

# Thèse de doctorat

**Brendan ALLIGAND**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

**École doctorale :** *Biologie-Santé*

**Discipline :** *Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie*

**Spécialité :** *Biochimie, biologie moléculaire*

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

**Soutenu le** *26 Novembre 2015*

**Thèse N° :**

## **Etude du rôle des phosphorylations de RAD51 en Y54 et en Y315 sur son fonctionnement**

### **JURY**

Rapporteurs : **Mauro MODESTI**, Directeur de Recherche, CNRS Marseille  
**Benoît CHENAIS**, Professeur Universitaire, Université du Maine

Examineurs : **Sophie BARILLE-NION**, Chargée de Recherche, INSERM Nantes  
**Pascale BERTRAND**, Directeur de Recherche, CEA Paris  
**Fabrice FLEURY**, Professeur Universitaire, Université de Nantes  
**Magali LE BRETON**, Maitre de conférences, Université de Nantes

Directeur de Thèse : **Fabrice FLEURY**, Professeur Universitaire, Université de Nantes  
Co-directeur de Thèse : **François VALLETTE**, Directeur de Recherche, INSERM Nantes  
Co-encadrant de Thèse : **Magali LE BRETON**, Maitre de conférences, Université de Nantes



*Rien n'a de sens en biologie si ce n'est à la lumière de l'évolution.*

**Theodosius Dobjansky**

*See a world in a grain of sand*

*And an heaven in a wild flower*

*Hold infinity in the palm of your hand*

*And eternity in an hour*

**William Blake**

*Ne demande jamais ton chemin à celui qui le connaît, tu risquerais de ne pas t'égarer.*

**Nahman de Bratslav**



# Remerciements

Cette thèse a été réalisée grâce à une bourse accordée par la présidence de l'Université de Nantes et par la SFR François Bonamy et je voudrais les en remercier.

Les fonds alloués pour la réalisation des travaux présentés dans ce mémoire doivent beaucoup au financement par la Ligue contre le cancer et je tenais à les remercier pour leur confiance.

Mauro Modesti et Benoît Chenais ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ce pourquoi ils ont toute ma gratitude. Je remercie également les autres membres de mon jury Sophie Barillé et Pascale Bertrand.

La réalisation de mes travaux s'est effectuée au sein du laboratoire UFIP, dont je remercie son directeur Charles Tellier. Je souhaiterais également dire mon affection à tous les membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux et les échanges cordiaux que nous avons pu avoir.

Je tiens plus spécifiquement à remercier les membres de l'équipe Réparation de l'ADN conduite par Fabrice Fleury, avec qui j'ai passé 4 bonnes années. Merci à Carine pour toutes les préparations. Merci à Cathy pour sa bonne humeur et ses blagues carambar. Merci à Pierre pour ses conseils et sa participation aux expériences d'HPLC. Merci à Houda pour sa philosophie et sa personnalité. Merci à Gweninna pour son éternel optimisme et malgré les trésors qu'elle m'a fait perdre en rangeant. Merci à Emmanuelle pour sa franchise. Merci à Dimitri. Merci à Axelle pour les conseils techniques et scientifiques. Je voulais aussi remercier les membres que j'ai pu côtoyer un peu moins longtemps : Nizar, Rodolphe, Milena, Delphine, Anaïs. Ainsi que tous les stagiaires que j'ai pu encadrer directement ou indirectement : Megan, Clara, Laura, Guillaume, Nadège, Kémy, Charlotte, Audrey, Mégane, Camille, Marion, ...

Je voudrais adresser un remerciement particulier à mes encadrants de thèse. A Fabrice toujours curieux de nouveautés et prêt à expérimenter. Je retiens ta méthode de rangement et ta bonne humeur permanente malgré les situations parfois complexes. A Magali pour ton

esprit critique et ton caractère bien trempé. Je retiens ton enthousiasme et ta rigueur scientifique. Tous les 3 nous avons passé de nombreuses heures à discuter et à préparer des présentations. Merci pour votre encadrement et tout ce que vous m'avez appris. Les relations ne furent pas toujours simples mais toujours riches en leçons pour le futur. La conception du travail présenté ici est le fruit de nos discussions. A François Vallette pour sa participation.

Un petit (grand) mot pour ceux qui ont été tout d'abord mes colocataires de bureau avant de devenir des amis. En premier lieu à Emmanuelle toute en persévérance, en conviction et en sincérité et à qui je souhaite tout le bonheur auprès de sa famille. A Denis le co-directeur du comité de la blague parti dans le froid glacé du Québec. Enfin à Florian, fin bretteur de l'ironie que j'ai vu grandir au sein du laboratoire. Nul doute que vous continuerez à apprendre et à vous amuser. J'ai passé de très bons moments avec chacun de vous.

Je ne pouvais pas ne pas dédier quelques mots à Damien. Je pourrais dire que j'ai appris à connaître un râleur au grand cœur. Ou encore que j'ai découvert un fameux mélange d'artiste et de scientifique. Si je garde autant de bons souvenirs de ces 4 années ce sera pour beaucoup grâce à toi. Les mots fléchés du midi, les purifications interminables, le beta-testing et tant d'autres... Je voulais donc simplement te dire : merci. Tu seras toujours le bienvenu chez moi.

J'ai eu la chance et l'opportunité de combiner une expérience d'enseignement à celle de recherche. Je voudrais donc remercier Thierry, fidèle lecteur d'OPC, qui a compris l'importance de mon vœux de diversité et m'a permis d'encadrer des TPs de biologie des organismes. Le bon déroulement des TP doit beaucoup à Bruno C., Priscilla, Tanguy, Anthony, Alice, Pascal, Olivier, Paul, Vincent, Nuria, Joël, Christophe, Alexandra, Odile, Hansy, Carol.

Je voudrais remercier particulièrement Bruno Jesus pour les échanges très instructifs que nous avons eus, les échanges d'opinions et de références qui ont permis d'approfondir mes connaissances naturalistes. Merci aussi pour les séances photos d'araignées sauteuses, de scorpions, de blattes. De grands moments et de belles images.

J'adresse un remerciement à Véronique Martin-Jézéquel pour son soutien et ses encouragements au cours de mon parcours universitaire.

Cette thèse a été l'occasion de construire et de déposer un projet CNRS pour une demande de financement au PEPS ExoMod. Ceci n'aurait pas été possible sans l'ouverture d'esprit de Fabrice ni sans la participation active de Bruno J., Bruno C., Priscilla et d'Alexandra. Merci à tous.

Parce que la thèse ne se passe pas qu'au laboratoire je souhaiterais adresser quelques mots à Damien O., à Bertrand, à Alexis & Emeline, à Chloé & Camille, à Rozenn & Benjamin, à Soline pour leur redire combien ont été agréables les moments que nous avons pu passer ensemble à l'occasion de repas, autour d'angiospermes divers ou de ruches populeuses.

Tout au long de ces quelques années j'ai pu compter sur ma deuxième famille. Françoise, Jean-Paul, Edith, Guillaume, Mirtha, David vous êtes toujours là. Vous vous êtes fait une place dans mon cœur.

Merci à tous les membres de ma famille toujours intéressés et attentifs à ce que je fais. A Grand-père et Manou. Aux pourmabonnais : Catherine, Elisabeth, Mamie. A Papy pour qui les mots courage et persévérance prennent tout leurs sens. A mes cousins Sophie, Kévin, Kilian, Fiona, Simon et à Soazig et Olivier.

A mes parents. Papa et Maman qui ont toujours veillé sur moi, j'ai pu compter sur votre soutien indéfectible et votre amour.

A Gwen mon petit soleil qui grandit si vite.

A mon grand frère Tanguy, à Claire et mes charmants petits neveux Titouan et Léo. J'ai l'impression que nous n'avons pas fini de rigoler.

A Gurvan, mon petit frère. Difficile de résumer en quelques mots combien ont été heureuses ces 15 années où nous ne nous sommes presque pas quittés et qui sont pour beaucoup dans ce que je suis aujourd'hui.



A ma Emma, qui m'a accompagné, soutenu, aidé à chaque instant. Ton amour m'a porté, il est la musique qui égaye mon chemin, il est le phare qui éclaire mon chemin, il est la force traçant mon chemin.

Les grandes motivations qui m'ont poussé à entreprendre cette thèse sont la progression des connaissances et l'espoir d'une vie meilleure pour chacun. J'espère qu'à une très modeste échelle ces résultats y participeront et je remercie du fond du cœur tous ceux qui ont pu m'y aider.



# Sommaire

Sommaire .....	1
Liste des Abréviations .....	8
Liste des figures .....	9
Liste des tableaux .....	11
INTRODUCTION .....	12
I. Les dommages à l'ADN et leurs voies de réparation.....	15
A- Des agents endogènes et exogènes endommagent continuellement l'ADN .....	15
1/ Les sources endogènes de dommages à l'ADN.....	15
2/ Les sources exogènes de dommages à l'ADN.....	17
B- Des dommages à l'ADN variés sont réparés par des voies spécifiques .....	18
1/ Les bases incorrectes sont réparées par la Réparation par Excision de Base (REB) .....	19
2/ Les mésappariements de bases sont réparées par la Réparation des Mésappariements (RM) .....	19
3/ Les pontages sont réparés par la Réparation par Excision de Nucléotides (REN)	19
4/ Les cassures double brin sont réparées par 2 voies principales : la Ligature Non Homologue des Extrémités (LNHE) et la Recombinaison Homologue (RH) .....	19
C- Les cassures double brin sont des défis de taille pour la cellule.....	21
1/ Le défi de la conservation de l'intégrité des chromosomes.....	21
2/ Le défi de l'absence de matrice pour la réparation sur le site de cassure.....	21
3/ Le défi des mauvaises réparations.....	21
D- Fonctionnement des principales voies de réparation des cassures double brin d'ADN .....	22
1/ Le choix entre RH et LNHE.....	22

2/ La LNHE permet une réparation simple mais non fidèle des cassures double brin. .....	23
3/ La RH permet une réparation fidèle des cassures double brin.....	25
4/ Les voies alternatives.....	27
II. RAD51 est au cœur du mécanisme de réparation par Recombinaison Homologue .....	29
A- Conservation de RAD51 au cours de l'évolution.....	29
1/ La protéine RAD51 est conservée dans tout l'arbre du vivant.....	29
2/ Les protéines de la famille RAD51 se sont diversifiées chez les Eucaryotes.....	29
3/ Transversalité des résultats obtenus chez d'autres organismes .....	32
B- La compréhension de RAD51 par sa structure tridimensionnelle .....	34
C- Les différentes étapes de l'activité intrinsèque d'échange de brins de RAD51.....	37
1/ L'interaction monomère-monomère.....	40
2/ La formation d'un nucléofilament actif entre RAD51, l'ADNsb et l'ATP .....	40
3/ La reconnaissance, la fixation de l'ADNdb homologue et l'échange de brins.....	43
III. Mécanismes connus de contrôle du fonctionnement de RAD51.....	46
A- Les conséquences d'un déséquilibre en RAD51 .....	46
1/ Un niveau trop faible de RAD51 peut conduire à la mort cellulaire ou à la carcinogénèse .....	46
2/ Une activité incontrôlée peut-elle être à l'origine de cancer ? .....	47
3/ La protection des cellules cancéreuses par la réparation des cassures double brin	47
B- Les régulations de l'expression génique de RAD51 .....	49
1/ Des régulations au niveau du promoteur de RAD51 .....	49
2/ L'épissage alternatif de RAD51 conduit à la formation de 4 isoformes de RAD51	49
C- Les régulations de RAD51 au niveau protéique .....	51
1/ Sur la localisation de RAD51.....	51
2/ Sur la stabilité de RAD51 .....	54
3/ Sur la coordination de RAD51 au sein de la RH.....	54
4/ Sur l'activité intrinsèque de RAD51 .....	56

D-	Les phosphorylations contrôlent le fonctionnement de RAD51 en réponse aux dommages à l'ADN.....	56
1/	Les sites de phosphorylation connus et leur conservation.....	56
2/	La phosphorylation en T309 par Chk1 .....	57
3/	La phosphorylation en S14 par Plk1 puis en T13 par CK2 .....	59
4/	Les résidus Y54 et Y315 de RAD51 sont phosphorylés de manière séquentielle par c-Abl.....	59
5/	Le contexte cellulaire de la phosphorylation de Y54 et Y315 par c-Abl.....	61
6/	Rôles supposés de la phosphorylation sur RAD51, la RH et la réponse aux dommages à l'ADN.....	61
	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	63
I.	Production et purification des protéines RAD51.....	64
A-	Préparation des plasmides .....	64
B-	Production et purification.....	64
II.	Mesure de Dichroïsme Circulaire.....	65
A-	Principe .....	65
B-	Conditions de mesure.....	66
III.	Test d'échange de brins.....	66
A-	Principe .....	66
B-	Conditions expérimentales .....	66
IV.	Test D-loop .....	67
A-	Principe .....	67
B-	Conditions expérimentales .....	67
V.	Fixation de l'ADNsb par Blitz .....	68
A-	Principe .....	68
B-	Conditions expérimentales .....	68
VI.	Gel retard.....	69
VII.	Hydrolyse de l'ATP.....	69
VIII.	Fixation de l'ATP .....	69

A-	Principe .....	69
B-	Conditions de mesure.....	70
IX.	Migration en conditions non-dénaturantes .....	70
X.	Chromatographie d'exclusion-diffusion .....	70
XI.	Phosphorylation <i>in vitro</i> de RAD51 par c-Abl.....	70
XII.	Pull Down.....	71
XIII.	Immunoprécipitation.....	71
XIV.	Culture cellulaire et transfection.....	71
XV.	Fractionnement cellulaire .....	72
XVI.	Immunofluorescence .....	72
XVII.	Tests MTT.....	73
XVIII.	Clonogénie.....	73
	RÉSULTATS.....	76
	Introduction générale de la partie résultat.....	78
I.	La double modification phosphomimétique de RAD51 montre un effet inhibiteur <i>in vitro</i> lié à la mauvaise formation du nucléofilament.....	78
A-	Production, purification et validation des protéines phosphomimétiques.....	79
1/	Construction de plasmides pour la production de phosphomimétiques.....	79
2/	Production et purification des variants de RAD51.....	81
3/	Vérification de la non-désorganisation de la structure.....	83
B-	La double modification phosphomimétique entraîne une perte quasi totale de l'activité d'échange de brins .....	85
1/	Le test d'échange de brins révèle un effet inhibiteur de la double modification phosphomimétique .....	85
2/	Le D-loop assay confirme la diminution d'activité de RAD51 par la double modification phosphomimétique.....	87
3/	La double mutation des résidus Y54 et Y315 sans apport de charge négative ne suffit pas à inactiver RAD51.....	89
4/	Les effets observés ne sont pas liés à un effet de lot.....	89

C-	La liaison à l'ADNsb de RAD51 est grandement réduite par la double modification phosphomimétique .....	91
1/	Validation technique de l'utilisation du Blitz pour suivre la fixation de RAD51 à l'ADNsb.....	91
2/	La liaison à l'ADNsb de RAD51 est grandement réduite par la double modification phosphomimétique .....	93
D-	La modification di-phosphomimétique prévient la polymérisation de RAD51 ....	97
1/	La mauvaise polymérisation de RAD51 pourrait être une explication pour l'absence de formation du nucléofilament.....	97
2/	La migration en conditions non-dénaturantes semble indiquer que la polymérisation est fortement diminuée par la modification di-phosphomimétique.....	97
3/	Des résultats préliminaires d'exclusion-diffusion semblent confirmer la diminution du niveau de polymérisation de la forme di-phosphomimétique .....	99
E-	La fixation et l'hydrolyse de l'ATP sont affectées par les modifications phosphomimétiques mais ne permettent pas d'expliquer la perte d'activité spécifique au di-phosphomimétique .....	101
1/	La fixation de l'ATP est diminuée par les modifications phosphomimétiques.....	101
2/	L'hydrolyse de l'ATP est diminuée par les modifications phosphomimétiques...	103
	Conclusion.....	105
II.	La phosphorylation de RAD51 par c-Abl est un mécanisme complexe .....	105
A-	L'immunoblotting révèle la phosphorylation en Y315 et sur une autre tyrosine mais pas en Y54 .....	105
2/	Les analyses prédictives indiquent le site Y191 comme probablement cible de c-Abl.....	107
3/	La phosphorylation in vitro a lieu en Y315 et Y191 mais pas en Y54.....	109
III.	Mise au point de la recherche de protéines partenaires de RAD51 .....	109
A-	Optimisation de la fixation et du relargage de RAD51 .....	111
1/	Optimisation de la fixation de RAD51 .....	111
2/	Optimisation des conditions d'éluions de RAD51 .....	111
B-	Recherche de protéines partenaires de RAD51 .....	113

1/ La technique de Pull Down permet de récupérer d'autres protéines avec RAD51 .....	113
2/ Modification de l'interaction de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques avec des protéines d'intérêt.....	113
IV. La modification Y54E change le fonctionnement cellulaire de RAD51.....	115
A- La modification Y54E favorise une localisation cytoplasmique de RAD51.....	115
1/ Par fractionnement cellulaire.....	115
2/ Par immunofluorescence.....	118
B- La stabilité de RAD51 semble peu influencée par les modifications phosphomimétiques .....	121
C- La survie cellulaire n'est pas différente selon les modifications phosphomimétiques des RAD51 transfectées.....	124
DISCUSSION.....	129
I. Sur la phosphorylation de RAD51 par c-Abl.....	130
A- Quels sont les sites phosphorylés ?.....	130
B- L'utilisation des phosphomimétiques .....	132
C- Sur l'effet des phosphorylations sur l'activité intrinsèque.....	133
1/ Inactivation de RAD51 .....	133
2/ Les étapes du fonctionnement de RAD51 affectés par les modifications phosphomimétiques .....	134
D- Hypothèse mécanistique de l'effet des phosphorylations par le contexte structurale des positions Y54 et Y315 .....	136
II. Sur l'effet des phosphorylations sur RAD51 à l'échelle cellulaire .....	138
A- La localisation cellulaire.....	138
B- La stabilité de RAD51 .....	138
C- La survie cellulaire.....	138
D- La recherche de partenaires.....	139
III. Modèle d'inactivation de RAD51 par la double phosphorylation.....	139
Bibliographie.....	141

Annexes.....	154
Annexe 1 : Fiche projet CNRS ExoMod.....	155
Annexe 2 : Participations aux congrès et production scientifique.....	162
Annexe 3 : Protocoles standardisés rédigés pour le laboratoire.....	163
Annexe 3.1 : Protocoles <i>in vitro</i> .....	163
Annexe 3.2 : Protocoles <i>in cellulo</i> .....	163

# Liste des Abréviations

- ADNdb** (dsDNA): ADN double brin
- ADNsb** (ssDNA): ADN simple brin
- BET** : Bromure d'ETHidium
- CDB** (DSB): Cassure double brin (Double Strand Break)
- CPT** : Camptothécine
- CSB** (SSB): Cassure Simple Brin (Single Strand Break)
- DNT** (NTD): Domaine N-Terminal
- DA** (DA): Domaine ATPasique
- DC** (CD): Dichroïsme Circulaire
- DRO** (ROS): Dérivés Réactifs de l'Oxygène
- EcRAD51** : RAD51 d'*Escherichia coli*
- HsRAD51** : RAD51 de *Homo sapiens*
- LNHE** (NHEJ) : Ligature Non Homologue des Extrémités
- MvRAD51** : RAD51 de *Methanococcus voltae* (Archaeobactérie)
- PfRAD51** : RAD51 de *Pyrococcus furiosus* (Archaeobactérie)
- REB** (BER): Réparation par Excision de Base
- REN** (NER): Réparation par Excision de Nucléotide
- REM** (MER): Réparation par Excision de Mésappariement
- RDA** (DDR): Réponse aux Dommages à l'ADN
- RH** (HR): Recombinaison Homologue
- SEN** (NES): Séquence d'Exclusion Nucléaire
- SLN** (NLS): Séquence de Localisation Nucléaire
- SM** : Spectrométrie de Masse
- ScRAD51** : RAD51 de *Saccharomyces cerevisiae*
- UV** : Ultra Violet

# Liste des figures

- Figure 1 : Les différents mécanismes participant à la formation et au développement des tumeurs.
- Figure 2 : Schéma des différents types de dommages pouvant survenir sur l'ADN.
- Figure 3 : Correspondance entre les différents dommages et leurs voies de réparation.
- Figure 4 : Activation de la Recombinaison Homologue par Cdk1.
- Figure 5 : Fonctionnement de la voie de la Ligature Non Homologue des Extrémités (LNHE/NHEJ).
- Figure 6 : Fonctionnement de la voie de la Recombinaison Homologue (RH).
- Figure 7 : Schématisation des différentes voies pouvant prendre en charge les cassures double brin d'ADN.
- Figure 8 : Conservation du gène codant pour les protéines de la famille RecA dans les 3 branches du vivant.
- Figure 9 : Evolution des protéines de la famille RecA/RAD51/RadA.
- Figure 10 : Transposition des résultats de RAD51 d'autres organismes à l'homme grâce à la bonne conservation de RAD51 au sein du vivant.
- Figure 11 : Modélisation du nucléofilament de 4 monomères de HsRAD51 autour de l'ADNsb en présence d'ATP
- Figure 12 : Les différents domaines de RAD51 vus à différents niveaux de structuration, primaire, secondaire et tertiaire.
- Figure 13 : Déroulement des différentes activités (->rouge) de RAD51 lors de son fonctionnement au sein de la Recombinaison Homologue
- Figure 14 : Schéma récapitulatif des différentes interactions intervenant dans l'activité intrinsèque de RAD51.
- Figure 15 : Organisation de RAD51 en solution pour différents organismes.
- Figure 16 : Equilibre et affinité d'interaction entre RAD51 et l'ADNsb et l'ADNdb
- Figure 17 : Deux modèles pour l'échange de brins homologues.
- Figure 18 : Conséquences d'un déséquilibre en RAD51.
- Figure 19 : Epissage alternatif de RAD51.
- Figure 20 : Différents mécanismes de translocations de RAD51 au noyau.
- Figure 21 : Schéma indiquant les protéines clés modulant les différentes étapes de l'activité de RAD51.
- Figure 22 : Positionnement des différents sites connus de phosphorylation de RAD51
- Figure 23 : Modèle actuellement proposé pour la phosphorylation de la T309 de RAD51 par Chk1.
- Figure 24 : Modèle actuellement proposé pour la phosphorylation séquentielle de S14 par Plk1 puis de T13 par CK2.
- Figure 25 : Schéma de la construction utilisé pour la production des His-RAD51.
- Figure 26 : Démarche de production et de purification des protéines His-tagguées.
- Figure 27 : Spectres caractéristiques des structures secondaires des protéines.
- Figure 28 : Principe de fonctionnement du test d'échange de brins.
- Figure 29 : Principe de fonctionnement du test D-loop.
- Figure 30 : Fonctionnement et utilisation du Blitz.
- Figure 31 : Structure de l'analogue de l'ATP fluorescent l'ATP-TNP (2'(3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate)
- Figure 32 : Alignement des séquences nucléotidiques des gènes codants pour les différents variants de RAD51.
- Figure 33 : Optimisation des conditions d'élution.
- Figure 34 : Analyse en SDS-PAGE des différents variants phosphomimétiques purifiés
- Figure 35 : Spectres de dichroïsme circulaire de RAD51 WT, Y54E, Y315E et Y54/315E.
- Figure 36 : La modification phosphomimétique empêche l'activité recombinase.
- Figure 37 : La modification phosphomimétique empêche la réalisation de D-loop.

- Figure 38 : La double modification Y54/315F est toujours capable de former des structures D-loop.
- Figure 39 : Les effets observés ne sont pas dus à un biais de lots.
- Figure 40 : Validation de la technique de Blitz pour suivre la fixation de RAD51 à l'ADNsb
- Figure 41 : La modification di-phosphomimétique entraîne une très forte diminution de la fixation à l'ADNsb.
- Figure 42 : Aucune différence significative de fixation à l'ADNsb n'est observée en EMSA selon les modifications phosphomimétiques.
- Figure 43 : L'absence de polymérisation en blitz conduit à une réduction très importante du signal.
- Figure 44 : Le niveau de polymérisation du variant di-phosphomimétique semble moins important en gel non-dénaturant.
- Figure 45 : La forme Y54/315E semble moins bien répondre à BRC4 en HPLC.
- Figure 46 : Les modifications phosphomimétiques diminuent la fixation de l'ATP par RAD51.
- Figure 47 : La fixation de l'ATP permet de fixer plus de RAD51 sur l'ADNsb.
- Figure 48 : L'hydrolyse de l'ATP est très fortement diminuée par les modifications phosphomimétiques.
- Figure 49 : Phosphorylation de RAD51 *in vitro* par c-Abl.
- Figure 50 : La phosphorylation *in vitro* de RAD51 montre l'existence d'une phosphorylation sur un site différent de Y54 et Y315.
- Figure 51 : Recherche prédictive de sites de phosphorylation par c-Abl.
- Figure 52 : Analyse des sites de phosphorylation de RAD51 par c-Abl en spectrométrie de masse.
- Figure 53 : Optimisation de la quantité de RAD51 fixée par les billes de Pull Down.
- Figure 54 : Optimisation de l'élué de RAD51 des billes de Pull Down.
- Figure 55 : Récupération par Pull Down d'une protéine partenaire potentielle spécifique à RAD51 Y315E.
- Figure 56 : Recherche d'interaction de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques avec des partenaires spécifiques par Immunoprécipitation suivi d'un western blot.
- Figure 57 : La modification Y54E entraîne une localisation cytoplasmique de RAD51 en fractionnement cellulaire.
- Figure 58 : Caractérisation de la localisation cellulaire de RAD51 WT par immunofluorescence.
- Figure 59 : Comparaison de la localisation cellulaire et de l'organisation intranucléaire de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques.
- Figure 60 : Quantités de RAD51 exprimées selon les modifications phosphomimétiques.
- Figure 61 : Cinétique d'expression des variants phosphomimétiques après transfection.
- Figure 62 : Pas de différences significatives de survie en clonogénie selon les modifications phosphomimétiques.
- Figure 63 : Equilibre de phosphorylation de RAD51 par c-Abl.
- Figure 64 : Comparaison de la structure des différents acides aminés impliqués pour mimer ou empêcher la phosphorylation.
- Figure 65 : Schéma bilan de la transposition de nos résultats au modèle de phosphorylation séquentielle.
- Figure 67 : Position de Y54 à l'interface entre domaine N-terminal et domaine ATPase.
- Figure 68 : Position de Y315 entre la boucle L2 de fixation de l'ADN et la boucle de la poche de fixation de l'ATP.
- Figure 69 : Modèle d'inactivation de RAD51 par la double phosphorylation en Y54 et Y315.

# Liste des tableaux

**Tableau I : Tableau de correspondance des formes phosphorylées et des variants phosphomimétiques équivalents et de leurs noms.**

**Tableau II : Variations des paramètres de dialyse pour éviter la précipitation de RAD51.**

**Tableau III : Tableau bilan des activités de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques.**

**Première partie :**  
**INTRODUCTION**

Tous les systèmes biologiques sont assimilables à des systèmes thermodynamiques ouverts traversés par un flux d'énergie qui les rend vivants, mais qui s'accompagne d'une entropie qui tend à désorganiser et à détruire. C'est pour cela que les organismes vivants sont en perpétuelle reconstruction. En particulier, l'ADN est la cible de nombreux dommages, alors qu'il est sans doute le plus précieux de tous les composants de la cellule.

Une cellule en conditions normales subit environ 10 000 lésions par jour dans son ADN (**Lindahl, 1993**). Ces dommages peuvent aussi bien être dus à des facteurs environnementaux qu'être une conséquence du métabolisme cellulaire. Les organismes ont développé un panel de mécanismes de réparation au cours de l'évolution, qui permet une maintenance de l'intégrité du génome.

Malgré ces systèmes de réparation efficaces, certains dommages subsistent dans le génome. La modification de gènes clefs impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération ou la réparation de l'ADN peut déclencher le développement de cancers. C'est pourquoi les maladies génétiques liées à des défauts de protéines de la réparation ont souvent pour conséquence la prédisposition aux cancers.

En tant que protéine majeure de la réparation, la protéine RAD51 fait partie des gardiens du génome. Mais elle possède aussi ce qui a été appelé son côté sombre. En effet, la surexpression de RAD51 a été observée dans de très nombreux cancers. L'activité importante de RAD51 permet aux cellules cancéreuses de résister aux cassures double brin induites par radio ou par chimiothérapie.

La compréhension de la régulation de RAD51 améliorerait notre connaissance de la façon dont se déroule la réponse aux dommages à l'ADN. De plus, les informations acquises sur le mécanisme de fonctionnement de RAD51 aideront sûrement à la conception d'inhibiteurs. Ce qui est un élément prometteur pour potentialiser les traitements anticancéreux.

L'étude de la régulation de RAD51 a révélé que, lors de la réponse aux dommages à l'ADN, RAD51 est phosphorylée sur Y54 et Y315 par c-Abl. Toutefois, le rôle de cette double phosphorylation n'est pas précisément connu.

Notre problématique est de comprendre quels sont les effets des phosphorylations de Y315 et de Y54 sur le fonctionnement de RAD51.

Dans une première partie, nous ferons le point sur les voies de réparation de l'ADN. Puis nous nous attarderons sur les cassures double brin d'ADN et leurs voies de réparation. Cette description permettra de souligner la place primordiale de RAD51 dans le mécanisme

de réparation. Nous présenterons alors RAD51 à travers sa séquence, sa structure et le détail de son activité. Nous terminerons cette introduction par les mécanismes de régulation de RAD51 en insistant sur les effets des phosphorylations connues de RAD51.

Dans une seconde partie, nous développerons les matériels et méthodes qui ont été utilisés pour réaliser les expériences.

Dans une troisième partie, nous présenterons les expériences menées pour répondre à notre problématique. Tout d'abord, par une série de tests *in vitro* visant à déterminer le rôle des phosphorylations sur l'activité intrinsèque de RAD51. Ceci nous amènera à détailler chacune des étapes qui participent au mécanisme de RAD51. Par la suite, nous développerons les essais réalisés pour phosphoryler RAD51 par c-Abl. Puis, nous présenterons la recherche de partenaires de RAD51 selon le niveau de phosphorylation. Enfin, nous tâcherons de présenter les bases d'un travail mené *in cellulo* pour comprendre les effets des phosphorylations sur la localisation et la stabilité de RAD51. Ainsi que des résultats préliminaires sur les impacts possibles des phosphorylations sur la survie cellulaire et les partenaires de RAD51.

Dans une quatrième partie, nous résumerons les résultats obtenus et nous les discuterons. Ce qui permettra d'aborder la suite à donner à ce travail.

## I. Les dommages à l'ADN et leurs voies de réparation

Les dommages survenant dans une zone active de l'ADN d'une cellule risquent d'altérer son fonctionnement. Ce processus peut rendre la cellule inactive, la conduire à la mort cellulaire ou induire le développement de cancers. Le processus de carcinogénèse résulte de l'altération de la séquence ou du niveau d'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans des processus clés, tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération ou la réparation de l'ADN (**Figure 1**). La réparation correcte de l'ADN est donc essentielle pour prévenir la modification de ces gènes clés et la survenue de cancers (**Bartkova et al, 2005**).

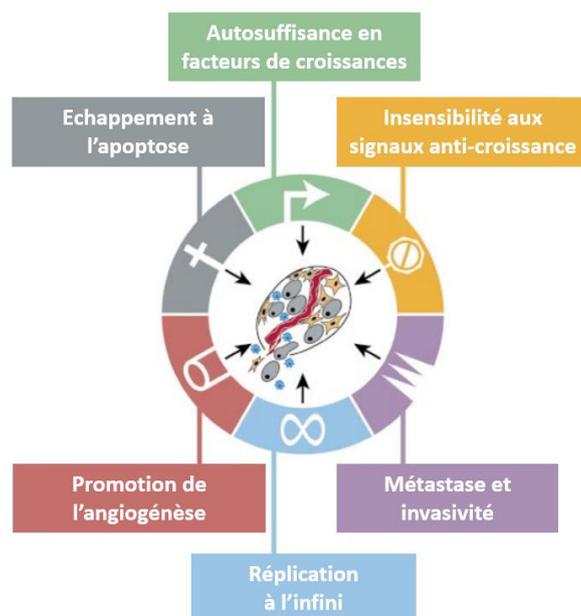
Dans cette partie, nous décrirons d'abord la diversité des agents endommageant l'ADN. Ceci nous amènera à décrire les différents types de dommages et quelles voies spécifiques leurs sont dévolues. Puis, nous nous attarderons sur les cassures double brin d'ADN, afin de souligner les défis qu'elles posent pour la cellule. Ces défis sont relevés par différentes voies de réparation que nous présenterons de manière générale. Nous discuterons rapidement de la manière dont s'opère le choix entre elles.

### A- Des agents endogènes et exogènes endommagent continuellement l'ADN

#### *1/ Les sources endogènes de dommages à l'ADN*

À l'intérieur de la cellule, l'ADN peut subir des lésions au cours du déroulement des processus de réplication et de transcription et également par l'action de molécules issues du métabolisme.

Le niveau de transcription d'une portion d'ADN est directement corrélé avec la quantité de dommages qu'elle subit. En effet, ce sont les zones des gènes les plus transcrits qui possèdent le taux de mutation le plus important (**Kim et al, 2007 ; Datta & Jinks-Robertson, 1995**). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de ces altérations. Cela peut être lié en premier lieu à un dysfonctionnement lors des ouvertures, fermetures, et torsions d'ADN. Un autre phénomène à l'origine de ces dommages est la formation d'hybrides ADN-ARN (R-loops) entre l'ARN néosynthétisé et l'ADN transcrit. Ces structures sont reconnues par les endonucléases XPF et XPG qui coupent aux extrémités (**Sollier & Cimprich, 2015**). Ces coupures aboutissent à des cassures simples ou doubles brins d'ADN (**Hamperl & Cimprich, 2014**).



**Figure 1 : Les différents mécanismes participant à la formation et au développement des tumeurs.**

La carcinogénèse demande l'altération de plusieurs systèmes distincts contribuant à limiter l'expansion incontrôlée des cellules. Le plus souvent une instabilité génétique est responsable de la modification conjointe de plusieurs des gènes impliqués dans la carcinogénèse.

Modifié d'après Hanahan & Weinberg, 2000

La réplication de l'ADN est aussi source de dommages dans l'ADN. Le premier type de défaut concerne les mésappariements. Les polymérases sont en charge de la copie intégrale du génome soit la duplication de quelques 3,4 milliards de bases chez l'homme. Malgré un système d'édition performant, elles font environ 1 erreur toutes les  $10^5$  à  $10^6$  bases *in vivo* (St Charles et al, 2015 ; Skoneczna et al, 2015). Le deuxième type de défaut à l'origine de dommages est lié aux blocages de la fourche de réplication. S'ils perdurent alors cela conduit à la formation de cassures (Hyrien, 2000). Ces blocages résultent souvent d'une structuration locale de l'ADN tel que des quadruplexes G ou autres structures secondaires (Wickramasinghe et al, 2015 ; Kregten & Tijsterman, 2014), mais parfois cela peut aussi être dû à un mauvais fonctionnement des topoisomérases (Jackson & Bartek, 2009) ou encore un conflit avec une fourche de transcription (Brambati et al, 2015).

Outre ces processus, d'autres mécanismes sont suspectés d'induire des dommages. C'est le cas des éléments génétiques mobiles qui pourraient lors de leur excision ou de leur insertion endommager l'ADN. Toutefois, l'implication dans la création de dommages n'a pas été clairement établie (Cardelli & Marchegiani, 2013).

Une source totalement différente de dommages endogènes est la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Ces molécules sont des métabolites secondaires produits lors du catabolisme oxydatif. Les principaux DRO formés sont le radical hydroxyle HO• et l'ion superoxyde O<sub>2</sub>• (Fraga et al, 1990). Ces radicaux très réactifs peuvent attaquer directement l'ADN entraînant des modifications de bases ou la création de pontages (Cooke et al, 2003).

## *2/ Les sources exogènes de dommages à l'ADN*

Les atteintes exogènes à l'ADN sont de deux ordres : chimique et physique.

Les rayonnements solaires peuvent atteindre l'ADN, en particulier celui des cellules superficielles de l'organisme. Les dommages induits sont surtout dépendants de l'énergie de ces rayonnements et donc de leur longueur d'onde ( $E=h/\lambda$ ). Par exemple, les rayonnements UltraViolets (UV) qui possèdent une longueur d'onde courte sont assez énergétiques. Leur action sur l'ADN conduit à la formation de ponts entre deux thymines adjacentes, ce qui modifie localement la structure de l'ADN (Douki et al, 2000).

Les émissions radioactives peuvent endommager l'ADN. La dangerosité pour l'ADN varie selon le type de radioactivité et la distance de la source. Ces radiations sont présentes de manière naturelle dans notre environnement, en lien avec l'histoire de la Terre et de ses minéraux. Dans certaines conditions elles peuvent être localement plus importantes, comme dans les maisons granitiques bretonnes (Jackson & Bartek, 2009) ou dans certains sites

géologiques tels que l'ancien réacteur naturel d'Oklo au Gabon (**Cassas et al, 2004**). Mais c'est surtout l'utilisation faite par l'homme de cette énergie qui entraîne des concentrations et des risques d'exposition importants. Les conséquences d'une telle exposition sont l'apparition d'un nombre important de cancers comme l'ont illustré les accidents de Tchernobyl en 1986 et de Fukushima en 2011 (**Ogrodnik et al, 2013**).

Certaines molécules présentes dans l'environnement ou dans l'alimentation peuvent pénétrer dans les cellules et y libèrent des DRO. Ces molécules ont un effet analogue aux DRO issus de la respiration cellulaire. D'autres molécules possèdent une affinité particulière pour l'ADN lui-même ou pour certaines enzymes agissant sur l'ADN. Leur fixation peut alors déboucher sur des erreurs lors de la réplication ou sur des cassures par blocage de la fourche de réplication. C'est typiquement le cas du cisplatine. Cette molécule anticancéreuse réagit de manière covalente avec les bases puriques (A et G). Ceci conduit à la formation de liaisons intra ou inter-brins, bloquant ainsi les processus de réplication et de transcription (**Dasari & Tchounwou, 2014**). Un autre exemple est la camptothécine (CPT) qui bloque l'avancée des fourches de réplication en inhibant la Topoisomérase I. Ceci aboutit à la formation de cassures simples ou doubles brins d'ADN. Ces molécules ne sont pas uniquement issues de la synthèse. La CPT est présente naturellement dans un arbre d'Asie le *Camptotheca acuminata* dont les feuilles entraînent dans la pharmacopée chinoise (**Lin et al, 2014**).

## **B- Des dommages à l'ADN variés sont réparés par des voies spécifiques**

Les altérations de l'ADN peuvent être de nature très diverses (**Figure 2**) et avoir des conséquences plus ou moins importantes sur la cellule. La survenue d'un dommage déclenche des cascades de réactions comprenant une suite logique d'activations et d'inactivations de protéines. Pour les voies les plus simples une seule protéine détecte le dommage et le répare comme c'est le cas pour la O<sup>6</sup>-alkylguanine DNA alkyltransférase ou MGMT (**Short et al, 2011**). Pour la plupart, il s'agit de la coordination dans le temps et dans l'espace de nombreuses protéines qui interviennent à différentes étapes tels que la détection, le recrutement, la préparation, la réparation et enfin la résolution. Les principales voies, ainsi que les dommages qu'elles réparent, sont présentés ci-dessous (**Figure 3**).

*1/ Les bases incorrectes sont réparées par la Réparation par Excision de Base (REB)*

Certaines bases azotées de l'ADN sont modifiées par alkylation, oxydation ou déamination. Ces bases sont alors reconnues par des ADN glycosylases qui retirent la base modifiée, créant un site apurique ou apyrimidique. La REB se déroule alors en 3 étapes. Un clivage du site sans base. Puis une polymérase ajoute la base manquante par complémentarité avec le brin intact. Enfin une ligase permet la ligation du brin réparé (**Robertson et al, 2009**).

*2/ Les mésappariements de bases sont réparés par la Réparation des Mésappariements (RM)*

Comme nous l'avons indiqué la duplication du génome s'accompagne de mésappariements. La voie de la RM prend en charge ces mésappariements lors de la réplication. hMutS permet la reconnaissance du mésappariement. Sa fixation s'accompagne de hMutL qui recrute différentes protéines sur le site. Notamment l'exonucléase ExoI qui libère une zone d'ADNsb autour de la zone de cassure. Finalement la réparation se conclut par la néopolymérisation et la ligation du brin réparé (**Li, 2008**).

*3/ Les pontages sont réparés par la Réparation par Excision de Nucléotides (REN)*

Les pontages chimiques lient de manière covalente deux bases entre elles. C'est le cas des doublets de thymines formés après exposition aux UV ou aux pontages générés par le cisplatine. La reconnaissance des dommages fait intervenir la protéine XPC. Celle-ci recrute TFIIH dont le rôle est l'ouverture de l'ADN. L'action successive de ERCC1 puis de XPG permet l'excision d'une large zone de 20-30 nucléotides autour de la zone de cassure. La séquence est reconstituée par les polymérases selon la complémentarité avec le brin intact (**Marteijn et al, 2014**).

*4/ Les cassures double brin sont réparées par 2 voies principales : la Ligature Non Homologue des Extrémités (LNHE) et la Recombinaison Homologue (RH)*

Les cassures double brin impliquent la rupture de la chaîne de nucléotides pour les deux brins de l'ADN. Ces cassures peuvent être prises en charge par plusieurs voies dont les deux principales sont la RH et la LNHE. Nous détaillerons par la suite leur fonctionnement.

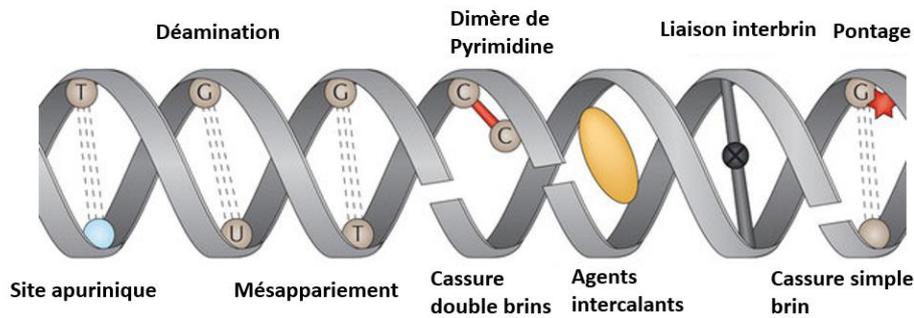


Figure 2 : Schéma des différents types de dommages pouvant survenir sur l'ADN. Modifié d'après Helleday et al, 2014

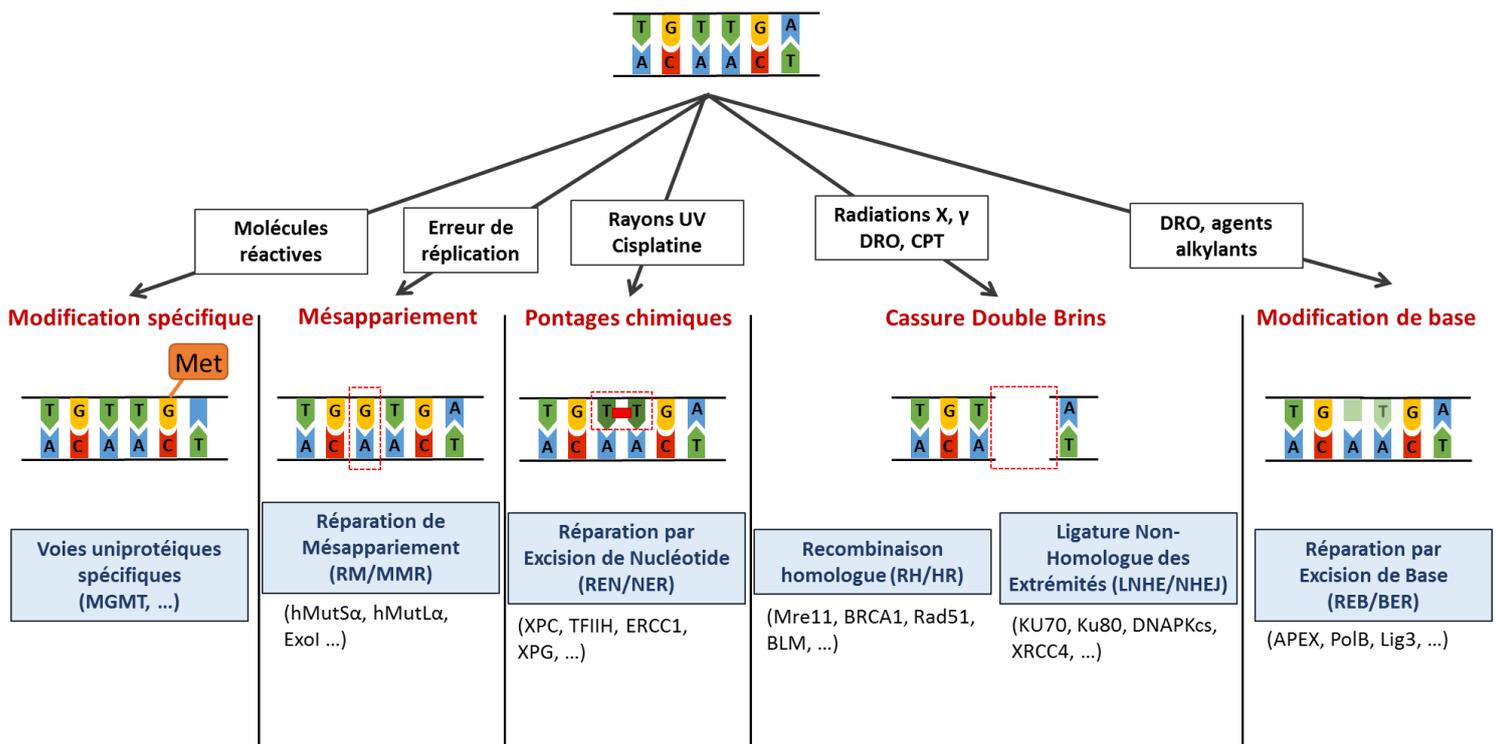


Figure 3 : Correspondance entre les différents dommages et leurs voies de réparation.

En haut la séquence avant dommage est présentée. Les flèches portent des encadrés à fond blanc indiquant les différentes sources de dommages. Elles pointent vers les types de dommages générés, écrits en rouge. Sous chaque nom de dommage une séquence endommagée modèle est présentée. Les encadrés bleus indiquent les voies de réparation utilisées pour chaque type de dommage.

### **C- Les cassures double brin sont des défis de taille pour la cellule**

Les cassures double brin sont parmi tous les dommages ceux qui présentent le plus de risques pour la cellule (**Grabarz et al, 2012**). En effet, elles menacent l'intégrité même des chromosomes et elles doivent absolument aboutir soit à leur réparation, soit à la mort cellulaire. De plus, le mécanisme de réparation des cassures double brin présente un niveau de complexité supplémentaire par rapport à celui des cassures simple brin. Enfin, certaines réparations mal effectuées peuvent également avoir de graves conséquences sur le fonctionnement de la cellule.

#### *1/ Le défi de la conservation de l'intégrité des chromosomes*

Les chromosomes sont des structures organisées avec des extrémités protégées par des télomères et une zone de fixation pour le fuseau mitotique. La cassure double brin abolit cette organisation. Si les deux fragments issus de la coupure ne sont pas réunis, alors la ségrégation des chromosomes ne pourra pas être correcte lors de la mitose. De plus, au niveau des extrémités non protégées les pertes de séquences peuvent être très importantes.

#### *2/ Le défi de l'absence de matrice pour la réparation sur le site de cassure*

Pour la plupart des dommages à l'ADN évoqués dans la partie I, les mécanismes présentent une similitude. En effet, la zone contenant une base modifiée ou altérée est excisée ce qui libère une zone d'ADNsb. Il est alors aisé de reproduire la séquence originelle à partir de la complémentarité des bases. C'est ce qui permet, dans la très grande majorité des cas, d'avoir une réparation fidèle. Dans le cas des cassures double brin aucune séquence matrice n'est disponible sur place.

#### *3/ Le défi des mauvaises réparations*

La réparation des cassures double brin ne signifie pas la restauration de l'état initial avant la cassure. Un fonctionnement normal des voies de réparation des CDB peut amener à certaines insertions ou délétions de bases. Dans le cas d'un fonctionnement anormal, les réparations aberrantes représentent un risque important de dysfonctionnement cellulaire car elles peuvent conduire à des translocations de morceaux de chromosomes, des aneuploïdies

ou des pertes de fragments de chromosomes qui sont très souvent liées à la carcinogénèse (**Hoeijmakers, 2001**). Dans le cas des translocations leur nocivité est due à une modification profonde du niveau d'expression de nombreux gènes parmi lesquels on peut trouver des pro ou anti oncogènes. Par exemple, la leucémie à BCR-Abl trouve son origine dans la translocation  $t(9;22)(q34;q11)$  formant un gène de fusion BCR-Abl qui produit une kinase active oncogénique (**Lamontanara et al, 2013**).

#### **D- Fonctionnement des principales voies de réparation des cassures double brin d'ADN**

La réparation des CDB est assurée par deux principales voies de réparation la Recombinaison Homologue (RH) et la Ligature Non-Homologue des Extrémités (LNHE). La coexistence des deux voies nécessite la mise en place de système de régulation. Ce choix permet à chacune d'entre elle d'être active au moment du cycle cellulaire où elle est le plus efficace (**Kass & Jasin, 2010**). Nous verrons que ceci est lié à leur mécanisme de réparation.

##### *1/ Le choix entre RH et LNHE*

Le choix de la voie de réparation se fait très tôt dans la réponse aux dommages à l'ADN, lors de la phase de signalisation. Cette première étape faisant immédiatement suite à la survenue d'un dommage est un processus complexe. Il fait intervenir des modifications d'histones telles que la phosphorylation de H2ACX en  $\gamma$ -H2AX et l'activation de kinases, principalement : ATM et ATR. La phosphorylation de cibles particulières va permettre le recrutement de protéines. 53BP1 et CtIP sont parmi les premières protéines sur le site de cassure et déterminent quelle voie est activée. Si 53BP1 est présente, alors elle dirige la réparation vers la LNHE (**Bunting et al, 2010**). Au contraire, si CtIP est recrutée, alors la réparation s'oriente vers la RH (**Eid et al, 2010**).

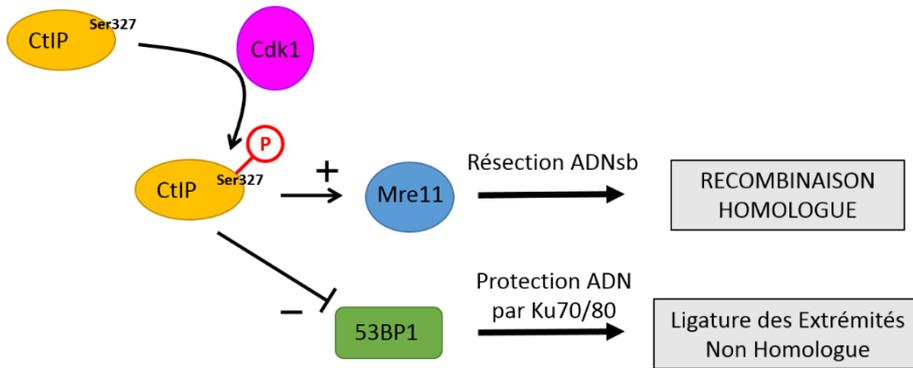
La voie de la RH est principalement active lors des phases S et G2 du cycle cellulaire (**Takata et al, 1998**) pendant lesquelles l'ADN est le plus vulnérable (**Jackson & Bartek, 2009**). Lors des autres phases G1, et M la voie de la LNHE serait majoritairement utilisée par la cellule pour prendre en charge les CDB. Ce contrôle semble s'exercer par plusieurs mécanismes avec, d'une part des modifications d'histones (**Stewart, 2009**), et d'autre part la phosphorylation de CtIP sur la Ser327 par Cdk1 en phase S et G2 (**Yu & Chen, 2004**). Cette phosphorylation induit le recrutement du complexe MRN sur le site de cassure (**Chen et al,**

**2008**) ce qui déclenche la résection de l'ADN et initie donc la voie de la Recombinaison Homologue. Dans le même temps, la phosphorylation de CtIP permet de déplacer 53BP1 et d'inactiver ainsi la LNHE (**Bunting et al, 2010**).

*2/ La LNHE permet une réparation simple mais non fidèle des cassures double brin*

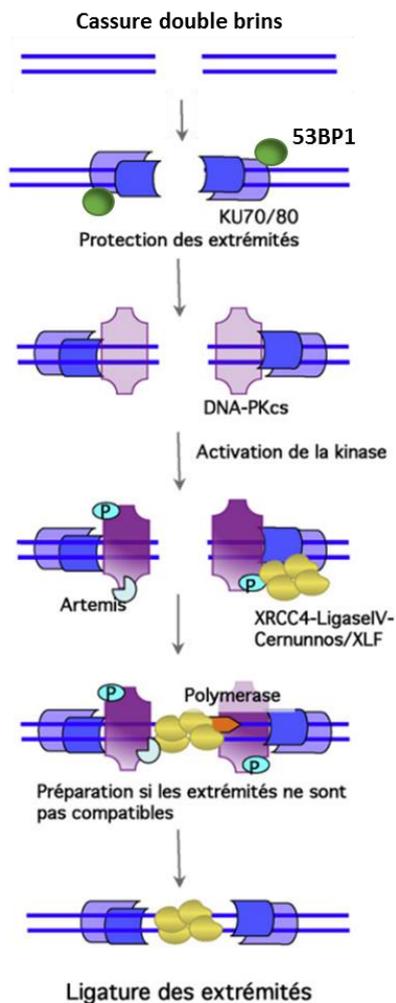
La LNHE permet la réparation des CDB mais le mécanisme de réparation ne garantit pas une restauration de l'état initial avant cassure. En effet, la LNHE s'accompagne de délétions de 0 à 14pb ou d'insertions (**Lieber, 2010**).

La première étape est la reconnaissance et la protection des extrémités par des hétérodimères Ku70-Ku80. Rapidement la kinase DNPkcs est recrutée et sert de plateforme de recrutement pour les autres protéines du complexe LNHE. Le rapprochement des deux extrémités est permis par l'action conjuguée des hétérodimères de Ku70-Ku80 et des filaments d'XRCC4-XLF (**Andres et al, 2012**). Par la suite, les extrémités subissent l'action de nucléases telles Artemis, d'hélicases comme WRN et de polymérases telles Polμ. Ces enzymes permettent de générer des extrémités franches. La finalisation de la cassure est réalisée par la DNA-Ligase IV qui ligature les deux extrémités (**Davis & Chen, 2013**). Les différentes étapes sont récapitulées sur la **Figure 5**.



**Figure 4 : Activation de la Recombinaison Homologue par Cdk1.**

La phosphorylation de CtIP par Cdk1 sur la Ser327 permet le recrutement du complexe RMN et promeut la RH et inhibe l'arrivée de 53BP1 ce qui empêche la LNHE de débiter.



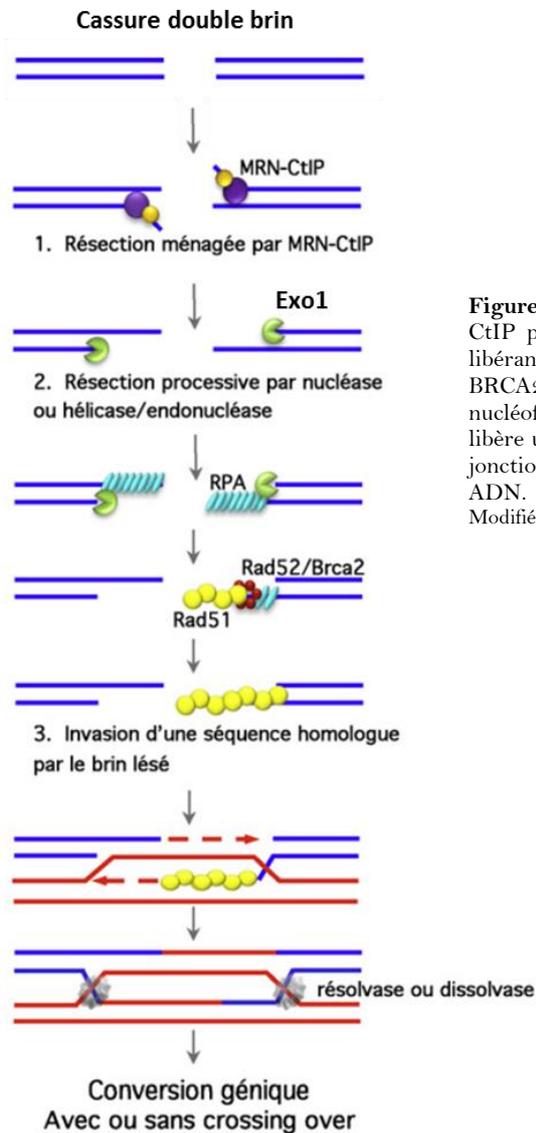
**Figure 5 : Fonctionnement de la voie de la Ligature Non Homologue des Extrémités (LNHE/NHEJ).**

53BP1 facilite le recrutement de l'hétérodimère Ku70-Ku80 protégeant les extrémités. Puis DNPKcs est recruté et permet l'arrimage des autres protéines. XRCC4 XLF maintiennent les extrémités à proximité. Artemis, Polμ et WRN traitent les extrémités. Celles-ci peuvent enfin être liguées par la DNA Ligase IV. Modifié d'après Rass et al, 2011

### *3/ La RH permet une réparation fidèle des cassures double brin*

La réparation par la Recombinaison Homologue lors des phases S et G2 permet d'assurer une réparation fidèle des CDB. Le mécanisme repose sur l'apport d'une séquence homologue sur le site de cassure servant de matrice pour la réparation (**Figure 6**).

Les premiers acteurs effectifs de la voie de la RH sont les protéines du complexe MRN : Mre11, Rad50 et NBS1 (**Stracker & Petrini, 2011**). Ils vont permettre la résection des extrémités 3' pour libérer des fragments d'ADNsb 5' sortantes au niveau des extrémités de cassures double brin. Ce faisant ils créent un point d'ancrage pour RPA. RPA tient un double rôle de protection de l'ADNsb et d'arrimage pour de nouvelles protéines. Notamment les paralogues de RAD51, les protéines Rad52 et BRCA2 qui à leur tour permettent le recrutement de RAD51 sur l'ADNsb en remplacement de RPA (**Sugiyama et al, 2009**). RAD51 s'oligomérisent autour de l'ADNsb pour former un nucléofilament qui possède la capacité de rechercher une séquence homologue à celle de l'ADNsb. Une fois cette séquence trouvée, RAD51 catalyse l'invasion de l'ADNdb homologue par l'ADNsb du site de cassure. Cet échange de brins se traduit par la libération d'un ADNsb intact et homologue au site de cassure. Cet ADNsb homologue sert de matrice à des polymérases pour reconstituer l'ADN du site de cassure. Les polymérases peuvent désormais réparer en s'appuyant sur le brin matrice disponible. La résolution des ADN entrecroisés au niveau des jonctions dites de Holliday demande l'intervention d'hélicases telles que BLM. Les possibilités de résolution sont diverses et peuvent résulter en cross-over ou non selon la manière dont sont réarrangées les brins (**Jasin & Rothstein, 2015**).



**Figure 6 : Fonctionnement de la voie de la Recombinaison Homologue (RH).**

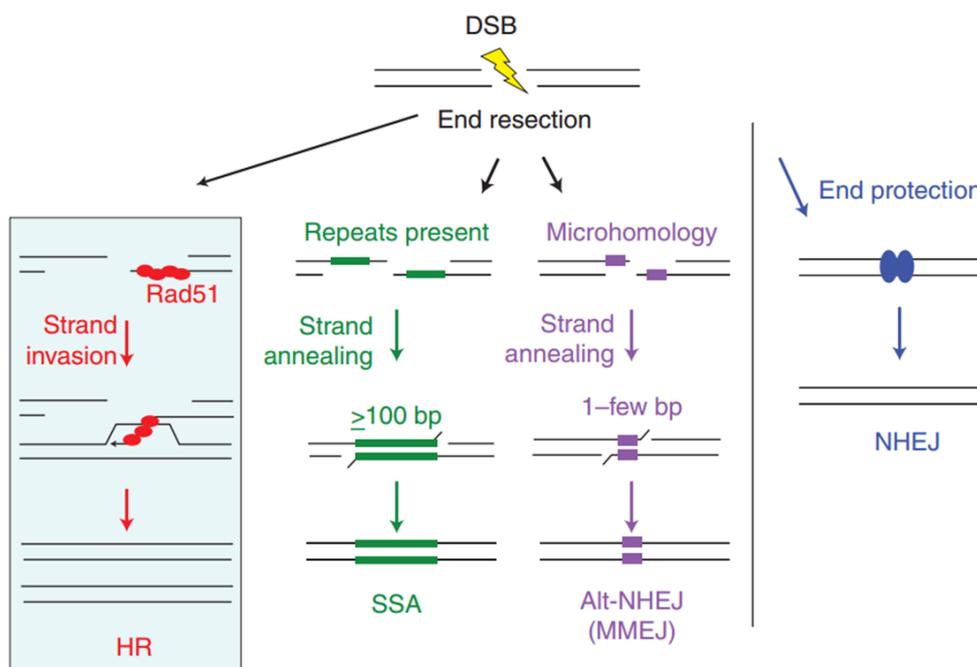
CtIP permet le recrutement du complexe MRN. Avec ExoI ils réalisent la résection libérant des fragments d'ADNsb. Ces extrémités sont protégées par RPA. Puis Rad52 et BRCA2 permettent le recrutement de RAD51 sur l'ADN à la place de RPA. Le nucléofilament ADNsb-RAD51 envahit une séquence homologue. Cet échange de brin libère un ADNsb intact qui sert de matrice pour la réparation sur le site de cassure. Les jonctions d'ADN créées sont résolues par des hélicases et résolvases pour séparer les ADN.

Modifié d'après Rass et al, 2011

*4/ Les voies alternatives*

Outre les deux grandes voies de réparation, il existe un certain nombre de voies secondaires (**Mehta et Haber, 2014**) dont l'importance reste encore à préciser. Les deux alternatives principales sont la Single Strand Annealing (SSA) et la voie alternative de la LNHE (A-NHEJ). Ces deux voies sont dépendantes de la présence d'homologies de part et d'autre du site de cassure (**Jasin et Rothstein, 2015**). La résection des sites de cassures libère des ADNsb. La présence d'homologies permet l'appariement de ces ADNsb (**Figure 7**). Dans le cas de la SSA il s'agit de grandes zones d'homologies qui sont traitées par certaines protéines de la RH (**Frankenberg-Schwager et al, 2009**). Dans le cas de la A-NHEJ il s'agit de microhomologies qui sont traitées par certaines protéines de la LNHE (**Rass et al, 2015**). Dans les deux cas la réparation s'accompagne d'une perte de séquence car la zone comprise entre les homologies est perdue (**Lin et al, 1984**).

**Nous avons vu que les dommages à l'ADN peuvent mettre en péril le bon fonctionnement de la cellule et la survie de l'organisme. L'homéostasie cellulaire est maintenue grâce à la prise en charge des lésions par des voies spécifiques. Parmi ces dommages, les plus délétères sont les cassures double brin. Ces cassures sont traitées par deux voies de réparation principales la LNHE et la RH ainsi que quelques voies alternatives. Au sein de ces systèmes de réparation seule la voie de la RH permet une réparation fidèle grâce à l'activité clef d'échange de brins homologues de la protéine RAD51.**



**Figure 7 : Schématisation des différentes voies pouvant prendre en charge les cassures double brin d'ADN.**

Les deux grandes voies de prises en charge des cassures double brin d'ADN sont la RH à gauche et la LNHE (NHEJ) à droite. La présence d'homologies de grandes tailles peut conduire à une voie proche de la HR la SSA où RAD51 n'intervient pas. En présence de microhomologies une voie proche de la LNHE intervient : la Alt-NHEJ. Jasin et Rothstein, 2015

## II. RAD51 est au cœur du mécanisme de réparation par Recombinaison Homologue

Dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps la protéine RAD51 et sa conservation tout au long de l'arbre du vivant depuis ses trois racines les plus anciennes. Nous verrons comment cette conservation permet de mieux comprendre l'organisation de sa structure. Enfin nous tâcherons de comprendre le déroulement de l'activité d'échange de brins homologues. Pour cela les différentes interactions et étapes de son fonctionnement seront détaillées successivement.

### A- Conservation de RAD51 au cours de l'évolution

#### *1/ La protéine RAD51 est conservée dans tout l'arbre du vivant*

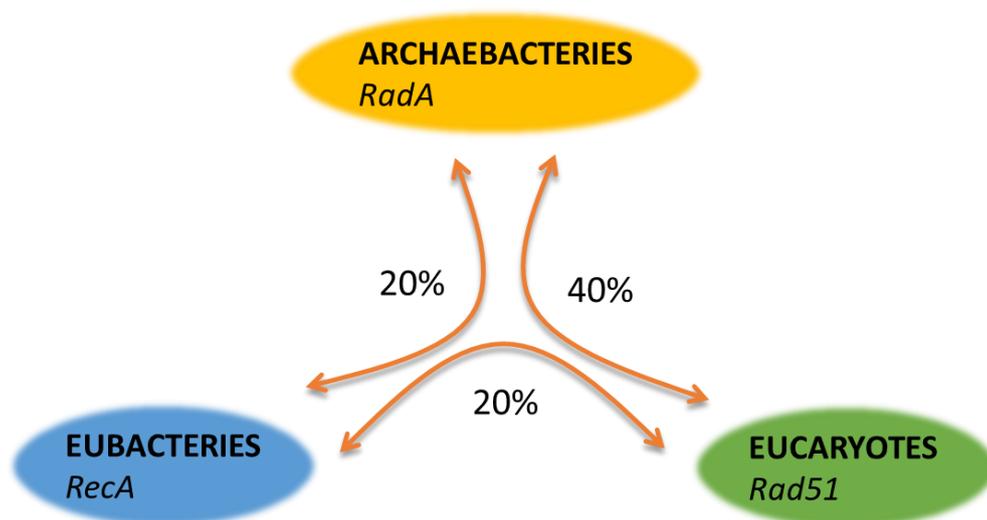
Nous avons vu l'importance du rôle de RAD51 dans la maintenance du génome. Ceci se reflète parfaitement par son haut niveau de conservation dans l'arbre du vivant (**Chintapalli et al, 2013**). Le gène codant pour la protéine RAD51 est conservé dans les 3 règnes du vivant que sont les Eucaryotes, les Eubactéries et les Archaeobactéries (**Figure 8**). La protéine RecA a été la première décrite et a donné son nom à cette famille de protéines. La famille RecA comprend donc RecA chez les Eubactéries, RadA chez les Archaeobactéries et RAD51 chez les Eucaryotes.

L'homologie entre les protéines est assez forte puisque RAD51 partage 20% d'homologie environ avec RecA et jusqu'à 40% avec RadA. Sachant que la divergence Eucaryotes/Eubactéries est estimée à 2,5 milliards d'années (**Gu, 1997**) ces pourcentages révèlent la pression de sélection importante qui s'exerce sur ce gène.

La séquence protéique de RAD51 est extrêmement bien conservée au sein des métazoaires. La RAD51 humaine (HsRAD51) partage 85% d'homologie avec la Rad51 de l'oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*), 95% avec celle du xénope (*Xenopus laevis*), ou plus proche 99% avec celle de souris (*Mus musculus*).

#### *2/ Les protéines de la famille RAD51 se sont diversifiées chez les Eucaryotes*

Outre les protéines homologues à RAD51, c'est-à-dire ayant à la fois un lien évolutif et une concordance de fonction, d'autres protéines appartiennent à la famille de RAD51. Chez



**Figure 8 : Conservation du gène codant pour les protéines de la famille RecA dans les 3 branches du vivant.**

Les % indiqués correspondent aux pourcentages d'homologies des protéines. RecA chez les Eubactéries ; RadA chez les Archéobactéries ; RAD51 chez les Eucaryotes.

l'homme par exemple on retrouve 6 autres protéines : Dmc1, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3. Les phénomènes à l'origine de ces protéines sont des duplications du gène ancestral. Différentes études de séquences permettent de reconstituer l'historique des duplications (**Lin et al, 2006 ; Chintapalli et al, 2013 ; Wu et al, 2007**).

La forme ancestrale est nommée « RecA », il semble que celle-ci soit restée seule chez les Eubactéries. Par contre, chez l'ancêtre commun aux Archaeobactéries et aux Eucaryotes une première duplication aurait eu lieu créant deux sous-familles : la sous-famille Rad $\alpha$  et la sous-famille Rad $\beta$ . Chez les Archaeobactéries cela aurait conduit à RadA et RadB. Chez les Eucaryotes la famille Rad $\alpha$  aurait subi une seconde duplication menant à RAD51 et Dmc1 et la famille Rad $\beta$  aurait subi de multiples duplications conduisant à RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3 (**Figure 9**).

Parmi toutes les protéines de la famille RAD51 présentes chez *Homo sapiens* seule RAD51 conserve le rôle que tient RecA chez les Eubactéries et RadA chez les Archaeobactéries. La plupart de ses paralogues ont d'ailleurs perdu leur activité recombinase même s'ils interviennent encore indirectement dans la voie de réparation de la recombinaison homologe. Seule Dmc1 réalise un rôle de recombinaison homologe, mais uniquement restreint à la méiose.

Si l'importance du rôle de RAD51 se traduit par la conservation de son gène au cours de l'évolution, il n'en est pas de même pour les autres protéines de sa famille qui ont parfois été perdues chez certains taxons. Par exemple Dmc1 n'est pas présent chez *Drosophila melanogaster* ni chez *Caenorhabditis elegans* (**Lin et al, 2006**).

### *3/ Transversalité des résultats obtenus chez d'autres organismes*

La très bonne conservation de RAD51 à travers l'ensemble de l'arbre du vivant permet de transposer certains résultats obtenus pour la RAD51 d'autres espèces à la RAD51 humaine. Bien sûr, il faut prendre en compte la distance évolutive qui sépare les organismes, ainsi que les modifications spécifiques (**Figure 10**).

La structure reste très bien conservée entre RecA, RadA et RAD51 (**Wyman & Kanaar, 2004**). Un exemple parmi d'autre est l'identification des domaines L1 et L2 initialement chez RecA puis par analogie chez RAD51 (**Matsuo et al, 2006**). En revanche, la formation du nucléofilament est différente, beaucoup plus dynamique chez RAD51 que chez RecA (**van der Heijden et al, 2007**).

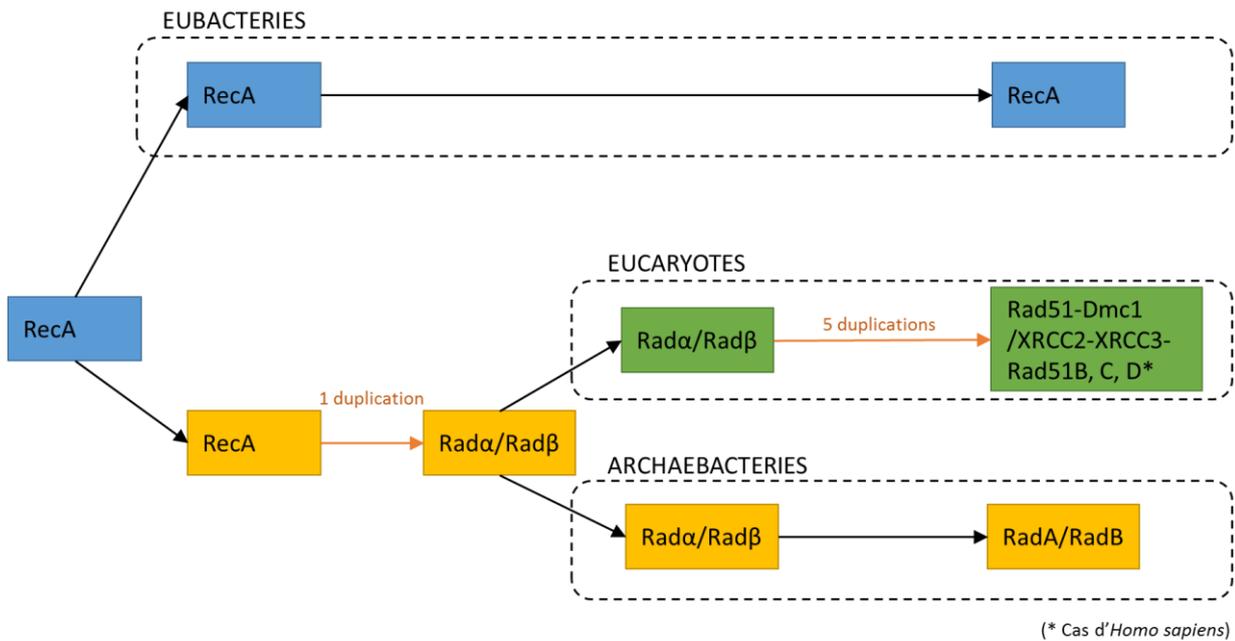


Figure 9 : Evolution des protéines de la famille RecA/RAD51/RadA.

Les flèches en orange soulignent un phénomène de duplication de gène à l'origine de nouvelles protéines. D'après Lin et al, 2006 ; Chintapalli et al 2013.

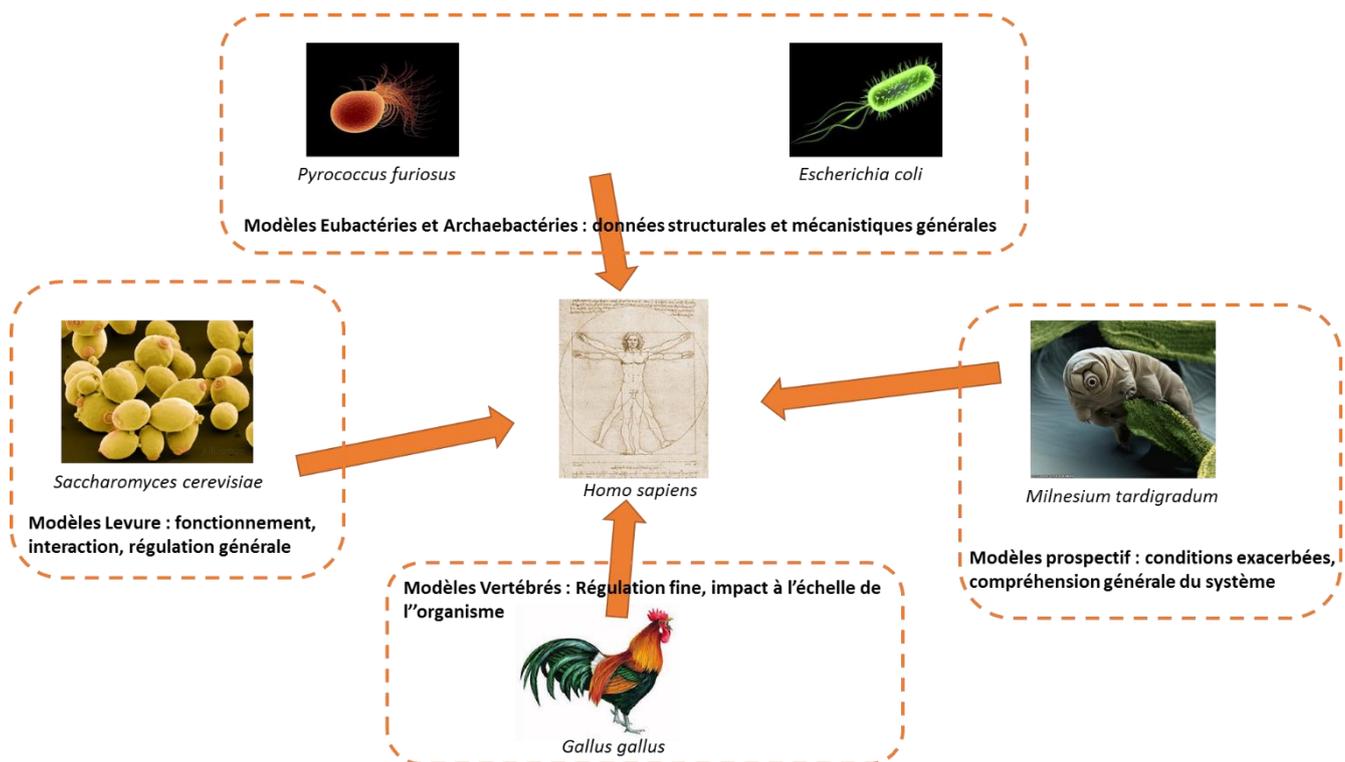


Figure 10 : Transposition des résultats de RAD51 d'autres organismes à l'homme grâce à la bonne conservation de RAD51 au sein du vivant.

Les résultats obtenus chez les Eubactéries et les Archaeobactéries sont transposables pour ce qui touche à la structure de RAD51 et à son fonctionnement général. Les résultats concernant le fonctionnement de Rad51 de *S.cerevisiae* et sa régulation générale sont transposables HsRAD51. Les modèles de vertébrés permettent une transposition de tous les mécanismes fins de régulation tels que les phosphorylations ainsi que les résultats à l'échelle de l'organisme. Les modèles prospectifs de métazoaires, comme les Tardigrades, peuvent permettre d'extrapoler des

Avec la levure (*S.cerevisiae*), organisme eucaryote, de nombreux résultats peuvent être extrapolés (**Ramotar et Masson, 1996**). Les mécanismes de réparation en général et de fonctionnement de Rad51 en particulier sont très proches et ce modèle est d'ailleurs très utilisé pour la compréhension du fonctionnement de RAD51.

Les lignées modèles de cellules de mammifères possèdent une RAD51 dont la séquence est similaire à 99% voire 100% à HsRAD51, ce qui permet une très bonne transposition des résultats. Il faut faire attention au contexte cellulaire notamment une possible modification des protéines partenaires et également au changement d'acides aminés d'intérêt. Nous verrons le cas des tyrosines 54 et 315 par la suite dans la lignée DT40 de poulet.

Outre l'utilisation de modèles connus de longue date, le haut niveau de conservation de RAD51 permet des études prospectives chez des organismes particuliers. Arrêtons-nous sur le cas des Tardigrades. Ces organismes proches des insectes et des nématodes sont les plus résistants de tous les métazoaires aux dommages à l'ADN. Ils survivent à 5000Gy d'irradiation. Grâce à la bonne conservation de RAD51 et d'autres protéines de réparation la détection est possible avec des anticorps humains (**Beltran-Pardo et al, 2013**). L'étude de la réponse aux dommages dans ces organismes et du rôle de RAD51 peut alors modifier notre conception du rôle de RAD51 chez *Homo sapiens*.

## **B- La compréhension de RAD51 par sa structure tridimensionnelle**

HsRAD51 est une protéine de 37kDa composée de 339aa et dont la structure complète n'est pas disponible à ce jour.

Toutefois, des structures 3D de fragments de HsRAD51 ont été obtenues. Le domaine N-terminal et le domaine central (ou Domaine ATPasique : DA) ont été résolus respectivement par RMN (**Aihara et al, 1999**) et cristallographie aux rayons X (**Pellegrini et al, 2002**). La résolution structurale du domaine central de HsRAD51 a été possible par la fusion de domaine avec un fragment de BRCA2 (**Pellegrini et al, 2002**). En revanche des structures 3D existent pour les RAD51 d'autres organismes tel que les archées *Methanococcus voltae* (**Du & Luo, 2012**) et *Pyrococcus furiosus* (**Shin et al, 2003**), ainsi que les eubactéries avec *Escherichia coli* (**Story et al, 1992**) et des eucaryotes avec *Saccharomyces cerevisiae* (**Conway et al, 2004**). Etant donné le grand niveau de conservation de RAD51 ces données ont été utilisées pour créer et proposer un modèle de structure tridimensionnelle de HsRAD51 oligomérique (**Reymer et al, 2009**) (**Figure 11**).



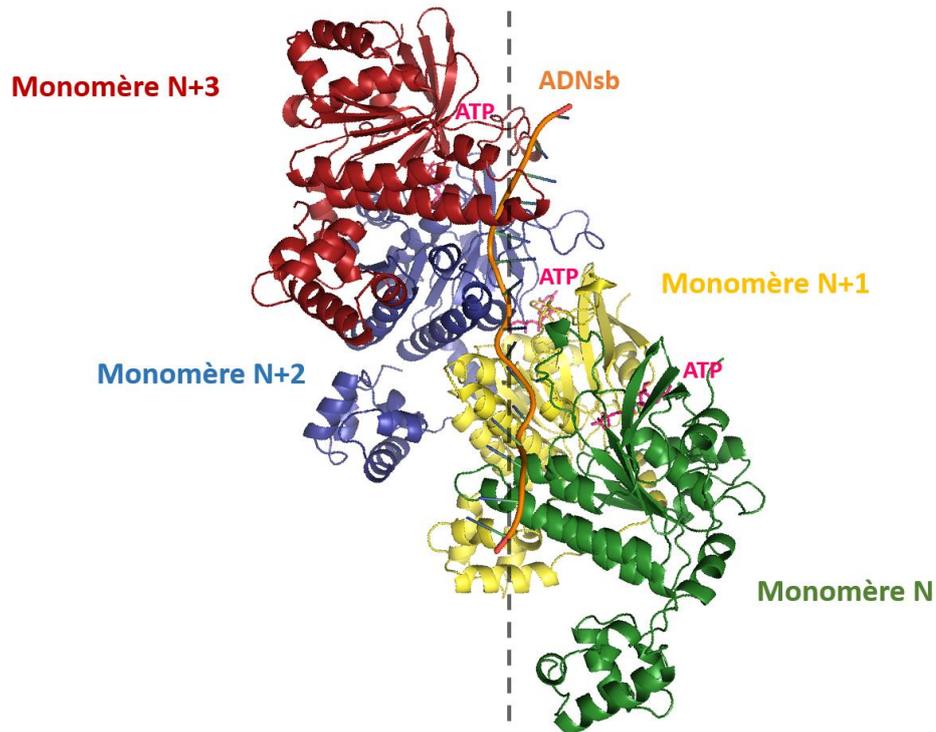


Figure 11 : Modélisation du nucléofilament de 4 monomères de HsRAD51 autour de l'ADNsb en présence d'ATP. Adapté depuis Reymer et al, 2009

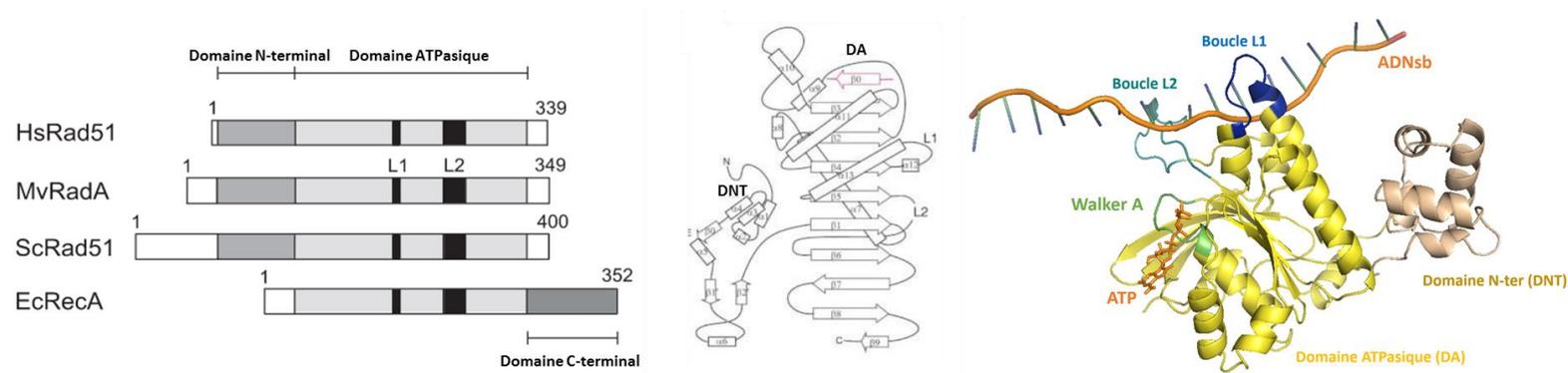


Figure 12 : Les différents domaines de RAD51 vus à différents niveaux de structuration, primaire, secondaire et tertiaire. Adapté d'après Shin et al, 2003 ; Matsuo et al, 2006 ; Reymer et al, 2009

Les données structurales de RAD51 ou de ses homologues RecA et RadA font clairement apparaître une structure conservée avec deux domaines reliés par un linker. Le plus petit est le Domaine N-terminal (DNT) de RAD51 ou RadA qui correspond au domaine C-ter de RecA. Il tient un rôle dans l'organisation du nucléofilament RAD51-ADNsb et dans la fixation de l'ADNdb. Le domaine ATPasique (DA) contient les boucles L1 et L2 permettant l'interaction avec l'ADNsb et une poche de fixation de l'ATP en lien avec les sites Walker A et B (**Figure 12**).

### C- Les différentes étapes de l'activité intrinsèque d'échange de brins de RAD51

Nous ne présenterons ici qu'un aperçu global de l'activité de RAD51 afin de présenter les grandes étapes (**Figure 13**) et les différentes interactions (**Figure 14**). Toutes les étapes seront détaillées et discutées par la suite.

Préalablement à l'activité de RAD51, le site de coupure est modifié pour libérer une extrémité 3' d'ADNsb. La première étape de l'activité de l'échange de brins est dite présynaptique, et consiste en la formation d'un nucléofilament de RAD51 autour de l'ADNsb. Cette étape est dépendante de la fixation d'ATP par RAD51.

La deuxième étape, dite synaptique, débute par la recherche d'une séquence homologue par le nucléofilament. Une fois une séquence homologue trouvée, RAD51 catalyse l'échange de brins. L'ADNsb du site de cassure est alors échangé pour s'associer à une séquence complémentaire. L'ADNsb extrait de la séquence homologue se retrouve au niveau du site de cassure. La structure complexe d'ADN entrecroisés forme une jonction de Holliday.

Dans la troisième étape, dite post-synaptique, la conformation formée permet une réparation grâce à la complémentarité de base. La néopolymérisation de l'ADN est réalisée à partir du brin matrice apporté sur le site de cassure. La résolution de la jonction par des hélicases et nucléases se fait sans RAD51 qui quitte l'ADN de manière active et dépendante de l'hydrolyse de l'ATP.

Il faut noter que l'activité de RAD51 dépend de nombreuses interactions avec des cations bivalents, de l'ATP, l'ADP, l'ADNsb, l'ADNdb et d'autres monomères de RAD51 (**Figure 13**). Les différentes étapes font intervenir plusieurs mécanismes, par exemple, la fixation de l'ATP, son hydrolyse ou encore l'interaction monomère-monomère. Ces différentes interactions et leurs interconnexions complexifient l'étude *in vitro* de RAD51. Par la suite, nous essayerons de comprendre les différents mécanismes en jeu, en détaillant les différentes étapes du fonctionnement de RAD51.



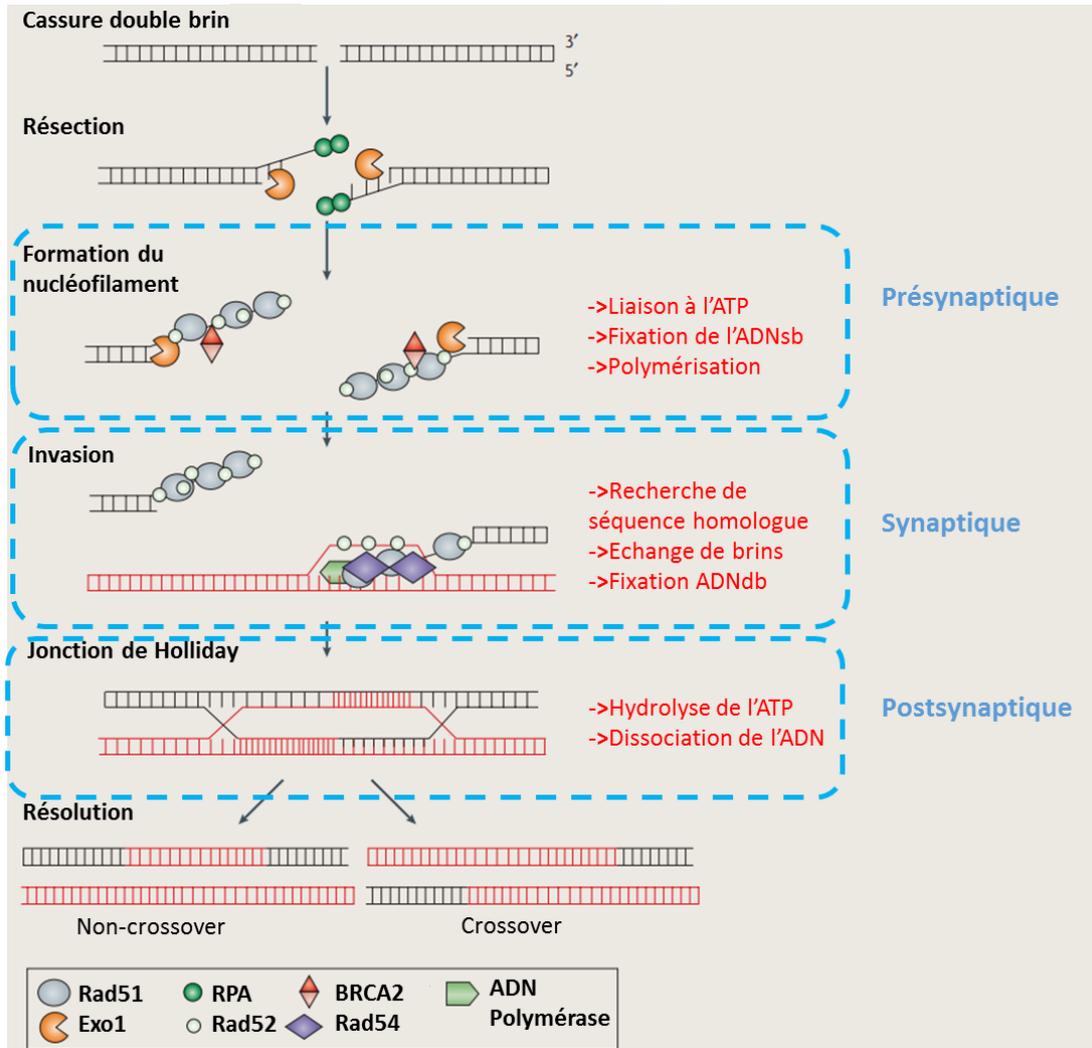


Figure 13 : Déroulement des différentes activités (->rouge) de RAD51 lors de son fonctionnement au sein de la Recombinaison Homologue. Modifié d'après Barzel & Kupiec, 2008

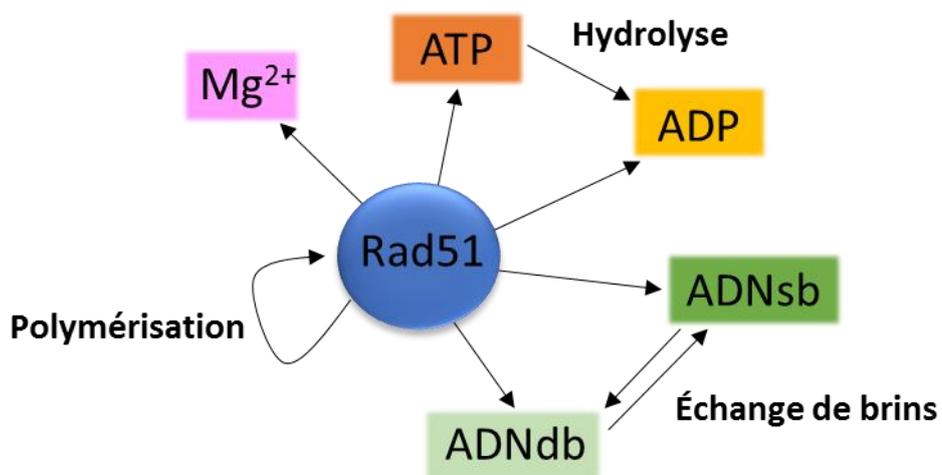


Figure 14 : Schéma récapitulant les différentes interactions intervenant dans l'activité intrinsèque de RAD51.

### *1/ L'interaction monomère-monomère*

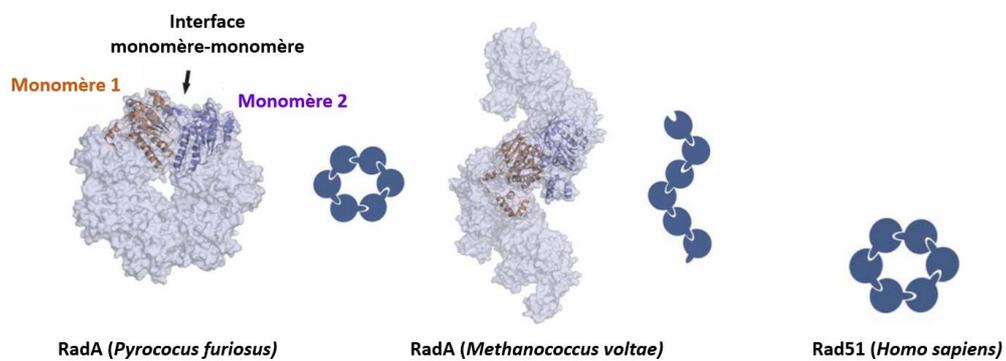
RAD51 a la capacité de s'auto-associer en solution (**Davies & Peregrini, 2007 ; Candelli et al, 2014**) et de polymériser sur un substrat d'ADNsb ou d'ADNdb (**Reymer et al, 2009**). En solution RAD51 est présente à différents degrés de polymérisation (**Davies & Peregrini, 2007 ; Candelli et al, 2014**). Les structures obtenues pour RAD51 chez différents organismes montrent une organisation fréquente en anneau de six à huit monomères (**Shin et al, 2003 ; Du & Luo 2012**), et parfois en filament (**Figure 14**).

Cette auto-association implique un motif de polymérisation situé dans le domaine N-terminal et impliquant les acides aminés 85 à 91 (**Pelegriani et al, 2002**). En absence de structure cristallographique complète pour HsRAD51, des études comparatives avec RecA ont permis à notre laboratoire d'identifier d'autres résidus présents à l'interface monomère-monomère tels que les tyrosines Y191 (**Selmane et al, 2004**) et Y315 (**Conilleau et al, 2004**).

Cette propriété d'auto-association tient une place primordiale dans la formation du nucléofilament de RAD51 qui est l'élément actif initial de l'échange de brins. D'ailleurs toutes les perturbations de l'interface monomère-monomère entraînent des modulations de la formation du nucléofilament et de l'activité recombinase. Ainsi des mutations A190/192L, SAM208/210LEA, F86E, A89E ou l'utilisation d'interférents peptidiques issus de BRCA2 (motifs BRC3 et BRC4) conduisent à l'abrogation de l'auto-association de RAD51 et donc à une inhibition de son activité d'échange de brin (**Davies et al, 2001 ; Yu et al, 2003**).

### *2/ La formation d'un nucléofilament actif entre RAD51, l'ADNsb et l'ATP*

Deux étapes essentielles marquent la formation du nucléofilament. Tout d'abord la fixation d'un noyau de RAD51 sur l'ADN : c'est l'étape de nucléation. Puis par la suite le filament de RAD51 s'agrandit : c'est l'étape d'extension.



**Figure 15 : Organisation de RAD51 en solution pour différents organismes.**

Structures d'oligomères de RAD51 ou RadA en solution d'après des résultats de cristallographie de RadA de *Pyrococcus furiosus* et de *Methanococcus voltae* ou d'un modèle pour RAD51 d'*Homo sapiens*. Modifié d'après Davies & Peregrini, 2007

Lors de l'étape de nucléation des oligomères de différentes tailles, qui seraient de 4 à 5 monomères en moyenne (**Miné et al, 2007 ; van der Heijden et al, 2007**), se fixent sur l'ADNsb. Ce phénomène est très dynamique avec l'association et la dissociation de RAD51 (**Modesti et al, 2007 ; Candelli et al, 2014**). Ces noyaux de RAD51 servent d'accroches pour l'ajout d'autres oligomères de RAD51, agrandissant le nucléofilament. Il y a donc de multiples points de nucléation dont certains perdurent et d'autres non. Cette stabilité serait directement corrélée au niveau de polymérisation : plus le nucléofilament est long et plus il est stable (**Candelli et al, 2014**).

A la fin de l'extension tout l'ADNsb est recouvert de RAD51 à l'exception de certaines zones de tailles insuffisantes pour ajouter une RAD51 (**van der Heijden et al, 2007 ; Modesti et al, 2007**).

La structure du nucléofilament RAD51-ADN est une hélice dextrogyre. Chaque tour est formé d'environ 18 bases et de 6 protéines, soit environ un monomère de RAD51 pour 3 bases (**Benson et al, 1994**). La complexation de RAD51 à l'ADN entraîne une ouverture dont l'extension est de l'ordre de 50% (**Sung et al, 2005**). L'amplitude de cette ouverture est variable selon la présence ou non d'ATP, prenant une forme compactée en présence d'ATP et une forme relâchée en absence d'ATP (**Egelman & Stasiak, 1993 ; Robertson et al, 2009**). La fixation de l'ATP par RAD51 est permise par deux domaines Walker A et Walker B. Il se positionne dans une poche formée entre deux monomères. L'ATP est un co-facteur essentiel à la formation et à la stabilité du nucléofilament (**Chi et al, 2006**). D'ailleurs, sans fixation de l'ATP, RAD51 est inactive (**Robertson et al, 2009**). Ce rôle de l'ATP n'est pas lié à son hydrolyse car l'effet est renforcé avec l'utilisation d'analogues non-hydrolysables de l'ATP ou de mutants défectueux pour l'hydrolyse de l'ATP (**Chi et al, 2006**).

Les régions de RAD51 impliquées dans la liaison à l'ADN ont été identifiées dans un premier temps chez la bactérie *E. coli* (**Story et al, 1992**). Ces structures nommées boucles L1 et L2 sont également présentes chez RAD51 d'*Homo sapiens* où elles participent également à la liaison à l'ADNsb (**Matsuo et al, 2006**) (**Figure10**). La façon dont les boucles interagissent avec l'ADN ne semble toutefois pas être exactement la même entre RecA et RAD51 (**Reymer et al, 2009**). Ce qui est cohérent avec les différences d'affinités pour l'ADNsb entre RAD51 et RecA.

### 3/ La reconnaissance, la fixation de l'ADNdb homologue et l'échange de brins

La fixation de l'ADNdb survient chronologiquement après la fixation de l'ADNsb. La façon dont s'organise précisément l'hétéroduplex RAD51-ADNsb-ADNdb n'est pas bien connue (**Atwell et al, 2012**). Mais l'hypothèse retenue est celle d'une fixation primaire de l'ADNsb sur un premier site avec une forte affinité et de manière secondaire la fixation avec l'ADNdb sur un second site avec une affinité beaucoup plus faible (**Liu et al, 2004 ; Shin et al, 2006**) (**Figure 16**) permettant la fixation de plusieurs séquences jusqu'à trouver une séquence homologue (**Sigurdsson et al, 2001**). Ces résultats sont en partie inspirés par le mécanisme de formation de l'hétéroduplex avec RecA (**Bianco et al, 1998 ; Roca & Cox, 1997**).

Cette étape est sans doute la plus intéressante et la moins connue des étapes du fonctionnement de RAD51 (**Barzel & Kupiec, 2008**).

Il est bien établi que l'échange de brins requiert la formation d'un nucléofilament stable entre RAD51 et l'ADNsb. Puis, par un processus de mobilité et de recherche a priori aléatoire, différents ADNdb sont contactés par le nucléofilament (**San Filippo et al, 2008 ; Bianco et al, 1998**). Ceci est illustré chez la levure par la mobilité de la zone de cassure, qui est considérablement accrue après l'induction de dommages (**Miné-Hattab & Rothstein, 2011**). La recherche ne concernerait pas uniquement une séquence mais reposerait également sur une structure tridimensionnelle de l'ADN (**Forget et al, 2012**).

RAD51 est capable de tolérer une certaine hétérologie entre les séquences homologues (**Tsai et al, 2011 ; Sagi et al 2006**). Toutefois cette différence de séquence ne doit pas être trop importante, car au-delà de 4 mésappariements le niveau de recombinaison est quasi nul (**Tsai et al, 2011**).

Il existe un modèle alternatif et controversé qui suggère que les séquences homologues soient déjà en contact avant la survenue d'une cassure double brin. Il n'y aurait alors pas de recherche de séquences homologues par RAD51 (**Barzel & Kupiec, 2008**).

L'hydrolyse de l'ATP par RAD51 conduit à la dissociation du nucléofilament et est un élément important pour le recyclage de RAD51. En effet, l'utilisation d'analogues non-hydrolysables de l'ATP ou du mutant K133R défectueux pour l'hydrolyse de l'ATP entraîne une stabilisation du nucléofilament (**Chi et al, 2006**). Une hypothèse est l'effet direct de l'hydrolyse sur la modification de l'interaction entre monomère ce qui désorganiserait le nucléofilament (**Ristic et al, 2005**).





Figure 16 : Equilibre et affinité d'interaction entre RAD51 et l'ADNsb et l'ADNdb

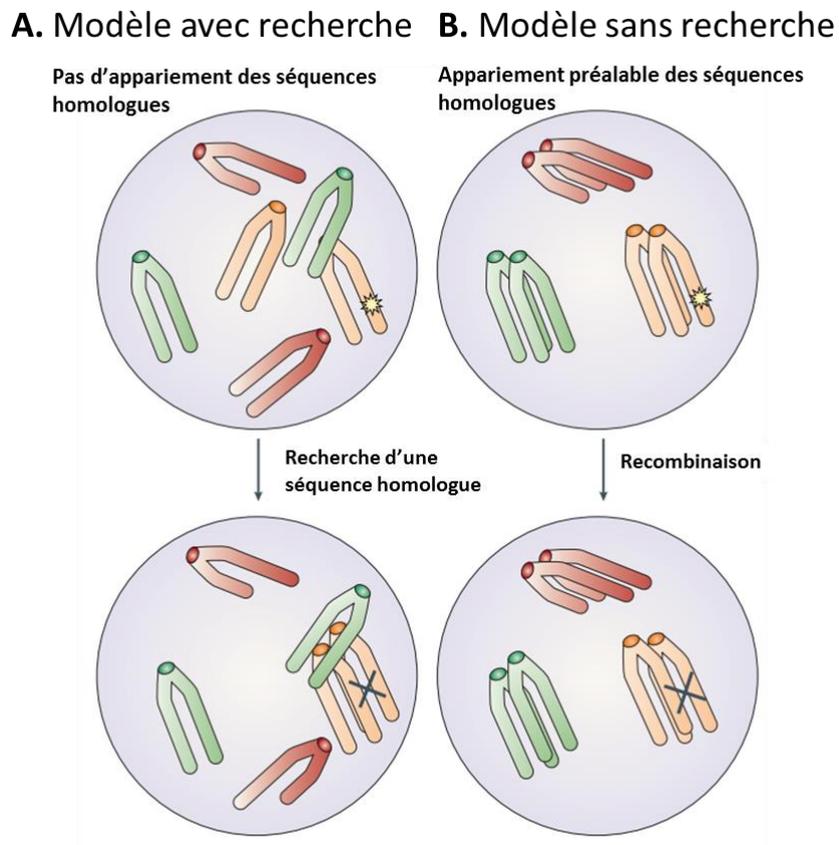


Figure 17 : Deux modèles pour l'échange de brins homologues.

**A.** les séquences homologues sont séparées et RAD51 réalise une recherche de séquence homologue. **B.** les séquences homologues sont déjà appariées dans la cellule et RAD51 n'effectue qu'un échange de brins. Modifié d'après Barzel & Kupieci, 2008

Nous avons vu que RAD51 est très conservée chez tous les organismes vivants ce qui reflète l'importance de son rôle. Celui-ci repose sur une activité d'échange de brins homologues qui est un phénomène complexe. En effet, l'échange de brins dépend d'une succession d'étapes faisant intervenir la fixation de l'ATP, la polymérisation de RAD51, l'interaction avec l'ADNsb, avec l'ADNdb et l'hydrolyse de l'ATP.

### III. Mécanismes connus de contrôle du fonctionnement de RAD51

RAD51 est un acteur central de la voie de la recombinaison homologue, ainsi la modulation de son activité va gouverner l'efficacité de la voie toute entière.

Dans un premier temps nous présenterons les conséquences néfastes générées par un déséquilibre en RAD51. Ce qui nous amènera à dresser un état des lieux des différents mécanismes connus de régulation de RAD51. Nous verrons que les phosphorylations de RAD51 tiennent un rôle déterminant dans la régulation en réponse aux dommages à l'ADN. Nous détaillerons donc les effets connus des différentes phosphorylations recensées à ce jour pour HsRAD51.

#### A- Les conséquences d'un déséquilibre en RAD51

*1/ Un niveau trop faible de RAD51 peut conduire à la mort cellulaire ou à la carcinogénèse*

La suppression de RAD51 n'est pas viable. En effet, la construction d'un modèle de souris KO pour RAD51 conduit à une létalité embryonnaire (Tsuzuki et al, 1996). De même, que les KO en cellules DT40 de poulet ne survivent pas (Sonoda et al, 1998). L'utilisation d'ARN interférence de RAD51 conduit également à une baisse significative de la survie cellulaire (Short et al, 2011). Ceci expliquerait qu'il existe des maladies génétiques pour presque tous les acteurs de la voie de la Recombinaison Homologue (Thompson & Schild, 2002), sauf pour RAD51 probablement trop primordiale.

Le processus de carcinogénèse demande la modification d'un certain nombre de gènes impliqués dans des processus clés tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération ou la réparation de l'ADN (Hanahan et Weinberg, 2000). Une instabilité génétique est souvent à l'origine de cancers. La réparation correcte de l'ADN est donc essentielle pour prévenir la modification de ces gènes clés et la survenue de cancers (Bartkova et al, 2005). Le lien

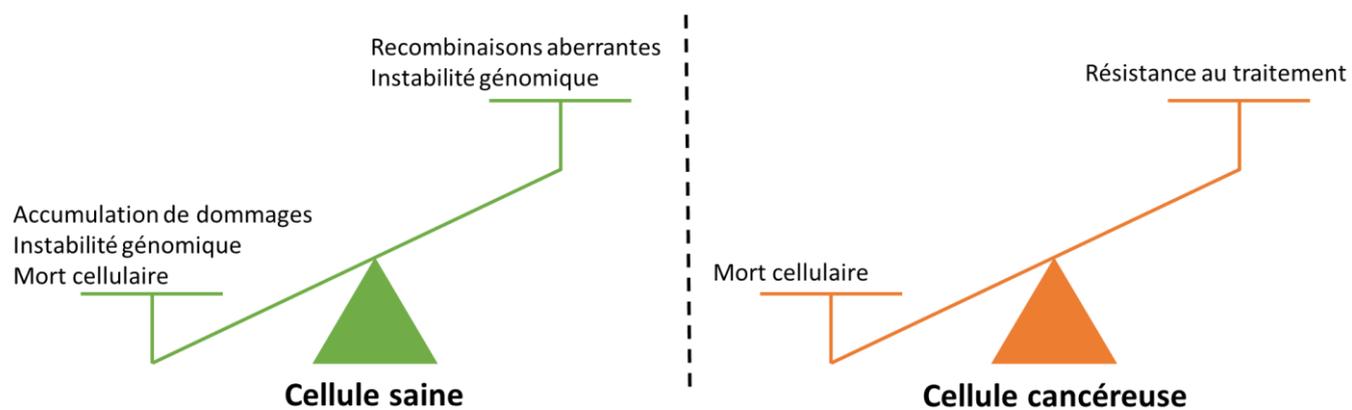
direct n'a pas encore été fait entre un niveau faible de RAD51 et la formation de cancer. Toutefois, un polymorphisme de RAD51 G135C est connu. Or la présence de cette mutation est un facteur de risque dans la survenue de nombreux cancers tels que le cancer du sein (**Sun et al, 2011**) ou du cancer du cou et de la tête (**Kong et al, 2015**). Il est tout à fait envisageable que ceci soit dû à un moins bon fonctionnement de RAD51 et il serait intéressant de tester cette hypothèse.

### *2/ Une activité incontrôlée peut-elle être à l'origine de cancer ?*

Le réarrangement de séquences homologues permet une bonne réparation dans le cadre d'un contexte de lésions double brins d'ADN (**Figure 18**). Mais en absence de lésions ces échanges de séquences peuvent conduire à des aberrations (**Stankiewicz et Lupski, 2002**). Un réarrangement aberrant par RAD51 peut donc être source de modifications et participer au développement et à la progression de cancers (**Wiegman et al, 2014**).

### *3/ La protection des cellules cancéreuses par la réparation des cassures double brin*

La surexpression de RAD51 a été observée dans de nombreux cancers comme, par exemple, le cancer du pancréas (**Nagathihalli et al, 2011**), le cancer du poumon non-à-petites-cellules NSCLC (**Yu et al, 2015**), le gliome (**Short et al, 2011**), le cancer du sein (**Hine et al, 2008**). L'hypothèse a été rapidement formulée que cette surexpression d'une protéine réparant les CDB et la résistance aux traitements radio et chimiothérapeutiques se basant justement sur la létalité des CDB, étaient liées. De nombreux éléments ont confirmé que la surexpression de RAD51 serait alors un facteur de résistance des cellules cancéreuses au traitement (**Short et al, 2011 ; Hannay et al, 2007**). En tant que tel il devient une cible privilégiée pour sensibiliser certaines cellules aux traitements (**Ward et al, 2015**) ce qui est appuyé par les essais d'inhibition de RAD51. Par exemple, dans la lignée T98G de gliome l'inhibition de RAD51 par ARN silencing a permis de sensibiliser les cellules au traitement (**Short et al, 2011**). De même, dans la lignée A549 où l'inhibition de RAD51 a également accru la mortalité des cellules cancéreuses (**Desai et al, 2014**). Dans ces deux cas il a également été montré que les cellules souches cancéreuses CD133+ pouvaient aussi être sensibilisées au traitement par l'inhibition de RAD51.



**Figure 18 : Conséquences d'un déséquilibre en RAD51.**

La hauteur de la balance correspond au niveau d'activité de RAD51. Dans un contexte sain, trop peu de RAD51 entraîne une accumulation de dommages pouvant rendre la cellule cancéreuse ou entraîner sa mort. Au contraire, un niveau trop élevé peut induire des réarrangements aberrants et dangereux. Dans un contexte cancéreux un faible niveau de RAD51 permet la mort des cellules par traitement induisant des CDB. Un niveau très élevé de RAD51 permet la résistance aux traitements des cellules cancéreuses.

## B- Les régulations de l'expression génique de RAD51

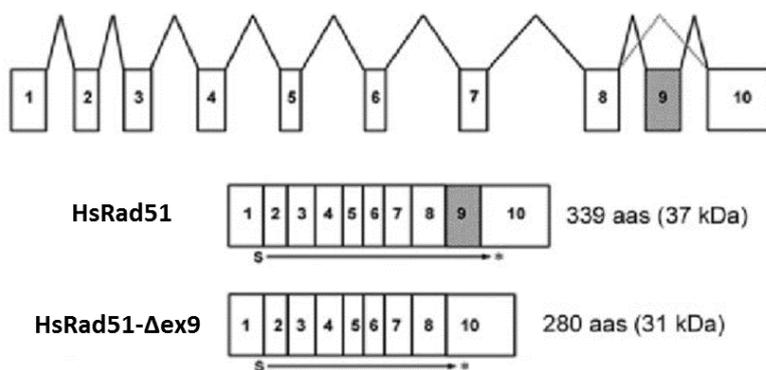
La première régulation a lieu au niveau de l'expression du gène de RAD51 avant d'aboutir à la protéine.

### *1/ Des régulations au niveau du promoteur de RAD51*

Jusqu'à présent deux facteurs ont été identifiés comme régulant le promoteur de RAD51 : p53 (**Arias-lopez et al, 2006**) et EGR (**Hine et al, 2014**). La modulation de l'expression a pu être montrée par l'utilisation de gènes reporters sous l'action du promoteur de RAD51 conduisant à montrer un effet répresseur de la fixation de p53 (**Arias-lopez et al, 2006 ; Fong et al, 2011**) et un effet activateur de EGR (**Hine et al, 2014**). Les facteurs Stat5 et E2F-1 sont également fortement suspectés d'activer le promoteur de RAD51 (**Hasselbach et al, 2005**).

### *2/ L'épissage alternatif de RAD51 conduit à la formation de 4 isoformes de RAD51*

Plusieurs isoformes de RAD51 sont connues, l'isoforme 1 est la plus fréquente et celle dont le rôle a été le plus étudié. Pour les isoformes 2 et 4, leurs détections proviennent d'études haut débit des ARNm (**Gerhard et al, 2004 ; Ota et al, 2004**) et aucune étude ne permet de conclure quant à leur signification biologique. En revanche, l'isoforme 3 a été décrite plus en détails (**Park et al, 2008**) (**Figure 19**). Elle correspond à l'épissage alternatif de l'avant dernier exon de RAD51, l'exon 9. Cette isoforme conserve une bonne activité d'échange de brins *in vitro* et une localisation plutôt nucléaire suggérant qu'elle correspond à une forme de RAD51 potentiellement active. Leurs premiers résultats indiquent également une localisation différentielle dans les testicules (**Park et al, 2008**).



**Figure 19 : Epissage alternatif de RAD51.**

Epissage de l'isoforme 1 de RAD51 (HsRAD51) et de l'isoforme 3 (HsRAD51-Δex9)  
D'après Park et al, 2008

### C- Les régulations de RAD51 au niveau protéique

Outre les phénomènes de régulation au niveau génétique, de nombreuses régulations surviennent au niveau protéique. La littérature n'est sûrement pas exhaustive sur l'ensemble des mécanismes en jeu mais ils semblent très nombreux et permettent des régulations fines pour adapter dans le temps et dans l'espace le fonctionnement de RAD51. Cette régulation touche plusieurs aspects du fonctionnement de RAD51 : sa localisation, sa stabilité et son activité. La modulation se fait par plusieurs biais tels que l'interaction avec des partenaires protéiques ou des modifications post-traductionnelles.

#### *1/ Sur la localisation de RAD51*

La localisation de RAD51 est primordiale car son activité de réparation de l'ADN se déroule dans le noyau. Il semble bien établi par de nombreuses observations qu'au niveau basal RAD51 est répartie entre le noyau et le cytoplasme (**Yoshikawa et al, 2000 ; Gildemeister et al, 2009**). Pourtant RAD51 ne possède pas de séquence d'adressage au noyau (NLS), elle contient même une séquence d'exclusion nucléaire (NES) (**Jeyasekharan et al, 2013**). La localisation nucléaire peut s'expliquer par diffusion. En effet, selon son niveau de polymérisation sous la forme monomère à 37kDa elle peut passer le pore nucléaire, alors que dès la forme dimère à 74kDa le passage du pore demande une séquence d'adressage (**Dingwall et Laskey, 1986 ; Jeyasekharan et al, 2013**).

Suite à l'induction de dommages il y a une redistribution de RAD51 dans le noyau (**Gildemeister et al, 2009**). Cette modulation de la localisation passe par un phénomène actif de translocation nucléaire dépendant sans doute de protéines partenaires. En effet, des arguments sérieux plaident en faveur du rôle de BRCA2 (**Davies et al, 2001 ; Tarsounas et al, 2004**) et de RAD51C (**Gildemeister et al, 2009 ; Bennett et al, 2005**) selon des mécanismes distincts. La corrélation entre niveau d'expression de BRCA2 et localisation nucléaire de RAD51 a été observée assez tôt, grâce notamment à des lignées déficientes en BRCA2 (**Yuan et al, 1999**). Des résultats plus récents suggèrent l'implication d'une troisième protéine partenaire : DSS1, qui permettrait de masquer les NES de RAD51 et de BRCA2 et apporterait son NLS pour permettre le passage du pore nucléaire au complexe (**Jeyasekharan et al, 2013**). RAD51C contenant une NLS (**French et al, 2003**) sa complexation avec RAD51 permettrait leur entrée simultanée dans le noyau (**Gildemeister et al, 2009**).



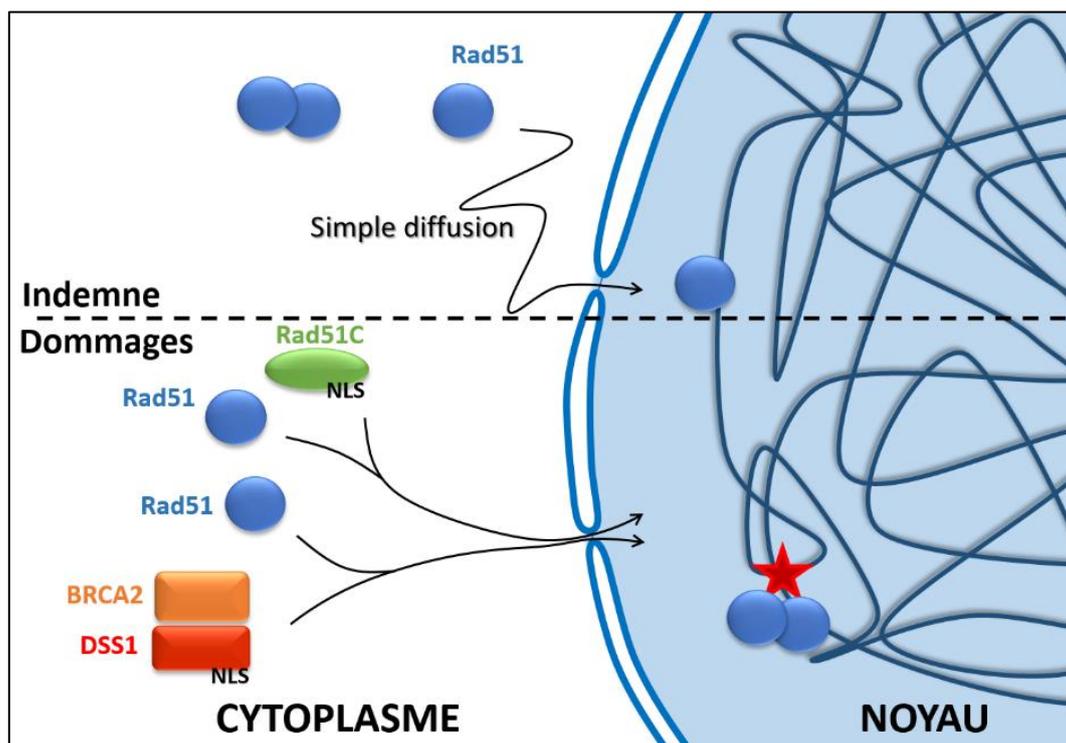


Figure 20 : Différents mécanismes de translocations de RAD51 au noyau.  
En conditions normales (Indemne) ou de dommages à l'ADN (Dommages).

### 2/ Sur la stabilité de RAD51

La possibilité de l'ubiquitinylation et de la dégradation de RAD51 par le protéasome a été évoquée très tôt pour RAD51 du fait de son interaction avec la E2 ligase Ubc9 chez la levure (**Kovalenko et al, 1996**). La dégradation de RAD51 par le protéasome a été montrée par la suite (**Kanamoto et al, 2002 ; Bennett et al, 2005 ; Ko et al, 2012 ; Zhu et al, 2013**) en lien avec une tétraubiquitinylation (**Bennett et al, 2005**) ou une polyubiquitinylation (**Zhu et al, 2013**). De manière intéressante elle semble liée au degré de polymérisation de RAD51, car l'action d'inhibiteur de la polymérisation ou d'un mutant non-polymérisable (A190/192L) montre une dégradation accrue dépendante du protéasome (**Zhu et al, 2013**). De plus, cette dégradation peut faire suite à des signaux extérieurs comme le TGF- $\beta$  (**Kanamoto et al, 2002**) ou dans le prolongement de la réponse aux dommages à l'ADN par irradiation (**Bennett et al, 2005**).

Un autre système de dégradation de RAD51 liée à l'apoptose est connu. En effet, RAD51 est une cible de clivage par la caspase3 (**Huang et al, 1999 ; Slupianek et al, 2001**).

### 3/ Sur la coordination de RAD51 au sein de la RH

La quantité de RAD51 n'augmente pas suite aux cassures à l'ADN (**Yuan et al, 1999**) son action de réparation vient donc de sa translocation dans le noyau et de son recrutement sur le site de cassure.

Le recrutement de RAD51 est favorisé *in cellulo* par l'interaction avec différentes protéines (**Figure 21**). Le rôle de Rad52 est essentiel car il est responsable du départ de RPA de l'ADNsb et son remplacement par RAD51 (**Chen et al, 1999 ; Sugiyama et al, 2009**). D'autres protéines favorisent le recrutement de RAD51 par leur double interaction entre RAD51 et l'ADN, c'est le cas de BRCA2 (**Yang et al, 2002 ; Liu et al, 2010**) et des paralogues de RAD51 : RAD51B et RAD51C (**Sigurdsson et al, 2001**). Puis Rad54 participe à la stabilisation du nucléofilament dans un premier temps (**Mazin et al, 2003**).

Cette action de recrutement peut également être inhibée par la complexation de RAD51 avec p53, cette action venant se coupler à l'effet répresseur sur le promoteur du gène (**Linke et al, 2003**).

Finalement le relargage de RAD51 est un phénomène actif dépendant de son activité ATPase et de celle de Rad54 (**Li et al, 2007**).

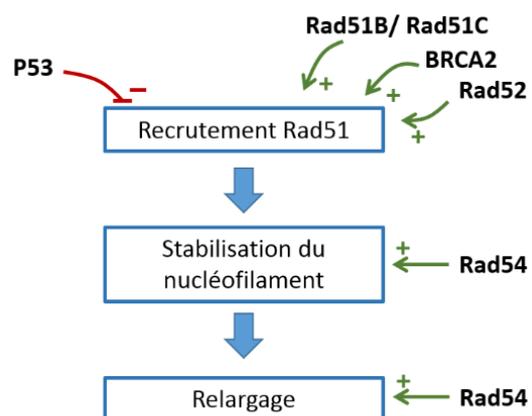


Figure 21 : Schéma indiquant les protéines clefs modulant les différentes étapes de l'activité de RAD51.

#### *4/ Sur l'activité intrinsèque de RAD51*

L'activité intrinsèque de RAD51 correspond à la bonne fixation des différents partenaires ADNsb, ATP, ADNdb, ADP, Mg<sup>2+</sup> et des autres monomères de RAD51. Ceci est bien sûr étroitement lié à la conformation tridimensionnelle et la répartition des charges à la surface de la protéine. Ainsi des modifications dans certains acides aminés peuvent par exemple affecter la liaison à l'ATP (**Amunugama et al, 2011**) ou possiblement l'interaction monomère-monomère (**Conilleau et al, 2005**). Ceci suggère les effets potentiels des modifications post-traductionnelles sur le fonctionnement de RAD51 (**Daboussi et al, 2002**) et peut guider le développement d'inhibiteurs de RAD51 (**Zhu et al, 2015**).

### **D- Les phosphorylations contrôlent le fonctionnement de RAD51 en réponse aux dommages à l'ADN**

Les phosphorylations sont sûrement les modifications post-traductionnelles les plus étudiées. Elles entrent en jeu dans nombre de mécanismes de réponses à des modifications environnementales et de régulations de voies métaboliques dans le contexte cellulaire. En particulier, lors de la signalisation intervenant lors de la DDR Réponse aux Dommages à l'ADN de nombreuses kinases sont activées et vont permettre la succession des différentes protéines pour que leurs activités soient localisées dans le temps et dans l'espace de manière à permettre une réparation optimale.

#### *1/ Les sites de phosphorylation connus et leur conservation*

Les sites de phosphorylation de RAD51 comportent à la fois des tyrosines (**Popova et al, 2009**), des thréonines (**Sørensen et al, 2005 ; Yata et al 2012**) et une sérine (**Yata et al, 2012**). Ils sont répartis à différents endroits de RAD51 à la fois en dans le domaine N-terminal et dans le domaine C-terminal. A noter qu'une phosphorylation est observée chez la levure en S192 (**Flott et al, 2011**) qui est homologue chez HsRAD51 à T134 pour laquelle aucune phosphorylation n'a encore été déterminée expérimentalement.

La conservation des sites de phosphorylation est intéressante à plusieurs titres. Tout d'abord la conservation d'un site peut révéler son importance par la pression de sélection qui s'y exerce. De plus, cela permet de savoir si des parallèles peuvent être effectués avec des animaux ou des lignées modèles.

Il avait déjà été noté que le résidu Y315 est conservé chez tous les métazoaires (**Chen et al, 1999**). Avec les données de plus en plus importantes de séquençage la comparaison est plus exhaustive aujourd'hui. Les deux résidus Y54 et Y315 montrent une très bonne conservation dans l'ensemble des métazoaires, avec quelques exceptions intéressantes.

Une exception notable concerne les oiseaux et en particulier l'ordre des Galliformes où Y54 a été remplacée en H54. Cette histidine n'est pas présente chez d'autres espèces d'oiseaux et est à prendre en compte pour l'utilisation de la lignée DT40. En effet cette lignée est beaucoup utilisée pour étudier la réparation de l'ADN et est une lignée de cellules de poulet (*Gallus gallus*).

## *2/ La phosphorylation en T309 par Chk1*

Une publication (**Sørensen et al, 2005**) montre une série d'expériences établissant le lien entre cycle cellulaire et réponses aux dommages à l'ADN par le biais de la kinase Chk1. Cette kinase du cycle cellulaire induit un blocage du cycle en cas de dommages à l'ADN. De plus leurs résultats établissent un lien direct avec la réparation de l'ADN. Ils suggèrent une activation de RAD51 par sa phosphorylation en T309 via Chk1. L'inhibition de Chk1 entraîne une baisse de la quantité de foci de RAD51 donc de son recrutement sur les sites de dommages après traitement. De plus, une phosphorylation détectée en électrophorèse 2D montre une phosphorylation de RAD51 qui est perdue par inhibition de Chk1 ou par mutation du site T309 qui fait justement partie d'une séquence consensus de reconnaissance par Chk1.

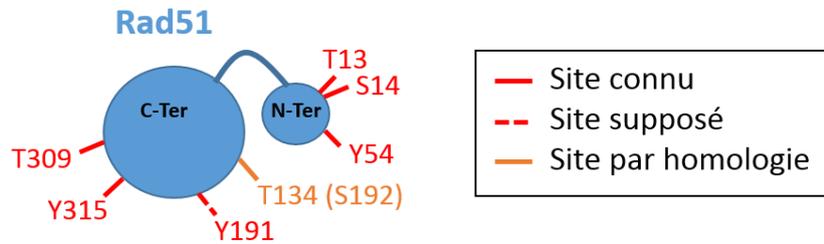


Figure 22 : Positionnement des différents sites connus de phosphorylation de RAD51

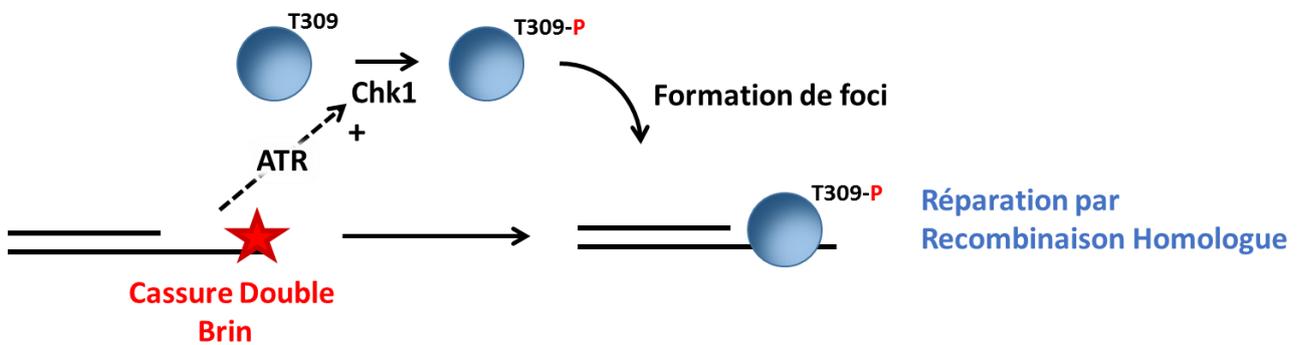


Figure 23 : Modèle actuellement proposé pour la phosphorylation de la T309 de RAD51 par Chk1.

Cette même mutation a des effets négatifs sur la survie des cellules aux dommages suggérant l'importance de ce site pour l'activation *in cellulo* de RAD51.

### 3/ La phosphorylation en S14 par Plk1 puis en T13 par CK2

La phosphorylation de RAD51 en S14 et T13 a été décrite en 2012. Une première série d'expériences (Yata et al, 2012) montrent une phosphorylation en S14 par Plk1 et en T13 par CK2 à la fois *in vitro* et *in cellulo*. De même, le caractère séquentiel est attesté *in vitro* et *in cellulo*. Ces phosphorylations de RAD51 interviendraient en phase G2, et le niveau de phosphorylation est augmenté suite à une irradiation. De plus, ces modifications post-traductionnelles promouvraient l'interaction avec NBS1. L'hypothèse posée est donc que ces phosphorylations participeraient au recrutement de RAD51 sur le site de cassure.

De plus récentes expériences, menées par la même équipe, suggèrent un rôle de BRCA2 dans la première phosphorylation par Plk1. BRCA2 sous une forme libre dans le noyau pourrait servir de plateforme de recrutement mettant en contact RAD51 et Plk1 (Yata et al, 2014).

### 4/ Les résidus Y54 et Y315 de RAD51 sont phosphorylés de manière séquentielle par c-Abl

C'est en 1997 que la première phosphorylation de RAD51 par c-Abl est rapportée (Yuan et al, 1997). La question qu'ils se posaient alors était de savoir comment peut être régulée l'activité de RAD51. Dans ce cadre ils identifient une kinase intervenant dans la réponse aux dommages à l'ADN : c-Abl. Ils déterminent que c-Abl phosphoryle RAD51 à la fois *in vitro* et *in cellulo*. La recherche par spectrométrie de masse des résidus phosphorylés montre qu'une cible de c-Abl est la tyrosine 54.

Suite à ces travaux, deux ans plus tard, une seconde phosphorylation est découverte en Y315 (Chen et al, 1999). Ils confirment une phosphorylation de tyrosine *in vitro* et *in cellulo* de RAD51 par c-Abl. La réalisation de mutants phosphorésistants (Y315F) abolit cette phosphorylation suggérant que la phosphorylation en tyrosine se déroule sur ce résidu. De manière intéressante, cette abolition n'est pas observée avec les mutants Y191F ni Y54F.

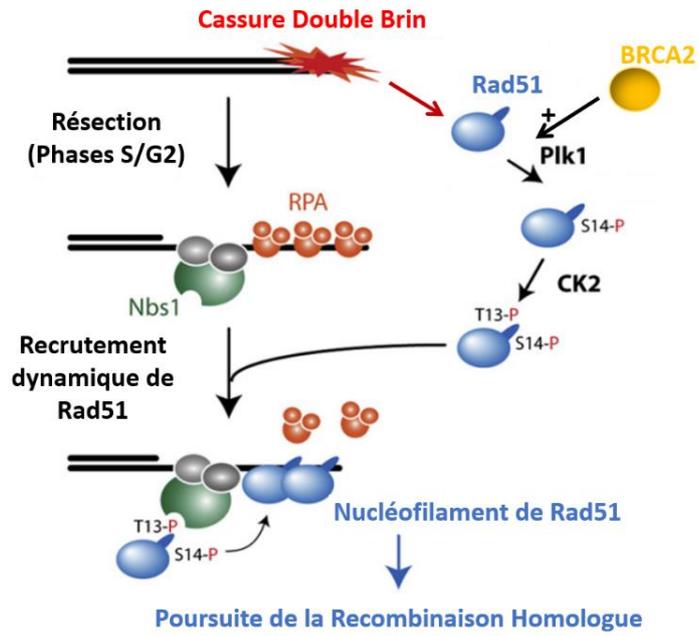


Figure 24 : Modèle actuellement proposé pour la phosphorylation séquentielle de S14 par Plk1 puis de T13 par CK2.

Modifié d'après Yata et al, 2012.

La confirmation de cette double phosphorylation est réalisée par la suite avec c-Abl ou avec la protéine de fusion BCR-Abl (**Slupianek et al, 2001 ; Popova et al, 2009 ; Slupianek et al, 2011**). De plus, cette double phosphorylation se déroulerait de manière séquentielle en premier temps sur Y315 puis dans un second temps sur Y54 (**Popova et al, 2009**). En effet, la phosphorylation s'effectue en Y315 même sans phosphorylation en Y54 (Y54F : mutant phosphorésistant). Alors que la phosphorylation ne se déroule pas en Y54 si le résidu Y315 n'est pas phosphorylable (Y315F).

#### *5/ Le contexte cellulaire de la phosphorylation de Y54 et Y315 par c-Abl*

Les phosphorylations en Y54 et Y315 sont détectées après irradiation (**Chen et al, 1999 ; Yuan et al, 1997**) ou après traitement au cisplatine ou à la mytomycine C (**Slupianek et al, 2001**). Avec la kinase de fusion BCR-Abl les deux phosphorylations sont constitutivement détectables (**Slupianek et al, 2001**). Tous ces résultats semblent indiquer que cette phosphorylation séquentielle s'inscrit dans la transduction du signal suite aux cassures double brin. D'ailleurs, il semblerait que cette phosphorylation soit aussi dépendante de la kinase ATR (**Yuan et al, 1997**), ce qui semble logique dans la cascade d'activation connue de c-Abl par ATR.

Cette phosphorylation peut également être détectée après co-transfection de RAD51 et de c-Abl, sans qu'il y ait eu d'induction de dommages (**Popova et al, 2009**). Cette situation avec un excès de kinase et de RAD51 se rapproche des conditions de phosphorylations *in vitro* et il n'est donc pas surprenant d'y trouver une phosphorylation de RAD51.

#### *6/ Rôles supposés de la phosphorylation sur RAD51, la RH et la réponse aux dommages à l'ADN*

Comme nous l'avons détaillé précédemment plusieurs aspects du fonctionnement de RAD51 peuvent être impactés par la phosphorylation séquentielle en Y315 puis Y54.

D'un point de vue de la capacité à réaliser l'échange de brins une protéine phosphorylée *in vitro* par c-Abl a montré une activité d'échange de brins nettement diminuée par rapport au sauvage (**Yuan et al, 1997**). Toutefois, il est important de noter que dans ces conditions seule la phosphorylation sur Y54 avait été détectée par spectrométrie de masse. Soit la phosphorylation en Y315 n'est pas détectée, soit elle n'est pas réalisée dans ces conditions de phosphorylation. La situation n'est pas donc parfaitement claire sur l'état de

phosphorylation de RAD51 dans ces conditions. Plus récemment, l'activité d'échange de brins a été étudiée en s'intéressant au rôle uniquement de Y315 (Takiwaza et al, 2004). En utilisant différents mutants de RAD51 pour la position Y315 ils montrent une diminution de l'activité d'échange de brins et de l'activité de liaison à l'ADN lorsqu'ils apportent une charge négative. Cette réduction de l'activité de fixation de l'ADNsb pourrait être reliée à un défaut de polymérisation. En effet, par modélisation moléculaire la position de Y315 atteste d'une position à l'interface monomère-monomère dont la phosphorylation pourrait avoir un effet négatif sur la formation du nucléofilament (Conilleau et al, 2004).

D'autre part, à l'échelle de la recombinaison homologue le recrutement de RAD51 pourrait être facilité car la phosphorylation de RAD51 par c-Abl favoriserait l'interaction entre RAD51 et Rad52 (Chen et al, 1999). De plus, les études de survie après induction de dommages montrent une réduction drastique du nombre de cellules si la phosphorylation en Y315 est empêchée (Slupianek et al, 2001). Dans le même temps, la présence de BCR-Abl avec RAD51 augmente la survie des cellules, ce qui suggère un effet activateur sur RAD51 (Slupianek et al, 2002).

**La phosphorylation séquentielle des tyrosines Y54 et Y315 est la plus ancienne et la plus étudiée des phosphorylations de RAD51. Le rôle de c-Abl a été clairement établi et le contexte de réponses aux dommages à l'ADN également. Toutefois, les détections de phosphorylations sont variables, tantôt Y54 seule est détectée (Yuan et al, 1997), tantôt Y315 seule (Chen et al, 1999) parfois les deux avec Y54 faiblement phosphorylée (Slupianek et al, 2001) et enfin les deux, environ au même niveau de phosphorylation (Popova et al, 2009). Il apparaît qu'une limite importante par rapport aux résultats obtenus est celle de l'état de phosphorylation précis de RAD51. Les quelques études menées *in vitro* indiqueraient un effet inhibiteur de la modification Y315 lorsqu'une charge négative est ajoutée. En revanche, les études *in cellulo* suggèrent un bon fonctionnement par la RH suite à la phosphorylation de RAD51. L'effet précis de la double phosphorylation reste donc encore à déterminer.**

**Deuxième partie :**  
**MATÉRIELS ET MÉTHODES.**

# I. Production et purification des protéines RAD51

## A- Préparation des plasmides

Le plasmide pET15a (**Figure 25**) contenant le gène codant pour His-RAD51 WT était déjà disponible. Il a servi de support à une mutagenèse dirigée afin d'obtenir le pET15a avec les gènes codant pour His-RAD51 Y315E, His-RAD51 Y54/315E et His-RAD51 Y54/315F.

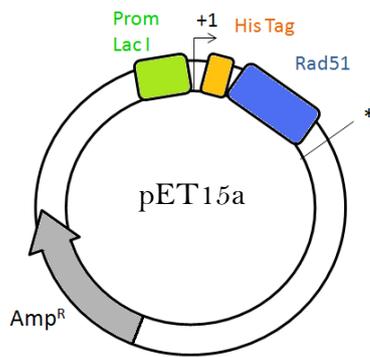


Figure 25 : Schéma de la construction utilisée pour la production des His-RAD51.

La présence des mutations est vérifiée par séquençage.

## B- Production et purification

Des bactéries *Escherichia Coli* BL21-DE3 ont été transformées avec les plasmides codant pour les protéines d'intérêt (RAD51 WT-His, Y54E-His, Y315E-His, Y54/315E-His et Y54/315F). Elles ont été mises en culture à 37°C dans 1L de LB contenant de l'Ampicilline (100µg/mL) et du Chloramphénicol (20µg/mL), jusqu'à ce que la  $DO_{600nm}$  atteigne 0,6. L'induction a été réalisée à 30°C sur la nuit par ajout d'1mM d'IPTG (**Figure 26**). Les bactéries ont été culotées par centrifugation et reprises dans du tampon de lyse (TrisHCl pH8 10mM, EDTA 1mM, Triton 1/100ème, Lysosyme 1mg/mL). Les cellules ont été lysées par 3 cycles de congélation et décongélation à -80°C suivis de 3 cycles de sonication (25W, 4min). Les fractions soluble et insoluble ont été séparées après 15min de centrifugation à 13000rpm, à 4°C. Le surnageant a été incubé sur colonne Ni-NTA (Acide Nickel-NitriloTriacétique Invitrogen™), 1h à 4°C sous agitation. Après évacuation de la fraction non-retenue, des lavages à 20, 60 et 80mM d'imidazole ont été réalisés (dans du tampon 20mM TrisHCl, 50mM NaCl, 10% glycérol). Enfin, les protéines ont été éluées par une solution à 300mM d'imidazole en fractions de 2mL.

Les fractions ont été analysées par migration sur gel SDS-PAGE et celles contenant la protéine ont été récupérées et dialysées. La concentration protéique a été mesurée par BCA, Bradford et électrophorèse capillaire (puce Agilent®). La pureté des échantillons a été analysée par SDS-PAGE révélée en nitrate d'argent et par électrophorèse capillaire. Toutes les protéines RAD51 produites ont été conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

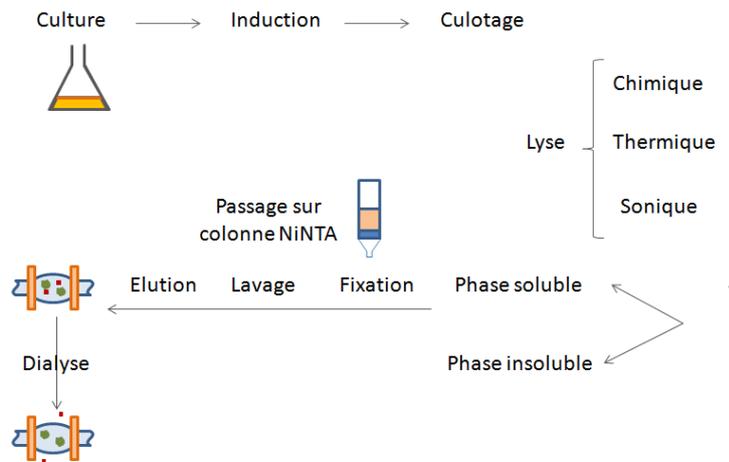


Figure 26 : Démarche de production et de purification des protéines His-tagguées.

## II. Mesure de Dichroïsme Circulaire

### A- Principe

Le spectropolarimètre de dichroïsme circulaire (ou CD pour Circular Dichroism) est essentiellement utilisé pour suivre les modifications structurales de biomolécules telles que des protéines en solution. Cette approche repose sur la capacité qu'ont des molécules à absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite de la lumière polarisée circulairement à gauche. Le spectre dichroïque (ou spectre CD) est obtenu par la différence d'absorbance entre ces deux types de lumière, pour chaque longueur d'onde. Dans la région UV lointain (180 à 260nm), cette méthode permet de déterminer la structure secondaire des protéines à savoir les hélices alpha, feuillets bêta et forme aléatoire. Les hélices alpha sont caractérisées par une déviation négative à 208 et 222nm qui est d'autant plus importante que le taux d'hélice alpha est grand. Les feuillets bêta sont caractérisés par une déviation positive à 190 nm (Figure 27).

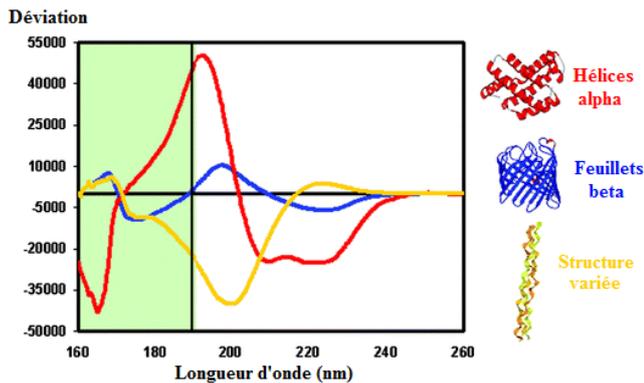


Figure 27 : Spectres caractéristiques des structures secondaires des protéines.

En rouge : spectre de CD typique d'une structure en hélice alpha. En bleu : spectre typique d'une structure de feuillets beta. En jaune : spectre typique d'une structure à organisation variée. (Modifié d'après Université d'Angers, EAD.)

## B- Conditions de mesure

L'acquisition des spectres de CD a été réalisée sur un spectrophotomètre CD J-810 (Jasco) équipé d'un contrôleur de température Peltier. Les échantillons de RAD51 dilués à 1mg/mL dans un tampon TrisHCl 20mM, ont été placés dans des cuves en quartz 0,2x1cm (Hellma). Les signaux ont été moyennés sur 3 répétitions pour améliorer le rapport signal sur bruit. Les paramètres de mesure sont : bande passante : 2nm ; intervalle : 0,1nm ; temps de réponse 0,5s ; température : 20°C ; gamme de longueur d'onde : 200 à 260nm ; distance optique 1cm. Tous les spectres ont été corrigés par soustraction du spectre du tampon.

## III. Test d'échange de brins

### A- Principe

Le test d'échange de brins homologues se base sur l'utilisation de deux ADN. Un ADNs<sub>b</sub> marqué (ADNs<sub>b</sub><sup>\*</sup>) et un ADN<sub>db</sub> non marqué. L'ADN<sub>db</sub> contient un brin homologue à celui de l'ADNs<sub>b</sub><sup>\*</sup> marqué. Le mélange seul des deux ADN ne conduit pas dans nos conditions à un échange de brins. Toutefois, RAD51 sous sa forme active catalyse l'échange entre l'ADNs<sub>b</sub><sup>\*</sup> et son homologue contenu dans l'ADN<sub>db</sub>. Le produit de la réaction est donc un ADN<sub>db</sub><sup>\*</sup> et un ADNs<sub>b</sub> non marqué.

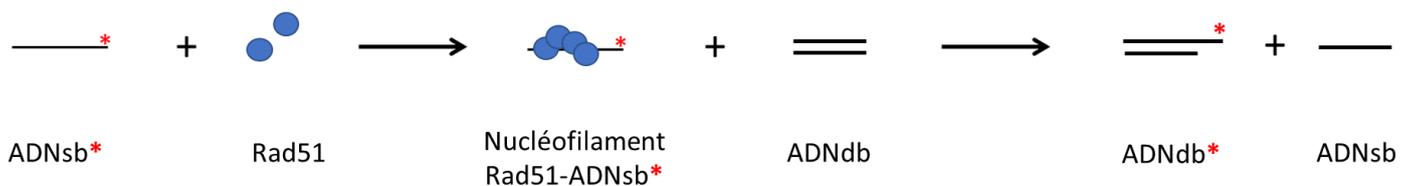


Figure 28 : Principe de fonctionnement du test d'échange de brins.

Conditions initiales : ADNs<sub>b</sub><sup>\*</sup> (ADNs<sub>b</sub> marqué) et ADN<sub>db</sub>. Conditions finales d'un échange de brins homologues catalysé par RAD51 : ADN<sub>db</sub><sup>\*</sup> et ADNs<sub>b</sub>.

### B- Conditions expérimentales

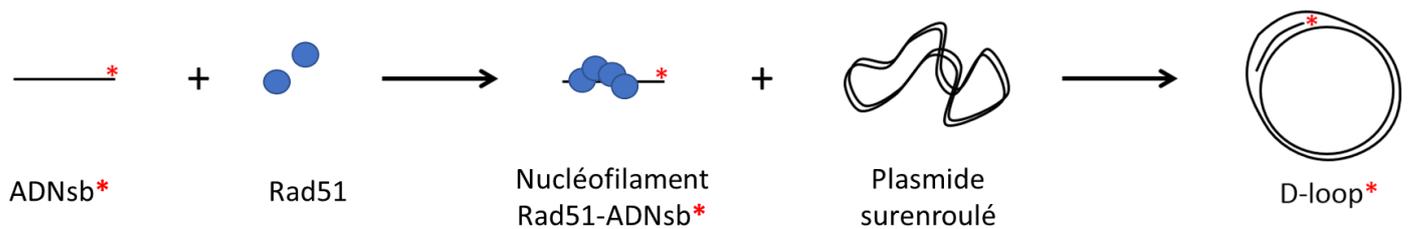
Un gradient de RAD51 de 0,5 à 3μM a été incubé avec 1μM d'ADNss de 58bases (5' -TCC TTT TGA TAA GAG GTC ATT TTT GCG GAT GGC TTA GAG CTT AAT TGC TGA ATC TGG T-3') couplé à un fluorophore d'IRD800. La réaction se déroule dans un tampon (Tris HCl pH 8 20mM ; MgCl<sub>2</sub> 20mM ; Glycérol 2% ; BSA 100μg/mL ; ATP

1mM ; DTT 1mM) à 37°C pendant 20min. 2,5µM d'ADNdb a été ajouté pendant 1h à 37°C. Finalement, la réaction a été stoppée par une solution SDS 0,5% et protéinase K 50µg/mL. Les produits de réaction ont été analysés sur SDS-PAGE 6% et l'ADN marqué a été détecté par lecture avec le scanner Odyssey® à 800nm. Les résultats ont été analysés par t-test apparié.

## IV. Test D-loop

### A- Principe

Le D-loop repose sur deux ADN, un ADNsb marqué (ADNsb\*) et un plasmide surenroulé contenant une séquence homologue. La réalisation de l'échange de brins se traduit par une invasion du plasmide par RAD51 positionnant la séquence d'ADNsb\* en face de sa séquence complémentaire. Le produit de la réaction est donc un plasmide désenroulé contenant un hétéroduplexe d'ADNsb et double brin : une structure dite D-loop\*.



**Figure 29 : Principe de fonctionnement du test D-loop.**

Conditions initiales : ADNsb\* (ADNsb marqué) et ADNdb. Conditions finales d'un échange de brins homologues catalysé par RAD51 : ADNdb\* et ADNsb.

### B- Conditions expérimentales

Un gradient de RAD51 de 0,5 à 4µM a été incubé avec 1µM d'ADNsb-IRD700 de 100Nt (GGG CGA ATT GGG CCC GAC GTC GCA TGC TCC TCT AGA CTC GAG GAA TTC GGT ACC CCG GGT TCG AAA TCG ATA AGC TTA CAG TCT CCA TTT AAA GGA CAA G) à 37°C en présence d'ATP 1mM, Tris HCl pH 7,5 25mM, DTT 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM. Le plasmide surenroulé pPB4.3 (300µM) est ajouté. Après 15min à 37°C la réaction est arrêtée par l'ajout de SDS1% et protéinase K à 1mg/mL pendant 20min. Les produits d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et analysé sur le scanner Odyssey à 700nm. L'intensité des signaux ont été analysés avec le logiciel du scanner Odyssey. Sur le graphique les résultats ont été normalisés par rapport à la valeur maximale du WT.

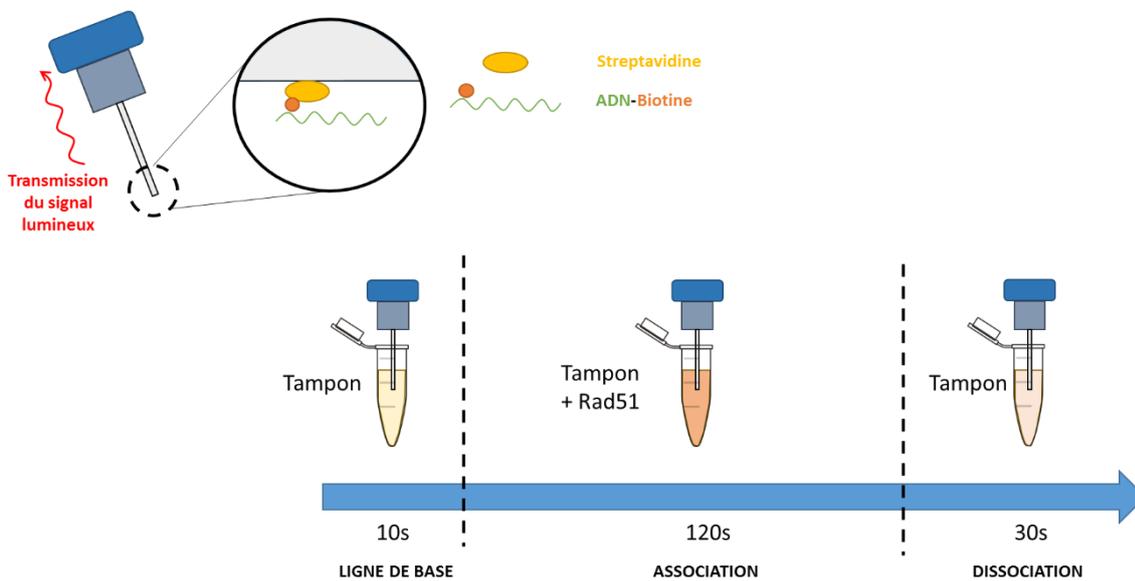
## V. Fixation de l'ADNsb par Blitz

### A- Principe

Le blitz est une technique proche de la résonance plasmonique de surface (SPR). Le premier partenaire d'interaction est fixé à l'extrémité d'un tip (**Figure 30**). La fixation d'un second partenaire d'interaction entraîne un alourdissement qui se traduit par la déviation d'un rayon lumineux. La mesure de sortie est donc l'amplitude de cette déviation dans le temps. Elle traduit l'alourdissement du complexe fixé au tip et donc de la liaison de partenaire. Contrairement au Biacore où le site de fixation est sous un flux constant de solution ici le tip est immergé dans différentes solutions.

### B- Conditions expérimentales

L'ADNsb biotinylé a été fixé sur un tip de streptavidine. Les échantillons de RAD51 ( $2\mu\text{M}$ ) sont préparés dans un tampon de réaction PBS 1X et ATP 1mM. La cinétique d'interaction est divisée en 3 phases : ligne de base (10s), association de l'ADNsb avec RAD51  $2\mu\text{M}$  (120s), dissociation (30s). Le tip est régénéré dans 2 bains de NaOH 50mM de 40s avant réutilisation.



**Figure 30 : Fonctionnement et utilisation du Blitz.**

A. Tip streptavidine sur lequel un ADN-Biotine est fixé (polydT). La fixation se traduit par une augmentation de masse et par une déviation de signal lumineux. B. Chronologie en 3 étapes des expériences d'association-dissociation menée avec RAD51 : 1ère étape de ligne de base dans du tampon seul (10s) ; 2ème étape d'association, le tip est plongé dans une solution contenant RAD51 (120s) ; 3ème étape de dissociation, le tip est plongé dans une solution de tampon seul (30s).

## VI. Gel retard

RAD51 est incubée avec un ADN 58mer ou polydT-IRD800, pendant 30min à 37°C, sous agitation, dans un tampon de réaction (TrisHCl pH8 20mM ; MgCl<sub>2</sub> 2mM ; KCl 30mM ; DTT 1mM). Les complexes RAD51-ADN sont fixés par ajout de glutaraldéhyde 0,5% final pendant 15min à 37°C. Les échantillons sont analysés par migration dans un gel d'agarose 1% et révélés à 800nm au scanner odyssey. Les résultats sont quantifiés avec le logiciel associé au scanner.

## VII. Hydrolyse de l'ATP

L'activité ATPase de RAD51 est suivie par titration du Pi relargué. RAD51 (4μM) est incubée avec de l'ADNsb polydT (10μM) dans un tampon de réaction (TrisHCl 20mM, NaCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, DTT 1mM, BSA 0,1mg/mL, EDTA 0,05mM) pendant 30min à 37°C. Puis l'ATP 1mM est ajouté pendant 40min. La réaction est arrêtée par l'ajout d'EDTA 50mM. Le molybdate d'ammonium (4,2%) et le l'oxalate de malachite (0,045%) sont ajoutés successivement et permettent la réaction colorimétrique avec le Pi. Le produit de la réaction est révélé par lecture de DO à 620nm.

## VIII. Fixation de l'ATP

### A- Principe

L'ATP-TNP (2',3' -O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5' -triphosphate) est un analogue de l'ATP (**Figure 31**). Il possède un maximum d'absorption à 408nm et 470nm seul en solution et à 418nm lorsqu'il est complexé à une protéine (**Hiratsuka & Uchida, 1973**). La fluorescence à 530nm est faible en solution aqueuse et augmente dans un environnement hydrophobe tel que les poches de fixation de l'ATP des protéines.

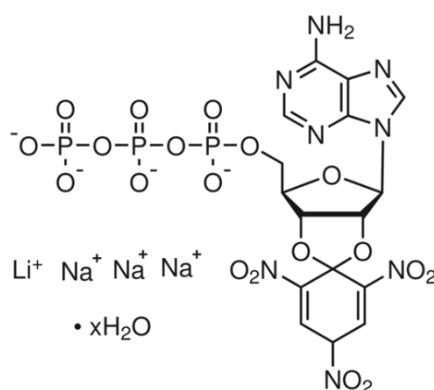


Figure 31 : Structure de l'analogue de l'ATP fluorescent l'ATP-TNP (2'(3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate)

## **B- Conditions de mesure**

La fluorescence de l'ATP-TNP est mesurée par un spectrofluorimètre (Jasco®) couplé à un contrôleur de température Peltier. RAD51 (1 $\mu$ M) est incubée pendant 10min avec de l'ATP-TNP 6 $\mu$ M (Sigma-Aldrich T4193) dans du Tris HCl 20mM pH8,1. La lecture de DO se fait dans des cuves de quartz 0,2x1cm (Hellma). Les spectres sont moyennés sur 3 répétitions pour réduire le ratio signal sur bruit. Les paramètres de mesure sont : longueur d'onde d'excitation à 410nm ; spectre d'émission lu entre 350 et 600nm ; vitesse 200nm/min ; ouverture 5x5nm ; pas de 0,2nm ; temps de réponse 1s ; sensibilité haute.

## **IX. Migration en conditions non-dénaturantes**

RAD51 est incubée pendant 25min à 37°C dans un tampon TrisHCl pH8 25mM, ATP 1mM. Un tampon de charge non-dénaturant est ajouté (TrisHCl pH6,8 120mM ; Glycérol 20% ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 1,5mM ; Bleu de BromoPhénol BBP 0,04%). Le mélange est déposé dans un gel 8% non dénaturant (Acrylamide-Bisacrylamide 37:1 8% ; TrisHCl pH8,8 375mM ; APS 0,2% ; TEMED 10nM) dans un tampon de migration non-dénaturant (Glycine 3g/L ; Tris Base 14,4g/L). Après 1h30 de migration à 80V le gel est analysé par western blot anti-RAD51.

## **X. Chromatographie d'exclusion-diffusion**

La protéine HsRAD51 (10 $\mu$ M) a été chargée sur une colonne Supradex 200 10/300 (Healthcare Biosciences) en présence ou absence de peptide BRC4 (40 $\mu$ M) et d'ATP (1mM) et éluée avec du tampon contenant : 20mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM EDTA, 2mM 2-mercaptoethanol et 10% de glycérol, à un débit de 0,5mL/min. Le profil d'élution a été suivi par absorption UV à 280nm. Les échantillons ont été incubés 1h à 37°C.

## **XI. Phosphorylation *in vitro* de RAD51 par c-Abl**

RAD51 (5 $\mu$ M) est mélangée avec c-Abl (Merck-Milipore) (30nM) dans un tampon de réaction HEPES 100mM pH7 et ATP 2mM. Le mélange est incubé pendant 2h à 30°C. La réaction est arrêtée à -20°C. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à analyse.

## **XII. Pull Down**

Les expériences de Pull-Down ont été réalisées avec le kit Pierce™ Pull-Down PolyHis de Thermo Scientific.

Une résine (50µL), constituée de billes d'agarose liées à des ions Cobalt est resuspendue puis déposée sur une colonne fournie par le kit et complétée avec 400µL de tampon de lavage (10mM Imidazole, 50% TBS, 50% Pierce Lysis Buffer). Après homogénéisation par inversion et 4 lavages successifs, 25 µg de His-RAD51 sont ajoutés à la résine.

La colonne est alors incubée à 4°C sur roue pendant 30 minutes, centrifugée 30 secondes et la fraction non-retenue de RAD51 est récupérée. Après 5 lavages, 250µg d'extrait protéique de HeLa est ajouté et la colonne est incubée à 4°C sur roue pendant 2 heures. La colonne est ensuite centrifugée 30 secondes et la fraction non-retenue de l'extrait est récupérée et conservée pour analyse. Les billes sont lavées 5 fois. Puis les billes sont incubées avec 250µL de tampon d'éluion (850mM d'imidazole). Après 15 minutes, la colonne est centrifugée pour récupérer l'éluion qui est analysée par SDS-PAGE.

## **XIII. Immunoprécipitation**

Nous nous sommes basés sur le protocole de GE Health Care®. L'anticorps utilisé est un anticorps de souris dirigé contre le Tag 6 Histidines présent sur notre RAD51.

RAD51 (50µg) est incubée avec un extrait protéique de cellules HeLa (250µg) et l'anticorps anti-His (5µg). Le volume est complété jusqu'à 500µL avec du tampon X ( NP40 1% ; 20mM Tris ; 150mM NaCl ; glycérol 10% ; 2mM EDTA).

Après avoir été incubé sur la nuit, nous y ajoutons 50 µL de billes Sépharose-protéine G et laissons incuber 1h à 4°C. Cela va permettre aux protéines G de fixer le fragment Fc des anti-corps. Trois lavages de 1mL de tampon X puis 1 lavage de 1mL de TrisHCl (20mM, pH8) sont réalisés pour enlever les protéines non fixées.

Les protéines sont ensuite éluées en ajoutant du SDS. Elles seront ensuite analysées sur SDS-PAGE suivi d'une coloration au Bleu de Coomassie, Nitrate d'Argent ou Western-Blot.

## **XIV. Culture cellulaire et transfection**

La lignée cellulaire utilisée dans les expériences présentées dans ce manuscrit est une lignée de cellules HeLa cultivées dans du DMEM complet à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Les produits utilisés pour la culture cellulaire sont : Dulbecco's Minimum Essential

Medium DMEM, RPMI 1640, SVF (Sérum Foetal de Veau), Antibiotiques (peniciline/streptomycine), PBS (Gibco).

La transfection a été réalisée avec du FuGENE6 (Promega). La transfection d'un puits de plaque 6 puits contenant 2mL de milieu et des cellules HeLa à 75% de confluence est réalisée avec un mélange de 180µL de milieu, 12µL de FuGENE6 et 4µg de plasmide codant pour RAD51. Dans le cas des conditions contrôles le même mélange est réalisé sans ADN. Le mélange est ajouté par goutte à goutte dans le milieu et sauf mention contraire le délai avant traitement des cellules est de 48h après transfection.

## **XV. Fractionnement cellulaire**

Les cellules HeLa cultivées en plaque 6 puits sont récupérées dans 500µL de PBS. Elles sont centrifugées 5min à 2000rpm, 4°C, puis resuspendues délicatement dans 200µL de tampon de lyse A (PIPES pH8 5mM ; KCl 860mM ; NP40 0,5% ; PMSF 1mM ; inhibiteurs de protéases Sigma P8340 et P004 1/100<sup>ème</sup>). Après centrifugation de 5min à 5000rpm, 4°C, le surnageant constitue la fraction cytoplasmique et est conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Le culot est repris dans 200µL de tampon de lyse B (Tampon de lyse Pierce 1X, PMSF 1mM) et lysé par sonication 20s à 30W. Cette fraction constitue la fraction nucléaire et est conservée à -80°C jusqu'à analyse.

## **XVI. Immunofluorescence**

Les cellules HeLa ont été cultivées directement sur les lamelles dans du DMEM. Les lamelles sont lavées dans du PBS 1X puis incubées dans une solution de fixation (Formaldéhyde 3,7% ; Triton X-100 0,1% ; PBS 1X) pendant 20min. Les lamelles sont lavées dans du PBS pendant 30s et incubées dans une solution de blocage (PBS BSA 1%). Puis elles sont incubées sur la nuit à 4°C avec un anticorps primaire dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du PBS BSA 1%. Après 3 lavages de 5min dans du PBS les lamelles sont mises en présence d'anticorps secondaires dilués au 1/500<sup>ème</sup> dans du PBS BSA 1%. Après 4 lavages de 5min dans du PBS les lamelles sont disposées sur des lames avec une goutte de Prolong® (Invitrogen) contenant du DAPI. Les lames sont laissées à sécher 24h minimum à l'obscurité avant observation au microscope à fluorescence (Nikkon Eclipse Ni-E).

## **XVII. Tests MTT**

Une plaque 96 puits a étéensemencée à raison de 5 000 cellules par puits dans 200µL de DMEM. Lorsque la confluence est de 50% les cellules sont transfectées par du Fugene6 (Promega). 48h après transfection elles ont été traitées avec des concentrations croissantes de Camptothécine (CPT) induisant des CDB de l'ADN. Après 72 heures d'incubation, 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 retiré et 200 µL de DMSO ont été ajoutés par puits. Après homogénéisation, la DO a été lue à 540 nm.

## **XVIII. Clonogénie**

Une plaque 96 puits a étéensemencée à raison de 5 000 cellules par puits dans 200µL de DMEM. Puis 48h après transfection elles ont été traitées avec des concentrations croissantes de Camptothécine (CPT) induisant des CDB de l'ADN. Après 1h d'incubation les cellules sont dénombrées sur lame de Mallasez. Selon les concentrations estimées une dilution est réalisée pour déposer 100 cellules dans 2mL de DMEM d'un puits de plaque 6 puits. Après 7 jours de culture les colonies sont colorées par ajout de 200µL de réactif MTT à 5mg/mL pendant 1h. Les colonies sont comptées par deux expérimentateurs de façon indépendante.

## **XIX. Western Blot**

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 ou sur 2 heures à 280mA dans du tampon de transfert composé de 3 g/l Tris ;14,4 g/l Glycine; 20% Ethanol.

La saturation des sites de liaison non spécifiques de la membrane a été effectuée avec de la BSA 2% dans du TBST (10 mM Tris HCl pH 7,4 ; 9 g/l NaCl ; 0,1% Tween20) pour les anticorps de lapin ou de souris. Après 60 minutes de blocage, les membranes ont été lavées rapidement au TBST et incubées avec l'anticorps primaire sur la nuit. Les membranes ont été ensuite lavées trois fois au TBST et incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris pendant 1 heure. 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.



**Troisième partie :**

**RÉSULTATS.**



## Introduction générale de la partie résultat

Nous avons cherché à répondre à la question du rôle des phosphorylations de RAD51 en Y315 et Y54 sur son fonctionnement à deux échelles : moléculaire et cellulaire.

L'étude des phosphorylations présente plusieurs difficultés : d'une part de s'assurer que les sites d'intérêts sont bien phosphorylés, et eux uniquement ; d'autre part la phosphorylation n'étant jamais complète, le produit de réaction est donc un mélange de formes phosphorylées et non phosphorylées. Afin de s'affranchir de ces contraintes, nous avons choisi d'utiliser un modèle phosphomimétique pour les positions Y54 et Y315. Ce modèle est relativement facile à réaliser et permet une séparation claire des différents états mono ou di-phosphomimétiques.

Cette stratégie m'a donc conduit à axer mon travail de thèse sur quatre points principaux :

-Premièrement, nous nous sommes intéressés à l'effet de ces modifications sur l'activité intrinsèque de RAD51.

-Deuxièmement, nous avons cherché à réaliser une phosphorylation de RAD51 par c-Abl dans le but de comparer formes phosphorylées et phosphomimétiques et de valider notre modèle phosphomimétique.

-Troisièmement, nous avons initié une recherche de partenaires de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques.

-Quatrièmement, afin de compléter l'approche menée *in vitro* nous avons mené des tests *in cellulo* permettant d'aborder d'autres aspects. Les constructions phosphomimétiques ont été transfectées en cellules HeLa pour étudier la localisation de RAD51, son association à la chromatine, la stabilité des différentes formes et leurs effets sur la survie cellulaire.

### **I. La double modification phosphomimétique de RAD51 montre un effet inhibiteur *in vitro* lié à la mauvaise formation du nucléofilament**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les études antérieures suggèrent que les phosphorylations pourraient avoir un effet sur l'activité intrinsèque de RAD51. Pour y répondre nous avons analysé la capacité d'échange de brins homologues de RAD51 selon ses

modifications phosphomimétiques. Par la suite, l'impact de ces modifications sur chacune des étapes nécessaires à l'échange de brins a été étudié afin de comprendre et d'identifier l'effet de ces modifications sur le mécanisme d'action de RAD51.

Cette analyse a nécessité la mise en place et une adaptation de plusieurs tests biochimiques. Lorsqu'un travail de mise au point technique a été nécessaire, il est présenté en préalable, avant la comparaison des formes phosphomimétiques. Cette présentation ne reprend pas le détail de la mise au point mais en fait ressortir les éléments majeurs.

### A- Production, purification et validation des protéines phosphomimétiques

Afin de connaître l'effet des phosphorylations sur les différents sites, il faut disposer de lots séparés de protéines phosphorylées et non-phosphorylées. En l'occurrence, deux sites de phosphorylation de RAD51 par c-Abl ayant été mis en évidence, il existe trois formes phosphorylées potentielles : sur Y54, sur Y315 ou sur Y54 et Y315 simultanément.

Pour ce faire nous avons choisi d'utiliser un modèle phosphomimétique. Ce type de modèle est fréquemment utilisé avec succès (**Pecina et al, 2010 ; Persaud et al, 2014**) et consiste à mimer la phosphorylation par un changement d'acides aminés. En effet, la phosphorylation en tyrosine se caractérise notamment par l'apport de charges négatives ( $\text{PO}_4^{2-}$ ). Ceci peut donc être mimé par le remplacement d'une tyrosine en glutamate qui porte, constitutivement, une charge négative ( $\text{COO}^-$ ).

De cette manière, à chaque niveau de phosphorylation correspond un mutant mimétique (**Tableau I**). Nous avons donc construit et produit les différents variants phosphomimétiques. L'utilisation de cette méthode nous a permis de nous affranchir de la labilité de la phosphorylation ainsi que du mélange de formes plus ou moins phosphorylées résultant d'une phosphorylation *in vitro*.

#### *1/ Construction de plasmides pour la production de phosphomimétiques*

Un plasmide d'expression procaryote pET15 codant pour RAD51 His tagguée a servi de matrice pour la réalisation de mutagénèses dirigées selon le protocole "Quick change direct mutagenesis". Ainsi les codons tyrosines (Y) en position 54 et 315 ont été remplacés par mutagénèse dirigée en codon glutamate (E) (**Figure 32**). De cette manière les plasmides codant pour RAD51 Y54E, RAD51 Y315E et RAD51 Y54/315E ont été générés. Les constructions obtenues ont été validées par séquençage.

Différents degrés de phosphorylation	Y54 Y315 Rad51	P-Y54 Y315 Rad51	Y54 Y315-P Rad51	P-Y54 Y315-P Rad51
Variant de Rad51 correspondant (sauvage ou phosphomimétiques)	Y54 Y315 Rad51	E54 Y315 Rad51	Y54 E315 Rad51	E54 E315 Rad51
Nom du variant	WT	Y54E	Y315E	Y54/315E

Tableau I : Tableau de correspondance des formes phosphorylées et des variants phosphomimétiques équivalents et de leurs noms.

	150		168	928		945									
<b>Rad51 WT</b>	GTT GCC TAT GCG CCA	...	CAAATC TAT GAC TCT												
<b>Rad51 Y54E</b>	GTT GCC GAG GCG CCA	...	CAAATC TAT GAC TCT												
<b>Rad51 Y315E</b>	GTT GCC TAT GCG CCA	...	CAAATC GAG GAC TCT												
<b>Rad51 Y54/315E</b>	GTT GCC GAG GCG CCA	...	CAAATC GAG GAC TCT												
	52	V	A	Y/E	A	P	56	...	313	Q	I	Y/E	D	S	317

Figure 32 : Alignement des séquences nucléotidiques des gènes codants pour les différents variants de RAD51.

En vert la séquence originelle non-modifiée, en rouge la séquence obtenue après modification.

De plus, une construction codant pour Y54/315F a été produite et validée de la même manière. Cette forme où les deux tyrosines sont mutées mais sans apport d'une charge négative sert de contrôle.

## *2/ Production et purification des variants de RAD51*

Un protocole de purification de RAD51-His disponible au laboratoire, a été optimisé pour permettre la production de quantités de RAD51 suffisantes à notre étude *in vitro*.

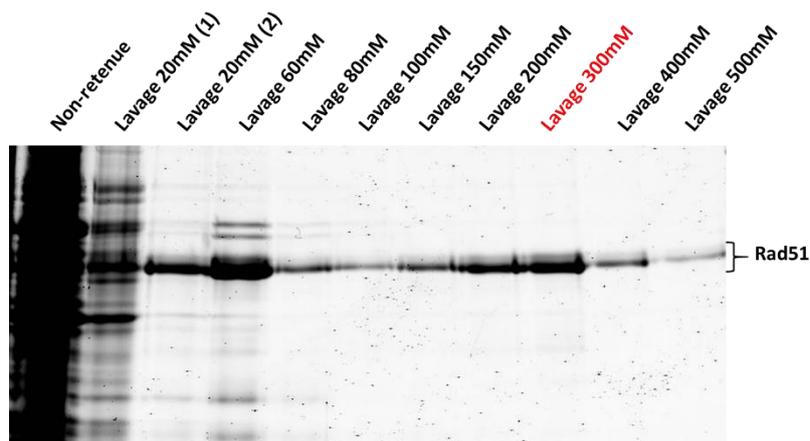
Le détail des étapes du protocole est disponible dans le matériel et méthode. Brièvement, His-RAD51 produite en bactérie est incubée sur colonne de NiNTA où elle s'accroche sur des billes de Nickel grâce à une affinité entre le Ni et le groupement imidazole des histidines. Après différents lavages RAD51 est éluée grâce à l'ajout d'une concentration importante d'imidazole. Ce dernier pouvant gêner lors de la réalisation des différents tests d'activité, il est retiré par dialyse. Un problème récurrent a été la précipitation de RAD51 à l'issue de la dialyse.

L'élément déclencheur de la précipitation correspond à l'élimination de l'imidazole par dialyse pendant laquelle la concentration passe de 500mM à environ 0mM. Nous avons émis l'hypothèse que cette diminution de concentration était trop brutale et pouvait être à l'origine de la précipitation.

Afin que le différentiel de concentration en imidazole soit moins important, nous avons cherché à optimiser sa concentration nécessaire à l'élution. Nous avons donc réalisé un gradient d'imidazole pour déterminer si RAD51 pouvait être éluée efficacement avec une concentration inférieure en imidazole (**Figure 33**).

Il apparaît que dès 300mM d'imidazole la majorité de RAD51 est éluée, suggérant que des concentrations supérieures en imidazole ne sont pas nécessaires. Nous avons donc diminué la concentration d'imidazole de 500mM à 300mM pour l'élution. Malgré le changement de cette condition d'élution la précipitation a eu lieu lors de la dialyse.

Nous avons donc cherché à fractionner la dialyse par des paliers successifs décroissants en concentration d'imidazole. Pour cela, nous avons établi 4 étapes : 225mM, 150mM, 75mM et enfin 0mM d'imidazole. Dans ces conditions aucune précipitation n'a été observée lors du palier à 225mM, à 150mM, ou à celui à 75mM. En revanche, lors du dernier palier de 75 à 0mM d'imidazole un précipité de RAD51 s'est formé. La réalisation de la dialyse en quatre étapes permet de retarder la précipitation mais pas de l'éviter.



**Figure 33 : Optimisation des conditions d'élution.**

La colonne contenant His-RAD51 fixée aux billes de Ni-NTA est lavée avec des conditions croissantes d'imidazole (20mM x2, 60mM, 80mM, 100mM, 150mM, 200mM, 300mM, 400mM et 500mM). Ce gel de SDS-PAGE présente la coloration de ces différentes fractions révélées par coloration au bleu de Coomassie.

	CTL	A	B	C	D
	C final	C final	C final	C final	C final
<i>Tris HCl 1M</i>	50mM	50mM	50mM	50mM	50mM
<i>NaCl 5M</i>	500mM		500mM	500mM	500mM
<i>KCl 3M</i>		500mM			
<i>Glycérol 100%</i>	20%	20%	10%	20%	20%
<i>Imidazole 5M</i>	225-150-75-0	225-150-75-0	225-150-75-0	225-150-75-0	225-150-75-0
<i>EDTA 0,5M</i>					1mM
<i>DTT 1M</i>				1mM	
<i><math>\beta</math>-mercapto EtOH</i>	2,8mM	2,8mM	2,8mM		2,8mM
<b>PRECIPITATION</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI (atténuée)</b>	<b>NON</b>

**Tableau II : Variations de la composition du tampon de dialyse pour éviter la précipitation de RAD51.**

Le tableau présente la composition des différentes solutions de dialyse testées. La solution CTL est celle de référence. Dans le tampon A, le NaCl a été remplacé par du KCl. Dans le tampon B, la concentration du glycérol est de 10% au lieu de 20%. Dans le tampon C, le  $\beta$ -mercaptoéthanol est remplacé par du DTT. Dans le tampon D, de l'EDTA est ajouté à raison de 1mM final. La présence ou l'absence de précipitation à la fin de la dialyse est indiquée en bas de tableau.

L'analyse comparative de la composition des tampons avec les données de la littérature a permis de proposer plusieurs modifications. Plusieurs éléments du mélange ont ainsi été sélectionnés : le KCl utilisé à la place du NaCl, le DTT utilisé à la place du  $\beta$ -mercaptoéthanol, le pourcentage de glycérol et la présence d'EDTA. Nous avons donc réalisé des dialyses avec différentes compositions de tampons en faisant varier ces 4 facteurs et surveillé la précipitation (**Tableau II**).

Le remplacement de NaCl par KCl, ou le changement de 20 à 10% de glycérol, n'ont eu aucun effet sur la précipitation. En revanche, le remplacement du  $\beta$ -mercaptoéthanol par le DTT a semblé diminuer le niveau de précipitation, sans l'abolir. La présence d'EDTA dans le tampon de dialyse apparaît être le paramètre le plus important pour limiter la précipitation de RAD51.

Nous avons donc pu établir les conditions optimales pour produire et purifier les différents variants de RAD51. La purification a été validée par SDS-PAGE et par électrophorèse. Les protéines ainsi obtenues sont toutes pures à plus de 95% (**Figure 34**).

Il est intéressant de noter que les formes Y54E et Y54/315E migrent un peu moins loin que les formes WT et Y54/315E. Il a déjà été montré qu'une charge négative selon sa position dans la protéine peut modifier plus ou moins sa migration en SDS-PAGE (**Lee et al, 2013**).

Nous avons ainsi produit et purifié les variants phosphomimétiques :

RAD51 WT ; RAD51 Y54E ; RAD51 Y315E ; RAD51 Y54/315E.

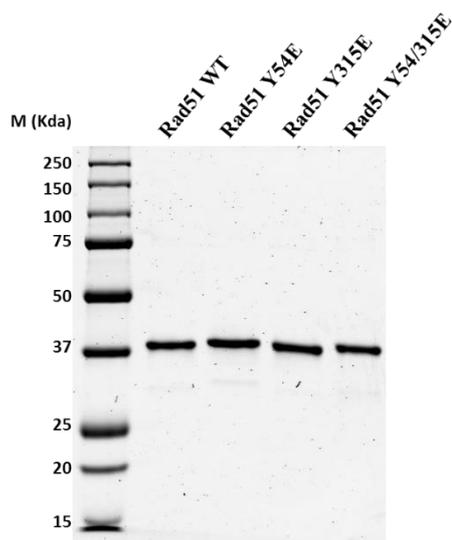
De plus, deux protéines contrôles ont également été produites :

RAD51 Y54/315F et RAD51 A190/192L (=mutant Non Polymérisable NP (**Yu et al, 2003**))

### *3/ Vérification de la non-désorganisation de la structure*

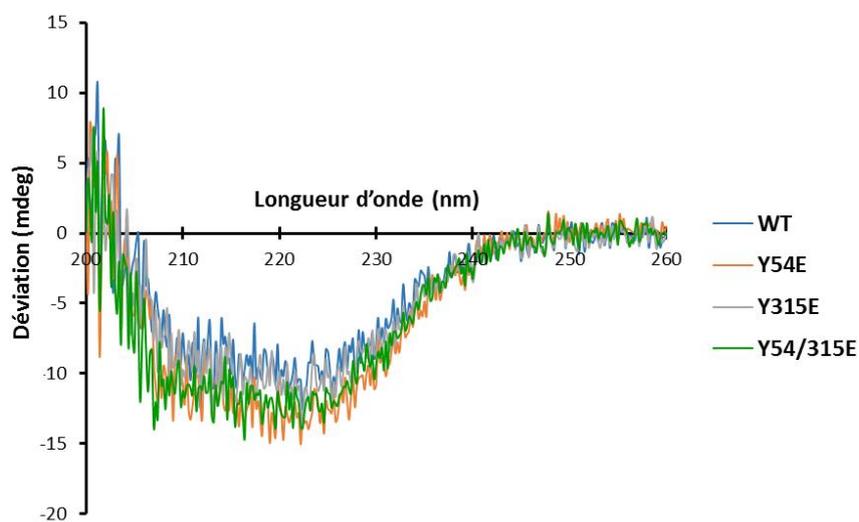
La modification d'un acide aminé n'est pas un processus anodin et peut avoir des conséquences importantes sur la structure de la protéine. L'apport de charges négatives peut induire de faibles changements conformationnels. Mais il faut vérifier qu'il n'y a pas eu de désorganisation totale de la protéine. Afin de vérifier l'intégrité structurale de RAD51 suite aux modifications phosphomimétiques, une analyse de la structure secondaire a été réalisée par dichroïsme circulaire (DC).

Rappelons que chaque protéine génère par dichroïsme circulaire un spectre révélateur de sa composition en feuillets betas, hélices alphas et structures non-organisées.



**Figure 34 : Analyse en SDS-PAGE des différents variants phosphomimétiques purifiés**

RAD51 WT, Y54E, Y315E et Y54/315E ont été déposées sur gel SDS-PAGE 12% après purification. Après migration les protéines ont été révélées par coloration au bleu de coomassie.



**Figure 35 : Spectres de dichroïsme circulaire de RAD51 WT, Y54E, Y315E et Y54/315E.**

Les RAD51 (WT ; Y54E ; Y315E ; Y54/315E) à 1mg/mL ont été analysées par DC avec une lecture optique de 1cm à 20°C dans un tampon TrisHCl à 20mM.

Les spectres de dichroïsme circulaire des différents mutants phosphomimétiques sont comparés à celui de la forme sauvage (**Figure 35**). Aucune différence importante n'est observée entre les variants. C'est donc que la structure secondaire est globalement bien préservée et qu'elle n'a pas été complètement perturbée par les modifications phosphomimétiques. De légères variations au niveau de l'amplitude sont néanmoins visibles entre le sauvage et les formes Y54E et Y54/315E. Ces légères modifications peuvent être le marqueur d'un changement de la structure quaternaire donc de leur auto-association.

### **B- La double modification phosphomimétique entraîne une perte quasi totale de l'activité d'échange de brins**

Des tests permettent de suivre l'activité d'échange de brins homologues de RAD51. Ces manipulations reflètent l'activité totale de RAD51 puisqu'elles nécessitent le bon déroulement de toutes les étapes (fixation de l'ADNsb, fixation de l'ATP, oligomérisation).

#### *1/ Le test d'échange de brins révèle un effet inhibiteur de la double modification phosphomimétique*

Le premier test réalisé est le test d'échange de brins. Il repose sur la mise en présence de RAD51 avec deux ADN : tout d'abord avec un ADNsb marqué de 58mer, puis un ADNdb de 32pb homologue. L'activité de RAD51 se traduit par un échange de brins entraînant le remplacement du brin homologue par la sonde marquée. L'ADNdb marqué ainsi formé peut être visualisé sur gel d'électrophorèse où il migre moins loin que l'ADNsb marqué libre (**Figure 36A**).

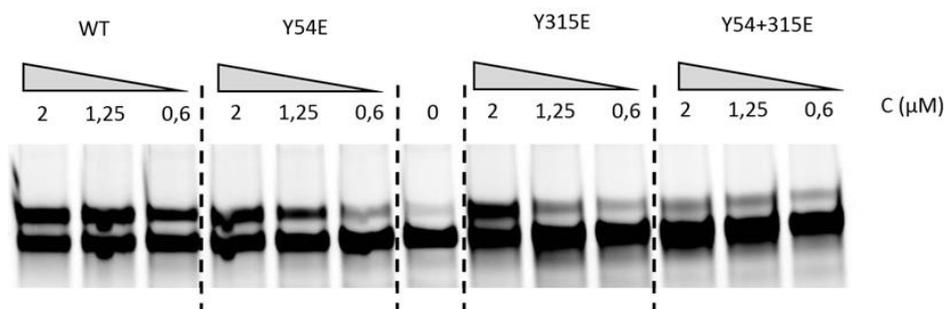
En absence de RAD51 (puits 0 **Figure 36B**), seul l'ADNsb marqué est visualisé. L'activité de RAD51 WT nous sert de référence. Elle est caractérisée par une augmentation de la formation d'ADNdb marqué avec des concentrations croissantes en RAD51. Cette augmentation débute dès 0,5 $\mu$ M de RAD51, puis progresse jusqu'à 3 $\mu$ M, après quoi elle atteint un plateau (**Figure 36B**).

L'activité des mutants mono-phosphomimétiques est similaire à celle de la forme sauvage. Sauf à 0,5 $\mu$ M, où les activités de RAD51 Y54E et de RAD51 Y315E semblent légèrement plus faibles que pour le sauvage. Cette différence n'est toutefois pas statistiquement significative. Par contre, le mutant di-phosphomimétique ne possède quasiment pas d'activité d'échange de brins, qui reste faible même à 3 $\mu$ M de RAD51 (**Figure 36C**).

A.



B.



C.

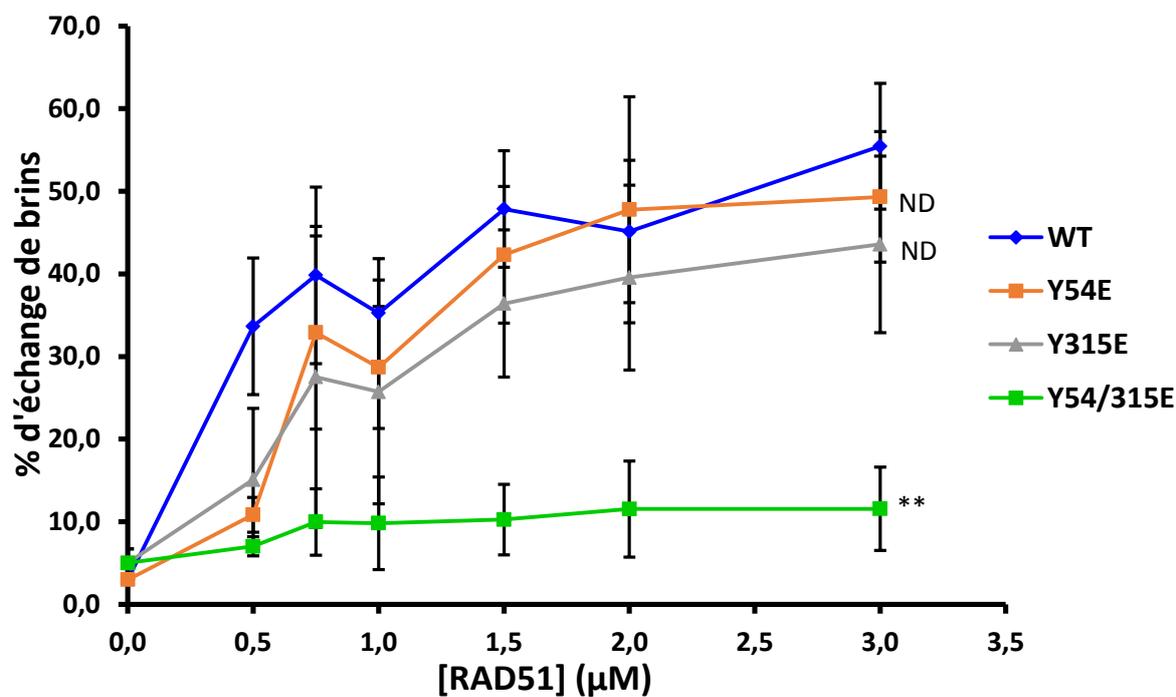


Figure 36 : La modification phosphomimétique empêche l'activité recombinase.

A. Principe du test d'échange de brins. B. Gel d'agarose révélant les produits marqués du test d'échange de brins pour les protéines RAD51 WT, Y54E, Y315 et Y54/315E. C. Pourcentage d'échange de brins selon la concentration en RAD51 ; n=4 répétitions. (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ )

Nous avons donc mis en évidence une perte d'activité de RAD51 lorsque les deux modifications phosphomimétiques sont présentes. Il ne s'agit pas d'un effet cumulatif car aucune des deux modifications effectuées séparément ne semble entraîner de diminution importante de l'activité de formation d'échange de brins.

*2/ Le D-loop assay confirme la diminution d'activité de RAD51 par la double modification phosphomimétique*

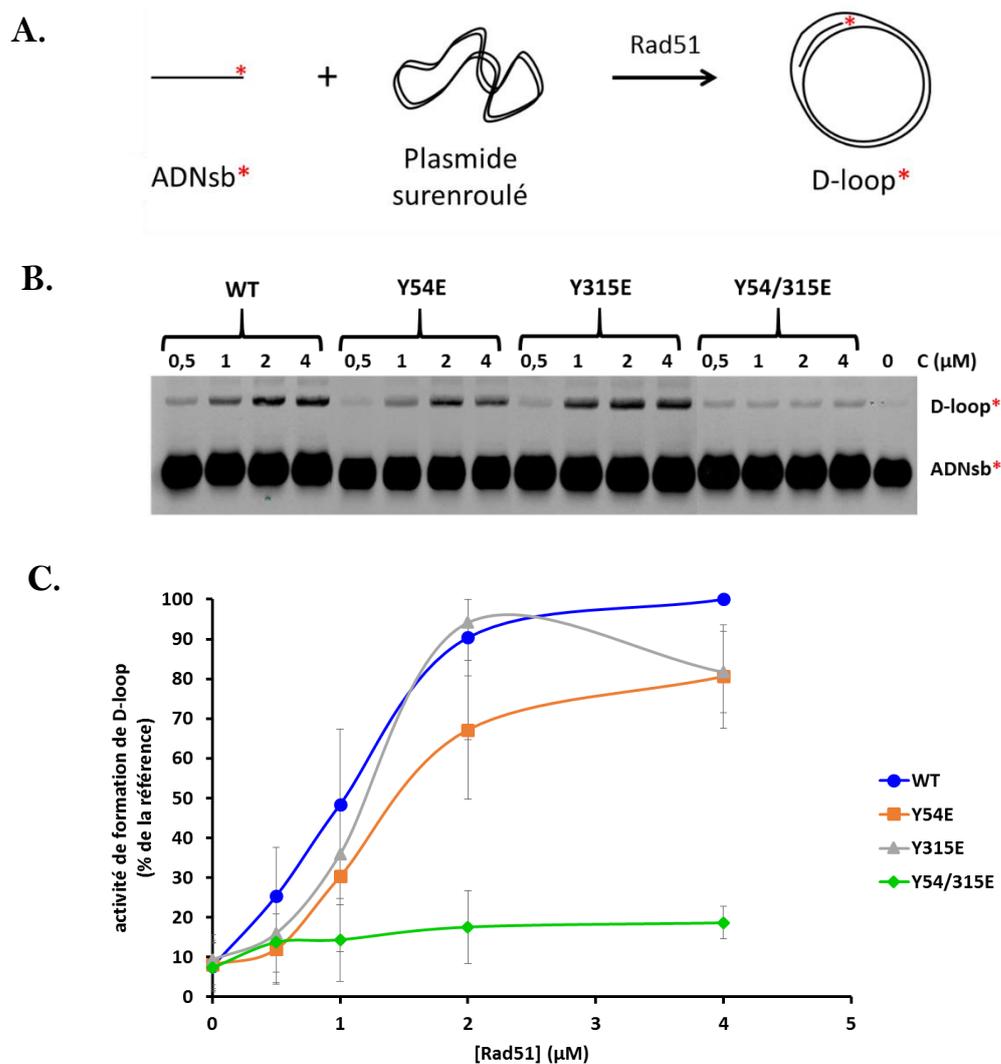
Dans le but de valider le résultat obtenu précédemment, un deuxième test d'activité générale de RAD51 est réalisé : le D-loop assay. Selon un principe similaire, RAD51 est mise en contact avec un ADNsb marqué puis avec un plasmide surenroulé d'ADNdb contenant une séquence homologe. Si RAD51 est active elle catalyse une invasion du plasmide par la sonde d'ADNsb marqué. La structure d'ADN triple brin formée est appelée D-loop (**Figure 37A**). La différence de taille entre l'ADNsb et la D-loop permet une séparation nette par migration sur gel. Cette technique est habituellement effectuée à l'aide d'une sonde radiomarquée et nous l'avons adaptée pour une détection en fluorescence (voir Annexe 4).

La réalisation du D-loop assay sans RAD51 montre uniquement la présence d'ADNsb marqué. L'ajout de concentrations croissantes de RAD51 WT entraîne une augmentation de formation de D-loop. A 0,5 $\mu$ M de RAD51 la D-loop est faible, puis elle augmente jusqu'à 2 $\mu$ M pour atteindre un plateau entre 2 et 4 $\mu$ M de RAD51 (**Figure 37B**).

Les formes mono-phosphomimétiques en Y54 ou en Y315 montrent un profil assez similaire à celui du WT. Les résultats obtenus sur gel ont été quantifiés et sont exprimés en pourcentage de l'activité maximale observée pour RAD51 WT à 4  $\mu$ M (**figure 37C**). Il semblerait que l'activité D-Loop soit légèrement moins importante pour les formes mono-phosphomimétiques. Mais les différences sont faibles et non statistiquement significatives entre ces mutants et la forme sauvage (**Figure 37C**).

En revanche, lorsque les deux modifications phosphomimétiques sont présentes l'augmentation de la concentration ne s'accompagne pas de formation de D-loop. Un très léger signal est visible dès 0,5 $\mu$ M de RAD51 mais il reste stable jusqu'à 4 $\mu$ M. La diminution d'activité par rapport à la forme sauvage est importante et statistiquement significative (**Figure 37C**).

Ces résultats sont en parfaite cohérence avec ceux de l'expérience d'échange de brins. Ils montrent que lorsque RAD51 possède deux modifications phosphomimétiques en Y54 et en Y315 simultanément, elle perd son activité intrinsèque d'échange de séquences homologues.



**Figure 37 : La modification di-phosphomimétique empêche la réalisation de D-loop.**

A. Schéma simplifié de la réaction de D-loop montrant les substrats et les produits de la réaction d'échange de brins catalysée par RAD51. B. Gel d'agarose 1% révélant les produits marqués du test D-loop pour les protéines RAD51 WT, Y54E, Y315 et Y54/315E. C. Graphique présentant la répétition de l'expérience B 4 fois. (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ )

*3/ La double mutation des résidus Y54 et Y315 sans apport de charge négative ne suffit pas à inactiver RAD51*

Afin de vérifier que l'effet observé sur l'activité de RAD51 est bien lié à l'apport de charges négatives et pas au simple fait de muter les résidus, le test de D-loop a également été réalisé avec le mutant Y54/315F (**Figure 38A**). L'activité de RAD51 est fortement diminuée par la modification Y54/315E, mais pas par la modification Y54/315F (**Figure 38B**).

La modification des sites Y54 et Y315 simultanément ne suffit donc pas à expliquer la très forte inhibition de l'activité d'échange de brins.

*4/ Les effets observés ne sont pas liés à un effet de lot*

RAD51 est une protéine thermosensible. Pour prévenir tout biais lié à un lot qui aurait été inactivé, nous avons réalisé une seconde série de purifications pour chaque variant de RAD51 afin de déterminer s'il y avait une différence entre anciens et nouveaux lots.

Les différents lots ont été testés pour leur activité d'échange de brins ou de fixation à l'ADNsb. Aucune différence significative n'est observée entre RAD51 des deux séries de purification (**Figure 39**).

**Ces expériences ont montré que les modifications mono-phosphomimétiques ne semblaient pas avoir d'effet sur l'activité d'échange de brins de RAD51. En revanche, la combinaison des deux modifications phosphomimétiques ensemble entraîne une diminution drastique de l'activité d'échange de brins.**

**Cette réduction peut être liée à un défaut de n'importe laquelle des étapes de l'activité de RAD51. C'est pourquoi nous avons analysé les différentes étapes en amont de l'échange de brins.**

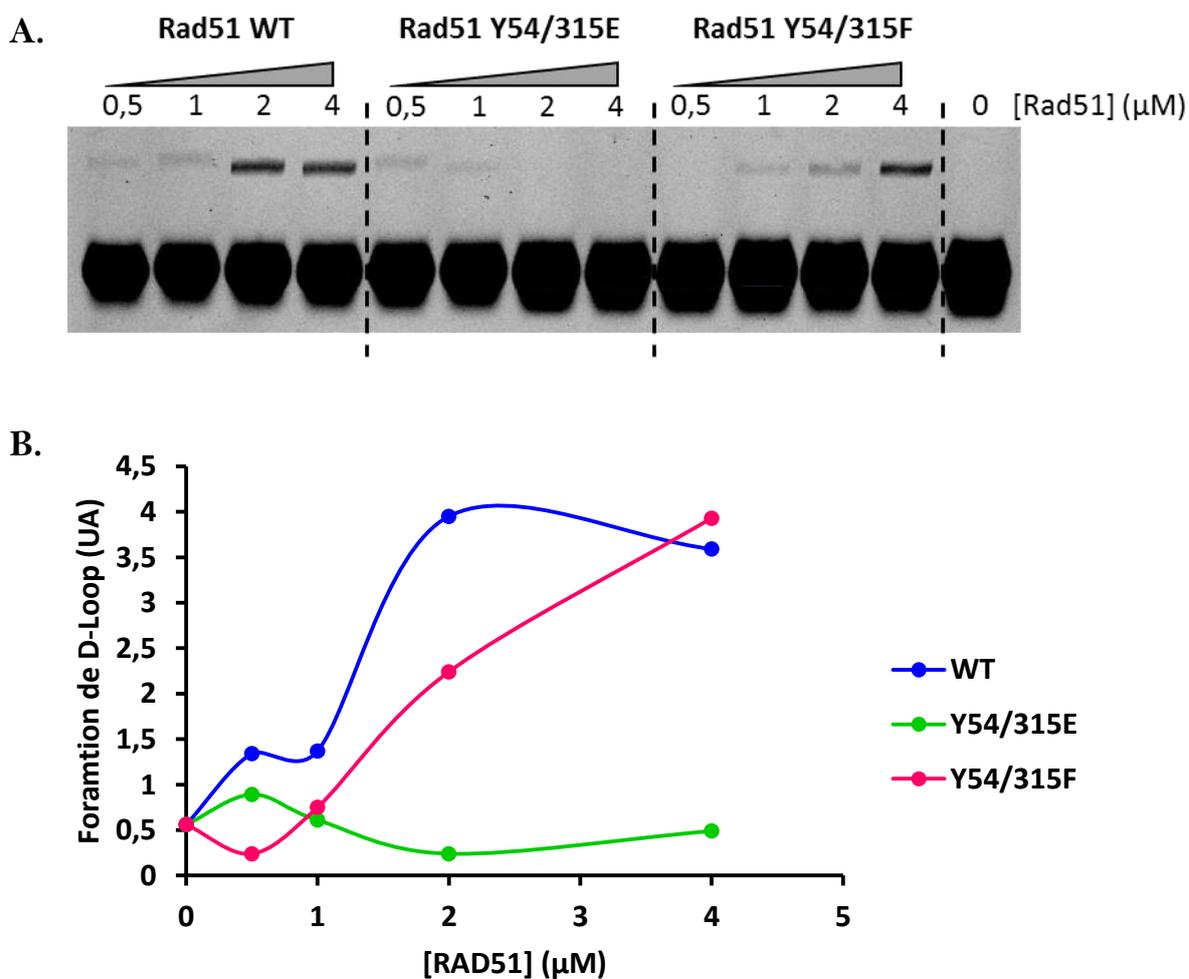


Figure 38 : La double modification Y54/315F est toujours capable de former des structures D-loop.

A. Test D-loop pour les protéines RAD51 WT, Y54/315E et Y54/315F. B. Formation de D-loop selon la concentration en RAD51.

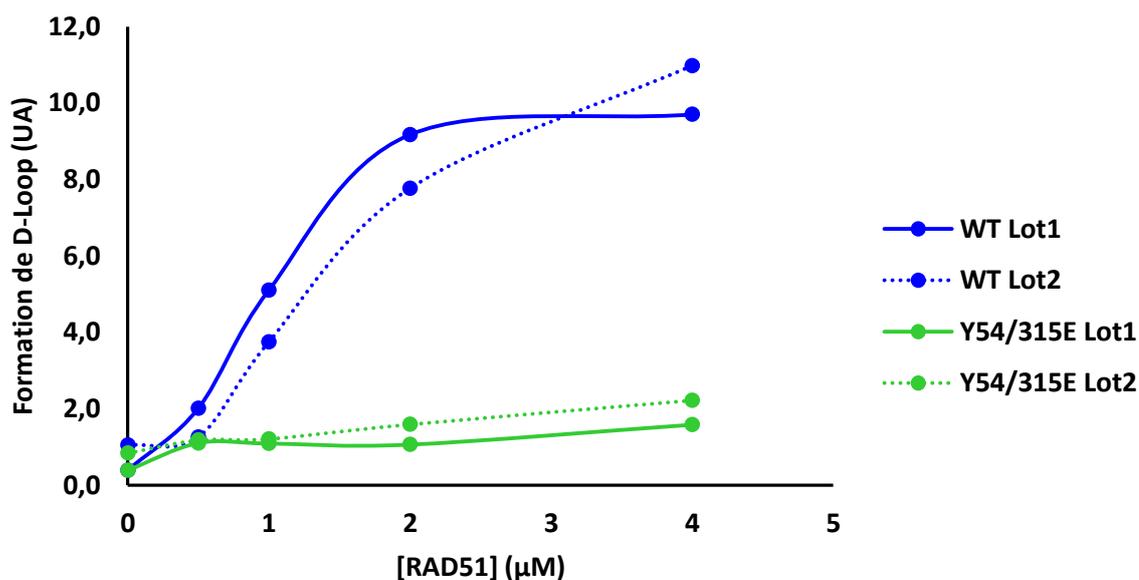


Figure 39 : Les effets observés ne sont pas dus à un biais de lots.

Test D-loop réalisé avec deux lots de RAD51 WT et deux lots de RAD51 Y54/315E.

## C- La liaison à l'ADNsb de RAD51 est grandement réduite par la double modification phosphomimétique

### *1/ Validation technique de l'utilisation du Blitz pour suivre la fixation de RAD51 à l'ADNsb*

L'utilisation du Blitz pour étudier l'interaction RAD51-ADN n'a pas encore été décrite dans la littérature à notre connaissance. Il nous a donc fallu réaliser des vérifications quant à la possibilité de suivre la fixation de RAD51 à l'ADNsb par cette méthode. Nous ne détaillerons ici que les étapes de la mise au point qui nous ont semblé les plus importantes dans la mise en place de cette nouvelle approche.

Un ADNsb biotynilé est fixé sur un tip recouvert de streptavidine. Le tip est plongé successivement dans une solution contenant RAD51 puis sans RAD51 ce qui permet de suivre l'association et la dissociation de RAD51 à l'ADNsb. Plus il y a de RAD51 fixée, plus le signal est important.

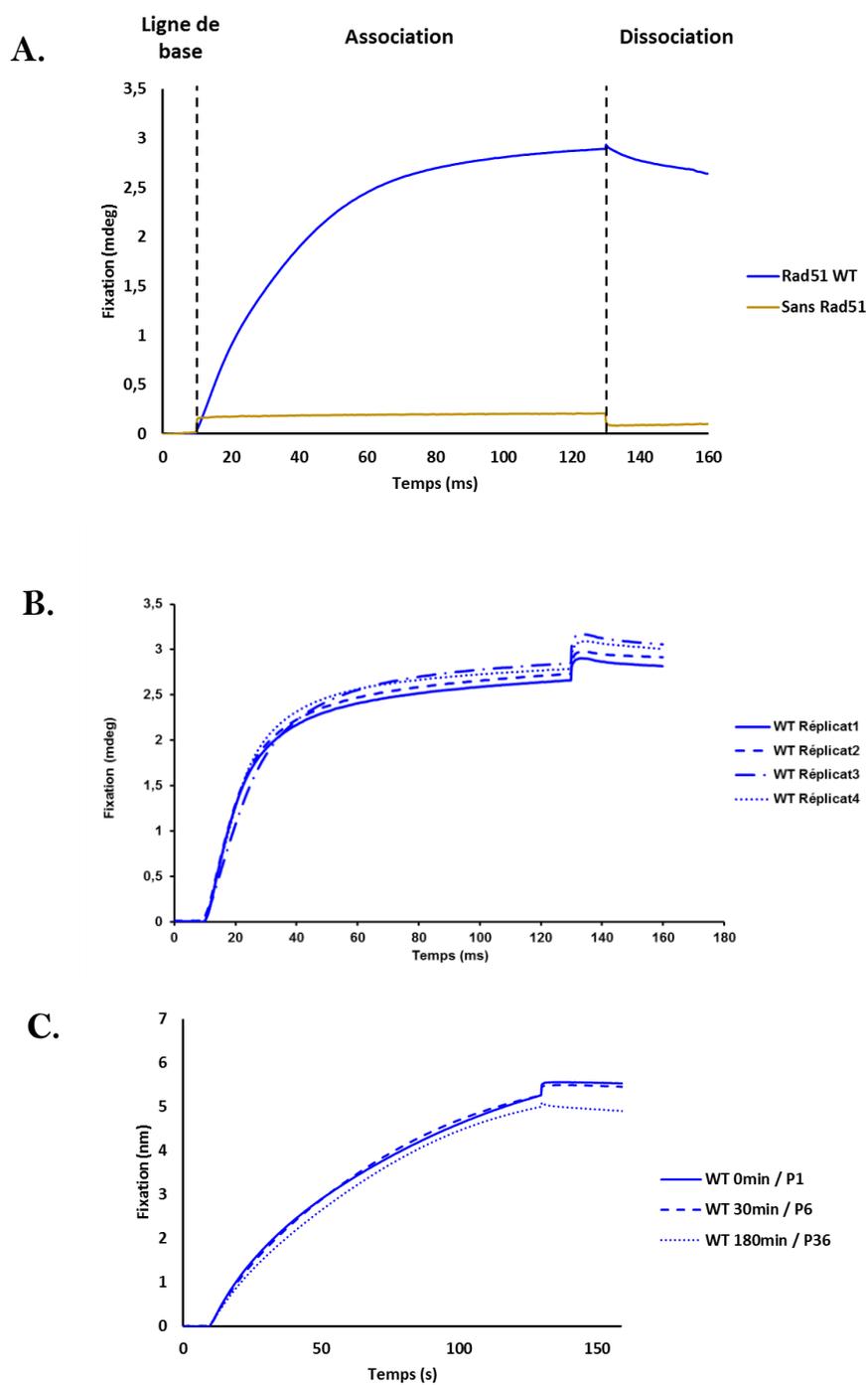
La **Figure 40A** présente l'exemple de la fixation de RAD51 WT. Pendant la ligne de base le signal est stable. L'immersion du tip dans la solution contenant RAD51 conduit à une augmentation du signal. Celle-ci est presque linéaire jusqu'à 50s puis s'infléchit pour atteindre un plateau : c'est l'étape d'association correspondant à la formation du nucléofilament de RAD51.

Le tip est alors plongé dans une solution tampon sans RAD51. Le signal baisse très progressivement : c'est l'étape de dissociation caractéristique de la dissociation du nucléofilament.

Ce profil typique est identique à ce qui peut être obtenu en résonance plasmonique de surface (SPR). L'ajout de tampon de stockage de RAD51 seul en absence de la protéine ne donne aucune augmentation ni diminution de signal.

Nous avons donc établi que nous pouvions observer la fixation de RAD51 à l'ADNsb par l'approche Blitz. Par la suite il était important de montrer que ce résultat est reproductible et stable dans le temps de réalisation d'une expérience.

Afin de tester la reproductibilité de l'expérience, différents échantillons de RAD51 ont été préparés en parallèle et analysés successivement. Les profils obtenus pour les échantillons différents sont parfaitement similaires (**Figure 40B**). Ce qui indique la bonne reproductibilité des résultats.



**Figure 40 : Validation de la technique de Blitz pour suivre la fixation de RAD51 à l'ADNs<sub>b</sub>**

**A.** Fixation avec ou sans RAD51 **B.** Essais de reproductibilité. **C.** Conservation du signal avec le temps et les passages successifs (Px = passage x)

L'analyse successive d'un nombre important d'échantillons peut entraîner un délai conséquent entre le premier et le dernier tube analysé. Pour savoir si le temps et/ou le passage successif d'un grand nombre d'échantillons pouvait influencer le signal obtenu nous avons analysé le même échantillon une première fois (t=0min) puis après 6 passages (t=30min) et après 36 passages (t=180min). Les 3 profils sont très similaires (**Figure 40C**). Une légère augmentation de la dissociation peut être observée après 6 passages et 180min d'expérimentation mais ces différences restent minimales.

*2/ La liaison à l'ADNsb de RAD51 est grandement réduite par la double modification phosphomimétique*

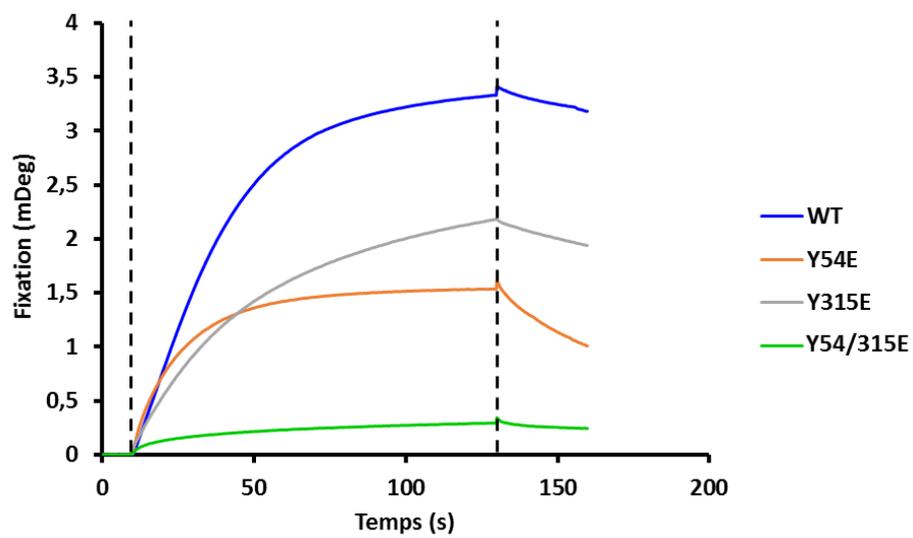
L'ajout de tampon seul sans RAD51 ne modifie pas le signal au cours du temps : il reste au niveau de la ligne de base. Dès lors que RAD51 WT est ajoutée, le signal augmente indiquant la fixation de RAD51 à l'ADNsb (**Figure 41**). L'augmentation a un profil sigmoïde et atteint un plateau. Lors de la phase de dissociation, le signal diminue de manière très progressive.

Les mono-phosphomimétiques fixent moins bien l'ADNsb que la forme sauvage. La modification Y315E diminue la vitesse d'association et le plateau semble plus bas que celui du WT. Le plateau est également plus bas pour la modification Y54E, mais les vitesses d'association et de dissociation sont plus élevées que pour le sauvage. Dans les deux cas, le plateau plus bas indique que moins de RAD51 se sont fixées sur l'ADNsb. La modification di-phosphomimétique affecte nettement la fixation à l'ADNsb. En effet le signal obtenu est très faible, à peine plus élevé que la ligne de base. Les paramètres d'association et de dissociation ne sont pas mesurables.

Cette expérience montre que les modifications mono-phosphomimétiques affectent la fixation à l'ADNsb. Le nucléofilament se forme mais il semble contenir moins de RAD51. L'association de RAD51 à l'ADNsb est particulièrement compromise par la modification di-phosphomimétique.

Afin de confirmer ces résultats nous avons voulu suivre la fixation à l'ADNsb par une autre méthode : le gel retard (EMSA : ElectroMobility Shift Assay). L'association de RAD51 à l'ADN alourdit l'ADNsb et donc ralentit sa migration dans le gel d'agarose.

Pour limiter la dissociation des complexes protéines/ADN lors de la migration électrophorétique, nous les avons fixés au préalable avec du glutaraldéhyde 0,5%.



**Figure 41 : La modification di-phosphomimétique entraîne une très forte diminution de la fixation à l'ADNsb.**

Profil d'interaction de RAD51 WT, Y54E, Y315E ou Y54/315E avec un ADN polydT de 58 bases. Ligne de base 10s, association 120s, dissociation 30s.

L'ajout d'une étape de fixation soulève la question de la formation de complexes aspécifiques protéine-ADN. Dans le but de confirmer que les retards d'ADN étaient bien représentatifs d'une association spécifique entre RAD51 et l'ADN, nous avons réalisé le même test mais avec une protéine ne possédant pas d'affinité particulière pour l'ADN. La protéine choisie est la BSA. Ainsi de la BSA à 1 $\mu$ M est incubée en présence d'ADN et subit le traitement de fixation par le glutaraldéhyde comme les autres échantillons. Le profil de migration obtenu avec le puits « contrôle BSA » est identique au puits « 0 » sans protéine : seul l'ADNsb libre est visible (**Figure 42A**).

Dès 0,06 $\mu$ M de RAD51 WT, un shift de migration est observé montrant son association à l'ADN. A partir de 0,5 $\mu$ M tout l'ADN est retardé, indiquant qu'il est sous forme complexé avec RAD51. Les modifications Y54E et Y315E montrent une fixation dès 0,06 $\mu$ M et est complète à 1 $\mu$ M. La modification Y54/315E semble assez proche du sauvage, la fixation débute à 0,06 $\mu$ M et est complète quasiment dès 0,25 $\mu$ M (**Figure 42B**).

Au final, il semblerait que les modifications mono-phosphomimétiques induisent une légère diminution de la fixation à l'ADNsb comme nous avons pu l'observer en Blitz. Par contre, le résultat obtenu pour RAD51 Y54/315E semble contradictoire avec celui de Blitz car la fixation n'était alors pas observée tandis qu'elle semble efficace ici.

Le résultat d'EMSA montre une fixation de RAD51, mais pas la taille du nucléofilament, c'est-à-dire, le nombre de monomères de RAD51 par brins d'ADN. Tandis que l'expérience de Blitz renseigne directement sur le nombre de monomères associés à l'ADNsb, l'intensité du signal étant proportionnelle à la prise de masse. Nous pouvons poser l'hypothèse que la différence observée entre les deux résultats puisse être liée à une différence du niveau de polymérisation de RAD51. Le double mutant di-phosphomimétique est capable de fixer l'ADNsb ce qui permet un retard de l'ADN fixé. Toutefois, il pourrait ne pas être capable de se polymériser autour de l'ADNsb et donc le signal de Blitz traduisant l'accumulation reste très faible. En outre les expériences ne sont pas réalisées sur les mêmes échelles de temps : 2min pour le blitz et 20min pour l'EMSA. L'aspect dynamique du Blitz permet sans doute d'avoir une vue plus fine des mécanismes.

Ces résultats nous amènent à vouloir déterminer l'effet des modifications phosphomimétiques sur le niveau de polymérisation de RAD51.

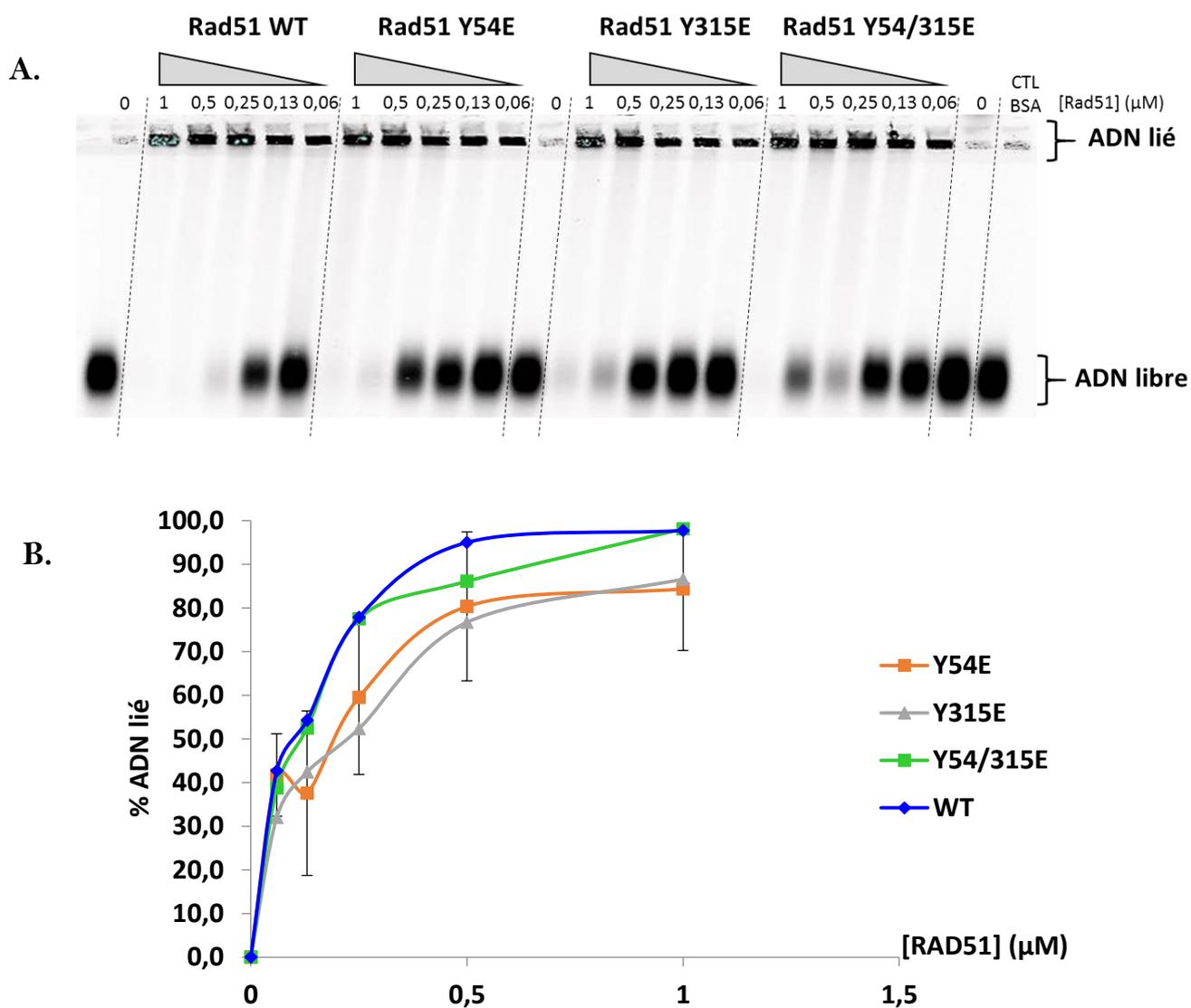


Figure 42 : Aucune différence significative de fixation à l'ADNsb n'est observée en EMSA selon les modifications phosphomimétiques.

A. EMSA sur gel d'agarose 1%, fixation de RAD51 WT, Y54E, Y315E ou Y54/315E à un ADNsb 58mer-IRD800. Les puits 0 sont sans RAD51.

## D- La modification di-phosphomimétique prévient la polymérisation de RAD51

*1/ La mauvaise polymérisation de RAD51 pourrait être une explication pour l'absence de formation du nucléofilament*

Pour tester l'idée que la faible fixation de RAD51 Y54/315E à l'ADNsb puisse être liée à un défaut de polymérisation, nous l'avons comparée en Blitz avec la forme sauvage pré-incubée avec un peptide BRC4, un inhibiteur de polymérisation, ou avec un mutant A190/192L (NP) incapable de polymériser.

L'absence de polymérisation, par l'un ou l'autre des modèles, résulte en une chute drastique de la fixation à l'ADNsb. Le profil est donc similaire entre RAD51NP, RAD51WT+BRC4 et RAD51 Y54/315E (**Figure 43A&B**). Ces résultats ne prouvent pas directement que la polymérisation de RAD51 soit affectée par la double modification phosphomimétique mais ils montrent que cette hypothèse est tout à fait cohérente.

*2/ La migration en conditions non-dénaturantes semble indiquer que la polymérisation est fortement diminuée par la modification di-phosphomimétique*

Afin d'évaluer le niveau de polymérisation de RAD51 nous avons réalisé une migration PAGE en conditions natives. RAD51 WT montre un profil de migration avec des formes majoritairement en haut du gel. L'incubation préalable de RAD51 avec BRC4 modifie totalement le profil puisque l'essentiel de la protéine se retrouve beaucoup plus bas (**Figure 44A**). Ces données suggèrent donc que des formes très polymérisées sont visibles dans la partie supérieure de gel tandis que des formes oligomériques sont présentes dans la partie inférieure du gel. Cette technique permet donc de suivre le niveau de polymérisation de RAD51.

Les profils obtenus pour les différents variants montrent un effet variable des modifications phosphomimétiques (**Figure 44B**). Les modifications mono-phosphomimétiques montrent un très léger décalage vers le bas de la migration de RAD51. Ceci indique que le niveau de polymérisation est légèrement modifié mais reste proche de celui du sauvage. A contrario, la modification Y54/315E induit un très net décalage vers le bas indiquant un niveau de polymérisation moins important que précédemment.

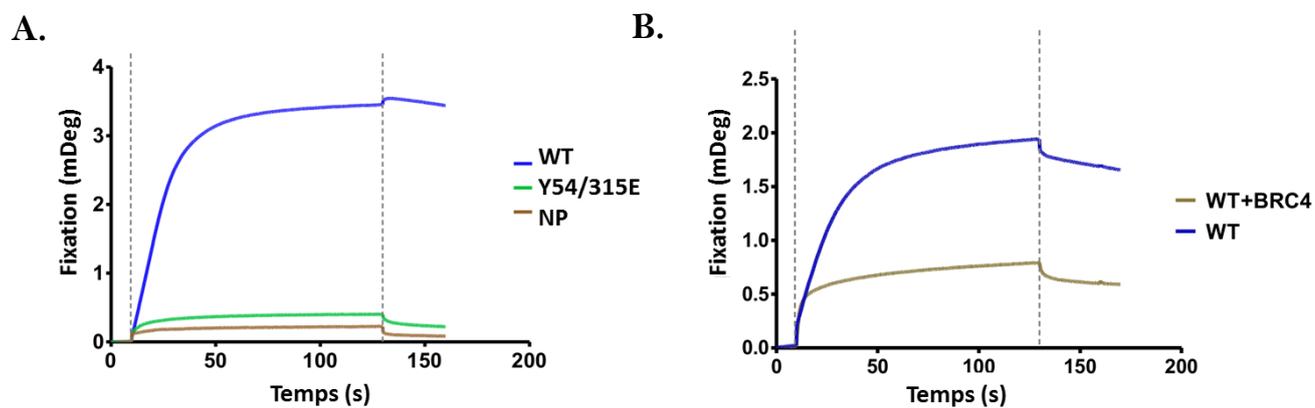


Figure 43 : L'absence de polymérisation en blitz conduit à une réduction très importante du signal.

A. Cinétique d'association et de dissociation de RAD51 WT, Y54/315 ou Non-Polymérisable (NP) par Blitz. B. Cinétique d'association et de dissociation de RAD51 WT en présence ou en absence de l'inhibiteur de polymérisation BRC4.

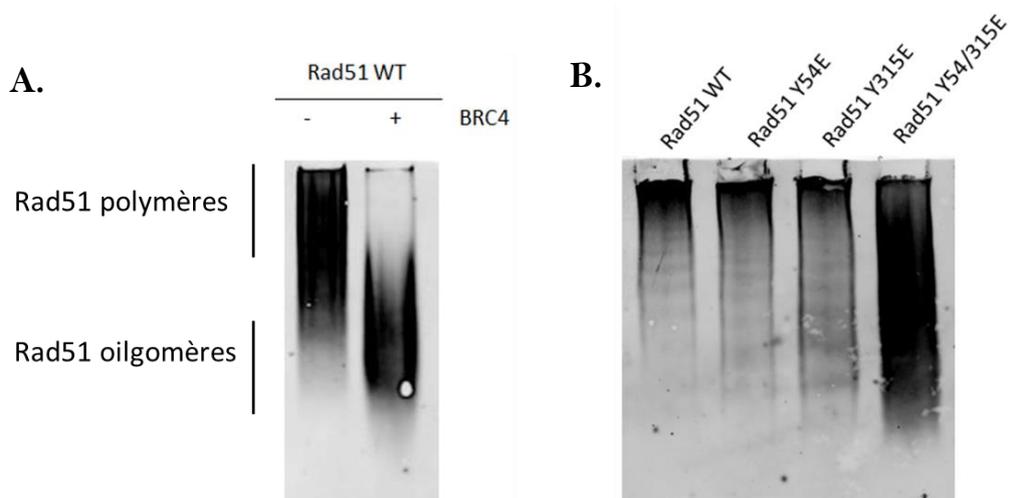


Figure 44 : Le niveau de polymérisation du variant di-phosphomimétique semble moins important en gel non-dénaturant.

A. Migration native de RAD51 en présence ou en absence de l'inhibiteur de polymérisation BRC4. B. Migration native de RAD51 WT, Y54E, Y315E, Y54/315E.

*3/ Des résultats préliminaires d'exclusion-diffusion semblent confirmer la diminution du niveau de polymérisation de la forme di-phosphomimétique*

La chromatographie d'exclusion-diffusion permet de séparer les polymères selon leur taille. Les formes les moins polymérisées, parcourant un chemin plus long, sont éluées plus tardivement que les formes très polymérisées. Les expériences présentées ici sont en cours de réalisation et restent à confirmer.

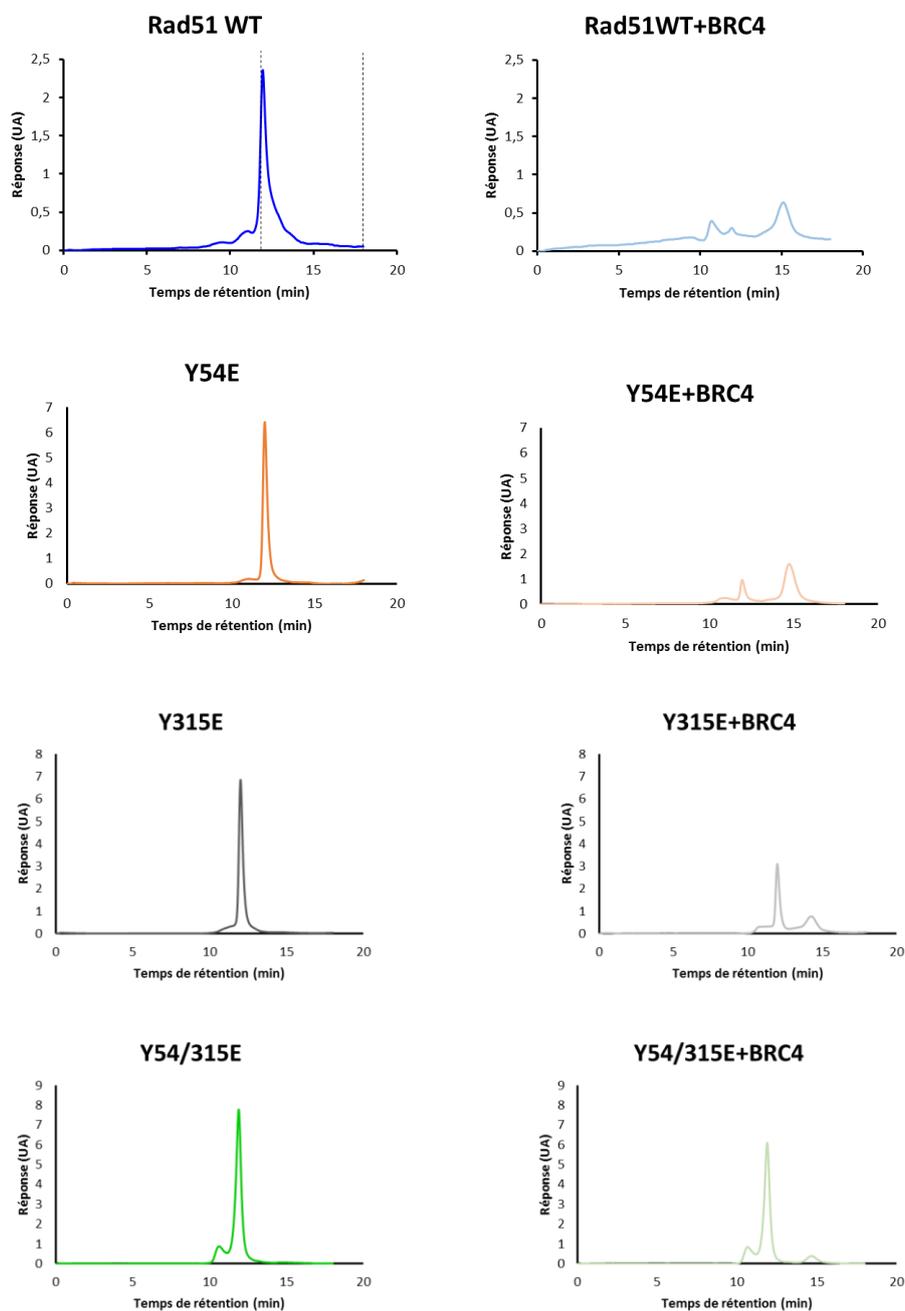
RAD51 est pré-incubée ou non avec l'inhibiteur de polymérisation BRC4. Afin de stabiliser les complexes un agent pontant (BS3) est ajouté. Puis les échantillons sont injectés dans la colonne. Le profil de la forme sauvage en absence de BRC4 montre un pic à 12 min correspondant au volume mort (**Figure 45**). Ces complexes protéiques de très haut poids moléculaire sont donc passés à l'extérieur des billes et ont une taille supérieure ou égale à 500 kDa. Il correspond donc des complexes contenant un grand nombre de RAD51. Ce pic est le seul détectable jusqu'à la limite inférieure de 10kDa. En présence de BRC4 le pic à haut poids moléculaire est fortement réduit tandis qu'un pic à 15min est nettement visible. Ce temps de rétention correspondrait à 70kDa proche d'une forme dimère de RAD51. L'ajout de BRC4 a permis de passer de formes très polymérisées à peu polymérisées. Le niveau de polymérisation peut donc être estimé par la réponse au BRC4.

La même expérience est conduite avec les variants phosphomimétiques afin de tester leurs réponses au BRC4. Pour la forme Y54E elle est très semblable au sauvage, avec une dissociation nette de formes à très haut poids moléculaire en présence de BRC4. La forme Y315E répond au BRC4, bien que le transfert de RAD51 des hauts poids moléculaires aux bas poids soit moins important que pour la forme sauvage. Finalement, la forme Y54/315E ne répond pas du tout au traitement BRC4 et les protéines restent à très haut poids moléculaire.

Ces premiers résultats demandent des points d'éclaircissement sur la nature des formes à très haut poids moléculaire que nous soupçonnons d'être des formes agrégées de RAD51. Ce qui ne correspondrait pas à des formes fonctionnelles. En se basant sur la réponse au BRC4, il semblerait que le niveau de polymérisation de RAD51 est diminué en présence de la modification di-phosphomimétique.

Nous disposons d'un faisceau d'éléments qui suggèrent un défaut de polymérisation de la part de la forme Y54/315E. La confirmation ultérieure de ces résultats fournirait une

hypothèse solide permettant d'expliquer le défaut de fixation et d'échange de brins lié à la modification di-phosphomimétique.



**Figure 45 : La forme Y54/315E semble moins bien répondre à BRC4 en HPLC.**

A. HPLC de RAD51 WT en présence ou en absence de l'inhibiteur de polymérisation BRC4. B. de RAD51 Y54E C. de RAD51 Y315E D. de Y54/315E.

### **E- La fixation et l'hydrolyse de l'ATP sont affectées par les modifications phosphomimétiques mais ne permettent pas d'expliquer la perte d'activité spécifique au di-phosphomimétique**

L'ATP est un élément important pour la cohésion du nucléofilament. Son site de fixation est situé entre deux monomères et sa présence est nécessaire pour la réalisation de l'échange de brins homologues.

En effet, la fixation de l'ATP conduit à la formation d'un nucléofilament actif de RAD51.

Quant à l'hydrolyse de l'ATP, elle est nécessaire à la dissociation de RAD51 de l'ADN.

#### *1/ La fixation de l'ATP est diminuée par les modifications phosphomimétiques*

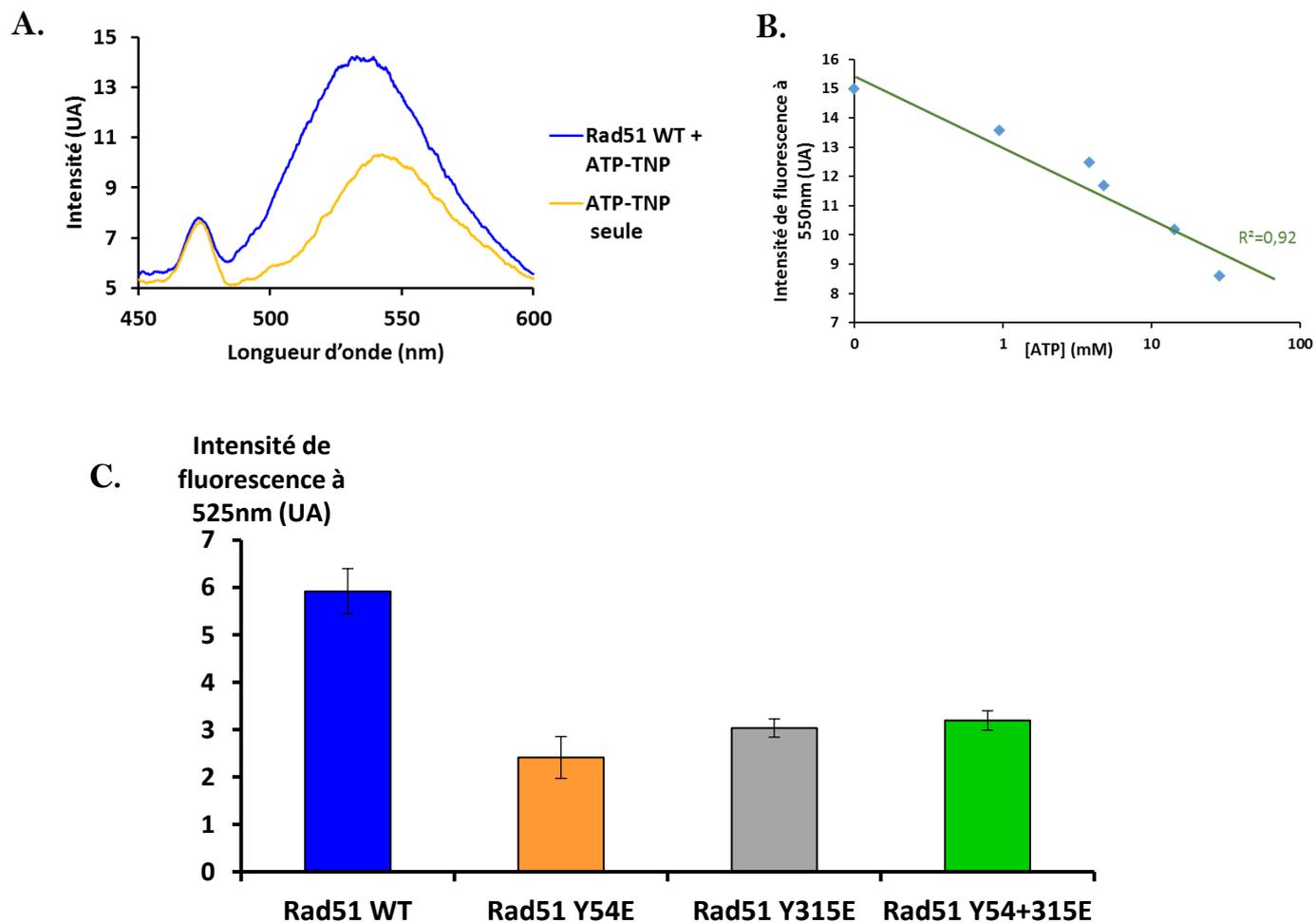
Afin d'étudier de manière directe l'association de l'ATP à RAD51 nous avons choisi d'utiliser l'ATP-TNP. Cet analogue de l'ATP a été utilisé pour étudier des ATPases car il possède la particularité d'émettre un signal de fluorescence lorsqu'il se fixe à des protéines (**Moutin et al, 1994 ; Moczydlowski & Fortes 1981**). Pour la première fois nous avons appliqué cette méthode à la protéine RAD51.

L'ATP-TNP seul n'émet qu'un signal faible de fluorescence à 420nm (**Figure 46A**) tandis que RAD51 ne possède pas de fluorescence propre à 420nm comme toute protéine. Par contre, le mélange d'ATP-TNP avec RAD51 conduit à un fort signal de fluorescence caractéristique d'un changement d'environnement de l'analogue, correspondant à son association avec RAD51.

De plus, pour s'assurer de la spécificité de la fixation de l'ATP-TNP nous avons réalisé une compétition avec l'ATP. Des quantités croissantes d'ATP sont ajoutées dans le milieu réactionnel. La diminution du signal de fluorescence indique une compétition de l'ATP-TNP et de l'ATP pour le même site (**Figure 46B**). Ceci valide la spécificité de l'ATP-TNP.

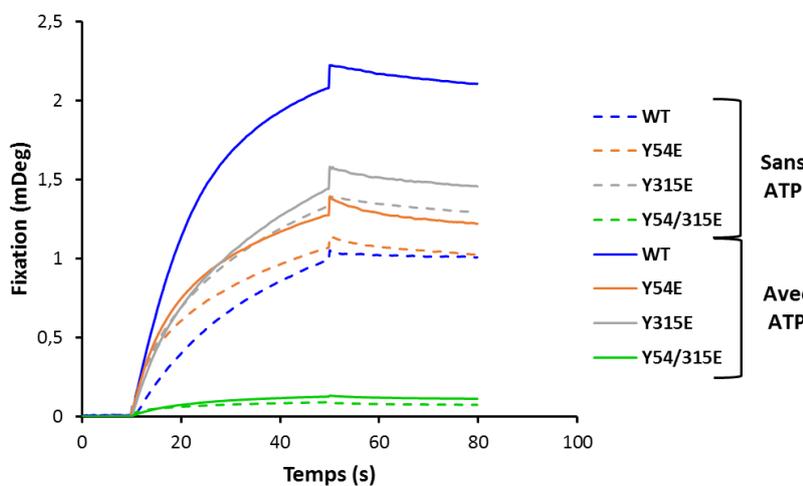
Par la suite nous avons donc voulu déterminer la capacité de fixation de l'ATP-TNP par les mutants phosphomimétiques. Les formes mono-phosphomimétiques montrent une activité réduite de moitié par rapport au sauvage. De manière surprenante, le double phosphomimétique présente également une réduction de 50% de son activité de fixation de l'ATP-TNP (**Figure 46C**).

Cette expérience montre que les modifications phosphomimétiques Y54E ou Y315E ont un effet négatif sur la fixation de l'ATP. Cet effet n'est pas cumulatif car la présence des deux modifications sur le même mutant n'entraîne pas une réduction plus importante de la



**Figure 46 : Les modifications phosphomimétiques diminuent la fixation de l'ATP par RAD51.**

**A.** Signal de fluorescence de l'ATP-TNP seul ou en présence de RAD51. **B.** Compétition de fixation entre l'ATP et l'ATP-TNP par diminution du signal de fluorescence par ajout de quantité croissante d'ATP. **C.** Comparaison des intensités de fluorescence de l'ATP-TNP en présence de RAD51 WT, Y54E, Y315E ou Y54/315E.



**Figure 47 : La fixation de l'ATP permet de fixer plus de RAD51 sur l'ADNsb.**

Expérience de Blitz réalisé avec les protéines RAD51 WT, Y54E, Y315E et Y54/315E. Les courbes continues correspondent à l'utilisation d'un tampon PBS avec ATP 1mM et les courbes discontinues à l'utilisation d'un tampon PBS sans ATP.

fixation de l'ATP-TNP. Les trois formes phosphomimétiques présentent ainsi une diminution de fixation de l'ATP équivalente.

La fixation d'ATP implique la formation d'un nucléofilament compacté tandis qu'il est relâché en absence de RAD51. Pour les variants phosphomimétiques cela implique qu'ils formeraient un nucléofilament relâché. Ceci pourrait expliquer pourquoi les formes Y54E et Y315E fixent moins de RAD51 à l'équilibre comme l'ont montré les expériences de Blitz.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons donc suivi la fixation de RAD51 à l'ADN par Blitz en présence et en absence d'ATP (**Figure 47**).

La forme sauvage montre une nette diminution de la valeur du plateau d'association de RAD51 à l'ADNsb lorsque l'ATP est absent. Pour les mutants mono-phosphomimétiques cette diminution est également présente mais avec une amplitude moins importante. Le signal de la forme Y54/315E est trop faible pour apprécier une diminution du plateau.

Ces résultats sont cohérents avec notre hypothèse initiale et suggèrent que la moins bonne fixation de l'ATP par les mutants mono-phosphomimétiques explique leur liaison à l'ADNsb plus faible.

## *2/ L'hydrolyse de l'ATP est diminuée par les modifications phosphomimétiques.*

L'hydrolyse de l'ATP est mesurée par quantification du Pi relargué. Celui-ci peut être dosé par colorimétrie grâce à l'emploi d'une coloration spécifique.

Sans RAD51 la coloration mesurée est faible montrant la faible hydrolyse spontanée de l'ATP. Lorsque RAD51 WT est ajoutée l'absorbance mesurée est plus importante traduisant une quantité importante de Pi et donc une activité ATPasique importante (**Figure 48**). Pour les mutants mono ou di-phosphomimétiques aucun signal significatif n'est détecté.

Au final cette expérience suggère que les phosphorylations ont un fort effet inhibiteur sur l'hydrolyse de l'ATP. La faible hydrolyse de l'ATP peut s'expliquer en partie par une fixation moins importante de l'ATP comme nous l'avons montré précédemment. De plus, sur les expériences d'hydrolyse de l'ATP le seuil de détection est assez élevé, il est donc possible que les mutants aient une hydrolyse bien qu'elle ne soit pas détectée.

Ces résultats ne permettent pas d'expliquer l'influence de la modification di-phosphomimétique sur l'échange de brins. Cette absence de corrélation entre les deux activités est aussi sans doute liée à l'action tardive de l'hydrolyse de l'ATP qui survient après l'échange de brins. Il a d'ailleurs été montré, grâce à des analogues non-hydrolysables de l'ATP, que l'hydrolyse de l'ATP n'était pas nécessaire à l'activité d'échange de brins.

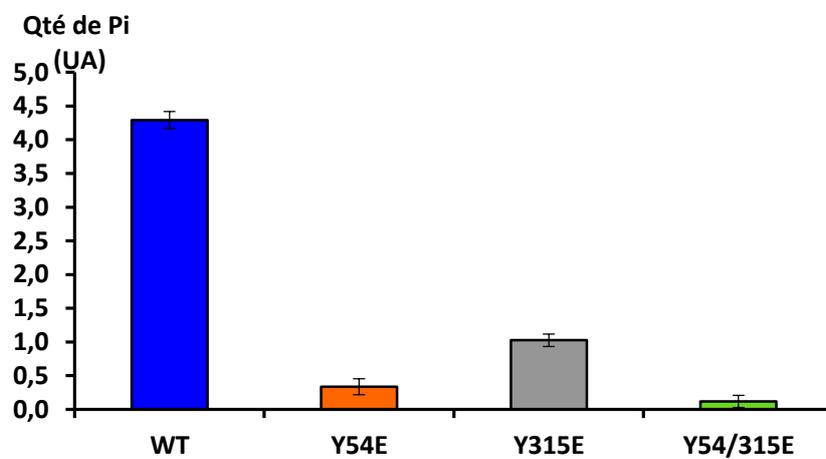


Figure 48 : L'hydrolyse de l'ATP est très fortement diminuée par les modifications phosphomimétiques. Hydrolyse de l'ATP, mesurée quantité de Pi relargué pour RAD51 WT, Y54E, Y315E ou Y54/315E.

## Conclusion

Nous avons montré de manière claire que la double modification phosphomimétique avait un effet fortement inhibiteur sur l'activité intrinsèque de RAD51 qui ne pouvait plus réaliser son activité d'échange de brins.

Les différentes étapes de l'activité de RAD51 ont été analysées dans le but de déterminer si l'une d'entre elles pouvaient être à la source de cette absence d'activité. La fixation et l'hydrolyse de l'ATP sont sensibles aux modifications phosphomimétiques mais ne permettent pas d'expliquer totalement la diminution drastique d'échange de brins observée pour le di-phosphomimétique. La faible fixation de la forme di-phosphomimétique à l'ADNsb montre un défaut évident de la formation du nucléofilament contrairement aux formes mono-phosphomimétique. Différents éléments tendent à montrer que ce défaut de formation du nucléofilament imputé à la modification Y54/315E résulte d'une mauvaise polymérisation.

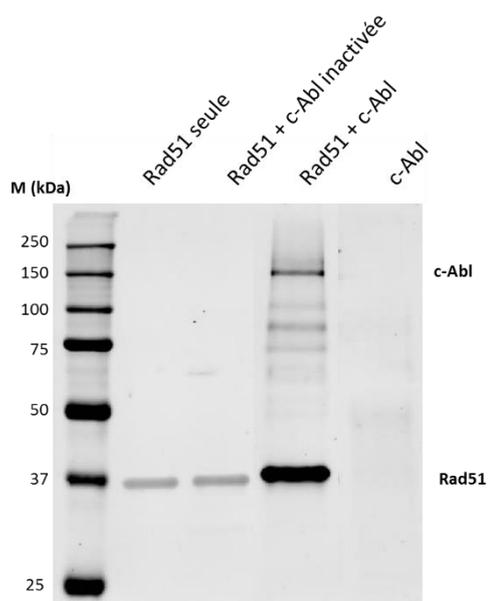
## II. La phosphorylation de RAD51 par c-Abl est un mécanisme complexe

Afin de valider les résultats obtenus avec notre modèle phosphomimétique nous avons souhaité le comparer avec des formes phosphorylées. Cet essai n'ayant pas encore abouti nous avons réalisé une phosphorylation *in vitro* de RAD51 par une c-Abl commerciale. Le résultat de cette phosphorylation est présenté dans une seconde partie.

### A- L'immunoblotting révèle la phosphorylation en Y315 et sur une autre tyrosine mais pas en Y54

A partir de c-Abl commerciale et de RAD51 purifiée nous avons réalisé des phosphorylations *in vitro*. La présence de phosphorylation a été analysée par western blot avec un anticorps anti-PhosphoTyrosine.

Dans un premier temps, nous avons établi les conditions de phosphorylation sur RAD51 WT. Celle-ci a été incubée seule ou en présence de c-Abl. De plus, nous avons réalisé deux contrôles : le premier avec c-Abl seule et le second avec RAD51 en présence de c-Abl inactivée thermiquement.



**Figure 49 : Phosphorylation de RAD51 *in vitro* par c-Abl.**

SDS-PAGE 10% révélé en western blot anti-PhosphoTyr de produits de phosphorylation : RAD51 seule ; RAD51 + c-Abl inactivée ; RAD51 + c-Abl et c-Abl seule.

Après les deux heures d'incubation à 30°C en présence d'ATP les échantillons sont analysés par western blot anti-phosphoTyrosine (**Figure 49**). Un faible signal est observé pour RAD51 seule, celui-ci peut sans doute être attribué à une fixation aspécifique de l'anticorps. Le signal de phosphorylation est du même ordre de grandeur pour RAD51 incubée avec c-Abl inactivée. En revanche, avec c-Abl active un signal très franc de phosphorylation est visible. Il est intéressant de constater qu'un signal de phosphorylation est également observé à hauteur de c-Abl. Mais ceci uniquement en présence de RAD51. Nous pouvons l'interpréter comme une autophosphorylation de c-Abl dépendante de RAD51.

Nous avons voulu vérifier que cette phosphorylation se déroulait effectivement sur les tyrosines 54 et 315. Pour se faire nous avons réalisé une phosphorylation *in vitro* sur les différents mutants phosphomimétiques. Ainsi, pour RAD51 Y54E le site Y54 n'est plus disponible à la phosphorylation tandis que Y315 l'est toujours.

Les trois mutants phosphomimétiques sont phosphorylés *in vitro* par c-Abl (**Figure 50**). La présence d'une phosphorylation sur le mutant di-phosphomimétique suggère la présence d'un site de phosphorylation autre que Y54 et Y315.

Le signal obtenu sur le mutant Y54E montre un très fort signal de phosphorylation équivalent à celui obtenu pour la phosphorylation du WT. Ceci suggère qu'il y a une très bonne phosphorylation du résidu Y315.

Le signal obtenu sur le mutant Y315E est nettement plus faible. Cela suggère que la phosphorylation ne se déroule pas ou très peu sur le site Y54.

En conclusion de ces expériences de phosphorylations *in vitro* menées sur les différents variants de RAD51 on en conclue que la phosphorylation avec c-Abl seule dans ces conditions conduit à une phosphorylation de RAD51. Cette phosphorylation se déroule sur Y315 majoritairement et très peu sur Y54. Il existerait par contre un autre site de phosphorylation. Ces résultats nous ont paru suffisant pour justifier l'analyse en spectrométrie de masse afin de confirmer les sites phosphorylés ou non.

*2/ Les analyses prédictives indiquent le site Y191 comme probablement cible de c-Abl*

RAD51 contient 10 tyrosines aux positions 54, 159, 178, 191, 205, 216, 228, 232 301 et 315 (**Figure 51A**).

En utilisant la séquence consensus de reconnaissance par c-Abl : I/V/L-Y-X-P/F seule trois tyrosines possèdent une séquence proche. Il s'agit des tyrosines Y54, Y191 et Y315 (**Figure 51B**).

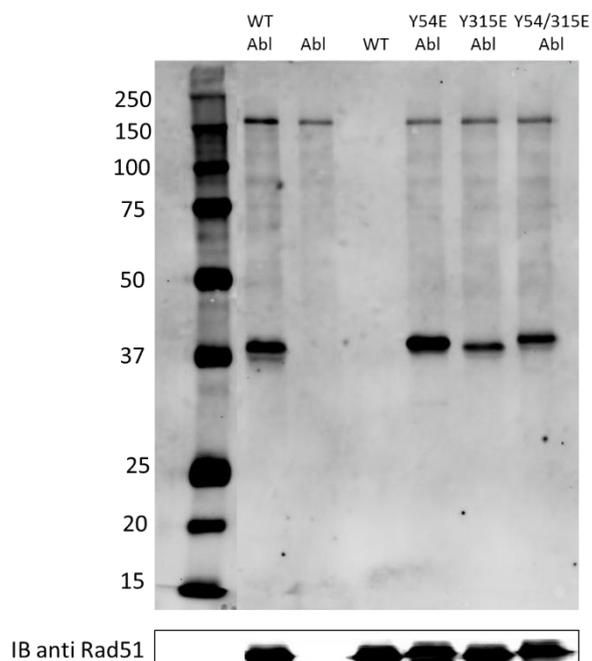


Figure 50 : La phosphorylation *in vitro* de RAD51 montre l'existence d'une phosphorylation sur un site différent de Y54 et Y315.

A.

0- MAMQMQLLEAN ADTSVEEESF GPQPISRLEQ CGINANDVKK LEEAGFHTVE AVAYAPKEL INIKGISEAK ADKILAEAAK LVPMGFTTAT EFHQRRSEII QITTGSKELD KLLQGGIETG  
SITEMFGEFR TGKTQICHTL AVTCQLPIDR GGEGEKAM<sup>Y</sup>I DTEGTFRPER LLVAERYGL SGSDVLDNVA YARAFNTDHO TQLLYQASAM MVESRYALLI VDSATALYRT DYSGRGELSA  
RQMHLARFLR MLLRLADEFV VAVVITNQVV AQVDGAAMFA ADPKKPIGNN IIAHASTTRL YLRKGRGETR ICKIYDSPCL PEAEAMFAIN ADGVGDAKD -339

B.

Séquence consensus

I/V/L-Y-X-P/F

Tyrosine 54	51-	AVAYAPK	-57
Tyrosine 191	188-	NVAYARAF	-196
Tyrosine 315	311-	ICKIYDSP	-318

Figure 51 : Recherche prédictive de sites de phosphorylation par c-Abl.

A. Séquence protéique de RAD51, les 10 tyrosines sont indiquées en rouge. B. Séquence consensus de reconnaissance de la kinase c-Abl et environnement des 3 tyrosines s'en approchant : 54, 191 et 315.

### 3/ La phosphorylation *in vitro* a lieu en Y315 et Y191 mais pas en Y54

Afin de déterminer les sites phosphorylés de RAD51 par c-Abl *in vitro* dans nos expériences, nous avons fait analyser nos échantillons par spectrométrie de masse (SM).

La réaction de phosphorylation a été conduite dans 3 conditions : RAD51 WT seule ; RAD51 WT avec c-Abl et RAD51 Y54/315E avec c-Abl.

Les échantillons ont été déposés en SDS-PAGE et colorés en bleu de coomassie (**Figure 52A**). Les bandes ont été découpées et envoyées à la plateforme 3P5 de Paris-Descartes pour analyse. La phosphorylation a été vérifiée par western blot anti-PhosphoTyrosine (**Figure 52B**). Le profil est le même que celui observé précédemment avec une phosphorylation importante pour la forme sauvage avec c-Abl, plus faible avec la forme Y54/315E avec c-Abl et peu détectable avec RAD51 WT seule.

Les analyses de SM font ressortir deux sites de phosphorylation (**Figure 52C**). Sur la forme RAD51 WT seule aucune tyrosine phosphorylée n'est détectée. Pour la forme RAD51 WT la Y191 et la tyrosine Y315 sortent comme étant phosphorylées. Enfin pour RAD51 Y54/315E avec c-Abl seule la Y191 apparaît phosphorylée. Il faut remarquer que la phosphorylation en Y54 n'est pas détectée.

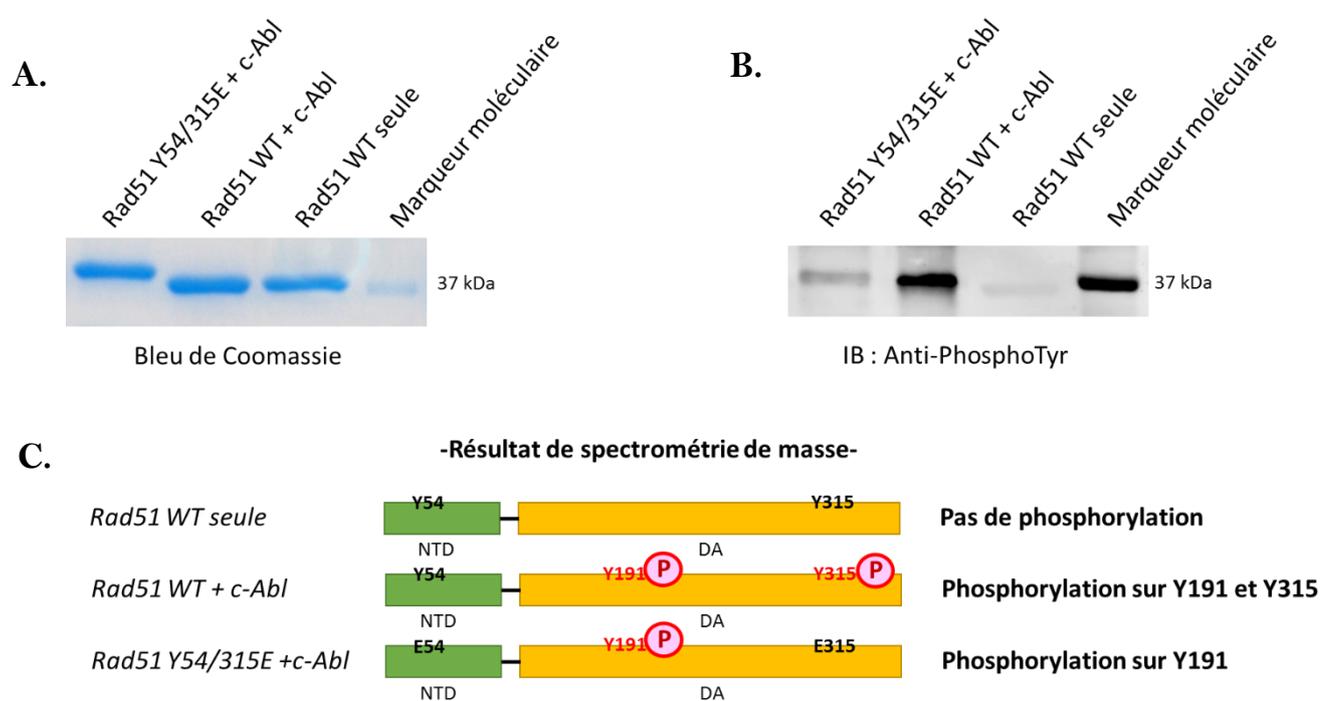
Ces résultats sont en parfaite concordance avec les résultats obtenus en WB et nous ont permis d'identifier un site putatif de phosphorylation de RAD51 par c-Abl : Y191.

La phosphorylation *in vitro* de RAD51 par c-Abl ne nous a pas permis d'obtenir, pour le moment, la phosphorylation sur Y54. La phosphorylation semble bien se dérouler en Y315 et un nouveau site potentiel en Y191 doit être pris en compte. La validation du modèle phosphomimétique n'a donc pas encore été réalisée.

## III. Mise au point de la recherche de protéines partenaires de RAD51

Comme nous l'avons vu RAD51 interagit avec de nombreux partenaires dans le cadre de la réparation de l'ADN. Ces interactions connues permettent à RAD51 de rentrer dans le noyau, l'aide à être recrutée sur le site de cassure et à en partir. De plus, de nombreuses interactions de RAD51 avec d'autres protéines restent à découvrir.

C'est pourquoi notre objectif est de rechercher les partenaires de RAD51 par Pull Down selon ses modifications phosphomimétiques. La réalisation de cet objectif comprend la mise au



**Figure 52 : Analyse des sites de phosphorylation de RAD51 par c-Abl en spectrométrie de masse.**

**A.** Gel SDS-PAGE coloré en bleu de coomassie des produits de phosphorylation pour RAD51 WT seule ; RAD51 WT + c-Abl et RAD51 Y54/315E +c-Abl **B.** Gel SDS-PAGE révélé en western blot des produits de phosphorylation pour RAD51 WT seule ; RAD51 WT + c-Abl et RAD51 Y54/315E +c-Abl **C.** Schéma présentant les résultats de spectrométrie de masse. NTD : N-Terminal Domain / DA : Domaine ATPase.

point de la technique de Pull Down pour récupérer et éluer RAD51. Ce qui nous permettrait d'étudier l'interaction avec des protéines issus de lysats cellulaires, afin d'isoler des partenaires de RAD51. Finalement les protéines partenaires doivent être analysées par spectrométrie de masse. En parallèle, nous développons une co-immunoprécipitation avec RAD51 afin de disposer d'une méthode complémentaire.

Nous présenterons ici les premières étapes réalisées. Tout d'abord, la mise au point de la technique avec RAD51. Puis des premiers éléments montrant une interaction avec des protéines partenaires en pull down et en co-immunoprécipitation.

### **A- Optimisation de la fixation et du relargage de RAD51**

Les protéines RAD51 utilisées possèdent un Tag 6-His qui permet de les fixer sur des billes de Nickel. Nous avons cherché dans un premier temps à caractériser les conditions de fixation et d'élution de RAD51 sur ces billes.

#### *1/ Optimisation de la fixation de RAD51*

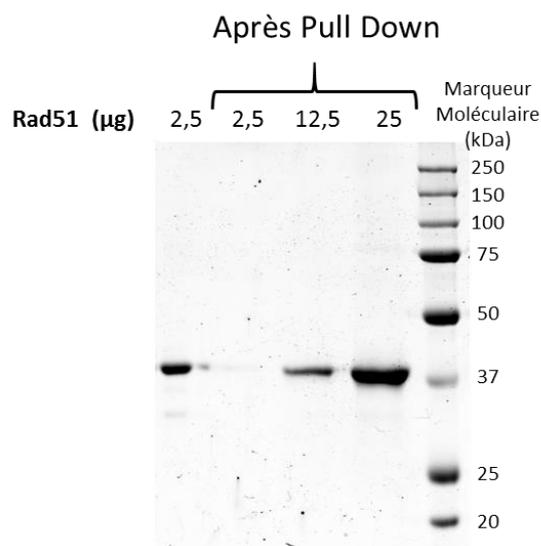
Nous avons cherché la quantité de RAD51 que nous pouvions fixer par billes. Pour ce faire différentes quantités de RAD51 ont été ajoutées sur une même quantité de billes. Après lavages les billes avec RAD51 sont mises à migrer directement en SDS-PAGE et les échantillons analysés par bleu de coomassie (**Figure 53**).

Une piste contrôle a été réalisée avec 2,5µg de RAD51. Le signal est beaucoup moins fort lorsque 2,5µg de RAD51 sont incubées sur les billes. Il y a donc eu une perte importante de RAD51 au cours des lavages. Avec 12,5µg de RAD51 le signal observé est presque similaire à celui des 2,5µg contrôle. Ce qui fait un rendement assez faible de l'ordre de 20%. Avec 25µg de RAD51 la quantité de protéines fixées est encore plus importante.

Nous n'avons pas trouvé de seuil de saturation des billes. Même si une quantité assez importante de RAD51 est perdue dans les lavages la protéine est bien retenue sur les billes.

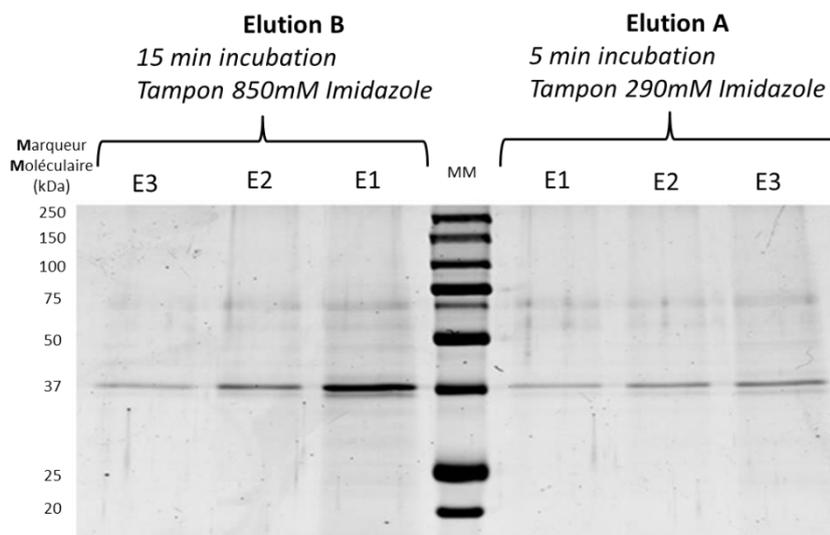
#### *2/ Optimisation des conditions d'élutions de RAD51*

Nous avons ensuite cherché les conditions optimales pour l'élution de RAD51 fixée aux billes. Deux conditions d'élution ont été essayées : Elution A de 5min d'incubation avec une solution à 290mM d'imidazole ; et Elution B, renforcée, de 15min d'incubation avec une



**Figure 53 : Optimisation de la quantité de RAD51 fixée par les billes de Pull Down.**

Différentes quantités de RAD51 WT (2,5 : 12,5 et 25µg) ont été incubées sur une quantité fixe de billes de Pull Down.



**Figure 54 : Optimisation de l'éluion de RAD51 des billes de Pull Down.**

Suite à la fixation de 25µg de RAD51 conformément au protocole précédent 3 phases d'éluions successives sont réalisées E1 puis E2 puis E3. Deux conditions d'éluions différentes ont été testées A. 5min d'incubation avec 290mM d'imidazole B. 15min d'incubation avec 850mM d'imidazole.

solution à 850mM d'imidazole. Pour chacune des conditions 3 éluions successives sont réalisées E1 à E3 et analysées par SDS-PAGE (**Figure 54**).

Dans les conditions d'éluion A, RAD51 est faiblement éluee au cours des trois éluions E1, E2, E3 et répartie de manière équivalente entre elles. Dans les conditions d'éluion B, la grande majorité de la RAD51 éluee est concentrée en E1. La condition d'éluion B a donc été utilisée par la suite.

## **B- Recherche de protéines partenaires de RAD51**

### *1/ La technique de Pull Down permet de récupérer d'autres protéines avec RAD51*

La technique de Pull Down a été utilisée avec les différents variants phosphomimétiques de RAD51. Après la fixation de RAD51 sur les billes, celles-ci sont incubées sur la nuit avec un extrait cellulaire de cellules HeLa. Après éluion les protéines ont été séparées sur SDS-PAGE et coloré au nitrate d'argent (**Figure 55**).

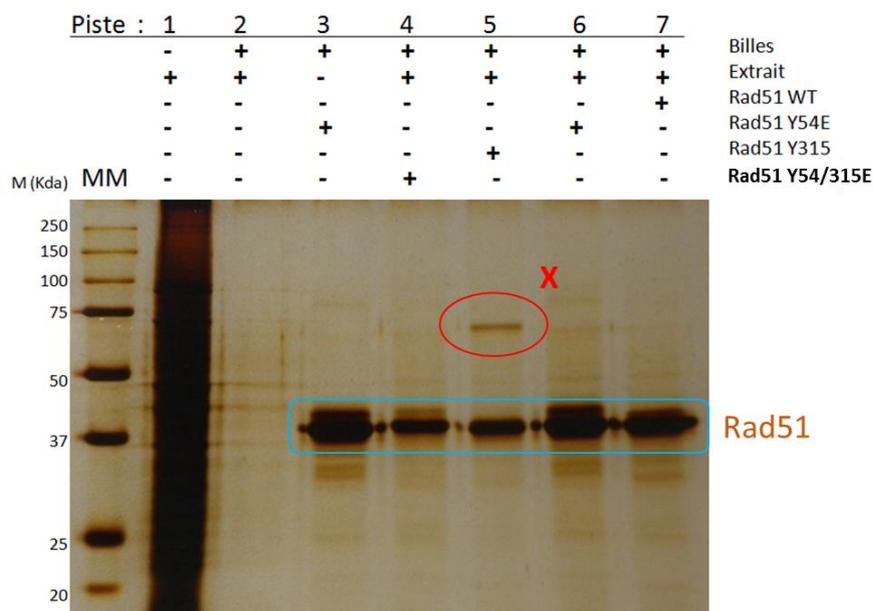
La fixation aux billes est bien spécifique car aucune protéine n'est détectée lorsque les billes sont incubées avec l'extrait cellulaire seul en absence de RAD51 (Piste1). La bande à 37 kDa nous indique que RAD51 a bien été fixée et éluee pour toutes les modifications phosphomimétiques (Piste 2 à 7). De manière intéressante les quantités de RAD51 récupérées ne sont pas identiques et sont moins importantes pour les formes Y54/315E et Y315E. D'autre part, une bande très nette est visible aux alentours de 65kDa pour l'extrait incubé avec RAD51 Y315E. Cette bande pourrait correspondre à un partenaire spécifique de la forme Y315E.

### *2/ Modification de l'interaction de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques avec des protéines d'intérêt.*

En parallèle des expériences de pull down, nous avons réalisé de l'immunoprécipitation (IP) afin de disposer d'une technique complémentaire.

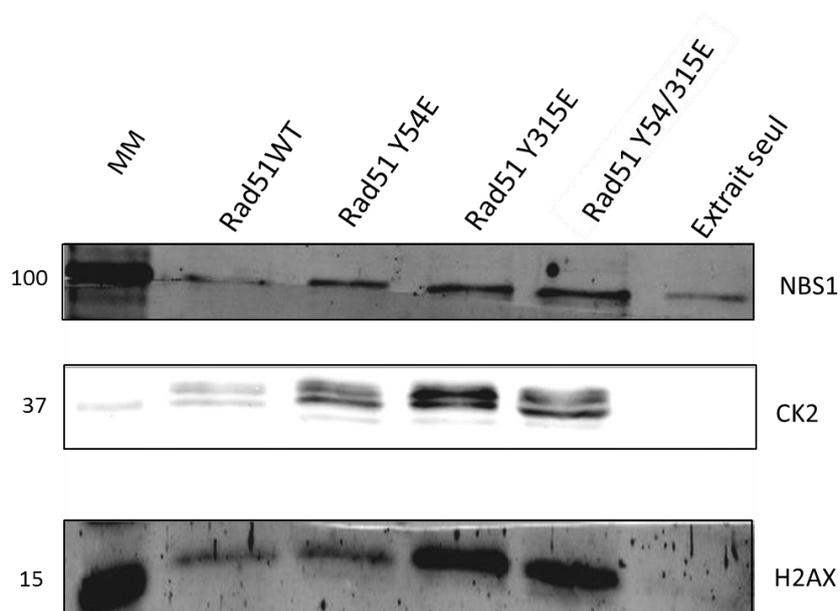
Les produits d'IP ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'un western blot (**Figure 56**). Nous avons choisi de rechercher des protéines partenaires de RAD51 connues ou intervenant dans la réparation homologue telles que NBS1, CK2 et H2AX.

Les trois protéines NBS1, CK2 et H2AX ont été co-précipité avec RAD51 WT mais aussi avec les différents variants phosphomimétiques.



**Figure 55 : Récupération par Pull Down d'une protéine partenaire potentielle spécifique à RAD51 Y315E.**

Suite au protocole de Pull Down réalisé avec les protéines RAD51 WT, Y54E, Y315E, Y54/315E les produits d'éluion sont analysés par coloration au nitrate d'argent.



**Figure 56 : Recherche d'interaction de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques avec des partenaires spécifiques par Immunoprécipitation suivi d'un western blot.**

Suite au protocole d'ImmunoPrécipitation réalisé avec les protéines RAD51 WT, Y54E, Y315E, Y54/315E les produits d'éluion sont analysés par western blot anti-NBS1 anti-CK2 ou anti-H2AX.

Ces résultats préliminaires sont encourageants car nous récupérons effectivement des protéines avec RAD51. Toutefois, l'expérience ayant été réalisée en absence de DNase il est possible que des complexes protéiques formés autour de l'ADN aient été récupérés.

Les techniques de Pull Down et de co-immunoprécipitation devraient nous permettre d'analyser l'effet des modifications phosphomimétiques sur des partenaires connus de RAD51 mais nous donnent également la possibilité de découvrir de nouveaux partenaires de RAD51.

#### **IV. La modification Y54E change le fonctionnement cellulaire de RAD51**

RAD51 est répartie de manière équilibrée entre le noyau et le cytoplasme. Suite à l'induction de dommages il y a une redistribution de RAD51 vers le noyau où elle forme des foci de réparation.

Dans ce chapitre nous tâcherons de déterminer si les phosphorylations en Y54 et Y315 jouent un rôle sur la localisation et la stabilité intracellulaire de RAD51 et sur la survie cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN.

Les travaux menés *in cellulo* sont majoritairement préliminaires et consistent en la mise en place des techniques.

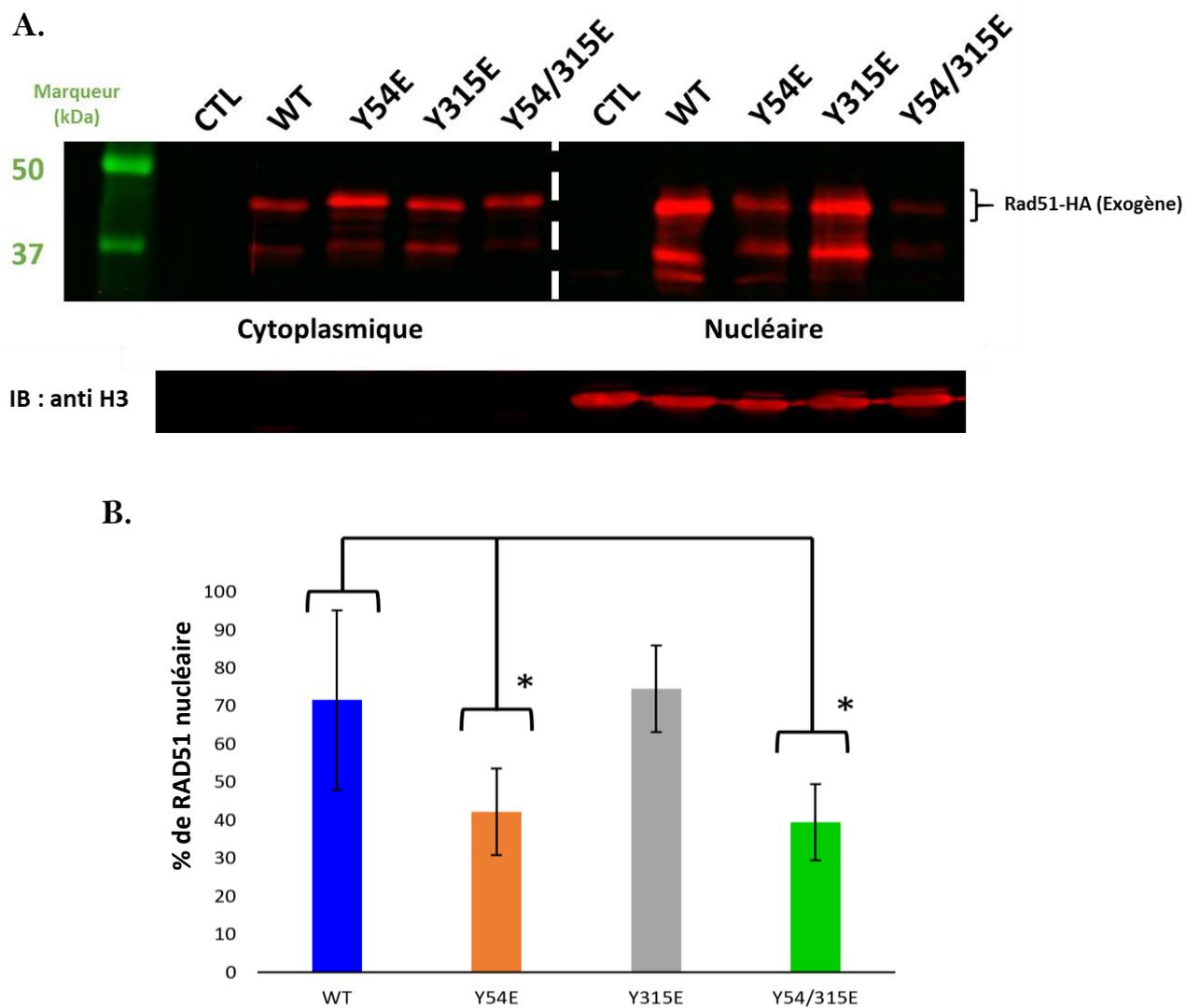
##### **A- La modification Y54E favorise une localisation cytoplasmique de RAD51**

La localisation cellulaire a été abordée par fractionnement cellulaire et par immunomarquage.

###### *1/ Par fractionnement cellulaire*

Des cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides codant pour les différents variants phosphomimétiques (Y54E, Y315E et Y54/315E) ainsi que la forme sauvage (WT) et le variant phosphorésistant (Y54/315F) toutes tagguées HA. Les extraits cellulaires ont été récupérés et les fractions nucléaires et cytoplasmiques isolées. La pureté des fractions a été vérifiée par l'analyse de l'histone H3 (**Figure 57A**).

L'immuloblotting de RAD51 montre deux bandes clairement distinctes : à 37kDa RAD51 endogène et à 45kDa RAD51 tagguée HA exogène. La forme sauvage est présente dans les



**Figure 57 : La modification Y54E entraîne une localisation cytoplasmique de RAD51 en fractionnement cellulaire.**

**A.** Immunoblotting anti-RAD51 et anti-H3 sur les produits de fractionnement des cellules HeLa transfectées avec RAD51 WT, Y54E, Y315E ou Y54/315E. **B.** Représentation de la localisation de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques ; n=4 répétitions. (\* :  $p < 0.05$ )

deux fractions avec une localisation plus nucléaire que cytoplasmique. La modification Y315E n'induit pas de changement significatif par rapport à la forme sauvage. En revanche, la présence des modifications Y54E ou Y54/315E induit une localisation cytoplasmique (**Figure 57B**).

La modification phosphomimétique Y54E semble donc influencer la localisation de RAD51 qui est détectée dans le cytoplasme. Il est possible que cette modification empêche l'entrée de RAD51 dans le noyau ou qu'elle déclenche une exportation du noyau vers le cytoplasme.

## *2/ Par immunofluorescence*

Afin de vérifier ces résultats, les cellules HeLa transfectées avec les différents variants de RAD51 ont été analysées par Immunofluorescence. La localisation de RAD51 est comparée à celle du marquage nucléaire DAPI à l'aide d'immunomarquage anti-RAD51 couplé au FITC (vert) ou anti-HA couplé au TRITC (rouge).

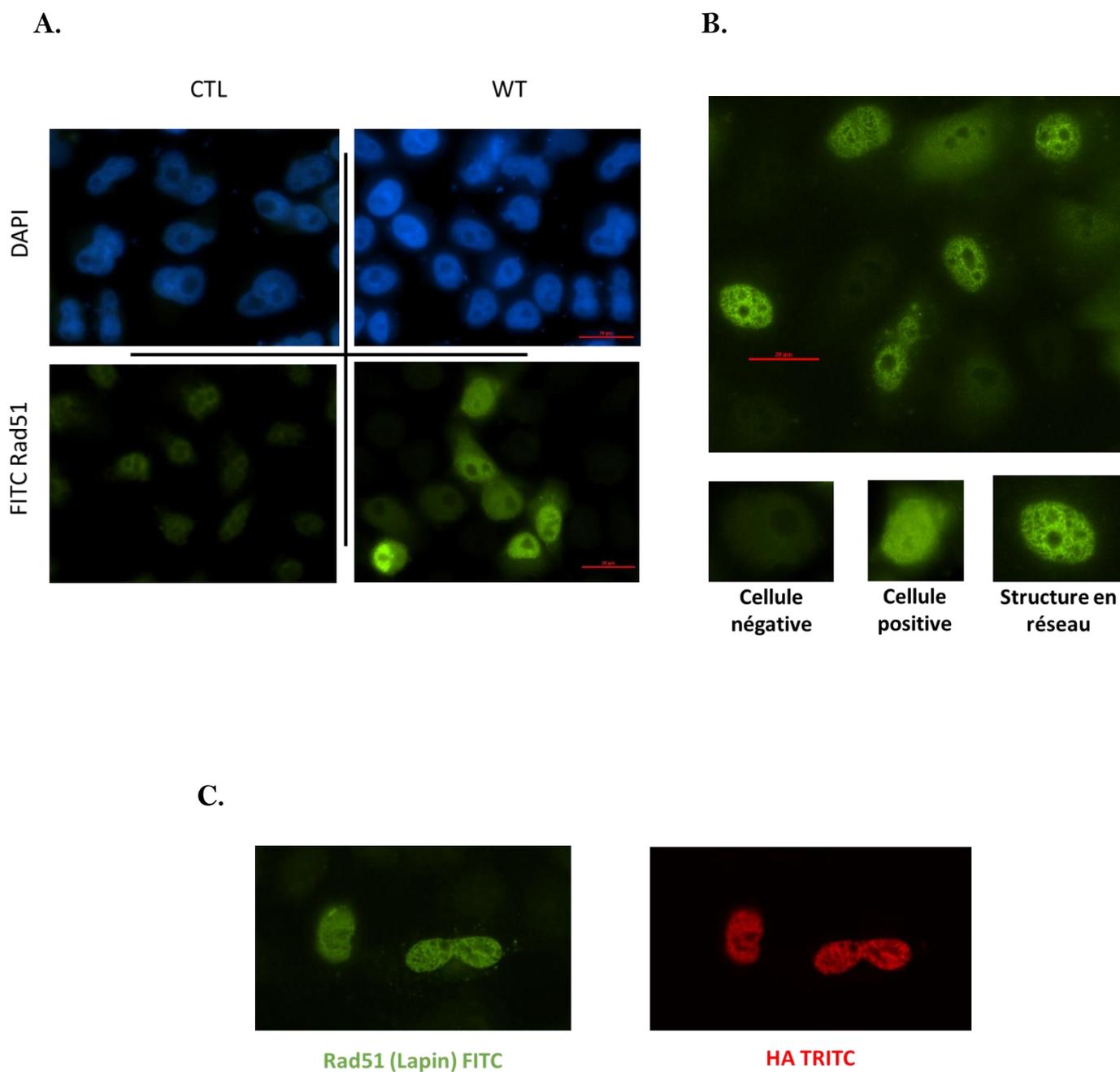
Dans les cellules non-transfectées par RAD51 (CTL), un signal faible est observé de manière homogène dans toutes les cellules et nous renseigne sur le bruit de fond (**Figure 58A**). Dans les cellules transfectées par RAD51 WT, le signal est hétérogène selon les cellules (**Figure 58A**). La majorité des cellules possèdent le même niveau de signal que les cellules CTL et sont donc considérées comme négatives ou non-transfectées par RAD51. D'autre part, environ 10% des cellules montrent une intensité de signal très largement supérieure au bruit de fond et sont dites positives. Parmi ces cellules positives, environ 95% des cellules font apparaître dans le noyau de nombreux filaments qui s'entrecroisent pour former comme un réseau. Elles sont appelées « en réseau » par la suite (**Figure 58B**).

Cette structure en réseau est typiquement observée lors de transfection et surexpression de RAD51. Elle résulterait de l'association de RAD51 avec la chromatine (**Raderschall et al, 2002 ; Grandy et al, 2002**).

Le marquage anti-Ha nous permet de détecter spécifiquement la forme exogène de RAD51. La comparaison des deux signaux, anti-RAD51 et anti-HA, montre une très bonne superposition (**Figure 58C**). Nous pouvons affirmer que le signal observé est donc bien lié à la RAD51 exogène.

Ayant caractérisé le signal pour la forme sauvage, nous avons voulu comparé la localisation avec les formes phosphomimétiques. Nous avons donc examiné la localisation cellulaire selon les modifications phosphomimétiques (**Figure 59**). La modification Y315E ne

modifie pas la localisation de RAD51 qui reste majoritairement nucléaire. Par contre les



**Figure 58 : Caractérisation de la localisation cellulaire de RAD51 WT par immunofluorescence.**

**A.** Observation par microscopie à fluorescence de cellules HeLa transfectées ou non par RAD51 WT, le noyau est observé par marquage DAPI et RAD51 par un anticorps anti-RAD51. CTL : cellules non-transfectées par RAD51 **B.** Cellules HeLa transfectées par RAD51 WT illustrant les différents qualificatifs utilisés pour nommer les cellules **C.** Cellules HeLa transfectées par RAD51 WT marquées par un anti-RAD51 (FITC, vert) ou par un anti-HA (TRITC, rouge).

modifications Y54E et Y54/315E conduisent à une localisation majoritairement cytoplasmique (**Figure 59**). D'autre part, aucun changement de localisation n'est observé avec le variant Y54/315F.

Les résultats d'immunofluorescence viennent confirmer ceux de fractionnement cellulaire, à savoir que la modification Y54E semble induire une localisation cytoplasmique de RAD51.

D'autre part nous avons constaté des différences dans les structures de RAD51 en réseau selon les modifications phosphomimétiques. En effet, ce type de structure est prépondérante lorsque RAD51 WT, Y315E ou Y54/315F sont transfectées. A contrario, elles ne sont pas détectées lorsque RAD51 Y54E ou Y54/315E sont transfectées.

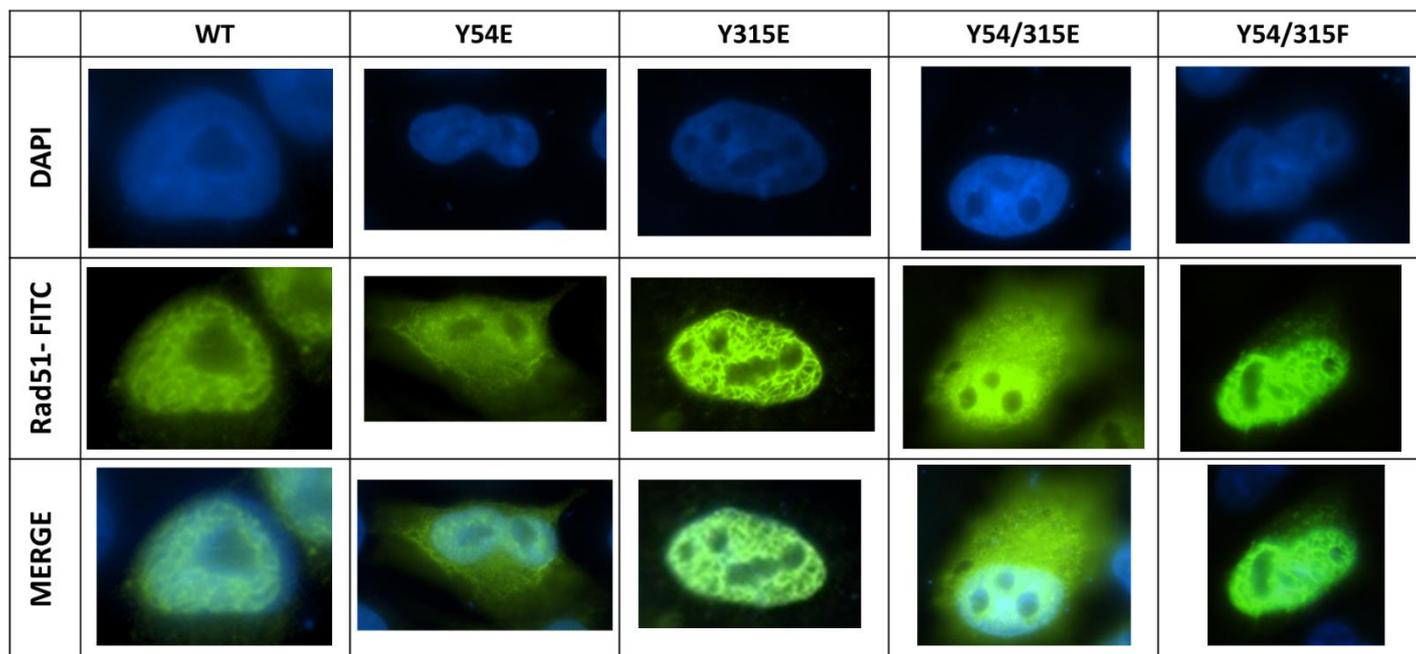
Il est tentant de suggérer que l'absence de cette structure reflète une moins bonne association à la chromatine *in cellulo*. Ce résultat semble cohérent avec nos expériences *in vitro* où nous avons montré que la modification pour RAD51 Y54/315E affecte la formation du nucléofilament. Cependant, cela ne s'applique pas pour RAD51 Y54E qui se fixe efficacement à l'ADN *in vitro*. D'autres facteurs peuvent intervenir *in cellulo* et pourraient expliquer ce résultat tel que l'interaction avec une protéine contrôlant l'accès de RAD51 à l'ADN.

## **B- La stabilité de RAD51 semble peu influencée par les modifications phosphomimétiques**

Les quantités relatives de RAD51 transfectées observées en western blot sont différentes selon les modifications phosphomimétiques de RAD51 (**Figure 60**) alors que les quantités de protéines déposées ont été normalisées avant dépôt. En particulier la forme Y54/315E est nettement moins présente. Ce résultat a été constaté sur de nombreuses répétitions de transfections. De plus, plusieurs lots différents de plasmides ont été utilisés pour ces transfections ce qui semble exclure un biais lié à une surestimation de la concentration du plasmide codant pour Y54/315E.

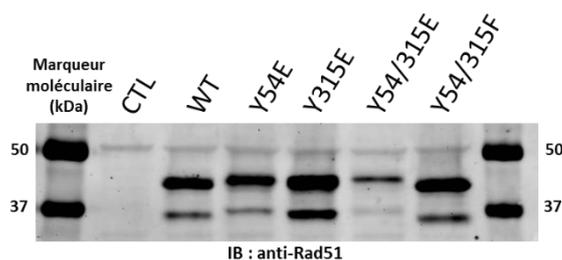
Devant ce résultat se pose la question de savoir si les modifications phosphomimétiques peuvent influencer la stabilité de RAD51. Jusqu'à présent nous avons regardé à un temps t=48h après transfection. Pour le vérifier, nous avons réalisé une cinétique pour suivre la quantité de RAD51 présente après transfection.

Le niveau d'expression de RAD51 a été suivi après transfection à 24, 32, 48 et 72h. Les cellules ont été lysées. Les concentrations protéiques des extraits cellulaires sont mesurées de façon à déposer la même quantité de protéines dans chaque puits.



**Figure 59 : Comparaison de la localisation cellulaire et de l'organisation intranucléaire de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques.**

Les noyaux sont révélés par un marquage DAPI, RAD51 par un anticorps primaire anti-RAD51 révélé par un anticorps secondaire couplé au FITC (vert).



**Figure 60 : Quantités de RAD51 exprimées selon les modifications phosphomimétiques.**

Western blot d'extraits cellulaires totaux de cellules HeLa transfectées sans RAD51 (CTL) ou avec RAD51 WT, Y54E, Y315E, Y54/315E ou Y54/315F. Révélation avec un anti-RAD51.

La quantité de RAD51 WT quantifiée en Western blot augmente progressivement tout au long de la période étudiée (**Figure 61**). Toutes les autres formes présentent un profil assez similaire avec un maximum de RAD51 détectée à 48 et 72h. Quelques différences sont observées mais la répétition des expériences permettra de déterminer si elles sont significatives. De plus, l'allongement du temps de suivi est nécessaire pour analyser l'ensemble de la cinétique de production et de disparition de RAD51. Par contre, la comparaison de la quantité de chaque variant à un temps t montre que le niveau du mutant Y54/315E est systématiquement plus bas que les autres.

Ces premiers résultats de suivi cinétique de RAD51 ont confirmé un niveau globalement plus faible de RAD51 Y54/315E par rapport aux autres variants de RAD51.

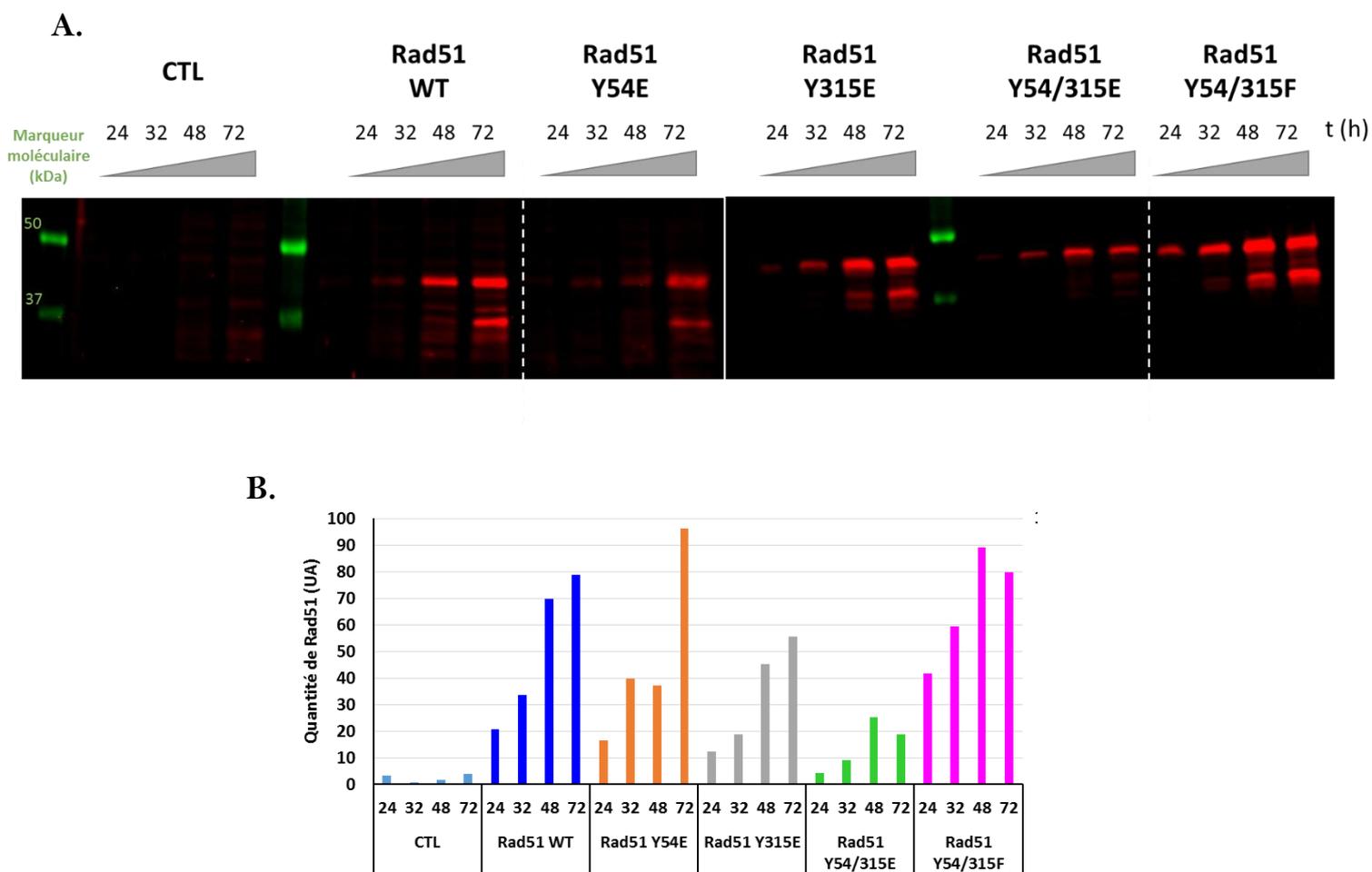
### **C- La survie cellulaire n'est pas différente selon les modifications phosphomimétiques des RAD51 transfectées.**

Il est raisonnable de penser qu'une modification de l'activité de RAD51 devrait se traduire par une différence de survie cellulaire après induction de dommages à l'ADN.

Afin de connaître l'effet des modifications phosphomimétiques sur la survie cellulaire nous avons traité des cellules transfectées avec les différents variants de RAD51 par la camptothécine (CPT). Ce traitement à forte dose induit des cassures simple brin qui évoluent vers des cassures double brin. La survie des cellules est évaluée par clonogénie.

100 cellules sont incubées dans un puits. Après 1 semaine chaque cellule vivante s'est divisée pour former une colonie. Le nombre de colonies reflète donc le taux de survie cellulaire.

Le nombre de clones des cellules Contrôles (CTL) chute d'environ 30 clones sans traitement jusqu'à environ 5 clones après traitement par  $10^{-4}$ M de CPT pendant 1heure. Nous avons ainsi vérifié l'efficacité de notre traitement et établi une condition de référence (**Figure 62A**).



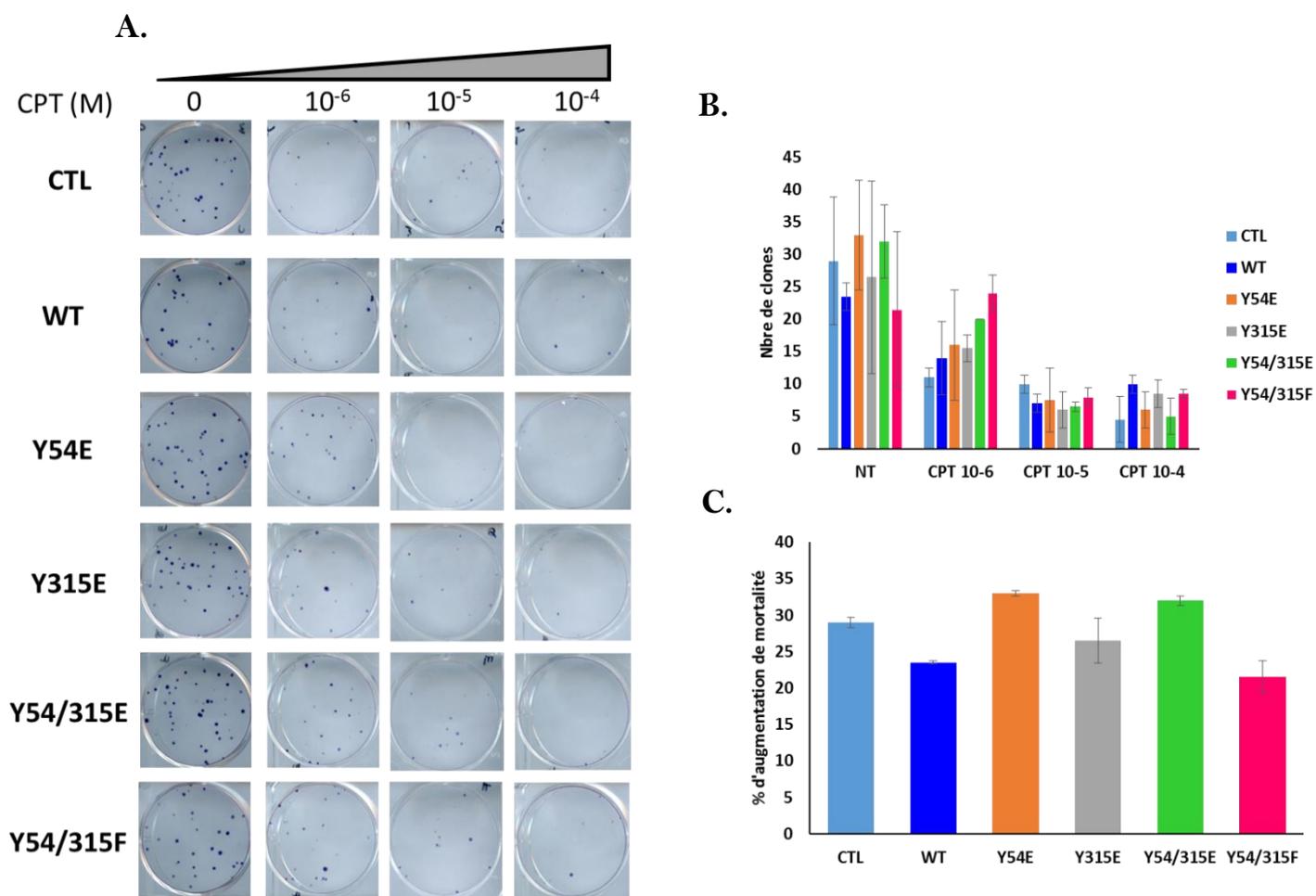
**Figure 61 : Cinétique d'expression des variants phosphomimétiques après transfection.**

**A.** Western blot d'extraits cellulaires totaux de cellules HeLa transfectées sans RAD51 (CTL), ou avec RAD51 WT, Y54E, Y315E, Y54/315E ou Y54/315F. Les cellules ont été récoltées à 24, 32, 48 et 72h après transfection. **B.** Graphique de l'évolution de la quantité de RAD51 selon le temps en h après transfection.

La comparaison effectuée avec les cellules transfectées par les différents variants de RAD51 ne fait pas ressortir de différences majeures avec la condition contrôle (**Figure 62B**). Toutefois, regardons maintenant uniquement les conditions extrêmes, c'est-à-dire sans traitement et avec le traitement le plus concentré en CPT ( $10^{-4}$ M). En absence de tout traitement (NT), les cellules avec la meilleure survie sont celles transfectées par RAD51 Y54E, RAD51 Y54/315E et la condition CTL. Tandis que les cellules transfectées par RAD51 WT, RAD51 Y315E et RAD51 Y54/315F présentent une survie moins importante. Dans les conditions de traitement à la CPT  $10^{-4}$ M, nous obtenons la tendance inverse. Si d'ailleurs, on calcule le pourcentage de diminution entre la condition NT et la CPT $10^{-4}$ , la baisse est la plus importante pour la condition CTL ou en présence de RAD51 Y54E ou Y54/315E par rapport aux cellules transfectées par RAD51 WT, Y315E ou Y54/315E (**Figure 62B**). D'ailleurs la comparaison de l'évolution de la mortalité entre les conditions extrêmes montre qu'elle augmente le plus pour RAD51 Y54E, Y54/315E et la condition CTL. (**Figure 62C**).

Cette observation ne repose pas sur un nombre suffisant de répétitions ( $n=2$ ) pour avoir une valeur significative. Toutefois il est intéressant de l'interpréter à la lumière des résultats précédents. En effet, d'après nos précédentes expériences il semblerait que la forme Y54/315E de RAD51 soit inactive tant à cause d'une inactivité intrinsèque qu'à cause de sa localisation nucléaire. La forme Y54E de RAD51 est active *in vitro* mais sa localisation majoritairement cytoplasmique laisse penser que sa capacité de réparation *in cellulo* puisse être moins efficace. En revanche, les formes WT, Y315E et Y54/315F de RAD51 semblent tout à fait actives *in vitro* et de localisation nucléaire.

En partant de ce postulat, en absence de traitement la présence de RAD51 inactive (Y54E et Y54/315E) est équivalente à l'absence de RAD51 transfectée (CTL). Par contre, la présence de RAD51 active (WT, Y315E et Y54/315F) entraîne une mortalité légèrement plus importante. En absence de dommages, RAD51 pourrait réaliser des recombinaisons aberrantes aux conséquences délétères. Lorsque de nombreux dommages sont induits et la mortalité augmente de manière similaire pour les cellules sans RAD51 ou avec RAD51 inactive (Y54E et Y54/315E). Cette diminution est moins importante pour les cellules possédant une RAD51 active (WT, Y315E et Y54/315F), RAD51 permettant alors une possible prise en charge de dommages et favorisant la survie cellulaire.



**Figure 62 : Pas de différences significatives de survie en clonogénie selon les modifications phosphomimétiques.**

**A.** Après 1h de traitement à la camptothécine (CPT) des cellules HeLa préalablement transfectées par RAD51 WT, Y54E, Y315E, Y54/315E, Y54/315F ou non-transfectées (CTL) ont été dénombrées. Puis 100cellules ont étéensemencés par puits. Après 72h les colonies sont révélées par marquage MTT. (NT : Non-Traité) **B.** Histogramme du nombre de colonies comptées en phase finale de la clonogénie (n=2 répétitions). **C.** Histogramme du % d'augmentation de la mortalité entre la condition NT et la condition CPT  $10^{-4}$ .

Les très faibles impacts apparents de la transfection de RAD51 sur la survie cellulaire peuvent s'expliquer par différents paramètres. Premièrement, les cellules ne sont pas synchronisées et sont donc dans différentes phases du cycle cellulaire. Il y a donc une réparation d'une partie des cassures double brin par la LNHE. Deuxièmement, les cellules possèdent un niveau basal de RAD51 sauvage endogène qui doit certainement participer à réparer les dommages. Troisièmement et c'est sûrement un point clef, nous avons vu lors de la réalisation des expériences d'immunofluorescence que le taux de cellules transfectées est faible (autour de 10%). Ainsi dans le cas de cellules dites transfectées par RAD51 il s'agit de 10% de cellules parmi 90% de cellules au comportement proches des cellules CTL.

Il sera déterminant pour les prochaines expériences menées pour la survie d'améliorer le taux de cellules transfectées ou de procéder à un tri pour ne conserver que celles-ci. Ceci permettra de diminuer le bruit de fond. De plus, il pourrait être intéressant d'utiliser des inhibiteurs de la NEHJ pour s'affranchir de son action de réparation des CDB.

**L'analyse des effets à l'échelle cellulaire des modifications phosphomimétiques de RAD51 est préliminaire.**

**Seule la comparaison de la localisation cellulaire a pu montrer des différences claires entre les variants phosphomimétiques. Nous avons vu, à la fois par fractionnement cellulaire et par immunofluorescence que la modification Y54E seule ou en présence de la modification Y315E semble conduire à une distribution majoritairement cytoplasmique de RAD51. De plus, la localisation plus nucléaire des formes WT, Y315E ou Y54/315F s'accompagnent de structure en réseaux, révélant sans doute une association avec la chromatine. La transposition de ces résultats au modèle de phosphorylation séquentiel conduirait à avoir suite à la première phosphorylation sur Y315 une forme majoritairement cytoplasmique. Dès lors que la deuxième phosphorylation en Y54 a lieu alors RAD51 serait redistribué dans le cytoplasme. Cela devra être confirmé notamment par des expériences dynamiques montrant la redistribution de RAD51 dans le temps.**

**Les résultats obtenus sur la stabilité ou la survie de RAD51 nous ont permis d'établir la base expérimentale nécessaire à la poursuite de ces investigations.**

**Quatrième partie :**

**DISCUSSION.**

## I. Sur la phosphorylation de RAD51 par c-Abl

### A- Quels sont les sites phosphorylés ?

Lors de la phosphorylation de RAD51 par c-Abl *in vitro* nous avons observé la phosphorylation de résidus tyrosine par immunoblotting. Comme nous l'avons vu l'utilisation de mutants phosphorésistants étaye très clairement la phosphorylation en Y315. En revanche, avec cette méthode aucune variation de phosphorylation n'est observée avec Y54. Par contre, il semblerait qu'un autre résidu Y soit phosphorylé ailleurs sur RAD51.

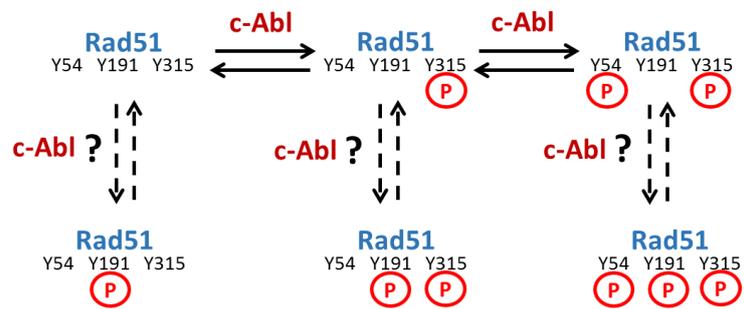
D'après les données de la littérature la phosphorylation en Y315 donne souvent un signal très clair de phosphorylation *in vitro* ou *in cellulo* après co-transfection avec c-Abl (**Chen et al, 1999 ; Slupianek et al, 2001 ; Popova et al, 2009 ; Shimizu et al, 2009 ; Slupianek et al, 2011**). Tandis que la phosphorylation en Y54 est souvent peu détectable (**Yuan et al, 1997 ; Slupianek et al, 2001**), voire non détectable (**Chen et al, 1999 ; Slupianek et al, 2011**) et plus rarement, clairement détectable (**Popova et al, 2009 ; Shimizu et al, 2009**).

Nous retrouvons bien par spectrométrie de masse la phosphorylation sur le site Y315. Nous ne détectons pas la phosphorylation en Y54, bien que celle-ci avait été détectée par spectrométrie de masse (**Yuan et al, 1997**). Les analyses révèlent également que la Y191 serait phosphorylée et pourrait donc correspondre au signal de phosphorylation détecté par western blot lorsque Y54 et Y315 ne sont pas phosphorylables. Cette hypothèse pourra être testée par l'utilisation de mutants phosphorésistants Y191A notamment.

La phosphorylation de ces 3 sites par c-Abl est cohérente car ce sont les 3 tyrosines de RAD51 qui s'inscrivent dans une séquence consensus de reconnaissance par c-Abl. D'autre part, les Y54, Y191 et Y315 sont toutes exposées à la surface de RAD51 d'après les modèles de structure pour HsRAD51, donc accessibles par la kinase.

Sur la base de ces résultats, il semble avéré que c-Abl phosphoryle bien RAD51 en Y54 et en Y315. Toutefois, la phosphorylation en Y315 semble majoritaire, quantitativement, par rapport à celle en Y54. L'explication pourrait provenir du mécanisme séquentiel déjà évoqué, la phosphorylation en Y54 demandant la phosphorylation en Y315 il est logique de trouver plus de P-Y315.

La vérification de la phosphorylation en Y191 peut s'appuyer sur des tests *in vitro* de phosphorylation. Elle pourra également être recherchée *in cellulo* afin de savoir si cette phosphorylation n'est pas un artefact lié aux conditions *in vitro*.



**Figure 63 : Equilibre de phosphorylation de RAD51 par c-Abl.**

Les flèches en trait continu indiquent une phosphorylation avérée, en discontinu une phosphorylation possible. Les phosphorylations sont indiquées en rouge par un grand P.

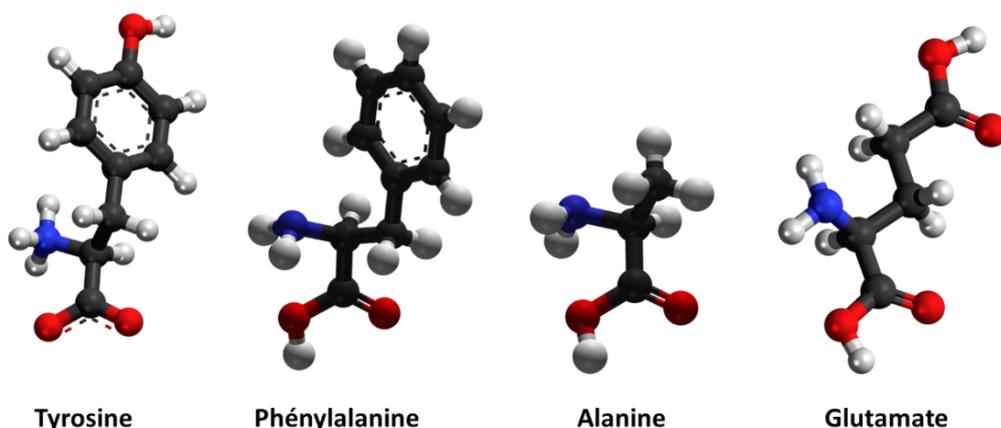
Enfin, si cette phosphorylation s'avère être effective il sera intéressant de savoir comment elle intervient vis-à-vis de la phosphorylation séquentielle de RAD51 sur Y315 et Y54 (**Figure 63**).

### B- L'utilisation des phosphomimétiques

Un premier avantage d'avoir choisi l'utilisation de phosphomimétiques est d'obtenir des lots distinctement séparés de RAD51 à différents degrés de phosphomimétisme. Car, comme nous venons d'en discuter, la phosphorylation de RAD51 par c-Abl implique un équilibre de phosphorylation de plusieurs sites. De plus, la phosphorylation de ces sites *in vitro* est sans doute dépendante des conditions utilisées comme le suggère la détection de Y54 ou Y315 phosphorylée. Le produit de phosphorylation de RAD51 par c-Abl *in vitro* est donc un mélange de formes non-phosphorylées et de formes phosphorylées.

L'emploi de phosphomimétiques demande la mutation de la tyrosine en glutamate. Nous avons vérifié que la mutation n'entraînait pas de déstructuration de la protéine. Nous avons également produit un mutant contrôle phosphorésistant (Y54/315F) en changeant la tyrosine en phénylalanine qui ne possède donc pas de charge négative.

Toutefois, lors de la mutation de Tyr vers Glu nous avons deux modifications, la première est l'apport d'une charge négative et la seconde est la perte du cycle aromatique. En effet, il n'y a pas d'acide aminé naturel qui possède à la fois une charge et un cycle. Il pourrait être intéressant de produire un mutant où les Tyr sont mutées en Ala. Car nous aurions effectivement la perte du cycle aromatique mais sans apport de charge négative (**Figure 64**). Ceci nous permettrait de vérifier définitivement que l'effet observé est bien uniquement lié à l'apport de charge négative.



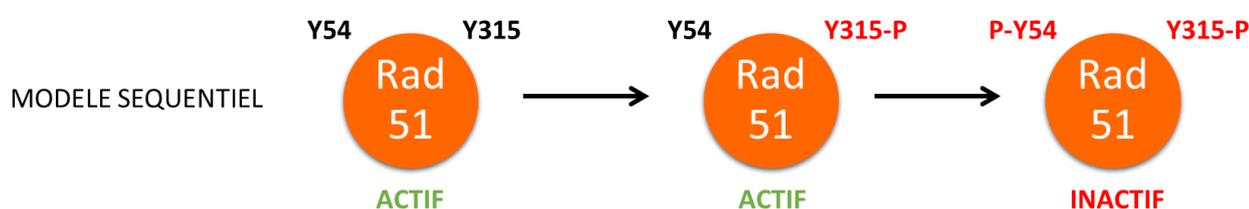
**Figure 64 : Comparaison de la structure des différents acides aminés impliqués pour mimer ou empêcher la phosphorylation.** De gauche à droite : la tyrosine avec un cycle aromatique et le groupement -OH où se fixe le groupement phosphate chargé négativement, la phénylalanine avec un cycle et sans groupement -OH ; l'Alanine sans cycle aromatique et sans groupement OH ; le Glutamate sans cycle aromatique et avec un groupement -COOH présent en COO<sup>-</sup> porteur d'une charge négative.

## C- Sur l'effet des phosphorylations sur l'activité intrinsèque

### 1/ Inactivation de RAD51

L'activité intrinsèque de RAD51, soit sa capacité d'échange de brins homologues, est fortement affectée par les modifications phosphomimétiques. La réalisation de différents tests d'échange de brins ou d'invasion montre clairement la très forte inactivation liée à la double modification Y54/315E. Il semble y avoir un fossé important entre la forme di-phosphomimétique et les formes mono-phosphomimétiques qui ont une activité similaire à celle du sauvage. RAD51 étant une protéine fragile, thermosensible notamment, il a fallu vérifier qu'un problème de lot n'avait pas pu survenir. La confirmation par DC de la bonne conservation de la structure, le profil similaire de RAD51 Y54/315E par rapport aux autres RAD51 en SDS-PAGE et la répétition avec un deuxième lot de RAD51 issu d'une purification indépendante nous confortent dans l'idée que l'effet observé est bien uniquement dû à la modification introduite. L'introduction de deux mutations aux positions 54 et 315 sans apport de charge négative ne suffit pas à inactiver RAD51 comme l'a montré l'utilisation du mutant Y54/315F. Comme cela a été discuté précédemment, il faudra compléter cette approche par l'utilisation d'un mutant Y54/315A et par une validation basée sur la comparaison avec des formes phosphorylées.

Il est intéressant de noter que Yuan et al avaient montré une inactivation de RAD51 en présence de c-Abl active lors de la réalisation d'échange de brins (Yuan et al, 1997). La seule phosphorylation qu'ils avaient alors détectée était celle en Y54 par spectrométrie de masse. Toutefois la phosphorylation en Y315 est délicate à analyser en SM (Popova et al, 2009) elle a pu ne pas être détectée. Cette hypothèse est d'autant plus probable que d'après le mécanisme séquentiel de phosphorylation (Popova et al, 2009) la phosphorylation de Y54 est secondaire à celle de Y315. Ainsi, bien que le doute subsiste sur l'état exact de phosphorylation de RAD51 lors de leurs expériences, ce résultat peut être vu comme un indice favorable à notre hypothèse d'inactivation de RAD51 par la double phosphorylation. L'inclusion de ces résultats avec le modèle séquentiel (Popova et al, 2009) nous conduit à envisager un modèle où RAD51 est toujours active suite à sa première phosphorylation, et devient inactive avec la seconde phosphorylation (Figure 65).



**Figure 65 : Schéma bilan de la transposition de nos résultats au modèle de phosphorylation séquentielle.**

Les résidus en Y54 et Y315 en noir sont non-phosphorylés. Les résidus P-Y54 et Y315-P sont phosphorylés.

Intéressons-nous tout d'abord aux formes mono-phosphomimétiques RAD51 Y54E et RAD51 Y315E. Nos expériences ont montré que leurs activités intrinsèques étaient très similaires. Pour récapituler, il semblerait que leurs capacités à fixer et à hydrolyser l'ATP soient diminuées. De plus, ces formes s'associent à l'ADNsb mais fixent quantitativement moins de RAD51 par paires de bases que la forme sauvage. Enfin ces modifications mono-phosphomimétiques n'ont pas d'effets observables sur l'échange ou l'invasion de brins homologues (**Tableau III**).

L'hydrolyse de l'ATP est logiquement affecté si moins d'ATP est fixé. De plus, la diminution de la fixation de l'ATP est sans doute responsable de la moins bonne fixation de RAD51 à l'ADNsb. En effet, le nucléofilament de RAD51 est sous une forme compactée en présence d'ATP et sous forme relâchée en absence d'ATP (**Robertson et al, 2009**). Nous pouvons donc penser que la moins bonne fixation de l'ATP conduit à la formation d'un nucléofilament plus relâché et donc à moins de fixation de RAD51. Les nucléofilaments formés seraient d'une taille suffisante pour permettre une activité recombinaise de RAD51 (**Figure 66**). Il est possible que cette activité soit un peu diminuée. En effet à faible concentration en RAD51 les mutants semblent un peu moins efficaces que la forme sauvage. Pour le montrer il serait intéressant de se placer loin des conditions d'équilibre avec un temps de réaction plus court et des concentrations plus faibles en RAD51 afin d'exacerber les différences.

Passons à la forme di-phosphomimétique. Le profil de fixation et d'hydrolyse de l'ATP est similaire à ceux des formes mono-phosphomimétiques. Nous pouvons attendre un résultat identique sur la fixation à l'ADNsb. Or la fixation de RAD51 semble montrer une fixation de très peu de RAD51. Le facteur supplémentaire responsable de cette mauvaise formation du nucléofilament serait la polymérisation. En effet, nos expériences semblent indiquer que le degré de polymérisation de la forme Y54/315E soit beaucoup plus faible que la forme sauvage ou que les formes mono-phosphomimétiques (**Tableau III**). Ainsi il semblerait que l'effet synergique des modifications Y54 et Y315 entraîne un défaut de polymérisation ne permettant pas de formation de nucléofilaments. Sous cette forme l'activité recombinaise est fortement compromise (**Figure 66**).

	WT	Y54E	Y315E	Y54/315E
Polymérisation	+	+	+	-
Fixation de l'ATP	+	+/-	+/-	+/-
Hydrolyse de l'ATP	+	+/-	+/-	+/-
Fixation à l'ADNsb	+	+	+	-
<b>Echange de brins homologues</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
	ACTIF	ACTIF	ACTIF	INACTIF

Tableau III : Tableau bilan des activités de RAD51 selon ses modifications phosphomimétiques.

La présence d'un « + » indique une bonne activité, un « +/- » indique une activité réduite et un « - » indique une activité très faible.

#### Rad51 di-phosphomimétique (Y54/315E)



#### Rad51 mono-phosphomimétique (Y54E ou Y315E)



#### Rad51 sauvage (WT)



Figure 66 : Modèle explicatif de l'effet des modifications phosphomimétiques sur l'activité intrinsèque de RAD51.

Proposition de mécanisme pouvant expliquer les effets des modifications phosphomimétiques au niveau de l'échange de brins par la polymérisation et la formation du nucléofilament.

### D- Hypothèse mécanistique de l'effet des phosphorylations par le contexte structural des positions Y54 et Y315

La tyrosine Y54 est relativement excentrée des sites de fixation de l'ADN ou de l'ATP par sa situation dans le Domaine N-terminal. Toutefois elle interagit directement avec un acide aminé aromatique (Phe195) du domaine ATPase au sein du même monomère de RAD51 (**Conway et al, 2004**) (**Figure 67**). Même si le domaine N-terminal ne semble pas nécessaire à l'oligomérisation de RAD51 (**Davies & Pellegrini, 2007**), la modification de Y54 peut jouer un rôle indirect sur la polymérisation de RAD51 à travers la rupture de l'interaction entre Y54 et F195. En effet, Zhang et al ont trouvé que l'apport de charges négatives à la surface du domaine N-terminal pouvait affecter l'échange de brins et l'hydrolyse de l'ATP suggérant un lien avec la flexibilité du domaine N-terminal. Ainsi il est envisageable que la charge négative en position 54 agisse comme un modulateur de la flexibilité du domaine N-terminal et de l'hélicité du filament. La cinétique d'auto-association de RAD51 sur l'ADNsb étant coopérative (**Candelli et al, 2014**) cela signifie qu'une instabilité de l'interaction monomère-monomère favoriserait la dissociation du nucléofilament. La dissociation rapide RAD51 Y54E de l'ADNsb observée en Blitz en est peut être une illustration.

Concernant la position Y315, des études précédentes ont suggéré sa présence à l'interface monomère-monomère et il semblerait que le remplacement de ce résidu par un acide aminé acide ou basique puisse inhiber sa polymérisation (**Takizawa et al, 2004**). Il est intéressant de noter que la poche de fixation de l'ATP correspondant aux acides aminés Asp316-Glu322 peut moduler la stabilité du nucléofilament de RAD51 (**Amunugama et al, 2012**). De plus, le voisinage acide de l'Asp316 est essentiel pour la formation d'un pont salin (**Qian et al, 2006**) qui est suspecté d'agir comme un capteur conformationnel déterminant le statut actif ou inactif pendant la RH (**Amunugama et al, 2012**). La Y315 est positionnée à une position stratégique : proche de la loop L2, de la poche de fixation de l'ATP et de l'interface monomère-monomère (**Figure 68**). De plus, cette position est entourée d'acides aminés chargés (K284, K285, D316, E322) qui peuvent jouer un rôle dans la flexibilité de la boucle L2 et de la boucle de la poche de fixation de l'ATP. Il n'est donc pas surprenant d'observer des effets sur la fixation de l'ATP et sur la fixation de l'ADN.

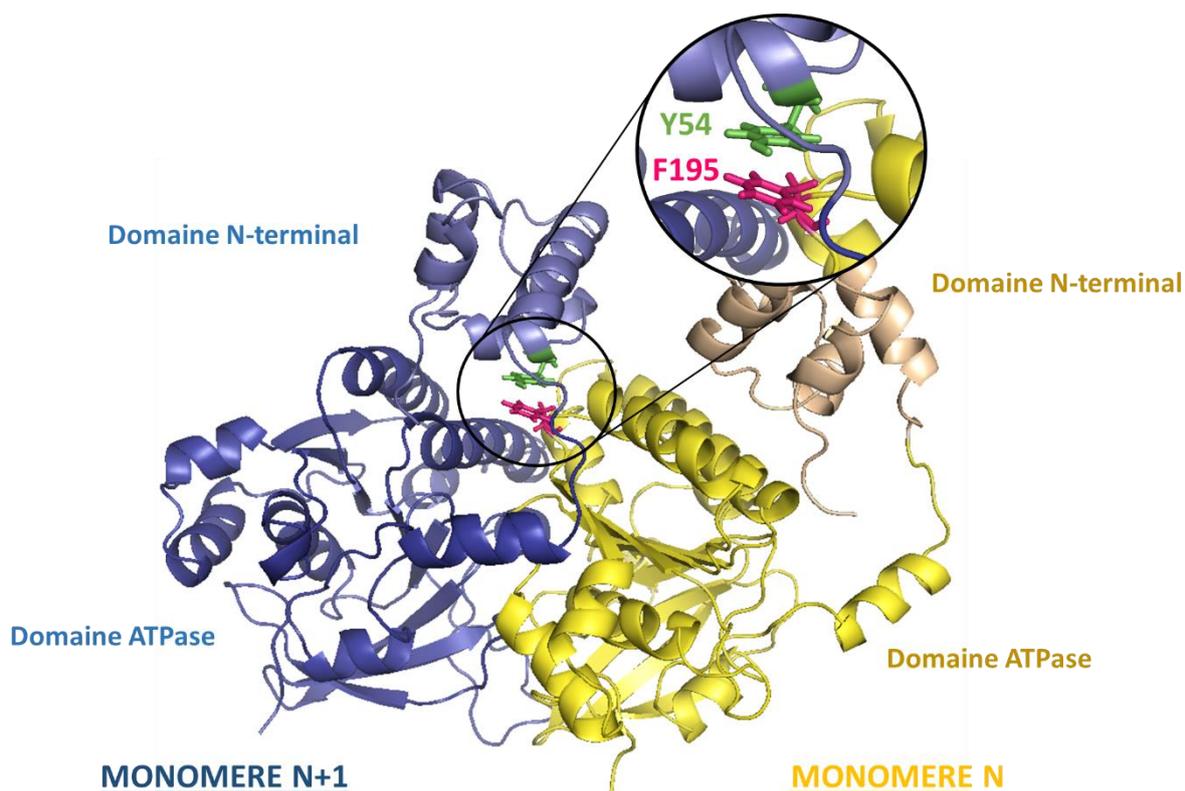


Figure 67 : Position de Y54 à l'interface entre domaine N-terminal et domaine ATPase.

Modèle présentant deux monomères de HsRAD51, premier monomère en jaune et second en bleu. Y54 est coloré en vert et F195 en rose.

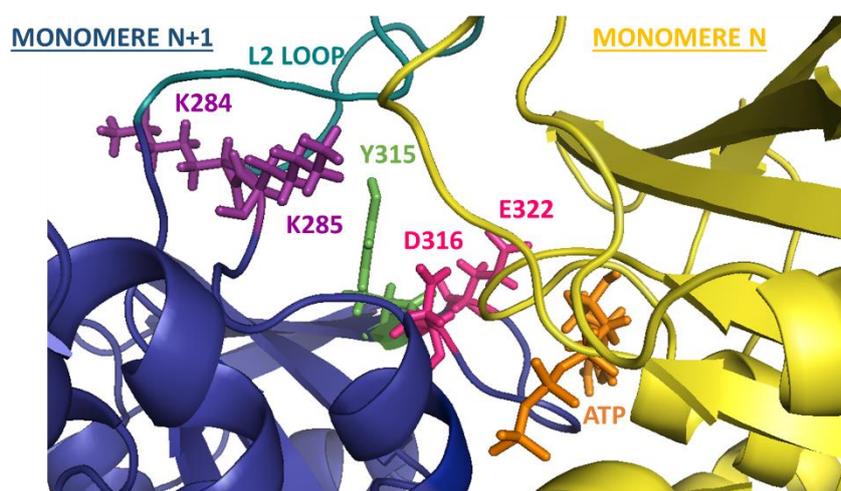


Figure 68 : Position de Y315 entre la boucle L2 de fixation de l'ADN et la boucle de la poche de fixation de l'ATP.

Modèle présentant deux monomères de HsRAD51, premier monomère en jaune et second en bleu. Y315 est coloré en vert ; la boucle L2 en turquoise à l'exception des aminés K284 et K285 situés à sa base ; l'ATP est coloré en orange et les acides D316 et E322 de la boucle de fixation à l'ATP sont colorés en rose.

## II. Sur l'effet des phosphorylations sur RAD51 à l'échelle cellulaire

### A- La localisation cellulaire

La combinaison des résultats d'immunofluorescence et de fractionnement cellulaire permet d'établir l'effet de la modification Y54 dans la translocation du noyau vers le cytoplasme. En effet, les mutants Y54E et Y54/315E montrent une localisation beaucoup plus cytoplasmique que la forme sauvage ou les mutants Y315E ou Y54/315F. Le déroulement précis de ce phénomène n'est pas connu. Il sera intéressant dans un premier temps de connaître la dynamique du phénomène. La modification Y54E empêche-t-elle l'entrée de RAD51 dans le noyau ou participe-t-elle à sa sortie du noyau. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Comme cela avait été discuté dans l'introduction RAD51 contient une séquence d'exclusion nucléaire (NES) (Jeyasekharan et al, 2013). Il pourrait être envisageable que la charge négative présente en Y54 entraîne un changement conformationnel qui découvre la NES. Celle-ci pourrait être mutée pour tester cette hypothèse. Lors des expériences de recherche des partenaires de RAD51 il faudra suivre l'interaction de RAD51 portant la modification Y54E avec les protéines BRCA2 ou RAD51C impliquées dans la translocation nucléaire de RAD51.

### B- La stabilité de RAD51

Les résultats de transfections montrent que les niveaux de RAD51 ne sont pas les mêmes dans les cellules. La part de la dégradation de RAD51 peut être testée par l'emploi d'inhibiteurs de protéasome et de la synthèse protéique. La dégradation de RAD51 pouvant également être effectuée par la caspase 3, des essais de clivage *in vitro* des différentes formes peuvent être réalisés.

### C- La survie cellulaire

Nous avons vu que les conséquences des modifications phosphomimétiques de RAD51 ont très peu d'effet sur la survie cellulaire. Le faible nombre de cellules transfectées par RAD51 peut être une piste d'explication. Il est envisageable d'améliorer la transfection pour

augmenter la proportion de cellules transfectées. Une alternative pourrait être de trier les cellules positives avant de réaliser un test de survie.

#### **D- La recherche de partenaires**

La recherche des partenaires de RAD51 selon son niveau de phosphorylation est un élément clef de la compréhension de la régulation de son mécanisme. D'une part en recherchant l'effet de ces phosphorylations sur des partenaires connus de RAD51. D'autre part en effectuant une recherche générale par détection et identification des partenaires par spectrométrie de masse. Les protéines montrant une différence d'interaction selon les modifications de RAD51 devraient permettre d'orienter les expériences à venir ou de renforcer celles déjà réalisées.

### **III. Modèle d'inactivation de RAD51 par la double phosphorylation**

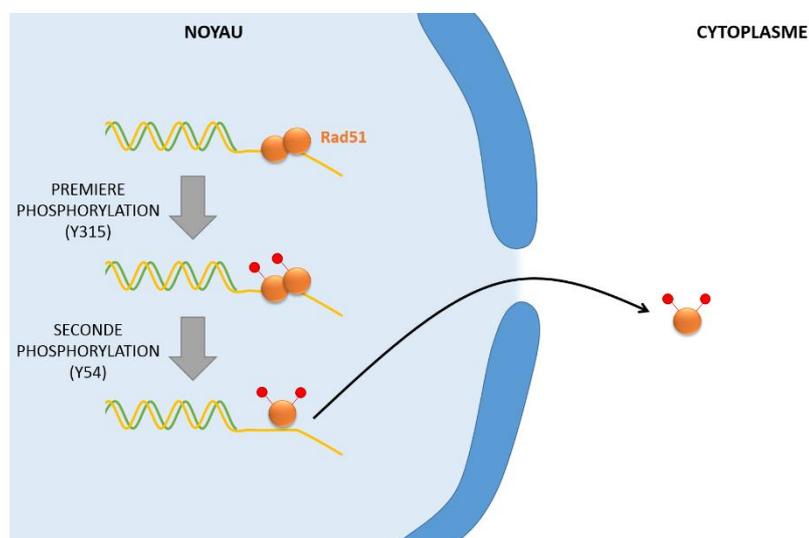
L'activation et l'inactivation sont des étapes importantes du fonctionnement des voies de réparation.

Il semble que la double phosphorylation ait un puissant effet inhibiteur sur RAD51. La formation du nucléofilament est considérablement diminuée et RAD51 ne peut plus effectuer un échange de brins homologues. De plus, sa localisation est beaucoup plus cytoplasmique ce qui diminue d'autant plus la possibilité d'avoir une activité de réparation (**Figure 69**).

Cette inhibition de RAD51 par la forme finale de la phosphorylation séquentielle peut être comprise comme une manière de stopper RAD51 afin d'éviter toute réparation anormale.

Il serait particulièrement intéressant de voir si la forme sauvage et la forme phosphorylée en Y315, montrent une différence de fonctionnement. Il est tentant de supposer que la double phosphorylation puisse fonctionner comme un interrupteur, activant d'abord RAD51 par une première phosphorylation suite à un dommage, et l'éteignant par une deuxième phosphorylation. Cela serait une manière de contrôler précisément le fonctionnement de RAD51 afin qu'elle ne soit active qu'au bon moment.

Nos résultats semblent indiquer que l'activité de polymérisation est facteur clef du fonctionnement de RAD51. La recherche et l'utilisation de molécules interférant avec la polymérisation est une piste d'intérêt pour l'inhibition de RAD51 et à terme la potentialisation des traitements cancéreux.



**Figure 69 : Modèle d'inactivation de RAD51 par la double phosphorylation en Y54 et Y315.**

La première phosphorylation de RAD51 en Y315 RAD51 est présente dans le noyau, elle est capable de fixer l'ADN et est active. Après la seconde phosphorylation en Y54 RAD51 ne forme plus de nucléofilament, n'est plus en mesure de réaliser un échange de brins homologues et sa localisation est majoritairement cytoplasmique.

# Bibliographie.

- Amunugama R., Fishel R. (2011) *Subunit interface residues F129 and H294 of human RAD51 are essential for recombinase function.* PLoS One. ;6(8):e23071
- Andres S.N., Vergnes A., Ristic D., Wyman C., Modesti M., Junop M. (2012) *A human XRCC4-XLF complex bridges DNA.* Nucleic Acids Res.;40(4):1868-78
- Arias-Lopez C., Lazaro-Trueba I., Kerr P., Lord C.J., Dexter T., Irvani M., Ashworth A., Silva A. (2006) *p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene.* EMBO Rep. ;7(2):219-24
- Atwell S., Disseau L., Stasiak A.Z., Stasiak A., Renodon-Cornière A., Takahashi M., Viovy J.L., Cappello G. (2012) *Probing RAD51-DNA interactions by changing DNA twist.* Nucleic Acids Res.;40(22):11769-76
- Bartkova J., Horejsi Z., Koed K., Kramer A., Tort F., Zieger K., Guldborg P., Sehested M., Nesland J.M., Lukas C., Orntoft T., Lukas J., Bartek J. (2005) *DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis.* Nature ; 434: 864-870
- Barzel A., Kupiec M. (2008) *Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination?* Nat Rev Genet.;9(1):27-37
- Brambati A., Colosio A., Zardoni L., Galanti L., Liberi G. (2015) *Replication and transcription on a collision course: eukaryotic regulation mechanisms and implications for DNA stability.* Front Genet.;6:166
- Beltràn-Pardo E. A., Jönsson I., Wojcik A., Haghdoost S., Harms-Ringdahl M., Bermúdez Cruz R.M., Bernal Villegas J.E. (2013) *Sequence analysis of the DNA-repair gene RAD51 in the tardigrades Milnesium cf. tardigradum, Hypsibius dujardini and Macrobiotus cf. harmsworthi.* J. Limnol., 2013; 72(s1): 80-91
- Bennett B.T., Knight K.L. (2005) *Cellular localization of human RAD51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of RAD51.* J Cell Biochem. ;96(6):1095-109
- Benson F.E., Stasiak A., West S.C. (1994) Purification and characterization of the human RAD51 protein, an analogue of E. coli RecA. EMBO J. ;13(23):5764-71.
- Bianco P.R., Tracy R.B., Kowalczykowski S.C. (1998) *DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison.* Front Biosci.;3:D570-603

- Bunting S.F., Callen E., Wong N., Chen H.T., Polato F., Gunn A., Bothmer A., Feldhahn N., Fernandez Capetillo O., Cao L., Xu X., Deng C.X., Finkel T., Nussenzweig M., Stark J.M., Nussenzweig A. (2010) *53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1- deficient cells by blocking resection of DNA breaks*. Cell ; 141: 243-254
- Candelli A., Holthausen J.T., Depken M., Brouwer I., Franker M.A., Marchetti M., Heller I., Bernard S., Garcin E.B., Modesti M., Wyman C., Wuite G.J., Peterman E.J. (2014) *Visualization and quantification of nascent RAD51 filament formation at single-monomer resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A.;111(42):15090-5
- Cardelli M, Marchegiani F. (2013) Good, bad, mobile elements: genome's most successful "parasites" as emerging players in cell and organismal aging. Curr Pharm Des. ;19(9):1739-52
- Chen, G., Yuan, S.S., Liu, W., Xu, Y., Trujillo, K., Song, B., Cong, F., Goff, S.P., Wu, Y., Arlinghaus, R., et al. (1999). *Radiation-induced assembly of RAD51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl*. J. Biol. Chem. 274, 12748–12752
- Casas I., de Pablo J., Pérez I., Giménez J., Duro L., Bruno J. (2004) *Evidence of uranium and associated trace element mobilization and retention processes at Oklo (Gabon), a naturally radioactive site*. Environ Sci Technol.;38(12):3310-5
- Chen L., Nievera C.J., Lee A.Y., Wu X. (2008) *Cell cycle dependent complex formation of BRCA1 CtIP MRN is important for DNA doublestrand break repair*. J Biol Chem ; 283: 7713-7720
- Chi P., Van Komen S., Sehorn M.G., Sigurdsson S., Sung P. (2006) *Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human RAD51 recombinase function*. DNA Repair (Amst).;5(3):381-91
- Chintapalli S.V., Bhardwaj G., Babu J., Hadjiyianni L., Hong Y., Todd G.K., Boosalis C.A., Zhang Z., Zhou X., Ma H., Anishkin A., van Rossum D.B., Patterson R.L. (2013) *Reevaluation of the evolutionary events within recA/RAD51 phylogeny*. BMC Genomics 14 : 240.
- Cloud V., Chan Y.L., Grubb J., Budke B., Bishop D.K. (2012) *RAD51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis*. Science.;337(6099):1222-5
- Conilleau S1, 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.
- Conway A.B., Lynch T.W., Zhan F., Fortin G.S., Fung C.W., Symington L.S., Rice P.A. (2004) *Crystal structure of a RAD51 filament*. Nat Struct Mol Biol. 2004 Aug;11(8):791-6
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. (2003) *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. FASEB J.;17(10):1195-214

- Daboussi F., Dumay A., Delacôte F., Lopez B.S. (2002) *DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation*. Cell Signal. ;14(12):969-75
- Dasari S., Tchounwou P.B. (2014) *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. Eur J Pharmacol.;740:364-78
- Datta A., Jinks-Robertson S. (1995) *Association of increased spontaneous mutation rates with high levels of transcription in yeast*. Science 268 1616–1619
- Davies A.A., Masson J.Y., McIlwraith M.J., Stasiak A.Z., Stasiak A., Venkitaraman A.R., West S.C. (2001) *Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein*. Mol Cell.;7(2):273-82
- Davies O.R., Pellegrini L. (2007) *Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats*. Nat Struct Mol Biol.;14(6):475-83
- Davis A.J., Chen D.J. (2013) *DNA double strand break repair via non-homologous end-joining*. Transl Cancer Res.;2(3):130-143
- Desai A., Webb B., Gerson S.L. (2014) *CD133+ cells contribute to radioresistance via altered regulation of DNA repair genes in human lung cancer cells*. Radiother Oncol.;110(3):538-45
- Dingwall C., Laskey R.A. (1986) *Protein import into the cell nucleus*. Annu Rev Cell Biol. ;2:367-90
- Douki T., Court M., Sauvaigo S., Odin F., Cadet J. (2000) *Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Biol. Chem. 275, 11678–11685
- Du L., Luo Y. (2012) *Structure of a hexameric form of RadA recombinase from Methanococcus voltae*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.;68(Pt 5):511-6
- Egelman,E.H. and Stasiak,A. (1993) *Electron microscopy of RecA-DNA complexes: two different states, their functional significance and relation to the solved crystal structure*. Micron, 24, 309–324
- Eid W., Steger M., El-Shemerly M., Ferretti L.P., Pena-Diaz J., König C., Valtorta E., Sartori A.A., Ferrari S. (2010) *DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability*. EMBO Rep; 11: 962-968
- Essers J., van Steeg H., de Wit J., Swagemakers S.M., Vermeij M., Hoeijmakers J.H., Kanaar R. (2000) *Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice*. EMBO J. ;19(7):1703-10

- Flott S., Kwon Y., Pigli Y.Z., Rice P.A., Sung P., Jackson S.P. (2011) *Regulation of RAD51 function by phosphorylation*. EMBO Rep.;12(8):833-9
- Fong V., Osterbur M., Capella C., Kim Y.E., Hine C., Gorbunova V., Seluanov A., Dewhurst S. (2011) *Adenoviral vector driven by a minimal RAD51 promoter is selective for p53-deficient tumor cells*. PLoS One ;6(12):e28714
- Forget A.L., Kowalczykowski S.C. (2012) *Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a three-dimensional homology search*. Nature.;482(7385):423-7
- Fraga C. G., Shigenaga M. K., Park J. W., Degan P., and Ames B. N. (1990) *Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine*. Proc Natl Acad Sci USA 87: 4533-4537
- French C.A., Tambini C.E., Thacker J. (2003) *Identification of functional domains in the RAD51L2 (RAD51C) protein and its requirement for gene conversion*. J Biol Chem.;278(46):45445-50
- Gerhard D.S., Wagner L., Feingold E.A., Shenmen C.M. et al (2004) *The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)*. Genome Res. ;14(10B):2121-7
- Gildemeister O.S., Sage J.M., Knight K.L. (2009) *Cellular redistribution of RAD51 in response to DNA damage: novel role for RAD51C*. J Biol Chem.;284(46):31945-52
- Grabarz A., Barascu A., Guirouilh-Barbat J., Lopez B.S. (2012) *Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining*. Am J Cancer Res. ;2(3):249-68
- Grandy I., Hardt T., Schmid M., Haaf T. (2002) *Effects of higher-order nuclear structure and RAD51 overexpression on radiation-induced chromosome rearrangements*. Cytogenet Genome Res.;98(4):265-9
- Gu X. (1997) *The Age of the Common Ancestor of Eukaryotes and Prokaryotes: Statistical Inferences*. Mol. Biol. Evol. 14(8): 861-866.
- Hahn M.W. (2009) *Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates*. J Hered. ;100(5):605-17
- Hamperl S., Cimprich K. A. (2014) *The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability*. DNA Repair 19 84-94
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) *The hallmarks of cancer*. Cell. ;100(1):57-70

- Hannay J.A., Liu J., Zhu Q.S., Bolshakov S.V., Li L., Pisters P.W., Lazar A.J., Yu D., Pollock R.E., Lev D. (2007) *RAD51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation*. Mol Cancer Ther.;6(5):1650-60
- Hasselbach L., Haase S., Fischer D., Kolberg H.C., Stürzbecher H.W. (2005) *Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene RAD51*. Eur J Gynaecol Oncol. ;26(6):589-98
- van der Heijden T., Seidel R., Modesti M., Kanaar R., Wyman C., Dekker C. (2007) *Real-time assembly and disassembly of human RAD51 filaments on individual DNA molecules*. Nucleic Acids Res. ;35(17):5646-57
- Helleday T., Eshtad S., Nik-Zainal S. (2014) *Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers*. Nature Reviews Genetics 15, 585-598
- Hine C.M., Li H., Xie L., Mao Z., Seluanov A., Gorbunova V. (2014) *Regulation of RAD51 promoter*. Cell Cycle. ;13(13):2038-45
- Hine C.M., Seluanov A., Gorbunova V. (2008) *Use of the RAD51 promoter for targeted anti-cancer therapy*. Proc Natl Acad Sci USA.;105(52):20810-5
- Hiratsuka T., Uchida K. (1973) *Preparation and properties of 2'(or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate, an analog of adenosine triphosphate*. Biochim Biophys Acta.;320(3):635-47
- Hoeijmakers J.H. (2001) *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature.;411(6835):366-74
- Huang Y., Nakada S., Ishiko T., Utsugisawa T., Datta R., Kharbanda S., Yoshida K., Talanian R. V., Weichselbaum R., Kufe D., Yuan Z.M. (1999) *Role for caspase-mediated cleavage of RAD51 in induction of apoptosis by DNA damage*. Mol Cell Biol. ;19(4):2986-97
- Hyrien O. (2000) *Mechanisms and consequences of replication fork arrest*. Biochimie; 82: 5-17
- Jackson S.P., Bartek J. (2009) *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature.;461(7267):1071-8
- Jeyasekharan A.D., Liu Y., Hattori H., Pisupati V., Jonsdottir A.B., Rajendra E., Lee M., Sundaramoorthy E., Schlachter S., Kaminski C.F., Ofir-Rosenfeld Y., Sato K., Savill J., Ayoub N., Venkitaraman A.R. (2013) *A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization*. Nat Struct Mol Biol.;20(10):1191-8
- Kanamoto T., Hellman U., Heldin C. H., Souchelnytskyi S. (2002) *Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: RAD51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair*. EMBO J. ;21(5):1219-30

- Kass E.M., Jasin M. (2010) *Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways*. FEBS Lett.;584(17):3703-8
- Khanna K.K., Jackson S.P. (2001) *DNA double-strand breaks signalling repair and the cancer connection*. Nature Genet. 27, 247-254
- Kim N., Abdulovic A., Gealy R., Lippert M., Jinks-Robertson S. (2007) *Transcription associated mutagenesis in yeast is directly proportional to the level of gene expression and influenced by the direction of DNA replication*. DNA Repair 6 1285-1296
- Kleckner N. (1996) *Meiosis: how could it work?* Proc Natl Acad Sci USA.;93(16):8167-74
- Ko J.C., Chen H.J., Huang Y.C., Tseng S.C., Weng S.H., Wo T.Y., Huang Y.J., Chiu H.C., Tsai M.S., Chiou R.Y., Lin Y.W. (2012) *HSP90 inhibition induces cytotoxicity via down-regulation of RAD51 expression and DNA repair capacity in non-small cell lung cancer cells*. Regul Toxicol Pharmacol. ;64(3):415-24
- Kong F., Wu J., Hu L., Du Y., Pan Y. (2015) *Association between RAD51 polymorphisms and susceptibility of head and neck cancer: a meta-analysis*. Int J Clin Exp Med.;8(4):6412-9
- Kovalenko O.V., Plug A.W., Haaf T., Gonda D.K., Ashley T., Ward D.C., Radding C.M., Golub E.I. (1996) *Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with RAD51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes*. Proc Natl Acad Sci USA.;93(7):2958-63
- van Kregten M., Tijsterman M. (2014) *The repair of G-quadruplex-induced DNA damage*. Exp Cell Res.;329(1):178-83
- Lamontanara A.J., Gencer E.B., Kuzyk O., Hantschel O. (2013) *Mechanisms of resistance to BCR-ABL and other kinase inhibitors*. Biochim Biophys Acta.;1834(7):1449-59
- Lee, C.R., Park, Y.H., Kim, Y.R., Peterkofsky, A. and Seok, Y.J. (2013). *Phosphorylation-Dependent Mobility Shift of Proteins on SDS-PAGE is Due to Decreased Binding of SDS*. Bull Korean Chem Soc 34, 2063-2066.
- Li X., Zhang X.P., Solinger J.A., Kiiianitsa K., Yu X., Egelman E.H., Heyer W.D. (2007) *RAD51 and Rad54 ATPase activities are both required to modulate RAD51-dsDNA filament dynamics*. Nucleic Acids Res. ;35(12):4124-40
- Li G.M. (2008) *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. Cell Res.;18(1):85-98
- Lieber M.R. (2010) *The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway*. Annu Rev Biochem.;79:181-211

- Lin Z., Kong H., Nei M., Ma H. (2006) *Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer*. PNAS 103(27) 10328-10333.
- Lin C.S., Chen P.C., Wang C.K., Wang C.W., Chang Y.J., Tai C.J., Tai C.J. (2014) *Antitumor Effects and Biological Mechanism of Action of the Aqueous Extract of the Camptotheca acuminata Fruit in Human Endometrial Carcinoma Cells*. Evid Based Complement Alternat Med. ;2014:564810
- Lin F.L., Sperle K., Sternberg N. (1984) *Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process*. Mol Cell Biol.;4(6):1020-34
- Lindahl T. (1993) *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature.;362(6422):709-15
- Linke S.P., Sengupta S., Khabie N., Jeffries B.A., Buchhop S., Miska S., Henning W., Pedoux R., Wang X.W., Hofseth L.J., Yang Q., Garfield S.H., Stürzbecher H.W., Harris C.C. (2003) *p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination*. Cancer Res. ;63(10):2596-605
- Liu Y., Stasiak A.Z., Masson J.Y., McIlwraith M.J., Stasiak A., West S.C. (2004) *Conformational changes modulate the activity of human RAD51 protein*. J Mol Biol.;337(4):817-27
- Liu J., Doty T., Gibson B., Heyer W.D. (2010) *Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA*. Nat Struct Mol Biol. ;17(10):1260-2
- Magadum S., Banerjee U., Murugan P., Gangapur D., Ravikesavan R. (2013) *Gene duplication as a major force in evolution*. J Genet.;92(1):155-61
- 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):3148-59
- Mazin A.V., Alexeev A.A., Kowalczykowski S.C. (2003) *A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the RAD51 nucleoprotein filament*. J Biol Chem. ;278(16):14029-36
- Mehta A., Haber J.E. (2014) *Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair*. Cold Spring Harb Perspect Biol.;6(9):a016428
- Miné J., Disseau L., Takahashi M., Cappello G., Dutreix M., Viovy J.L. (2007) *Real-time measurements of the nucleation, growth and dissociation of single RAD51-DNA nucleoprotein filaments*. Nucleic Acids Res.;35(21):7171-87
- Miné-Hattab J., Rothstein R. (2012) *Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination*. Nat Cell Biol. ;14(5):510-7

- Moczydlowski E.G., Fortes P.A. (1981) *Characterization of 2',3'-O-(2,4,6-trinitrocyclohexadienylidene)adenosine 5'-triphosphate as a fluorescent probe of the ATP site of sodium and potassium transport adenosine triphosphatase. Determination of nucleotide binding stoichiometry and ion-induced changes in affinity for ATP.* J Biol Chem.;256(5):2346-56
- Modesti M., Ristic D., van der Heijden T., Dekker C., van Mameren J., Peterman E.J., Wuite G.J., Kanaar R., Wyman C. (2007) *Fluorescent human RAD51 reveals multiple nucleation sites and filament segments tightly associated along a single DNA molecule.* Structure.;15(5):599-609
- Moutin M.J., Cuillel M., Rapin C., Miras R., Anger M., Lompré A.M., Dupont Y. (1994) *Measurements of ATP binding on the large cytoplasmic loop of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase overexpressed in Escherichia coli.* J Biol Chem.;269(15):11147-54
- Nagathihalli N.S., Nagaraju G. (2011) *RAD51 as a potential biomarker and therapeutic target for pancreatic cancer.* Biochim Biophys Acta.;1816(2):209-18
- Ogrodnik A., Hudon T.W., Nadkarni P.M., Chandawarkar R.Y. (2013) *Radiation exposure and breast cancer: lessons from Chernobyl.* Conn Med.;77(4):227-34
- Ota T., Suzuki Y., Nishikawa T., Otsuki T., Sugiyama T. (2004) *Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs.* Nat Genet. ;36(1):40-5
- Park J.Y., Yoo H. W., Kim B.R., Park R., Choi S.Y., Kim Y. (2008) *Identification of a novel human RAD51 variant that promotes DNA strand exchange.* Nucleic Acids Res. (10):3226-34
- Pecina, P. et al. (2010). *Phosphomimetic substitution of cytochrome C tyrosine 48 decreases respiration and binding to cardiolipin and abolishes ability to trigger downstream caspase activation.* Biochemistry 49, 6705-14.
- Persaud, A. et al. (2014). *Tyrosine phosphorylation of NEDD4 activates its ubiquitin ligase activity.* Sci Signal 7, ra95.
- Popova M., Shimizu H., Yamamoto K. I., Lebecqec M., Takahashi M., Fleury F. (2009) *Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of RAD51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependant on that of Y315* FEBS Letters 583 1867-1872
- Raderschall E., Bazarov A., Cao J., Lurz R., Smith A., Mann W., Ropers H.H., Sedivy J.M., Golub E.I., Fritz E., Haaf T. (2002) *Formation of higher-order nuclear RAD51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis.* J Cell Sci.;115(Pt 1):153-64
- Ramotar D., Masson J.Y. (1996) *Saccharomyces cerevisiae DNA repair processes: an update.* Mol Cell Biochem.;158(1):65-75

- Rass E., Grabarz A., Bertrand P., Lopez B.S. (2012) *Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining*. *Cancer Radiother.* 2012 Feb;16(1):1-10
- Reymer A., Frykholm K., Morimatsu K., Takahashi M., Nordén B. (2009) *Structure of human RAD51 protein filament from molecular modeling and site-specific linear dichroism spectroscopy*. *Proc Natl Acad Sci USA.* ;106(32):13248-53
- Rich T., Allen R.L., Wyllie A.H. (2000) *Defying death after DNA damage*. *Nature.* ;407(6805):777-83
- Robertson,R.B., Moses,D.N., Kwon,Y., Chan,P., Chi,P., Klein,H., Sung,P. and Greene,E.C. (2009) *Structural transitions within human RAD51 nucleoprotein filaments*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106, 12688–12693
- Roca A.I., Cox M.M. (1997) *RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*;56:129-223
- Roeder G.S. (1990) *Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation*. *Trends Genet.*;6(12):385-9
- Sagi, D., Tlusty, T. & Stavans, J. (2006) *High fidelity of RecA catalyzed recombination: a watchdog of genetic diversity*. *Nucleic Acids Res.* 34, 5021–5031
- San Filippo J., Sung P., Klein H. (2008) *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. *Annu Rev Biochem.* ;77:229-57
- Selmane T., Camadro J.M., Conilleau S., Fleury F., Tran V., Prévost C., Takahashi M. (2004) *Identification of the subunit-subunit interface of Xenopus RAD51.1 protein: similarity to RecA*. *J Mol Biol.*;335(4):895-904
- Shin D.S., Pellegrini L., Daniels D.S., Yelent B., Craig L., Bates D., Yu D.S., Shivji M.K., Hitomi C., Arvai A.S., Volkman N., Tsuruta H., Blundell T.L., Venkitaraman A.R., Tainer J.A. (2003) *Full-length archaeal RAD51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2*. *EMBO J.* ;22(17):4566-76
- Short S.C., Giampieri S., Worku M., Alcaide-German M., Sioftanos G., Bourne S., Lio K.I., Shaked-Rabi M., Martindale C. (2011) *RAD51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells*. *Neuro Oncol.*;13(5):487-99
- Sigurdsson S., Trujillo K., Song B., Stratton S., Sung P. (2001) *Basis for avid homologous DNA strand exchange by human RAD51 and RPA*. *J Biol Chem.*;276(12):8798-806
- Sigurdsson S., Van Komen S., Bussen W., Schild D., Albala J.S., Sung P. (2001) *Mediator function of the human RAD51B-RAD51C complex in RAD51/RPA-catalyzed DNA strand exchange*. *Genes Dev.* ;15(24):3308-18

- Skoneczna A., Kaniak A., Skoneczny M. (2015) *Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms*. FEMS Microbiol Rev. pii: fuv028
- Slupianek A., Dasgupa Y., Ren S.-Y., Gurdek E., Donli M., Nieborowska-Skorska M., Fleury F., Skorski T. (2011) *Targeting RAD51 phosphotyrosine-315 to prevent unfaithful recombination repair in BCR-Abl leukemia*. Blood 118(4) 1062-1068
- 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):4189-201.
- Slupianek A., Schmutte C., Tomblin G., Nieborowska-Skorska M., Hoser G., Nowicki M. O., Pierce A. J., Fishel R., Skorski T. (2001) *BCR/ABL Regulates Mammalian RecA Homologs, Resulting in Drug Resistance*. Molecular Cell, Vol. 8, 795-806
- Smith G.C., Jackson S.P. (1999) *The DNA-dependent protein kinase*. Genes Dev.;13(8):916-34
- Sollier J., Cimprich K.A. (2015) *Breaking bad: R-loops and genome integrity*. Trends Cell Biol.;25(9):514-22
- Sørensen C. S., Hansen L. T., Dziegielewska J., Syljuåsen R. G., Lundin C., Bartek J. and Helleday T. (2005) *The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair*. Nature Cell Biol 7(2) 195-201
- St Charles J. A., Liberti S. E., Williams J. S., Lujan S. A., Kunkel T. A. (2015) *Quantifying the contributions of base selectivity, proofreading and mismatch repair to nuclear DNA replication in Saccharomyces cerevisiae*. DNA Repair 31 41-51
- Stankiewicz P1, Lupski JR. (2002) *Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders*. Curr Opin Genet Dev.;12(3):312-9
- Stewart G.S. (2009) *Solving the RIDDLE of 53BP1 recruitment to sites of damage*. Cell Cycle ; 8: 1532-1538
- Story R.M., Weber I.T., Steitz T.A. (1992) *The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer*. Nature.;355(6358):318-25
- Sonoda E., Sasaki M.S., Buerstedde J.M., 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

- Sugiyama T., Kantake N. (2009) *Dynamic regulatory interactions of RAD51, rad52, and replication protein-a in recombination intermediates*. J Mol Biol. ;390(1):45-55
- Summers K.C., Shen F., Sierra-Potchanant E.A., Phipps E.A., Hickey R.J., Malkas L.H. (2011) *Phosphorylation: the molecular switch of double-strand break repair*. Int J Proteomics.;2011:373816
- Sun H., Bai J., Chen F., Jin Y., Yu Y., Jin L., Fu S. (2011) *RAD51 G135C polymorphism is associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 22,399 subjects*. Breast Cancer Res Treat.;125(1):157-61
- Takata M., Sasaki M.S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., Takeda S. (1998) *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. EMBO J.;17(18):5497-508
- 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):781-90.
- Tarsounas M., Davies A.A., West S.C. (2004) *RAD51 localization and activation following DNA damage*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.;359(1441):87-93
- Thompson L.H., Schild D. (2002) *Recombinational DNA repair and human disease*. Mutat Res.;509(1-2):49-78
- Tian H., Gao Z., Li H., Zhang B., Wang G., Zhang Q., Pei D., Zheng J. (2015) *DNA damage response--a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy*. Cancer Lett.;358(1):8-16
- Tsai Y.C., Wang Y., Urena D.E., Kumar S., Chen J. (2011) *Heterology tolerance and recognition of mismatched base pairs by human RAD51 protein*. DNA Repair (Amst);10(4):363-72
- 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. 1996 Jun 25;93(13):6236-40
- Ward A., Khanna K.K., Wiegman A.P. (2015) *Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51*. Cancer Treat Rev.;41(1):35-45
- Ward, J. F. (1988) *DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability*. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 35, 95-125
- Wickramasinghe C. M., Arzouk H., Frey A., Maiter A., Sale J. E. (2015) *Contributions of the specialised DNA polymerases to replication of structured DNA* DNA Repair 29 83-90

- Wiegmans A.P., Al-Ejeh F., Chee N., Yap P.Y., Gorski J.J., Da Silva L., Bolderson E., Chenevix-Trench G., Anderson R., Simpson P.T., Lakhani S.R., Khanna K.K. (2014) *RAD51 supports triple negative breast cancer metastasis*. *Oncotarget*;5(10):3261-72
- Wu D., Wu M., Halpern A., Rusch D.B., Yooseph S., Frazier M., Venter J.C., Eisen J.A. (2007) *Stalking the fourth domain in metagenomics data: searching for, discovering, and interpreting novel, deep branches in marker gene phylogenetic trees*. *PLoS One*, 6(3): e18011.
- Yang H., Jeffrey P.D., Miller J., Kinnucan E., Sun Y., Thoma N.H., Zheng N., Chen P.L., Lee W.H., Pavletich N.P. (2002) *BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure*. *Science*. ;297(5588):1837-48.
- Yata K., Bleuyard J.-Y., Nakato R., Ralf C., Katou Y., Schwab R. A., Niedzwiedz W., Shirahige K., and Esashi F (2014) *BRCA2 Coordinates the Activities of Cell-Cycle Kinases to Promote Genome Stability*. *Cell Reports* 7, 1547–1559
- Yata, K., Lloyd, J., Maslen, S., Bleuyard, J.Y., Skehel, M., Smerdon, S.J., and Esashi, F. (2012). *Plk1 and CK2 act in concert to regulate RAD51 during DNA double strand break repair*. *Mol. Cell* 45, 371–383.
- 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 A.F., 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.
- Yu X., Chen J. DNA (2004) *damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains*. *Mol Cell Biol*; 24: 9478-9486
- Yu D.S., Sonoda E., Takeda S., Huang C.L., Pellegrini L., Blundell T.L., Venkitaraman A.R. (2003) *Dynamic control of RAD51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2*. *Mol Cell*. ;12(4):1029-41
- Yu S.S., Tu Y., Xu L.L., Tao X.Q., Xu S., Wang S.S., Xiong Y.F., Mei J.H. (2015) *Effects of RAD51 on survival of A549 cells*. *Asian Pac J Cancer Prev*. ;16(1):175-9
- Yuan Z.-M., Huang Y., Ishiko T., Nakada S., Utsugisawa T., Kharbanda S., Wang R., Sung P., Shinohara A., Weichselbaum R., Kufe D. (1997) *Regulation of RAD51 function by c-Abl Response to DNA Damage*. *Cancer Res*. 59, 3547–3551
- Yuan S.S., Lee S.Y., Chen G., Song M., Tomlinson G.E., Lee E.Y. (1999) *BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of RAD51 complex in vivo*. *Cancer Res*. ;59(15):3547-51
- Zhu J., Chen H., Guo X.E., Qiu X.L., Hu C.M., Chamberlin A.R., Lee W.H. (2015) *Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of novel RAD51 inhibitors*. *Eur J Med Chem*. ;96:196-208.

Zhu J., Zhou L., Wu G., König H., Lin X., Li G., Qiu X.L., Chen C.F., Hu C.M., Goldblatt E., Bhatia R., Chamberlin A.R., Chen P.L., Lee W.H. (2013) *A novel small molecule RAD51 inactivator overcomes imatinib-resistance in chronic myeloid leukaemia*. EMBO Mol Med.;5(3):353-65

# **Annexes.**

## Annexe 1 : Fiche projet CNRS ExoMod.

 <p><b>MI</b> Mission pour l'Interdisciplinarité</p>	<p align="center"><b>APPEL A PROJETS PEPS Interdisciplinaires 2015</b></p> <p align="center"><b>ExoMod</b></p> <p align="center">Nouveaux modèles : la biodiversité pour explorer de nouveaux mécanismes biologiques et biochimiques</p>		
<p align="center"><b>Ce formulaire (libellé ExoMod –<b>nomcandidat</b>) doit être obligatoirement <u>déposé par le porteur du projet</u> sur le site <a href="https://sigap.cnrs.fr/sigap/web/connexion.php">https://sigap.cnrs.fr/sigap/web/connexion.php</a> sous format word et ou pdf</b></p> <p align="center"><b>DATE LIMITE DE CANDIDATURE : LE 29 JANVIER 2015 A MINUIT</b></p>			
<p><b>Identification</b></p>			
Civilité et Nom du porteur du projet	Mr FLEURY Fabrice / Mr ALLIGAND Brendan		
Titre long (max 150 caractères)	Les tardigrades comme organismes modèles de la protection et réparation de l'ADN		
Acronyme	TARDINA		
Durée envisagée du projet	X 1 an		☑ 2 ans
<p><b>Résumé du projet : (10 lignes maxi)</b></p>			
<p>Les tardigrades présentent une résistance hors du commun aux conditions extrêmes, capables de résister à des taux de radiations tels qu'ils survivent aux rayonnements solaires d'un vol spatial. Les mécanismes permettant leur survie restent à être identifiés mais les voies de la photoprotection et de la réparation de l'ADN pourraient jouer un rôle prépondérant. A partir de ce modèle animal original, nous proposons d'étudier les mécanismes impliqués dans le maintien de la stabilité génomique. Après la sélection d'une espèce la mieux adaptée, nous évaluerons l'importance du contenu pigmentaire des tardigrades pour la résistance aux dommages radio-induits de l'ADN. Nous analyserons également la réponse aux dommages de l'ADN par l'identification et la caractérisation des protéines de réparation de l'ADN. Nous pourrions ainsi établir la relation entre la photoprotection et la réparation de l'ADN ce qui nous conduira à mieux comprendre les mécanismes à l'origine d'une si grande efficacité dans la résistance aux radiations.</p>			
<p><b>Exposé scientifique du projet (3 pages maximum) accompagné d'un court CV du porteur (1/2 page) et mentionnant 5 à 7 références pertinentes des équipes impliquées. Les équipes participantes et la demande budgétaire doivent être mentionnées (ainsi que sur l'application SIGAP lors de la candidature).</b></p>			
<p><b>INTRODUCTION</b></p>			
<p><b><i>Les tardigrades des organismes très résistants.</i></b></p>			
<p>Tous les êtres vivants partagent un fonctionnement commun basé sur leur ADN. Tous doivent faire face à des dommages quotidiens, 10 000 cassures par jour et par cellule en moyenne pour une cellule humaine. Tous possèdent des mécanismes leur permettant de réparer ces cassures. Certains organismes ont développé des capacités particulières pour résister à ces dommages, tels les tardigrades qui appartiennent à une classe d'organisme sans équivalent au sein des métazoaires. Ces organismes d'environ un demi-millimètre se trouvent facilement dans tous les milieux humides, en particulier dans les mousses et dans les lichens. Découverts en 1773, l'attention s'est portée sur eux depuis qu'ils sont devenus les premiers animaux à avoir survécu à un voyage dans l'espace sans protection (Jönsson et al, 2008). Des expériences en conditions extrêmes ont</p>			

confirmé l'extraordinaire résistance des tardigrades aux températures hautes ou basses de  $-272^{\circ}\text{C}$  à  $150^{\circ}\text{C}$ , au vide, aux hautes pressions jusqu'à 30 000 atmosphères (Kunihiro et al 1998). Enfin, il supporte des taux de radiations exceptionnels (rayons X ou ultraviolets) résistant à des doses d'irradiation mille fois plus grandes que l'homme (Horikawa et al., 2013). Cela en fait un système de choix pour étudier la protection de l'ADN. En cherchant à répondre à la manière dont les tardigrades parviennent à protéger leur ADN, des découvertes importantes peuvent être faites sur les mécanismes mis en jeu.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la résistance des tardigrades. Un mécanisme bien connu est l'entrée en vie ralentie, ou cryptobiose. En effet, lorsque les conditions deviennent défavorables les tardigrades peuvent perdre 97% de leur eau. Cette perte d'eau va diminuer l'effet des radiations en limitant l'apparition de ROS (Reactive Oxygen Species) issus de la photolyse de l'eau. Toutefois ceci n'explique pas tout puisque de récents travaux montrent que dans leur état hydraté, les tardigrades résistent même mieux aux radiations (Dose Létale  $DL_{50}=5000$  Gy contre 4400Gy) (Beltran-Pardo et al., 2013).

### **La résistance aux fortes doses de radiations ionisantes fait intervenir plusieurs mécanismes.**

Les fortes doses de radiations sont très souvent mortelles car elles agissent sur le génome des organismes vivants de façon indirecte via la création d'espèces radicalaires libres oxygénées ou ROS (moins toxique dans l'état d'anhydrobiose) ou directe par des altérations physiques de l'ADN (cassures simple ou double brin de l'ADN).

La compréhension des mécanismes mis en jeu chez les tardigrades apporterait des informations précieuses dont la portée devrait dépasser celle du système des tardigrades.

Les deux pistes envisagées pour expliquer cette résistance aux radiations en plus de l'état d'anhydrobiose sont la photoprotection et l'efficacité de la réparation de l'ADN, deux processus dont la relation n'est pas clairement établie.

La photoprotection permet l'absorption de l'énergie des rayons lumineux par les pigments. Ce phénomène est bien décrit chez les œufs ou embryons (Lamare et Hoffman, 2004) ainsi que certains organismes adultes telles les limaces de mer (Jesus et al, 2010). Une étude a clairement montré que les tardigrades acquièrent leurs pigments de leur alimentation (Bonifacio et al, 2012). Il est donc probable que cette source pigmentaire participe à la photoprotection des tardigrades en absorbant une partie des rayonnements.

D'autre part, la réparation de l'ADN permet aux organismes de prendre en charge les dommages quotidiens. Les systèmes de réparation sont relativement bien conservés dans l'arbre du vivant et sont généralement adaptés à chaque type de dommage de l'ADN. Ainsi les radiations ionisantes induisent majoritairement des cassures double brin de l'ADN qui sont les plus délétères. Ces altérations peuvent être prises en charge par deux voies de réparation principales : la recombinaison homologue (RH) impliquant la protéine RAD51 et la non-homologue (NHEJ) impliquant la protéine DNA-PKcs .

Peu d'études se sont intéressées aux protéines de réparation impliquées dans ces deux voies chez les Tardigrades. Toutefois l'équipe de Beltran-Pardo et al. a montré récemment que la séquence de la protéine RAD51 dans les trois espèces de tardigrades, *Milnesium cf. tardigradum*, *Hypsibius dujardini* et *Macrobiotus cf. harmsworthi* était similaire à celle trouvée pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Beltran-Pardo et al. 2013). Il est donc probable que les systèmes de réparation chez les tardigrades soient conservés.

## **PROBLEMATIQUE**

Quelle relation entre photoprotection et réparation de l'ADN permet aux tardigrades de survivre aux forts taux de radiations ?

## **METHODOLOGIE**

### **1-Mise en culture des tardigrades**

Afin de mener correctement les expériences sur les tardigrades il conviendra d'isoler une espèce caractérisée par un cycle de vie court et une résistance aux radiations. En effet, il existe plus de 800 espèces de tardigrades recensées à ce jour qui peuvent être d'eau douce, terrestres ou marines. Nous avons d'ores et déjà mis au point un protocole pour trouver et isoler des tardigrades à partir de mousses ou de lichens (Figure 1).

Cela nous a permis de commencer des essais de cultures pour deux espèces de tardigrades en se basant sur les protocoles de culture disponibles. Cette culture de tardigrades doit être suffisamment efficace pour obtenir des populations assez importantes pour réaliser les tests. Si les cultures venaient à être limitantes, il est possible de se procurer des souches commerciales d'*Hypsibius dujardini* (Sciento) qui est bien décrite et nous pouvons bénéficier de l'expérience d'un collaborateur du partenaire 2, i.e. Ricardo C. Neves (Schulze et al., 2013) puisqu'aucun laboratoire français ne dispose de ce modèle original.



Figure 1. Photographies au microscope photonique (x400) de Tardigrades vivants de l'ordre des Eutardigrada récoltés dans des mousses (*Bryum capillare*) à Nantes (44).

## 2- Transfert de pigments aux tardigrades

Les microalgues ont développé une large gamme de mécanismes de photoprotection pour s'accommoder de l'intensité lumineuse de leur milieu. Leur gestion de l'excès de lumière est primordiale. En effet, les doses importantes de radiations peuvent léser la chaîne photosynthétique de transport d'électrons par la création d'espèces réactives de l'oxygène. L'un des mécanismes photoprotecteurs clés implique la dissipation de l'énergie lumineuse en excès par des caroténoïdes photoprotecteurs (e. g. zeaxanthine). Le mode d'action réside dans la capture et l'élimination des ions superoxyde, des radicaux hydroxydes ou du peroxyde d'hydrogène. Typiquement, la photoacclimatation des microalgues se traduit par une induction de la synthèse des caroténoïdes qui augmente l'efficacité de la photoprotection (Lavaud et al, 2004 ; Jesus et al, 2008). Ainsi, pour cette partie l'étape déterminante est la culture de micro-algues (*Chlorella sp.*) avec différentes intensités lumineuses. Concrètement, nous allons établir une condition à haute intensité lumineuse et une à basse intensité lumineuse (20 et 400  $\mu\text{mol E}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$  respectivement). La culture de microalgues dans ces deux conditions est connue pour induire des différences significatives de contenu en pigments photoprotecteurs et pour être à l'origine de modifications importantes des capacités photoprotectives des microalgues (Jesus et al 2008). Les différents lots d'algues avec leurs profils pigmentaires propres seront utilisés pour nourrir les tardigrades. L'action photoprotective que pourraient avoir ces pigments sur les tardigrades sera étudiée selon les modalités détaillées dans la partie suivante. Les modifications photoprotectrices acquises par les *Chlorella sp.* sous les deux régimes de lumières seront caractérisées en traçant les courbes de photosynthèse-irradiance et en mesurant leurs potentiels de photorégulation par des mécanismes NPQ (non-photochemical quenching). Des indices NPQ plus élevés sont de bons indicateurs de capacités de photoprotection plus élevés et généralement de concentrations plus élevées en caroténoïdes photoprotecteurs (e.g. xanthophylle) (Jesus et al. 2008, Perkins et al, 2010 ; Jesus et al, 2010). Ces mesures seront réalisées en utilisant la méthode de fluorescence PAM (Pulse Amplitude Modulated) selon la méthode développée par l'équipe MMS pour l'étude des biofilms et les limaces de mer (Ventura et al, 2013). Afin de déterminer le contenu pigmentaire en caroténoïdes des microalgues et des tardigrades les pigments seront extraits et quantifiés par HPLC. Cette méthode a donné de très bons résultats sur les biofilms du microphytobenthos, les limaces de mer et les huîtres.

## 3- Evaluation de l'importance des pigments sur la radio-résistance des tardigrades

Les lots de tardigrades avec différents contenus pigmentaires seront ensuite traités aux rayons X (irradiateurs à rayons X, plateau technique de la SFR de Nantes) et la toxicité sera mesurée en déterminant la courbe de survie (évaluation de la viabilité des tardigrades).

Les résultats ainsi obtenus permettront de juger de l'importance de ces pigments dans le phénomène de photoprotection. Il sera alors envisageable de corréliser la quantité et le type de pigment avec la radio-résistance des tardigrades. Les conditions de culture des tardigrades conduisant à différents phénotypes résistants seront alors choisies pour aborder l'évaluation des dommages de l'ADN.

## 4- Evaluation des dommages de l'ADN et identification des protéines de réparation chez les tardigrades

Grâce aux étapes précédentes, nous disposerons de population de tardigrades traitées sur lesquelles nous estimerons le taux de dommages d'ADN en mesurant le niveau de phosphorylation d'histones. En effet, chez de nombreuses espèces animales, la phosphorylation de certaines histones (H2AX chez l'homme) est fréquemment utilisée comme un marqueur des dommages de l'ADN. Dans la même optique, nous évaluerons chez les tardigrades, ces modifications radio-induites par des approches biochimiques (Western Blotting). D'autre part, la recherche des protéines de réparation susceptibles d'être activées en réponse aux dommages de l'ADN, sera entreprise par ces méthodes de Western Blot dans la mesure où l'homologie de séquence entre plusieurs protéines de réparation de tardigrades et de mammifères apparaît être conservée. Un alignement de séquence entre la protéine RAD51 humaine et du tardigrade *Hypsibius dujardini* nous a permis de déterminer 73% d'identité. Cette homologie renforce l'idée d'une grande conservation de séquence des protéines de réparation et une analyse préliminaire nous a permis de confirmer la reconnaissance de HspRAD51 par nos anticorps disponibles dans l'équipe réparation de l'ADN-UFIP (Figure 2).

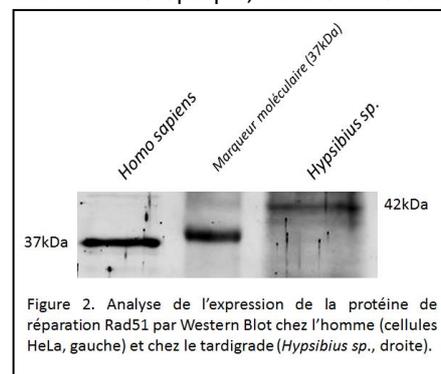


Figure 2. Analyse de l'expression de la protéine de réparation Rad51 par Western Blot chez l'homme (cellules HeLa, gauche) et chez le tardigrade (*Hypsibius sp.*, droite).

### RESULTATS ATTENDUS

Il est raisonnable de supposer que les tardigrades nourris avec les algues exposées à une forte intensité lumineuse, présentent une plus forte radio-résistance. La confirmation de ce résultat, permettrait de mettre au jour pour la première fois un lien direct entre l'alimentation de micro-algues et la capacité de résistance des tardigrades.

La recherche de protéines de réparation de l'ADN chez les tardigrades permettrait de préciser la présence ou l'absence de certaines protéines de réparation de l'ADN, ce qui nous informera des voies privilégiées utilisées par les tardigrades. Cette mise en évidence des voies de réparation empruntées par les tardigrades à l'origine de leur phénotype radio-résistant conduirait à une meilleure compréhension des relations entre les différentes voies de réparation, et donc mieux comprendre des problèmes de résistances anticancéreuses rencontrés dans certains traitements par radiothérapie.

### CALENDRIER ET BUDGET PREVISIONNEL

Etapes	Mois 1-2	Mois 2-6	Mois 6-9	Mois 9-12	Budget Prévisionnel (€)	
1. Production de biomasse : cultures de tardigrades ( <i>Hypsibius dujardini</i> ou autre)	MMS	MMS			Consommables, milieux de culture, achat souche	5
2. Cultures de tardigrades avec différentes alimentations en micro-algues		MMS			Consommables HPLC, (colonne, filtre, réactifs etc..)	3
3. Traitement aux rayons X-détermination des courbes de survie et des dommages à l'ADN		MMS	UFIP		Prestation plateforme SFR radioactivité, microscopie (réactifs, lames etc..)	4
		UFIP				
4. Analyse et recherche des protéines de réparation			UFIP	UFIP	Anticorps, réactifs d'analyse et de traitement (coloration, chitinase etc..)	7
5. Missions					Participations congrès	1
					<b>Total</b>	<b>20</b>

CV COURT DU PORTEUR

## DESCRIPTION DES PARTENAIRES

### **PARTENAIRE 1 –Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines UFIP UMR 6286**

Equipe 2 : Mécanismes et régulation de la réparation de l'ADN

#### **Participants**

- Fabrice FLEURY, PU Université de Nantes, 2 mois
- Brendan ALLIGAND, doctorant, 2 mois
- Damien MARQUIS, Technicien, 2 mois

#### **Expertises**

L'équipe Réparation de l'ADN possède une solide expertise dans l'analyse des dommages à l'ADN et des voies de réparation de l'ADN en conduisant des études moléculaires et cellulaires. Un intérêt particulier est porté sur le mécanisme de réparation par recombinaison homologue impliquant la protéine clef RAD51 qui peut être à l'origine de radio-résistance aux traitements anticancéreux. L'utilisation d'un modèle original « super-résistant » pourrait conduire à l'identification de nouveaux mécanismes transposables aux modèles cellulaires de mammifères.

#### **Publications les plus significatives en relation avec le projet**

Renodon-Cornière A., Weigel P., Le Breton M., **Fleury F.** New potential therapeutic approaches by targeting RAD51-dependent homologous recombination. Book "DNA Repair - New Research Directions", 2013, ISBN 980-953-307-746-3, pp 467-488.

Slupianek A., Dasgupta Y., Ren S., Gurdek E., Bargaoanu M., Nieborowska-Skorska B., **Fleury F.**, and Skorski T. *Targeting RAD51 phosphotyrosine-315 to prevent unfaithful homeologous recombination repair in BCR-ABL1 leukemia*, Blood, 2011, 118(4):1062-8

Popova M., Henry S., **Fleury F.** *Posttranslational modifications of RAD51 protein and its direct partners: role and effect on Homologous Recombination – mediated DNA repair.* "DNA Repair / Book 4", 2011, ISBN 978-953-307-1336-0, pp 143-160.

Shimizu H., Popova M., **Fleury F.**, Kobayashi M., Hayashi N., Venkitaraman A.R., Sakane I., Kurumisaka H., Takahashi M., Yamamoto K. *c-Abl tyrosine kinase stabilizes RAD51 chromatin association*. BBRC, 2009, 382, 286-91.

Popova M., Shimizu H., Yamamoto K., Le Behec M., Takahashi M., **Fleury F.** *Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of RAD51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependent on that of Y315*. FEBS Lett., 2009, 583, 1867-72.

### **PARTENAIRE 2 –Mer Molécule Santé MMS EA 2160**

Equipe Eco : Réseaux trophiques et contaminants en milieux marins côtiers et estuariens

#### **Participants**

- Bruno JESUS, MCU Université de Nantes, 2 mois
- Bruno Cogne, MCU Université de Nantes, 2 mois
- Priscilla Decottignies MCU Université de Nantes, 2 mois

#### **Expertises**

L'équipe MMS possède une vaste expérience dans la culture des micro-algues et dans l'analyse des mécanismes de photorégulation dans les biofilms benthiques et chez les limaces de mer à symbiote photosynthétique. Ils ont effectué des recherches approfondies sur le rôle des pigments des micro-algues contenus dans les cellules animales. En particulier le rôle des pigments du cycle de xanthophylle chez les limaces de mer (*Elysisa timida*, *Elysis viridis* et *Thuridilla hopei*) et le rôle du pigment marennine chez les huîtres (*Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis*). En outre, MMS possède une banque de microalgues (Nantes Culture Collection), qui est enregistré au World Data Center for Microorganisms (NCC WDCM 856) avec un catalogue de 300 souches. L'équipe MMS présente également des compétences dans les élevages d'invertébrés ainsi que dans le champ de la taxonomie basée sur la Microscopie Electronique à Balayage. Ces aptitudes et compétences sont indispensables pour mener à bien les étapes clés de ce projet.

**Publications les plus significatives en relation avec le projet**

- Cartaxana, P., Domingues, N., Cruz, S., **Jesus, B.**, Laviale, M., Serôdio, J., Marques da Silva, J. (2013) Photoinhibition in benthic diatom assemblages under light stress. *Aquatic Microbial Ecology*, 70:87-92.
- Ventura, P., Calado, G., **Jesus, B.** (2013) Photosynthetic efficiency and kleptoplast pigment diversity in the sea slug *Thuridilla hopei* (Vérany, 1853). *J Exp Biol Ecol.* 441: 105-109.
- P.G. Beninger, **P. Decottignies** (2008) Worth a second look: gill structure in *Hemipecten forbesianus* (Adams & Reeve, 1849) and taxonomic implications for the Pectinidae, *J Molluscan Stud*, 74: 137-142
- Perkins, R. G., Lavaud, J., Serôdio, J., Mouget, J. L., Cartaxana, P., Rosa, P., Barille, L., Brotas, V, **Jesus, B.** (2010) Vertical cell movement is a primary response of intertidal benthic biofilms to increasing light dose. *Mar Ecol Prog Ser*, 416:93-103. doi:10.3354/meps08787
- Jesus, B.** Mouget, J.-L., Perkins, R. G. (2008) Detection of diatom xanthophyll cycle using spectral reflectance. *J Phycol*, 44 (5), 1349-1359.
- Jesus, B.**, Ventura, P., Calado, G. (2010) Behaviour and a functional xanthophyll cycle enhance photo-regulation mechanisms in the solar-powered sea slug *Elysia timida* (Risso, 1818). *J Exp Biol Ecol.* 395:98-105.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Beltran-Pardo et al. (2013) Sequence analysis of the DNA-repair gene *RAD51* in the tardigrades *Milnesium cf. tardigradum*, *Hypsibius dujardini* and *Macrobotus cf. harmsworthi*. *J. Limnol.*; 72(s1): 80-91.
- Bonifacio A, et al. (2012) Nature, source and function of pigments in tardigrades: in vivo raman imaging of carotenoids in *Echiniscus blumi*. *PLoS One*; 7(11):e50162.
- Corinna Schulze, et al. (2013) Comparative immunohistochemical investigation on the nervous system of two species of Arthrotardigrada (Heterotardigrada, Tardigrada) *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology.*;
- Horikawa DD, et al. (2013) Analysis of DNA repair and protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after exposure to UVC radiation. *PLoS One.*;8(6):e64793
- Jesus, B. et al.. (2010) Behaviour and a functional xanthophyll cycle enhance photo-regulation mechanisms in the solar-powered sea slug *Elysia timida* (Risso, 1818). *J Exp Biol Ecol.* 395:98-105.
- Jesus, B. et al. (2008) Detection of diatom xanthophyll cycle using spectral reflectance. *J Phycol*, 44 (5), 1349-1359.
- Jönsson KI et al.. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Curr Biol* 2008,18:R729-R731.
- Kunihiro Seki1 & Masato Toyoshima1(1998). Preserving tardigrades under pressure *Nature*, 395, 853-854
- Lamare MD, Hoffman J (2004) Natural variation of carotenoids in the eggs and gonads of the echinoid genus, *Strongylocentrotus*: implications for their role in ultraviolet radiation photoprotection. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312,(2),215-233.
- Lavaud J et al. (2004) General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (Bacillariophyceae). *J. Phycology* 40 : 130 -137.
- Perkins, R. G. et al. (2010) Vertical cell movement is a primary response of intertidal benthic biofilms to increasing light dose. *Mar Ecol Prog Ser*, 416:93-103.
- Ventura, P. et al. (2013) Photosynthetic efficiency and kleptoplast pigment diversity in the sea slug *Thuridilla hopei* (Vérany, 1853). *J Exp Biol Ecol.* 441: 105-109

**Informations pratiques :**

- Le formulaire de réponse (au format pdf) ne doit pas dépasser 6 pages.
- Le projet doit être rédigé préférentiellement en français.
- L'implication des équipes doit être clairement identifiée ; les contributions doivent être quantitativement renseignées dans l'application SIGAP. Le temps de travail est exprimé en personne.mois : une personne.mois correspond à une personne travaillant sur le projet à temps plein pendant un mois.
- En déposant une proposition le porteur s'engage à tenir informé son directeur d'unité de cette initiative; il s'engage également à fournir un rapport scientifique en décembre 2015 qui sera évalué dans le cadre du suivi des actions interdisciplinaires du CNRS ainsi qu'un rapport financier des dépenses engagées au 31 décembre de l'année de financement. Ces deux documents doivent être adressés au responsable de l'action, Stéphane Blanc ([stephane.blanc@cnrs-dir.fr](mailto:stephane.blanc@cnrs-dir.fr)).
- Procédure de suivi des actions interdisciplinaires : le porteur s'engage à présenter les recherches mise en œuvre lors des journées de restitution organisées au CNRS au premier trimestre 2016. Les frais de déplacement du représentant des projets lauréats seront à prendre sur le financement alloué en 2015.
- Procédure d'information aux candidats : à la fin de l'évaluation, le porteur du projet sera informé par courriel

de la décision du comité d'évaluation du PEPS.

- Les rapports d'évaluation des projets ne seront pas envoyés aux porteurs.
- Les montants alloués (qui peuvent différer de la demande budgétaire exprimée par le porteur du projet) par le comité d'évaluation du PEPS seront notifiés directement et intégralement au porteur du projet, ce dernier aura la responsabilité de ventiler les moyens en fonction des besoins des équipes impliquées.
- Les frais de personnels type CDD bourse doctorale ainsi que les indemnités de stages ne pourront pas être financés sur ces crédits.
- Les projets doivent être réalisés sur l'année 2015. Les crédits destinés à l'exécution du projet, de type subvention d'Etat (SE) doivent être entièrement payés à la date de la clôture de l'année budgétaire fixée par le CNRS, et ceci quel que soit le moment de la notification. Aucune dérogation ne pourra être accordée.

## **Annexe 2 : Participations aux congrès et production scientifique**

### **1- 7èmes journées du Cancéropôle du Grand Ouest (CGO)**

Date : 02 et 03 Avril 2013

Lieu : Les Sables d'Olonne (85)

Type : Poster (« Rôle des phosphorylations de RAD51 sur ses activités et ses interactions »)

### **2- Journées du département Sciences de la Vie**

Date : 11 Septembre 2013

Lieu : Université de Nantes (44)

Type : Poster (« Rôle des phosphorylations de RAD51 sur ses activités »)

### **3- Young Life Scientist's Symposium (YLS) : DNA damage response in physiology and disease**

Date : 24 Octobre 2014

Lieu : Université de Rennes (35)

Type : Poster (« RAD51 c-Abl mediated phosphorylation of Y54 and Y315 affects its recombinase activity»)

### **4- 20ème congrès des 3R Réplication Recombinaison Réparation**

Date : 04 au 07 Mai 2015

Lieu : Presqu'île de Giens, Toulon (83)

Type : Poster (« RAD51 c-Abl mediated phosphorylation of Y54 and Y315 affects its recombinase activity»)

### **5- 40<sup>th</sup> FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life**

Date : 04 au 09 Juillet

Lieu : Berlin, Allemagne

Type : Présentation orale (« RAD51 c-Abl mediated phosphorylation of Y54 and Y315 affects its recombinase activity»)

## **Annexe 3 : Protocoles standardisés rédigés pour le laboratoire.**

### **Annexe 3.1 : Protocoles *in vitro***

Annexe 3.1.A : *Protocole de suivi de la fixation de l'ATP-TNP par RAD51 par fluorométrie.*

Annexe 3.1.B : *Mesure de l'activité recombinaise de RAD51 par D-loop assay.*

Annexe 3.1.C : *Test de fixation de RAD51 à l'ADN par BLItz®.*

Annexe 3.1.D : *Expérience de retard sur gel ou Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) pour RAD51 et ADN 58mer.*

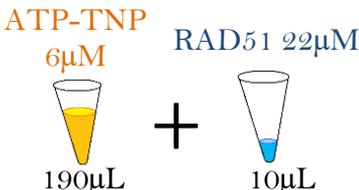
Annexe 3.1.E : *Migration en condition non-dénaturante pour le suivi de la polymérisation de RAD51*

### **Annexe 3.2 : Protocoles *in cellulo***

Annexe 3.2.A : *Protocole de fractionnement cellulaire : lyses en deux étapes*

Annexe 3.2.B : *Fixation de cellules adhérentes pour observation de RAD51*

Annexe 3.2.C : *Préparation d'ampoules de cellules pour congélation*

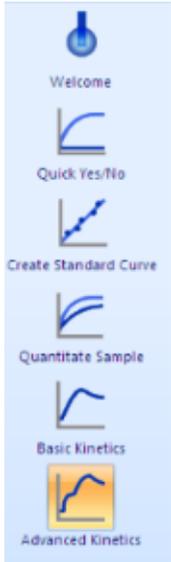
 UMR-CNRS n°6286	⇒ <b><u>PROTOCOLE DE SUIVI DE LA FIXATION DE L'ATP-TNP PAR RAD51 PAR FLUOROMETRIE</u></b>  Référence UFIP-Equipe2-PE-2013-1 Version : 1		
Date : 12-06-2013	Rédacteur : Brendan Alligand <span style="float: right;">PAGE 1 sur 2</span>		
<p><b><u>Matériel et solutions nécessaires :</u></b></p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-ATP-TNP 6mM (-20°C)</li> <li>-Tris HCl 20mM pH 8 (TA)</li> <li>-RAD51 20µM (-20°C ou -80°C)</li> <li>-Tampon de stockage RAD51</li> </ul> </td> <td style="vertical-align: top; padding-left: 20px;"> <p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Fluorimètre Jasco FP-6500</li> <li>-Centrifugeuse pour sécher les cuves Hellma</li> <li>-Cuves 10x2mm 4 faces Hellma105.260-QS</li> </ul> </td> </tr> </table> <p><b><u>Paramètres de réglage du fluorimètre :</u></b></p> <p>Longueur d'onde d'excitation : 410nm          Longueur d'onde de lecture : 350 à 600nm          Vitesse de lecture : 200nm/s          Ouverture : 5x5mm          Sensibilité : High          Retour : 1s          Data pitch : 0,2nm          Accumulations : 4</p> <p><b><u>Étapes du protocole :</u></b></p> <p><i>1. Préparation des solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Une cuve contient 200µL de solution (190µL ATP-TNP 6µM et 10µL RAD51 22µM)</li> <li>- CTL nécessaire avec RAD51 seul et un blanc avec 10µL de tampon de stockage au lieu de RAD51</li> <li>-Diluer l'ATP-TNP au millième dans de Tris-HCl 20mM pour l'ensemble des réactions (prévoir 200µL par échantillon)</li> </ul> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;">  <p style="margin: 0;">ATP-TNP 6µM      RAD51 22µM</p> <p style="margin: 0;">190µL      10µL</p> </div>		<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-ATP-TNP 6mM (-20°C)</li> <li>-Tris HCl 20mM pH 8 (TA)</li> <li>-RAD51 20µM (-20°C ou -80°C)</li> <li>-Tampon de stockage RAD51</li> </ul>	<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Fluorimètre Jasco FP-6500</li> <li>-Centrifugeuse pour sécher les cuves Hellma</li> <li>-Cuves 10x2mm 4 faces Hellma105.260-QS</li> </ul>
<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-ATP-TNP 6mM (-20°C)</li> <li>-Tris HCl 20mM pH 8 (TA)</li> <li>-RAD51 20µM (-20°C ou -80°C)</li> <li>-Tampon de stockage RAD51</li> </ul>	<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Fluorimètre Jasco FP-6500</li> <li>-Centrifugeuse pour sécher les cuves Hellma</li> <li>-Cuves 10x2mm 4 faces Hellma105.260-QS</li> </ul>		
<p><b><u>Remarques :</u></b></p> <p>Inscription préalable sur le cahier de réservation          Bien remettre la house verte de protection après utilisation.</p>			

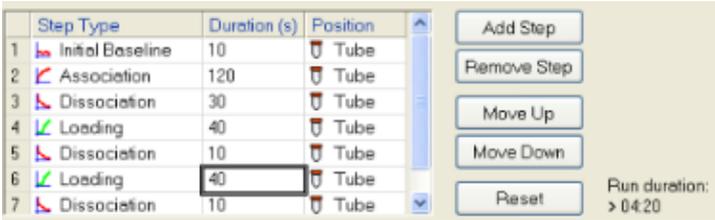
 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	<p>⇒ <b><u>PROTOCOLE DE SUIVI DE LA FIXATION DE L'ATP-TNP PAR RAD51 PAR FLUOROMETRIE</u></b></p> <p><b>Référence UFIP-Equipe2-PE-2013-1</b>  <b>Version : 1</b></p>
Date : 12-06-2013	Rédacteur : Brendan Alligand <span style="float: right;">PAGE 2 sur 2</span>
<p><i>2. Mise en route de l'appareil</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mettre en route la circulation d'eau</li> <li>-Allumer le Peltier et lancer la thermorégulation à 20°C</li> <li>-Allumer l'ordinateur (MtP : himage1)</li> <li>-Ouvrir Spectra Manager, sélectionner « spectrum measurement »</li> <li>-Ouvrir une session (Cf ci-contre jusqu'à Browse)</li> <li>-Enregistrer un jeu de paramètre (jusqu'à Save...)</li> </ul> <div data-bbox="1050 595 1441 909" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> <pre> Measurement ├─ Parameter │   └─ Data File (Browse) │       └─ Parameters │           └─ Chemin d'accès │               └─ Save... </pre> </div> <p><i>3. Passage d'un échantillon</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mélanger RAD51 avec l'ATP-TNP puis transférer les 200µL dans la cuve</li> <li>-Mettre la cuve dans l'appareil (faisceau traversant 1cm)</li> <li>-Lancer l'excitation (...) à 410nm</li> <li>-Appuyer sur Start pour lancer l'acquisition</li> <li>-Une fois les mesures effectuées une fenêtre s'ouvre automatiquement</li> <li>-Revenir sur spectra measurement et couper l'excitation (protection du fluorophore)</li> <li>-Récupérer l'échantillon (il peut être ré-utilisé ou conservé pour analyse)</li> <li>-Nettoyer au moins 4 fois la cuve à l'eau ultrapure et la faire sécher sur centri Hellma</li> </ul> <p><i>4. Exportation des données</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Enregistrer le fichier avec un nom explicite</li> <li>-La vue par défaut montre le spectre d'émission à 410nm. Ce signal sature mais son aspect nous renseigne sur la diffusion générale du milieu.</li> <li>-Afin d'observer le signal d'émission de RAD51 il faut zoomer grâce à l'outil loupe (Cf barre d'outil ci-contre) sur la zone d'intérêt (450 à 600nm). Sachant que l'intensité du pic d'émission se situe autour de 5 à 15.</li> </ul> <div data-bbox="927 1429 1441 1554" style="text-align: right; margin: 10px 0;">  </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Le fichier peut être enregistré sous format texte (ASCII) pour être ouvert avec Excel afin de mettre en forme les graphiques.</li> </ul>	
<p><u>Remarques :</u>  Inscription préalable sur le cahier de réservation  Bien remettre la house verte de protection après utilisation.</p>	

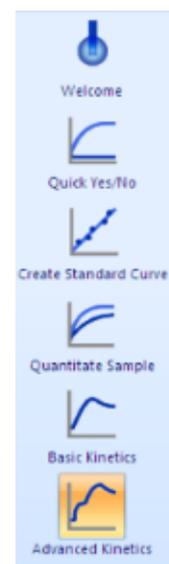
 UMR-CNRS n°-6286	⇒ <b><u>Mesure de l'activité recombinase de RAD51 par D-loop assay.</u></b>  <b>UFIP-Equipe2-PE-2013-3</b> <b>Version : 2</b>																							
Date : 26/09/13	Rédacteurs : Denis Velic et Brendan Alligand <span style="float: right;">Page 1 sur 2</span>																							
<p><b><u>Matériel et solutions nécessaires :</u></b></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-ADNsb 100mer IRD700 (-20°C)</li> <li>-RAD51 (-20°C/-80°C)</li> <li>-Plasmide pPB4.3 (-20°C)</li> <li>-Milieu de réaction (-20°C)</li> <li>-Solution STOP (-20°C)</li> <li>-Bleu de charge (BBT)</li> </ul> </td> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Bain-marie à 37°C</li> <li>-Portoir à tubes PCR</li> <li>-Système de migration de gel agarose</li> <li>-Scanner Odyssey Li-cor®</li> </ul> </td> </tr> </table> <p><b><u>Préparation des solutions :</u></b></p> <p>Composition du milieu de réaction (Volume final pour une réaction = 10µL) :</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr style="background-color: #008080; color: white;"> <th></th> <th><i>Conc. Init.</i></th> <th><i>Conc. Finale</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="background-color: #008080; color: white;">Tris-HCl pH 7,5 (mM)</td> <td>125</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #008080; color: white;">DTT (mM)</td> <td>100</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #008080; color: white;">ATP (mM)</td> <td>100</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #008080; color: white;">CaCl<sub>2</sub> (mM)</td> <td>20</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #008080; color: white;">H<sub>2</sub>O</td> <td>/</td> <td>/</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #008080; color: white;">Sonde (µM)</td> <td>50</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <p>Composition de la solution STOP :</p> <p>Mélange dans l'eau : Tris-HCl pH7.5 (100mM), SDS (25mg/mL), Protéinase K (10 mg/mL), MgCl<sub>2</sub> (100mM).</p>		<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-ADNsb 100mer IRD700 (-20°C)</li> <li>-RAD51 (-20°C/-80°C)</li> <li>-Plasmide pPB4.3 (-20°C)</li> <li>-Milieu de réaction (-20°C)</li> <li>-Solution STOP (-20°C)</li> <li>-Bleu de charge (BBT)</li> </ul>	<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Bain-marie à 37°C</li> <li>-Portoir à tubes PCR</li> <li>-Système de migration de gel agarose</li> <li>-Scanner Odyssey Li-cor®</li> </ul>		<i>Conc. Init.</i>	<i>Conc. Finale</i>	Tris-HCl pH 7,5 (mM)	125	25	DTT (mM)	100	1	ATP (mM)	100	1	CaCl <sub>2</sub> (mM)	20	1	H <sub>2</sub> O	/	/	Sonde (µM)	50	1
<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-ADNsb 100mer IRD700 (-20°C)</li> <li>-RAD51 (-20°C/-80°C)</li> <li>-Plasmide pPB4.3 (-20°C)</li> <li>-Milieu de réaction (-20°C)</li> <li>-Solution STOP (-20°C)</li> <li>-Bleu de charge (BBT)</li> </ul>	<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Bain-marie à 37°C</li> <li>-Portoir à tubes PCR</li> <li>-Système de migration de gel agarose</li> <li>-Scanner Odyssey Li-cor®</li> </ul>																							
	<i>Conc. Init.</i>	<i>Conc. Finale</i>																						
Tris-HCl pH 7,5 (mM)	125	25																						
DTT (mM)	100	1																						
ATP (mM)	100	1																						
CaCl <sub>2</sub> (mM)	20	1																						
H <sub>2</sub> O	/	/																						
Sonde (µM)	50	1																						
<p><b><u>Remarques :</u></b></p>																								

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	<p>⇒ <b><u>Mesure de l'activité recombinase de RAD51 par D-loop assay.</u></b></p> <p><b>UFIP-Equipe2-PE-2013-3</b>  <b>Version : 2</b></p>
Date : 26/09/13	Rédacteurs : Denis Velic et Brendan Alligand <span style="float: right;">Page 2 sur 2</span>
<p><b><u>Etapes du protocole :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Préparation du Mix (Nbre de tubes + 2 ou 10%) et déposer 6µL par tube</li> <li>-Préparation des dilutions de RAD51 et des autres molécules/protéines à tester</li> <li>-Incubation du mix 5min à 37°C</li> <li>-Couler les gels d'agarose 1%</li> <li>-Ajout RAD51 (3µL), 5min à 37°C</li> <li>-Optionnel : Ajouter le volume d'un inhibiteur ou d'une protéine partenaire de RAD51 et incubé 5min à 37°C (Attention aux volumes, car il ne faut pas dépasser 10µL de milieu réactionnel)</li> <li>-Ajout plasmide (1µL de plasmide à 3mM), 15min à 37°C (20sec entre chaque tube)</li> <li>-Ajout 2µL de solution STOP, 20min 37°C (20sec entre chaque tube)</li> <li>-Ajout 3µL de bleu de charge BBT</li> <li>-Dépôt de 12µL sur gel agarose 1%</li> <li>-Migration 15min à 135V</li> <li>-Scan 700nm (intensité 8) au scanner Odyssey Li-cor®</li> </ul>	
<p><b><u>Remarques :</u></b></p>	

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	⇒ <b><u>Test de fixation de RAD51 à l'ADN par BLitz®</u></b>  <b>UFIP-Equipe2-PE-2013-4</b> <b>Version : 2</b>		
Date : 25/02/2015	Rédacteurs : Brendan Alligand / Damien Marquis / Denis Velic		
<p><b><u>Remarques préalables :</u></b></p> <p>-L'appareil utilisé est partagé et demande une réservation avant utilisation.</p> <p><b><u>Matériel et solutions nécessaires :</u></b></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <i>Solutions</i>  - RAD51 (-80°C)  - ADN biotynilé à 100µM (-20°C)  -Tampon Phosphate 1X (4°C)  -ATP 100mM (-20°C)  -NaOH 50mM (TA) </td> <td style="vertical-align: top; padding-left: 20px;"> <i>Matériel</i>  - Appareil Blitz  - Tip streptavidine (4°C)  - Tubes de 500µL </td> </tr> </table> <p><b><u>Préparation des solutions :</u></b></p> <p><i>-Dilution de RAD51</i>  Les Solutions mères de RAD51 sont diluées à 2µM dans le tampon de réaction, prévoir un volume final de 260µL.  (On veillera à ajuster les volumes avec le tampon de stockage de RAD51 pour normaliser les concentrations en glycérol et en sels.)</p> <p><i>-Tampon de réaction (PA)</i>  Préparer une solution de tampon phosphate 1X à 2mM d'ATP commune pour tous les échantillons, conserver sur glace jusqu'à utilisation.  Prévoir 300µL de tampon supplémentaire qui servira pour la dissociation et le stockage du TIP.  (il est important d'utiliser la même solution pour tous les échantillons afin d'éviter un biais lié à la concentration en ATP, le signal est sensible à la concentration en ATP).</p> <p><i>-Solution de lavage</i>  Préparer 300µL de NaOH 50mM dans un tube 500µL.</p>		<i>Solutions</i> - RAD51 (-80°C) - ADN biotynilé à 100µM (-20°C) -Tampon Phosphate 1X (4°C) -ATP 100mM (-20°C) -NaOH 50mM (TA)	<i>Matériel</i> - Appareil Blitz - Tip streptavidine (4°C) - Tubes de 500µL
<i>Solutions</i> - RAD51 (-80°C) - ADN biotynilé à 100µM (-20°C) -Tampon Phosphate 1X (4°C) -ATP 100mM (-20°C) -NaOH 50mM (TA)	<i>Matériel</i> - Appareil Blitz - Tip streptavidine (4°C) - Tubes de 500µL		
<p><b><u>Remarques :</u></b>  Sortir les Tip au moins 20min avant utilisation pour les mettre à TA.</p>			

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	⇒ <b><u>Test de fixation de RAD51 à l'ADN par BLitz®</u></b>  <b>UFIP-Equipe2-PE-2013-4</b> <b>Version : 2</b>
Date : 25/02/15	Rédacteurs : Brendan Alligand / Damien Marquis / Denis Velic <span style="float: right;">Page 2 sur 4</span>
<p><b><u>Etapes du protocole :</u></b></p> <p><b>S'il s'agit d'un nouveau Tip. ⚠</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Faire décongeler l'ADN biotyliné</li> <li>-Mettre à hydrater le Tip dans du PBS</li> <li>-Indiquer sur le plan de plaque le Tip utilisé (Nature ADN et date)</li> <li>-Allumer l'ordinateur</li> <li>-Allumer le Blitz</li> <li>-Ouvrir le programme Blitz</li> <li>-Choisir « Advanced Kinetics »</li> </ul> <div style="float: right; border: 1px solid black; padding: 5px; width: 150px;">  </div> <p>-Paramétrer :</p> <p>BASELINE : Ligne de base dans le tampon PA <b>10s [Tube]</b>  ASSOCIATION : Mise en contact avec ADN-Biot (4µL) =&gt; Fixation <b>120s [Goutte]</b>  DISSOCIATION : Dans le tampon PA =&gt; Dissociation <b>30s [Tube]</b>  LOADING : NaOH 50mM =&gt; Lavage <b>40s [Tube]</b>  DISSOCIATION : Dans le tampon PA =&gt; Lavage <b>10s [Tube]</b>  LOADING : NaOH 50mM =&gt; Lavage <b>40s [Tube]</b>  DISSOCIATION : Dans le tampon PA =&gt; Lavage <b>10s [Tube]</b></p> <p>Temps total : 4min20s (compter 5min)</p> <p>La fixation de l'ADN est visible par une augmentation rapide et faible de l'intensité de fixation.  <b>Attention</b> au premier tube passé après la fixation il est souvent biaisé avec une plus grande fixation de RAD51.  Pour la suite se référer au paragraphe suivant.</p>	
<p><b><u>Remarques :</u></b>  Allumer le Blitz au moins 20min avant son utilisation.</p>	

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	<p>⇒ <u><b>Test de fixation de RAD51 à l'ADN par BLitz®</b></u></p> <p><b>UFIP-Equipe2-PE-2013-4</b>  <b>Version : 2</b></p>
Date : 25/02/15	Rédacteurs : Brendan Alligand / Damien Marquis / Denis Velic <span style="float: right;">Page 3 sur 4</span>
<p><b><u>Etapes du protocole :</u></b></p> <p><b>S'il s'agit d'un Tip déjà prêt.</b> </p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Vérifier l'hydratation du Tip si besoin le ré-hydrater dans du PBS</li> <li>-Allumer l'ordinateur</li> <li>-Allumer le Blitz</li> <li>-Réaliser les dilutions de RAD51 en tubes de 500µL.</li> <li>-Ouvrir le programme Blitz</li> <li>-Choisir « Advanced Kinetics »</li> </ul> <p>-Paramétrer :</p> <p>BASELINE : Ligne de base dans le tampon PA <b>10s [Tube]</b>  ASSOCIATION : Mise en contact avec RAD51 =&gt; Association <b>120s [Tube]</b>  DISSOCIATION : Dans le tampon PA =&gt; Dissociation <b>30s [Tube]</b>  LOADING : NaOH 50mM =&gt; Lavage <b>40s [Tube]</b>  DISSOCIATION : Dans le tampon PA =&gt; Lavage <b>10s [Tube]</b>  LOADING : NaOH 50mM =&gt; Lavage <b>40s [Tube]</b>  DISSOCIATION : Dans le tampon PA =&gt; Lavage <b>10s [Tube]</b></p> <p>Temps total : 4min20s (compter 5min par tube à analyser)</p> <div style="text-align: center;">  </div>	
<p><b><u>Remarques :</u></b></p> <p>Allumer le Blitz au moins 20min avant son utilisation.</p>	



Step Type	Duration (s)	Position
1 Initial Baseline	10	Tube
2 Association	120	Tube
3 Dissociation	30	Tube
4 Loading	40	Tube
5 Dissociation	10	Tube
6 Loading	40	Tube
7 Dissociation	10	Tube

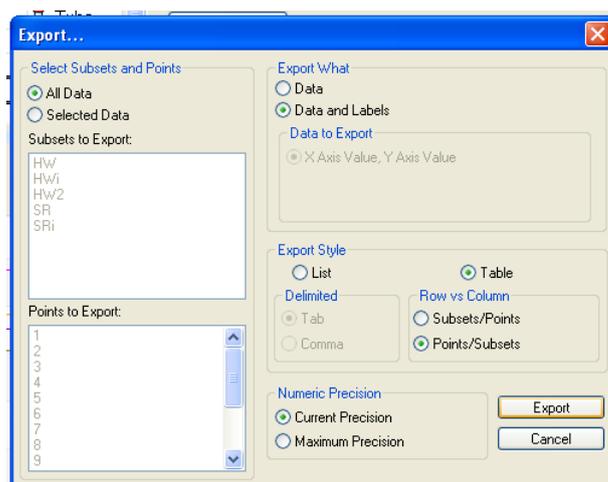
Run duration: > 04:20

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	<p>⇒ <b><u>Test de fixation de RAD51 à l'ADN par BLItz®</u></b></p> <p><b>UFIP-Equipe2-PE-2013-4</b>  <b>Version : 2</b></p>
Date : 25/02/15	Rédacteurs : Brendan Alligand / Damien Marquis / Denis Velic <span style="float: right;">Page 4 sur 4</span>

### **Etapes du protocole :**

Exportation des données.

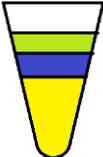
- Une fois l'acquisition des données terminée, faire un enregistrement et exporter les données.
- Clic droit sur le graphe
- Exporter
- Format texte
- Choisir l'emplacement
- Exporter



- Ouvrir avec Excel (choisir une séparation : par les espaces)
- Supprimer les lignes vides excédentaires
- Les colonnes du temps sont inutilisables, il faut recréer une colonne avec un pas de 0,2s

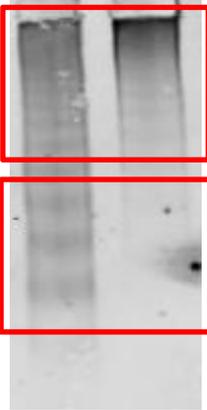
### **Remarques :**

Il est recommandé de donner les noms aux courbes plutôt que les numéros de Run.

 UMR-CNRS n°6286	<b><u>EXPERIENCE DE RETARD SUR GEL OU ELECTROPHORESIS MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA) POUR RAD51 ET ADN 58mer.</u></b>  <b>UFIP-Equipe2-PE-2013-2</b> <b>Version : 1</b>																
Date : 13/06/13	Rédacteurs : Brendan Alligand et Magali Le Breton <span style="float: right;">Page 1 sur 2</span>																
<p><b><u>Matériel et solutions nécessaires :</u></b></p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-RAD51 (-80°C)</li> <li>-ADN 58mer-IRD 100nM (-20°C)</li> <li>-Tampon de reaction 2X (-20°C)</li> <li>-Glutaraldéhyde 25% (TA)</li> <li>-Agarose 1%</li> </ul> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Système d'électrophorèse</li> <li>- Scanner odyssey</li> <li>- Portoirs pour tubes PCR</li> <li>- Enceinte à 37°C</li> </ul> </td> </tr> </table> <p><b><u>Préparation des solutions :</u></b></p> <p><i>Composition du milieu de réaction</i></p> <div style="display: flex; align-items: center; margin: 10px 0;">  <div style="margin-left: 10px;"> <p><b>RAD51 4X (2,5µL)</b></p> <p><b>H<sub>2</sub>O (2,5µL)</b></p> <p><b>Tampon de réaction</b></p> <p><b>2X (5µL)</b></p> </div> </div> <p><i>Composition du tampon de réaction 2X:</i></p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Réactif</th> <th>Concentration finale</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tris HCl 1M</td> <td>40mM</td> </tr> <tr> <td>MgCl<sub>2</sub> 50mM</td> <td>4mM</td> </tr> <tr> <td>ATP 100mM</td> <td>2mM</td> </tr> <tr> <td>KCl 3M</td> <td>60mM</td> </tr> <tr> <td>DTT 25mM</td> <td>2mM</td> </tr> <tr> <td>ADN 58mer-IRD</td> <td>5nM</td> </tr> </tbody> </table> <p><i>Solutions de RAD51 (4X)</i></p> <p>Les solutions de RAD51 sont préparées à 4X. Dans le cas d'un gradient de RAD51 il convient de faire une dilution en série pour préparer les solutions.</p>		<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-RAD51 (-80°C)</li> <li>-ADN 58mer-IRD 100nM (-20°C)</li> <li>-Tampon de reaction 2X (-20°C)</li> <li>-Glutaraldéhyde 25% (TA)</li> <li>-Agarose 1%</li> </ul>	<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Système d'électrophorèse</li> <li>- Scanner odyssey</li> <li>- Portoirs pour tubes PCR</li> <li>- Enceinte à 37°C</li> </ul>	Réactif	Concentration finale	Tris HCl 1M	40mM	MgCl <sub>2</sub> 50mM	4mM	ATP 100mM	2mM	KCl 3M	60mM	DTT 25mM	2mM	ADN 58mer-IRD	5nM
<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-RAD51 (-80°C)</li> <li>-ADN 58mer-IRD 100nM (-20°C)</li> <li>-Tampon de reaction 2X (-20°C)</li> <li>-Glutaraldéhyde 25% (TA)</li> <li>-Agarose 1%</li> </ul>	<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Système d'électrophorèse</li> <li>- Scanner odyssey</li> <li>- Portoirs pour tubes PCR</li> <li>- Enceinte à 37°C</li> </ul>																
Réactif	Concentration finale																
Tris HCl 1M	40mM																
MgCl <sub>2</sub> 50mM	4mM																
ATP 100mM	2mM																
KCl 3M	60mM																
DTT 25mM	2mM																
ADN 58mer-IRD	5nM																
<p><b><u>Remarques :</u></b></p>																	

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	<b><u>EXPERIENCE DE RETARD SUR GEL OU</u></b> <b><u>ELECTROPHORESIS MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)</u></b> <b><u>POUR RAD51 ET ADN 58mer.</u></b>  <b>UFIP-Equipe2-PE-2013-2</b> <b>Version : 1</b>
Date : 13/06/13	Rédacteurs : Brendan Alligand et Magali Le Breton <span style="float: right;">Page 1 sur 2</span>
<p><b><u>Etapas du protocole :</u></b></p> <p><i>1. Préparation de l'expérience</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-S'assurer qu'on dispose de l'ensemble des réactifs nécessaires</li> <li>-Couler le gel d'agarose 1%</li> <li>-Réserver un créneau de scan (le scan doit être effectué si tôt la migration finie)</li> <li>-Réaliser les dilutions de Rad1 4X (celles-ci peuvent être réalisées la veille au soir et stockée à -80°C)</li> </ul> <p><i>2. Réalisation de la réaction</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Préparer le milieu de réaction total et le répartir 7,5µL par tube</li> <li>- Ajouter 2,5µL de RAD51 4X</li> <li>- Incuber à 37°C pendant 30min</li> <li>- Ajouter 0,2µL de glutaraldéhyde 25% par tube</li> <li>- Incuber 15min à 37°C</li> <li>- Ajouter 4µL de bleu de charge 4X au XC</li> <li>- Déposer sur gel</li> <li>- Migration 15min à 135V ou 30min à 100V</li> </ul>	
<p><b><u>Remarques :</u></b></p>	

 UMR-CNRS n°6286	⇒ <b><u>Migration en condition non-dénaturante pour le suivi de la polymérisation de RAD51</u></b>  UFIP-Equipe2-PE-2014-N°5 Version : 1																															
Date : 24/06/14	Rédacteurs : Brendan Alligand	Page 1 sur 2																														
<p><b><u>Matériel et solutions nécessaires :</u></b></p> <p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tampon de migration Non-dénaturant</li> <li>- Tampon de charge Non-dénaturant</li> <li>- Gel 8% Non-dénaturant</li> <li>- Tris HCl 50mM pH 8 (4°C/ TA)</li> <li>-ATP 100mM (-20°C)</li> <li>-RAD51 (-80°C)</li> <li>-Ac anti-RAD51</li> </ul> <p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Matériel PAGE</li> <li>- Système de transfert</li> <li>- Kit de révélation au NO<sub>3</sub>Ag</li> </ul> <p><b><u>Préparation des solutions :</u></b></p> <p><i>Tampons et gel</i></p> <table border="1" data-bbox="156 1160 539 1326"> <thead> <tr> <th>Composant</th> <th>Quantité (g/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glycine</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>Tris Base</td> <td>144</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Tampon de migration 10X</p> <table border="1" data-bbox="608 1088 1002 1413"> <thead> <tr> <th>Composant</th> <th>Volume (µL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TrisHCl 1M pH6,8</td> <td>240</td> </tr> <tr> <td>Glycérol 50%</td> <td>800</td> </tr> <tr> <td>β-mercapto</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>BBP 0,1%</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>H<sub>2</sub>O</td> <td>800</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Tampon de charge 4X</p> <table border="1" data-bbox="1070 1088 1465 1413"> <thead> <tr> <th>Composant</th> <th>Volume (mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H<sub>2</sub>O</td> <td>4,7</td> </tr> <tr> <td>Acryl (37:1)</td> <td>2,7</td> </tr> <tr> <td>Tris HCl pH 8,8 1,5M</td> <td>2,5</td> </tr> <tr> <td>APS 20%</td> <td>0,1</td> </tr> <tr> <td>TEMED</td> <td>0,008</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Gel de migration 8%</p> <p>Les solutions de tampons de migration et de charge permettent de réaliser plusieurs réactions. Ne pas en re-faire si il en reste.</p> <p><i>Solutions de RAD51</i></p> <p>Les solutions stocks de RAD51 sont diluées à 20µM en équilibrant le tampon de charge pour chaque protéine.</p>			Composant	Quantité (g/L)	Glycine	30	Tris Base	144	Composant	Volume (µL)	TrisHCl 1M pH6,8	240	Glycérol 50%	800	β-mercapto	80	BBP 0,1%	80	H <sub>2</sub> O	800	Composant	Volume (mL)	H <sub>2</sub> O	4,7	Acryl (37:1)	2,7	Tris HCl pH 8,8 1,5M	2,5	APS 20%	0,1	TEMED	0,008
Composant	Quantité (g/L)																															
Glycine	30																															
Tris Base	144																															
Composant	Volume (µL)																															
TrisHCl 1M pH6,8	240																															
Glycérol 50%	800																															
β-mercapto	80																															
BBP 0,1%	80																															
H <sub>2</sub> O	800																															
Composant	Volume (mL)																															
H <sub>2</sub> O	4,7																															
Acryl (37:1)	2,7																															
Tris HCl pH 8,8 1,5M	2,5																															
APS 20%	0,1																															
TEMED	0,008																															
<p><b><u>Remarques :</u></b></p>																																

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	<p>⇒ <b><u>Migration en condition non-dénaturante pour le suivi de la polymérisation de RAD51</u></b></p> <p><b>UFIP-Equipe2-PE-2014-N°5</b>  <b>Version : 1</b></p>
Date : 24/06/14	Rédacteurs : Brendan Alligand <span style="float: right;">Page 2 sur 2</span>
<p><b><u>Etapes du protocole :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Préparation des dilutions de RAD51 (conservées à -80°C)</li> <li>-Etiquetage des tubes de réactions</li> <li>-Préparation du mélange de réaction, distribution de 15µL mélange dans les tubes</li> <li>-Ajout de 5µL de RAD51 4X</li> <li>-Incubation 25min à 37°C</li> <li>-Préparation des gels d'acrylamide 8% (Non-dénaturants)</li> <li>-Ajout de 8µL de tampon de réaction 4X (Non-dénaturant)</li> <li>-Dépôt 20µL par puits, migration 1h30 80V</li> <li>-Les gels sont récupérés pour analyse en Bleu / Nitrate d'argent / Western (on pourra doubler le volume pour réaliser deux révélations différentes)</li> </ul> <p><b><u>Analyse des résultats :</u></b></p> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>Pist    Pist</p>  </div> <div> <p>-La quantification est réalisée sur la partie haute des pistes (très polymérisées TP), sur la partie basse (peu polymérisée PP).          -Il faut également quantifier une piste vide (bruit de fond). Ainsi que l'intensité totale par piste.</p> <p>-Un taux de polymérisation peut être obtenu après :</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.Soustraction du bruit de fond</li> <li>2.Rapport = <math>(TP / (TP+PP)) * 100</math></li> <li>3.Normalisation des pistes par rapport à leur intensité totale.</li> </ol> </div> </div>	
<p><b><u>Remarques :</u></b></p>	

 UMR-CNRS n°6286	⇒ <b><u>Protocole de fractionnement cellulaire : lyses en deux étapes</u></b>  <b>UFIP-Equipe2-PE-2015-N°10</b> <b>Version : 1</b>																																																								
Date : 26/01/15	Rédacteurs : Florian Lafont et Brendan Alligand																																																								
Page 1 sur 2																																																									
<b><u>Matériel et solutions nécessaires :</u></b>																																																									
<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-PBS 1X (4°C)</li> <li>-Tampon de lyse A           <ul style="list-style-type: none"> <li>-PIPES 50mM</li> <li>-KCl 3M</li> <li>-NP40 10%</li> <li>-INH protéases P8340 (-20°C)</li> <li>-INH phosphatase P0044 (4°C)</li> <li>-PMSF 200mM (4°C)</li> </ul> </li> <li>-Tampon de lyse B           <ul style="list-style-type: none"> <li>-Tp de lyse B 10X (-20°C)</li> <li>-PMSF 200mM (4°C)</li> </ul> </li> </ul>	<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Grattoir</li> <li>-Centrifugeuse pour tubes 1,5mL</li> <li>-Sonicateur à aiguille</li> </ul>																																																								
<b><u>Préparation des solutions :</u></b>																																																									
Tampon de lyse A.	Tampon de lyse B.																																																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Intitulé</th> <th>Ci</th> <th>Cf</th> <th>V</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>PIPES pH8</i></td> <td>50mM</td> <td>5mM</td> <td>300µL</td> </tr> <tr> <td><i>KCl</i></td> <td>3M</td> <td>860mM</td> <td>90µL</td> </tr> <tr> <td><i>NP40/Igepal</i></td> <td>10%</td> <td>0,50%</td> <td>150µL</td> </tr> <tr> <td><i>P8340</i></td> <td>100X</td> <td>1X</td> <td>30µL</td> </tr> <tr> <td><i>P0044</i></td> <td>100X</td> <td>1X</td> <td>30µL</td> </tr> <tr> <td><i>PMSF</i></td> <td>200mM</td> <td>1mM</td> <td>15µL</td> </tr> <tr> <td><i>H2O</i></td> <td></td> <td></td> <td>2400µL</td> </tr> <tr> <td><i>Total</i></td> <td></td> <td></td> <td>3mL</td> </tr> </tbody> </table>	Intitulé	Ci	Cf	V	<i>PIPES pH8</i>	50mM	5mM	300µL	<i>KCl</i>	3M	860mM	90µL	<i>NP40/Igepal</i>	10%	0,50%	150µL	<i>P8340</i>	100X	1X	30µL	<i>P0044</i>	100X	1X	30µL	<i>PMSF</i>	200mM	1mM	15µL	<i>H2O</i>			2400µL	<i>Total</i>			3mL	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Intitulé</th> <th>Ci</th> <th>Cf</th> <th>V</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Tp lyse B</i></td> <td>10X</td> <td>1X</td> <td>300µL</td> </tr> <tr> <td><i>PMSF</i></td> <td>200mM</td> <td>1mM</td> <td>15µL</td> </tr> <tr> <td><i>H2O</i></td> <td></td> <td></td> <td>2685µL</td> </tr> <tr> <td><i>Total</i></td> <td></td> <td></td> <td>3mL</td> </tr> </tbody> </table>	Intitulé	Ci	Cf	V	<i>Tp lyse B</i>	10X	1X	300µL	<i>PMSF</i>	200mM	1mM	15µL	<i>H2O</i>			2685µL	<i>Total</i>			3mL
Intitulé	Ci	Cf	V																																																						
<i>PIPES pH8</i>	50mM	5mM	300µL																																																						
<i>KCl</i>	3M	860mM	90µL																																																						
<i>NP40/Igepal</i>	10%	0,50%	150µL																																																						
<i>P8340</i>	100X	1X	30µL																																																						
<i>P0044</i>	100X	1X	30µL																																																						
<i>PMSF</i>	200mM	1mM	15µL																																																						
<i>H2O</i>			2400µL																																																						
<i>Total</i>			3mL																																																						
Intitulé	Ci	Cf	V																																																						
<i>Tp lyse B</i>	10X	1X	300µL																																																						
<i>PMSF</i>	200mM	1mM	15µL																																																						
<i>H2O</i>			2685µL																																																						
<i>Total</i>			3mL																																																						
<b><u>Remarques :</u></b> Réserver et allumer la centrifugeuse Fresco 21 (Thermo) pour la mettre à refroidir à 4°C avant de commencer le fractionnement Réserver le sonicateur																																																									

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	⇒ <b><u>Protocole de fractionnement cellulaire : lyses en deux étapes</u></b>  <b>UFIP-Equipe2-PE-2015-N°10</b> <b>Version : 1</b>
Date : 26/01/15	Rédacteurs : Florian Lafont et Brendan Alligand <span style="float: right;">Page 2 sur 2</span>
<p><b><u>Etapes du protocole :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Récupérer le milieu pour le jeter dans la poubelle appropriée</li> <li>-Laver 1 fois avec 500µL de PBS</li> <li>-Ajouter 500µL de PBS [Facultatif : + INH protéases, phosphatase et PMSF] et décoller les cellules à l'aide d'un grattoir</li> <li>-Transférer les cellules en suspension dans un tube 1,5mL</li> <li>-Laver le grattoir avant de faire un nouveau puits</li> <li>-Centrifuger les échantillons 5min à 2000rpm et 4°C</li> <li>-Retirer le surnageant (les cellules peuvent être conservées à cette étape à -80°C à sec)</li> <li>-Ajouter 200 à 300µL de tampon de lyse A frais</li> <li>- <b>ATTENTION</b>, ne pas vortexer ni mélanger. Faire uniquement un aller-retour de pipette pour resuspendre le culot et tapoter le tube 2-3fois. La texture ne doit pas devenir gluante car cela signifie que la lyse a atteint les noyaux.</li> <li>-Centrifuger 5min à 5000rpm et 4°C</li> <li>-Récupérer le surnageant dans un tube à part, il constitue la fraction cytoplasmique</li> <li>-Les culots sont repris dans 200 à 300µL de tampon de lyse B</li> <li>-Lyser avec le sonicateur à aiguille (10 pulses d'1s à puissance 80, soit 15-30W)</li> <li>- [Facultatif] centrifuger 10min à 14000g et 4°C, le surnageant constitue la fraction nucléaire</li> <li>- Les échantillons peuvent être conservés à -80°C</li> <li>- Doser la concentration protéique pour normaliser les dépôts</li> <li>- Analyser selon la méthode souhaitée</li> </ul>	
<p><b><u>Remarques :</u></b></p>	

 UMR-CNRS n°6286	⇒ <b><u>Fixation de cellules adhérentes pour observation de RAD51</u></b>  <b>UFIP-Equipe2-PE-2014-N°9</b> <b>Version : 1</b>																			
Date : 15/12/14	Rédacteurs : Brendan Alligand et Fabrice Fleury	Page 1 sur 2																		
<p><b><u>Matériel et solutions nécessaires :</u></b></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-PBS 1X (4°C)</li> <li>-Formaldéhyde (!) (TA)</li> <li>-Triton X-100 (TA)</li> <li>-PBS BSA 1% (4°C)</li> <li>-Ac I<sup>R</sup> anti-RAD51 (4°C)</li> <li>-Ac II<sup>R</sup> anti-Ac I<sup>R</sup> couple FITC ou Rhodamine (-20°C)</li> </ul> </td> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Pincés fines</li> <li>-Aiguille en crochet</li> <li>-Lame en verre</li> <li>-Sorbonne (hotte chimique)</li> </ul> </td> </tr> </table> <p><b><u>Préparation des solutions :</u></b></p> <p><i>Solution de fixation</i></p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Ci</th> <th>Cf</th> <th>V</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Formaldéhyde</b></td> <td>37%</td> <td>3,7%</td> <td>600µL</td> </tr> <tr> <td><b>Triton X-100</b></td> <td>30%</td> <td>0,1%</td> <td>20µL</td> </tr> <tr> <td><b>PBS</b></td> <td>1X</td> <td>~1X</td> <td>5,4mL</td> </tr> </tbody> </table> <p>Rq : <b>ATTENTION</b>, la manipulation du formaldéhyde demande des mesures de précautions car il s'agit d'un produit toxique. Il doit être manipulé sous hotte et les déchets ne doivent pas être jetés à l'évier. Consulter attentivement l'étiquetage et si besoin la FDS disponible dans la pièce de manipulation centrale.</p> <p>La solution de fixation n'est pas stable et doit être re-préparée au-delà de 7jours passés après la réalisation du mélange.</p> <p><b><u>Étapes du protocole :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Retirer les lamelles des puits avec une pince fine et une aiguille tordue en crochet.</li> <li>-Les placer dans une plaque 24 puits en annotant bien les puits.</li> <li>-Laver au PBS</li> <li>-Ajouter 300µL de solution de fixation par puits, incuber 10-20min à TA</li> <li>- Retirer la solution de fixation (poubelle spécifique)</li> <li>- Laver 1 fois avec du PBS, 30s et incuber 15min avec une solution de blocage (PBS BSA 1%)</li> </ul>			<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-PBS 1X (4°C)</li> <li>-Formaldéhyde (!) (TA)</li> <li>-Triton X-100 (TA)</li> <li>-PBS BSA 1% (4°C)</li> <li>-Ac I<sup>R</sup> anti-RAD51 (4°C)</li> <li>-Ac II<sup>R</sup> anti-Ac I<sup>R</sup> couple FITC ou Rhodamine (-20°C)</li> </ul>	<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Pincés fines</li> <li>-Aiguille en crochet</li> <li>-Lame en verre</li> <li>-Sorbonne (hotte chimique)</li> </ul>		Ci	Cf	V	<b>Formaldéhyde</b>	37%	3,7%	600µL	<b>Triton X-100</b>	30%	0,1%	20µL	<b>PBS</b>	1X	~1X	5,4mL
<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-PBS 1X (4°C)</li> <li>-Formaldéhyde (!) (TA)</li> <li>-Triton X-100 (TA)</li> <li>-PBS BSA 1% (4°C)</li> <li>-Ac I<sup>R</sup> anti-RAD51 (4°C)</li> <li>-Ac II<sup>R</sup> anti-Ac I<sup>R</sup> couple FITC ou Rhodamine (-20°C)</li> </ul>	<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Pincés fines</li> <li>-Aiguille en crochet</li> <li>-Lame en verre</li> <li>-Sorbonne (hotte chimique)</li> </ul>																			
	Ci	Cf	V																	
<b>Formaldéhyde</b>	37%	3,7%	600µL																	
<b>Triton X-100</b>	30%	0,1%	20µL																	
<b>PBS</b>	1X	~1X	5,4mL																	
<p><b><u>Remarques :</u></b></p>																				

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	<p>⇒ <b><u>Fixation de cellules adhérentes pour observation de RAD51</u></b></p> <p><b>UFIP-Equipe2-PE-2014-N°9</b>  <b>Version : 1</b></p>
Date : 15/12/14	Rédacteurs : Brendan Alligand et Fabrice Fleury <span style="float: right;">Page 2 sur 2</span>
<p>-Retirer la solution de blocage et incuber avec 200µL d'anticorps I<sup>R</sup> anti-RAD51 dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du PBS BSA1%.</p> <p>-Incuber sur la nuit à 4°C</p> <p>-Récupérer l'anticorps et laver 3 fois 5min avec du PBS (500µL)</p> <p>-Incuber 1h avec un anticorps II<sup>R</sup> pour IF couplé à la rhodamine ou au FITC, dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans du PBS BSA 1%</p> <p>-5min avant la fin de l'incubation, sortir le Prolong<sup>®</sup> conservé à -20°C</p> <p>-Récupérer l'anticorps et laver 4 fois 5min avec du PBS (500µL)</p> <p>-Préparer les lames avec une petite goutte de Prolong<sup>®</sup></p> <p>-Prendre la lamelle avec une pince fine et une aiguille recourbée en crochet</p> <p>-Réaliser le montage en prêtant attention au sens pour que les cellules soient bien entre lame et lamelle</p> <p>-Annoter les lames avec nom de manip et date</p> <p>-Laisser sécher 24h minimum avant analyse</p>	
<p><u>Remarques :</u></p>	

 <b>UMR-CNRS n°6286</b>	<p>⇒ <b><u>Préparation d'ampoules de cellules pour congélation</u></b></p> <p><b>UFIP-Equipe2-PE-2014-N°6</b>  <b>Version : 1</b></p>			
Date : 17/11/14	Rédacteurs : Brendan Alligand / Florian Lafont	Page 1 sur 1		
<p><b><u>Matériel et solutions nécessaires :</u></b></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PSM</li> <li>-Bain Marie</li> <li>- Flasque 175cm<sup>2</sup></li> <li>- Lame de KOVA</li> <li>- Centrifugeuse Jouan</li> <li>- Cryotubes et capuchons</li> <li>- Bac à éthanol (ou boîtes de polystyrènes)</li> </ul> </td> <td style="vertical-align: top; width: 50%;"> <p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PBS (4°C =&gt; 37°C)</li> <li>- Trypsine (-20°C =&gt; 37°C)</li> <li>- Milieu (4°C =&gt; 37°C)</li> <li>- DMSO (TA)</li> <li>- SVF (-20°C =&gt; 37°C)</li> </ul> </td> </tr> </table> <p><b><u>Étapes du protocole :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Faire pousser, au préalable, les cellules en grande(s) flasque(s) de 175cm<sup>2</sup> jusqu'à 80% de confluence</li> <li>-Prélever un aliquot de surnageant de culture pour test mycoplasme</li> <li>-Pour les cellules adhérentes : lavage PBS 10mL</li> <li>-Ajouter la trypsine 3mL</li> <li>-Laisser agir 5-10min à 37°C</li> <li>-Une fois les cellules décollées, ajouter 17mL de milieu</li> <li>-Dénombrer les cellules sur lame de KOVA et estimer le taux de mortalité au bleu Trypan</li> <li>-Centrifuger les cellules 800rpm pdt 10min à 20°C</li> <li>-Annoter précisément le tube en ajoutant : Nom de la lignée / Nbre de cellules / Date / Préparateur, les autres données seront à noter dans le classeur référençant les ampoules de conservation.</li> <li>-Choisir une couleur de capuchon appropriée</li> <li>-Reprendre les cellules dans un mélange 90%-10% de SVF-DMSO de manière à avoir 4-5millions de cellules par mL</li> <li>-Aliquoter en cryotube à raison de 1mL par tube</li> <li>-Congeler les ampoules à -80°C dans un bac à isopropanol ou dans un double système de boîtes polystyrènes pour permettre une descente progressive de la température</li> <li>-Ultérieurement, répartir les ampoules entre le stockage à -80°C et dans l'azote liquide (!)</li> </ul> <p style="color: red; margin-left: 20px;"><b>PRECAUTIONS DE MANIPULATION (!)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Compléter le classeur référençant les lignées congelées en ampoules</li> </ul>			<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PSM</li> <li>-Bain Marie</li> <li>- Flasque 175cm<sup>2</sup></li> <li>- Lame de KOVA</li> <li>- Centrifugeuse Jouan</li> <li>- Cryotubes et capuchons</li> <li>- Bac à éthanol (ou boîtes de polystyrènes)</li> </ul>	<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PBS (4°C =&gt; 37°C)</li> <li>- Trypsine (-20°C =&gt; 37°C)</li> <li>- Milieu (4°C =&gt; 37°C)</li> <li>- DMSO (TA)</li> <li>- SVF (-20°C =&gt; 37°C)</li> </ul>
<p><i>Matériel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PSM</li> <li>-Bain Marie</li> <li>- Flasque 175cm<sup>2</sup></li> <li>- Lame de KOVA</li> <li>- Centrifugeuse Jouan</li> <li>- Cryotubes et capuchons</li> <li>- Bac à éthanol (ou boîtes de polystyrènes)</li> </ul>	<p><i>Solutions</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PBS (4°C =&gt; 37°C)</li> <li>- Trypsine (-20°C =&gt; 37°C)</li> <li>- Milieu (4°C =&gt; 37°C)</li> <li>- DMSO (TA)</li> <li>- SVF (-20°C =&gt; 37°C)</li> </ul>			

Remarques :

-Avant la première manipulation de l'Azote contacter la personne compétente.

# Thèse de doctorat

Brendan ALLIGAND

**Etude du rôle des phosphorylations de RAD51 en Y54 et Y315 sur son fonctionnement.**

**Role of RAD51's phosphorylation on Y54 and Y315 on its function.**

## Résumé

La Recombinaison Homologue (RH) permet la réparation des dommages à l'ADN les plus délétères : les Cassures double brin. L'étape centrale de la RH est basée sur l'activité d'échange de brins de RAD51. Ainsi, l'activité de RAD51 est cruciale pour le maintien de l'intégrité génomique. Toutefois, cette protéine possède également un côté sombre. En effet, la surexpression de RAD51 permet aux cellules cancéreuses de résister aux traitements. Ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle pour sensibiliser les cellules cancéreuses au traitement. Une meilleure compréhension du contrôle de l'activité de RAD51 aiderait sûrement à développer des stratégies thérapeutiques.

L'activité de RAD51 est régulée par des phosphorylations et plusieurs kinases sont connues pour cibler RAD51. C'est le cas de la kinase c-Abl qui phosphoryle les tyrosines Y54 et Y315 en réponse aux dommages à l'ADN. Mais le rôle de ces phosphorylations est peu connu. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'effet de ces phosphorylations sur RAD51.

Dans ce but, nous avons produit des mutants de RAD51 mimant la phosphorylation. Leur activité a été analysée et comparée *in vitro*. Nous avons démontré que le mutant équivalent à une double phosphorylation est incapable de réaliser l'échange de brins. Un défaut de polymérisation de RAD51 serait à l'origine de cette inhibition. Par la suite, la régulation a été étudiée dans le contexte cellulaire. Les résultats préliminaires montrent un effet de la double phosphorylation sur la localisation cellulaire de RAD51.

L'inactivation de RAD51 par cette double phosphorylation pourrait participer à la régulation de la voie de la Recombinaison Homologue et serait une étape clef dans la compréhension de la réponse aux dommages à l'ADN.

## Mots clés

**RAD51 / Réparation de l'ADN / Phosphorylation / Phosphomimétique / c-Abl**

## Abstract

Homologous Recombination (HR) promotes the repair of the most deleterious DNA damage: the Double Strand Break. The main step of HR is based on RAD51's DNA strand exchange activity. Thus, the activity of RAD51 is crucial to maintain genome integrity. However, this protein also has a dark side since RAD51 overexpression allows cancer cells to become resistant to anticancer treatment. Therefore RAD51 is a potential target for sensitizing cancer cells to treatment. A better understanding of RAD51's activity regulation might help to develop therapeutic strategies.

RAD51 activity is regulated by phosphorylation and several kinases are known to target RAD51. Indeed, Abl kinase phosphorylates Y54 and Y315 in response to DNA damage but the precise role of these phosphorylations is poorly understood. Therefore we investigated the effect of phosphorylation on RAD51 activity.

RAD51 mutants mimicking phosphorylation were produced and purified. Their activity was analysed and compared *in vitro*. We demonstrated that the double phosphorylated RAD51 mutant was unable to perform homologous strand exchange. A defect in RAD51 polymerization could be the cause of the inhibition of the recombinase activity. The regulation of RAD51 through its phosphorylation was thus analysed in cellular context. Our preliminary results underline the effect of the double phosphorylation on the cellular distribution of RAD51.

Phosphorylation-mediated inactivation of RAD51 could be involved in the regulation of the Homologous Recombination pathway and might be an important step in understanding the DNA damage response.

## Key words

**RAD51 / DNA Repair / Phosphorylation /**