un ou deux dépôts, ont été réalisés.

Le plan des puces à peptide est représenté ci-dessous :

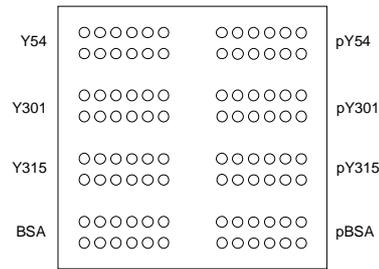


Figure 2.1 : Plan des puces à peptides

Le spotteur manuel dépose entre 3 et 10 nl de solution par spot. Les dilutions utilisées ainsi que la quantités de peptides déposées sont regroupées dans le tableau suivant :

Dilution	1 mg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	100 ng/ml	10 ng/ml
Quantité de peptide déposée 1 dépôt	3 – 10 ng	0,3 – 1 ng	30 – 100 pg	3 – 10 pg	0,3 – 1 pg	30 – 100 fg
Quantité de peptide déposée 2 dépôts	6 - 20 ng	0,6 – 2 ng	60 – 200 pg	6 – 20 pg	0,6 – 2 pg	60 – 100 fg

Tableau 2.3 : Quantités de peptides déposées sur la puce à peptides

9.4 Purification d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques

La purification des anticorps anti-phosphopeptide a été réalisée avec le kit SulfoLink (Pierce). Les billes d'agarose sont fournies dans 50% de tampon contenant 10 mM EDTA-Na ; 0,05% NaN₃ ; 50% glycérol.

9.4.1 Couplage peptide – colonne

Le gel de couplage SulfoLink permet l'immobilisation covalente de peptides contenant des groupements thiol. Les groupements iodoacétyle du gel de couplage réagissent spécifiquement avec des groupements thiol libres du peptide pour former une liaison thioether covalente. De plus, l'espaceur de 12 atomes qui relie les billes d'agarose au groupement

iodoacétyle réduit l'encombrement stérique et favorise ainsi l'interaction de molécules avec le peptide couplé.

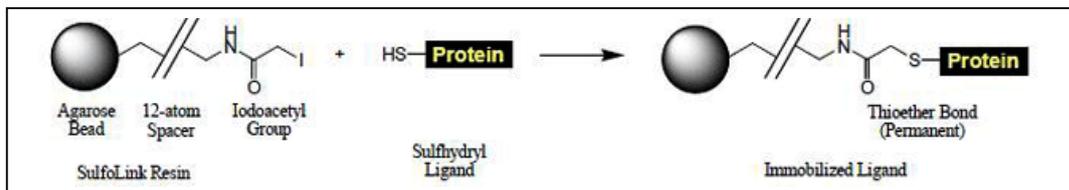


Figure 2.2 : Immobilisation de peptide sur le gel de couplage

4 mg de chacun des peptides Y54, pY54, Y315 et pY315 ont été dissous dans 2 ml de Coupling Buffer (50 mM TrisHCl ; 5 mM EDTA-Na pH 8,5). Après équilibration avec le Coupling Buffer, une colonne SulfoLink a été incubée pendant 45 minutes avec une solution peptidique. Après lavage avec le Coupling Buffer, les sites non spécifiques du gel non liés par le peptide ont été bloqués avec 0,05 M L-Cysteine HCl. La colonne a été lavée ensuite avec du PBS et stockée à 4°C avec du PBS-azide 0,05% jusqu'à son utilisation pour la purification des anticorps anti-phosphopeptide.

L'efficacité de couplage des peptides à la colonne a été déterminée par lecture et comparaison de l'absorbance à 280 nm des solutions peptidiques avant et après couplage à la colonne. L'efficacité de couplage a été exprimée en pourcentage par le rapport entre la DO du peptide avant couplage et celle après couplage.

9.4.2 Purification des anticorps anti-pY54 et anti-pY315

Le sérum a été filtré, dilué au demi avec du PBS et appliqué sur la colonne d'affinité par fractions de 1,5 ml. Chaque fraction a été incubée 30 minutes avec les billes SulfoLink. Une fois la totalité du sérum incubée, la colonne a été lavée au PBS. Les anticorps retenus ont été élués par fractions de 0,5 ml avec 100 mM de glycine, pH 2,9 et le pH de chaque fraction a été neutralisé avec du Tris 1 M pH 8,9. La présence d'anticorps dans les fractions a été recherchée par lecture de la densité optique à 280 nm, longueur d'onde d'absorption maximale des protéines. Après lavage de la colonne au PBS, celle-ci a été stockée dans du PBS-azide 0,05% à 4°C.

Les anticorps anti-phosphotyrosine ont été stockés à -20°C avec 0,2% BSA et 0,09% azide.

9.4.2.1 Principe de purification

La purification des anticorps anti-phosphotyrosine d'intérêt a été réalisée en deux ou trois étapes successives de chromatographies d'affinité. Le sérum a été d'abord appliqué sur une colonne couplée au peptide phosphorylé. Les anticorps élués ont été ensuite appliqués sur une colonne couplée au peptide nonphosphorylé correspondant. Une troisième colonne couplée à un phosphopeptide différent du peptide d'immunisation a été utilisée pour la purification de l'anticorps anti-pY315. La spécificité et l'affinité des anticorps ont été vérifiées sur puce à peptide après chaque étape de chromatographie.

10 Test de viabilité cellulaire au MTT

5 000 cellules par puits ont étéensemencées dans 200µl de DMEM dans une plaque 96 puits et incubées avec des concentrations croissantes de différents médicaments induisant des CDB de l'ADN. Après incubation de 72 heures, 20 µl de MTT à 5 mg/ml ont été ajoutés par puits et incubés pendant 2 heures à 37°C. Le milieu a été aspiré et 200 µl de DMSO ont été ajoutés par puits. Après homogénéisation, la DO a été lue à 540 nm.

11 Transfection de cellules

11.1 Transfection transitoire

Deux réactifs ont été testés pour réaliser des transfections transitoires : DreamFect Gold (OZ Biosciences) et FuGENE6 (Roche).

11.1.1 DreamFect Gold

200 000 cellules HeLa ont étéensemencées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% SVF sans antibiotiques, puis co-transfectées 24 heures après avec un ratio de 4 µl de réactif DreamFect Gold pour 1 µg de plasmide. 16 µl de réactif et 2 µg de chaque plasmide ont été utilisés pour réaliser des co-transfections. Le protocole préconisé par le fournisseur a

été suivi. L'ADN et le DreamFect Gold ont été dilués séparément dans du DMEM sans SVF et sans antibiotiques et ensuite l'ADN dilué a été ajouté au réactif. Après incubation du mélange pendant 20 minutes à température ambiante, le complexe ADN-réactif a été ajouté aux cellules goutte par goutte. Les cellules ont été incubées 24 heures à 37°C.

11.1.2 FuGENE 6

Les cellules ont étéensemencées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% SVF sans antibiotiques un jour avant la transfection. Nous avons utilisé 2µg de plasmide et 6 µl de FuGENE 6 pour transfecter 200 000 cellules avec un ratio de FuGENE 6 : ADN de 3:1. Pour un ratio de 3:2, 4 µg de plasmide ont été transfectés avec 6 µl de FuGENE 6. Le réactif de transfection FuGENE 6 a été dilué dans du DMEM sans SVF et sans antibiotiques et incubé pendant 5 minutes. L'ADN plasmidique a été ensuite ajouté et incubé pendant 20 minutes afin de permettre la formation des complexes FuGENE 6-ADN. Ces complexes ont été ajoutés ensuite aux cellules goutte par goutte. Les cellules ont été incubées pendant 24h pour permettre l'expression des protéines recombinantes et elles ont été lysées par la suite.

Pour effectuer une co-transfection des cellules HeLa, les plasmides ont été mélangés avant l'ajout dans le milieu et une quantité double de FuGENE 6 a été utilisée.

11.2 Transfection stable

La transfection stable des cellules a été réalisée avec le réactif FuGENE 6 de la même manière que la transfection transitoire. Nous avons sélectionné les cellules transfectées en ajoutant au milieu de culture un agent de sélection, la geneticine (G418). Le plasmide PS2141 EGFP-Rad51 utilisé pour la transfection porte un gène de résistance au G418, qui permet aux cellules transfectées stablement de survivre dans les conditions de sélection.

11.2.1 Détermination de la sensibilité des cellules HeLa au G418

Afin de déterminer la sensibilité des cellules HeLa à l'agent de sélection G418, des cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant des concentrations croissantes de G418. Le milieu a été changé régulièrement afin d'éliminer les cellules mortes. La concentration de

G418 retenue pour la sélection des cellules transfectées était celle qui après 10 jours de culture provoque le décollement des cellules de leur support sans induire leur mort.

11.2.2 Sélection de clone transfecté

Après transfection, les colonies ont été sélectionnées en ajoutant 1 mg/ml d'agent de sélection G418 au milieu de culture. Des cellules non transfectées ont également été cultivées en présence de G418 et ont servi de témoins. La sélection a été maintenue pendant 10 à 15 jours. La présence de colonies exprimant la protéine EGFP-Rad51 de manière stable a été recherchée par Western Blot. Les cellules ont été lysées dans du tampon EBC et le niveau d'expression de EGFP-Rad51 a été comparé entre les clones. La colonie exprimant le taux le plus élevé de EGFP-Rad51 a été choisie et maintenue en culture dans du milieu DMEM complet supplémenté de 1 mg/ml de G418.

12 Fixation de cellules

5 000 cellules ont étéensemencées par puits sur lame en verre (Lab-Tek Chamber Slide System, NUNC). Après traitement les cellules ont été lavées au PBS et fixées pendant 10 minutes avec un mélange méthanol : acétone 1:1 à -20°C. Après lavage au PBS, une solution de Hoescht 3342 a été ajoutée et incubée pendant 10 minutes. Les puits sont ensuite enlevés. Une lamelle a été collée sur la lame, sur laquelle ont été préalablement déposés 50-100 µl de milieu de montage (10% glycérol dans du PBS). Les lames ont été ensuite observées avec un microscope à fluorescence (Leica).

13 Lyse des cellules

Les cellules ont été lysées en suivant le protocole modifié de Chen et collègues (Chen et al, 1999b). Après deux lavages au PBS froid, les cellules ont été incubées 20 minutes avec du tampon de lyse EBC (50 mM TrisHCl pH 7,6 ; 120 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 0,5% NP-40 ; 1 mM β-Mercaptoethanol ; 50 mM NaF ; 1 mM Na₃VO₄ ; 1 mM PMSF ; 1/100 Protease Inhibitor Cocktail) sous agitation dans la chambre froide. Les cellules ont été récupérées ensuite avec un râteau. Le tampon RIPA, composé de 50 mM TrisHCl pH 8 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 0,25% Na-DOC ; 1% NP-40 ; 10 mM NaF ; 1 mM Na₃VO₄ ; 1 mM PMSF ; 1/100 Protease Inhibitor Cocktail, a été utilisé pour la lyse de cellules pour la réalisation

d'immunoprécipitations. Les cellules ont été soniquées par sonde ultrason à amplitude 60%, 20 pulses. Après centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm à 4°C, le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube.

14 Fractionnement cellulaire

Les cellules ont été lavées deux fois au PBS froid. Elles ont été trypsinées et lavées deux fois au PBS. Les cellules ont été lavées ensuite avec cinq fois leur volume de tampon A (10 mM HEPES pH 7.9 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 10 mM KCl ; 0,5 mM DTT) et centrifugées à 5 000 rpm, 5 minutes à 4°C. Les cellules ont été incubées sur glace pendant 10 minutes avec deux fois leur volume de tampon A additionné de 0,1% NP-40 et ensuite homogénéisées. Le surnageant, récupéré après centrifugation à 5 000 rpm, 5 minutes à 4°C correspond à la fraction cytoplasmique.

Le culot a été lavé deux fois avec 1ml de tampon A et centrifugé à 5 000 rpm, 5 minutes à 4°C. Le culot a été incubé ensuite avec deux fois son volume de tampon C (20 mM HEPES pH 7,9 ; 25% glycerol ; 0,42 M NaCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM EDTA ; 0,5 mM DTT ; 1 mM Na₃VO₄ ; 1 mM PMSF ; 1/100 Protease Inhibitor Cocktail) pendant 15 minutes sous agitation à 4°C. Après centrifugation à 14 000 rpm, 15 minutes à 4°C le surnageant qui correspond à la fraction nucléoplasmique a été récupéré.

Le culot a été lavé ensuite deux fois avec 1ml de tampon C et centrifugé à 14 000 rpm, 15 minutes à 4°C. En fonction du volume du culot 50 à 75 µl de Buffer C ont été ajoutés et le culot a été soniqué à amplitude 70%, 24 pulses. La fraction obtenue est la fraction de protéines liée à la chromatine.

15 Immunoprécipitation

Le Immunoprecipitation Starter Pack (Amersham Biosciences) a été utilisé pour réaliser les immunoprécipitations. Le Immunoprecipitation Starter pack est composé de matrices d'affinité Protein A Sepharose 4 Fast Flow et de Protein G Sepharose 4 Fast Flow dans lesquelles la Protéine A native ou la Protéine G recombinante sont immobilisées sur la Sepharose 4 Fast Flow.

L'extrait protéique des cellules a été incubé avec l'anticorps pendant 1 heure ou toute la nuit. Après lavage avec du tampon RIPA, 50 µl de Protein A Sepharose 4 Fast Flow ou de Protein G Sepharose 4 Fast Flow ont été ajoutés au complexe antigène – anticorps. Après 1 heure d'incubation et lavage avec 50 mM Tris pH 8, les complexes immuns ont été dissociés par chauffage de 3 minutes à 95°C en présence de 15 µl de Sample Buffer (50 mM Tris pH 7,5 ; 100 mM DTT ; 1% SDS). 5µl de tampon de charge 4X (62,5 mM Tris HCl pH 6,8 ; 20% Glycérol ; 2% SDS; 0,7M β-Mercaptoethanol ; 0,05% Bleu de bromophénol) ont été ajoutés afin de permettre l'analyse des immunoprécipitats par Western Blot.

16 Précipitation de protéines au TCA

Afin de précipiter les protéines contenues dans une solution, 0,02% de Na-Doc ont été ajoutés et incubés pendant 20 minutes à 4°C. 10% d'acide trichloroacétique ont été ajoutés au mélange et incubés pendant 20 minutes à 4°C. Après centrifugation à 13 000 rpm, pendant 15 minutes à 4°C, deux lavages à l'acétone ont été réalisés par centrifugation 13 000 rpm, pendant 10 minutes à 4°C. Les culots ont été séchés à l'air et resuspendus dans du tampon contenant 50 mM Tris pH 7.5 ; 100 mM DTT ; 1% SDS.

17 Dosage protéique

La quantité de protéines dans les extraits de cellules ainsi que la concentration de la protéine Rad51 purifiée ont été dosées par la méthode de Bradford. Le réactif de Bradford (Bio-Rad) a été dilué au cinquième avec de l'eau distillée. Les extraits cellulaires ont été dilués au dixième avec de l'eau distillée afin d'éviter la réaction non spécifique du NP-40 du tampon d'extraction avec le réactif de Bradford. La BSA à 2 mg/ml a été utilisée pour la réalisation de la gamme d'étalonnage.

18 SDS-PAGE / WB

Les protéines ont été séparées sur gel d'acrylamide dénaturant (SDS-PAGE). Les compositions du gel de séparation et du gel de concentration sont les suivantes : gel de séparation à 10% - 10% Acrylamide ; 375 mM TrisHCl pH 8,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ;

TEMED ; gel de concentration – 4,5% Acrylamide ; 250 mM TrisHCl pH 6,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; TEMED. Les échantillons ont été dilués au quart dans du tampon de charge 4X de manière à obtenir des concentrations protéiques équivalentes. Des quantités de protéines équivalentes ont été déposées sur gel d'acrylamide et migrées d'abord 20 minutes à 80V suivi d'environ 100 minutes à 120 V dans du tampon de migration (3 g/l Tris ; 14,4 g/l Glycine ; 1 g/l SDS pH entre 8,3 – 8,6). Des protéines marqueurs de poids moléculaire pré colorées (Bio-Rad, Precision Plus Protein Standards All Blue) ont également été déposées.

Après leur séparation, les protéines ont été électrotransférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham) pendant la nuit à 90 mA dans du tampon de transfert composé de 3 g/l Tris ; 14,4 g/l Glycine ; 20% Ethanol. L'efficacité de transfert a été vérifiée par coloration des membranes au Rouge Ponceau (10 mM Tris HCl pH 7,4 ; 9 g/l NaCl ; 0,1% Tween20).

La saturation des sites de liaison non spécifiques de la membrane a été effectuée avec un agent de blocage (Amersham) 2% dans du TBST (10 mM Tris HCl pH 7,4 ; 9 g/l NaCl ; 0,1% Tween20) pour les anticorps de lapin ou avec de la BSA 2% dans du TBST pour les anticorps de souris. Après 60 minutes de blocage, les membranes ont été lavées rapidement au TBST et incubées avec l'anticorps primaire en suivant les conditions du tableau 2.4. Les membranes ont été ensuite lavées trois fois au TBST et incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris pendant 45 minutes. Les anticorps secondaires sont couplés à un fluorophore AlexaFluor 680 ou IRDye800 émettant respectivement à une longueur d'onde de 680 nm pour l'anticorps anti-souris et de 780 nm pour l'anticorps anti-lapin. Après trois lavages au TBST, les membranes ont été scannées avec le scanner de fluorescence infrarouge Odyssey (LI-COR Biosciences) qui détecte directement la fluorescence infrarouge des anticorps secondaires. Ce scanner possède deux canaux infrarouge ce qui permet une multidétection des signaux des anticorps de souris et de lapin sur la même membrane. L'analyse quantitative des signaux est également possible avec le logiciel du scanner.

Des anticorps anti- β -actine et anti- α -tubuline ont été utilisés afin de s'assurer que la quantité de protéines déposées dans les pistes du gel est équivalente.

	Anticorps, concentration	Organisme	Dilution pour WB
Anticorps primaires monoclonaux	Ac anti Rad51 1mg/ml	souris	1/10 000
	Ac anti-c-Abl 1mg/ml		1/500
	Ac anti- β -actine 2,4 mg/ml		1/1 000
	Ac anti- α -tubuline 1 mg/ml		1/10 000
	Ac anti-topoisomerase I 1 mg/ml		1/1 000
Anticorps primaires polyclonaux	Ac anti-H2AX 1mg/ml	lapin	1/5 000
	Ac anti-HA 1 mg/ml		1/250
	Ac anti-pY54		1/500
	Ac anti-pY315		1/500
Anticorps secondaires	Ac anti-GST 0,25 mg/ml	chèvre	1/500
	Ac anti-souris AlexaFluor 700		1/10 000
	Ac anti-lapin IRDye 800		1/10 000

Tableau 2.4 : Anticorps et dilutions utilisés pour la révélation des Western blots

19 Précipitation au GST

Des extraits cellulaires ont été incubés avec 100 μ l de billes glutathione-agarose à 50% (préalablement lavées avec du tampon de lyse) pendant 2 heures à 4°C sous agitation pour éliminer les interactions aspécifiques entre les billes et les protéines de l'extrait. Les extraits ont été centrifugés pour éliminer les billes d'agarose et transférés dans de nouveaux tubes. 10 μ g de peptide de fusion GST-domaine SH2 de c-Abl ont été ajoutés par tube et incubés pendant 2 heures à 4° sous agitation. Après quatre lavages au tampon de lyse (20 mM TrisHCl pH 8 ; 200 mM NaCl ; 0,5% NP-40 ; 1 mM EDTA ; 1 mM PMSF), un volume de tampon de chargement SDS 2x égal au billes a été ajouté dans chaque tube et chauffé à 90°C pour dissocier les protéines. Les protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE 10% et transférées sur membrane. Les anticorps anti-pY315 et anti-GST ont été utilisés pour la révélation de la membrane.

20 Purification de HsRad51

20.1 Culture bactérienne

Des bactéries chimiocompétentes BL21 (DE3) pLys ont été transfectées avec le plasmide pET15b-HsRad51 et incubées la nuit à 37°C sur du LB-agar additionné d'ampicilline 100 µg/ml et de chloramphenicol 30 µg/ml. Deux litres de LB additionnés d'ampicilline 100 µg/ml et de chloramphenicol 30 µg/ml ont été inoculés ensuite avec la totalité du tapis bactérien et cultivés à 30°C sous agitation jusqu'à atteindre une densité optique de 0,6 à 600 nm. L'expression de la protéine recombinante a été alors induite en ajoutant de l'IPTG 1mM. Après culture à 30°C sous agitation pendant environ 18 heures, les bactéries ont été centrifugées, le surnageant éliminé et les culots stockés à -20°C.

20.2 Sonication des bactéries transformées

Après décongélation, les culots ont été dissous dans 20ml de tampon A (50 mM TrisHCl pH 8 ; 500 mM NaCl ; 5 mM Imidazole ; 10% Glycérol ; 5 mM β-Mercaptoéthanol) et soniqués par ultrason à trois reprises pendant une minute 45 secondes à amplitude 70%. Des temps de pause ont été faits entre les sonications afin de permettre le refroidissement de la suspension. La suspension a été centrifugée ensuite pendant 30 minutes à 16 000 rpm à 4°C.

20.3 Chromatographie sur colonne NiNTA

La résine NiNTA a été lavée avec le tampon A. Le surnageant des bactéries soniquées et centrifugées a été mélangé avec la résine et incubé pendant une heure sous agitation à 4°C. Après une heure d'incubation, la colonne a été reliée au Biologic LP (Bio-Rad). La chromatographie a été effectuée selon le protocole suivant :

	Temps (min)	Tampon
Lavage	20	100% B
Gradient	45	100% B→100% C
Lavage	45	100% C
Lavage	30	100% A

Tableau 2.5 : Conditions de chromatographie sur colonne NiNTA

La composition des tampons est la suivante : Tampon B – 50 mM TrisHCl pH 8 ; 500 mM NaCl; 60 mM Imidazole ; 10% Glycérol ; 5 mM β Mercaptoéthanol. Tampon C – 50 mM TrisHCl pH 8 ; 500 mM NaCl ; 500 mM Imidazole ; 10% Glycérol ; 5 mM β -Mercaptoéthanol.

Des fractions de 1 ml ont été recueillies avec un débit de 0,33 ml/min. Les fractions contenant la protéine ont été regroupées et la quantité de protéine a été dosée par la méthode de Bradford. La protéine a été dialysée contre le tampon D (20 mM TrisHCl pH 8 ; 200 mM KCl ; 0,25 mM EDTA ; 2 mM β Mercaptoéthanol) additionné de 10% de Glycérol pendant la nuit à 4°C en présence de 1,5 unités de thrombine par milligramme de protéine. Ceci permet l'élimination du tag His en N-terminal de la protéine.

20.3.1 Purification sur colonne échangeuse d'anions

La protéine dialysée a été centrifugée pendant 10 minutes à 4 100 rpm à 4°C. Le surnageant a été chargé dans la colonne MonoQ (Amersham, GE Healthcare). La chromatographie a été réalisée selon le protocole suivant avec un débit de 0,5 ml/min et des fractions de 0,5 ml.

	Temps (min)	Tampon
Lavage	40	100% D
Gradient	20	100% D→100%E
Lavage	15	100% E
Lavage	10	100% D

Tableau 2.6 : Conditions de chromatographie sur colonne MonoQ

La composition du tampon E est la suivante - 20 mM TrisHCl pH 8; 600 mM KCl; 0,25 mM EDTA; 2 mM β Mercaptoéthanol.

La présence de la protéine a été détectée par lecture de l'absorbance UV à 280nm. Les fractions contenant la protéine purifiée ont été dialysées contre le tampon F (20 mM TrisHCl pH 8 ; 200 mM KCl ; 0,25 mM EDTA ; 5 mM DTT ; 20% Glycérol) pendant trois heures à 4°C. Après dosage protéique la protéine purifiée a été stockée à -80°C.

CHAPITRE III

III. Résultats et Discussion

La régulation des protéines chez les eucaryotes se fait souvent par phosphorylation réversible. Une même protéine peut être phosphorylée sur plusieurs sites distincts. Dans ce cas il existe différentes formes phosphorylées de la protéine et chaque phosphorylation peut avoir un effet distinct sur sa fonction. Il est donc nécessaire d'identifier les sites de phosphorylation afin de pouvoir distinguer les différentes formes phosphorylées de la protéine et d'étudier leurs rôles. Les phosphorylations se font sur des sites accessibles au solvant ou aux kinases et phosphatases. Cependant les sites de phosphorylation d'une protéine ne peuvent pas être prédits par analyse du génome humain car la phosphorylation est un processus dynamique (Goshe, 2006).

La protéine Rad51 possède dix tyrosines dans sa séquence peptidique. Des études sur un modèle tridimensionnel réalisées au laboratoire, montrent que 7 tyrosines sont exposées, donc orientées plutôt vers l'extérieur de la protéine. Selon des études antérieures, seulement deux tyrosines sont phosphorylées, en position 54 et 315 (Chen et al, 1999b; Li et al, 2002; Slupianek et al, 2001; Yuan et al, 1998). La figure 3.1 représente un monomère de Rad51 dans lequel les tyrosines 54 et 315 qui sont exposées et susceptibles d'être phosphorylées sont représentées en couleur. La tyrosine en position 301 a également été présentée car cette tyrosine a été utilisée dans nos études comme témoin négatif.

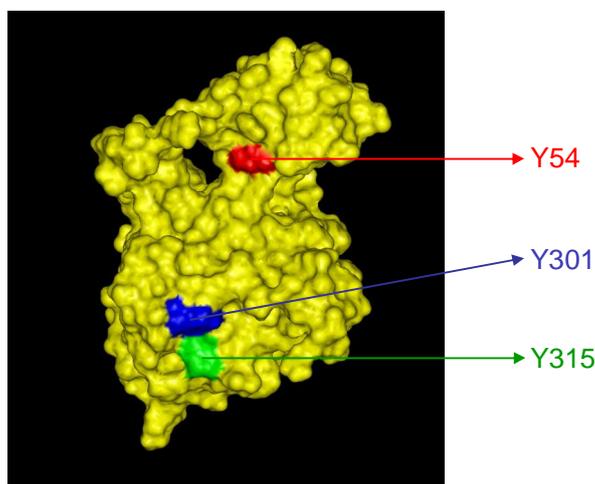


Figure 3.1 : Structure d'un monomère de Rad51. L'emplacement des tyrosines Y54, Y301 et Y315 sont indiquées en couleur : Y54 en rouge, Y301 en bleu et Y315 en vert.

Dans chacune des études antérieures un seul site de phosphorylation de Rad51 a été détecté, soit la tyrosine 54, soit la tyrosine 315. La phosphorylation de ces deux sites n'a

jamais été observée dans la même étude. La phosphorylation de la protéine Rad51 sur Y315 a été mise en évidence à l'aide de mutants non phosphorylables et d'un sérum dirigé contre un peptide contenant la tyrosine 315 phosphorylée (Chen et al, 1999b; Slupianek et al, 2001). La phosphorylation de la tyrosine 54 a été décrite par spectroscopie de masse et la phosphorylation de la tyrosine 315 n'a pas été détectée (Yuan et al, 1998).

Les connaissances sur le rôle de la phosphorylation de Rad51 sont contradictoires. D'une part cette protéine aurait des effets négatifs (Yuan et al, 1998), alors que dans d'autres études elle aurait des effets positifs sur la RH (Chen et al, 1999b; Slupianek et al, 2001).

Afin de pouvoir étudier le rôle de la phosphorylation de Rad51, il est indispensable de connaître avec certitude le nombre de phosphorylations que cette protéine peut subir ainsi que les sites exacts de phosphorylation. Il est important de déterminer comment se fait la phosphorylation – si une même molécule peut être phosphorylée que sur un des deux sites ou si elle peut être phosphorylée sur les deux sites, ainsi que les différentes formes de la protéine phosphorylée qui existent. Pour aborder cette étude il a été indispensable de développer des outils adéquats pouvant détecter spécifiquement la phosphorylation des deux tyrosines de Rad51. Nous avons élaboré des anticorps spécifiques de chaque site de phosphorylation sur tyrosine.

Ainsi la première partie de ce travail a consisté à la purification des anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques. Ces anticorps reconnaissent spécifiquement la phosphorylation des tyrosines en position 54 ou 315. Nous avons ensuite recherché un modèle cellulaire adapté à l'étude de la phosphorylation de Rad51. N'ayant pas réussi à détecter la phosphorylation de Rad51 dans les extraits totaux de cellules traitées, nous nous sommes tournés vers des approches d'enrichissement de la protéine. Ainsi nous avons déterminé les conditions optimales d'immunoprécipitation de la protéine Rad51 à partir d'extraits de cellules traitées avec un agent génotoxique. Cette approche ne s'est pas montrée efficace pour enrichir la quantité de Rad51 et nous n'avons pas pu observer la phosphorylation de Rad51. Nous avons alors surexprimé Rad51 et la kinase c-Abl dans des cellules. Cette méthode nous a permis de détecter la phosphorylation de Rad51 à l'aide de nos anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques. Nous avons ainsi démontré avec certitude les sites de phosphorylation de Rad51 sur tyrosine et nous avons déterminé les formes existantes de phospho-Rad51. Nous avons ensuite abordé l'étude du rôle de la phosphorylation en analysant la localisation intracellulaire

des différentes formes de Rad51 phosphorylée. Nous avons également élaboré une lignée cellulaire qui exprime de manière stable la protéine de fusion naturellement fluorescente EGFP-Rad51 et qui permet la visualisation de la formation de foci.

1 Elaboration d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques

La technique la plus directe pour l'étude de la phosphorylation d'une protéine sur tyrosine est le Western blot. Toutefois la détection de la phosphorylation sur tyrosine n'est rendue possible qu'avec un anticorps anti-phosphotyrosine spécifique du site d'intérêt. Plusieurs anticorps anti-phosphotyrosine commerciaux sont disponibles. Cependant un tel anticorps reconnaît évidemment toutes les tyrosines phosphorylées d'une protéine et ne peut donc pas distinguer les différents sites de phosphorylation. On obtiendra une ou plusieurs bandes correspondant aux différentes formes de phosphorylation de la protéine mais cela ne permettra pas d'identifier le site de phosphorylation. Pour remédier à l'absence d'anticorps commerciaux dirigés contre les formes phosphorylées de Rad51, la première partie de ce travail a été consacrée à l'élaboration d'anticorps anti-phosphoY54 et anti-phosphoY315 reconnaissant spécifiquement et séparément les tyrosines 54 et 315 dans leur état phosphorylé. Pour cela nous avons choisi dans la séquence de Rad51 des phosphopeptides contenant phospho-Y54 ou phospho-Y315. Ces peptides ont été synthétisés et couplés à la protéine porteuse ovalbumine par la société NéoMPS (Néosystem). La même société a réalisé les immunisations de lapins avec ces phosphopeptides-protéines porteuses selon le programme décrit dans le chapitre "Matériel et méthodes", page 65. Plusieurs prélèvements sanguins ont été effectués au cours de l'immunisation. Ces prélèvements nous ont permis de suivre la production et l'évolution des anticorps anti-phosphotyrosine. Nous avons ensuite purifié les anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques de pY54 ou de pY315 par des chromatographies d'affinité successives à partir des sérums des saignées finales.

1.1 Synthèse des peptides

Les peptides pY54 et pY315 que nous avons choisis pour les immunisations des lapins, ainsi que les peptides Y54, pY301, Y315, et pY315c ont été synthétisés par la société NéoMPS (Néosystem). Ces peptides ont été nécessaires pour la purification des anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques, ainsi que pour l'évaluation de leur spécificité sur puce à peptides. La séquence, le degré de pureté vérifiée par HPLC et le poids moléculaire des peptides sont regroupés dans le tableau suivant :

Peptide	pY54	pY301	pY315
Séquence	TVEAVAY(PO ₂ H ₃)APKK ELINIKGIC	RLY(PO ₂ H ₃)LRKGRGETR IC	KIY(PO ₂ H ₃)DSPCLPEAEA MFY
Pureté	> 85%	> 80%	> 90%
Poids Moléculaire	2239 Da	1800 Da	1956 Da

Peptide	Y54	Y301	Y315
Séquence	TVEAVAYAPKKELINIK GIC	RLYLRKGRGETRIC	KIYDSPCLPEAEAMFY
Pureté	> 60%	> 80%	> 65%
Poids Moléculaire	2159 Da	1775 Da	1805 Da

Peptide	pY315c
Séquence	KIY(PO ₂ H ₃)DSPC
Pureté	95.1%
Poids Moléculaire	905 Da

Tableau 3.1 : Caractéristiques des peptides synthétisés. Les acides aminés en italique ont été ajoutés à la séquence peptidique pour permettre le couplage du peptide à la protéine porteuse ou à la colonne d'affinité et ne font pas partie de la séquence de Rad51.

Les peptides de petite taille injectés dans un animal réagissent souvent comme des haptènes. Ces molécules de petite taille peuvent être reconnues par le système immunitaire mais elles sont incapables d'engendrer une réponse immunitaire. Afin d'être rendues immunogènes, elles doivent être couplées à une protéine porteuse qui dans notre cas est l'ovalbumine. Pour permettre le couplage chimique à l'ovalbumine, des résidus cystéine ou tyrosine ont été ajoutés du côté C-terminal des peptides. La conjugaison du peptide à la protéine porteuse par un résidu terminal assure que la longueur totale du peptide soit disponible comme antigène pour induire la génération d'anticorps. Ainsi une cystéine a été ajoutée à la séquence des peptides pY54 et pY301. Le peptide pY315 possède une cystéine au milieu de sa séquence. Afin d'éviter que la conjugaison de ce peptide avec la protéine se fasse

par cette cystéine, une tyrosine a été ajoutée du côté C-terminal et un autre réactif de conjugaison a été utilisé.

1.2 Réalisation de puces à peptides

La spécificité d'un anticorps peut être évaluée en utilisant des puces à peptides. Cette méthode a été utilisée auparavant pour étudier la spécificité d'un anticorps anti-tyrosine général en déposant sur puce des peptides contenant des phospho-thréonines, phospho-sérines, phospho-tyrosines et des peptides non phosphorylés (Xu et al, 2007). Nous avons utilisé une approche similaire pour suivre l'évolution de l'immunisation des lapins avec les phosphopeptides et la spécificité des sérums. Des puces à peptides ont été utilisées également pour déterminer la spécificité des anticorps anti-phosphotyrosine que nous avons purifiés. La technologie des puces offre l'avantage de réduire les volumes déposés à quelques nanolitres. Ainsi des quantités de quelques femtogrammes à quelques picogrammes de peptides ont été déposés sur les puces à peptides.

Le plan des puces est présenté dans le chapitre "Matériel et méthodes, Préparation des puces à peptides", page 66. Sur les puces les peptides phosphorylés et les peptides non phosphorylés correspondants ont été déposés. Deux contrôles ont été utilisés – le peptide pY301 et la phospho-BSA. Le peptide pY301 contient dans sa séquence la tyrosine en position 301 qui est située à la surface de la protéine Rad51, à proximité du site Y315 (fig. 3.1). Dans le peptide pY301 cette tyrosine est phosphorylée et constitue un bon contrôle de la spécificité des anticorps purifiés pour leur site phosphorylé correspondant par rapport aux autres tyrosines de la protéine. La phospho-BSA qui est phosphorylée sur un grand nombre de tyrosines a été utilisée comme deuxième contrôle. Elle permet de s'assurer que les anticorps purifiés ne reconnaissent pas des tyrosines phosphorylées sur d'autres protéines.

1.3 Choix du sérum pour la purification des anticorps

Les prélèvements sanguins réalisés au cours de l'immunisation des lapins avec les phosphopeptides permettent de suivre l'évolution des propriétés des anticorps générés dans les animaux au cours du temps. Un prélèvement contrôle avant le début des immunisations et deux prélèvements après la troisième et après la quatrième immunisation ont été effectués, suivis de la saignée finale. Ainsi trois prélèvements ont été réalisés avant la saignée finale.

Nous avons analysé la spécificité et l'affinité de ces prélèvements sur les puces à peptides que nous avons préparées. Les intensités des spots sur les puces, reflétant l'intensité de reconnaissance par l'anticorps, ont été mesurées et représentées sur histogramme. Avant l'immunisation il n'y a pas d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques. Les intensités des spots ont été donc exprimées en pourcentage par rapport à l'intensité de reconnaissance du phosphopeptide d'immunisation du deuxième prélèvement sanguin qui a été considéré comme étant 100%. Ceci nous a permis de choisir le sérum présentant l'affinité la plus forte pour le phosphopeptide d'immunisation qui a été utilisé par la suite pour la purification des anticorps.

1.3.1 Sérums anti-pY54

La spécificité des sérums, prélevés au cours de l'immunisation des lapins L345 700 et L345 705 avec le peptide pY54, pour les différents peptides et protéines déposés sur puces à peptides est représentée sur la figure 3.2.

Avant le début des immunisations (J0), les systèmes immunitaires des deux lapins ne reconnaissent aucun des phosphopeptides ou de leurs équivalents non phosphorylés, ni la phospho-BSA. Ceci indique qu'aucun anticorps anti-phosphotyrosine n'est présent dans le sérum des lapins avant la première immunisation.

Après immunisation, les sérums des deux lapins reconnaissent le peptide pY54 ce qui montre la présence d'anticorps anti-pY54. La quantification des spots montre que la reconnaissance du peptide d'immunisation pY54 augmente après chaque immunisation et est maximale dans la saignée finale.

Le sérum du lapin L345 700 reconnaît le peptide pY54, mais également les peptides Y54 et pY315 et la phospho-BSA avec une affinité moins forte.

Le sérum du lapin L345 705 est plus spécifique que celui du lapin L345 700. En effet, le sérum de ce lapin reconnaît uniquement le peptide Y54 phosphorylé et non phosphorylé. De plus dans la saignée finale la reconnaissance du peptide pY54 est plus forte comparée à celle du lapin L345 700. Nous avons donc choisi le sérum du lapin L345 705 pour la purification des anticorps anti-pY54.

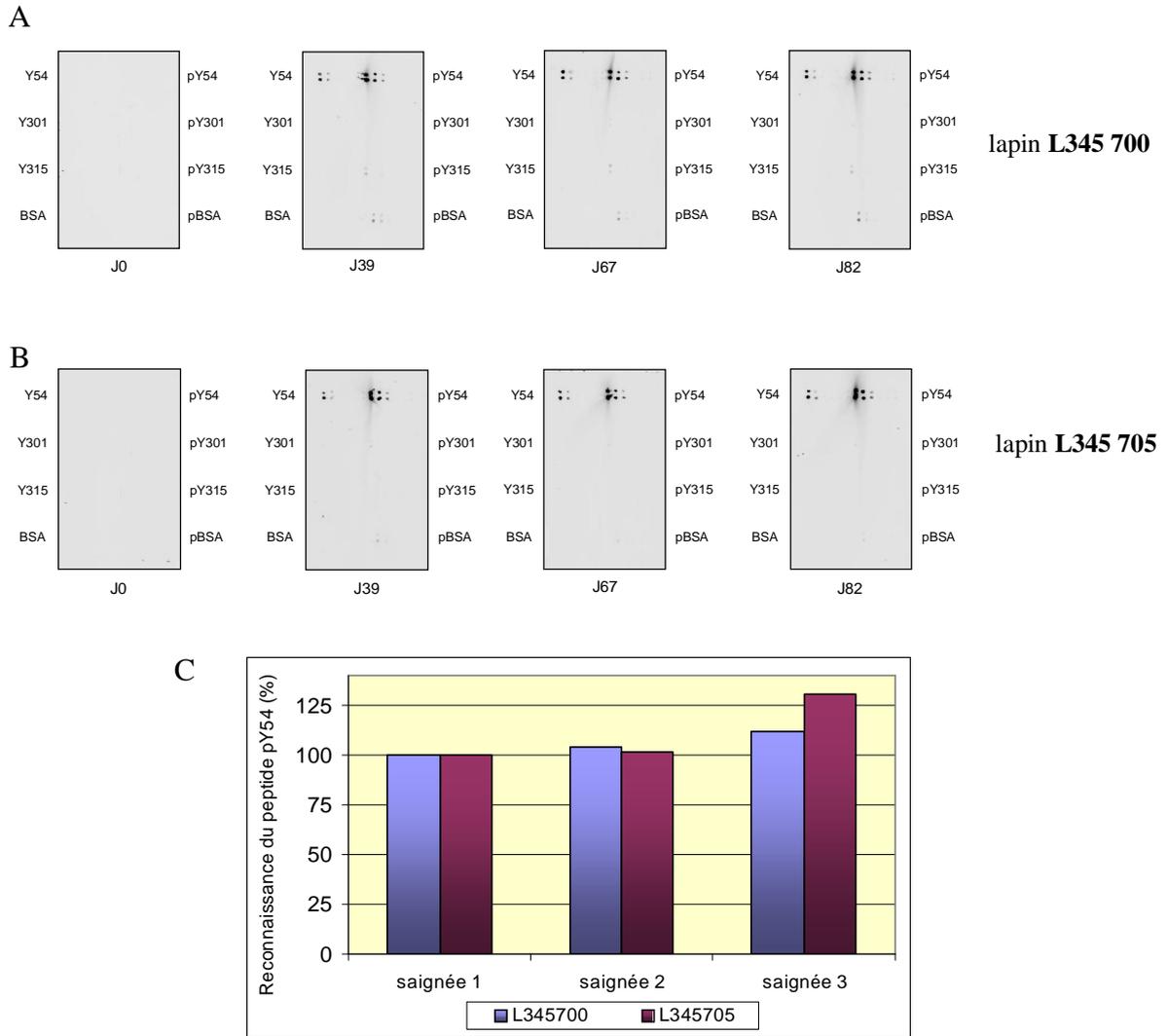


Figure 3.2 : Spécificité des sérums des lapins immunisés avec le peptide pY54. Révélation de puces à peptides spottées avec différents peptides et protéines avec les sérums du lapin L345 700 (A) et L345 705 (B). Affinité relative des sérums des deux lapins pour le peptide pY54. Les signaux sur les puces à peptides ont été quantifiés et représentés par rapport à la reconnaissance du peptide pY54 après la première immunisation (C).

1.3.2 Sérums anti-pY315

La même analyse a été réalisée avec les lapins L111 65 et L111 84 immunisés avec le peptide pY315. Les puces à peptides sont représentées dans la figure 3.3.

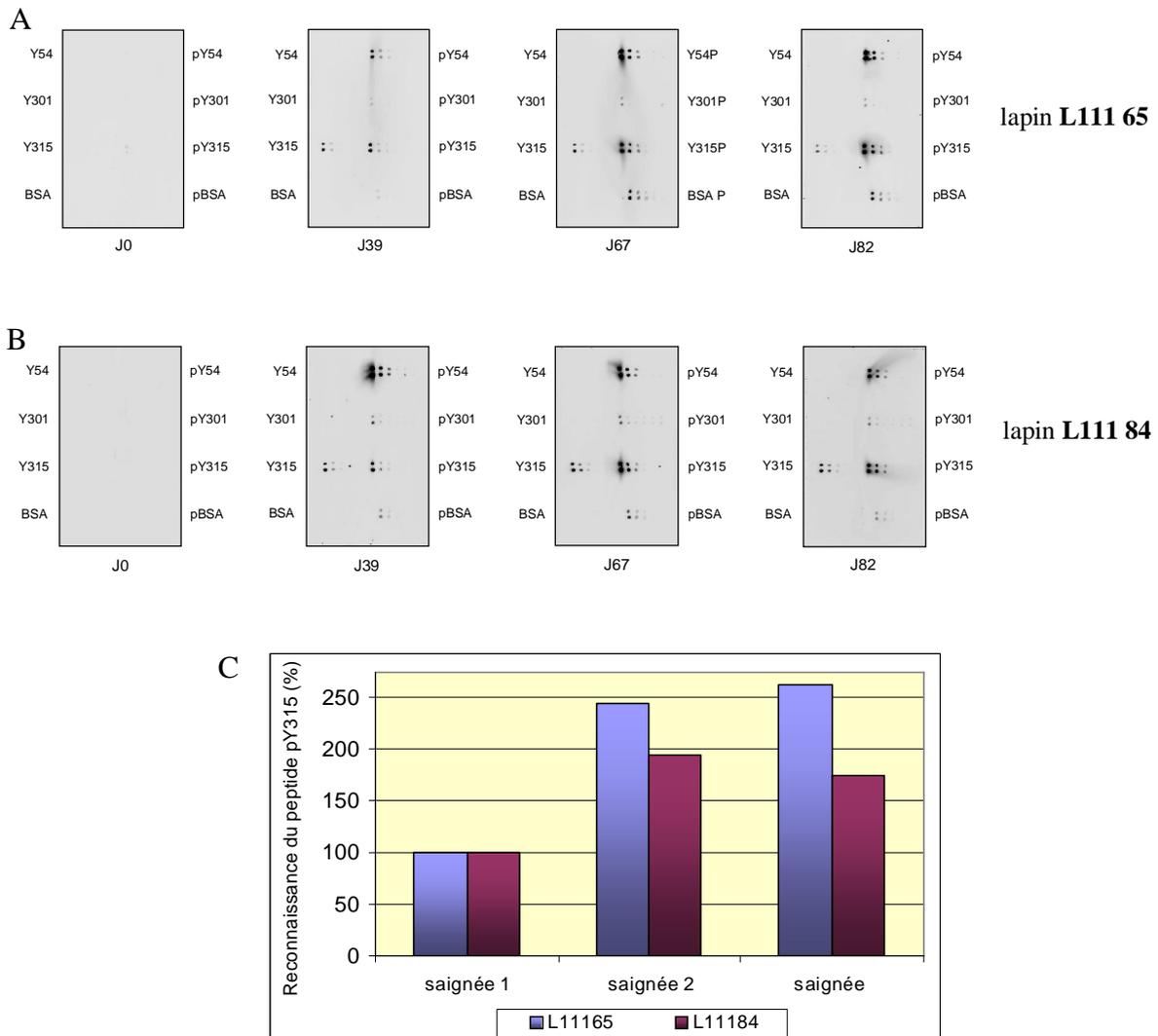


Figure 3.3 : Spécificité des sérums des lapins immunisés avec le peptide pY315. Révélations des puces à peptides avec les sérums des lapins L111 65(A) et L111 84 (B). Affinité relative des sérums des deux lapins pour le peptide pY315. Les signaux sur les puces à peptides ont été quantifiés et représentés par rapport à la reconnaissance du peptide pY315 après la première immunisation (C).

Avant l'immunisation des lapins avec le peptide pY315 aucun spot n'est visible sur les puces à peptides, il n'y a donc pas d'anticorps anti-phospho spécifiques dans les sérums des deux lapins. L'immunisation avec le peptide pY315 stimule le système immunitaire et après trois immunisations, les sérums des lapins L111 65 et L111 84 reconnaissent le peptide

d'immunisation pY315, indiquant la présence d'anticorps anti-pY315. Cependant ces sérums présentent une aspécificité importante car il reconnaissent le peptide Y315 et les autres peptides phosphorylés – pY54, pY301, ainsi que la phospho-BSA. Ceci indique la présence d'anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques. Après comparaison des intensités des spots représentées sur l'histogramme, nous avons constaté que la reconnaissance du peptide pY315 diminue dans la saignée finale du lapin L111 84. Nous avons donc choisi le sérum du lapin L111 65 pour la purification des anticorps anti-pY315. Ce sérum présente une évolution croissante de la reconnaissance du peptide pY315 et cette reconnaissance est plus forte que celle du sérum L111 84.

1.4 Purification d'anticorps anti-phosphoTyrosine spécifiques

Les anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques ont été purifiés à partir des sérums choisis, par chromatographie d'affinité sur des colonnes SulfoLink couplées aux peptides d'immunisation et aux peptides non phosphorylés correspondants. La purification de chaque anticorps a été réalisée en plusieurs étapes sur des colonnes couplées à différents peptides. Quatre colonnes ont été préparées, couplées aux peptides pY54, Y54, pY315c et Y315.

1.4.1 Couplage peptide - colonne

Le couplage des peptides au gel SulfoLink a été décrit dans le chapitre "Matériel et méthodes, Couplage peptide - colonne", page 67. La cystéine terminale ajoutée du côté C-terminal des peptides pY54 et pY301 permet non seulement le couplage du phosphopeptide à la protéine porteuse pour l'immunisation mais également le couplage au gel SulfoLink utilisé pour la purification des anticorps. Ainsi toute la longueur du peptide est disponible en tant que source d'épitopes lors de la purification. Le peptide pY315 se termine par une tyrosine et le couplage avec ce résidu terminal n'est pas possible. Cependant ce peptide possède une cystéine au milieu de la séquence. Si le couplage au gel SulfoLink est fait avec un résidu situé au milieu de la séquence, certains épitopes peuvent être cachés et non accessibles. Pour éviter cela, le peptide pY315c, constitué des 7 premiers acides aminés de la séquence du peptide pY315 a été utilisé. Ce peptide plus court se termine par une cystéine en C-terminale qui permet le couplage au gel SulfoLink.

L'efficacité de couplage des peptides a été vérifiée par lecture de l'absorbance à 280 nm des solutions peptidiques avant et après couplage à la colonne. Le peptide élué de la colonne est dilué par le liquide contenu dans le gel qui est d'environ 2 ml. La dilution maximale est donc de demi. Pour obtenir la valeur de DO réelle du peptide non retenu, la valeur de l'absorbance de la solution peptidique après couplage a été multipliée par deux.

Ainsi pour le couplage du peptide pY54 nous avons obtenu une DO de la solution peptidique avant couplage de 1.947 et une DO de la solution peptidique après couplage de 0.135. Le pourcentage de peptide non couplé est donc $(0.135 \times 2) / 1.947 \times 100$ égal à 13.9%. Le pourcentage de peptide couplé à la colonne est donc 86.1%.

Les efficacités de couplage des peptides sont regroupées dans le tableau 3.2.

peptide	peptide non couplé	peptide couplé
pY54	13.9%	86.1%
Y54	20%	80%
pY315c	15.3%	84.7%
Y315	9.8%	90.1%

Tableau 3.2 : Pourcentage de peptide couplé aux colonnes SulfoLink utilisées pour la purification d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques.

Nous avons obtenu des efficacités de couplage des peptides au gel SulfoLink entre 80 et 90%, ce qui convient à la purification des anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques.

1.4.2 Types d'anticorps générés après immunisation d'un animal avec un phosphopeptide

L'immunisation avec un peptide phosphorylé entraîne la génération de différents types d'anticorps par le système immunitaire de l'animal (fig. 3.4). Des anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques que nous voulons purifier sont développés mais également des anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques qui reconnaîtront toute tyrosine phosphorylée, ainsi que des anticorps anti-peptide reconnaissant d'autres parties du peptide que la tyrosine. Les phosphatases présentes dans l'animal peuvent déphosphoryler une partie du phosphopeptide injecté ce qui entraîne le développement d'anticorps anti-tyrosine. De plus, le linker qui relie le phosphopeptide à la protéine porteuse, l'ovalbumine, ainsi que l'ovalbumine elle-même sont également des antigènes et des anticorps dirigés contre eux sont générés.

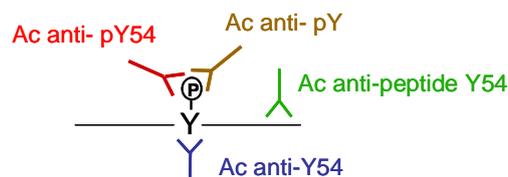


Figure 3.4 : Types d'anticorps générés après immunisation d'un animal avec un phosphopeptide.

1.4.3 Principe de purification

La purification des anticorps anti-phosphotyrosine d'intérêt a été réalisée en deux ou trois étapes successives de chromatographies d'affinité. Le sérum a été d'abord appliqué sur une colonne couplée au phosphopeptide d'immunisation. Elle retient les anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques ainsi que les anticorps anti-peptide et les anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques. Les anticorps anti-tyrosine, ceux dirigés contre le linker et la protéine porteuse ainsi que tous les autres anticorps présents dans le sérum sont éliminés. Les anticorps élués de cette première colonne sont appliqués sur une colonne couplée au peptide non phosphorylé correspondant. Cette colonne retient les anticorps anti-peptide. Les anticorps anti-phosphotyrosine d'intérêt et les anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques sont recueillis dans la fraction non retenue dans la colonne. Une troisième colonne couplée à un phosphopeptide différent retient les anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques alors que les anticorps anti-phosphotyrosine d'intérêt sont recueillis dans la fraction non retenue.

La spécificité et l'affinité des anticorps élués ont été vérifiées à chaque étape de chromatographie sur puce à peptides. Les intensités de reconnaissance des différents peptides déposés sur les puces ont été quantifiés. L'affinité relative des anticorps pour les peptides reconnus ont été représentés sur des histogrammes par rapport à la reconnaissance du phosphopeptide d'intérêt qui a été considéré comme égal à 100%.

1.4.4 Purification des anticorps anti-pY54

Le sérum du lapin L345 705 que nous avons choisi pour la purification des anticorps anti-pY54 ne contient pas d'anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques. Sur puce à peptides ce sérum ne détecte que les peptides pY54 et Y54. Nous avons donc réalisé la purification des anticorps anti-pY54 en deux étapes successives en utilisant deux colonnes, couplées au peptide pY54 et au peptide Y54 respectivement (fig. 3.5A).

Le sérum du lapin L345 705 a été d'abord appliqué sur une colonne couplée au peptide pY54 (fig. 3.5A1). Cette colonne retient les anticorps anti-pY54 d'intérêt mais également les anticorps anti-peptide Y54. La présence de ces anticorps est révélée par la puce à peptides réalisée avec l'éluat (fig. 3.5B1). Les anticorps dirigés contre la protéine porteuse et le linker, ainsi que toutes les autres immunoglobulines présentes dans le sérum sont éliminées. L'histogramme représentant la spécificité des anticorps élués (fig. 3.5C1) montre que la reconnaissance du peptide Y54 s'élève à 40% de celle du peptide pY54.

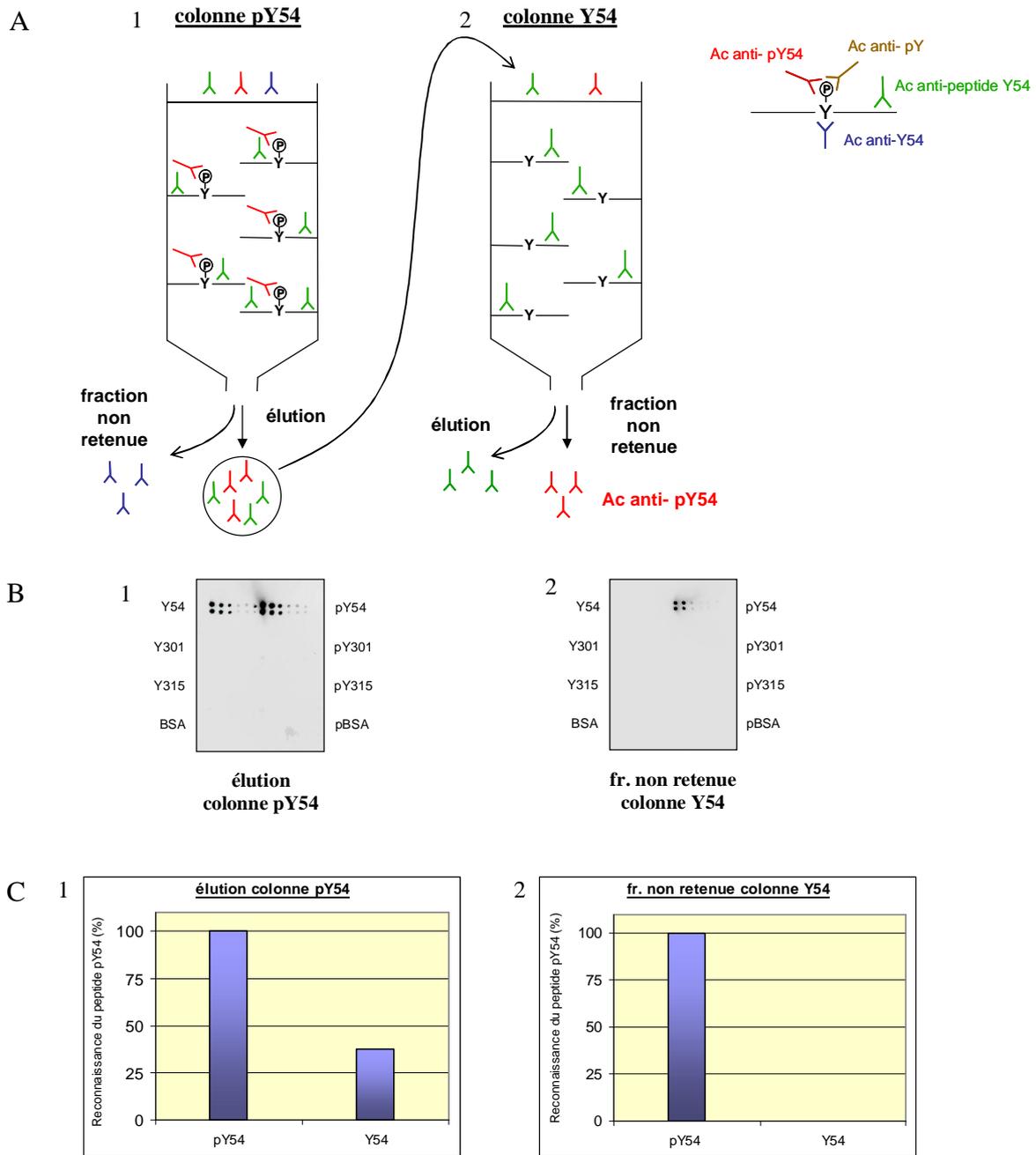


Figure 3.5 : Purification des anticorps anti-pY54. Principe de purification des anticorps anti-pY54 par deux chromatographies d'affinité successives (A) et vérification de la spécificité des anticorps sur puce à peptides après chaque étape (B). L'affinité relative des anticorps pour le peptide d'immunisation pY54 et le peptide Y54 après la première et la deuxième étape de purification est représentée sur histogramme (C).

Les anticorps élués de la première colonne ont été appliqués sur une colonne couplée au peptide Y54 non phosphorylé. Les anticorps anti-peptide Y54 sont retenus par cette colonne. Les anticorps anti-pY54 traversent la colonne sans se lier et nous les avons recueillis dans la fraction non retenue. La puce à peptides réalisée avec cette fraction montre la grande

spécificité des anticorps anti-pY54 purifiés. En effet, ces anticorps ne reconnaissent que le peptide pY54 (fig. 3.5B2) et ne reconnaissent aucun des autres peptides phosphorylés ni la phospho-BSA. Ceci est confirmé par l'histogramme (fig. 3.5C2) qui ne montre aucune reconnaissance du peptide Y54. Les anticorps anti-pY54 sont donc hautement spécifiques de la tyrosine Y54 phosphorylée et peuvent être utilisés pour l'étude de la phosphorylation de Rad51.

1.4.5 Purification des anticorps anti-pY315

La purification des anticorps anti-pY315 a nécessité trois étapes successives de chromatographie. En effet le sérum du lapin L111 84 que nous avons choisi pour la purification, reconnaît d'autres tyrosines phosphorylées que la tyrosine 315 et contient donc des anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques. Leur élimination nécessite l'utilisation d'une colonne couplée à un phosphopeptide différent de celui utilisé pour l'immunisation. Trois colonnes d'affinité ont été utilisées pour la purification des anticorps anti-pY315, couplées aux peptides pY315c, Y315 et pY54 respectivement (fig. 3.6A).

Le sérum a été appliqué d'abord sur une colonne couplée au peptide pY315. Les anticorps anti-pY315 que nous voulons purifier sont retenus par cette colonne. Les anticorps anti-peptide Y315 ainsi que les anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques trouvent également des sites de fixation au niveau de la colonne et sont ainsi retenus (fig. 3.6A1). Les anticorps anti-Y315 ainsi que tous les autres anticorps présents dans le sérum sont éliminés. La puce à peptides réalisée après élution de cette première colonne confirme la présence des anticorps anti-pY315, anti-pY et anti-peptide Y315 dans l'éluat car il y a reconnaissance non seulement du peptide pY315 mais également des peptides Y315, pY54, pY301 et de la pBSA (fig. 3.6B1). L'histogramme représentant les intensités de reconnaissance des différents peptides par rapport à la reconnaissance de pY315 montre que l'éluat de la première étape de purification reconnaît préférentiellement le peptide pY315 (fig. 3.6C1). Cependant, on remarque que la reconnaissance de la pBSA est légèrement supérieure à celle du peptide pY315. La reconnaissance du peptide pY54 s'élève à 50% et celle du peptide pY301 à 20% de la reconnaissance du peptide pY315. Cette forte reconnaissance des phosphopeptides et de la phospho-BSA démontre la présence d'une grande quantité d'anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques.

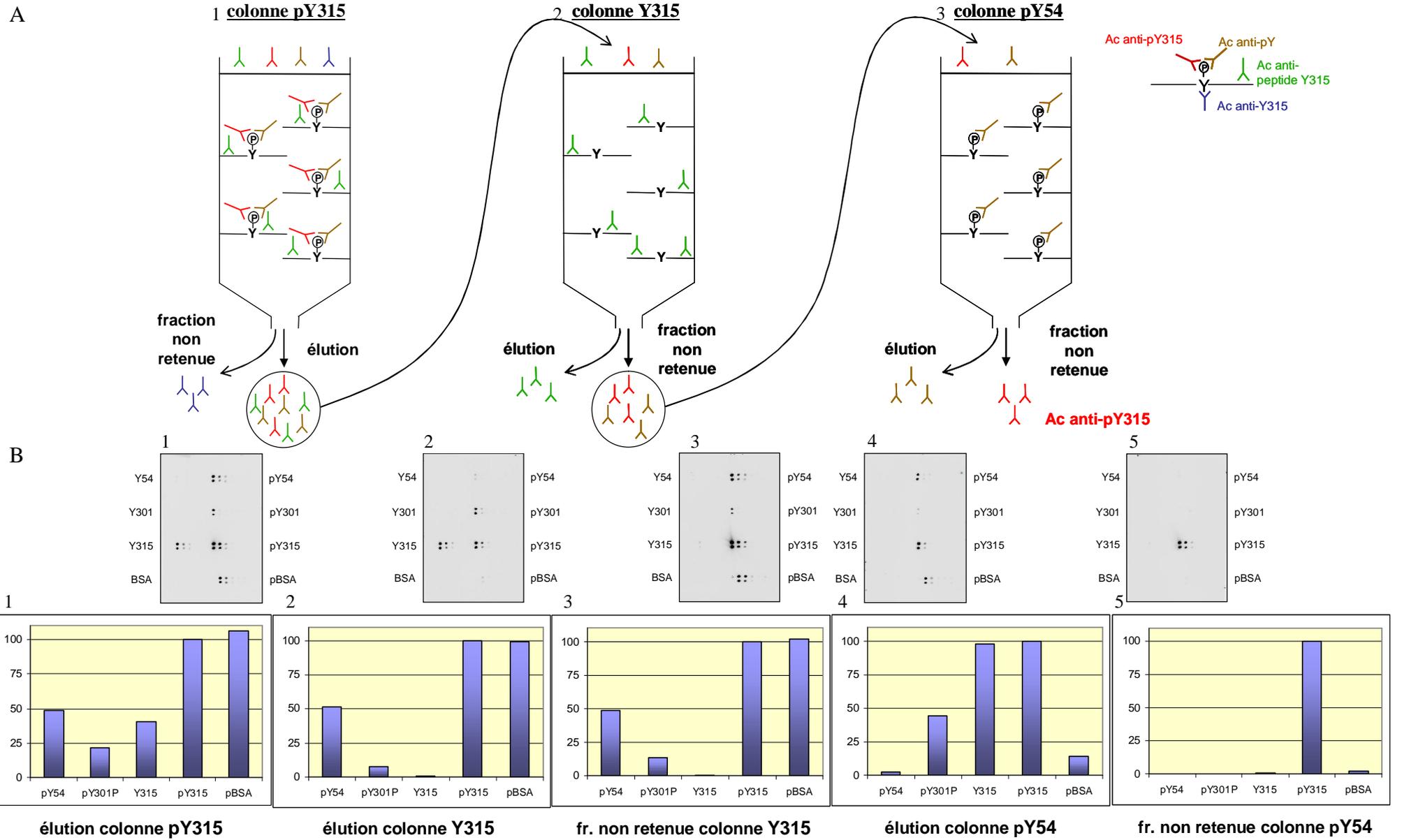


Figure 3.6 : Purification des anticorps anti-pY315. Principe de purification des anticorps anti-pY315 par trois chromatographies d'affinité successives (A) et vérification de la spécificité des anticorps obtenus après chaque étape sur puce à peptides (B). Affinité relative des anticorps pour le peptide d'immunisation pY315 et pour d'autres peptides phosphorylés et non phosphorylés après chaque étape de purification (C).

L'éluat de la première colonne a été appliqué sur une colonne couplée au peptide Y315 non phosphorylé (fig. 3.6A2). Les anticorps anti-peptide Y315 sont retenus par cette colonne et sont ainsi éliminés. Ceci est démontré par la puce réalisée avec l'éluat qui montre la reconnaissance des peptides Y315, pY315 et dans une moindre mesure celle de pY301 (fig. 3.6B2). L'histogramme représentant les intensités de reconnaissance montre une reconnaissance identique des peptides Y315 et pY315 (fig. 3.6C2).

Dans la fraction non retenue par la colonne Y315 nous avons recueilli les anticorps anti-pY315 comme démontré par la puce à peptides (fig. 3.6B3). Cependant il y a une reconnaissance croisée des peptides pY54 et pY301 ainsi que de la phospho-BSA avec les mêmes intensités relatives de reconnaissance qu'après la première étape de purification (fig. 3.6C3). Ceci montre que les anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques sont toujours présents.

Afin d'éliminer les anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques, nous avons utilisé une troisième étape de purification sur la colonne couplée au peptide pY54 (fig. 3.6A3). Les anticorps anti-phosphotyrosine non spécifiques sont retenus par cette colonne, comme démontré par la puce à peptides réalisée avec l'éluat (fig. 3.6B4) et par l'histogramme (fig. 3.6C4). Les anticorps recueillis dans la fraction non retenue correspondent aux anticorps anti-pY315. Ceci est démontré par la puce à peptides sur laquelle ces anticorps ne reconnaissent que le peptide pY315 (fig. 3.6B5) et est confirmé par l'histogramme (fig. 3.6C5). Les anticorps anti-pY315 purifiés sont donc hautement spécifiques à la tyrosine 315 phosphorylée.

Nous avons ainsi obtenu par plusieurs étapes de purification sur chromatographie d'affinité des anticorps anti-pY54 et anti-pY315 spécifiques dirigés contre les tyrosines phosphorylées en position 54 et 315 respectivement de la protéine Rad51. Ces anticorps hautement spécifiques distinguent les deux tyrosines phosphorylées en position 54 et 315.

2 Evaluation de Rad51 phosphorylée et non phosphorylée dans différentes lignées

La purification d'anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques, capables de détecter séparément la phosphorylation des deux tyrosines de Rad51 décrites dans la littérature, permettront l'étude de la phosphorylation de la protéine Rad51. Nous avons alors recherché un modèle cellulaire adapté à cette étude. Dans notre laboratoire nous disposons de différentes lignées cancéreuses : HeLa, K562, HL60S, HL60/DNR et HL60/DOX. La lignée cellulaire HeLa provient d'un cancer du col de l'utérus. La lignée K652 dérive d'une leucémie myéloïde chronique (CML) en phase blastique. Cette lignée possède le chromosome de Philadelphie et exprime la tyrosine kinase de fusion BCR/Abl. Les cellules HL60 proviennent d'une leucémie myéloïde aigue (AML). Des lignées résistantes aux médicaments anti-cancéreux daunorubicine et doxorubicine – HL60/DNR et HL60/DOX respectivement ont été générées à partir de la lignée sensible HL60S. Parmi ces lignées la lignée HL60/DNR exprime BCR/Abl. Il a été montré que BCR/Abl induit la surexpression de Rad51 en augmentant la transactivation du gène via STAT5 et en diminuant le clivage de la protéine par la caspase-3. De plus BCR/Abl qui présente une activité kinase constitutive phosphoryle Rad51 sur la tyrosine 315 (Slupianek et al, 2001). Ainsi ces cellules pourraient non seulement exprimer un taux élevé de Rad51 mais la protéine pourrait également être phosphorylée. Ces lignées pourraient donc être de bons modèles d'étude de la phosphorylation de Rad51.

2.1 Niveau d'expression de Rad51 dans différentes lignées

Afin de choisir la lignée cellulaire la mieux adaptée à l'étude de la phosphorylation de Rad51, nous avons analysé le niveau d'expression de cette protéine dans les différentes lignées cancéreuses : K562, HL60S, HL60/DNR, HL60/DOX et HeLa.

Nous avons tout d'abord vérifié l'expression de Rad51 dans toutes les lignées. Après avoir lysé des cellules, des extraits cellulaires ont été analysés par Western Blot avec l'anticorps anti-Rad51. La β -actine a été utilisée comme marqueur de charge (fig. 3.7A). Après quantification et normalisation par rapport à la β -actine, le niveau d'expression de Rad51 dans

les lignées a été rapporté à celui de la lignée parentale HL60S. Les niveaux relatifs de Rad51 sont représentés en pourcentage sur l'histogramme (fig. 3.7B).

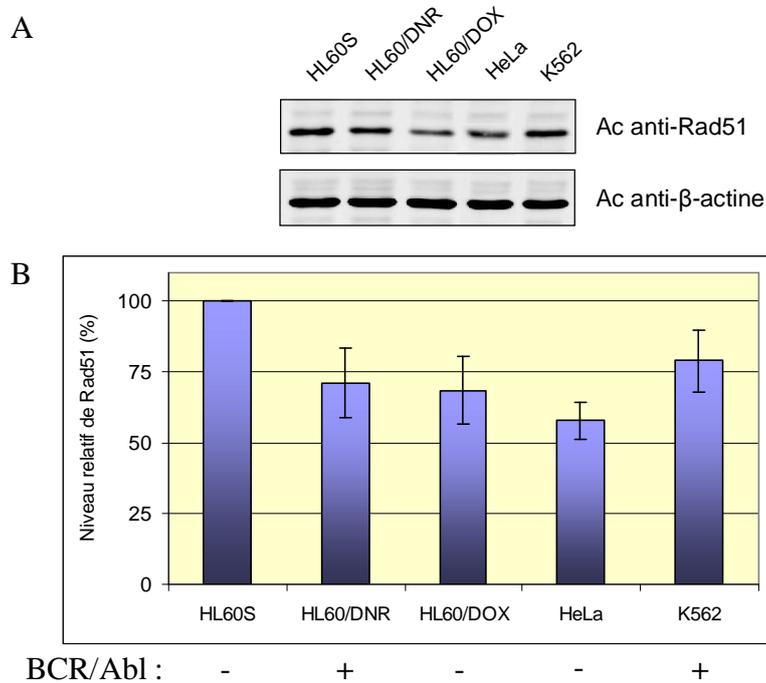


Figure 3.7 : Expression de Rad51 dans les lignées HL60S, HL60/DNR, HL60/DOX, HeLa et K562. L'expression de Rad51 a été analysée par Western Blot avec l'anticorps anti-Rad51 (A). Le niveau d'expression relatif de Rad51 dans chaque lignée a été exprimé par rapport à la lignée HL60S après normalisation par rapport à la β -actine (B).

Le niveau d'expression de Rad51 est maximal dans la lignée HL60S. Un niveau semblable est trouvé entre les lignées HL60/DNR et HL60/DOX. La lignée HeLa exprime le niveau le plus faible de Rad51, alors que la lignée K562 exprime plus de 75% du niveau de Rad51 des cellules HL60S. Contrairement à nos attentes, les lignées HL60/DNR et K562 qui expriment BCR/Abl présentent un niveau de Rad51 moins élevé que la lignée HL60S qui n'exprime pas la tyrosine kinase de fusion. Nos résultats montrent que l'expression de BCR/Abl n'induit pas obligatoirement une surexpression de Rad51 dans ces lignées. L'expression de BCR/Abl ne serait donc pas corrélée à la surexpression de Rad51 dans toutes les lignées exprimant cette tyrosine kinase de fusion. Ceci est confirmé par une comparaison du niveau de Rad51 dans différentes lignées cancéreuses réalisée par Raderschall et collaborateurs. En effet, un niveau de Rad51 plus faible, semblable à celui que nous avons déterminé, a été trouvé dans les lignées HeLa et K562 comparé à la lignée HL60S (Raderschall et al, 2002).

Nous avons choisi les lignées HL60S, HL60/DNR et HL60/DOX pour analyser la phosphorylation de Rad51. Ces lignées semblaient offrir de nombreux avantages. D'une part, la lignée sensible HL60S présente le niveau le plus élevé de Rad51. D'autre part, la lignée HL60/DNR exprime la tyrosine kinase de fusion BCR/Abl, contrairement à la lignée sensible et les HL60/DOX. De plus la comparaison de la lignée sensible et les lignées résistantes pourrait apporter des informations intéressantes.

2.2 Recherche de phosphorylation de Rad51 dans des lellules BCR/Abl

Parmi les lignées que nous avons choisies, la lignée HL60/DNR exprime la kinase de fusion BCR/Abl. Etant donné que l'équipe de Slupianek a observé une phosphorylation de la tyrosine 315 dans des lignées exprimant BCR/Abl (Slupianek et al, 2001), nous avons recherché une phosphorylation éventuelle de la protéine Rad51 dans des cellules n'ayant pas subi de traitement génotoxique. Nous avons utilisé les anticorps anti-phosphotyrosine que nous avons purifiés afin de révéler la phosphorylation éventuelle de Rad51 dans les extraits.

Malgré la présence de la tyrosine kinase de fusion BCR/Abl dans les lignées K562 et HL60/DNR, nous n'avons pas détecté de phosphorylation de la tyrosine 315. Dans leur étude démontrant la phosphorylation de Y315 par BCR/Abl, Slupianek et collègues ont utilisé des lignées transformées avec BCR/Abl et un antisérum dirigé contre pY315 (Slupianek et al, 2001). Il est probable qu'il existe des différences avec les lignées que nous avons analysées. De plus, l'expression de BCR/Abl induite par une transfection est certainement plus importante par rapport à celle rencontrée dans nos lignées BCR/Abl positives. Le niveau de phosphorylation de Rad51 par BCR/Abl dans nos lignées serait donc trop faible pour être détecté avec nos anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques.

2.3 Recherche de phosphorylation dans des cellules traités

La phosphorylation de la protéine Rad51 est liée à l'activation de la kinase c-Abl suite à la formation de CDB de l'ADN. Les extraits que nous avons analysés proviennent de cellules n'ayant subi aucun stress génotoxique. L'absence de phosphorylation de Rad51 pourrait donc s'expliquer par l'absence de CDB et d'activation de la kinase c-Abl. En conditions normales la protéine Rad51 se trouverait sous forme non phosphorylée.

Afin d'induire un stress génotoxique susceptible de provoquer la phosphorylation de la protéine Rad51, nous avons traité les cellules avec des agents anticancéreux connus pour générer des CDB de l'ADN. Nous avons utilisé deux médicaments anti-cancéreux : le VP16, également connu sous le nom d'étoposide et le chlorambucil (CLB). Le VP16 est un inhibiteur de la topoisomérase II utilisé dans le traitement de différents types de cancers, telles que certaines leucémies. Cet agent bloque l'entrée des cellules en mitose en formant un complexe ternaire avec l'ADN et la topoisomérase II qui aboutit à la formation de CDB (van Maanen et al, 1988). Le chlorambucil est un médicament appartenant à la classe des moutardes à azote qui est fréquemment prescrit dans le traitement de leucémies et de certains lymphomes. Cette molécule est un agent alkylant de l'ADN avec un effet radiomimétique. Le CLB entraîne la formation de pontages entre les brins de l'ADN. Leur réparation implique entre autres la voie de la RH et des CDB sont formées comme intermédiaires (Drablos et al, 2004).

2.3.1 Détermination des IC50

Les cellules doivent être traitées avec une concentration de médicament appropriée pour induire un taux de CDB suffisant pour l'activation des voies de réparation. Dans ce but, nous avons réalisé des tests de viabilité cellulaire au MTT et nous avons déterminé les IC50 des différentes lignées pour les deux molécules. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.3.

Lignée cellulaire	IC50 VP16 (μ M)	IC50 CLB (μ M)
HL60S	2.5	105
HL60/DNR	7-8	114
HL60/DOX	2	2

Tableau 3.3 : IC50 des lignées HL60S, HL60/DNR et HL/DOX pour le VP16 et CLB.

La lignée HL60/DNR présente une résistance au VP16 plus élevée que celle des lignées HL60S et HL60/DOX. Le mécanisme de résistance de cette lignée au daunorubicine pourrait être responsable également de la résistance au VP16.

Les cellules HL60S et HL60/DNR présentent une sensibilité comparable vis-à-vis du CLB, tandis que la lignée HL60/DOX présente une hypersensibilité au chlorambucil, malgré son caractère résistant à la doxorubicine. Cette sensibilité aux agents alkylants est généralement associée à une déficience du système de réparation par RH ou NHEJ. Le niveau d'expression relativement faible de Rad51 dans cette lignée (voir fig. 3.7, page 97) pourrait également expliquer en partie cette hypersensibilité. Toutefois des études supplémentaires seraient nécessaires pour élucider le mécanisme responsable.

2.3.2 Traitement avec VP16

Nous avons choisi de traiter les cellules avec du VP16 car des études ont montré que la RH est indispensable pour réparer les lésions induites par un traitement avec ce médicament (Lundin et al, 2003). La protéine Rad51 serait donc impliquée dans la réparation de ces lésions.

Les trois lignées HL60 ont été traitées avec 100 μ M de VP16 pendant 2 heures. Le milieu a été ensuite changé et les cellules ont été lysées après 3h, 6h et 24 heures. Après Western blot, la protéine Rad51 a été révélée avec un anticorps anti-Rad51. Le niveau d'expression relatif de Rad51 après traitement a été normalisé par rapport à la β -actine et représenté par rapport aux cellules témoins non traitées (fig. 3.8).

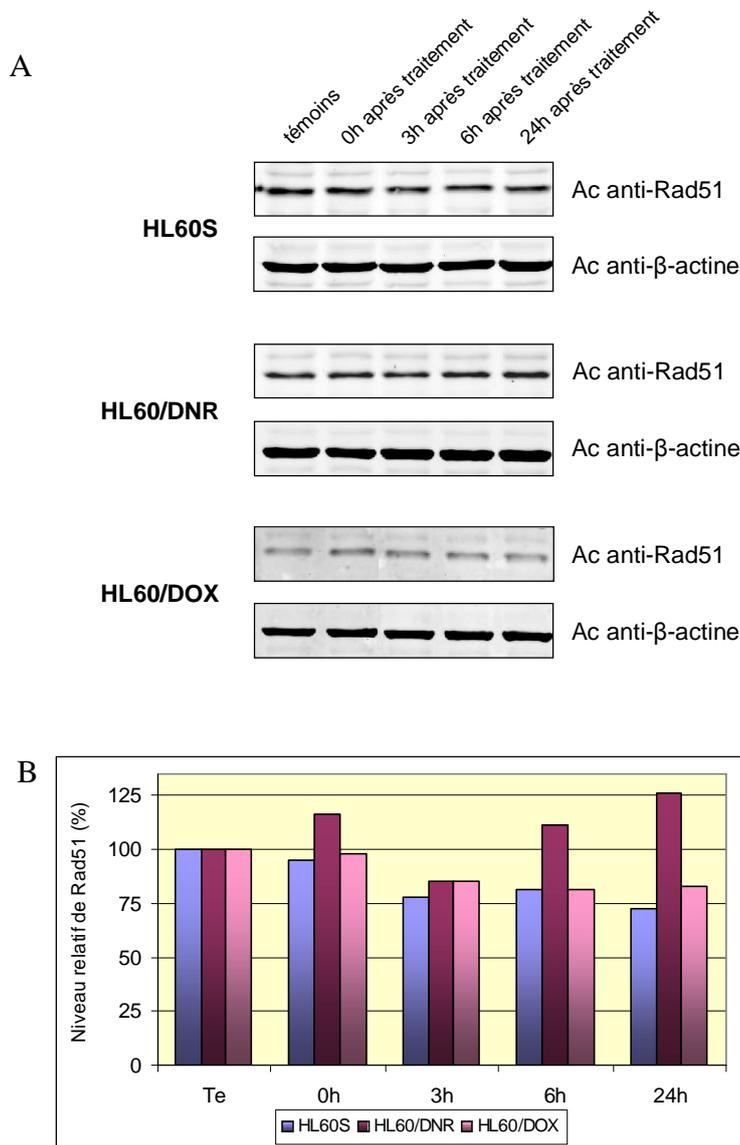


Figure 3.8 : Expression de Rad51 dans les lignées HL60S, HL60/DNR et HL60/DOX après traitement au VP16. Les cellules ont été traitées pendant 2 heures et lysées 3h, 6h et 24 heures après changement du milieu (indiqué comme 0h). Rad51 a été révélée avec un anticorps anti-Rad51, la β -actine a été utilisée comme marqueur de charge (A). Le niveau de Rad51 à été rapporté à celui des cellules non traitées après normalisation à la β -actine (B).

Selon certaines études, des dommages de l'ADN n'entraînent pas de variation du niveau d'expression de Rad51 (Chen et al, 1997). Cependant on remarque que dans les lignées HL60S et HL60/DOX le niveau de Rad51 diminue légèrement après le traitement. Cette diminution du niveau de Rad51 dans les lignées HL60S et HL60/DNR peut être expliquée par les conditions du traitement. Nous avons traité les cellules pendant une courte durée avec une concentration de médicament plus forte que les IC50 dans le but d'induire un taux élevé de CDB. Cependant cette quantité de VP16 pourrait être létale pour les cellules, entraînant

l'activation de voies apoptotiques pour un certain nombre d'entre elles. La dégradation de Rad51 par clivage par la caspase-3 activée lors de la réponse apoptotique peut être responsable de la diminution du niveau de Rad51 dans les lignées HL60S et HL60/DOX.

Dans la lignée HL60/DNR on observe une faible augmentation de l'expression de Rad51 après traitement au VP16. Cette lignée présente une résistance au VP16 supérieure à celle des lignées HL60S et HL60/DOX. La viabilité cellulaire de cette lignée est donc moins affectée par le traitement. De plus cette lignée exprime la tyrosine kinase de fusion BCR/Abl qui est associée à la résistance de cellules à la cisplatine et au mitomycine C et à la surexpression de Rad51 (Slupianek et al, 2001). La présence de BCR/Abl pourrait expliquer la résistance plus élevée de cette lignée au VP16. L'augmentation du niveau de Rad51 pourrait également être induite par cette kinase de fusion. Toutefois, les variations du niveau d'expression de Rad51 observées après traitement ne dépassent pas 25%, ce qui tend à confirmer le faible impact d'un stress génotoxique sur l'expression de Rad51.

Ces immunoblots ont été incubés ensuite avec nos anticorps anti-phosphoRad51 spécifiques pour étudier l'état de phosphorylation de la protéine. Là encore aucun signal n'a pu être détecté, ce qui indique l'absence ou le trop faible taux de phosphorylation dans ces cellules après traitement au VP16.

2.3.3 Traitement avec CLB

L'utilisation du chlorambucil a été motivée par une étude de Aloyz et collaborateurs, qui ont montré qu'un traitement au CLB de lymphocytes provenant de patients leucémiques induit la phosphorylation de Rad51 par c-Abl (Aloyz et al, 2004). Nous avons alors utilisé les mêmes conditions de traitement et nous avons traité les trois lignées avec des concentrations de CLB proches de l'IC50. Ainsi les lignées HL60S et HL60/DNR ont été traitées pendant 6 et 24 heures avec 100 μ M de CLB, alors que la lignée HL60/DOX avec 2 μ M. Les résultats sont présentés sur la figure 3.9.

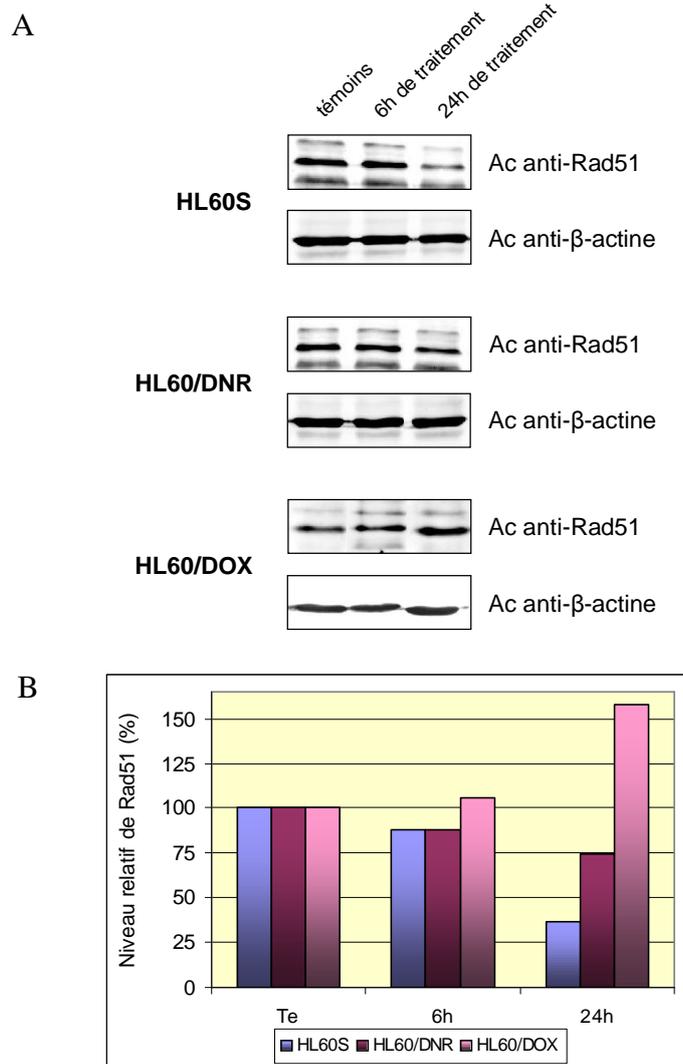


Figure 3.9 : Expression de Rad51 dans les lignées HL60S, HL60/DNR et HL60/DOX après traitement avec du CLB. Les cellules ont été traitées pendant 6h et 24 heures et lysées. Rad51 a été révélée avec un anticorps anti-Rad51, la β -actine a été utilisée comme marqueur de charge (A). Le niveau de Rad51 a été rapporté à celui des cellules non traitées après normalisation à la β -actine (B).

Lorsque les cellules HL60S sont traitées avec CLB, le niveau de Rad51 diminue en fonction du temps de traitement. Cette diminution pourrait être expliquée par un taux élevé de CDB et le clivage de la protéine par la caspase-3 lors de la réponse apoptotique de la cellule. Une faible diminution du niveau de Rad51 est également observée dans la lignée HL60/DNR. Le niveau de Rad51 dans cette lignée diminue moins que dans la lignée HL60S ce qui pourrait être dû à la résistance plus élevée de la lignée HL60/DNR. De façon surprenante, le niveau de Rad51 augmente de façon importante dans les cellules HL60/DOX malgré leur plus

grande sensibilité au CLB. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si ce résultat est significatif et la cause de cette augmentation de l'expression.

Après immunoblot avec les anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques, aucune phosphorylation de Rad51 n'a été détectée.

La détection de formes phosphorylées d'une protéine intracellulaire est difficile. L'étude *in cellulo* des sites de phosphorylation d'une protéine est limitée, d'une part par son niveau d'expression qui peut être bas et d'autre part par le fait que ces protéines sont seulement transitoirement et/ou partiellement phosphorylées. En effet, le plus souvent seulement une faible proportion de la protéine est phosphorylée. De plus la phosphorylation des protéines sur résidu tyrosine est la phosphorylation la moins fréquente. Elle constitue seulement 0,05% des phosphorylations dans la cellule, contre 90% pour la phosphorylation sur sérine et 10% sur thréonine (Salih, 2005). Ceci peut expliquer l'absence de détection de phosphorylation de Rad51.

Ainsi le niveau de phosphorylation de la protéine Rad51 est sûrement très faible et inférieur au seuil de détection de nos anticorps malgré le traitement avec des médicaments anticancéreux.

2.4 Immunoprécipitation de Rad51 - optimisation

Le taux de phosphorylation de la protéine Rad51 dans les extraits cellulaires étant trop faible pour être détecté par les anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques, nous avons essayé d'enrichir les extraits en protéine Rad51. Pour cela nous avons réalisé des immunoprécipitations de la protéine Rad51 à partir d'extraits de cellules traitées avec le CLB. L'Immunoprécipitation Starter Pack (Amersham) a été choisi pour réaliser les immunoprécipitations. Ce pack contient la Protein A Sepharose et la Protein G Sepharose qui présentent des affinités différentes pour les anticorps en fonction de l'espèce dans laquelle ils ont été générés.

Plusieurs conditions d'immunoprécipitation ont été testées afin d'optimiser le protocole proposé avec le kit. Nous avons déterminé l'effet de l'ajout de SDS ou de NaCl dans le tampon de lyse des cellules, la nécessité de réaliser une étape de preclearing, la quantité

d'anticorps anti-Rad51, l'utilisation de la protéine G ou la protéine A, la durée de couplage antigène-anticorps.

2.4.1 Tampon de lyse

La composition du tampon de lyse influence l'efficacité de lyse des cellules et va conditionner l'extraction des complexes protéiques. Avant de commencer l'optimisation de l'immunoprécipitation elle-même, nous avons étudié l'effet de la composition du tampon de lyse sur l'efficacité de lyse. Le tampon proposé dans le protocole de l'Immunoprecipitation Starter Pack est le tampon RIPA. Ce tampon contient 150 mM de NaCl et ne contient pas de SDS. Nous avons analysé l'effet de l'ajout de SDS et d'une forte concentration en sel dans le tampon de lyse (fig. 3.10).

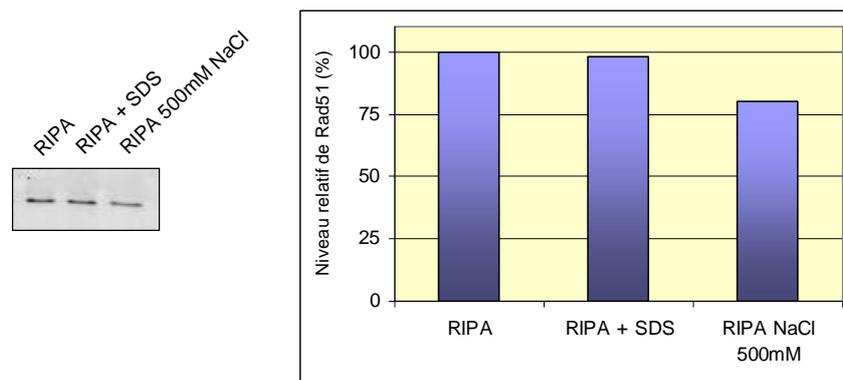


Figure 3.10 : Effet de la composition du tampon de lyse sur l'immunoprécipitation de Rad51. Les extraits ont été analysés par Western blot révélé avec l'anticorps anti-Rad51. La quantité de Rad51 immunoprécipitée avec les différents tampons de lyse a été présentée sur l'histogramme par rapport au tampon RIPA.

Le tampon RIPA contenant 500 mM de NaCl est le plus efficace pour l'extraction des protéines car on obtient une concentration protéique plus élevée qu'avec le tampon classique et le tampon contenant du SDS. Cependant le tampon RIPA classique semble le plus adapté pour réaliser des immunoprécipitations car la quantité de Rad51 immunoprécipitée à partir de l'extrait avec ce tampon est plus importante. La forte concentration de sel ainsi que le SDS pourraient interférer dans l'interaction de l'anticorps anti-Rad51 avec la protéine Rad51.

2.4.2 Preclearing

Une étape de preclearing avant l'ajout de l'anticorps dans l'extrait est souvent nécessaire pour éliminer les protéines qui se lient de manière non spécifique aux billes de sépharose couplées aux Protéine A ou Protéine G. Nos résultats montrent que dans notre cas cette étape n'est pas nécessaire et que de plus cette étape diminue la quantité de Rad51 immunoprécipitée (fig. 3.11).

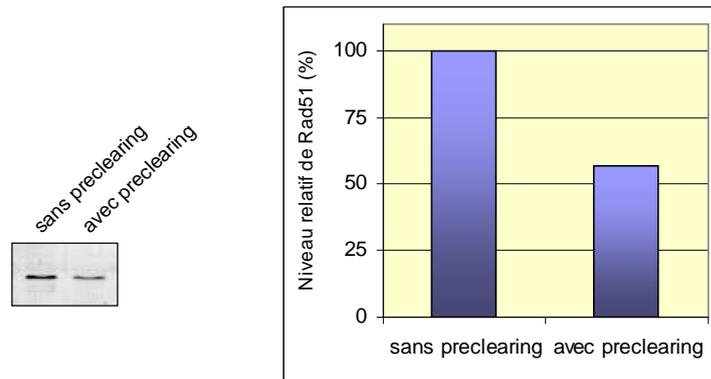


Figure 3.11 : Nécessité d'étape de preclearing pour l'immunoprécipitation de Rad51. Les immunoprécipitats ont été analysés par Western blot révélé avec l'anticorps anti-Rad51. La quantité de Rad51 immunoprécipitée avec ou sans étape de préclearing a été présentée sur l'histogramme par rapport à la quantité immunoprécipitée sans preclearing.

2.4.3 Protéine A / Protéine G

Nous avons ensuite étudié l'efficacité de la protéine A ou la protéine G à lier l'anticorps anti-Rad51 monoclonal de souris. La protéine A de *Staphilococcus aureus* ou la protéine G de *Streptocoques* ont la propriété de se lier au fragment Fc des immunoglobulines. Leur affinité pour les anticorps provenant de différentes espèces est différente. La protéine A ou G couplée aux billes de sépharose constitue une matrice solide assurant la sédimentation du complexe immun antigène – anticorps.

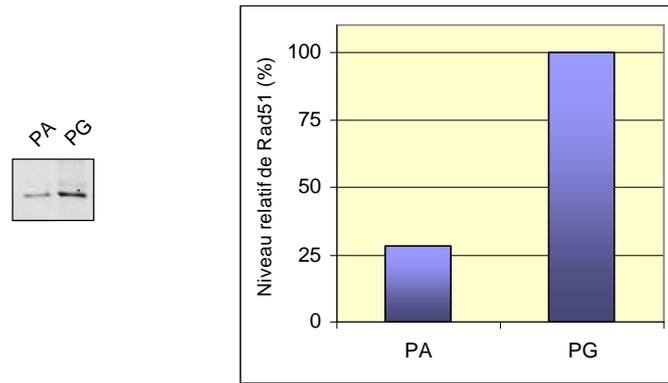


Figure 3.12 : Efficacité de la protéine A ou la protéine G pour l'immunoprécipitation de Rad51. Les immunoprécipitats ont été analysés par Western blot révélé avec l'anticorps anti-Rad51. La quantité de Rad51 immunoprécipitée en utilisant la protéine A ou la protéine G a été illustrée dans l'histogramme et exprimée par rapport à la quantité obtenue avec la protéine G.

Nos essais ont montré que l'anticorps anti-Rad51 monoclonal est reconnu préférentiellement par la protéine G (fig.3.12), puisqu'on immunoprécipite quatre fois plus de Rad51 avec la protéine G qu'avec la protéine A.

2.4.4 Quantité d'anticorps monoclonal

Nous avons déterminé la quantité optimale d'anticorps anti-Rad51 monoclonal pour l'immunoprécipitation de la protéine Rad51. Nous avons réalisé des immunoprécipitations avec 0,5 ; 1 et 5 μg d'anticorps monoclonal pour 1,3 mg d'extrait cellulaire. La quantité de Rad51 immunoprécipitée en fonction de la quantité d'anticorps anti-Rad51 est représentée sur l'histogramme de la figure 3.13. La quantité de Rad51 immunoprécipitée avec 0,5 μg d'anticorps a été considérée comme 100%, les autres valeurs ont été rapportées à celle-ci.

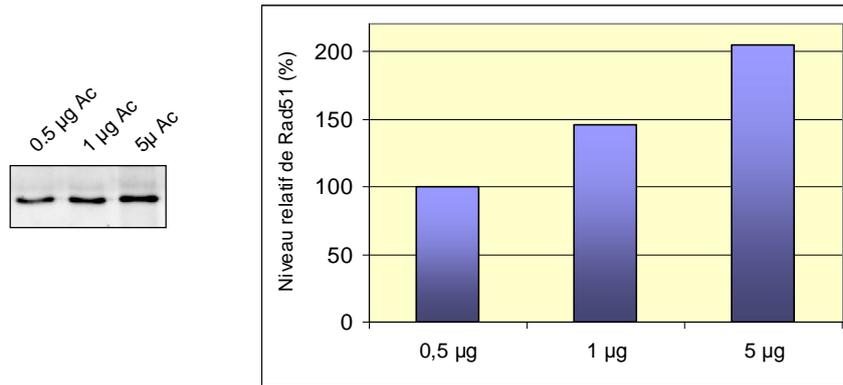


Figure 3.13 : Quantité optimale d'anticorps anti-Rad51 pour l'immunoprécipitation de Rad51. Les immunoprécipitats ont été analysés par Western blot révélé avec l'anticorps anti-Rad51. La quantité de Rad51 immunoprécipitée avec les différentes quantités d'anticorps anti-Rad51 a été présentée sur l'histogramme par rapport à la quantité immunoprécipitée avec 0,5 µg d'anticorps.

L'histogramme montre que la quantité de protéine Rad51 immunoprécipitée n'est pas proportionnelle à la quantité d'anticorps utilisée. Lorsqu'on double la quantité d'anticorps utilisée de 0,5 à 1 µg, la quantité de Rad51 immunoprécipitée augmente de 1,5 fois. Une quantité 10 fois supérieure d'anticorps n'immunoprécipite que deux fois plus de protéine. Pour nos expériences nous avons choisi d'utiliser 1 µg d'anticorps pour immunoprécipiter la protéine Rad51 contenue dans 1,3 mg d'extrait cellulaire, qui semble le meilleur compromis.

2.4.5 Temps d'incubation antigène - anticorps

Le temps d'incubation de l'extrait cellulaire avec l'anticorps peut influencer la formation du complexe immun antigène – anticorps. Nous avons étudié le temps optimal d'incubation de l'anticorps anti-Rad51 avec l'extrait cellulaire. Les extraits ont été incubés avec l'anticorps pendant 1 heure ou sur la nuit à 4°C. Les résultats montrent que l'incubation sur la nuit à 4°C est plus efficace pour immunoprécipiter Rad51 (fig. 3.14).

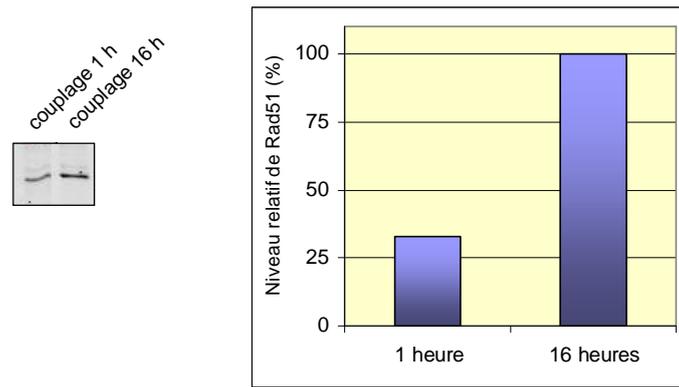


Figure 3.14 : Effet du temps de couplage antigène - anticorps sur l'immunoprécipitation de Rad51. Les immunoprécipitats ont été analysés par Western blot révélé avec l'anticorps anti-Rad51. La quantité de Rad51 immunoprécipitée après incubation de 1 heure ou sur la nuit avec l'anticorps anti-Rad51 a été présentée sur l'histogramme.

2.4.6 Volume de dissociation du complexe immunitaire

L'étape finale de l'immunoprécipitation est la dissociation du complexe immunitaire. Du tampon de dissociation est ajouté et le complexe est chauffé à 90°C. Nous avons recherché le volume optimal pour la dissociation. Nous avons réalisé l'étape de dissociation avec 15 µl ou avec 300 µl de tampon de dissociation suivi d'une précipitation des protéines au TCA (fig. 3.15).

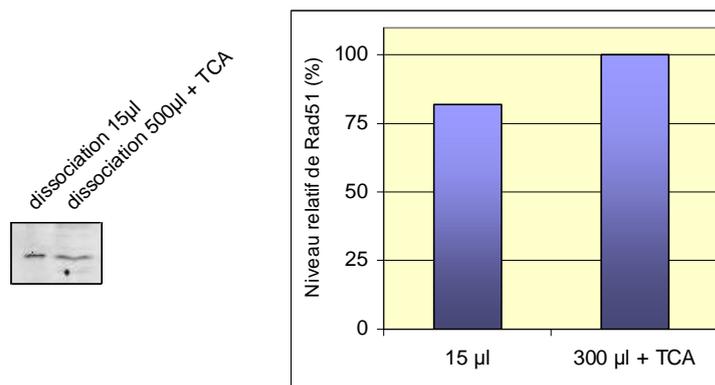


Figure 3.15 : Effet du volume de dissociation du complexe immunitaire sur l'immunoprécipitation de Rad51. Les immunoprécipitats ont été analysés par Western blot révélé avec l'anticorps anti-Rad51. La quantité de Rad51 dissociée avec 15 µl de tampon de dissociation ou avec 300 µl de tampon suivi par la précipitation au TCA a été présentée sur l'histogramme.

La dissociation avec un petit volume de tampon semble légèrement moins efficace que la dissociation avec un grand volume suivi de précipitation des protéines par TCA. L'efficacité

de cette méthode de dissociation des complexes immuns n'étant que peu supérieure à l'efficacité de la dissociation avec un petit volume, nous avons choisi de réaliser la dernière étape de l'immunoprécipitation de Rad51 avec 15 µl de tampon de dissociation pour éviter les effets potentiels du TCA sur la phosphorylation de Rad51.

2.4.7 Conditions d'immunoprécipitation

Les conditions testées pour optimiser l'immunoprécipitation de la protéine Rad51 et les conditions retenues sont regroupées dans le tableau 3.4.

Condition testée		Condition retenue
Tampon de lyse des cellules	RIPA RIPA + SDS RIPA + 500mM NaCl	RIPA
Precogning		Pas nécessaire
Protéine couplée aux billes de sépharose	Protéine A Protéine G	Protéine G
Quantité d'anticorps monoclonal	0,5 µg ; 1 µg ; 5 µg	1 µg pour 1,3 mg extrait cellulaire
Couplage antigène – anticorps	1 heure Sur la nuit	Sur la nuit
Dissociation	Petit volume Grand volume suivi de précipitation au TCA	Petit volume

Tableau 3.4 : Conditions testées et retenues pour la mise en oeuvre de l'immunoprécipitation de Rad51

2.5 Immunoprécipitation de Rad51

Une fois les meilleures conditions d'immunoprécipitation établies, nous avons réalisé des immunoprécipitations de Rad51 à partir de cellules HL60 traitées avec du VP16 ou CLB dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (fig.3.16).

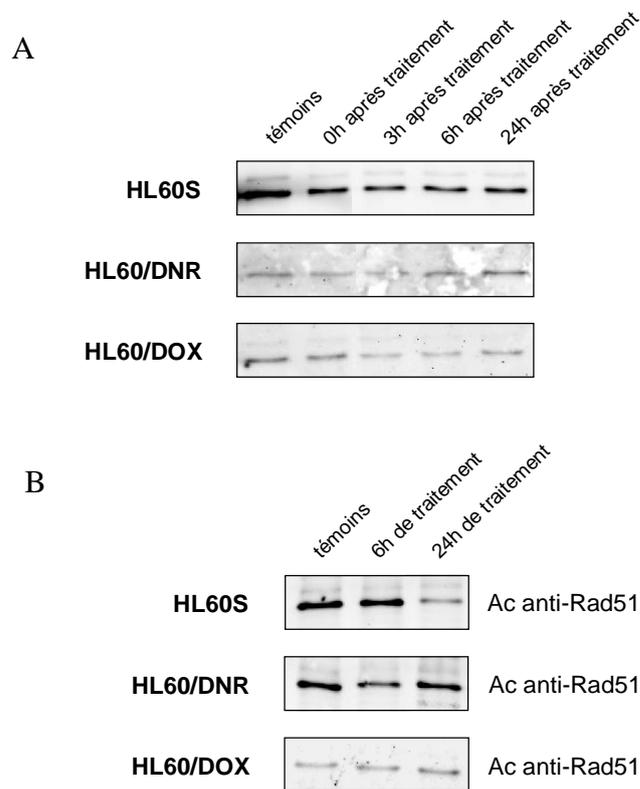


Figure 3.16 : Immunoprécipitation de Rad51 après traitement de cellules HL60S, HL60/DNR et HL60/DOX avec VP16 (A) et CLB (B). IP : Ac anti-Rad51 ; IB : Ac anti-Rad51

L'immunoprécipitation de Rad51 à partir des extraits de cellules traitées avec VP-16 et CLB montre une évolution du niveau de Rad51 similaire à celle dans les extraits bruts (fig. 3.16A, B et fig. 3.8, 3.9). Le niveau de Rad51 diminue dans les cellules HL60S et HL60/DOX et augmente dans la lignée HL60/DNR lorsque les cellules sont traitées au VP16. Le traitement au CLB induit une baisse du niveau de Rad51 plus important dans la lignée HL60S que dans la lignée HL60/DNR et une augmentation dans les cellules HL60/DOX.

On remarque que les quantités de protéine Rad51 immunoprécipitée sont similaires, voir plus faibles que les quantités de Rad51 détectée à partir de l'extrait cellulaire brut. Ainsi l'immunoprécipitation est réalisée à partir d'un grand volume d'extrait de 200 μ l, alors que la

séparation de l'extrait brut par électrophorèse est réalisée avec 15 µl d'extrait. L'immunoprécipitation de Rad51 n'est donc pas efficace. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le site de reconnaissance de l'anticorps anti-Rad51 sur la protéine Rad51 est moins accessible. Il est possible que dans les conditions natives dans lesquelles se trouvent les protéines dans l'extrait cellulaire et dans lesquelles l'immunoprécipitation est réalisée, ce site soit masqué par l'interaction de Rad51 avec d'autres protéines. L'accès de l'anticorps serait ainsi limité ce qui pourrait expliquer la faible quantité de Rad51 immunoprécipitée. Malgré notre tentative d'optimisation de l'immunoprécipitation, celle-ci apparaît moins reproductible et plus aléatoire que l'immunoblot des extraits cellulaires bruts.

Toutefois, nous avons recherché une éventuelle phosphorylation de la protéine Rad51 immunoprécipitée. Aucune phosphorylation n'a été détectée, ce qui peut s'expliquer avec la faible quantité de protéine immunoprécipitée. L'immunoprécipitation de la protéine Rad51 par l'anticorps anti-Rad51 monoclonal a donc été écartée au bénéfice d'une approche par transfection cellulaire de Rad51 et/ou la kinase c-Abl.

3 Surexpression de Rad51 par transfection - optimisation

Nous avons constaté que la quantité de Rad51 phosphorylée après traitement de cellules aux agents anti-cancéreux induisant des CDB était trop faible pour être détectée par nos anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques. Notre tentative d'enrichir la quantité de Rad51 par immunoprécipitation n'a pas donné de résultats satisfaisants car la quantité de protéine immunoprécipitée était inférieure à celle dans l'extrait brut. Nous avons alors recherché une autre méthode pour augmenter la quantité de Rad51 et pour surmonter ainsi la limite de détection de la forme phosphorylée de Rad51 par nos anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques.

Nous avons surexprimé la protéine Rad51 dans des cellules par transfection transitoire du gène *rad51*. Nous avons également co-transfecté la kinase c-Abl afin d'induire un taux de phosphorylation suffisamment élevé pour être détecté.

L'ADNc du gène Rad51 a été surexprimé à l'aide d'un vecteur d'expression pEF-3xHA. Trois mutants ont également été transfectés dans lesquels la séquence du gène sauvage a été mutée en remplaçant une tyrosine par une phénylalanine en position 54 ou 301 ou 315. Les mutants Y54F, Y301F et Y315F ont été ainsi obtenus. La mutation de la tyrosine en phénylalanine rend le résidu non phosphorylable. Le tag HA qui précède la séquence de Rad51 est constitué des acides aminés 98-106 de la glycoprotéine de surface hémagglutinine (HA) du virus influenza humain. Ce tag n'interférerait pas avec l'activité biologique et la localisation cellulaire de la protéine de fusion, et facilite la détection de la protéine. La protéine de fusion HA-Rad51 étant de taille plus importante que Rad51 (dû à la présence du tag HA), cette protéine exogène migre plus lentement que la protéine endogène sur gel d'acrylamide. Ceci permet la distinction entre la protéine Rad51 endogène et la protéine surexprimée HA-Rad51 exogène.

Dans la suite du manuscrit nous parlerons essentiellement de la protéine Rad51 surexprimée par transfection. Cette protéine sera appelée Rad51 sans précision qu'il s'agisse de la protéine transfectée. Les appellations Rad51 exogène et Rad51 endogène vont être utilisées lorsque les deux sont présentées ensemble.

Afin de stimuler la phosphorylation de Rad51, la kinase c-Abl a également été surexprimée par transfection. La séquence codante du gène *c-abl* sauvage ou muté de façon à abolir son activité kinase (c-Abl KD - Kinase Dead) a été insérée dans le vecteur d'expression CMV-FLAG. Ce vecteur d'expression contient un tag FLAG en amont de la séquence de c-Abl, ce qui permet l'expression de la protéine de fusion FLAG-c-Abl. Nous utiliserons c-Abl pour indiquer la protéine c-Abl surexprimée. Lorsque la kinase déficiente est utilisée, elle sera indiquée par c-Abl KD. Dans le cas contraire il s'agira de la kinase c-Abl sauvage.

3.1 Amplification des plasmides

Les plasmides ont été obtenus par collaboration avec l'équipe du Pr. Yamamoto. Afin de les amplifier, des bactéries *E.coli* XL1 ont été transformées avec chacun des plasmides et après purification, les plasmides obtenus ont été migrés sur gel d'agarose (fig. 3.17).

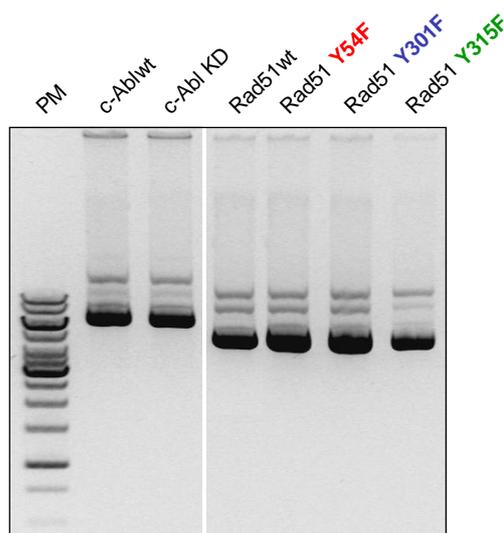


Figure 3.17 : Electrophorèse en gel d'agarose des plasmides c-Ablwt, c-Abl KD, Rad51wt, Rad51 Y54F, Rad51 Y301F et Rad51 Y315F.

L'efficacité de transfection dépend de plusieurs paramètres. Les différentes lignées cellulaires se transfectent avec une efficacité différente. Le réactif de transfection doit, d'une part être adapté à la lignée cellulaire, et d'autre part présenter une bonne efficacité de transfection avec une faible toxicité pour les cellules. La quantité de plasmide, ainsi que le rapport entre la quantité de l'ADN et du réactif influencent également l'efficacité de transfection. Le temps d'incubation après transfection est également un paramètre important.

Nous avons procédé à l'optimisation de ces différents paramètres afin de déterminer les conditions optimales de transfection de Rad51 et de c-Abl.

3.2 Choix de la lignée cellulaire

Nous avons recherché parmi les lignées dont nous disposions, la lignée cellulaire la mieux adaptée à la transfection de Rad51. Les lignées HL60 sont généralement difficiles à transférer contrairement à la lignée HeLa qui est transférée par différents composés avec une efficacité élevée. De plus, les lignées en suspension nécessitent plus d'étapes de lavage et de centrifugation que les lignées adhérentes. Pour ces raisons pratiques nous avons choisi la lignée HeLa pour la surexpression des protéines Rad51 et c-Abl.

3.3 Choix du réactif de transfection

Le processus de transfection induit un certain stress au niveau de la cellule. De plus, la transfection d'une kinase impliquée dans différentes voies de signalisation peut provoquer l'instabilité de la cellule. Nous avons donc recherché un réactif de transfection à la fois efficace et non toxique pour les cellules. Le réactif FuGENE 6 (Roche) semblait répondre à nos attentes.

Selon le fournisseur, 90% des cellules COS-1 mises en présence du FuGENE 6 étaient viables pendant 26 heures. Arnold et collègues ont comparé différents composés de transfection et le réactif FuGENE 6 semblait combiner au mieux efficacité de transfection et absence de cytotoxicité (Arnold et al, 2006). De plus, les conditions d'utilisation du FuGENE 6 ne nécessitent pas de déplétion de sérum au moment de la transfection. Le réactif FuGENE 6 permet d'effectuer des transfusions en présence et en absence de sérum avec la même efficacité. Ceci constitue un avantage, d'une part car il y a moins d'étapes, et d'autre part parce que les effets liés à l'addition du sérum pouvant influencer l'interprétation des résultats de la transfection, peuvent être évités. Des études de la cytotoxicité du FuGENE 6 par quantification des protéines totales dans les cellules ont montré que la quantité des protéines ne change pratiquement pas lorsque la quantité de réactif est augmentée (Jacobsen et al, 2004).

Un deuxième réactif de transfection, le Dreamfect Gold (DFG) (OZ Biosciences) a également été testé. Selon la société OZ Biosciences qui a développé le réactif DFG, l'efficacité de transfection des cellules HeLa avec ce produit est de 80 – 90%.

Nous avons alors co-transfecté des cellules HeLa avec les plasmides contenant les gènes de Rad51wt et de c-Ablwt en utilisant le réactif DFG ou FuGENE 6 et nous avons comparé l'efficacité de transfection de ces deux réactifs. Les résultats sont présentés sur la figure 3.18. Les niveaux d'expression de Rad51wt et de c-Ablwt après transfection avec le DFG ont été rapportés à ceux obtenus avec le FuGENE 6 (fig. 3.18B).

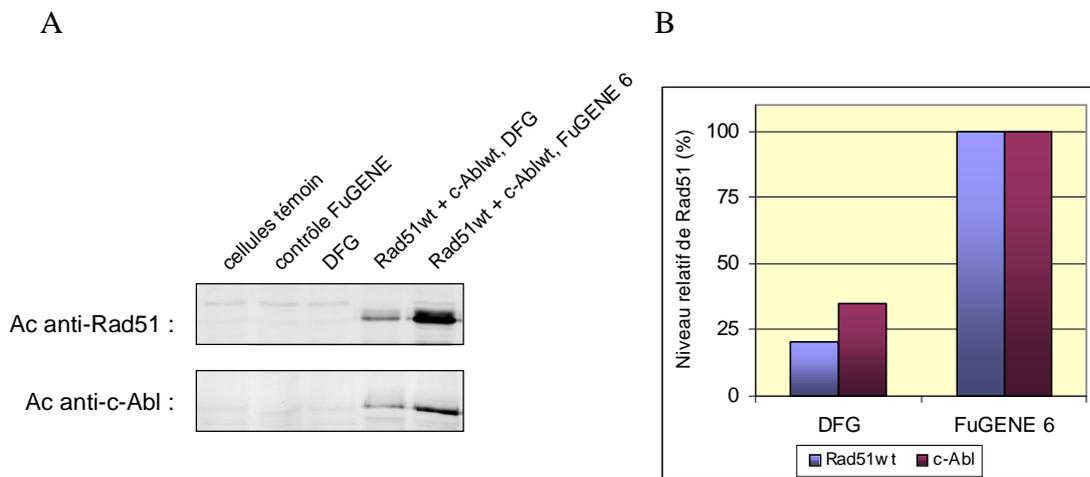


Figure 3.18 : Co-transfection de cellules Hela avec les réactifs DreamFect Gold et FuGENE 6. Les Western blots ont été révélés avec les anticorps anti-Rad51 et anti c-Abl (A). Le niveau d'expression relatif de la protéine Rad51wt a été représenté par rapport à celui avec le FuGENE 6 considéré comme 100% (B).

L'observation morphologique des cellules sous microscope montre que les réactifs FuGENE 6 ou DreamFect Gold ajoutés seuls aux cellules ne sont pas toxiques. On n'observe pas de différence morphologique entre les cellules témoins et les cellules incubées en présence du réactif. Cependant la co-transfection de Rad51wt avec c-Ablwt a un effet néfaste sur la viabilité cellulaire lorsque le DFG est utilisé. 24 heures après la co-transfection de Rad51wt et c-Ablwt avec ce réactif, une grande partie des cellules présentent des altérations morphologiques avec des vésicules clairement visibles. L'observation des cellules co-transfectées avec le FuGENE 6 montre une viabilité cellulaire supérieure à 95% laissant supposer une toxicité négligeable contrairement au DFG.

Une bande de taille d'environ 42 kDa est reconnue par l'anticorps anti-Rad51 dans les extraits de cellules co-transfectées. Cette bande de taille supérieure à la protéine endogène correspond à HA-Rad51wt. La kinase exogène FLAG-c-Abl détectée par l'anticorps anti-cAbl est d'environ 150 kDa. L'efficacité de transfection a été estimée par l'analyse du niveau d'expression des protéines recombinantes. La figure 3.18B montre que le niveau d'expression de Rad51wt transfectée avec le FuGENE 6 est cinq fois supérieur à celui obtenu avec le DFG. La kinase c-Ablwt est également mieux transfectée avec le FuGENE 6, puisque son expression est trois fois plus importante que celle obtenue avec le DFG. Ceci est certainement dû en partie au taux élevé de mort cellulaire lorsque la co-transfection est effectuée avec le DFG.

Au vu de la forte toxicité du DFG sur nos cellules, nous avons choisi le réactif FuGENE 6 qui présente une très faible toxicité et un pouvoir de transfection satisfaisant des cellules HeLa.

3.4 Optimisation du ratio FuGENE 6 : ADN

Le ratio entre la quantité de réactif de transfection et la quantité de plasmide est très important pour l'efficacité de transfection. Nous avons déterminé le ratio optimal de quantité de FuGENE 6 par rapport à la quantité d'ADN plasmidique pour obtenir la meilleure efficacité de transfection de Rad51 sauvage ou mutée et de c-Abl. Trois ratios ont été testés pour chaque plasmide – 3 μ l FuGENE 6 pour 1 μ g ADN (3:1), 3 μ l FuGENE 6 pour 2 μ g ADN (3:2) et 6 μ l FuGENE 6 pour 1 μ g ADN (6:1).

3.4.1 Rad51wt

Nous avons transfecté des cellules HeLa avec le plasmide codant Rad51wt en utilisant les trois ratios de FuGENE 6 : ADN cités ci-dessus. Les Western blots réalisés avec les extraits des cellules transfectées ont été révélés avec l'anticorps anti-Rad51 et l'anticorps anti- β -actine, utilisé comme témoin de charge (fig. 3.19).

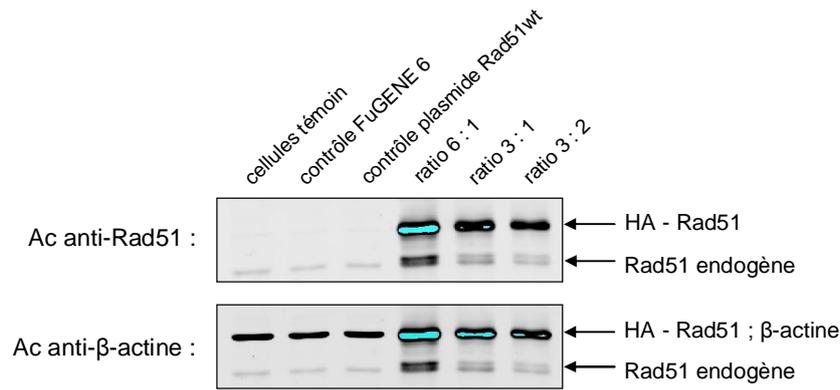


Figure 3.19 : Optimisation du ratio FuGENE 6 : plasmide Rad51wt. La protéine Rad51 a été révélée par un anticorps anti-Rad51. La β -actine, révélée par un anticorps anti- β -actine a été utilisée pour la normalisation des signaux.

La figure 3.19 montre que l'efficacité de transfection de Rad51 sauvage est optimale avec un ratio de FuGENE 6 : plasmide de 3:1. Nous avons utilisé la β -actine pour la normalisation des signaux entre les pistes. Cependant la taille moléculaire de cette protéine qui est de 42 kDa coïncide avec celle de la protéine HA-Rad51 et ceci résulte dans la superposition des deux bandes et donc l'impossibilité de normaliser la charge protéique entre les pistes. Cependant il est clairement visible que le niveau de HA-Rad51 obtenu avec un ratio 3:1 est beaucoup plus important qu'avec les autres ratios testés. La β -actine ne peut donc pas être utilisée pour la normalisation de la charge protéique en cas de transfection de la protéine HA-Rad51. Pour cette raison la α -tubuline a été utilisée pour les expériences suivantes.

Il est intéressant de noter que la transfection de la protéine exogène HA-Rad51 augmente le niveau d'expression de la protéine Rad51 endogène. Plus le niveau de la protéine exogène est élevé, plus la protéine endogène est exprimée fortement. Cette augmentation du niveau de Rad51 a déjà été observée dans des études antérieures (Ruksc et al, 2007). De plus, une augmentation de la quantité de Rad51 associé à la chromatine a été observée après surexpression de Rad51 exogène (Shimizu et al, 2009). Ceci peut être dû à une augmentation du niveau d'expression de Rad51 endogène après transfection, semblable à celle que nous avons observée. Ce phénomène reste à élucider.

3.4.2 Rad51 mutée – Y54F, Y301F, Y315F

La même expérience a été réalisée avec les plasmides contenant le gène de Rad51 mutée : Rad51 Y54F, Rad51 Y301F, Rad51 Y315F afin de déterminer le ratio optimal de FuGENE 6 : ADN. Les Western blots réalisés avec les extraits des cellules transfectées ont été révélés avec l'anticorps anti-Rad51 pour mettre en évidence l'expression de la protéine Rad51 mutée et avec l'anticorps anti- α -tubuline pour la normalisation des signaux entre les pistes (fig. 3.20).

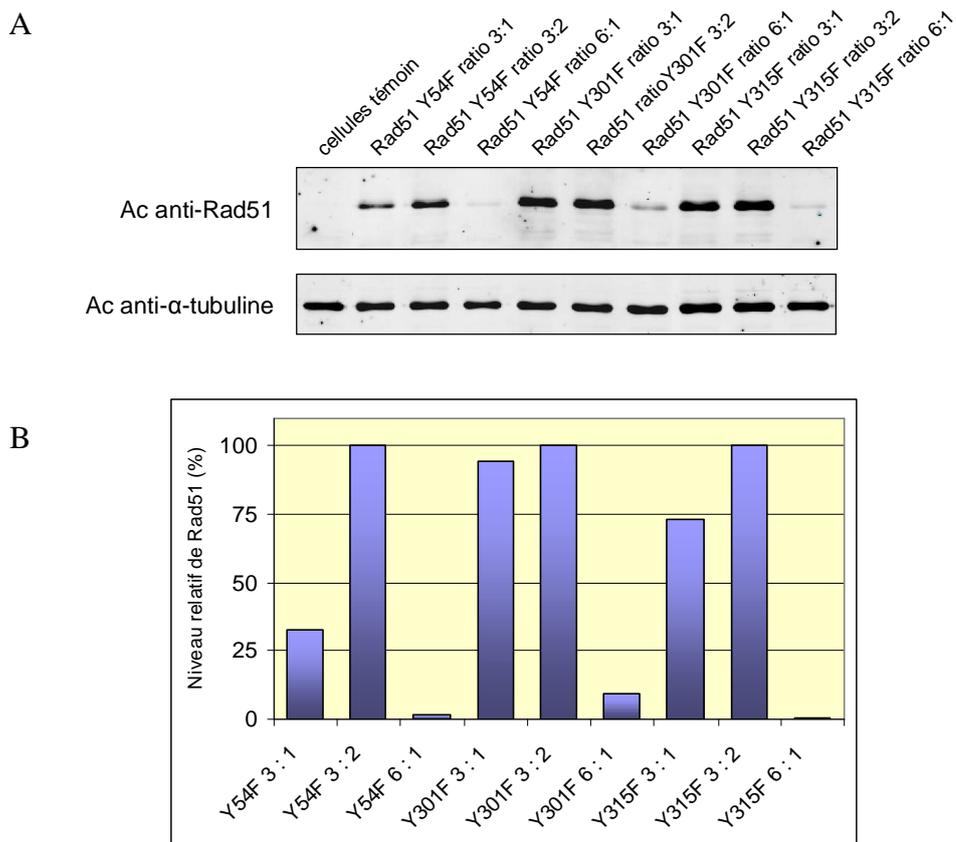


Figure 3.20 : Optimisation du ratio FuGENE 6 : plasmides Rad51 Y54F, Y301F, Y315F. Trois ratios de FuGENE 6 : ADN ont été testés pour chaque plasmide – 3:1, 3:2, 6:1. La protéine HA-Rad51 a été révélée par l'anticorps anti-Rad51. La α -tubuline, révélée par un anticorps anti- α -tubuline a été utilisée pour la normalisation des signaux (A). Les niveaux relatifs d'expression des protéines mutées comparés à la protéine sauvage sont représentés sur l'histogramme (B).

L'efficacité de transfection des trois plasmides contenant le gène de Rad51 muté est très dépendante du ratio FuGENE 6 : ADN utilisé. L'expression de la protéine HA-Rad51 la plus élevée pour les trois mutations est obtenue avec un ratio de FuGENE 6 : ADN de 3:2. Nous

avons donc choisi ce ratio de 3 μ l FuGENE 6 pour 2 μ g d'ADN plasmidique qui donne la meilleure expression des protéines mutées.

3.4.3 c-Abl

Afin de déterminer le ratio optimal de FuGENE 6 : ADN pour la transfection de la kinase c-Abl, nous avons transfecté des cellules HeLa avec les trois ratios de FuGENE 6 : ADN. Les Western blots réalisés avec les extraits ont été révélés avec l'anticorps anti-c-Abl et l'anticorps anti- β -actine pour la normalisation des signaux entre les pistes (fig. 3.21).

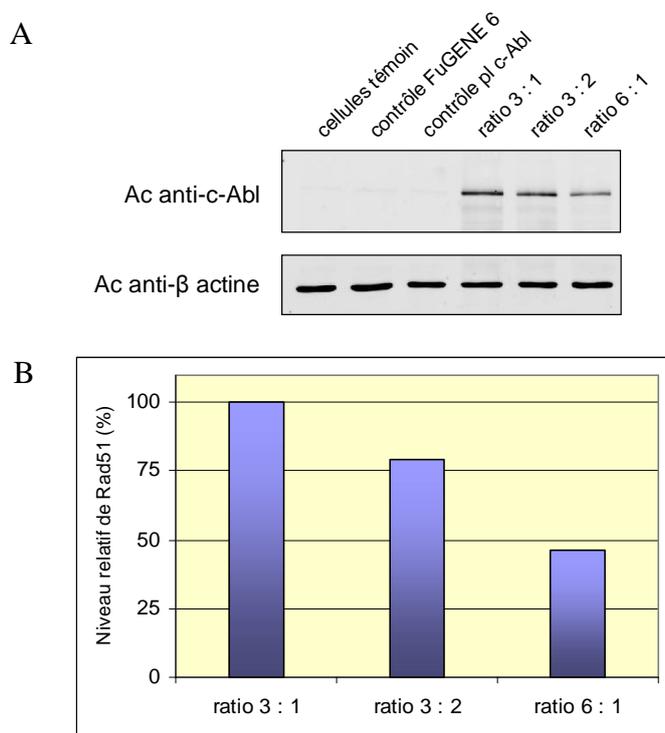


Figure 3.21 : Optimisation du ratio FuGENE 6 : plasmide c-Abl. La protéine c-Abl a été révélée par l'anticorps anti-c-Abl. La β -actine, révélée par l'anticorps anti- β -actine a été utilisée comme témoin de charge (A). Les niveaux relatifs d'expression de la protéine sont représentés sur l'histogramme, le niveau obtenu avec un ratio 3:1 a été considéré comme 100% (B).

Le ratio de FuGENE 6 : ADN qui donne l'expression la plus élevée de c-Abl est de 3:1. Une augmentation de la quantité d'ADN ou du réactif réduit l'efficacité de transfection de c-Abl.

Dans toutes les expériences permettant de déterminer le ratio optimal de réactif par rapport à la quantité d'ADN, nous avons réalisé des contrôles. Les cellules ont été incubées uniquement avec le réactif FuGENE 6 ou avec le plasmide. Aucune bande n'est révélée par les anticorps anti-Rad51 et anti-c-Abl dans les extraits de ces cellules. Ceci montre que le réactif seul et le plasmide seul n'induisent pas l'expression de protéines de taille identique aux protéines exogènes HA-Rad51 et FLAG-c-Abl dans les cellules et que les plasmides ne peuvent pas entrer spontanément dans les cellules HeLa pour être exprimés.

3.5 Quantité de plasmide pour les co-transfections

Une fois le ratio de FuGENE 6 : ADN déterminé pour les plasmides Rad51 sauvage et mutée et le plasmide c-Abl, nous avons déterminé la quantité de plasmide à co-transfecter pour un nombre de cellules donné. Nous avons souhaité obtenir une co-expression maximale des deux protéines afin d'assurer un taux maximal de phosphorylation de la protéine Rad51.

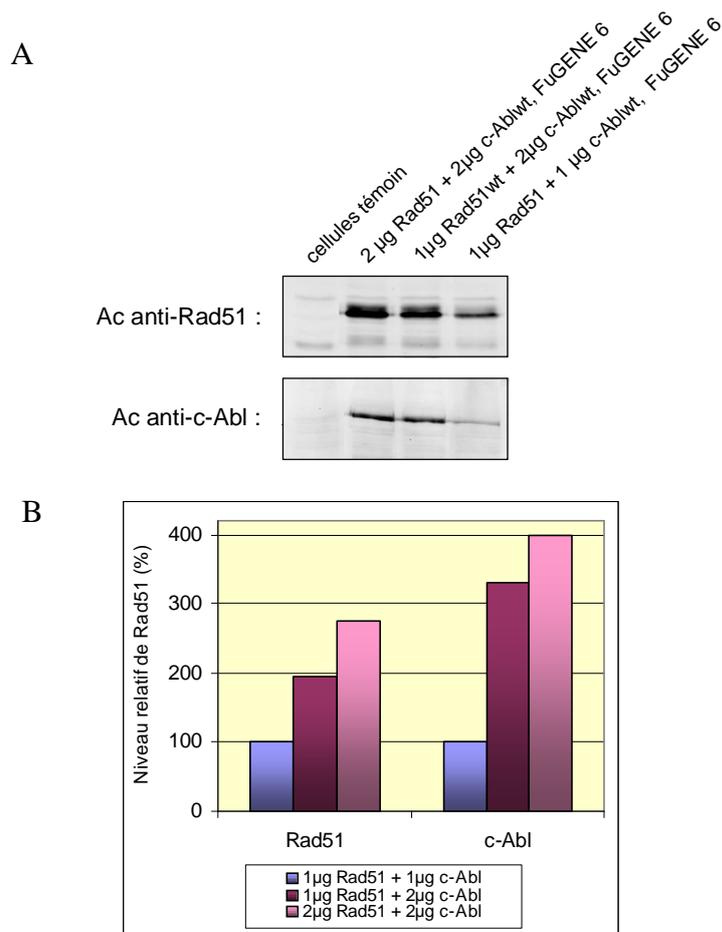


Figure 3.22 : Optimisation de la quantité de plasmide à co-transfecter. Les Western blots ont été révélés avec les anticorps anti-Rad51 et anti c-Abl (A). Les niveaux relatifs d'expression

des protéines Rad51 et c-Abl ont été rapportés à ceux obtenus avec 1 μg de chaque plasmide (B).

Nous avons préparé 200 000 cellules que nous avons co-transfectée le lendemain avec 1 ou 2 μg de plasmide Rad51wt et 1 ou 2 μg de plasmide c-Abl. L'expression des protéines Rad51 et c-Abl ont été révélées avec les anticorps anti-Rad51 et anti-c-Abl respectivement (fig. 3.22A). Les niveaux relatifs d'expression de la protéine Rad51 et de la kinase c-Abl ont été représentés sur histogramme (fig. 3.22B) par rapport au niveau obtenu en co-transfectant les cellules avec 1 μg de chaque plasmide.

L'histogramme de la figure 3.23B montre que l'expression des protéines Rad51 et c-Abl est maximale lorsque 2 μg de chaque plasmide sont utilisés pour la transfection. Nous avons donc utilisé un rapport de 2 μg de chaque plasmide pour 200 000 cellules dans toutes les expériences de transfection.

3.6 Temps d'incubation après transfection

Le temps d'incubation des cellules après transfection doit être suffisant pour permettre une expression optimale des protéines recombinantes. Cependant une incubation prolongée peut être défavorable pour la viabilité cellulaire si les protéines surexprimées sont toxiques pour la cellule.

Nous avons déterminé le temps optimal d'incubation après transfection pour l'expression de la protéine Rad51 et estimé la viabilité cellulaire. Pour cela nous avons transfecté des cellules avec le plasmide Rad51wt ou co-transfecté Rad51wt et c-Abl. Les cellules ont été lysées à différents temps après transfection et le niveau d'expression de Rad51 a été analysé. Les résultats sont représentés sur la figure 3.23.

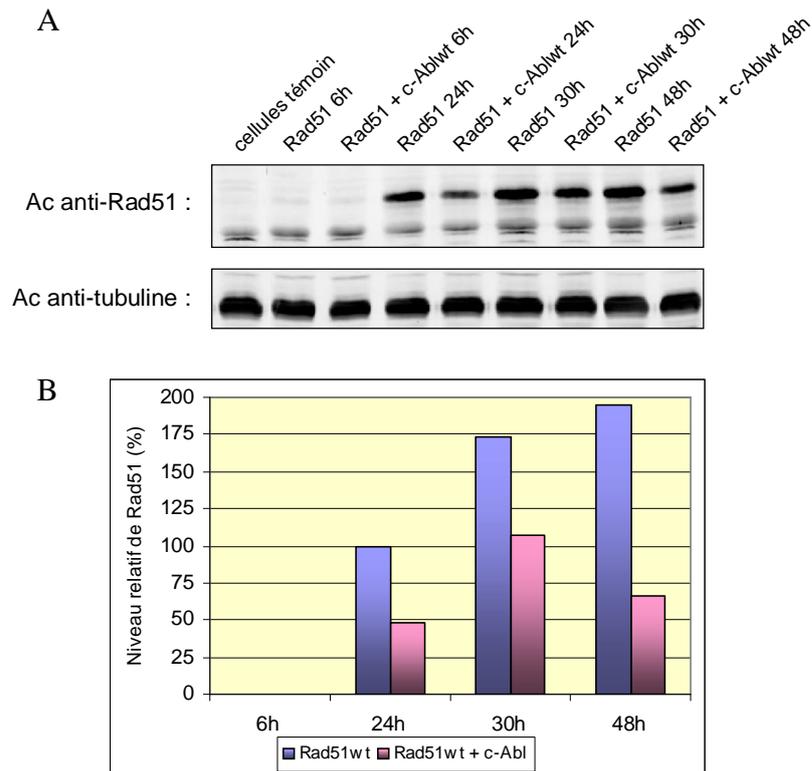


Figure 3.23 : Optimisation du temps d'incubation des cellules après transfection. L'expression de la protéine Rad51wt transfectée seule ou co-transfectée avec la kinase c-Abl a été révélée sur Western blot par l'anticorps anti-Rad51 (A). Le niveau d'expression de HA-Rad51wt a été normalisé par rapport à la α -tubuline et exprimé par rapport à l'expression 24 heures après transfection (B).

L'expression de HA-Rad51wt est très faible six heures après transfection et le niveau d'expression n'apparaît pas sur l'histogramme. 24 heures après transfection, la protéine Rad51wt est surexprimée dans les cellules transfectées. Lorsque Rad51wt est transfectée seule, son expression augmente avec le temps et 48 heures après transfection son taux d'expression est deux fois supérieur à celle 24 heures après transfection.

La co-transfection de Rad51wt avec c-Ablwt diminue l'efficacité d'expression de Rad51wt. 24 heures après co-transfection son expression est deux fois moins importante que lorsque Rad51wt est transfectée seule. 30 heures après co-transfection le niveau de Rad51wt augmente comparé à 24 heures après transfection, mais reste cependant inférieur à celui de Rad51wt transfectée seule. 48 heures après co-transfection l'expression de Rad51wt diminue. L'observation morphologique des cellules au microscope 48 heures après co-transfection montre des cellules fortement altérées qui présentent un grand nombre de vésicules sur la membrane. De plus, un grand nombre de cellules sont décollées du support ce qui montre que

la co-transfection de Rad51wt et c-Ablwt est néfaste pour la viabilité cellulaire qui est d'environ 55%. Lorsqu'on surexprime une kinase, elle phosphoryle un grand nombre de protéines cibles de manière non contrôlée, ce qui déséquilibre la cellule et peut induire sa mort. La diminution de l'expression de la protéine Rad51wt transfectée peut donc être due à l'état des cellules.

Nous avons choisi de réaliser nos expériences en incubant les cellules 24 heures après transfection qui est un bon compromis entre l'expression de la protéine et la viabilité cellulaire.

3.7 Niveau d'expression de la protéine HA-Rad51 transfectée seule

Après avoir établi le ratio optimal de FuGENE 6 : ADN, la quantité de plasmide et le temps optimal d'incubation des cellules pour la transfection de Rad51, nous avons analysé le niveau d'expression Rad51 sauvage ou mutée dans les cellules transfectées afin de s'assurer que le niveau d'expression est comparable entre les protéine exogènes.

Des cellules ont été transfectées avec le plasmide Rad51wt ou avec un des trois plasmides mutés : Rad51 Y54F, Rad51 Y301F et Rad51 Y315F. Le niveau de Rad51 a été analysé par Western blot révélé par l'anticorps anti-Rad51 (fig. 3.24). La α -tubuline a été utilisée pour la normalisation de la quantité de protéines chargées entre les pistes. La protéine Rad51 purifiée a été utilisée comme témoin.

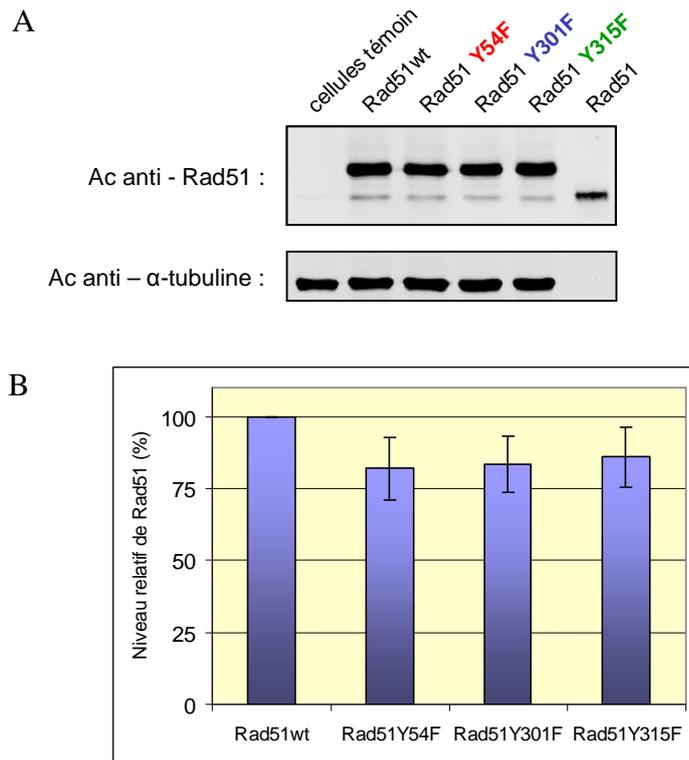


Figure 3.24 : Niveau d'expression de Rad51wt, Rad51 Y54F, Rad51 Y301F et Rad51 Y315F transfectées dans des cellules HeLa. Les Western blots ont été révélés avec l'anticorps anti-Rad51 et l'anticorps anti- α -tubuline. La protéine Rad51 purifiée a été utilisée comme témoin. (A). Niveau relatif d'expression de Rad51 sauvage ou mutée rapporté à l'expression de Rad51wt (B).

La figure 3.24B montre que l'expression de Rad51 est quasiment identique entre la protéine sauvage et les trois protéines mutées. On peut donc conclure que l'expression de Rad51 sauvage ou mutée est quasi équivalente avec tous les plasmides. Ceci permettra la comparaison du niveau de phosphorylation entre ces protéines.

3.8 Niveau d'expression de la protéine Rad51 co-transfectée avec c-Abl

Nous avons réalisé la même étude du niveau d'expression de Rad51 sauvage ou mutée lorsque la kinase c-Abl est co-transfectée. Les résultats du Western blot des extraits de cellules co-transfectées avec c-Abl et Rad51 sauvage ou mutée sont présentés sur la figure 3.25.

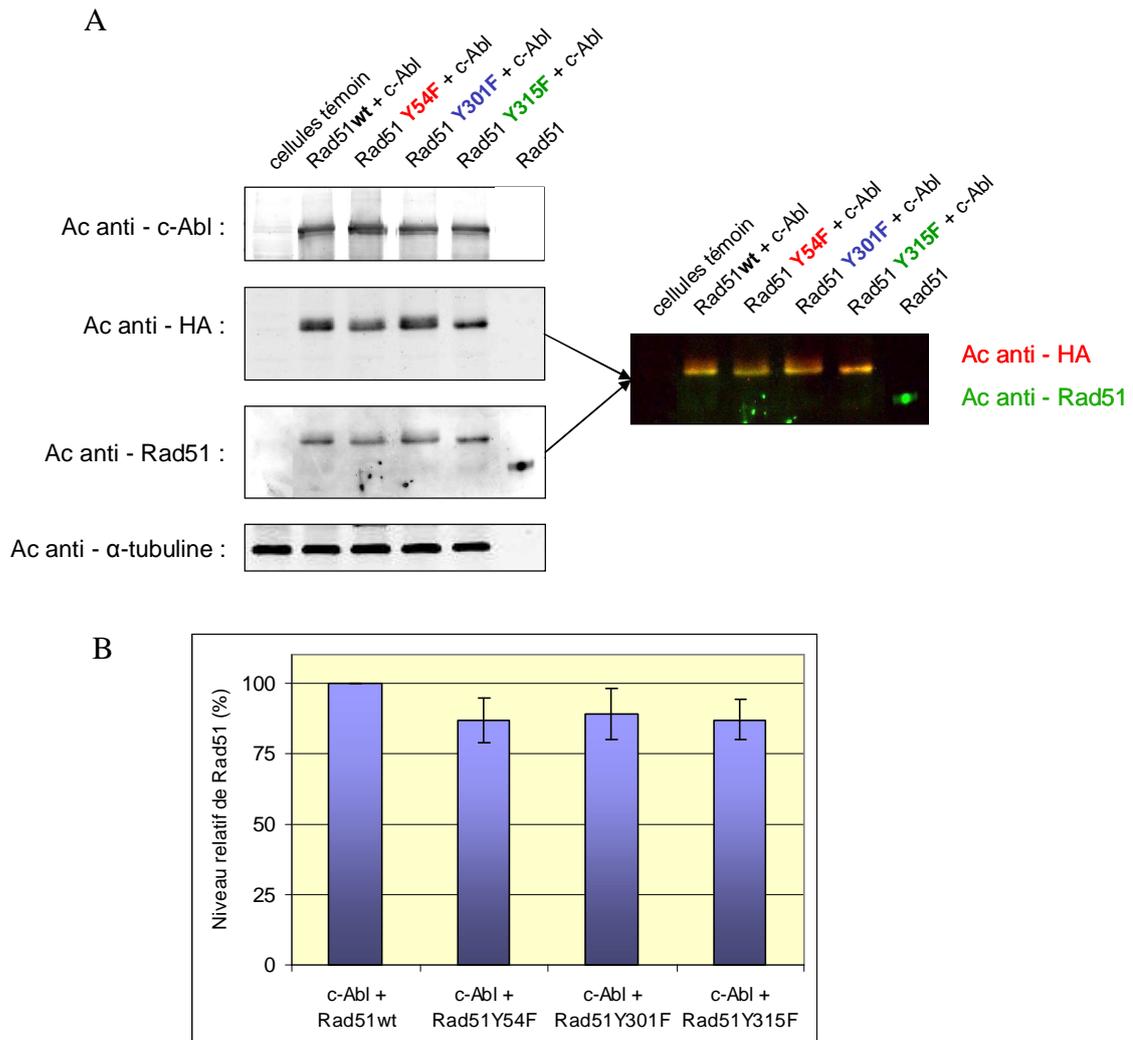


Figure 3.25 : Niveau d'expression de Rad51 sauvage ou mutée dans des cellules co-transfectées avec c-Abl. Les cellules ont été co-transfectées avec c-Abl et Rad51wt, Rad51 Y54F, Y301F ou Rad51 Y315F. Les Western blots ont été révélés par les anticorps anti c-Abl, anti-Rad51 et anti-HA. La α -tubuline a été utilisée comme témoin de charge. La superposition des signaux des anticorps anti-Rad51 et anti-HA est montrée en couleur sur l'image de droite. La protéine Rad51 purifiée a été utilisée comme témoin. (A). Niveau relatif d'expression de Rad51 sauvage ou mutée rapporté à l'expression de Rad51wt (B).

L'anticorps anti-c-Abl révèle la présence de c-Abl dans tous les extraits de cellules transfectées avec c-Abl ou co-transfectés avec c-Abl et Rad51. L'expression de HA-Rad51 dans les cellules co-transfectées est confirmée par les anticorps anti-HA et anti-Rad51. La superposition des signaux des anticorps est présentée en couleur. Le signal des anticorps de lapin est obtenu en rouge (ici l'anticorps anti-HA), celui des anticorps de souris en vert (ici l'anticorps anti-Rad51). La superposition des deux couleurs donne un signal jaune. Sur l'image de synthèse obtenue, le signal des deux anticorps est en jaune. Il y a donc une parfaite

superposition des bandes révélées par l'anticorps anti-Rad51 et par l'anticorps anti-HA et ces bandes correspondent bien à la protéine Rad51 exogène d'environ 42 kDa.

Lorsque la kinase c-Abl est co-transfectée avec Rad51, on observe la détection d'une bande diffuse pour Rad51 plus large que celle de la protéine transfectée seule. Cette bande diffuse est détectée par l'anticorps anti-Rad51 ainsi que par l'anticorps anti-HA dans les extraits des cellules co-transfectées avec Rad51wt, Rad51 Y54F et Rad51 Y301F. Dans les extraits de cellules co-transfectées avec Rad51 Y315F la bande de Rad51 n'est pas diffuse et ressemble celle de l'extrait transfecté avec Rad51 seul. La présence de cette bande diffuse plus large semble être corrélée à la co-transfection de c-Abl et pourrait résulter de formes phosphorylées de Rad51.

Le niveau d'expression de Rad51 mutée a été quantifié et rapporté au niveau de Rad51 sauvage. Les résultats montrent que l'expression de Rad51 sauvage ou mutée co-transfecté avec c-Abl a un profil d'expression comparable à celui de la protéine transfectée seule. Le niveau d'expression de la protéine est comparable entre les extraits de cellules co-transfectées avec c-Abl et la protéine Rad51 sauvage ou mutée (fig. 3.25B).

Ainsi nous avons montré que la transfection de Rad51 seule ou en présence de c-Abl est efficace et homogène entre la protéine sauvage et les protéines mutées et donc que nos conditions retenues permettent une transfection reproductible.

3.9 Conditions de transfection retenues

Les conditions optimales de transfection du plasmide contenant le gène de Rad51 et de co-transfection des plasmides contenant les gènes de Rad51 et de c-Abl que nous avons choisi sont regroupées dans le tableau suivant.

Condition testée	Condition retenue	
Réactif de transfection	FuGENE 6	
Ratio FuGENE 6 : ADN	Rad51wt	3 : 1
	Rad51 Y54F	3 : 2
	Rad51 Y301F	3 : 2
	Rad51 Y315F	3 : 2
	c-Abl	3 : 1
Quantité de plasmide Rad51 et c-Abl pour co-transfection	2 µg Rad51 + 2 µg c-Abl	
Temps d'incubation après co-transfection	24 heures	

Tableau 3.5 : Conditions optimales de transfection de Rad51 sauvage ou mutée et de co-transfection de Rad51 avec c-Abl dans des cellules HeLa.

4 Evaluation de la phosphorylation de Rad51 dans des cellules transfectées

Après avoir établi les meilleures conditions de transfection de Rad51 sauvage et mutée et de co-transfection avec c-Abl, nous avons surexprimé ces deux protéines dans les cellules HeLa. La surexpression des deux protéines devrait assurer un taux de phosphorylation de Rad51 suffisant qui permettra de surmonter la limite de détection de nos anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques et de détecter ainsi la forme phosphorylée de Rad51.

Etant donné que la phosphorylation de Rad51 sur les deux tyrosines décrites, en positions 54 et 315 n'a jamais été observée dans la même étude, nous avons tout d'abord vérifié que cette protéine peut effectivement être phosphorylée sur ces deux sites.

La protéine Rad51 transfectée étant de poids moléculaire supérieur au poids de la protéine endogène, ces protéines peuvent être distinguées sur Western blot par la migration ralentie de la protéine exogène. La phosphorylation de la protéine endogène étant trop faible pour être détectée, pour la suite des résultats, seule la protéine exogène sera présentée, sauf précision.

4.1 Confirmation de l'activité kinase de c-Abl surexprimée

La kinase c-Abl transfectée dans les cellules HeLa doit être active afin de pouvoir phosphoryler la protéine Rad51. En absence de dommage de l'ADN la kinase c-Abl adopte une conformation auto-inhibée (voir chapitre "Introduction, c-Abl", page 46). Afin d'être activée la kinase doit être phosphorylée sur tyrosine. En conditions physiologiques c-Abl s'autophosphoryle rarement. Cependant l'autophosphorylation et l'autoactivation est observée en cas de surexpression par transfection dans des cellules (Zhu & Wang, 2004). Afin de vérifier si la protéine c-Abl transfectée dans les cellules HeLa est active et peut exercer son activité kinase, nous l'avons transfectée seule ou avec Rad51wt. Une protéine mutée déficiente en activité kinase (c-Abl KD) a également été utilisée. Les Western blots ont été révélés avec l'anticorps anti-tyrosine commercial (fig. 3.26).

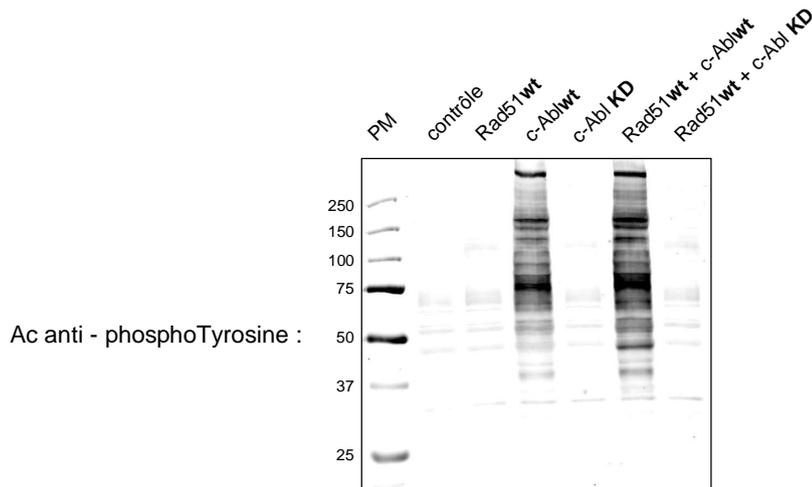


Figure 3.26 : Vérification de l'activité kinase de c-Abl. Les cellules ont été transfectées avec Rad51, c-Ablwt ou c-Abl KD ou co-transfectées avec Rad51wt et c-Ablwt ou KD. Les Western blots ont été révélés par l'anticorps anti-phosphotyrosine commercial.

L'anticorps anti-phosphotyrosine commercial que nous avons utilisé pour la révélation du Western blot met en évidence l'activité de la kinase c-Abl transfectée dans les cellules HeLa. Cet anticorps révèle une multitude de bandes qui correspondent à des protéines phosphorylées dans les extraits de cellules transfectées avec c-Ablwt seule ou avec c-Ablwt et Rad51wt (fig. 3.26). Dans les extraits de cellules transfectées avec c-Abl KD, l'anticorps anti-phosphotyrosine ne détecte pas de protéines phosphorylées et le profil des pistes est très semblable à celui des extraits de cellules témoins. Ceci confirme que la kinase c-Ablwt est active et est capable de phosphoryler un grand nombre de protéines cibles. Le grand nombre de protéines phosphorylées détectées par l'anticorps anti-phosphotyrosine commercial souligne la nécessité d'utiliser des anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques pour l'analyse de la phosphorylation de Rad51.

4.2 Confirmation de la phosphorylation de Rad51

Afin de vérifier que la protéine Rad51 peut être phosphorylée sur les tyrosines en position 54 et 315, nous avons transfecté des cellules HeLa avec Rad51 sauvage, c-Abl sauvage ou c-Abl déficiente. Des cellules ont été également co-transfectées avec Rad51 sauvage et c-Abl sauvage ou déficiente. Après séparation et transfert des extraits, les membranes ont été révélées avec les anticorps anti-c-Abl, anti-Rad51 et anti-phosphotyrosine spécifiques que nous avons purifiés (fig. 3.27).

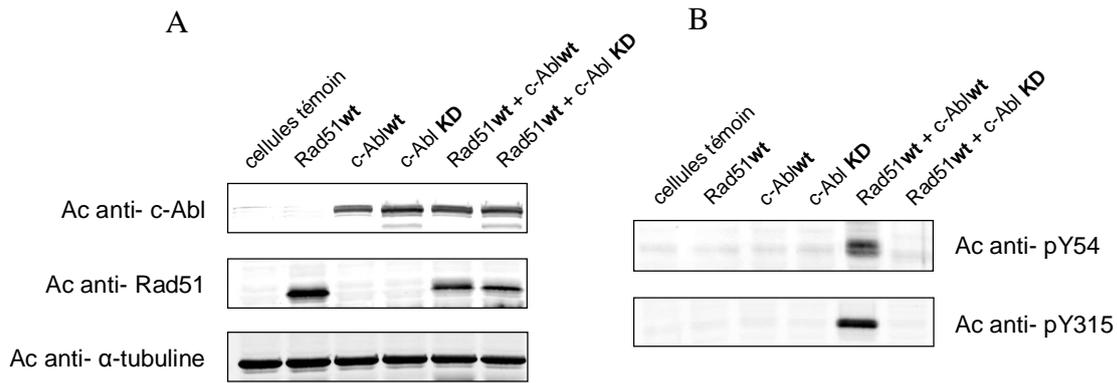


Figure 3.27 : Vérification de la phosphorylation de Rad51 sur tyrosine. Les Western blots d'extraits de cellules transfectées avec Rad51wt, c-Ablwt, c-Abl KD ou co-transfectées avec Rad51wt et c-Ablwt ou c-Abl KD ont été révélés avec les anticorps anti-c-Abl, anti-Rad51, anti- α -tubuline (A) et les anticorps anti-pY54 et anti-pY315 (B). La α -tubuline a été utilisée comme témoin de charge.

La surexpression de Rad51 et de c-Abl dans les extraits des cellules transfectées est confirmée par leur détection par les anticorps anti-Rad51 et anti-c-Abl respectivement. Les anticorps anti-pY54 et anti-pY315 reconnaissent la protéine Rad51 dans les extraits de cellules co-transfectées avec la kinase c-Abl active. Ceci confirme que la protéine Rad51 peut être phosphorylée sur la tyrosine 54 ainsi que sur la tyrosine 315. L'absence de signal lorsque la kinase c-Abl déficiente est co-transfectée confirme que la phosphorylation est réalisée par c-Abl.

Une seule étude antérieure a démontré la phosphorylation de Y54. Dans cette étude les auteurs ont mis en évidence la phosphorylation par spectroscopie de masse. La protéine Rad51 a été co-transfectée avec c-Abl dans des cellules, purifiée et analysée ensuite par spectroscopie de masse qui a montré un seul pic de phosphorylation dans le fragment contenant la tyrosine 54 (Yuan et al, 1998). Nous avons utilisé une approche différente par détection avec des anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques. La détection de la phosphorylation de la protéine sur Y54 a été fait directement sur membrane résultant de la séparation et le transfert des extraits cellulaires. Ainsi nous avons démontré la phosphorylation de la tyrosine 54 de Rad51 par la kinase c-Abl. De plus, nous avons observé pour la première fois la phosphorylation des deux sites Y54 et Y315 dans la même étude. En effet, dans leur étude Yuan et collègues n'ont observé qu'un seul site de phosphorylation, la

tyrosine 54. D'autres études ont également présenté la phosphorylation de Rad51 mais uniquement sur la tyrosine 315 (Chen et al, 1999b; Slupianek et al, 2001).

Dans l'expérience de Yuan et collègues, afin de réaliser l'étude des sites de phosphorylation de Rad51 par spectroscopie de masse, la protéine phosphorylée, ainsi que la protéine non phosphorylée a été digérée par la trypsine. Le spectre obtenu avec la protéine phosphorylée a été comparé avec celui de la protéine non phosphorylée. Cependant aucun détail sur les conditions de la spectroscopie de masse n'a été donné par les auteurs (Yuan et al, 1998). En spectroscopie de masse MALDI le peptide phosphorylé a une masse d'environ 80 Da supérieure à celle du peptide non phosphorylé. Une différence de pic a été observée dans le fragment contenant la tyrosine 54 mais aucun pic n'a été détecté pour le fragment contenant la tyrosine 315. L'absence de détection de phosphorylation sur Y315 par cette méthode peut être expliquée par les caractéristiques des peptides obtenus après digestion. Le peptide contenant la tyrosine 54 a une longueur de 17 acides aminés et un pHi de 4.03. Le peptide contenant la tyrosine 315 est de 25 acides aminés avec un pHi de 4.83 (fig. 3.28). Ainsi le peptide contenant Y315 est plus long et plus négativement chargé que le peptide Y54, ce qui pourrait interférer avec sa détection par spectroscopie de masse (Raggiaschi et al, 2005).

1	MAMQMQL	LEAN	ADTSVEEESF	GPQPISRLEQ	CGINANDVKK	LEEAGFHTVE
51	AVAYAP	KKEL	INIKGISEAK	ADKILAEAAK	LVPMGF	TAT EFHQRSEII
101	QITTTGSKELD		KLLQGGIETG	SITEMFGEFR	TGKTQICHTL	AVTCQLPIDR
151	GGGEGKAMYI		DTEGTFRPER	LLAVAERYGL	SGSDVLDNVA	YARAFNTDHQ
201	TQLLYQASAM		MVESRYALLI	VDSATALYRT	DYSGRGELSA	RQMHLARFLR
251	MLLRLADEFG		VAVVITNQVV	AQVDGAAMFA	ADPKKPIGGN	IIAHASTTRL
301	YLRKGRGETR		ICKIYDSPCL	PEAEAMFAIN	ADGVGDAKD	

Figure 3.28 : Sites de coupure de la protéine Rad51 humaine par la trypsine. Les résidus de coupure par la trypsine situés près des tyrosines 54 et 315 sont indiqués en gras. Le peptide contenant Y54 obtenu après digestion trypsique de la protéine est souligné en rose, le peptide contenant Y315 en vert pale ou foncé en fonction du site de coupure.

Une autre explication serait que la phosphorylation à proximité d'un site de clivage pourrait diminuer l'efficacité de clivage de ce site (Benore-Parsons et al, 1989; Kjeldsen et al, 2007). Ainsi le phosphopeptide sera partiellement clivé et un équivalent non phosphorylé ne sera pas présent dans la digestion de la protéine non phosphorylée. Une différence de pic ne sera donc pas observée. En effet, dans la séquence de Rad51 un seul acide aminé sépare la

tyrosine 315 du site de coupure de la trypsine le plus proche, alors que deux acides aminés séparent la tyrosine 54 du site de coupure (fig. 3.28). Ainsi en cas d'absence de coupure au site le plus proche de la tyrosine 315, la coupure s'effectuera après le résidu arginine situé en amont. Ceci conduira à la génération d'un peptide pY315 plus long de trois acides aminés (soulignés en vert foncé sur la figure 3.28) qui sera différent du peptide généré à partir de la digestion de la protéine Rad51 non phosphorylée et qui ne sera pas identifié en spectroscopie de masse. Ainsi nos résultats ne sont pas en opposition avec les résultats de Yuan et collègues.

4.3 Phosphorylation de Y315

La phosphorylation de Rad51 sur la tyrosine 315 a été observée dans les études de Chen et collègues (Chen et al, 1999b) et de Slupianek et collègues (Slupianek et al, 2001). Dans leur étude, Chen et collègues ont immunoprécipité Rad51 à partir d'extraits de cellules irradiées et la phosphorylation de la protéine a été révélée avec un anticorps anti-phosphotyrosine. L'utilisation de différents mutants non phosphorylables sur tyrosine incluant Y54F et Y315F a démontré que la mutation de Y315 en phénylalanine abolit la phosphorylation de la protéine Rad51. Slupianek et collègues ont démontré la phosphorylation de Rad51 de façon plus directe. Un antisérum a été généré contre un peptide contenant la tyrosine 315 phosphorylée et a été utilisé pour révéler la phosphorylation de Rad51 dans des extraits de cellules surexprimant BCR/Abl.

Nous avons utilisé une approche utilisant des anticorps anti-pY315 et anti-pY54 pour révéler la phosphorylation de Rad51 sur Y315 et Y54 par la kinase c-Abl (fig.3.27B). Ces anticorps se sont montrés hautement spécifiques de pY315 et de pY54 respectivement lorsque leur spécificité est testée sur puces à peptides. Cependant sur la puce uniquement des peptides de Rad51 ont été déposés et la spécificité des anticorps n'avait pas été vérifiée contre la protéine Rad51 entière. Afin de confirmer avec certitude d'une part que nos anticorps anti-pY315 et anti-pY54 ne reconnaissent pas d'autres parties de la molécule Rad51, et d'autre part que la phosphorylation s'effectue bien sur les résidus Y315 et Y54, nous avons utilisé trois mutants non phosphorylables de Rad51 – Y54F, Y301F et Y315F. La mutation de la tyrosine en phénylalanine empêche toute phosphorylation du site et une disparition ou une très forte baisse du niveau de phosphorylation devrait être observée.

Nous avons co-transfecté des cellules HeLa avec les plasmides de c-Abl sauvage et de Rad51 sauvage ou mutée en phénylalanine en positions Y54, Y301 ou Y315. Nous avons révélé les Western blots réalisés avec les extraits cellulaires à l'aide des anticorps spécifiques anti-pY315 et anti-pY54 suivis de l'anticorps anti-Rad51. La transfection de c-Abl a été vérifiée avec un anticorps anti-c-Abl.

L'utilisation d'anticorps générés dans des espèces différentes est très avantageuse car des anticorps secondaires marqués avec des fluorophores différents permettent la détection simultanée des anticorps primaires sur la même membrane. Le signal des anticorps anti-pY54 et anti-pY315 qui sont des anticorps de lapin, est obtenu en scannant la membrane à 800 nm. Pour la révélation de l'anticorps anti-Rad51 de souris la membrane est scannée à 700 nm. Les images peuvent être visualisées en noir et blanc ou en couleur. La présentation en couleur permet de visualiser simultanément les signaux des deux anticorps sur l'image de synthèse. Nous avons choisi de représenter les signaux des anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques en rouge et le signal de l'anticorps anti-Rad51 en vert.

Le moyen le plus facile et le plus direct pour la détection de protéines phosphorylées est la séparation des protéines par SDS-PAGE et la révélation des formes phosphorylées par des anticorps anti-phosphotyrosine. Lorsque certaines protéines sont phosphorylées elles migrent à une masse moléculaire apparente plus élevée et un shift est observé sur l'immunoblot par rapport à la protéine non phosphorylée. La masse moléculaire du groupement phosphate est de 0.08 kDa et ne peut pas être responsable de ce shift de migration. Cependant ce groupement phosphate peut modifier l'enveloppe de SDS de la protéine en fonction des résidus voisinant le résidu phosphorylé. Ceci ralentit la migration de la protéine phosphorylée dans le gel (Peck, 2006).

4.3.1 Phosphorylation de Rad51 exogène sur Y315

Les résultats des Western blots réalisés avec des extraits de cellules co-transfectées avec c-Abl et Rad51 sauvage ou mutée sont présentés sur la figure 3.29A. L'expression de la kinase c-Abl révélée par l'anticorps anti-c-Abl est équivalente dans tous les extraits co-transfectés. Les membranes ont été révélées par l'anticorps anti-pY315 suivi par l'anticorps anti-Rad51. Le niveau relatif de phosphorylation de la tyrosine 315 est représenté

par le rapport de l'intensité du signal pY315 sur la quantité de protéine HA-Rad51 totale et rapportée à la phosphorylation de HA-Rad51 sauvage (fig. 3.29B).

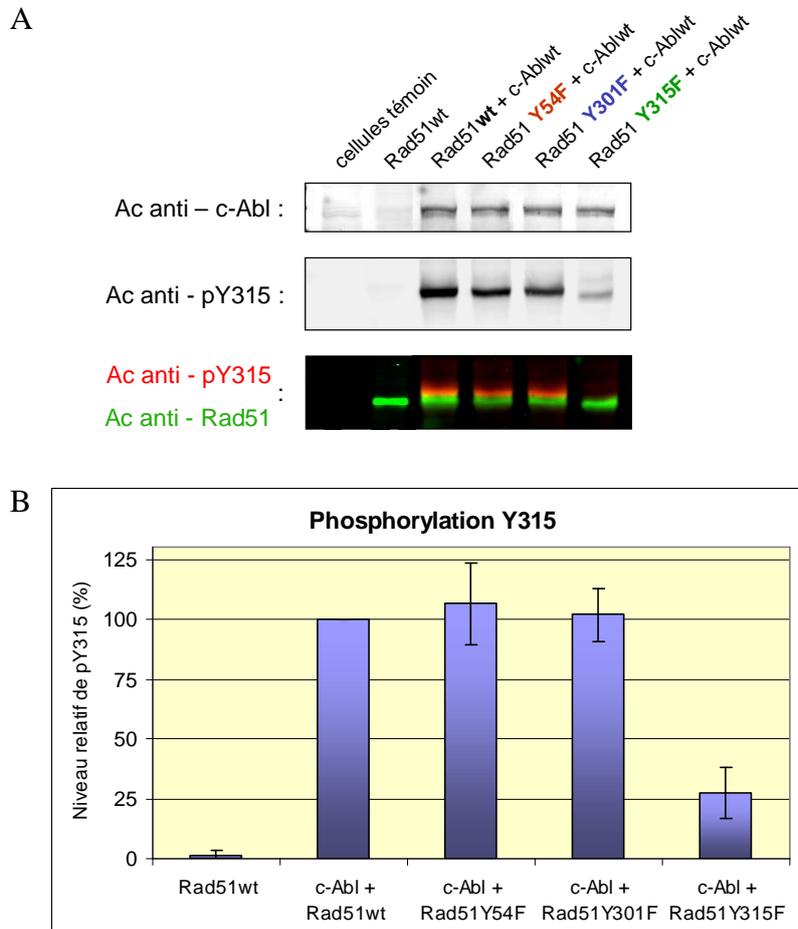


Figure 3.29 : Phosphorylation de Rad51 sauvage ou mutée sur Y315. Western Blot des cellules co-transfectées par c-Abl et Rad51wt ou mutée Y54F, Y301F, Y315F révélé par les anticorps anti-c-Abl, anti-pY315, anti-Rad51 (A). Les niveaux relatifs de phosphorylation de Rad51 sur la tyrosine 315 ont été exprimés par le ratio de Rad51 pY315 sur Rad51 totale et rapportés à la co-transfection de Rad51wt+c-Abl (B).

La phosphorylation de la protéine Rad51 sauvage sur Y315 est démontrée par la bande détectée par l'anticorps anti-pY315 dans l'extrait de cellules co-transfectées avec Rad51wt et c-Abl. Cette bande est de taille apparente plus élevée que la protéine non phosphorylée. La phosphorylation de Y315 est également détectée au niveau des protéines mutées Rad51 Y54F et Rad51 Y301F. La quantification relative de phosphorylation des mutants montre que cette phosphorylation est équivalente à celle de la protéine sauvage (fig. 3.29B). La mutation des résidus Y54 et Y301 n'a donc pas d'effet sur la phosphorylation de Y315.

Lorsque la tyrosine 315 est mutée en phénylalanine, on observe une forte baisse de la phosphorylation de Rad51 au niveau de Y315. La proportion relative de Rad51 phosphorylée en Y315 présentée sur l'histogramme montre que la mutation de la tyrosine 315 en phénylalanine diminue le niveau de phosphorylation de 75%. Ceci confirme que Y315 est un site de phosphorylation pour la kinase c-Abl. D'autre part cette forte baisse de phosphorylation montre que le site reconnu par l'anticorps anti-pY315 est bien la tyrosine 315 phosphorylée et confirme la spécificité de l'anticorps pour ce résidu. De plus la haute spécificité de l'anticorps pour la forme phosphorylée est démontrée par l'absence complète de reconnaissance de la protéine non phosphorylée dans l'extrait de cellules transfectées avec Rad51wt seul. La faible bande que cet anticorps détecte au niveau de la protéine Rad51 Y315F pourrait correspondre à une cross réactivité de l'anticorps non pas envers une tyrosine phosphorylée mais une thréonine. La thréonine en position 309 qui peut être phosphorylée par Chk2, se trouve à proximité de la tyrosine 315 et pourrait être détectée par l'anticorps anti-pY315. Cette faible bande au niveau de Rad51 Y315F a été observée également dans l'étude de Slupianek et collègues (Slupianek et al, 2001).

4.3.2 Phosphorylation de Rad51 endogène sur Y315

Nous avons remarqué que la transfection de la protéine Rad51 induit une surexpression de la protéine endogène. Dans des extraits de cellules surexprimant la kinase c-Abl et la protéine Rad51, l'anticorps anti-pY315 détecte une bande au niveau de Rad51 endogène (fig. 3.30). La protéine Rad51 endogène dans cet extrait est donc phosphorylée sur la tyrosine en position 315. Dans nos expériences de traitement de cellules avec des médicaments génotoxiques aucune phosphorylation n'avait été détectée par cet anticorps. Le niveau d'expression plus élevée obtenu par la transfection de Rad51 exogène ainsi que la surexpression de la kinase c-Abl permettent d'obtenir un niveau de phosphorylation de Y315 sur la protéine Rad51 endogène détectable par notre anticorps spécifique.

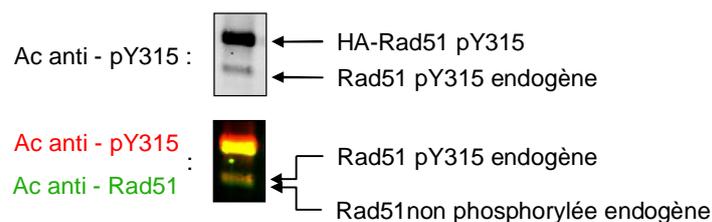


Figure 3.30 : Phosphorylation de la protéine Rad51 endogène sur Y315 dans des cellules co-transfectées avec HA-Rad51wt et c-Abl. Western blot d'extraits de cellules co-transfectées avec Rad51wt et c-Abl révélés avec les anticorps anti-pY315 et anti-Rad51.

Ceci montre que si le seuil de détection est surmonté, nos anticorps sont capables de détecter la phosphorylation sur la protéine Rad51 endogène.

4.4 Phosphorylation de Y54

L'état de phosphorylation de la tyrosine Y54 a été analysé dans les extraits de cellules transfectées avec Rad51 sauvage ou muté en association avec c-Abl. Les Western blots ont été révélés avec l'anticorps anti-c-Abl pour confirmer l'expression équivalente de c-Abl dans les cellules. La membrane a été ensuite révélée par l'anticorps anti-pY54 suivi par l'anticorps anti-Rad51. Les résultats sont présentés sur la figure 3.31A. Le niveau relatif de phosphorylation de la tyrosine 54 est représenté par le rapport de l'intensité du signal pY54 sur la quantité de protéine Rad51 totale et rapporté à la phosphorylation de Rad51 sauvage (fig. 3.31B).

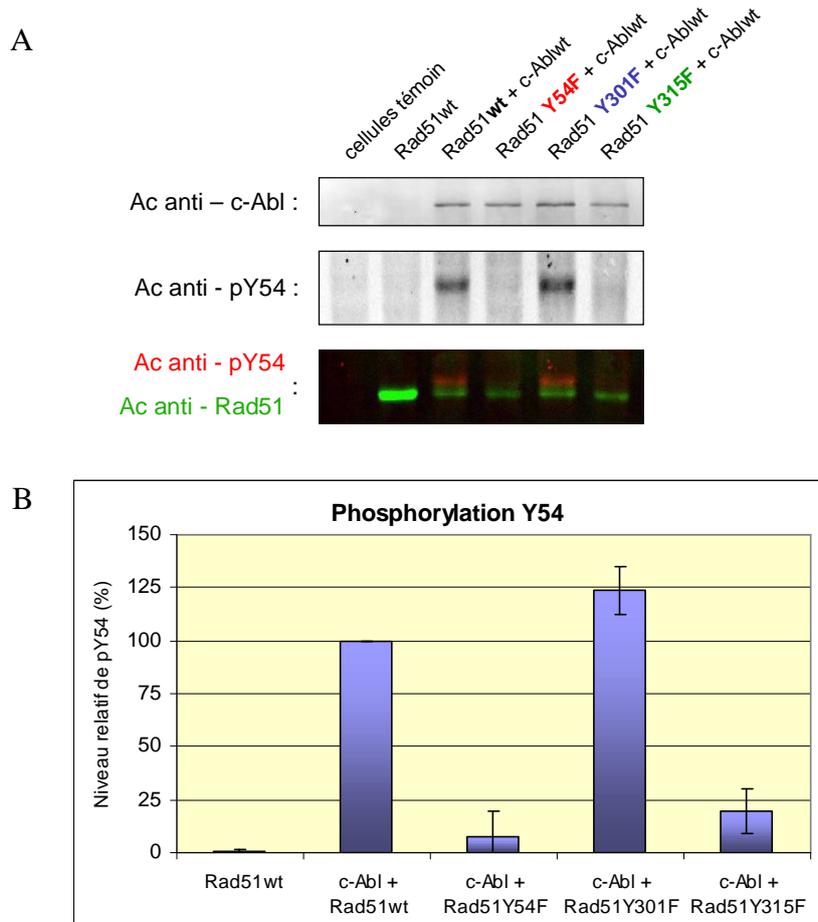


Figure 3.31 : Phosphorylation de Rad51 sauvage ou mutée sur Y54. Western Blot d'extraits de cellules surexprimant c-Abl et Rad51wt ou mutée, révélé par les anticorps anti-c-Abl, anti-p54 et anti-Rad51 (A). Les niveaux relatifs de phosphorylation de Rad51 sur la tyrosine 54 ont été exprimés par le ratio de Rad51 pY54 sur Rad51 total et rapportés à la co-transfection de Rad51wt+c-Abl (B).

La détection d'une bande par l'anticorps anti-pY54 dans les extraits de cellules surexprimant la kinase c-Abl et la protéine Rad51 sauvage confirme la phosphorylation de Rad51 sur Y54 que nous avons observée. Aucune bande n'est détectée sur la protéine Rad51wt transfectée seule ce qui confirme la spécificité de l'anticorps anti-pY54 pour la forme phosphorylée de la tyrosine 54. Une bande démontrant la phosphorylation de Y54 est révélée également pour la protéine mutée Rad51 Y301F. Son taux de phosphorylation est au moins équivalent à celui de la protéine sauvage.

Lorsque la tyrosine 54 est mutée en phénylalanine, le niveau de phosphorylation de la protéine sur Y54 diminue de plus de 90%. Cette abolition de la phosphorylation de la protéine par la mutation Y54F confirme la phosphorylation de la tyrosine Y54.

Il est intéressant de noter que la phosphorylation de Y54 est diminuée de 80% lorsque le résidu Y315 est muté en phénylalanine et donc non phosphorylable. Deux hypothèses peuvent expliquer l'absence de phosphorylation de Y54 lorsque Y315 est muté. La phosphorylation de la tyrosine pourrait être liée à celle de la tyrosine 315. La phosphorylation de la protéine serait donc séquentielle – d'abord Y315 suivi de Y54. Une autre explication pourrait être que la mutation de Y315 en phénylalanine pourrait entraîner des modifications conformationnelles de la protéine Rad51, ce qui pourrait empêcher sa reconnaissance par c-Abl et donc l'interaction des deux protéines.

Plusieurs points montrent que la deuxième hypothèse est peu probable. D'une part Takizawa et collègues ont effectué l'étude de plusieurs mutants de Rad51 sur le résidu Y315 parmi lesquels le mutant Y315F. La phénylalanine étant un acide aminé aromatique, le remplacement de la tyrosine 315 par cet acide aminé ne modifie pas de manière significative l'environnement hydrophobe créé par cette tyrosine 315. L'hydrolyse de l'ATP, ainsi que la fixation sur l'ADN simple brin et double brin du mutant Rad51 Y315F sont aussi efficaces que celles de la protéine sauvage selon ces travaux. Ces résultats indiquent que le remplacement de la tyrosine en position 315 par une phénylalanine n'affecte pas de manière significative la structure de la protéine monomère (Takizawa et al, 2004). D'autre part, la mutation Y301F n'a aucun effet sur la phosphorylation de Rad51 en Y315, ce qui montre que la kinase c-Abl interagit avec ce mutant. La tyrosine 301 étant située sur la surface de la protéine Rad51 à proximité de Y315, il est très probable que la mutation des deux résidus a le même effet sur la structure de la protéine et sur son interaction avec c-Abl. De plus, c-Abl reconnaît des motifs PXXP et pYXXP au niveau de ses protéines cibles. Deux motifs PXXP sont présents dans la protéine Rad51 et la tyrosine 315 ne fait partie d'aucun des deux. Sa mutation ne devrait donc pas empêcher la reconnaissance et l'interaction entre c-Abl et Rad51.

4.5 Phosphorylation séquentielle de Rad51

Dans le mutant Rad51 Y315F la mutation non phosphorylable se situe sur un résidu différent de celui qui est ciblé par l'anticorps anti-pY54. La phosphorylation de Y54 étant très altérée lorsque Y315 est non phosphorylable, on peut supposer qu'il existe un lien entre la phosphorylation de la tyrosine 315 et celle de la tyrosine 54. La phosphorylation de Y315 favoriserait celle de Y54. La kinase c-Abl reconnaît des séquences spécifiques au niveau de

ses protéines cibles via ses domaines SH3 et SH2. Le domaine SH3 reconnaît des séquences PXXP, alors que le domaine SH2 reconnaît des motifs pYXXP où X peut être n'importe quel des acides aminés (Shaul, 2000). Deux motifs PXXP qui pourraient être reconnus par le domaine SH3 de c-Abl se trouvent dans la séquence de Rad51 entre les acides aminés 283 et 286 et entre les acides aminés 318 et 321 (soulignés en rouge sur la figure 3.32). Lorsque la tyrosine 315 est phosphorylée, un motif pYXXP apparaît et se situe entre les acides aminés 315 et 318. Ainsi la phosphorylation de la tyrosine 315 révèle un motif de reconnaissance pour le domaine SH2 de c-Abl qui n'existe pas dans la protéine Rad51 non phosphorylée.

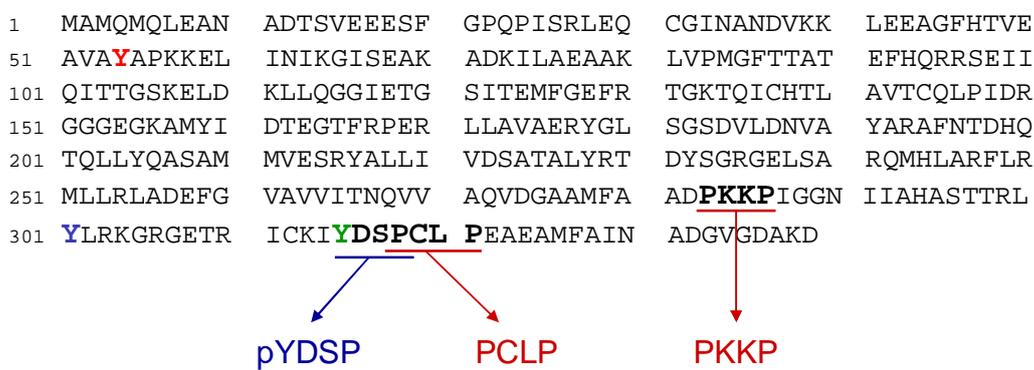


Figure 3.32 : Séquence de Rad51 et sites de reconnaissance de c-Abl. Les sites potentiels de reconnaissance par la kinase c-Abl sont représentés en gras et soulignés en rouge pour les motifs PXXP et en bleu pour le motif pYXXP. Les tyrosines en position 54, 301 et 315 sont indiquées en couleur.

Nos résultats suggèrent un modèle de phosphorylation séquentielle de la protéine Rad51 par la kinase c-Abl. Cette kinase reconnaît un ou les motifs PXXP présents dans Rad51 via son domaine SH3 et phosphorylerait la protéine sur la tyrosine 315. Cette phosphorylation révélerait un motif pYXXP reconnu par le domaine SH2 de c-Abl et permettrait ainsi la phosphorylation de la tyrosine 54.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons vérifié si le domaine SH2 de c-Abl est capable d'interagir avec Rad51 phosphorylée sur Y315. Dans cette optique nous avons réalisé des expériences de précipitation au GST avec le peptide de fusion GST-domaine SH2 de c-Abl (Marligen). Ce peptide a été incubé avec des extraits de cellules transfectées avec Rad51 sauvage ou c-Abl ou co-transfectées avec Rad51wt et c-Abl. Les résultats du Western blot révélé par l'anticorps anti-pY315 suivi par l'anticorps anti-GST sont présentés sur la figure 3.33.

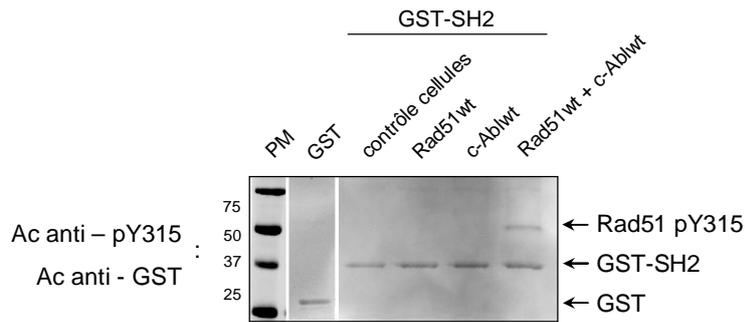


Figure 3.33 : Interaction du domaine SH2 de c-Abl avec Rad51 phosphorylée sur Y315. Des extraits de cellules transfectées avec Rad51wt et/ou c-Abl ont été incubés avec le peptide de fusion GST-domaine SH2 de c-Abl. Le Western blot a été révélé avec les anticorps anti-pY315 et anti-GST.

L'anticorps anti-pY315 détecte une seule bande dans l'extrait de cellules co-transfectées avec Rad51wt et c-Abl. Ceci non seulement confirme l'interaction du domaine SH2 de c-Abl avec Rad51 mais montre également que cette interaction se fait avec la protéine phosphorylée sur Y315. Ce résultat confirme notre hypothèse que le résidu Y315 phosphorylé révèle un site d'interaction avec le domaine SH2 de c-Abl et que la phosphorylation de Rad51 est certainement séquentielle (Popova et al, 2009).

5 Rôle de la phosphorylation de Rad51

La phosphorylation sur tyrosine semble constituer un moyen de régulation de la protéine Rad51, cependant son effet exact n'est pas déterminé. Yuan et collègues ont montré que la phosphorylation de Y54 inhibe la fonction de la protéine Rad51 par l'inhibition de la fixation de Rad51 sur l'ADN simple brin (Yuan et al, 1998). Les études réalisées sur la phosphorylation de la protéine sur Y315 indiquent que cette phosphorylation favorise l'interaction de Rad51 avec Rad52 *in vitro* et stimulerait ainsi la RH (Chen et al, 1999b). De plus la phosphorylation de ce résidu aurait un effet positif sur la réparation de l'ADN et la résistance aux traitements anticancéreux cisplatine et mitomycine C (Slupianek et al, 2001). L'étude de protéines Rad51 mutées au niveau de la tyrosine 315 a démontré que ce résidu joue un rôle important dans la liaison de la protéine à l'ADN simple brin et dans la formation du filament nucléoprotéique (Takizawa et al, 2004). Ainsi les résultats obtenus par les études antérieurs sont contradictoires.

La kinase c-Abl régule des protéines cibles lors de la réponse de la cellule aux dommages de l'ADN par phosphorylation. Cette phosphorylation peut moduler la localisation intracellulaire de la protéine. Ainsi la redistribution nucléaire et l'association de p73 avec la matrice nucléaire est dépendante de la phosphorylation par c-Abl (Ben-Yehoyada et al, 2003). La localisation intracellulaire de l'hélicase WRN, impliquée dans la réparation de l'ADN, est également modulée par phosphorylation par la kinase c-Abl (Cheng et al, 2003). Nous avons alors recherché une corrélation éventuelle entre l'état de phosphorylation de Rad51 et sa localisation intracellulaire.

Nous avons abordé cette étude en réalisant des fractionnements cellulaires de cellules co-transfectées avec Rad51 et c-Abl. La phosphorylation de la tyrosine 315 étant impliquée dans l'interaction de la protéine avec l'ADN et la formation du filament nucléoprotéique (Takizawa et al, 2004), nous avons recherché un lien entre l'état de phosphorylation de Rad51 et sa localisation intracellulaire. De plus la protéine Rad51 a une localisation essentiellement nucléaire. La technique de fractionnement cellulaire devrait donc enrichir la quantité de Rad51 dans la fraction nucléaire. Nous avons ensuite élaboré une lignée cellulaire dérivée des cellules HeLa qui exprime stablement la protéine de fusion fluorescente EGFP-Rad51.

La fluorescence de cette protéine permet l'observation directe des foci de Rad51 sous microscope.

5.1 Fractionnement cellulaire

Nos résultats précédents ont montré que la surexpression de la protéine Rad51 et de la kinase c-Abl sont nécessaires afin d'obtenir un niveau de phosphorylation de Rad51 détectable par nos anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques. Nous avons donc réalisé les expériences de fractionnement cellulaire avec des cellules co-transfectées avec les plasmides portant les gènes de la kinase c-Abl et de Rad51. Nous avons réalisé trois fractions cellulaires : fraction cytoplasmique, fraction nucléoplasmique et fraction de protéines liées à la chromatine. Ceci nous a permis d'étudier la localisation cellulaire de la protéine Rad51 transfectée.

5.1.1 Efficacité du fractionnement cellulaire

Avant de commencer l'analyse de la localisation cellulaire de Rad51, nous avons vérifié l'efficacité du fractionnement cellulaire. Pour cela des protéines marqueurs des trois fractions (cytoplasmique, nucléoplasmique et liée à la chromatine) ont été choisies. Ces marqueurs doivent être exprimés exclusivement dans un compartiment cellulaire. Après fractionnement des cellules, ils doivent être présents uniquement dans leur fraction cellulaire caractéristique. Ceci permet de s'assurer qu'il n'y a pas de contamination entre les fractions pendant le processus de fractionnement cellulaire. La révélation des marqueurs a été réalisée par Western blot avec des anticorps spécifiques.

La α -tubuline a été choisie comme marqueur de la fraction cytoplasmique. Cette protéine compose les microtubules, un des trois principaux types de fibres constitutives du cytosquelette eucaryote. Cette protéine a une localisation cytoplasmique.

Le marqueur de la fraction nucléoplasmique que nous avons choisi est la topoisomérase I, enzyme capable de moduler la structure topologique de l'ADN en amont des fourches de réplication. Cette protéine est localisée dans le nucléoplasme.

L'histone H2AX a été utilisée comme marqueur de la fraction protéique liée à la chromatine. Cette histone participe avec d'autres types d'histones dans la composition des octamères pour enrouler et compacter l'ADN dans le noyau.

Afin de vérifier l'efficacité de cette technique, nous avons réalisé le fractionnement de cellules HeLa en fraction cytoplasmique, nucléoplasmique et liée à la chromatine. Les protéines des trois fractions ont été analysées par Western blot. Les membranes ont été révélées avec les anticorps anti- α -tubuline, anti-topoisomérase I et anti-H2AX pour mettre en évidence les marqueurs protéiques que nous avons choisis. Les résultats sont présentés sur la figure 3.34.

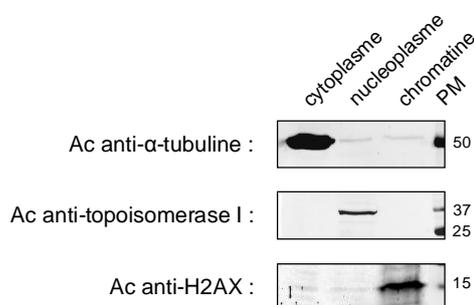


Figure 3.34 : Vérification de l'efficacité du fractionnement cellulaire. Les fractions cytoplasmique, nucléoplasmique et liée à la chromatine ont été analysées par Western blot. Les anticorps anti- α -tubuline, anti-topoisomérase I et anti-H2AX ont été utilisés pour la révélation.

Les résultats montrent que le fractionnement des cellules HeLa est efficace. La α -tubuline est révélée uniquement dans la fraction cytoplasmique. La topoisomérase I est présente exclusivement dans la fraction nucléoplasmique. L'histone H2AX est détectée uniquement dans la fraction liée à la chromatine. Chaque marqueur est donc présent uniquement dans la fraction cellulaire correspondant à sa localisation. Ceci confirme qu'il n'y a pas de contamination entre les fractions et que cette technique de fractionnement cellulaire est adaptée à l'étude de la localisation intracellulaire de Rad51.

5.1.2 Localisation intracellulaire de Rad51 endogène et exogène

Lorsqu'une protéine est surexprimée dans des cellules, sa localisation intracellulaire peut être différente de celle de la protéine endogène. De plus l'ajout d'un tag précédant la séquence de la protéine peut influencer la localisation cellulaire de la protéine recombinante. Avant de

commencer l'étude de la localisation intracellulaire de Rad51 phosphorylée, nous avons vérifié si la protéine Rad51 surexprimée dans des cellules HeLa avait la même localisation intracellulaire que la protéine endogène. Nous avons donc analysé la localisation intracellulaire de la protéine Rad51 endogène dans des cellules non transfectées. Ensuite nous avons déterminé la localisation intracellulaire de la protéine Rad51 surexprimée seule ou avec la kinase c-Abl et nous l'avons comparée à celle de la protéine endogène. Pour cela nous avons transfecté des cellules avec Rad51 seule ou co-transfectées avec c-Abl et nous avons réalisé des fractionnements cellulaires. Des quantités protéiques équivalents entre les fractions pour chaque condition ont été séparées sur gel d'acrylamide. La figure 3.35 présente les résultats obtenus après révélation des Western blots avec l'anticorps anti-Rad51. Pour chaque condition le niveau de Rad51 dans chaque fraction a été quantifié et représenté par rapport au niveau de la fraction liée à la chromatine qui a été considérée comme étant 100%.

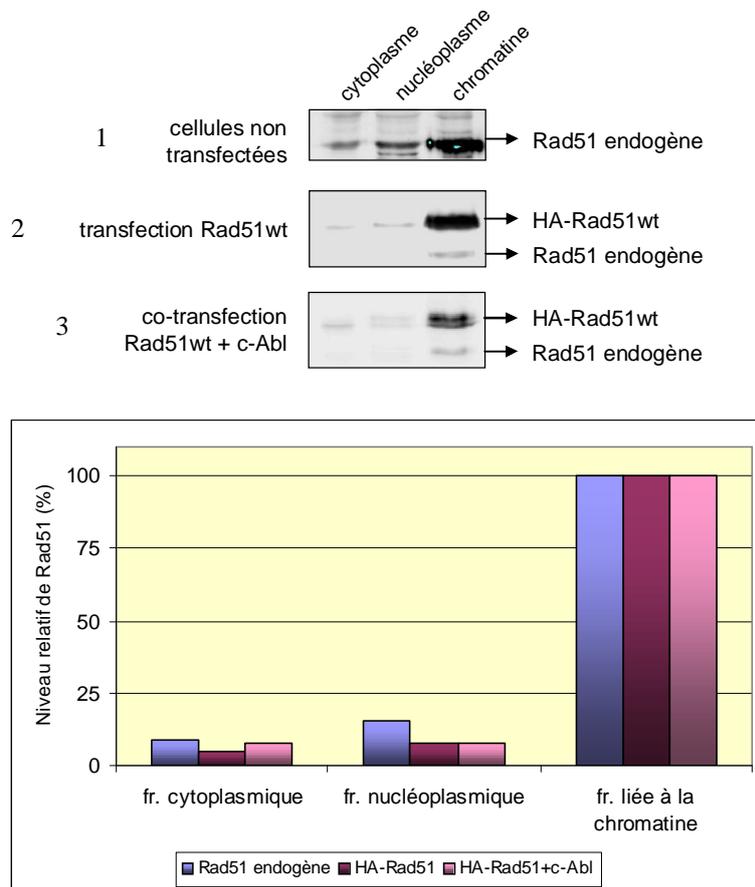


Figure 3.35 : Localisation intracellulaire de Rad51 endogène et exogène. Des cellules non transfectées (1), transfectées avec Rad51 (2) ou co-transfectées avec Rad51 et c-Abl (3) ont été séparées en fraction cytoplasmique, nucléaire et liée à la chromatine. Les Western blots ont été révélés avec l'anticorps anti-Rad51. Pour chaque condition le niveau de Rad51 dans les fractions a été quantifié et rapporté au niveau de Rad51 dans la fraction liée à la chromatine correspondante et représenté sur l'histogramme.

Il a été montré que Rad51 est localisée essentiellement dans le noyau (Haaf et al, 1999), principalement lié à la chromatine (Shimizu et al, 2009). Nos résultats confirment cette localisation de Rad51 endogène essentiellement dans le noyau, principalement lié à la chromatine (fig. 3.35 1). Une faible quantité de Rad51 est trouvée également dans le cytoplasme.

Lorsque Rad51 est surexprimée seule ou avec la kinase c-Abl dans des cellules HeLa, la protéine Rad51 exogène est essentiellement liée à la chromatine et des quantités plus faibles sont présentes dans la fraction nucléoplasmique et cytoplasmique. Cette protéine Rad51 exogène a donc une distribution cellulaire identique à celle de la protéine endogène (fig. 3.35 2 et 3). Ceci est confirmé par l'histogramme qui montre les niveaux de Rad51 dans chaque fraction. Le tag HA qui précède la séquence de la protéine ne semble pas modifier sa localisation intracellulaire. En cas de co-transfection de Rad51 avec c-Abl, l'anticorps anti-Rad51 détecte deux bandes dans la fraction liée à la chromatine, ainsi que dans la fraction nucléoplasmique (fig. 3.35 3). La kinase c-Abl étant co-transfectée avec Rad51 on peut supposer qu'il s'agit de formes non phosphorylée et phosphorylée de Rad51 exogène.

L'intensité des bandes de Rad51 endogène est très forte dans les cellules non transfectées comparée aux cellules transfectées avec Rad51. Ceci est dû à la quantité différente de cellules fractionnées qui a été plus importante pour les cellules non transfectées.

La suite des résultats a été obtenue en co-transfectant Rad51 et c-Abl dans des cellules HeLa. Seule la protéine Rad51 exogène est présentée sur les figures.

5.1.3 Localisation intracellulaire de Rad51 phosphorylée

Après avoir vérifié que la surexpression de Rad51 n'influence pas la localisation cellulaire de la protéine, nous avons analysé son état de phosphorylation dans chaque fraction cellulaire. Pour cela nous avons co-transfecté des cellules avec Rad51 sauvage et c-Abl et nous les avons séparé en fractions cytoplasmique, nucléoplasmique et liée à la chromatine. L'état de phosphorylation de la protéine Rad51 exogène dans les différentes fractions a été analysé par Western blot avec les anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques suivis de l'anticorps anti-Rad51. Les signaux des deux anticorps sont présentés sur l'image de synthèse en couleur. Les bandes détectées par les anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques sont présentées en

rouge, celles détectées par l'anticorps anti-Rad51 en vert. Lorsque la même bande est détectée par les deux anticorps, la superposition des deux couleurs donne une couleur jaune.

5.1.3.1 Rad51 pY315

Afin de déterminer la localisation intracellulaire de la protéine Rad51 phosphorylée sur Y315, les Western blots du fractionnement des cellules co-transfectées avec Rad51wt et c-Abl ont été révélés avec l'anticorps anti-pY315 suivi par l'anticorps anti-Rad51 (fig. 3.36).

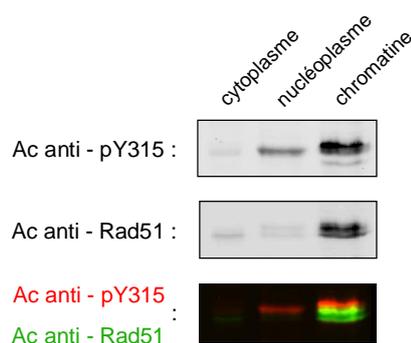


Figure 3.36 : Localisation intracellulaire de Rad51 pY315. Des cellules co-transfectées avec Rad51wt et c-Abl ont été fractionnées en fraction cytoplasmique, nucléaire et liée à la chromatine. Le Western blot réalisé avec ces fractions a été révélé par les anticorps anti-pY315 et anti-Rad51.

La protéine Rad51 phosphorylée sur Y315 est essentiellement liée à la chromatine (fig. 3.36). Rad51 pY315 est très peu présent dans le cytoplasme. La phosphorylation de Y315 est également détectée dans la fraction nucléoplasmique et la quantité présente dans cette fraction est inférieure à celle de la fraction liée à la chromatine. On remarque que l'anticorps anti-pY315 reconnaît une seule bande dans le nucléoplasme et deux bandes dans la fraction chromatine. Ceci indique qu'il existe deux formes différentes de Rad51 impliquant phospho- Y315.

L'anticorps anti-Rad51 révèle une seule bande dans le cytoplasmique, deux bandes dans le nucléoplasme et deux bandes dans la chromatine.

L'image de synthèse des deux anticorps montre deux bandes dans la fraction nucléoplasmique. La bande verte très faible est révélée uniquement par l'anticorps anti-Rad51 et correspond à Rad51 non phosphorylée. La bande rouge obtenue avec l'anticorps

anti-pY315 correspond à la protéine phosphorylée sur la tyrosine 315. En théorie cette bande devrait être de couleur jaune car elle est reconnue à la fois par l'anticorps anti-pY315 et l'anticorps anti-Rad51. Une couleur jaune est cependant obtenue dans le cas où les intensités de reconnaissance des deux anticorps sont équivalentes. Dans notre cas le signal de l'anticorps anti-Rad51 est beaucoup plus faible que celui de l'anticorps anti-pY315, ce qui explique la couleur dominante rouge de la bande.

Dans la fraction liée à la chromatine, trois bandes distinctes de couleur verte, jaune et rouge sont détectées. La bande verte révélée uniquement par l'anticorps anti-Rad51 correspond à Rad51 non phosphorylée. La couleur jaune de la bande intermédiaire résulte de la superposition des signaux des deux anticorps. Cette bande migre à la même distance que la bande rouge de la fraction nucléoplasmique. C'est la protéine Rad51 phosphorylée sur la tyrosine 315. La dernière bande reconnue préférentiellement par l'anticorps anti-pY315 (d'où sa couleur rouge) correspond à une forme de Rad51 phosphorylée sur Y315 de taille moléculaire plus importante que celle de la bande intermédiaire. Cette bande est très peu détectée par l'anticorps anti-Rad51, laissant supposer une quantité de protéine Rad51 très faible.

5.1.3.2 Rad51 pY54

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation cellulaire de la protéine Rad51 phosphorylée sur la tyrosine en position 54. Nous avons alors réalisé la même expérience que précédemment - Rad51 wt et la kinase c-Abl ont été surexprimés dans les cellules HeLa. Après fractionnement cellulaire, le Western blot a été révélé par les anticorps anti-pY54 suivis par l'anticorps anti-Rad51. Les résultats sont présentés sur la figure 3.37.

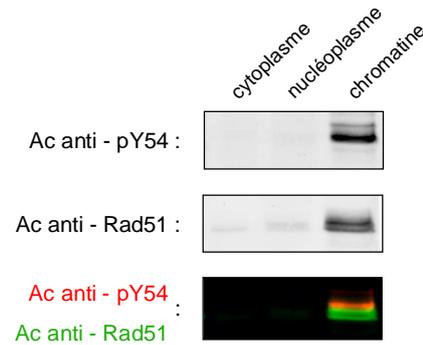


Figure 3.37 : Localisation intracellulaire de Rad51 pY54. Des cellules co-transfectées avec Rad51wt et c-Abl ont été fractionnées en fraction cytoplasmique, nucléaire et liée à la chromatine. Le Western blot réalisé avec ces fractions a été révélé par les anticorps anti-pY54 et anti-Rad51.

La révélation de la membrane par l'anticorps anti-pY54 montre une seule bande dans la fraction protéique liée à la chromatine. Aucune bande n'est détectée dans la fraction cytoplasmique ou la fraction nucléoplasmique. La protéine Rad51 phosphorylée sur Y54 est donc présente uniquement sous forme liée à la chromatine.

L'anticorps anti-Rad51 révèle une bande dans le cytoplasme correspondant à Rad51 non phosphorylée. Deux bandes de très faible intensité sont révélées par cet anticorps dans le nucléoplasme. Ces deux bandes ne sont pas reconnues par l'anticorps anti-pY54 et correspondent à la protéine non phosphorylée et à la protéine phosphorylée sur Y315 (voir section précédente "Rad51 pY315", page 150).

Dans la fraction liée à la chromatine, l'anticorps anti-Rad51 détecte deux bandes, une troisième supérieure aux autres est très peu visible. La superposition en couleur des signaux des anticorps anti-pY54 et anti-Rad51 montre également trois bandes – deux bandes vertes et une bande orange. Les deux bandes vertes sont reconnues uniquement par l'anticorps anti-Rad51. Ces deux formes de Rad51 ne sont donc pas phosphorylées sur Y54. La bande orange est détectée à la fois par l'anticorps anti-Rad51 et anti-pY54. La reconnaissance par l'anticorps anti-pY54 étant plus intense que celui de l'anticorps anti-Rad51, la couleur obtenue n'est pas jaune mais orange. Cette bande correspond à une forme de la protéine Rad51 phosphorylée sur Y54.

5.1.3.3 Formes de phospho-Rad51 et localisation

Dans la fraction liée à la chromatine nos anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques en combinaison avec l'anticorps anti-Rad51 révèlent trois bandes. La figure 3.38 présente les images agrandies de la fraction chromatine révélée par les anticorps anti-pY54 ou anti-pY315 suivis par l'anticorps anti-Rad51.

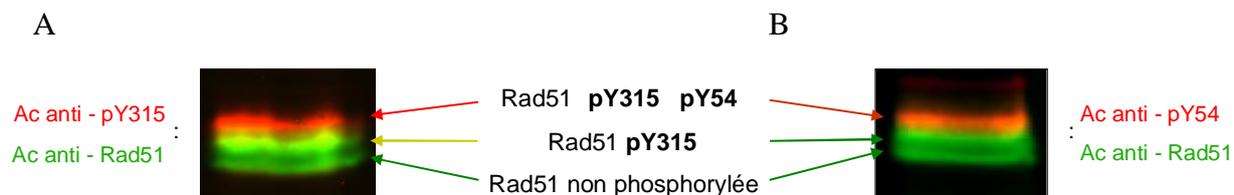


Figure 3.38 : Formes de Rad51. Révélation de la fraction liée à la chromatine obtenue par fractionnement de cellules surexprimant Rad51wt et c-Abl par les anticorps anti-pY315 (A) ou anti-pY54 (B) suivis par l'anticorps anti-Rad51.

Le profil des bandes est différent selon l'anticorps anti-phosphotyrosine spécifique utilisé. Les anticorps anti-pY315 et anti-Rad51 révèlent une bande verte, une bande jaune et une bande rouge (fig. 3.38A), alors que les anticorps anti-pY54 et anti-Rad51 révèlent deux bandes vertes et une bande orange (fig. 3.38B).

La bande inférieure de couleur verte est détectée uniquement par l'anticorps anti-Rad51 et par aucun des deux anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques. Cette bande correspond à la protéine Rad51 non phosphorylée.

La bande intermédiaire est de couleur jaune lorsqu'elle est révélée par l'anticorps anti-pY315 suivi par l'anticorps anti-Rad51. Cette couleur jaune indique que la bande est reconnue par l'anticorps anti-pY315. La couleur de cette bande intermédiaire est verte lorsque les anticorps anti-pY54 et anti-Rad51 sont utilisés. Elle n'est donc pas reconnue par l'anticorps anti-pY54. Cette bande correspond donc à une forme de Rad51 mono-phosphorylée sur Y315.

La bande supérieure est reconnue par les deux anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques. Cette bande correspond donc à une forme de Rad51 di-phosphorylée – Rad51 pY315 pY54. Cette bande est très peu reconnue par l'anticorps anti-Rad51. Ceci peut être dû soit à une

quantité trop faible de protéine sous cette forme, soit à une mauvaise reconnaissance de cette forme par l'anticorps anti-Rad51. Les groupements phosphate de la double phosphorylation de la protéine pourraient bloquer l'accès au site de reconnaissance de l'anticorps anti-Rad51. L'épitope de cet anticorps n'étant pas connu, cette hypothèse ne peut pas être vérifiée.

Nos résultats montrent donc l'existence d'au moins deux formes de Rad51 phosphorylées : une forme mono-phosphorylée sur Y315 et une forme di-phosphorylée sur Y315 et sur Y54. Ces formes ont des localisations intracellulaires différentes. La forme mono-phosphorylée Rad51 pY315 est très peu présente dans la fraction cytoplasmique, elle est présente dans le nucléoplasme et surtout dans la fraction liée à la chromatine (fig. 3.36). La forme di-phosphorylée Rad51 pY315 pY54 est exclusivement liée à la chromatine (fig. 3.36 et 3.37).

5.1.4 Localisation intracellulaire de Rad51 mutée

En surexprimant Rad51 et c-Abl dans des cellules HeLa et en réalisant des fractionnements cellulaires, nous avons démontré qu'il existe deux formes de Rad51 phosphorylée – mono-phosphorylée et di-phosphorylée. Nous avons ensuite analysé la localisation intracellulaire des mutants de Rad51 non phosphorylables. Cette étude permet de confirmer la relation entre la phosphorylation de Rad51 et sa localisation intracellulaire.

Nous avons surexprimé dans des cellules HeLa la kinase c-Abl et un des trois mutants de Rad51 Y54F, Y301F ou Y315F. Après fractionnement cellulaire et Western blot, nous avons utilisé les anticorps anti-pY54 ou anti-pY315 suivi de l'anticorps anti-Rad51 pour étudier la phosphorylation et la localisation cellulaire des mutants de Rad51 (fig.3.39).

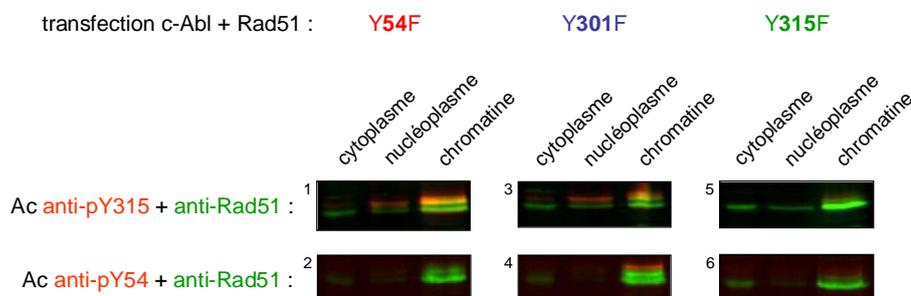


Figure 3.39 : Localisation intracellulaire de Rad51 mutée Y54F, Y301F et Y315F. Des cellules co-transfectées avec c-Abl et Rad51 Y54F, Y301F ou Y315F ont été fractionnées en fraction cytoplasmique, nucléaire et liée à la chromatine. Les Western blots réalisés avec ces fractions ont été révélés par les anticorps anti-pY54 ou anti-Y315 et anti-Rad51.

Le mutant Rad51 Y301F a été utilisé comme contrôle. Les résultats obtenus avec ce mutant confirment ceux obtenus avec la protéine sauvage. Dans le cytoplasme l'anticorps anti-Rad51 détecte la forme non phosphorylée en vert. Dans le nucléoplasme la forme non phosphorylée est détectée en vert et la forme mono-phosphorylée sur Y315 est reconnue en rouge par l'anticorps anti-pY315 (3). Dans la fraction liée à la chromatine on retrouve trois bandes correspondant à la forme non phosphorylée, la forme mono-phosphorylée sur Y315 et la forme di-phosphorylée sur pY315 pY54 (3 et 4).

Lorsque Y54 est muté en phénylalanine, l'anticorps anti-pY54 ne reconnaît aucune bande (2). Seules les bandes reconnues par l'anticorps anti-Rad51 sont visibles en vert : une bande dans le cytoplasme (forme non phosphorylée), deux bandes dans le nucléoplasme et deux bandes dans la fraction chromatine (formes non phosphorylées et mono-phosphorylées sur Y315). Comme dans les expériences réalisées avec les extraits cellulaires totaux, la mutation de Y54 en phénylalanine abolit la phosphorylation de ce résidu sans influencer la phosphorylation de Y315. En effet l'anticorps anti-pY315 suivi de l'anticorps anti-Rad51 détecte la forme non phosphorylée dans le cytoplasme et la forme non phosphorylée et mono-phosphorylée dans le nucléoplasme et dans la fraction liée à la chromatine (1). La forme di-phosphorylée est absente de la fraction liée à la chromatine.

Lorsque la tyrosine 315 est mutée en phénylalanine, aucune phosphorylation de Rad51 n'est détectée ni par l'anticorps anti-pY315, ni par l'anticorps anti-pY54 (5 et 6). Dans toutes les fractions on observe une seule bande reconnue par l'anticorps anti-Rad51 qui correspond à la forme non phosphorylée de la protéine. Ceci confirme de nouveau l'existence d'un lien entre la phosphorylation des deux résidus tyrosine en positions 54 et 315. De plus, Rad51 étant présent préférentiellement dans la fraction liée à la chromatine, le fractionnement cellulaire permet d'enrichir les extraits en Rad51. Le fait qu'aucune phosphorylation de Y54 ne soit détectée sur la protéine Rad51 Y315F malgré la forte quantité de protéine renforce notre hypothèse de phosphorylation séquentielle (Popova et al, 2009).

5.1.5 Rôle de la phosphorylation de Rad51

Chez les eucaryotes, la phosphorylation réversible des protéines est l'un des mécanismes de régulation le plus important et le plus fréquent. Ce phénomène est impliqué dans un très grand nombre de processus biologiques. La charge négative portée par un résidu phosphorylé peut induire des changements conformationnels de la protéine ainsi qu'introduire des forces d'attraction et de répulsion. Les phosphorylations peuvent avoir pour effet l'activation ou l'inactivation d'une protéine, la régulation de sa stabilité, sa localisation intracellulaire, l'interaction avec d'autres protéines, son oligomérisation, la liaison à l'ADN. Une même protéine peut être phosphorylée sur plusieurs sites par la même kinase ou par des kinases différentes. Les phosphorylations sur plusieurs sites peuvent avoir des effets antagonistes (Cohen, 2000; Holmberg et al, 2002).

La phosphorylation de Rad51 serait impliquée dans la régulation de la recombinaise Rad51 mais les effets de cette phosphorylation ne sont pas clairement déterminés. Nous avons démontré l'existence de deux formes de Rad51 phosphorylée : mono-phosphorylée sur Y315 et di-phosphorylée sur Y315 et Y54. Chacune des formes phosphorylées a une localisation intracellulaire précise, ce qui suggère que leur rôles soient différents.

Les études de Takizawa et collègues ont montré que la phosphorylation de Y315 est importante pour la liaison de la protéine Rad51 à l'ADNdb et la formation du nucléofilament (Takizawa et al, 2004). Nos résultats montrent la présence de Rad51 non phosphorylée dans la fraction liée à la chromatine ce qui suggère que la phosphorylation de la protéine n'est pas nécessaire à l'interaction de Rad51 avec la chromatine. Cependant il est possible que cette phosphorylation soit nécessaire à la polymérisation de la protéine car le résidu Y315 est localisé à proximité du site de polymérisation (Conilleau et al, 2004). Sa phosphorylation pourrait donc moduler l'interface d'interaction monomère/monomère. De plus, la phosphorylation de Y315 favorise l'interaction de Rad51 avec Rad52 (Chen et al, 1999b) qui est un des facteurs protéiques qui facilitent le recrutement de Rad51 sur les CDB en favorisant le déplacement de RPA des extrémités simples brin (Sugiyama & Kowalczykowski, 2002). La meilleure efficacité d'interaction de Rad51 avec Rad52 favorise donc la formation du filament de Rad51 sur l'ADN. Si la phosphorylation de Y315 est en faveur de la formation du nucléofilament, la protéine non phosphorylée liée à la chromatine pourrait être sous forme

monomérique. En effet, les monomères de Rad51 peuvent se lier à la chromatine ce qui est démontré par des mutants de Rad51 qui ne peuvent pas se polymériser (Shimizu et al, 2009).

L'étude de Yuan et collègues a montré que la phosphorylation de la tyrosine 54 inhibe la fixation de la protéine Rad51 à l'ADNdb (Yuan et al, 1998). Cependant, dans notre étude la protéine phosphorylée sur Y54 est localisée uniquement dans la fraction liée à la chromatine. Cette différence dans l'effet de la phosphorylation peut être due aux conditions expérimentales. Dans l'essai de Yuan et collègues, Rad51 a été incubé avec la kinase c-Abl *in vitro* avant d'étudier l'activité d'échange de brin de la protéine phosphorylée. Aucun des partenaires protéiques de Rad51 n'a été présent dans la réaction. Notre étude a été réalisée au niveau intracellulaire où la protéine Rad51 forme des complexes avec un grand nombre de protéines partenaires. Ces interactions protéiques peuvent être responsables de la stabilisation de la protéine Rad51 phosphorylée sur Y54 sur la chromatine. L'hypothèse de Yuan et collaborateurs était basée sur la supposition que la phosphorylation du résidu Y54 aurait un effet répulsif sur l'ADN par sa charge négative. Cependant Rad51 interagirait avec l'ADNdb par l'intermédiaire des résidus 61 à 69 de la partie N-terminale (Aihara et al, 1999). La tyrosine Y54 ne fait pas partie de ces résidus et il est probable que sa phosphorylation n'influence pas la liaison de la protéine à l'ADN. La phosphorylation de la protéine Rad51 pourrait influencer l'efficacité de recherche de séquence homologue ou d'échange de brin. L'interaction avec des protéines partenaires pourrait également être modulée par la phosphorylation.

5.2 Elaboration d'une lignée stable EGFP-Rad51

Afin de visualiser au niveau cellulaire l'effet de la phosphorylation de Rad51 sur sa localisation et la formation de foci, nous avons élaboré une lignée cellulaire HeLa qui exprime de manière stable une protéine fluorescente EGFP-Rad51. Nous avons validé l'utilisation de cette lignée pour l'étude de la formation de foci et la localisation intracellulaire de Rad51, cependant nous n'avons pas eu suffisamment de temps pour réaliser cette étude.

Rad51 est fusionnée en position C-terminale de l'EGFP, ce qui confère une fluorescence naturelle à la protéine de fusion. Une étude menée par Yu et collaborateurs a montré qu'après traitement de cellules avec le médicament doxycycline, la croissance de cellules *rad51* déficientes qui expriment la protéine de fusion GFP-Rad51, est similaire à celle des cellules sauvages contrairement aux cellules exprimant Rad51-GFP (Yu et al, 2003). La position N-terminale ou C-terminale de GFP serait donc très importante pour la fonctionnalité de la protéine de fusion. La protéine EGFP-Rad51 exprimée dans la lignée HeLa que nous avons élaborée devrait donc présenter les mêmes propriétés que la protéine Rad51 sauvage. De plus, il a été montré par des expériences d'immunoprécipitation dans des cellules transfectées que GFP-Rad51 est capable de s'associer avec la protéine Rad51 endogène et de se lier à BRCA2 (Pellegrini et al, 2002).

5.2.1 Sélection du clone transfecté

La transfection stable des cellules HeLa avec le plasmide PS2141 EGFP-Rad51 a été réalisée comme décrit dans le chapitre "Matériel et méthodes", page 70. Le plasmide PS2141 contient un gène de résistance à la néomycine/G418 qui permet la sélection des cellules ayant intégré le plasmide.

Après sélection avec le G418 pendant 10 jours, 24 clones ont été choisis et la présence d'EGFP-Rad51 a été recherchée dans les lysats de ces cellules par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-Rad51 (fig. 3.40).

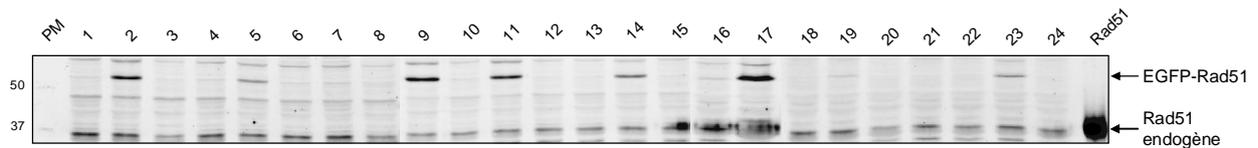


Figure 3.40 : Expression d'EGFP-Rad51 dans des cellules HeLa transfectées stablement. Les lysats de 24 clones sélectionnés au G418 après transfection de EGFP-Rad51 ont été séparés sur gel d'acrylamide et analysés sur Western blot. L'anticorps anti-Rad51 a été utilisé pour la révélation de Rad51.

La figure 3.40 montre l'expression de la protéine EGFP-Rad51 dans les clones 2, 5, 9, 11, 14, 17 et 23. La présence d'EGFP dans la protéine de fusion explique la différence de migration entre EGFP-Rad51 et Rad51 endogène. En effet, EGFP lié à Rad51 augmente son poids moléculaire de 26 kDa soit un poids moléculaire final d'environ 55 kDa. Le clone 17 qui exprime le niveau le plus élevé d'EGFP-Rad51 a été choisi.

5.2.2 Observation de foci

Après endommagement de l'ADN, Rad51 forme des foci nucléaires avec d'autres protéines tels que Rad52, Rad54 (Haaf et al, 1995; Liu & Maizels, 2000; Miyazaki et al, 2004; Raderschall et al, 1999). Ces foci sont formés sur les sites de réparation des CDB de l'ADN. Il a été décrit que la protéine de fusion GFP-Rad51 forme des foci nucléaires avec Rad52 et Rad54 similaires à ceux formés par la protéine Rad51 endogène suite à des dommages de l'ADN (Essers et al, 2002). De plus, son expression n'affecte pas la sensibilité des cellules aux irradiations ionisantes (Essers et al, 2002) et n'a aucun effet négatif sur la capacité de réparation de l'ADN (Kojic et al, 2005). Malgré la présence de 26 kDa supplémentaire, la protéine GFP-Rad51 semble conserver toutes les propriétés de Rad51 endogène.

Notre modèle cellulaire avec EGFP-Rad51 devrait présenter les mêmes caractéristiques que GFP-Rad51 puisque EGFP et GFP ne diffèrent que de quelques acides aminés et que des anticorps anti-GFP sont capables de reconnaître également EGFP. EGFP présente d'ailleurs une fluorescence plus élevée que GFP, ce qui nous permettra d'obtenir un meilleur signal de fluorescence des foci.

Dans un premier temps, nous avons observé sous microscope à fluorescence des cellules HeLa EGFP-Rad51 non traitées après fixation et coloration des noyaux. Les images sont présentées dans la figure 3.41.

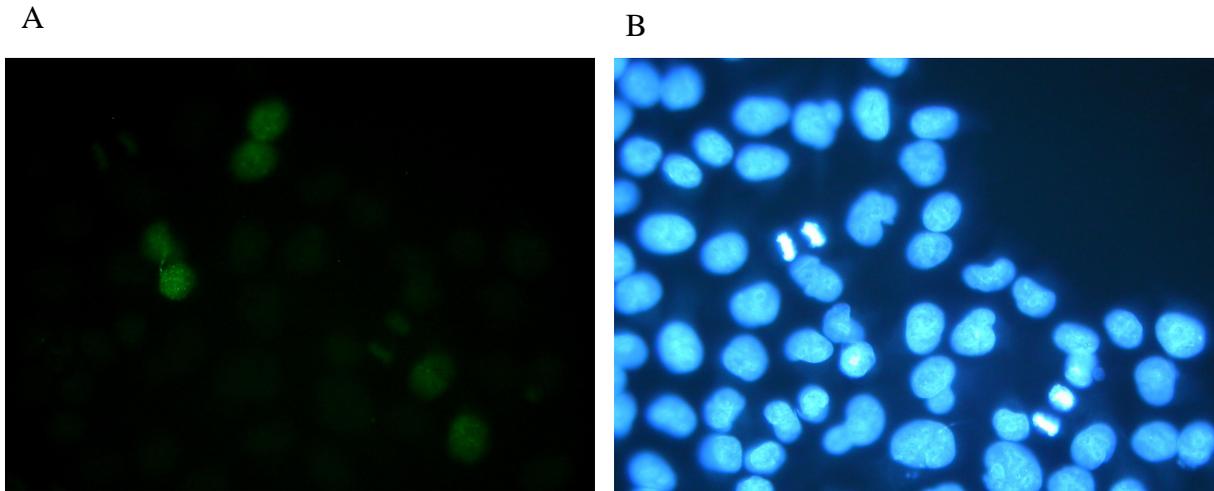


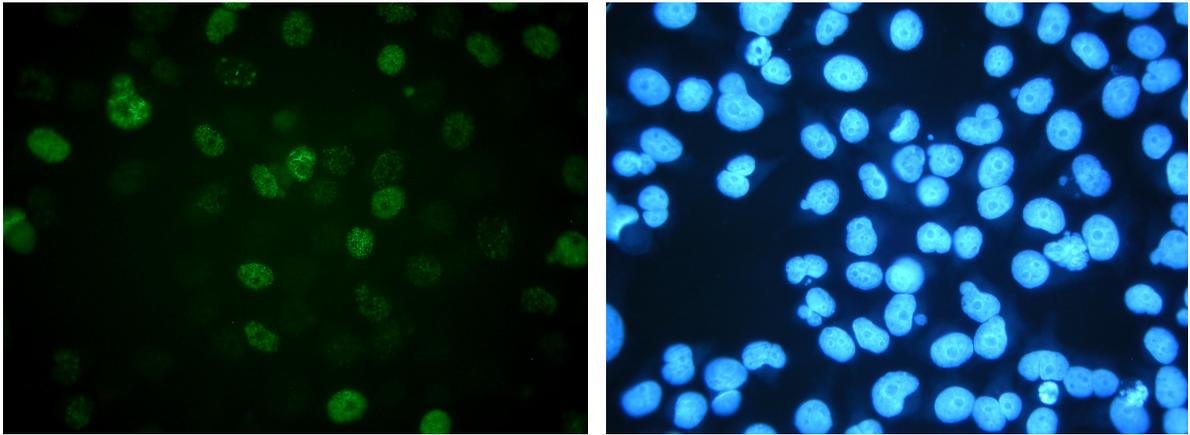
Figure 3.41 : Cellules HeLa EGFP-Rad51 non traitées. La fluorescence naturelle de la protéine EGFP-Rad51 permet la visualisation de foci de Rad51 dans quelques cellules non traitées (A). Les noyaux des cellules ont été colorés au Hoescht 3342(B).

Il a été montré qu'en absence de dommage de l'ADN, Rad51 est diffus dans le nucléoplasme, mais qu'un petit nombre de cellules peuvent présenter des foci (Tashiro et al, 1996). En effet, dans les cellules non traitées on observe quelques cellules qui présentent des foci de EGFP-Rad51 (fig. 3.41) qui correspondent sûrement à des dommages de l'ADN occasionnés pendant la réplication.

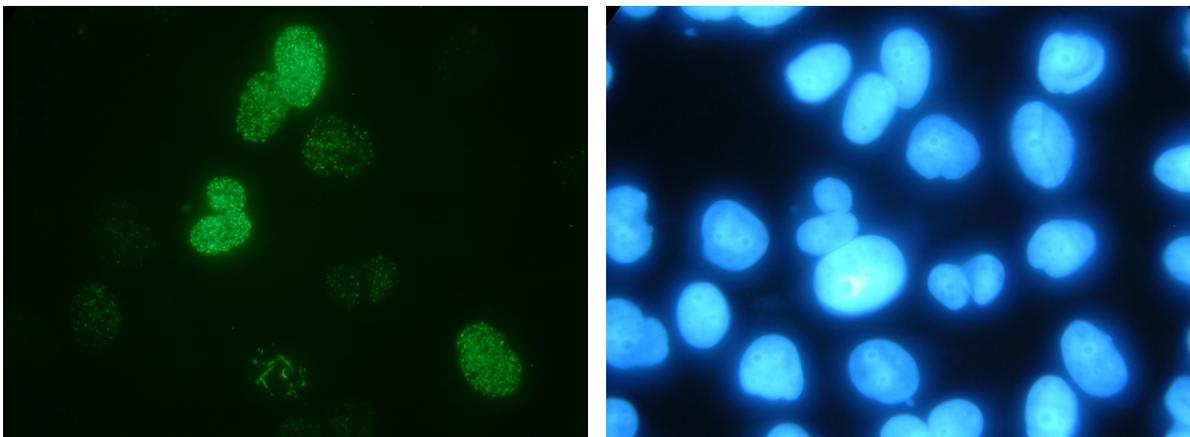
Afin d'observer plus efficacement la formation de foci de Rad51, nous avons traité les cellules HeLa avec 10 μ M de camptothécine ou 10 μ M de mitomycine C, qui sont deux agents induisant des CDB. La camptothécine est un inhibiteur de la topoisomérase I et l'élongation de l'ADN dans les cellules traitées ne peut pas être achevée, ce qui entraîne la formation de lésions sur l'ADN. La mitomycine C est un agent alkylant qui inhibe la synthèse de l'ADN.

Après 6 heures de traitement, les cellules ont été fixées et observées au microscope de fluorescence après coloration des noyaux. Les images obtenues sont présentées sur la figure 3.42.

A



B



C

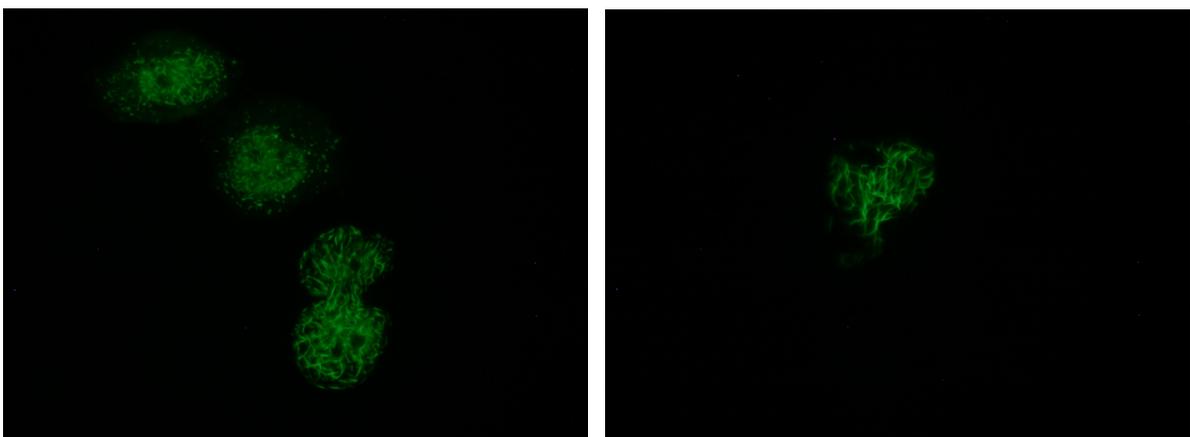


Figure 3.42 : Formation de foci nucléaires de EGFP-Rad51 après traitement de cellules HeLa EGFP-Rad51 à la CPT ou à la MMC. Traitement au CPT, grossissement x50 (A) et x100 (B). Traitement à la MMC, grossissement x 100 (C). Les noyaux ont été colorés au Hoescht 3342.

Dans les conditions de traitement des cellules HeLa EGFP-Rad51 par la camptothécine ou à la mitomycine C, on observe la formation de foci fluorescents dans plus de 80% des cellules. Ces foci résultent de la redistribution dans la cellule de la protéine Rad51 qui se localise au niveau des CDB (Haaf et al, 1995). Le traitement des cellules avec les deux médicaments semble induire la formation de plusieurs types de structures contenant la protéine EGFP-Rad51. Dans les cellules traitées à la CPT, la majeure partie de EGFP-Rad51 est détectée sous forme de points correspondant à des foci. Dans les cellules traitées à la MMC, des structures filamenteuses de EGFP-Rad51 sont détectées. Ce type de structure a été observé auparavant dans l'étude de Raderschall et collaborateurs (Raderschall et al, 2002).

Ces observations confirment que la protéine EGFP-Rad51 de notre lignée est capable de se relocaliser en cas de dommages au niveau des sites de réparation. La lignée HeLa EGFP-Rad51 est donc un outil cellulaire adapté à l'étude de la localisation et des foci de la protéine Rad51.

Chapitre IV

IV. Conclusions et Perspectives

Le maintien de la stabilité génomique est primordial pour la survie des cellules. Cependant de nombreuses agressions d'origine exogène et endogène endommagent l'ADN et risquent de compromettre la stabilité génomique. Les CDB sont les plus létales des lésions de l'ADN. Une réparation efficace est assurée par recombinaison homologue avec la chromatide soeur et la protéine centrale de ce processus est la protéine Rad51. L'expression et l'activité de cette recombinase doivent être finement régulées dans les cellules. Des variations de son niveau d'expression sont observées dans différents types de cancers (Maacke et al, 2002; Maacke et al, 2000a; Maacke et al, 2000b; Raderschall et al, 2002). De plus, la surexpression de Rad51 est associée à la résistance de cellules cancéreuses aux chimiothérapies et radiothérapies. En effet, les CDB induits par les traitements anti-cancéreux sont réparés par l'activité élevée de la recombinaison homologue liée à la surexpression de Rad51.

La phosphorylation de la protéine Rad51 serait impliquée dans sa régulation. Les études antérieures avaient montré la phosphorylation individuelle de la tyrosine 54 ou la tyrosine 315. La phosphorylation des deux sites n'avait jamais été observée auparavant. Malgré les hypothèses émises par les auteurs sur le rôle de ces phosphorylations, les effets ne sont pas clairement définis. La meilleure compréhension de la phosphorylation et de son rôle dans l'activité de la protéine Rad51 pourrait être bénéfique pour l'élaboration de traitements anti-cancéreux plus spécifiques. L'objectif de ce travail a donc été tout d'abord de déterminer avec certitude les sites de phosphorylation de la protéine Rad51 et de mieux comprendre les conséquences sur l'activité de cette recombinase.

Résumé des travaux

La détermination des sites exacts de phosphorylation de la protéine Rad51 a nécessité l'élaboration d'outils adaptés à cette étude. Nous avons ainsi commencé ce travail par l'élaboration d'anticorps anti-phosphotyrosine reconnaissant spécifiquement la phosphorylation du site Y54 ou Y315. La purification de ces anticorps a été réalisée à partir de sérums de lapins immunisés avec des phosphopeptides contenant dans leur séquence pY54 ou pY315 et en utilisant plusieurs étapes de chromatographie d'affinité. La spécificité des anticorps purifiés a été analysée sur puces à peptides contenant différents peptides

phosphorylés et non phosphorylés. Nous avons ainsi obtenus des anticorps anti-pY54 et anti-pY315 hautement spécifiques.

Les anticorps que nous avons purifiés ont été utilisés pour l'étude de la phosphorylation de Rad51. Nous avons tout d'abord recherché la phosphorylation de Rad51 dans des cellules leucémiques traitées par des médicaments induisant des CDB et activant la voie de réparation par recombinaison homologue. Le niveau de phosphorylation de Rad51 étant inférieur au seuil de détection de nos anticorps, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la phosphorylation de Rad51 dans ces conditions.

Une méthode d'enrichissement de la protéine Rad51 a été recherchée et nous a amené à réaliser des immunoprécipitations de cette protéine. Une fois les conditions optimales pour l'immunoprécipitation déterminées, nous avons immunoprécipité la protéine Rad51 à partir des extraits de cellules leucémiques traitées avec des médicaments. Cependant cette technique ne s'est pas avérée efficace pour l'enrichissement de la protéine. La quantité de Rad51 immunoprécipité était faible et sa phosphorylation n'a pas pu être détectée.

Afin de contourner la limite de détection de la phosphorylation de Rad51 par nos anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques, nous avons surexprimé cette protéine ainsi que la kinase c-Abl responsable de sa phosphorylation dans des cellules HeLa. A l'aide de nos anticorps nous avons détecté dans les extraits de ces cellules la phosphorylation de la protéine Rad51 sur les tyrosines 54 et 315. Nous avons ainsi démontré que cette protéine peut être phosphorylée sur les deux tyrosines 54 et 315 en même temps. La phosphorylation de Y54 est abolie lorsque Y315 est muté et non phosphorylable ce qui indique que la phosphorylation de Y54 est dépendante de celle de Y315. Nous avons émis une hypothèse de phosphorylation séquentielle de la protéine Rad51 selon laquelle la kinase c-Abl interagirait avec Rad51 via son domaine SH3 pour phosphoryler Y315. La phosphorylation de ce résidu révélerait un nouveau site de reconnaissance pour le domaine SH2 de c-Abl, ce qui permettrait la phosphorylation de Y54. Cette hypothèse est confirmée par la mise en évidence de l'interaction du domaine SH3 de c-Abl avec la protéine Rad51 phosphorylée sur Y315.

Après avoir déterminé avec certitude les sites de phosphorylation de Rad51 et le mécanisme impliqué, nous avons recherché un rôle possible de ces phosphorylations dans la localisation intracellulaire de la protéine. Des fractionnements de cellules HeLa

co-transfectées avec Rad51 et c-Abl ont montré l'existence de deux formes de phospho-Rad51 avec des localisations intracellulaires précises. La forme mono-phosphorylée sur Y315 présente une localisation nucléoplasmique et liée à la chromatine. La forme di-phosphorylée sur Y315 et Y54 est localisée uniquement au niveau de la chromatine. La localisation des formes de phospho-Rad51 suggère un rôle possible de la phosphorylation dans l'interaction de la protéine avec l'ADN.

Nous avons élaboré une ligne HeLa EGFP-Rad51. Cette lignée exprime stablement la protéine EGFP-Rad51 qui possède une fluorescence naturelle, ce qui permet la visualisation de foci de Rad51 sous microscope à fluorescence. La formation de foci de Rad51 a été vérifiée par le traitement de ces cellules au camptothécine, médicament qui active la voie de recombinaison homologue. Nous avons ainsi observé la formation de foci et de structures filamenteuses de la protéine Rad51 dans les cellules traitées.

Perspectives

La détection des formes phosphorylées d'une protéine peut être une entreprise difficile. La phosphorylation des protéines est souvent un phénomène transitoire et les formes phosphorylées sont peu présentes dans les cellules. De plus la phosphorylation sur tyrosine est la moins fréquente des phosphorylations. Nous avons détecté les deux sites de phosphorylation de Rad51 et nous avons mis en évidence deux formes de phospho-Rad51. Les altérations dans la phosphorylation d'une protéine dues à l'inactivation ou l'hyperactivation de protéine kinases peuvent être responsables du développement et de la progression d'un cancer (Blume-Jensen & Hunter, 2001; Slupianek et al, 2002; Slupianek et al, 2001). Ainsi la simple mise en évidence de la phosphorylation d'une protéine n'est pas suffisante.

Une des perspectives de court terme serait donc la quantification de la stoechiométrie de chaque forme phosphorylée. Ceci peut être effectué par l'analyse de la protéine phosphorylée par électrophorèse 2D, technique qui permettra la séparation efficace de la forme non phosphorylée, mono-phosphorylée et di-phosphorylée. Grâce à cette technique les variations éventuelles dans les taux de phosphorylation des deux tyrosines suite à des dommages de l'ADN pourront être analysées et pourront aider à la meilleure compréhension du rôle de la phosphorylation.

Des études *in vitro* de la capacité de fixation sur l'ADN simple brin ou double brin, l'activité ATPase, l'activité d'échange de brin de Rad51 peuvent apporter des indications sur le rôle de la phosphorylation de la protéine Rad51. Le site de phosphorylation Y315 a déjà été caractérisé par une étude moléculaire de mutants (Takizawa et al. 2004). Une étude similaire peut être envisagée pour la tyrosine 54. Nos résultats montrent que la protéine Rad51 mono-phosphorylée sur Y54 ne peut pas exister. Un double mutant sur les tyrosines 315 et 54 doit donc être produit pour mieux refléter les formes de phospho-Rad51 présentes dans les cellules. La mutation des résidus tyrosine en glutamate présente à pH neutre une charge négative comme celle trouvée dans la phosphorylation de la tyrosine. L'étude moléculaire d'un double mutant Rad51 Y54E Y315E devrait donc apporter des indications sur l'effet de l'ajout d'une charge négative sur ces deux sites sur l'activité de la protéine. Cette étude serait évidemment plus informative si elle est réalisée directement avec la protéine di-phosphorylée.

Cependant les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ne sont pas effectuées dans les bactéries. Un système baculovirus pourrait être envisagé pour l'expression et la purification de la protéine phosphorylée. En effet, des modifications post-traductionnelles de protéines sont réalisées dans les cellules d'insectes. Toutefois la phosphorylation sur tyrosine est moins efficace que celle des sérines et thréonines et la maîtrise des sites phosphorylés reste aléatoire.

La phosphorylation de la protéine Rad51 pourrait également influencer sa stabilité. Des études de clivage *in vitro* de Rad51 sauvage ou mutée Y315E et Y54E Y315E pourraient indiquer l'existence d'un lien entre la charge négative portée par le résidu muté et la capacité de la molécule à être clivée par la caspase-3. Cette étude peut également être réalisée avec des extraits de cellules surexprimant Rad51 et c-Abl.

La phosphorylation de la protéine Rad51 peut influencer non seulement son interaction avec l'ADN et son activité de recombinaise mais également l'interaction avec des protéines partenaires. Pour réaliser cette étude, des anticorps dirigés contre la protéine partenaire qui nous intéresse peuvent être utilisés pour réaliser des co-immunoprécipitations. L'état de phosphorylation de Rad51 co-immunoprécipitée sera analysé à l'aide de nos anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques. Des co-immunoprécipitations à partir de fractions cellulaires pourraient nous renseigner sur le compartiment cellulaire dans lequel s'établit l'interaction de Rad51 avec la protéine partenaire.

Des études du rôle de la phosphorylation peuvent également être envisagées au niveau cellulaire. Grâce à la lignée HeLa EGFP-Rad51 que nous avons élaboré nous pouvons visualiser sous microscope la formation de foci intracellulaires. La transfection transitoire de ces cellules avec la kinase c-Abl induira la phosphorylation de la protéine EGFP-Rad51. Nous pouvons ainsi vérifier l'importance de la phosphorylation de Rad51 pour la formation de foci après traitement des cellules avec un médicament génotoxique.

Cette lignée HeLa EGFP-Rad51 peut être utilisée non seulement pour l'étude du rôle de la phosphorylation mais peut avoir des applications plus larges. La formation de foci étant considéré comme marqueur de la formation de CDB, cette lignée pourrait permettre l'évaluation de l'efficacité de différents traitements anti-cancéreux. Elle pourrait être utilisée également pour analyser et visualiser l'efficacité d'inhibiteurs de Rad51. Ainsi des

inhibiteurs peptidiques qui inhibent l'activité de Rad51 par l'inhibition de la polymérisation ont été développés au laboratoire. Leur efficacité peut être validée *in cellulo* dans les cellules HeLa EGFP-Rad51.

La phosphorylation de la tyrosine 315 serait corrélée avec la résistance de cellules leucémiques aux médicaments cisplatine et mitomycine C (Slupianek et al, 2001). Une fois le mécanisme et le rôle de la phosphorylation de la protéine Rad51 bien élucidés, il sera possible à plus long terme de rechercher des inhibiteurs de la phosphorylation. Ces inhibiteurs pourront être utilisés pour sensibiliser les tumeurs présentant un niveau élevé d'activité de Rad51 aux chimio et radiothérapies et améliorer ainsi les traitements anticancéreux.

Bibliographie

- Abelson HT, Rabstein LS (1970) Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res* **30**(8): 2213-2222
- Agarwal S, Tafel AA, Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair (Amst)* **5**(9-10): 1075-1081
- Aihara H, Ito Y, Kurumizaka H, Yokoyama S, Shibata T (1999) The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *J Mol Biol* **290**(2): 495-504
- Aloyz R, Grzywacz K, Xu ZY, Loignon M, Alaoui-Jamali MA, Panasci L (2004) Imatinib sensitizes CLL lymphocytes to chlorambucil. *Leukemia* **18**(3): 409-414
- Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S (2008) DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* **10**(5): 891-937
- Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR (1998) Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene* **16**(11): 1383-1390
- Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, Lord CJ, Dexter T, Irvani M, Ashworth A, Silva A (2006) p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep* **7**(2): 219-224
- Arnaudeau C, Helleday T, Jenssen D (1999) The RAD51 protein supports homologous recombination by an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol* **289**(5): 1231-1238
- Arnold AS, Laporte V, Dumont S, Appert-Collin A, Erbacher P, Coupin G, Levy R, Poindron P, Gies JP (2006) Comparing reagents for efficient transfection of human primary myoblasts: FuGENE 6, Effectene and ExGen 500. *Fundam Clin Pharmacol* **20**(1): 81-89
- Aylon Y, Kupiec M (2004) New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat Res* **566**(3): 231-248
- Bahassi EM, Ovesen JL, Riesenberger AL, Bernstein WZ, Hasty PE, Stambrook PJ (2008) The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene* **27**(28): 3977-3985
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**(6922): 499-506
- Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw-Boris A, Kastan MB, Wang JY (1997) Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* **387**(6632): 516-519

- Baumann P, Benson FE, West SC (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* **87**(4): 757-766
- Baumann P, West SC (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci* **23**(7): 247-251
- Bedi A, Barber JP, Bedi GC, el-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS, Akhtar AJ, Hilton J, Jones RJ (1995) BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* **86**(3): 1148-1158
- Ben-Neriah Y, Bernards A, Paskind M, Daley GQ, Baltimore D (1986) Alternative 5' exons in c-abl mRNA. *Cell* **44**(4): 577-586
- Ben-Yehoyada M, Ben-Dor I, Shaul Y (2003) c-Abl tyrosine kinase selectively regulates p73 nuclear matrix association. *J Biol Chem* **278**(36): 34475-34482
- Benore-Parsons M, Seidah NG, Wennogle LP (1989) Substrate phosphorylation can inhibit proteolysis by trypsin-like enzymes. *Arch Biochem Biophys* **272**(2): 274-280
- Benson FE, Stasiak A, West SC (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO J* **13**(23): 5764-5771
- Bertrand P, Lambert S, Joubert C, Lopez BS (2003) Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells. *Oncogene* **22**(48): 7587-7592
- Bertrand P, Rouillard D, Boulet A, Levalois C, Soussi T, Lopez BS (1997) Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene* **14**(9): 1117-1122
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**(6835): 355-365
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y (2008) GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**(12): 957-967
- Bork P, Blomberg N, Nilges M (1996) Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat Genet* **13**(1): 22-23
- Brown ET, Robinson-Benion C, Holt JT (2008) Radiation enhances caspase 3 cleavage of Rad51 in BRCA2-defective cells. *Radiat Res* **169**(5): 595-601
- Buchhop S, Gibson MK, Wang XW, Wagner P, Sturzbecher HW, Harris CC (1997) Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res* **25**(19): 3868-3874
- Bugreev DV, Mazin AV (2004) Ca²⁺ activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 9988-9993

- Cann KL, Hicks GG (2007) Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol* **85**(6): 663-674
- Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**(6753): 616-620
- Chen CF, Chen PL, Zhong Q, Sharp ZD, Lee WH (1999a) Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G(2)/M checkpoint control. *J Biol Chem* **274**(46): 32931-32935
- Chen F, Nastasi A, Shen Z, Brenneman M, Crissman H, Chen DJ (1997) Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat Res* **384**(3): 205-211
- Chen G, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff SP, Wu Y, Arlinghaus R, Baltimore D, Gasser PJ, Park MS, Sung P, Lee EY (1999b) Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem* **274**(18): 12748-12752
- Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R (1999c) BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res* **59**(7 Suppl): 1752s-1756s
- Chen PL, Chen CF, Chen Y, Xiao J, Sharp ZD, Lee WH (1998) The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5287-5292
- Chene P (2003) Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**(2): 102-109
- Cheng WH, von Kobbe C, Opresko PL, Fields KM, Ren J, Kufe D, Bohr VA (2003) Werner syndrome protein phosphorylation by abl tyrosine kinase regulates its activity and distribution. *Mol Cell Biol* **23**(18): 6385-6395
- Chi P, Van Komen S, Sehorn MG, Sigurdsson S, Sung P (2006) Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function. *DNA Repair (Amst)* **5**(3): 381-391
- Chissoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L, et al. (1995) Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* **27**(1): 67-82
- Cimprich KA, Cortez D (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(8): 616-627
- Cohen P (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* **25**(12): 596-601
- Conilleau S, Takizawa Y, Tachiwana H, Fleury F, Kurumizaka H, Takahashi M (2004) Location of tyrosine 315, a target for phosphorylation by cAbl tyrosine kinase, at the edge of the subunit-subunit interface of the human Rad51 filament. *J Mol Biol* **339**(4): 797-804

- Daboussi F, Courbet S, Benhamou S, Kannouche P, Zdzienicka MZ, Debatisse M, Lopez BS (2008) A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J Cell Sci* **121**(Pt 2): 162-166
- Daboussi F, Dumay A, Delacote F, Lopez BS (2002) DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation. *Cell Signal* **14**(12): 969-975
- Dai Z, Quackenbush RC, Courtney KD, Grove M, Cortez D, Reuther GW, Pendergast AM (1998) Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. *Genes Dev* **12**(10): 1415-1424
- David-Cordonnier MH, Hamdane M, Bailly C, D'Halluin JC (1998) The DNA binding domain of the human c-Abl tyrosine kinase preferentially binds to DNA sequences containing an AAC motif and to distorted DNA structures. *Biochemistry* **37**(17): 6065-6076
- Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC (2001) Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* **7**(2): 273-282
- Delacote F, Lopez BS (2008) Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle* **7**(1): 33-38
- Deutsch E, Dugray A, AbdulKarim B, Marangoni E, Maggiorella L, Vaganay S, M'Kacher R, Rasy SD, Eschwege F, Vainchenker W, Turhan AG, Bourhis J (2001) BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* **97**(7): 2084-2090
- Dong Y, Hakimi MA, Chen X, Kumaraswamy E, Cooch NS, Godwin AK, Shiekhattar R (2003) Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair. *Mol Cell* **12**(5): 1087-1099
- Donoho G, Brenneman MA, Cui TX, Donoviel D, Vogel H, Goodwin EH, Chen DJ, Hasty P (2003) Deletion of Brca2 exon 27 causes hypersensitivity to DNA crosslinks, chromosomal instability, and reduced life span in mice. *Genes Chromosomes Cancer* **36**(4): 317-331
- Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Pena-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE (2004) Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* **3**(11): 1389-1407
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **2**(5): 561-566
- Dudenhoffer C, Rohaly G, Will K, Deppert W, Wiesmuller L (1998) Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol* **18**(9): 5332-5342
- Dumay A, Laulier C, Bertrand P, Saintigny Y, Lebrun F, Vayssiere JL, Lopez BS (2006) Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene* **25**(22): 3196-3205

- Durant ST, Nickoloff JA (2005) Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1. *Cell Cycle* **4**(9): 1216-1222
- Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, West SC (2005) CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**(7033): 598-604
- Esashi F, Galkin VE, Yu X, Egelman EH, West SC (2007) Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat Struct Mol Biol* **14**(6): 468-474
- Essers J, Houtsmuller AB, van Veelen L, Paulusma C, Nigg AL, Pastink A, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2002) Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. *EMBO J* **21**(8): 2030-2037
- Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, Khanna KK (2004) BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem* **279**(30): 31251-31258
- Fan R, Kumaravel TS, Jalali F, Marrano P, Squire JA, Bristow RG (2004) Defective DNA strand break repair after DNA damage in prostate cancer cells: implications for genetic instability and prostate cancer progression. *Cancer Res* **64**(23): 8526-8533
- Feldmann E, Schmiemann V, Goedecke W, Reichenberger S, Pfeiffer P (2000) DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res* **28**(13): 2585-2596
- Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H (1994) c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *Embo J* **13**(10): 2341-2351
- Flygare J, Armstrong RC, Wennborg A, Orsan S, Hellgren D (1998) Proteolytic cleavage of HsRad51 during apoptosis. *FEBS Lett* **427**(2): 247-251
- Flygare J, Hellgren D, Wennborg A (2000) Caspase-3 mediated cleavage of HsRad51 at an unconventional site. *Eur J Biochem* **267**(19): 5977-5982
- Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P (2003) A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J* **22**(11): 2860-2871
- Galkin VE, Esashi F, Yu X, Yang S, West SC, Egelman EH (2005) BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(24): 8537-8542
- Goga A, Liu X, Hambuch TM, Senechal K, Major E, Berk AJ, Witte ON, Sawyers CL (1995) p53 dependent growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinase. *Oncogene* **11**(4): 791-799

- Goshe MB (2006) Characterizing phosphoproteins and phosphoproteomes using mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic* **4**(4): 363-376
- Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, Holyoake TL (2002) Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* **99**(1): 319-325
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**(1): 93-99
- Gudmundsdottir K, Ashworth A (2006) The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* **25**(43): 5864-5874
- Guirouilh-Barbat J, Huck S, Bertrand P, Pirzio L, Desmaze C, Sabatier L, Lopez BS (2004) Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell* **14**(5): 611-623
- Guirouilh-Barbat J, Rass E, Plo I, Bertrand P, Lopez BS (2007) Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(52): 20902-20907
- Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6): 2298-2302
- Haaf T, Raderschall E, Reddy G, Ward DC, Radding CM, Golub EI (1999) Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *J Cell Biol* **144**(1): 11-20
- Hansen LT, Lundin C, Helleday T, Poulsen HS, Sorensen CS, Petersen LN, Spang-Thomsen M (2003a) DNA repair rate and etoposide (VP16) resistance of tumor cell subpopulations derived from a single human small cell lung cancer. *Lung Cancer* **40**(2): 157-164
- Hansen LT, Lundin C, Spang-Thomsen M, Petersen LN, Helleday T (2003b) The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. *Int J Cancer* **105**(4): 472-479
- Hantschel O, Superti-Furga G (2004) Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(1): 33-44
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **8**(3): 193-204
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**(6835): 366-374
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* **253**(5015): 49-53

- Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, Sistonen L (2002) Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci* **27**(12): 619-627
- Huang Y, Nakada S, Ishiko T, Utsugisawa T, Datta R, Kharbanda S, Yoshida K, Talanian RV, Weichselbaum R, Kufe D, Yuan ZM (1999) Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2986-2997
- Huertas P, Jackson SP (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem* **284**(14): 9558-9565
- Hyrien O (2000) Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie* **82**(1): 5-17
- Iijima K, Komatsu K, Matsuura S, Tauchi H (2004) The Nijmegen breakage syndrome gene and its role in genome stability. *Chromosoma* **113**(2): 53-61
- Iijima K, Ohara M, Seki R, Tauchi H (2008) Dancing on damaged chromatin: functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. *J Radiat Res (Tokyo)* **49**(5): 451-464
- Inokuchi K (2006) Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. *J Nippon Med Sch* **73**(4): 178-192
- Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, Haber JE, Foiani M (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**(7011): 1011-1017
- Jacobsen LB, Calvin SA, Colvin KE, Wright M (2004) FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* **33**(2): 104-112
- Jeggo PA, Lobrich M (2007) DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene* **26**(56): 7717-7719
- Kabotyanski EB, Gomelsky L, Han JO, Stamato TD, Roth DB (1998) Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res* **26**(23): 5333-5342
- Kadlec L, Pendergast AM (1997) The amphiphysin-like protein 1 (ALP1) interacts functionally with the cABL tyrosine kinase and may play a role in cytoskeletal regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12390-12395
- Kao J, Rosenstein BS, Peters S, Milano MT, Kron SJ (2005) Cellular response to DNA damage. *Ann N Y Acad Sci* **1066**: 243-258
- Kawabata M, Kawabata T, Nishibori M (2005) Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama* **59**(1): 1-9
- Kharbanda S, Pandey P, Jin S, Inoue S, Bharti A, Yuan ZM, Weichselbaum R, Weaver D, Kufe D (1997) Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* **386**(6626): 732-735

- Kharbanda S, Ren R, Pandey P, Shafman TD, Feller SM, Weichselbaum RR, Kufe DW (1995) Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* **376**(6543): 785-788
- Kim PM, Allen C, Wagener BM, Shen Z, Nickoloff JA (2001) Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **29**(21): 4352-4360
- Kipreos ET, Wang JY (1992) Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* **256**(5055): 382-385
- Kjeldsen F, Savitski MM, Nielsen ML, Shi L, Zubarev RA (2007) On studying protein phosphorylation patterns using bottom-up LC-MS/MS: the case of human alpha-casein. *Analyst* **132**(8): 768-776
- Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, Tauchi H (2008) Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res (Tokyo)* **49**(2): 93-103
- Kojic M, Zhou Q, Lisby M, Holloman WK (2005) Brh2-Dss1 interplay enables properly controlled recombination in *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **25**(7): 2547-2557
- Kovalenko OV, Plug AW, Haaf T, Gonda DK, Ashley T, Ward DC, Radding CM, Golub EI (1996) Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(7): 2958-2963
- Kuhfittig-Kulle S, Feldmann E, Odersky A, Kuliczowska A, Goedecke W, Eggert A, Pfeiffer P (2007) The mutagenic potential of non-homologous end joining in the absence of the NHEJ core factors Ku70/80, DNA-PKcs and XRCC4-LigIV. *Mutagenesis* **22**(3): 217-233
- Kuzminov A (1995) Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **16**(3): 373-384
- Lambert S, Lopez BS (2000) Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *EMBO J* **19**(12): 3090-3099
- Lazaro-Trueba I, Arias C, Silva A (2006) Double bolt regulation of Rad51 by p53: a role for transcriptional repression. *Cell Cycle* **5**(10): 1062-1065
- Lee JH, Paull TT (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**(5721): 551-554
- Lee JH, Paull TT (2007) Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**(56): 7741-7748
- Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH (2000) hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* **404**(6774): 201-204
- Lee S, Cavallo L, Griffith J (1997) Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem* **272**(11): 7532-7539

- Li W, Hesabi B, Babbo A, Pacione C, Liu J, Chen DJ, Nickoloff JA, Shen Z (2000) Regulation of double-strand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein. *Nucleic Acids Res* **28**(5): 1145-1153
- Li X, Heyer WD (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**(1): 99-113
- Li Y, Shimizu H, Xiang SL, Maru Y, Takao N, Yamamoto K (2002) Arg tyrosine kinase is involved in homologous recombinational DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun* **299**(5): 697-702
- Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* **283**(1): 1-5
- Lim DS, Hasty P (1996) A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* **16**(12): 7133-7143
- Linke SP, Sengupta S, Khabie N, Jeffries BA, Buchhop S, Miska S, Henning W, Pedoux R, Wang XW, Hofseth LJ, Yang Q, Garfield SH, Sturzbecher HW, Harris CC (2003) p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res* **63**(10): 2596-2605
- Liu N, Schild D, Thelen MP, Thompson LH (2002) Involvement of Rad51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells. *Nucleic Acids Res* **30**(4): 1009-1015
- Liu Y, Maizels N (2000) Coordinated response of mammalian Rad51 and Rad52 to DNA damage. *EMBO Rep* **1**(1): 85-90
- Lundin C, Schultz N, Arnaudeau C, Mohindra A, Hansen LT, Helleday T (2003) RAD51 is involved in repair of damage associated with DNA replication in mammalian cells. *J Mol Biol* **328**(3): 521-535
- Maacke H, Hundertmark C, Miska S, Voss M, Kalthoff H, Sturzbecher HW (2002) Autoantibodies in sera of pancreatic cancer patients identify recombination factor Rad51 as a tumour-associated antigen. *J Cancer Res Clin Oncol* **128**(4): 219-222
- Maacke H, Jost K, Opitz S, Miska S, Yuan Y, Hasselbach L, Luttgies J, Kalthoff H, Sturzbecher HW (2000a) DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* **19**(23): 2791-2795
- Maacke H, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Henning W, Kruger S, Feller AC, Lopens A, Diedrich K, Schwinger E, Sturzbecher HW (2000b) Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* **88**(6): 907-913
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**(5600): 1912-1934

- Maru Y, Bergmann E, Coin F, Egly JM, Shibuya M (2001) TFIIF functions are altered by the P210BCR-ABL oncoprotein produced on the Philadelphia chromosome. *Mutat Res* **483**(1-2): 83-88
- Masson JY, Tarsounas MC, Stasiak AZ, Stasiak A, Shah R, McIlwraith MJ, Benson FE, West SC (2001) Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev* **15**(24): 3296-3307
- Matsuo Y, Sakane I, Takizawa Y, Takahashi M, Kurumizaka H (2006) Roles of the human Rad51 L1 and L2 loops in DNA binding. *FEBS J* **273**(14): 3148-3159
- Mazin AV, Zaitseva E, Sung P, Kowalczykowski SC (2000) Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing. *EMBO J* **19**(5): 1148-1156
- McAllister KA, Bennett LM, Houle CD, Ward T, Malphurs J, Collins NK, Cachafeiro C, Haseman J, Goulding EH, Bunch D, Eddy EM, Davis BJ, Wiseman RW (2002) Cancer susceptibility of mice with a homozygous deletion in the COOH-terminal domain of the Brca2 gene. *Cancer Res* **62**(4): 990-994
- Mekeel KL, Tang W, Kachnic LA, Luo CM, DeFrank JS, Powell SN (1997) Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* **14**(15): 1847-1857
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**(5182): 66-71
- Miller WT (2003) Determinants of substrate recognition in nonreceptor tyrosine kinases. *Acc Chem Res* **36**(6): 393-400
- Mine J, Disseau L, Takahashi M, Cappello G, Dutreix M, Viovy JL (2007) Real-time measurements of the nucleation, growth and dissociation of single Rad51 DNA nucleoprotein filaments. *Nucleic Acids Res*
- Miyazaki T, Bressan DA, Shinohara M, Haber JE, Shinohara A (2004) In vivo assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair. *Embo J* **23**(4): 939-949
- Morita T, Yoshimura Y, Yamamoto A, Murata K, Mori M, Yamamoto H, Matsushiro A (1993) A mouse homolog of the Escherichia coli recA and Saccharomyces cerevisiae RAD51 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14): 6577-6580
- Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* **4**(4): 511-518
- Moynahan ME, Cui TY, Jasin M (2001a) Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res* **61**(12): 4842-4850

- Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M (2001b) BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* **7**(2): 263-272
- Mullan PB, Quinn JE, Gilmore PM, McWilliams S, Andrews H, Gervin C, McCabe N, McKenna S, White P, Song YH, Maheswaran S, Liu E, Haber DA, Johnston PG, Harkin DP (2001) BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene* **20**(43): 6123-6131
- Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W, Grosse F (1996) p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* **85**(7): 1089-1099
- Nagar B, Hantschel O, Seeliger M, Davies JM, Weis WI, Superti-Furga G, Kuriyan J (2006) Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase. *Mol Cell* **21**(6): 787-798
- Neale MJ, Keeney S (2006) Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* **442**(7099): 153-158
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**: 617-656
- Paffett KS, Clikeman JA, Palmer S, Nickoloff JA (2005) Overexpression of Rad51 inhibits double-strand break-induced homologous recombination but does not affect gene conversion tract lengths. *DNA Repair (Amst)* **4**(6): 687-698
- Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M (2001) Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6086-6091
- Pawson T, Schlessingert J (1993) SH2 and SH3 domains. *Curr Biol* **3**(7): 434-442
- Peck SC (2006) Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J* **45**(4): 512-522
- Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR (2002) Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* **420**(6913): 287-293
- Pendergast AM (2002) The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res* **85**: 51-100
- Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G (2002) Autoinhibition of c-Abl. *Cell* **108**(2): 247-259
- Popova M, Shimizu H, Yamamoto KI, Lebecqec M, Takahashi M, Fleury F (2009) Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependent on that of Y315. *FEBS Lett*
- Prabhu VP, Simons AM, Iwasaki H, Gai D, Simmons DT, Chen J (2002) p53 blocks RuvAB promoted branch migration and modulates resolution of Holliday junctions by RuvC. *J Mol Biol* **316**(5): 1023-1032

- Prasad TK, Yeykal CC, Greene EC (2006) Visualizing the assembly of human Rad51 filaments on double-stranded DNA. *J Mol Biol* **363**(3): 713-728
- Purandare SM, Patel PI (1997) Recombination hot spots and human disease. *Genome Res* **7**(8): 773-786
- Raderschall E, Golub EI, Haaf T (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 1921-1926
- Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T (2002) Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res* **62**(1): 219-225
- Raggiaschi R, Gotta S, Terstappen GC (2005) Phosphoproteome analysis. *Biosci Rep* **25**(1-2): 33-44
- Reardon JT, Sancar A (2005) Nucleotide excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **79**: 183-235
- Reliene R, Bishop AJ, Schiestl RH (2007) Involvement of homologous recombination in carcinogenesis. *Adv Genet* **58**: 67-87
- Ren R, Ye ZS, Baltimore D (1994) Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev* **8**(7): 783-795
- Richardson C, Horikoshi N, Pandita TK (2004) The role of the DNA double-strand break response network in meiosis. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1149-1164
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 402-412
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**(49): 5548-5557
- Rouse J, Jackson SP (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* **297**(5581): 547-551
- Ruksc A, Birmingham EC, Baker MD (2007) Altered DNA repair and recombination responses in mouse cells expressing wildtype or mutant forms of RAD51. *DNA Repair (Amst)* **6**(12): 1876-1889
- Saglio G, Cilloni D (2004) Abl: the prototype of oncogenic fusion proteins. *Cell Mol Life Sci* **61**(23): 2897-2911
- Saintigny Y, Delacote F, Boucher D, Averbek D, Lopez BS (2007) XRCC4 in G1 suppresses homologous recombination in S/G2, in G1 checkpoint-defective cells. *Oncogene* **26**(19): 2769-2780

- Saintigny Y, Delacote F, Vares G, Petitot F, Lambert S, Averbeck D, Lopez BS (2001a) Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J* **20**(14): 3861-3870
- Saintigny Y, Dumay A, Lambert S, Lopez BS (2001b) A novel role for the Bcl-2 protein family: specific suppression of the RAD51 recombination pathway. *EMBO J* **20**(10): 2596-2607
- Saintigny Y, Rouillard D, Chaput B, Soussi T, Lopez BS (1999) Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint. *Oncogene* **18**(24): 3553-3563
- Saitoh H, Pizzi MD, Wang J (2002) Perturbation of SUMOlation enzyme Ubc9 by distinct domain within nucleoporin RanBP2/Nup358. *J Biol Chem* **277**(7): 4755-4763
- Salih E (2005) Phosphoproteomics by mass spectrometry and classical protein chemistry approaches. *Mass Spectrom Rev* **24**(6): 828-846
- Salomoni P, Condorelli F, Sweeney SM, Calabretta B (2000) Versatility of BCR/ABL-expressing leukemic cells in circumventing proapoptotic BAD effects. *Blood* **96**(2): 676-684
- San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu Rev Biochem* **77**: 229-257
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**: 39-85
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**(7169): 509-514
- Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O (1994) The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* **77**(1): 121-131
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J (2000) Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**(5486): 1938-1942
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R (2007) DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* **8**(6): 377-397
- Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD, Bowdish KS, Humaran T, Boast S, Harbison ML, Robertson EJ, Goff SP (1991) Mice homozygous for the ablm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* **65**(7): 1165-1175
- Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **88**(2): 265-275

Sgagias MK, Wagner KU, Hamik B, Stoeger S, Spieker R, Huber LJ, Chodosh LA, Cowan KH (2004) Brca1-deficient murine mammary epithelial cells have increased sensitivity to CDDP and MMS. *Cell Cycle* **3**(11): 1451-1456

Shamoo Y (2003) Structural insights into BRCA2 function. *Curr Opin Struct Biol* **13**(2): 206-211

Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P, Bradley A (1997) Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* **386**(6627): 804-810

Shaul Y (2000) c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ* **7**(1): 10-16

Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ (1996a) Associations of UBE2I with RAD52, UBL1, p53, and RAD51 proteins in a yeast two-hybrid system. *Genomics* **37**(2): 183-186

Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ (1996b) UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* **36**(2): 271-279

Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-168

Shimizu H, Popova M, Fleury F, Kobayashi M, Hayashi N, Sakane I, Kurumizaka H, Venkitaraman AR, Takahashi M, Yamamoto K (2009) c-ABL tyrosine kinase stabilizes RAD51 chromatin association. *Biochem Biophys Res Commun* **382**(2): 286-291

Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, Ushio N, Ieko K, Ogawa T (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet* **4**(3): 239-243

Shivji MK, Davies OR, Savill JM, Bates DL, Pellegrini L, Venkitaraman AR (2006) A region of human BRCA2 containing multiple BRC repeats promotes RAD51-mediated strand exchange. *Nucleic Acids Res* **34**(14): 4000-4011

Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18**(1): 134-147

Sickmann A, Meyer HE (2001) Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* **1**(2): 200-206

Sigurdsson S, Van Komen S, Petukhova G, Sung P (2002) Homologous DNA pairing by human recombination factors Rad51 and Rad54. *J Biol Chem* **277**(45): 42790-42794

Sirvent A, Benistant C, Roche S (2008) Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell* **100**(11): 617-631

Slupianek A, Hoser G, Majsterek I, Bronisz A, Malecki M, Blasiak J, Fishel R, Skorski T (2002) Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent

recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**(12): 4189-4201

Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Nowicki MO, Pierce AJ, Fishel R, Skorski T (2001) BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* **8**(4): 795-806

Smith GC, d'Adda di Fagagna F, Lakin ND, Jackson SP (1999) Cleavage and inactivation of ATM during apoptosis. *Mol Cell Biol* **19**(9): 6076-6084

Solinger JA, Kiianitsa K, Heyer WD (2002) Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol Cell* **10**(5): 1175-1188

Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS (1997) Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. *Nature* **389**(6647): 187-190

Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* **17**(2): 598-608

Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewska J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* **7**(2): 195-201

Soulas-Sprauel P, Rivera-Munoz P, Malivert L, Le Guyader G, Abramowski V, Revy P, de Villartay JP (2007) V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* **26**(56): 7780-7791

Stroh C, Schulze-Osthoff K (1998) Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* **5**(12): 997-1000

Sturzbecher HW, Donzelmann B, Henning W, Knippschild U, Buchhop S (1996) p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J* **15**(8): 1992-2002

Sugiyama T, Kowalczykowski SC (2002) Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem* **277**(35): 31663-31672

Sun X, Majumder P, Shioya H, Wu F, Kumar S, Weichselbaum R, Kharbanda S, Kufe D (2000) Activation of the cytoplasmic c-Abl tyrosine kinase by reactive oxygen species. *J Biol Chem* **275**(23): 17237-17240

Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(10): 739-750

Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JY, Hope TJ (1998) Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7457-7462

- Takeda S, Nakamura K, Taniguchi Y, Paull TT (2007) Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination. *Mol Cell* **28**(3): 351-352
- Takizawa Y, Kinebuchi T, Kagawa W, Yokoyama S, Shibata T, Kurumizaka H (2004) Mutational analyses of the human Rad51-Tyr315 residue, a site for phosphorylation in leukaemia cells. *Genes Cells* **9**(9): 781-790
- Tashiro S, Kotomura N, Shinohara A, Tanaka K, Ueda K, Kamada N (1996) S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene* **12**(10): 2165-2170
- Taylor AM, Groom A, Byrd PJ (2004) Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1219-1225
- Thacker J (1999) A surfeit of RAD51-like genes? *Trends Genet* **15**(5): 166-168
- Thacker J (2005) The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* **219**(2): 125-135
- Thorslund T, West SC (2007) BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* **26**(56): 7720-7730
- Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T (1996) Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6236-6240
- Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (1999) Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* **398**(6729): 728-731
- Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D (1989) The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* **58**(4): 669-678
- Van Etten RA, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janney PA (1994) The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol* **124**(3): 325-340
- van Maanen JM, Retel J, de Vries J, Pinedo HM (1988) Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *J Natl Cancer Inst* **80**(19): 1526-1533
- Vigneri P, Wang JY (2001) Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* **7**(2): 228-234
- Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M (1998) Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* **26**(12): 2859-2864

- Wang HC, Chou WC, Shieh SY, Shen CY (2006) Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res* **66**(3): 1391-1400
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* **14**(8): 927-939
- Welch PJ, Wang JY (1993) A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* **75**(4): 779-790
- Welsh PL, King MC (2001) BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* **10**(7): 705-713
- Wen ST, Jackson PK, Van Etten RA (1996) The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *Embo J* **15**(7): 1583-1595
- Wen ST, Van Etten RA (1997) The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev* **11**(19): 2456-2467
- West SC (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 435-445
- Wiesmuller L, Cammenga J, Deppert WW (1996) In vivo assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J Virol* **70**(2): 737-744
- Williams RS, Williams JS, Tainer JA (2007) Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* **85**(4): 509-520
- Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL (1997) RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J Biol Chem* **272**(51): 31941-31944
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T (2001) Human DNA repair genes. *Science* **291**(5507): 1284-1289
- Woodring PJ, Hunter T, Wang JY (2001) Inhibition of c-Abl tyrosine kinase activity by filamentous actin. *J Biol Chem* **276**(29): 27104-27110
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**(6559): 789-792
- Xu MQ, Ghosh I, Kochinyan S, Sun L (2007) Intein-mediated peptide arrays for epitope mapping and kinase/phosphatase assays. *Methods Mol Biol* **381**: 313-338

- Xu X, Weaver Z, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, Harris CC, Ried T, Deng CX (1999) Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* **3**(3): 389-395
- Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP (2002) BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **297**(5588): 1837-1848
- Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC (2002) BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* **30**(3): 285-289
- Yoshida K (2008) Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage. *Trends Mol Med* **14**(7): 305-313
- Yoshikawa K, Ogawa T, Baer R, Hemmi H, Honda K, Yamauchi A, Inamoto T, Ko K, Yazumi S, Motoda H, Kodama H, Noguchi S, Gazdar AF, Yamaoka Y, Takahashi R (2000) Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer* **88**(1): 28-36
- Yoshimura Y, Morita T, Yamamoto A, Matsushiro A (1993) Cloning and sequence of the human RecA-like gene cDNA. *Nucleic Acids Res* **21**(7): 1665
- Yu DS, Sonoda E, Takeda S, Huang CL, Pellegrini L, Blundell TL, Venkitaraman AR (2003) Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Mol Cell* **12**(4): 1029-1041
- Yu VP, Koehler M, Steinlein C, Schmid M, Hanakahi LA, van Gool AJ, West SC, Venkitaraman AR (2000) Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* **14**(11): 1400-1406
- Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Kharbanda S, Wang R, Sung P, Shinohara A, Weichselbaum R, Kufe D (1998) Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem* **273**(7): 3799-3802
- Yun MH, Hiom K (2009) CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* **459**(7245): 460-463
- Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS (1998) BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* **16**(13): 1713-1721
- Zhang H, Zha X, Tan Y, Hornbeck PV, Mastrangelo AJ, Alessi DR, Polakiewicz RD, Comb MJ (2002) Phosphoprotein analysis using antibodies broadly reactive against phosphorylated motifs. *J Biol Chem* **277**(42): 39379-39387
- Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F (2004) Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **24**(2): 708-718

Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ (2000) Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* **14**(8): 981-993

Zhivotovsky B, Kroemer G (2004) Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(9): 752-762

Zhu J, Wang JY (2004) Death by Abl: a matter of location. *Curr Top Dev Biol* **59**: 165-192

Zhuang J, Zhang J, Willers H, Wang H, Chung JH, van Gent DC, Hallahan DE, Powell SN, Xia F (2006) Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res* **66**(3): 1401-1408

Rad51 est la protéine centrale de la recombinaison homologue chez l'homme. Cette protéine est essentielle pour la réparation de cassures de l'ADN mais son rôle peut être détourné au profit des cellules tumorales pour résister aux radio et chimiothérapies anti-cancéreuses. Une meilleure compréhension de la régulation de Rad51 favoriserait la mise en place de traitements mieux ciblés en terme de modulation de son activité recombinase.

La phosphorylation de Rad51 par la kinase c-Abl sur deux tyrosines en position 54 (Y54) ou 315 (Y315) constitue une des voies de sa régulation mais leur rôle exact n'est pas clairement défini. Afin de mieux cerner le mécanisme et les conséquences de ces phosphorylations, nous avons élaboré des anticorps anti-phosphotyrosine spécifiques de chaque résidu phosphorylé. A l'aide de ces outils, nous avons pu confirmer l'existence de ces deux sites de phosphorylation dans des cellules surexprimant Rad51 et c-Abl. Nous avons montré que la phosphorylation de Y54 est dépendante de celle de Y315 et nous avons proposé un modèle de phosphorylation séquentielle de la protéine. Nous avons ainsi observé deux formes phosphorylées de Rad51 – une forme monophosphorylée sur Y315 et une forme diphosphorylée sur Y315 et Y54. L'étude de la localisation intracellulaire des différentes formes de Rad51 par fractionnement cellulaire suggère un rôle de la phosphorylation dans l'interaction de cette protéine avec l'ADN.

Rad51 is the central protein in homologous recombination. Its activity is crucial for the repair of DNA breaks via homologous recombination but this recombinase is over-expressed in different cancers and confers resistance to anticancer treatment. A better knowledge of the regulation mechanisms of this protein would help develop more specific and effective treatments.

One of the mechanisms of Rad51 regulation is by phosphorylation by the c-Abl tyrosine kinase on tyrosines 315 (Y315) or 54 (Y54). In spite of the importance of Rad51 phosphorylation in recombinase activity, its exact position and effect are still not clearly determined. In order to study the phosphorylation of Rad51 we purified specific anti-phosphotyrosine antibodies for each site. Using these antibodies we confirmed that both sites are phosphorylated in cells over expressing Rad51 and c-Abl and we observed an interconnection between these phosphorylation events. We therefore propose a model of sequential phosphorylation of the Rad51 protein. We showed the existence of two forms of phosphorylated Rad51 – monophosphorylated on Y315 and diphosphorylated on Y315 and Y54. The respective subcellular localizations of these forms suggest a role for the phosphorylation of Rad51 in the interaction of the protein with DNA.