

Université de Montréal

Évidence génétique du rôle double du suppresseur de tumeur BRCA2 dans le
maintien de la stabilité du génome humain

par
Christine Abaji

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en Biochimie

Décembre 2003

© Christine Abaji, 2003



W

4

U58

2004

V. 100

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Évidence génétique du rôle double du suppresseur de tumeur BRCA2 dans le
maintien de la stabilité du génome humain

présenté par :
Christine Abaji

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur	Dr Sylvie Mader
Directeur de recherche	Dr Abdellah Belmaaza
Codirecteur	Dr Daniel Skup
Membre du jury	Dr Daniel Sinnett

Mémoire accepté le :

RÉSUMÉ

Des mutations dans le gène *BRCA2* sont responsables de 60-80 % des cancers héréditaires du sein et de l'ovaire. Les cellules ou tumeurs *BRCA2*-déficientes accumulent des réarrangements chromosomiques et des cassures doubles brins (CDB). *BRCA2* interagit et co-localise avec *RAD51*, une protéine essentielle à la recombinaison homologe (RH), qui est une voie de réparation des CDB. Afin d'élucider le rôle de *BRCA2* dans la RH et le maintien de la stabilité du génome, nous avons intégré dans le génome des CAPAN-1, une lignée cellulaire humaine *BRCA2*-déficiente, un plasmide rapporteur contenant deux copies non fonctionnelles du gène puromycine (*Puro*), de sorte qu'un événement de RH *RAD51*-dépendant reconstitue un *Puro* fonctionnel. Une des copies contient le site de la méganucléase *I-SceI* qui suite à son expression permet d'introduire une CDB. Nos résultats montrent que l'expression de *BRCA2* dans les CAPAN-1 rétablit le transport de *RAD51* du cytoplasme au noyau, diminue la RH spontanée *RAD51*-dépendante de 30 fois, mais augmente celle induite par *I-SceI* de 10 fois. Ces résultats représentent la première évidence génétique d'un rôle double pour *BRCA2* dans le maintien de la stabilité du génome. En absence de CDB, *BRCA2* inhibe la capacité de *RAD51* à promouvoir des réactions de RH spontanées indésirables. En présence de CDB, *BRCA2* facilite la fonction de *RAD51* permettant de réparer le dommage. Toutefois, *BRCA2* agit au niveau de l'initiation de la réparation et non au niveau de la résolution de l'intermédiaire de recombinaison. Nous proposons que la perte de ces contrôles due à l'inactivation de *BRCA2* mène à l'instabilité génomique et à la tumorigénèse. Nous proposons également que *BRCA2* protège les cellules contre les réarrangements génomiques induits par les métabolites de l'estrogène en inhibant la RH spontanée et en activant la réparation par excision de bases ou de nucléotides.

Mots clés : *BRCA2*, recombinaison homologe, cassures simple et double brins, *RAD51*, méganucléase *I-SceI*, réarrangement génomique, estrogène.

SUMMARY

Mutations in BRCA2, a tumour suppressor gene, lead to familial breast and ovarian cancers. BRCA2-deficient cells or tumours accumulate chromosomal rearrangements and double strand breaks (DSB). BRCA2 interacts and co-localises with RAD51, an essential protein for homologous recombination (HR), which is a major pathway for DSB repair. In order to elucidate the role of BRCA2 in HR and the maintenance of genome stability, we have integrated a reporter plasmid in the genome of CAPAN-1, a human cell line deficient in BRCA2. The reporter plasmid contains two non-functional copies of the puromycin (*Puro*) gene. Only a RAD51-dependant HR event reconstitutes a functional *Puro* gene. One of the copies contains the site of the meganuclease I-*Sce*I to introduce a chromosomal DSB after its expression. Our results show that expression of wt BRCA2 in CAPAN-1 re-establishes the nuclear localisation of RAD51, diminishes the spontaneous RAD51-dependant HR frequency by 30 fold, but increases the DSB repair frequency by 10 fold. These results represent the first genetic evidence that BRCA2 plays a dual role in the maintenance of genome stability. In the absence of a DSB, BRCA2 inhibits RAD51 to prevent undesired spontaneous HR reactions. Upon a DSB, BRCA2 helps RAD51 to repair the damage. However, BRCA2 plays a role in the initiation of DSB repair but not in the resolution of recombination intermediates. We propose that loss of these functions due to inactivation of BRCA2 leads to chromosomal instability and tumourigenesis. We also propose that BRCA2 protects breast cells from chromosomal rearrangements induced by oestrogen metabolites by inhibiting spontaneous HR repair and activating the base or nucleotide excision repair pathways.

Key words: BRCA2, homologous recombination, single and double strand breaks, RAD51, I-*Sce*I meganuclease, chromosomal rearrangements, oestrogen.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
SUMMARY	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xi
1. Introduction.....	1
1.1 Le cancer du sein.....	2
1.2 Gènes de susceptibilité.....	2
1.3 Structure primaire de BRCA2.....	3
1.4 Modèles génétiques pour BRCA2.....	6
1.5 Analyse des cellules BRCA2-déficientes.....	7
1.5.1 L'instabilité du génome.....	7
1.5.2 L'hypersensibilité aux agents génotoxiques.....	7
1.6 Voies de réparation des cassures doubles brins.....	8
1.6.1 La religation non-homologue (NHEJ).....	9
1.6.2 Le <i>single-strand annealing</i> (SSA).....	9
1.6.3 La recombinaison homologue (RH).....	12
1.6.3.1 Les étapes de réparation des cassures doubles brins par recombinaison homologue.....	15
1.6.3.1.1 L'initiation et la formation de l'intermédiaire de recombinaison.....	15
1.6.3.1.2 La résolution de l'intermédiaire de recombinaison.....	20
1.7 BRCA2 dans les points de contrôle du cycle cellulaire et la réponse aux dommages.....	25
1.8 BRCA2 dans la réparation de dommages à l'ADN.....	26
1.8.1 L'interaction entre BRCA2, BRCA1 et RAD51.....	26
1.8.2 Évidence génétique appuyant l'implication de BRCA2 dans la recombinaison homologue.....	28
1.8.3 La régulation de RAD51 par BRCA2.....	29
1.9 Objectifs.....	30

2. Matériels et méthodes.....	32
2.1 Culture de cellules.....	33
2.2 Transfection de cellules.....	33
2.2.1 Agents de sélection.....	33
2.2.2 Électroporation.....	34
2.3 Construction de vecteurs.....	34
2.3.1 Construction de pCAinv et pCAdr.....	35
2.3.2 Analyse des plasmides pCAinv et pCAdr.....	38
2.4 Établissement et analyse des clones cellulaires parentaux.....	38
2.4.1 Extraction de l'ADN génomique.....	39
2.4.2 Southern Blot.....	40
2.4.3 PCR.....	40
2.5 Complémentation des clones parentaux avec BRCA2.....	42
2.5.1 Extraction de l'ARNm.....	42
2.5.2 RT-PCR.....	42
2.5.3 Extraction des protéines.....	43
2.5.4 Technique de transfert de Western.....	43
2.6 Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires.....	44
2.6.1 Localisation cytoplasmique et nucléaire de RAD51.....	44
2.7 Fréquence et taux de recombinaison homologue.....	45
2.8 Induction de la cassure double brin.....	46
2.9 Analyse des recombinants.....	47
3. Résultats.....	48
3.1 Approche expérimentale.....	49
3.1.1 Établissement de clones cellulaires CAPAN-1 stables.....	49
3.1.2 Complémentation des clones parentaux avec BRCA2.....	54
3.2 Localisation cellulaire de la protéine RAD51.....	54
3.3 Effet de BRCA2 sur la fréquence et le taux de recombinaison homologue spontanée.....	59
3.4 Effet de BRCA2 sur l'efficacité de la réparation de la cassure double brin.....	62
3.5 Effet de BRCA2 sur la structure des recombinants.....	64
4. Discussion.....	70
4.1 BRCA2 transporte RAD51 du cytoplasme au noyau.....	71
4.2 BRCA2 inhibe la fonction de RAD51 <i>in vivo</i>	73

4.3.	BRCA2 facilite la fonction de RAD51 au niveau des cassures doubles brins et promeut les événements de conversion génique.....	74
4.4.	Comment BRCA2 contrôle-t-elle l'activité de RAD51?.....	74
4.4.1	Au niveau de la recombinaison homologue spontanée	74
4.4.2	Au niveau de la cassure double brin.....	79
4.5	BRCA2 inhibe les délétions au niveau des cassures doubles brins...	81
4.6	L'instabilité génétique dans les cellules BRCA2-déficientes	82
4.7	Inactivation des points de contrôle du cycle cellulaire et la transformation des cellules BRCA2-déficientes	84
5.	Conclusion.....	86
6.	Références	89
7.	Annexe.....	128

MSH2-deficient Human Cells Exhibit a Defect in the Accurate Termination of Homology-directed repair of DNA Double Strand-Break

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Domaines fonctionnels de la protéine BRCA2	4
Figure 2 :	L'instabilité chromosomique dans les cellules de souris Brca2-déficientes	8
Figure 3 :	Modèle de réparation d'une CDB par la relication non- homologue (NHEJ)	10
Figure 4 :	Modèle de réparation d'une CDB par le <i>single-strand</i> <i>annealing</i> (SSA)	11
Figure 5 :	Conversion génique et crossing-over.....	12
Figure 6 :	Réarrangements chromosomiques par crossing-over	14
Figure 7 :	Modèle de <i>one-sided invasion</i>	16
Figure 8 :	Représentation schématique des plasmides rapporteurs ...	36
Figure 9 :	Représentation schématique des intermédiaires de pCAinv et pCAdr	37
Figure 10 :	Représentation schématique de l'analyse par Southern Blot des plasmides pCAinv et pCAdr	41
Figure 11 :	Représentation schématique de la protéine BRCA2 mutée dans les cellules CAPAN-1.....	50
Figure 12 :	Représentation schématique de l'approche expérimentale	51
Figure 13 :	Analyse des clones parentaux par PCR	52
Figure 14 :	Analyse de l'expression de BRCA2 par RT-PCR	55
Figure 15 :	Expression de la protéine BRCA2 dans les clones CAPAN-1 G418 ^R	57
Figure 16 :	Localisation cellulaire de la protéine RAD51 dans les cellules BRCA2 ⁺ vs BRCA2 ^{-/-}	58

Figure 17 :	Recombinaison homologue entre des répétitions inversées (pCAinv) ou directes (pCAAdr)	65
Figure 18 :	Analyse des recombinants obtenus avec les répétitions inversées (pCAinv)	66
Figure 19 :	Analyse des recombinants obtenus avec les répétitions directes (pCAAdr)	67
Figure 20 :	Modèle de Holliday (1964)	76
Figure 21 :	Modèle de Meselson et Radding (1975)	77
Figure 22 :	Modèle de réparation d'une cassure simple brin en présence de BRCA1 et BRCA2	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Phénotypes associés à la déficience des protéines impliquées dans le contrôle de la RH	23
Tableau II :	Analyse fonctionnelle des constructions plasmidiques dans les cellules HCT116	39
Tableau III :	Fréquence de la RH spontanée pour les clones parentaux non-complémentés et complémentés avec BRCA2	60
Tableau IV :	Taux de la RH spontanée des clones parentaux non-complémentés et complémentés avec BRCA2	61
Tableau V :	Fréquence de la RH spontanée versus fréquence de la RH induite par I-SceI en absence et en présence de BRCA2	63
Tableau VI :	Effet de BRCA2 sur la structure des recombinants spontanés	68
Tableau VII :	Effet de BRCA2 sur la structure des recombinants induits par l'endonucléase I-SceI	69

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
A-T	Ataxie télangiectasia
ATM	Ataxia-telangiectasia, mutated
ATR	ATM and Rad3-related
BRAF35	BRCA2-associated factor
BRCA1	Breast Cancer Susceptibility Gene 1
BRCA2	Breast Cancer Susceptibility Gene 2
CSB	Cassure simple brin
CDB	Cassure double brin
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Déoxyribonucléotide tri-phosphate
DSS1	Deleted in split hand/split foot
ES	Souches embryonnaires
G418	Généticine
G418 ^R	Généticine résistant
GFP	Green Fluorescent Protein
HA	hémagglutinine
<i>Hyg</i>	Hygromycine
Hyg ^R	Hygromycine résistant
kb	kilo paire de base
kDA	kilo dalton
LINE	Long interspersed nuclear element
MEFs	Fibroblastes de l'embryon de souris
MSH	Mut S homologue

<i>Néo</i>	Néomycine
NHEJ	Non-homologous end-joining
NLS	Signal de localisation nucléaire
pb	paire de base
PBS	Phosphate buffer saline
P/CAF	p300/CBP et facteurs associés
PCR	Polymerase chain reaction
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
<i>Puro</i>	Puromycine
Puro ^R	Puromycine résistant
RH	Recombinaison homologue
RI	Radiation ionisante
RPA	Replication protein A
RT	Reverse transcriptase
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SINE	Short interspersed nuclear element
SSA	Single-strand annealing
TE	Tris-EDTA
UV	Ultra-violets
V	Volt

REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement remercier le docteur Abdellah Belmaaza, mon directeur de recherche, qui m'a permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire. Je le remercie aussi pour la formation qu'il m'a permis d'acquérir, pour le support financier qu'il m'a accordé et pour ses sages conseils, qui m'ont permis de mener à terme mon projet.

J'aimerais remercier Josée-France Villemure et Fatima Zouanat pour m'avoir enseigné les techniques avec patience et pour m'avoir aidé à démarrer mon projet. Je tiens aussi à remercier les stagiaires Zeinab Daher, Farida Beleiche et Bouchra Labraki avec lesquelles j'ai eu beaucoup de plaisir durant ma maîtrise. J'aimerais également remercier les étudiants de notre laboratoire, Isabelle Cousineau et Jean-François Lemelin, ainsi que tous les membres de l'Institut du cancer de Montréal qui ont croisé mon chemin. Je remercie aussi Christelle Ogoudikpe, Djamila Boutemmine, Edlie St-Hilaire et particulièrement Hortence Makui qui a su m'encourager et me supporter durant ma maîtrise, sans oublier Christine Maugard, pour m'avoir donné de bons conseils qui m'ont permis d'avancer dans mon projet et pour m'avoir aidé dans les analyses statistiques.

J'aimerais finalement remercier tous les membres de ma famille, mon père Antoine, ma mère Nadia, mes frères Frédéric et Joseph Patrick, mes grand-mères, mes oncles, mes tantes et tous mes cousins et cousines qui m'ont beaucoup supporté durant mes études. J'aimerais particulièrement remercier mes parents pour leur soutien moral et financier, sans eux je n'aurais pas pu compléter ma maîtrise.

**CHAPITRE 1:
INTRODUCTION**

1. Introduction

1.1 Le cancer du sein

Une femme sur neuf risque d'être atteinte du cancer du sein au cours de sa vie ([http:// www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)). Le cancer du sein affecte environ un million de femme chaque année à travers le monde (Schwab et al., 2002). En 2003, au Canada seulement, il y aura environ 21 200 femmes qui seront diagnostiquées pour le cancer du sein et environ 5 300 en mourront ([http:// www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)). Le taux de mortalité dû au cancer du sein est d'environ 30%, faisant du cancer du sein la source la plus fatale chez les femmes entre 50 et 55 ans (Schwab et al., 2002). Une hormonothérapie, aucun enfant, une ménopause tardive, l'âge, la consommation d'alcool et les radiations ionisantes sont quelques exemples de facteurs environnementaux qui peuvent mener au développement du cancer du sein. De plus, les femmes ayant une histoire familiale du cancer du sein sont les plus à risque de développer cette maladie (Schwab et al., 2002; Welch et al., 1998). En effet, 10 % des cas de cancer du sein sont héréditaires (Rahman and Stratton, 1998).

1.2 Gènes de susceptibilité

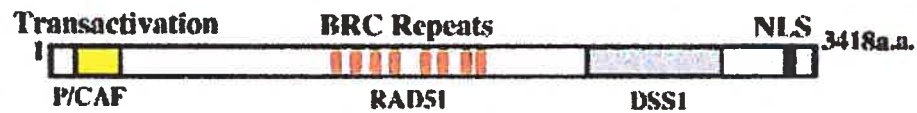
Jusqu'à ce jour, peu de gènes ont été identifiés comme étant responsable du cancer du sein héréditaire. En 1990, le premier gène de susceptibilité au cancer du sein, *BRCA1* (*Breast Cancer Susceptibility Gene*), a été identifié et localisé sur le chromosome 17q21.3 (Hall et al., 1990; Miki et al., 1994). En 1994, un second gène de susceptibilité au cancer du sein, *BRCA2*, a été localisé sur le chromosome 13q12-13 (Wooster et al., 1994), et a été isolé par clonage positionnel quelques mois plus tard (Wooster et al., 1995).

Des mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont responsables d'environ 5-10 % de tous les cas de cancers du sein et d'environ 60-80 % des cas héréditaires de cancer du sein (Ford et al., 1998; Schubert et al., 1997; Serova et al., 1997). Des mutations dans *BRCA2* sont aussi associées aux cancers de l'ovaire, de la prostate, du pancréas, du colon, de l'estomac, du larynx, de la thyroïde et des mélanomes oculaires (The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999). On retrouve également des cas de cancers du sein chez l'homme dus à des mutations dans *BRCA2* (Ford et al., 1998). De fortes variations de la pénétrance estimée pour *BRCA1* et *BRCA2* ont été rapportées : une femme porteuse d'une mutation de *BRCA1* a un risque moyen cumulé à 70 ans de 65% de développer un cancer du sein et de 39% de développer un cancer de l'ovaire, alors que pour une mutation de *BRCA2*, le risque moyen calculé atteint respectivement 45% et 11% (Antoniou et al., 2003). *BRCA1* et *BRCA2* sont des gènes suppresseurs de tumeur: l'analyse des tumeurs héréditaires montre une perte d'hétérozygoté pour le chromosome normal avec rétention de l'allèle muté (Scully and Puget, 2002).

1.3 Structure primaire de *BRCA2*

Les régions codantes de *BRCA2* ne ressemblent à aucune autre protéine présente dans les banques de données. L'ARNm du gène *BRCA2* est de 11 kb. Il est composé de 27 exons et encode une large protéine de 3418 acides aminés ou 384 kDa (Chen et al., 1998b; Wooster et al., 1995) (figure 1). Même s'il est exprimé de façon ubiquitaire, son niveau d'expression demeure le plus élevé dans le thymus, les testicules et les ovaires. Son expression est également régulée par le cycle cellulaire: elle est faible en G1 et élevée en S-G2 (Vaughn et al., 1996; Wang et al., 1997). Dans une cellule normale, *BRCA2* se localise au noyau : *BRCA2* possède un signal de localisation nucléaire (NLS) au niveau

C-terminal chez l'humain et probablement au niveau N-terminal chez la souris (Bertwistle et al., 1997; Sarkisian et al., 2001; Yano et al., 2000).



(Zheng et al. 2000)

Figure 1: Domaines fonctionnels de la protéine BRCA2. BRCA2 est composée de 3418 aa. La partie N-terminale contient un domaine de transactivation et interagit avec la protéine P/CAF. La partie centrale contient huit répétitions BRC (*BRC repeats*) qui interagissent avec RAD51. La partie C-terminale s'associe avec DSS1 et contient un signal de localisation nucléaire (NLS) chez l'humain.

L'exon 3 (acides aminés 23-105), dans la partie N-terminale, semble contenir un domaine de transactivation (Milner et al., 1997). En effet, l'exon 3, lorsque fusionné avec le domaine du GAL4 qui lie l'ADN, stimule la transcription chez la levure et les cellules de mammifères (Milner et al., 1997). Le domaine d'activation à l'intérieur de l'exon 3 montre également des similarités avec la séquence de c-Jun, un facteur de transcription. L'activité transcriptionnelle de BRCA2 pourrait être régulée par sa phosphorylation car l'exon 3 s'associe à une kinase inconnue et est phosphorylé par cette kinase (Milner et al., 2000). De plus, l'exon 10 (acides aminés 293-453) interagit avec un co-activateur à activité d'histone acétyl transférase, soit P/CAF (p300/CBP et facteurs associés), et démontre une activité d'acétyl transférase suite à cette interaction (Fuks et al., 1998). EMSY, une protéine qui est surexprimée (amplifiée) dans les cancers sporadiques du sein et de l'ovaire, interagit avec l'exon 3 de BRCA2 et inhibe l'activité transcriptionnelle de ce domaine (Hughes-Davies et al., 2003). Puisque l'amplification de EMSY dans les

cancers sporadiques montre les mêmes caractéristiques que des mutations dans BRCA2 dans les cancers héréditaires, l'interaction EMSY-BRCA2 semble impliquer BRCA2 dans les cancers sporadiques (Hughes-Davies et al., 2003). Le rôle de BRCA2 dans la régulation de la transcription demeure incertain jusqu'à ce jour. Cependant, supprimer les domaines transcriptionnelles de BRCA2 peut prédisposer au développement d'une tumeur (Milner et al., 1997; Nordling et al., 1998).

La partie C-terminale de BRCA2 (acides aminés 2472-2957) est hautement conservée entre la souris et l'homme; il y a 72% d'homologie (Sharan and Bradley, 1997; Tavtigian et al., 1996). Cette région s'associe à DSS1 (*deleted in split hand/split foot*), une protéine conservée à travers l'évolution (Marston et al., 1999). Le gène *DSS1* chez la levure semble être requis pour la croissance cellulaire normale, et un mutant *dss1* de levure croît plus lentement, suggérant un rôle dans le cycle cellulaire (Marston et al., 1999). Des études récentes avec *Ustilago maydis* montrent que Dss1 est impliqué dans la réparation des cassures doubles brins (CDB) par recombinaison homologue (RH) et maintient la stabilité du génome (Kojic et al., 2003). Des mutants Dss1 chez *Ustilago maydis* montrent une sensibilité aux radiations, une déficience dans la RH, une déféctuosité dans la méiose et une instabilité génomique (Kojic et al., 2003).

L'exon 11, dans la partie centrale de BRCA2, est le plus long des exons (5 kb). Il contient huit copies d'une séquence répétée en tandem. Ces motifs sont appelés les répétitions BRC (*BRC repeats*) et s'étalent sur une région de 1200 acides aminés. Chaque BRC, nommé BRC1 à BRC8, est d'environ 30 acides aminés. Les répétitions BRC sont relativement bien conservées, en séquence et en longueur, des mammifères aux oiseaux (Takata et al., 2002). Six des huit BRC (BRC1-4, BRC7 et BRC8) sont hautement conservées chez les mammifères et sont nécessaires pour l'interaction avec RAD51 (Chen et al., 1998b; Marmorstein et al., 1998; Mizuta et al., 1997; Wong et al., 1997), une

protéine essentielle pour la réparation de dommages à l'ADN par RH (voir section 1.6.3.1.1).

1.4 Modèles génétiques pour BRCA2

Pour mieux comprendre la fonction de BRCA2, des souris mutantes dans *Brca2* ont été générées. Les différentes mutations dans les allèles de *Brca2* ont engendré divers phénotypes. Les souris portant une mutation en 5' de l'exon 11 (avant BRC1) meurent de façon prématurée durant le développement embryonnaire, soit entre les jours E6,5 et E9,5 (Ludwig et al., 1997; Sharan et al., 1997; Suzuki et al., 1997). Toutefois, juste avant l'arrêt de leur croissance, ces embryons semblaient se différencier et former un mésoderme, suggérant que *Brca2* influencerait la prolifération plutôt que la différenciation durant l'embryogenèse. En effet, des souris homozygotes pour *Brca2* portant une mutation en 3' de l'exon 11 (après BRC3 ou BRC7), montrent une prolifération cellulaire diminuée et meurent de façon prénatale ou périnatale (Connor et al., 1997; Friedman et al., 1998). Toutefois, les souris qui survivent sont trois fois plus petites que les souris sauvages et ont une durée de vie plus courte. Les souris qui vivent jusqu'à l'âge adulte développent des lymphomes du thymus létaux avant l'âge de 5 mois, démontrant ainsi que *Brca2* est un suppresseur de tumeur. Par contre, les souris hétérozygotes pour *Brca2* se développent normalement, sont fertiles, et ne paraissent pas être plus susceptibles aux tumeurs mammaires.

Les fibroblastes d'embryons de souris (MEFs) qui portent des mutations en 3' de l'exon 11 poussent lentement en culture, arrêtent en G1 et G2/M, et ont un niveau élevé de p53 et p21, présumément dû à une augmentation de dommages à l'ADN (Connor et al., 1997; Friedman et al., 1998; Patel et al., 1998). Une augmentation de p53 résulte en une augmentation de p21 et à l'arrêt du cycle

cellulaire en G1. Dans un background $p53^{-/-}$ ou $p21^{-/-}$, les embryons de souris Brca2-déficientes survivent quelques jours de plus (jusqu'au jour E10,5), indiquant que c'est l'activation de la voie p53/p21, due à l'apparition spontanée de dommages à l'ADN, qui semblerait diminuer la prolifération cellulaire des embryons en absence de Brca2 (Brugarolas and Jacks, 1997; Ludwig et al., 1997).

1.5 Analyse des cellules BRCA2-déficientes

1.5.1 L'instabilité du génome

Les cellules Brca2-déficientes de souris (MEFs) et les cellules dérivées de tumeurs dues à une mutation dans BRCA2 accumulent des aberrations chromosomiques de manière spontanée à chaque division cellulaire (Patel et al., 1998). Ces aberrations incluent des cassures dans les chromosomes et les chromatides, ainsi que la formation de triradials et de quadriradials (figure 2). Les triradials sont des chromosomes à trois bras en forme de Y alors que les quadriradials sont des chromosomes dicentriques à quatre bras en forme d'étoile (Zhang et al., 1998). Les cellules Brca2-déficientes chez la souris contiennent également des réarrangements chromosomiques telles que des délétions, des translocations, des inversions et des chromosomes acentriques (Yu et al., 2000). Ces observations montrent que BRCA2 est un gène essentiel pour la stabilité de la structure des chromosomes (Venkitaraman, 2002).

1.5.2 L'hypersensibilité aux agents génotoxiques

Une autre caractéristique des cellules BRCA2-déficientes est leur hypersensibilité aux agents génotoxiques ayant le potentiel de causer des CDB telles que les radiations ionisantes (RI), le méthyl-methanesulfonate et la

mitomycine C (Zheng et al., 2000). Cette hypersensibilité est due à la déficience de BRCA2, puisqu'une diminution de son expression rend des cellules normales sensibles aux RI et à la mitoxantrone, un agent chimique qui produit des CDB (Abbott et al., 1998). Cette hypersensibilité peut être due à une déficuosité dans la signalisation ou dans la réparation des dommages à l'ADN.

Les CDB apparaissent également lorsque la fourche de réplication traverse une cassure (coupure) simple brin. La réparation des CDB est très importante à la survie de la cellule et au maintien de la stabilité de son génome. Une CDB non réparée entraîne la mort cellulaire par apoptose (Bennett et al., 1993), par contre, une CDB mal réparée provoquerait des réarrangements génomiques et dans certains cas, prédisposerait au développement de cancers (Frankenberg-Schwager, 1989; Ward, 1995).



Figure 2: L'instabilité chromosomique dans les cellules de souris Brca2-déficientes. La flèche noire indique une cassure chromosomique (A), un triradial (B), et un quadriradial (C).

1.6 Voies de réparation des cassures doubles brins

Les principales voies de réparation des CDB sont la religation non-homologue (NHEJ: *non-homologous end-joining*), le *single-strand annealing*

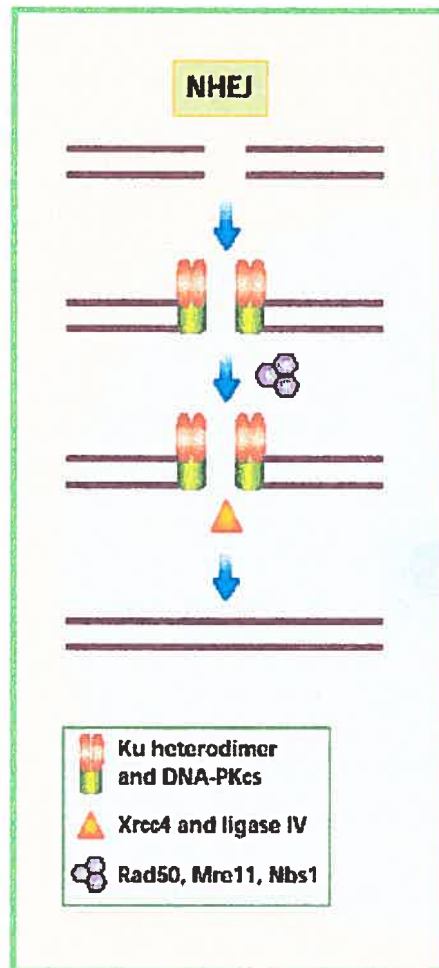
(SSA) et la recombinaison homologue (RH). Ces voies de réparation sont conservées entre la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules de mammifères (Karran, 2000).

1.6.1 La religation non-homologue (NHEJ)

La voie du NHEJ permet la réparation de la CDB en réunissant les deux extrémités de la cassure l'une à l'autre. Le NHEJ ne requiert aucune homologie entre les deux extrémités de la cassure (Featherstone and Jackson, 1999). Cependant, il y a parfois la présence d'une microhomologie de moins de dix paires de bases. Le NHEJ est un processus non conservatif qui est souvent associé à des délétions et des insertions. Lorsque plusieurs CDB sont présentes simultanément dans la même cellule, les extrémités d'une cassure pourront se religaturer avec les extrémités d'une autre cassure, générant ainsi des délétions, des inversions et des translocations (Khanna and Jackson, 2001). Chez les mammifères ou la levure, le mécanisme du NHEJ nécessite la participation des protéines comme Ku70, Ku80, DNA ligase IV et Xrcc4 (Haber, 2000) (figure 3). La voie du NHEJ est en fonction durant la phase G1 et la phase S précoce (Takata et al., 1998). BRCA2 n'est pas impliqué dans cette voie (Merel et al., 2002; Wang et al., 2001; Xia et al., 2001).

1.6.2 Le *single-strand annealing* (SSA)

La réparation d'une CDB par SSA requiert la présence de deux duplex d'ADN homologues en répétitions directes (Lin et al., 1984; Lin et al., 1990; Paques and Haber, 1999). La première étape du SSA est la génération de bouts 3' simples brins, probablement par l'exonucléase RAD50/MRE11/NBS1 (figure 4). Les bouts 3' ainsi exposés sont complémentaires et s'associent entre eux. Les extrémités 3' simples brins non-homologues qui sont créées lors de la résection et l'appariement sont clivées par le complexe XPF/ERCC1,



(Khanna and Jackson, 2001)

Figure 3: Modèle de réparation d'une CDB par la religation non-homologue (NHEJ). Le NHEJ requiert Ku, un hétérodimère qui se lie aux extrémités de la cassure et qui recrute la DNA-PKcs. Par la suite, Xrcc4 et la ligase IV sont recrutés pour religaturer les extrémités de la cassure. Le complexe Rad50/Mre11/Nbs1, qui contient les activités d'hélicase et d'exonucléase, est également requis, particulièrement pour traiter les bouts d'ADN avant la ligation.

l'homologue humain du complexe Rad1/Rad10 de *Saccharomyces cerevisiae*, et le complexe MSH2/MSH3 du système de réparation des bases mal appariées (*mismatch repair*) (Adair et al., 2000; Sugawara et al., 1995; Sugawara et al., 1997). Finalement, il y a synthèse d'ADN, suivie d'une ligation pour terminer la réparation de la cassure. Comme le NHEJ, le SSA est un mécanisme non conservatif parce qu'il y a perte de la séquence d'ADN entre les répétitions. BRCA2 n'est pas impliquée dans la voie du SSA, car en absence de BRCA2, le SSA augmente (Larminat et al., 2002, Tutt et al., 2001).

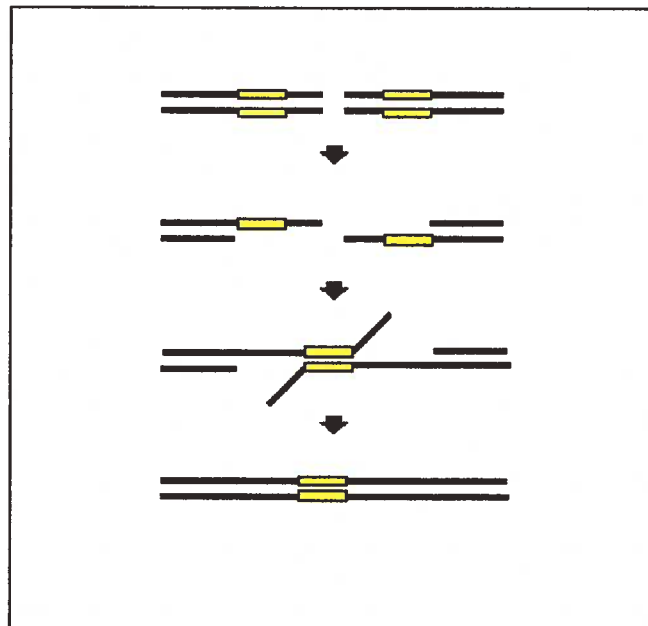


Figure 4: Modèle de réparation d'une CDB par le *single-strand annealing* (SSA). Le SSA requiert deux séquences répétées dans la même orientation (répétition directe). Une région simple brin, adjacente à la cassure, est créée, probablement par RAD50/MRE11/NBS1, et s'étend jusqu'aux séquences répétées de manière à ce que les brins complémentaires puissent s'apparier l'un à l'autre. Suite à l'appariement des brins complémentaires, les queues 3' simples brins qui apparaissent sont clivées par Rad1/Rad10 et MSH2/MSH3. Les brèches sont finalement remplies par l'ADN polymérase pour compléter la réparation (Paques and Haber, 1999).

1.6.3 La recombinaison homologue (RH)

La RH est un processus qui requiert une homologie extensive entre deux duplex d'ADN (Featherstone and Jackson, 1999; Paques and Haber, 1999). La voie de la RH est préférentiellement utilisée durant les phases S et G2 (Sonoda et al., 1998; Takata et al., 1998), car la chromatide sœur est présente (Pastink et al., 2001). Le donneur peut également être un chromosome homologue ou une séquence répétitive. La RH peut être réciproque (crossing-over), dans laquelle les deux molécules donnent et reçoivent de l'information génétique, ou non réciproque (conversion génique), dans laquelle la molécule endommagée reçoit de l'information génétique d'une molécule intacte qui demeure inchangée (figure 5).

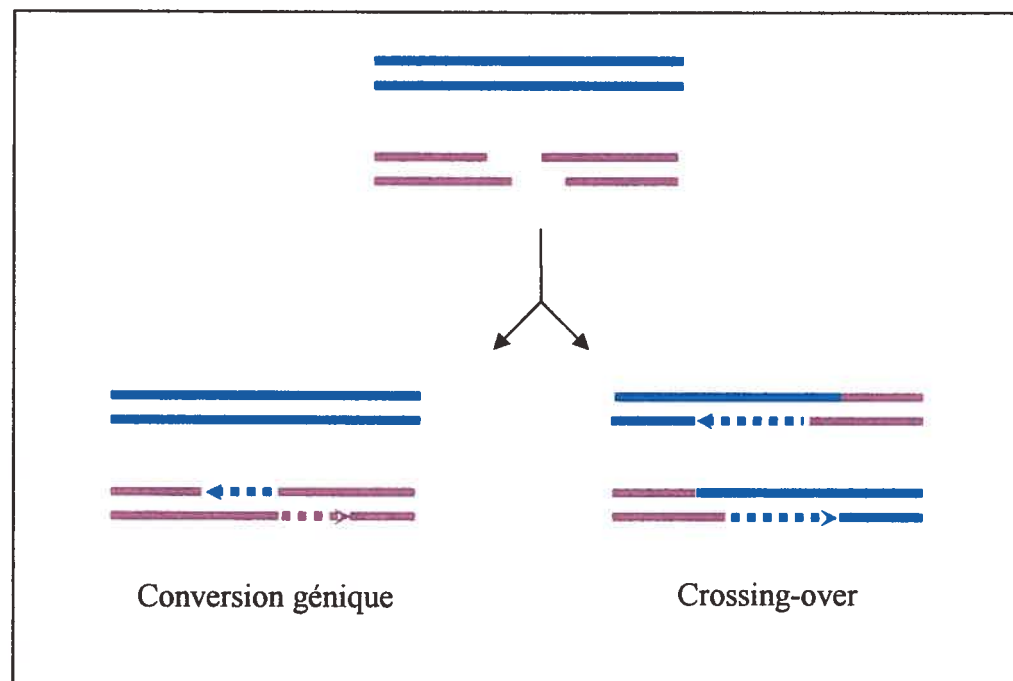


Figure 5: Conversion génique et crossing-over. Lors de la conversion génique, la molécule receveuse (en mauve) reçoit de l'information génétique d'une molécule donneuse (en bleu) qui demeure inchangée. Lors du crossing-over, il y a un échange de l'information génétique entre les deux molécules où chacune donne et reçoit de l'information.

La RH est un processus très important pour la survie et l'évolution de tous les organismes. Durant la méiose, la RH, qui est initiée par une CDB, assure la ségrégation ordonnée des chromosomes homologues suite à la formation des chiasmas qui sont des intermédiaires de recombinaison. La résolution de ces intermédiaires par des événements de crossing-over provoque la répartition des gènes parentaux sur les chromosomes et un réassortiment des allèles, créant ainsi de la diversité génétique (Orr-Weaver, 1996; Simchen and Hugerat, 1993; Smith and Nicolas, 1998). Les événements de conversion génique durant la méiose seraient plutôt impliqués dans la diversification des gènes et dans le maintien de l'homogénéité des familles multigéniques dont les membres au sein d'une même espèce sont plus homologues entre eux qu'avec les membres d'une autre espèce (Liao et al., 1997; Wang et al., 1999; Wendel, 2000).

Durant la mitose, la RH permet de réparer les CDB qui apparaissent spontanément ou qui sont induites par un agent exogène (Karran, 2000; Khanna and Jackson, 2001; Paques and Haber, 1999). La RH permet également de réinitialiser la fourche de réplication (Cox et al., 2000; Haber, 1999; Hyrien, 2000; Lundin et al., 2002; Lundin et al., 2003; Michel et al., 2001; Rothstein et al., 2000; Saintigny et al., 2001). Une défectuosité dans la réinitiation de la réplication peut mener à l'apoptose ou à l'instabilité génétique (Enomoto, 2001). Les événements de crossing-over durant la mitose seraient mutagéniques, contribueraient à l'instabilité génétique et à la transformation néoplasique (Kolomietz et al., 2002; Labuda et al., 1995). En effet, plus du tiers du génome humain est composé de séquences répétitives, dont 34% constituent des rétrotransposons à ARN tels que les éléments SINEs (*short interspersed nuclear elements*) et LINEs (*long interspersed nuclear elements*) (Smit, 1999). Ces séquences répétitives peuvent être des points chauds pour la RH (RH ectopique entre séquences répétitives) et peuvent promouvoir des réarrangements chromosomiques. Un crossing-over entre des répétitions directes engendre des délétions, des translocations et des amplifications, alors

qu'un crossing-over entre des répétitions inversées engendre des inversions (figure 6) (Klein, 1995). Cependant, la stabilité de leur génome indique que les cellules somatiques ont développé un mécanisme qui inhibe la formation des crossing-over et canalise ainsi les CDB vers la conversion génique (Villemure et al., 2003); la nature de ce mécanisme demeure inconnue (West, 2003).

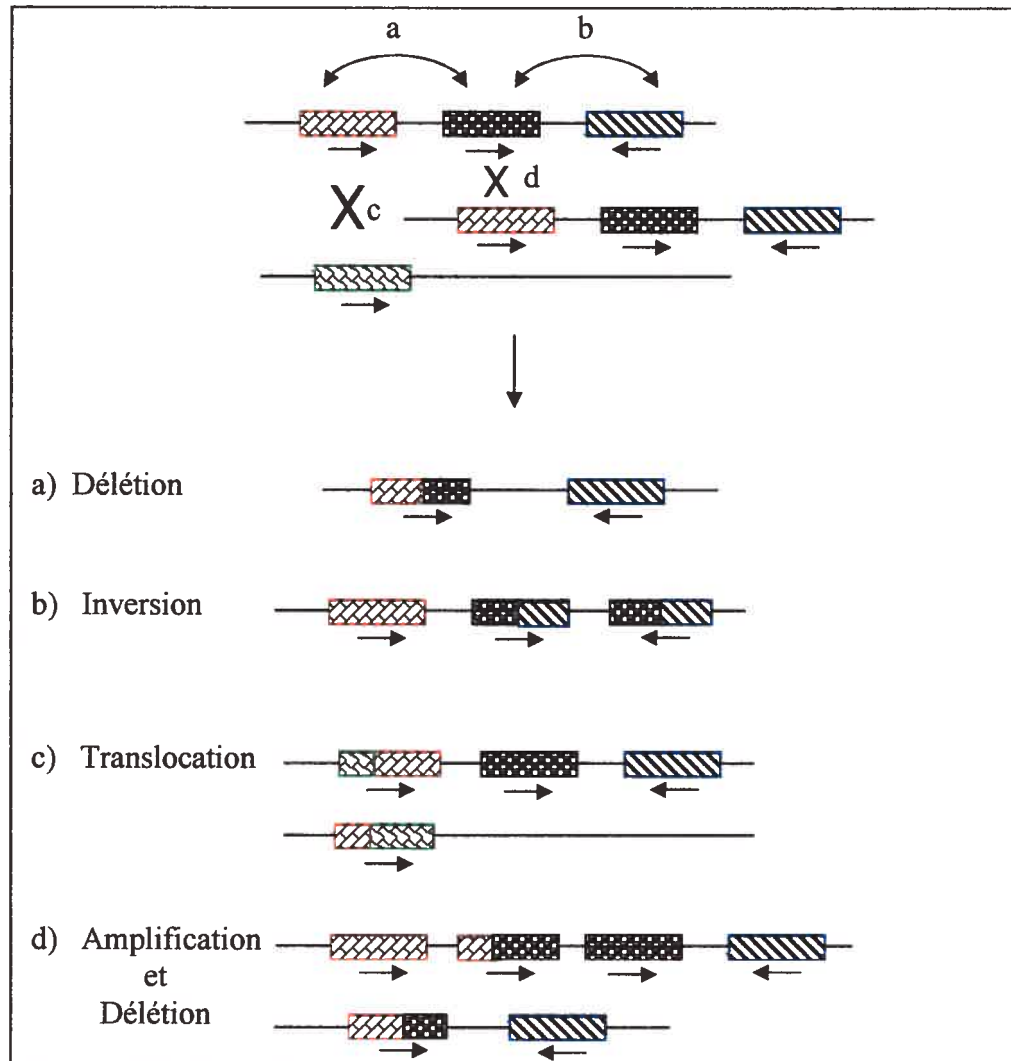


Figure 6: Réarrangements chromosomiques par crossing-over. La recombinaison réciproque (crossing-over) entre des séquences d'ADN répétitives entraîne des délétions entre les séquences en répétitions directes (a) ou des inversions entre les séquences en répétitions inversées (b). Un crossing-over entre des chromosomes différents entraîne une translocation (c), tandis qu'un crossing-over entre des chromatides sœurs entraîne une amplification et une délétion de séquences (d).

1.6.3.1 Les étapes de réparation des cassures doubles brins par recombinaison homologue

La réparation des CDB par RH comporte principalement trois grandes étapes : l'initiation, la formation de l'intermédiaire et la résolution de cet intermédiaire en événement de réparation précis (conversion génique ou crossing-over).

1.6.3.1.1 L'initiation et la formation de l'intermédiaire de recombinaison

Lors de l'initiation, la CDB (figure 7 a) subit un façonnage par une exonucléase 5'-3', probablement le complexe protéique RAD50/MRE11/NBS1 (Furuse et al., 1998; Paull and Gellert, 1998; Paull and Gellert, 1999; Trujillo et al., 1998; Tsubouchi and Ogawa, 1998), pour générer des bouts 3' simples brins (figure 7 b). Cette étape est essentielle à la réparation des CDB par RH et SSA (figures 4 et 7) (Karran, 2000). RAD51, une protéine d'environ 37 kDa, se lie à ces bouts 3' simples brins et forme un filament de nucléoprotéines hélicoïdal sur l'ADN (figure 7 c) (Benson et al., 1994; Kowalczykowski, 2002). RAD51 des mammifères, qui est l'homologue de la protéine RecA chez *Escherichia coli* (Clark, 1996) et de la protéine ScRad51 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Shinohara et al., 1992), catalyse l'appariement et l'échange de brins entre deux molécules d'ADN homologues pour former un intermédiaire de recombinaison (Baumann et al., 1996; Baumann and West, 1997; Clark, 1996; Sung, 1994; Sung and Roberson, 1995). La stabilité de l'intermédiaire est assurée par la synthèse d'ADN amorcée par le bout 3' envahissant (figure 7 d) (Paques and Haber, 1999).

La formation du filament de nucléoprotéines ainsi que l'invasion (figure 7 c et d) sont stimulées par la présence des protéines RAD52, RAD54, RAD55/57

Figure 7: Le modèle de *one-sided invasion*.
(Légende page suivante)

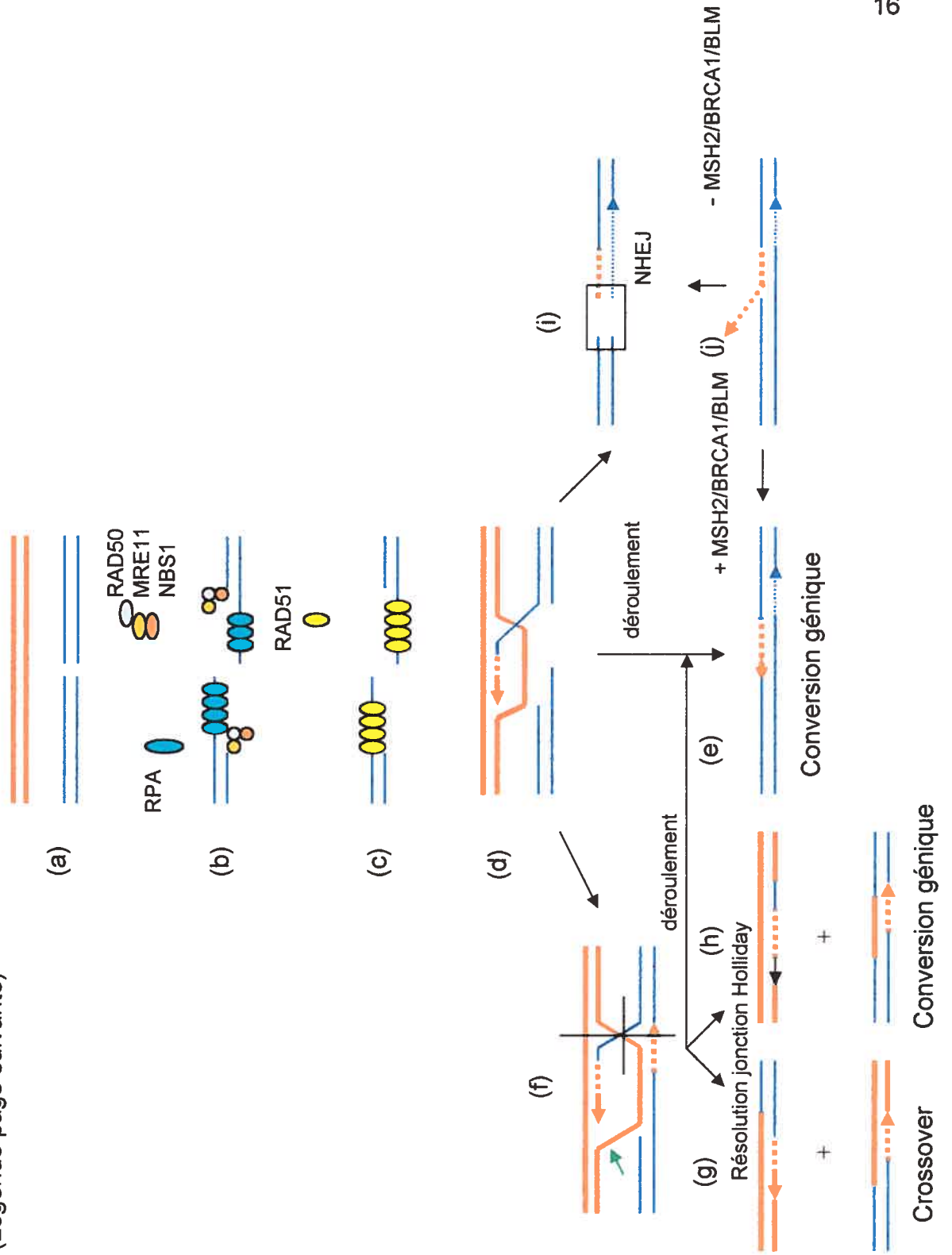


Figure 7: Modèle de *one-sided invasion*. A) Présence d'une CDB induite par un agent endogène ou exogène. B) Façonnage des extrémités de la CDB par le complexe RAD50/MRE11/NBS1 et liaison de la protéine RPA aux bouts 3'simples brins générés pour les protéger. C) Formation du filament de nucléoprotéine par RAD51. D) Formation de l'intermédiaire de recombinaison stabilisé par la synthèse d'ADN. E) Résolution de l'intermédiaire : le brin nouvellement synthétisé est libéré par des hélicases, puis il s'apparie avec l'extrémité 3' libre de l'autre bout de manière à produire un événement non-réciproque (conversion génique). F) La boucle d'ADN simple brin s'apparie avec l'extrémité 3' de l'autre bout pour former un intermédiaire avec une jonction de Holliday. G) La coupure de la jonction de Holliday, de manière horizontale, et de la boucle d'ADN simple brin (flèche verte) engendre un événement non-réciproque (conversion génique). H) La coupure de la jonction de Holliday, de manière verticale, et de la boucle d'ADN simple brin (flèche verte) engendre un événement réciproque (crossover). I) Terminaison des événements de conversion génique par le NHEJ. J) Génération d'une queue 3'simple brin libre due à une synthèse d'ADN prolongée qui s'étend au-delà de la région d'homologie. Cette queue est clivée par les protéines MSH2, BRCA1 et BLM (voir texte).

et RPA (*replication protein A*) (Dasika et al., 1999). RPA est une protéine qui lie l'ADN simple brin pour éliminer les structures secondaires et pour empêcher la dégradation de l'ADN simple brin (figure 7 b) (Shamoo, 2003). RAD52, en association avec RAD55 et RAD57, déplace également la protéine RPA pour faciliter l'accès à l'ADN par RAD51 (New et al., 1998; Sung, 1997b). RAD52 augmente aussi l'affinité de RAD51 pour l'ADN simple brin (Benson et al., 1998; Shinohara and Ogawa, 1998) puisque RAD51 a une faible affinité pour l'ADN simple brin comparativement à l'ADN double brin (Mazin et al., 2000; McIlwraith et al., 2000). La compétition entre RAD52 et Ku pour lier les extrémités de la CDB pourrait déterminer quelle voie de réparation entre la RH ou le NHEJ sera employée (Van Dyck et al., 1999).

Des mutations dans RAD50 et MRE11, ainsi que dans Xrc2 chez la levure, sont associées à une déficience de la réparation des CDB par NHEJ, SSA et RH. Des mutations dans Rad50 et Mre11 chez la souris sont létales (Luo et al., 1999; Xiao and Weaver, 1997). Les individus portant des mutations dans MRE11 présentent des symptômes tels qu'une radiosensibilité, une fréquence augmentée de mutations spontanées et de l'instabilité chromosomique (Averbeck, 2000). Le syndrome héréditaire de Nijmegen est caractérisé par une fragmentation des chromosomes et est dû à des mutations dans le gène *NBS1*, l'homologue humain de Xrc2, (Digweed et al., 1999). Des mutations dans le gène *NBS1* sont également associées à une diminution de la réparation des CDB (Tauchi et al., 2002). Les patients atteints de ce syndrome montrent une hypersensibilité aux RI, une déficience immunitaire, de l'instabilité chromosomique et une prédisposition aux tumeurs lymphoréticulaires (Averbeck, 2000).

Des mutations dans le gène *RAD51* démontrent une sensibilité aux RI, de l'instabilité chromosomique, une accumulation de CDB durant la réplication et un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2/M avant que les cellules entrent en

apoptose (Dasika et al., 1999; Sonoda et al., 1998). La perte de RAD51 dans la lignée cellulaire de poulet DT40 engendre une accumulation de cassures chromosomiques (Karran, 2000), indiquant que la stabilité des chromosomes dans les cellules normales, qui n'ont pas été traitées avec des agents génotoxiques, requière une voie de réparation RAD51-dépendante (Khanna and Jackson, 2001). Le consensus général est que cette observation reflète l'importance de RAD51 dans la progression des fourches de réplication à travers des sites endommagés ou des structures d'ADN secondaires (Khanna and Jackson, 2001). En accord avec cette interprétation est l'observation que RAD51 des mammifères forment des foci dans les noyaux de cellules irradiées, et durant la phase S à des sites de réplication (Tashiro et al., 2000). Étant donné que la RH est importante pour la réparation des lésions qui surgissent durant la réplication dans les bactéries, les levures et les cellules de mammifères (Lundin et al., 2002; Michel et al., 2001; Saintigny et al., 2001), il est possible que la perte de réparation par RH dans les cellules RAD51^{-/-} provoque l'accumulation de cassures et éventuellement la mort de ces cellules (Lundin et al., 2003). Les souris Rad51^{-/-} meurent prématurément durant le développement embryonnaire (Lim and Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996).

Contrairement aux souris Rad51^{-/-}, les souris Rad52- ou Rad54-négatives sont viables et fertiles (Rijkers et al., 1998). Les cellules souches embryonnaires (ES) de souris Rad52-négatives sont déficientes pour la RH, mais ne sont pas hypersensibles à la présence de CDB (Essers et al., 1997), tandis que les cellules ES de souris Rad54 négatives sont hypersensibles à la présence de CDB (Essers et al., 1997).

Comme BRCA1 et BRCA2, la perte d'expression de RAD51 pourrait être un facteur important dans la prédisposition aux cancers héréditaires du sein et de l'ovaire (Venkitaraman, 2002). RAD51 est mutée dans certains cancers du sein bilatéraux (Kato et al., 2000) et une perte d'hétérozygoté dans le locus de

RAD51, RAD52 ou RAD54 a été associée au développement du cancer du sein (Gonzalez et al., 1999). La surexpression de la protéine RAD51, qui est suffisante pour stimuler la RH dans les cellules de mammifères (Vispe et al., 1998), a été associée au développement de l'adénocarcinome du pancréas (Maacke et al., 2000). Ces études suggèrent que la dérégulation de la RH due à une augmentation ou une diminution de la fréquence de RH pourrait être impliquée dans la tumorigénèse (Lundin et al., 2003).

Une autre protéine associée à la RH est ATM (*ataxia-telangiectasia, mutated*). Suite à une RI, ATM phosphoryle les protéines NBS1, RPA et BRCA1 ainsi que la tyrosine kinase c-Abl qui phosphoryle RAD51 (Baskaran et al., 1997; Brush et al., 1996; Gatei et al., 2000; Gatei et al., 2001; Khanna, 2000; Yuan et al., 1998). La phosphorylation de c-Abl augmente la formation du complexe entre RAD51 et RAD52 (Chen et al., 1999b). La protéine ATM est mutée dans la maladie héréditaire A-T (Ataxie télangiectasie). Cette maladie se caractérise par une radiosensibilité accrue, une légère défectuosité dans la réparation des CDB et une prédisposition au cancer (ex: lymphomes, leucémies, cancer du sein) (Lavin and Khanna, 1999). Au niveau cellulaire, les cellules A-T sont hypersensibles aux RI, déficientes dans les points de contrôle G1/S et G2/M, et p53-déficientes (Khanna and Jackson, 2001). De plus, la fréquence de RH spontanée est extrêmement élevée dans les cellules A-T (de 40 à 100 fois) (Meyn, 1993).

1.6.3.1.2 La résolution de l'intermédiaire de recombinaison

Les étapes subséquentes, c'est-à-dire la résolution de l'intermédiaire (jonction de Holliday) et la terminaison, sont moins claires et plusieurs modèles ont été proposés pour tenter de les expliquer. Le modèle de Szostak et al. propose que les deux bouts 3' simples brins envahissent la molécule donneuse et forment un intermédiaire de recombinaison avec deux jonctions de Holliday

(Szostak et al., 1983). La résolution de cette intermédiaire engendre 50% de conversion génique et 50% de crossing-over. Toutefois, les événements de crossing-over durant la mitose sont très rares et représentent moins de 7% des événements totaux. Le modèle de *one-sided invasion* a donc été proposé (figure 7) (Belmaaza and Chartrand, 1994). Dans ce modèle, supporté par plusieurs évidences (Dellaire et al., 1997; Eggleston and Zhao, 2001; Hunter and Kleckner, 2001; Johnson and Jasin, 2000; Kraus et al., 2001; Osman and Subramani, 1998; Paques and Haber, 1999; Puchta et al., 1996; Richardson and Jasin, 2000; Richardson et al., 1998; Rubin and Levy, 1997; Sakagami et al., 1994; Villemure and Belmaaza, 1999; Villemure et al., 1997; Weng and Nickoloff, 1998), la majorité des événements sont des conversion génique; il y a peu ou pas de crossing-over.

Dans le modèle de *one-sided invasion*, une des deux extrémités de la cassure envahit la molécule donneuse et amorce la synthèse d'ADN (figure 7 d), alors que l'autre extrémité est impliquée dans l'étape de la résolution (Belmaaza et al., 1994; Villemure et al., 2003; Villemure et al., 1997). La résolution de l'intermédiaire de recombinaison peut se faire selon deux façons. La première consiste en la libération du brin nouvellement synthétisé, puis à son appariement avec l'extrémité 3' libre de l'autre bout de manière à obtenir un événement non-réciproque (conversion génique) (figure 7 e). La résolution peut également se faire par la coupure d'une extrémité de la boucle d'ADN simple brin (flèche verte, figure 7 f) qui s'apparie avec l'autre extrémité de la cassure pour former un intermédiaire de RH avec une seule jonction de Holliday. Cette jonction sera coupée horizontalement pour générer un événement non-réciproque (conversion génique) (figure 7 g) ou verticalement pour générer un événement réciproque (crossing-over) (figure 7 h). Ainsi, la conversion génique a priorité sur les crossing-over si des protéines, ayant une activité d'hélicase ou de migration de branche, libèrent le brin nouvellement synthétisé, ou si des protéines empêchent ou perturbent la formation des

jonctions de Holliday. L'absence de telles protéines provoqueraient des crossing-over qui contribueraient à l'instabilité génétique. Actuellement, aucune protéine ayant une telle fonction n'a été identifiée chez les eucaryotes (West, 2003).

Le maintien de la stabilité du génome nécessite également une terminaison précise des événements de conversion génique car une terminaison imprécise (un événement de conversion génique couplé au NHEJ), qui est caractérisée par des délétions, des insertions ou des amplifications, contribue à l'instabilité génétique. Une terminaison imprécise implique que la conversion génique est interrompue à divers stades et que la réparation se termine par le NHEJ (figure 7 i-j) (Belmaaza and Chartrand, 1994; Belmaaza et al., 1994; Belmaaza et al., 1990; Villemure et al., 2003; Villemure and Belmaaza, 1999; Villemure et al., 1997). Ainsi, la réparation peut se faire partiellement ou entraîner l'acquisition de séquences pouvant s'étendre au-delà de la région d'homologie (Belmaaza et al., 1994; Belmaaza et al., 1990; Ellis and Bernstein, 1989; Mudgett and Taylor, 1990; Villemure et al., 1997). Ceci dépend de l'étape de synthèse par l'ADN polymérase: si elle est courte et ne synthétise pas toute la région manquante, une délétion en résultera, mais si elle est longue et s'étend au-delà de la région d'homologie, une insertion ou une duplication en résultera (Belmaaza and Chartrand, 1994).

Les protéines XRCC3 (un paralogue de RAD51) (Brenneman et al., 2002), MSH2 (Villemure et al., 2003) (voir annexe), BLM (Adams et al., 2003) et WRN (Prince et al., 2001) sont impliquées dans la terminaison précise des événements de conversion génique. Des cellules ayant une mutation dans l'une de ces protéines démontrent une diminution de la terminaison précise par conversion génique et une augmentation de la terminaison imprécise. Cependant, il n'est pas encore connu comment ces protéines assurent la terminaison précise. Toutefois, MSH2 et BLM pourraient enlever la queue 3'

non homologue des intermédiaires de conversion génique (figure 7 j) (Adams et al., 2003; Villemure et al., 2003). Ces queues 3' non homologues apparaissent lorsque le brin nouvellement synthétisé est trop long. Récemment, nous avons trouvé que BRCA1 pourrait également enlever cette queue 3' non homologue (Cousineau I., Abaji C. et Belmaaza A., manuscrit en préparation). Les cellules ayant une mutation dans ces protéines montrent beaucoup d'instabilité génomique. Des mutations dans les gènes *BLM* et *WRN*, des membres de la famille des hélicases RecQ, sont associées aux syndromes Bloom et Werner respectivement et sont caractérisées par un défaut de la réplication de l'ADN (arrêt de la fourche de réplication) et une instabilité génomique (Khanna and Jackson, 2001). Le tableau I résume la fonction de la plupart des protéines qui sont impliquées dans le contrôle de la RH, ainsi que les phénotypes qui sont associés à leur déficience.

Tableau I. Phénotypes associés à la déficience des protéines impliquées dans le contrôle de la RH

Protéine	Fonction	Phénotype associé à la déficience	Références
<i>Recombinaison homologue et religation non-homologue</i>			
RAD50	Stimule l'activité nucléase de MRE11 Maintien le télomère	Mort embryonnaire précoce (E6,5) Prolifération cellulaire retardée Cellules ES RAD50 ^{-/-} non viables	(Luo et al., 1999; Paull and Gellert, 1998)
MRE11	Nucléase Maintien le télomère	Cellules ES MRE11 ^{-/-} non viables	(Xiao and Weaver, 1997)
NBS1	Stimule l'activité nucléase de Mre11	Létale Cellules ES NBS1 ^{-/-} viables	(Lavin et al., 1999; Paull and Gellert, 1999; Zhu et al., 2001)
<i>Recombinaison homologue</i>			
RAD51	Pairage homologue Échange de brin	Mort embryonnaire précoce (E8,5) Prolifération cellulaire retardée Embryons hypersensibles aux RI Cellules RAD51 ^{-/-} non viables	(Lim and Hasty, 1996; Sonoda et al., 1999; Tsuzuki et al., 1996)
RAD52	Stimule l'activité de RAD51 Liaison et protection des extrémités de la cassure	Viable, croissance normale Cellules RAD52 ^{-/-} montrent une diminution modérée de la fréquence de RH	(New et al., 1998; Rijkers et al., 1998; Sung, 1997a; Sung, 1997b; Van Dyck et al., 1999)

RAD54	ATPase ATP-dépendante Stimule l'activité de pairage de RAD51 Stabilise l'hétéroduplexe Échange de brin	Viable, croissance normale Cellules RAD54 ^{-/-} montrent une diminution de la fréquence de RH et une sensibilité aux RI, méthyl-methanesulfonate et mitomycine C	(Clever et al., 1997; Eisen et al., 1995; Essers et al., 1997; Jiang et al., 1996; Petukhova et al., 1998)
BLM	Hélicase 3'-5' ATP-dépendante	Instabilité génomique Augmentation de la fréquence du ciblage de gène (<i>gene targeting</i>) dans les cellules ES BLM ^{-/-}	(Chester et al., 1998; Karow et al., 1997; Luo et al., 2000)
WRN	Hélicase 3'-5' ATP-dépendante Exonucléase 3'-5' et 5'-3'	Translocation variée, augmentation de la recombinaison illégitime, fréquence élevée de délétions, progression du cycle cellulaire retardée	(Gray et al., 1997; Huang et al., 1998; Mohaghegh and Hickson, 2002; Suzuki et al., 1999)
MSH2	Réparation des bases mal appariées durant la réplication	Viable, développe tumeur en moins d'un an Déficiência dans la réparation des bases mal appariées et dans la RH Cancer du colon	(de Wind et al., 1995; de Wind et al., 1998; Mohindra et al., 2002; Pichiéri et al., 2001; Reitmair et al., 1995; Villemure et al., 2003)
FANC (8 gènes : A, B, C, D1, D2, E, F, G)	Fonction inconnue Monoubiquitination de FANCD2 par le complexe FA (A,C,E,F,G) FANC interagissent avec BRCA1, ATM et NBS1 FANCD1=BRCA2 FANCG interagit avec BRCA2/FANCD1	Anémie de Fanconie Sensibilité aux RI, instabilité génomique, défaut dans la réparation de l'ADN Souris Fanc ^{-/-} , Fanc ^{-/-} et Fancg ^{-/-} ont le même phénotype que anémie de Fanconie, mais ne développe pas l'anémie ou le cancer Phénotype Fancd2 ^{-/-} plus sévère et incidence de cancer épithélial plus élevée Diminution de la RH dans les cellules de vertébrées FANCG-déficiente	(Chen et al., 1996; D'Andrea and Grompe, 1997; Garcia-Higuera et al., 2001; Houghtaling et al., 2003; Howlett et al., 2002; Hussain et al., 2003; Nakanishi et al., 2002; Rio et al., 2002; Whitney et al., 1996; Yamamoto et al., 2003; Yang et al., 2001)

Point de contrôle et réponse aux dommages

ATM	Kinase Ser/Thr Phosphoryle p53, CHK2 et NBS1 Régule les multiples point de contrôle Maintien le télomère	Viable, mais retardement de croissance Infertile Maturation déficiente des cellules T Anormalité neurologique/dysfonction Lymphome malin du thymus	(Barlow et al., 1996; Canman et al., 1998; Chaturvedi et al., 1999; Dasika et al., 1999; Elson et al., 1996; Lin and Desiderio, 1995; Matsuoka et al., 1998; Xu et al., 1996)
ATR	Kinase Ser/Thr Phosphoryle p53 Points de contrôle S et G2/M	Létal Prolifération retardée Niveau élevé de chromatides brisées	(Brown and Baltimore, 2000; Dasika et al., 1999; Tibbetts et al., 1999)

BRCA1	Collaboration avec RAD50 Point de contrôle G2/M	Létal (E7,5) Cellules ES BRCA1 ^{-/-} non viables Point de contrôle G2/M défectif Instabilité génétique Duplication de centrosome anormale Défectuosité dans la réparation des CDB	(Dasika et al., 1999; Gowen et al., 1996; Hakem et al., 1996; Liu et al., 1996; Ludwig et al., 1997; Xu et al., 1999; Zhong et al., 1999)
-------	--	--	--

1.7 BRCA2 dans les points de contrôle du cycle cellulaire et la réponse aux dommages

Suite à un arrêt de la fourche de réplication ou un dommage à l'ADN, BRCA2 subi des modifications post-traductionnelles (possiblement une phosphorylation), mais il n'est pas encore connu si BRCA2 est la cible d'une kinase des points de contrôles S et G2 (Chen et al., 1998a; Lee et al., 2003; Venkitaraman, 2002). Des tumeurs provenant de souris Brca2-déficientes démontrent une perte du point de contrôle mitotique de l'assemblage des microtubules. Des mutations dans Bub1 provoquent l'inactivation de ce point de contrôle, et les cellules primaires d'embryons de souris Brca2-déficientes résistent à l'arrêt de croissance; il y a initiation de la transformation néoplasique (Lee et al., 1999; Venkitaraman, 2002). BRCA2 pourrait jouer un rôle dans ce point de contrôle puisque le domaine kinasique de hBUBR1 se lie à BRCA2 et le phosphoryle (Futamura et al., 2000).

BRCA2 pourrait également participer dans le point de contrôle G2/M car l'expression cellulaire d'une répétition BRC sauvage (BRC4) empêche l'interaction BRCA2-RAD51 et interfère avec ce point de contrôle suite à une RI (Chen et al., 1999a). Il a également été suggéré que BRCA2 participe dans ce point de contrôle à travers son interaction avec BRAF35 (*BRCA2-associated factor*) (Marmorstein et al., 2001). BRAF35 lie préférentiellement les branchements d'ADN. Le complexe BRCA2-BRAF35 se localise sur les chromosomes mitotiques durant l'initiation de la condensation des

chromosomes. La micro-injection d'un anticorps contre l'une ou l'autre de ces protéines retarde la progression de la métaphase, et ainsi du cycle cellulaire.

La participation directe de BRCA2 dans la régulation du cycle cellulaire et des points de contrôles demeure un sujet controversé puisque les points de contrôle du cycle cellulaire sont largement préservés dans les cellules primaires de souris *Brca2*-déficientes en présence de dommages à l'ADN (Connor et al., 1997; Friedman et al., 1998; Patel et al., 1998). De plus, le point de contrôle G1/S demeure intact (voir section 1.4) (Chen et al., 1999a), suggérant ainsi que BRCA2 jouerait plutôt un rôle dans la réparation des CDB (Patel et al., 1998).

1.8 BRCA2 dans la réparation de dommages à l'ADN

1.8.1 L'interaction entre BRCA2, BRCA1 et RAD51

BRCA1 et BRCA2 interagissent *in vivo* dans les cellules mitotiques et méiotiques (Chen et al., 1998a; Venkitaraman, 2001b). L'interaction BRCA1-BRCA2 est médiée par une région adjacente à l'extrémité C-terminale de BRCA1 (acides aminés 1314-1863) (Chen et al., 1998a; Chen et al., 1999c) et une région en N-terminale de BRCA2 (Chen et al., 1998a). BRCA1 peut jouer un rôle dans la réplication, le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de dommages à l'ADN, la régulation de la transcription, l'ubiquitination des protéines, l'apoptose et le remodelage de la chromatine. Par immunofluorescence et microscopie confocale, RAD51 a également été retrouvé dans le complexe BRCA1-BRCA2 en foyer nucléaire dans les phases S/G2 de plusieurs lignées cellulaires humaines cancéreuses (Chen et al., 1999c). Dans les cellules méiotiques, ces trois protéines co-localisent sur les éléments axiaux de complexes synaptonémaux en développement (Chen et al., 1999c).

L'interaction BRCA2-RAD51 est directe (Marmorstein et al., 1998; Wong et al., 1997). Cette interaction implique la partie C-terminale de Brca2 chez la souris, soit les acides aminés 3196-3232 (Mizuta et al., 1997; Sharan et al., 1997) et une deuxième région dans la partie centrale de BRCA2 chez l'humain et la souris, soit les acides aminés 736-2126 (Wong et al., 1997). Cette deuxième région se retrouve dans l'exon 11 à l'intérieur de la zone des répétitions BRC (aa 638-2280) (Bignell et al., 1997; Bork et al., 1996). Par contre, l'interaction BRCA1-RAD51 semble être indirecte, et probablement médiée par BRCA2 (Scully et al., 1997; Venkitaraman, 2001b). Seulement 1 à 5 % du pool intracellulaire de BRCA1 a été retrouvé en association avec BRCA2 ou RAD51 dans les cellules somatiques (Chen et al., 1998a).

Dans les cellules traitées à l'UV ou à l'hydroxyurée, BRCA2 se re-localise au complexe BRCA1-RAD51-PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) de cellules somatiques en phase S (Chen et al., 1998a). PCNA est un facteur de processivité δ et ϵ de l'ADN polymérase et sert comme point de repère pour les sites de synthèse d'ADN (Scully et al., 2000). L'hydroxyurée inhibe la ribonucléotide réductase et diminue rapidement la réserve de déoxynucléotide triphosphates (dNTPs). Lorsque ces substrats (dNTPs) de l'ADN polymérase s'épuisent, il y a arrêt de la fourche de réplication. L'arrêt de la réplication dû à l'hydroxyurée est unique à la phase S. De même, l'induction d'un dimère de pyrimidines par l'UV peut provoquer l'arrêt de la réplication. Ces types de lésions créent des étendues d'ADN simple brin qui sont exceptionnellement persistantes. Ainsi, le complexe BRCA1-BRCA2-RAD51 pourrait se lier à ce type de lésions et/ou à la fourche de réplication arrêtée durant la phase S de manière à réinitier la réplication par RH (Scully et al., 2000).

BRCA2 semble aussi être requis pour l'assemblage de complexes RAD51 au site du dommage. En présence d'un dommage à l'ADN, induit par les RI par exemple, la formation des foyers nucléaires RAD51 diminue dans les

cellules BRCA2-déficientes (Yu et al., 2000; Yuan et al., 1999) ou dans les cellules où l'interaction BRCA2-RAD51 est interrompue (Chen et al., 1998a). L'expression ectopique d'une seule répétition BRC dans une cellule BRCA2 sauvage (MCF7 ou COS-7) est suffisante pour diminuer la formation des foyers nucléaires aux sites du dommage induit par des irradiations. Son expression est également suffisante pour interférer avec la co-localisation de RAD51 et BRCA2 au site du dommage. Ces mêmes cellules, en présence du peptide BRC, sont hypersensibles aux RI et au cisplatine, un antibiotique qui provoque des CDB (Chen et al., 1999a; Yuan et al., 1999).

Récemment, il a été démontré que les cellules CAPAN-1, qui expriment une protéine BRCA2 tronquée en C-terminal, sont capables de former des foyers RAD51 durant la phase S (Tarsounas et al., 2003). De plus, lorsque les cellules sont synchronisées, RAD51 s'associe à la chromatine durant la phase S et ce, indépendamment de BRCA2. Ces résultats suggèrent que la formation des foyers nucléaires RAD51 est indépendante de BRCA2 lorsqu'il y a arrêt de la réplication mais qu'elle est dépendante de BRCA2 lorsque les CDB sont introduites par RI.

1.8.2 Évidence génétique appuyant l'implication de BRCA2 dans la recombinaison homologue

Depuis les deux dernières années, quelques études ont appuyé le rôle de BRCA2 dans la régulation de la RH. En effet, une baisse de quatre à six fois de la conversion génique avec des répétitions directes a été observée suite à l'induction de la CDB par I- *SceI* (voir section 3.4) dans des cellules ES de souris *Brca2*-déficientes (Moynahan et al., 2001; Tutt et al., 2001). Une augmentation de deux fois du nombre de délétions (crossing-over/SSA) accompagne cette diminution de la conversion génique (Tutt et al., 2001). Une augmentation du nombre de délétions avec des répétitions directes a également

été observé dans des cellules de hamster chinois BRCA2-déficientes (Larminat et al., 2002). La diminution de la conversion génique et l'augmentation des délétions (crossing-over/SSA) pourraient expliquer l'instabilité génétique observée dans les cellules BRCA2-déficientes (Tutt et al., 2001). Contrairement à BRCA2, les cellules BRCA1-déficientes montrent une baisse de conversion génique et de délétions (Moynahan et al., 1999; Cousineau I., Abaji C. et Belmaaza A., manuscrit en préparation), indiquant que BRCA1 et BRCA2 jouent des rôles distincts dans la RH.

1.8.3 La régulation de RAD51 par BRCA2

Les répétitions BRC ne sont pas équivalentes dans leur capacité à lier RAD51. Par exemple, la présence du peptide BRC7 empêche partiellement l'habilité de RAD51 à former un filament de nucléoprotéines. Par contre, la présence du peptide BRC3 empêche totalement la formation du filament de nucléoprotéines par RAD51. Ce même peptide, lorsque mis en présence d'un complexe ADN-RAD51 préformé, provoque la dissociation du complexe (Davies et al., 2001). En absence d'ADN, RAD51 s'auto-associe et forme un multimère, une structure en anneau. La présence du peptide BRC4 non seulement empêche la formation de nucléoprotéines par RAD51, mais séquestre également RAD51. Lorsque RAD51 se trouve associé avec BRC4, RAD51 demeure monomérique et ne peut plus s'auto-associer (Davies et al., 2001). Donc, BRCA2 pourrait prévenir la formation du filament de nucléoprotéines en interférant avec les contacts monomériques entre les molécules de RAD51 (Pellegrini et al., 2002). Ainsi, il a été proposé que RAD51 et BRCA2 forment un complexe inactif dans les cellules normales (Davies et al., 2001).

Dans les cellules BRCA2 sauvages, BRCA2 et RAD51 se retrouvent tant dans la fraction cytoplasmique que dans la fraction nucléaire de ces cellules. Par contre, dans les CAPAN-1 BRCA2-déficientes, BRCA2 demeure

cytoplasmique, et en conséquence, RAD51, associée à BRCA2, se retrouve majoritairement dans le cytoplasme, suggérant un rôle pour BRCA2 dans la localisation nucléaire de RAD51 (Davies et al., 2001). En présence d'un dommage, probablement une CDB induite durant la réplication ou par un agent exogène, le complexe BRCA2-RAD51 s'active possiblement par une modification post-traductionnelle et se relocalise au site du dommage pour effectuer la réparation. Dans ce cas, BRCA2 pourrait assister et moduler l'assemblage du filament de nucléoprotéines (Kowalczykowski, 2002). En absence d'un BRCA2 fonctionnel, la cassure demeure irréparée ou est réparée par la voie du NHEJ ou du SSA, créant ainsi de l'instabilité génétique (Venkitaraman, 2001a).

1.9 Objectifs

Les objectifs de mon travail sont d'élucider le rôle de BRCA2 dans la RH et le maintien de la stabilité du génome dans le contexte des hypothèses suivantes :

Hypothèse 1 : BRCA2 transporte RAD51 du cytoplasme au noyau. Cette hypothèse vient de l'observation que dans les cellules CAPAN-1, RAD51 demeure cytoplasmique avec la protéine BRCA2 tronquée sans NLS (Davies et al., 2001). Ainsi, mon objectif est d'analyser la localisation cellulaire de RAD51 avant et après expression de *BRCA2* dans les cellules CAPAN-1.

Hypothèse 2 : En absence de dommages à l'ADN, BRCA2 inhibe la fonction de RAD51 et prévient ainsi les réarrangements génomiques spontanés. Cette hypothèse vient de l'observation que les répétitions BRC inhibent la formation du filament de nucléoprotéine *in vitro* (Davies et al., 2001; Pellegrini et al., 2002). Mon objectif est de déterminer si BRCA2 inhibe la RH dépendante de RAD51 *in vivo*. La fréquence et le taux de RH spontanée entre des

répétitions inversées et directes seront déterminés avant et après expression de *BRCA2* dans les cellules CAPAN-1.

Hypothèse 3 : En présence de cassures chromosomiques, BRCA2 active RAD51 pour effectuer une réparation précise des CDB et prévient ainsi les réarrangements génomiques par NHEJ et SSA. Cette hypothèse découle de l'observation que les cassures chromosomiques s'accumulent dans les cellules BRCA2-déficientes et que BRCA2 est impliqué dans la réparation des CDB (Patel et al., 1998). Mon objectif est de calculer la fréquence de RH induite par une CDB entre des répétitions inversées et directes avant et après expression de *BRCA2* dans les cellules CAPAN-1, afin de déterminer l'effet de BRCA2 sur la RH induite par une CDB, et en conséquence sur l'activité de RAD51. Par ailleurs, pour déterminer quelles voies de réparation sont affectées par l'absence ou la présence de BRCA2, la structure des recombinants sera analysée afin de déterminer le type de recombinant (conversion génique vs crossing-over vs SSA).

Hypothèse 4 : Lors de la réparation des cassures chromosomiques par RH, BRCA2 inhibe la formation des crossing-over (Scully et al., 2000). Cette hypothèse a été émise à cause de la présence des triradials et des quadriradials, des intermédiaires de recombinaison associés au crossing-over observés dans les cellules BRCA2-déficientes (Patel et al., 1998), et à cause de l'interaction entre BRCA2 et BRCAF35, une protéine qui lie les jonctions de Holliday et qui est impliquée dans la ségrégation des chromosomes (Marmorstein et al., 2001). Ainsi, mon objectif est d'analyser la structure des recombinants entre les répétitions inversées avant et après expression de *BRCA2* dans les cellules CAPAN-1, afin de déterminer si les délétions (crossing-over/SSA) observées entre les répétitions directes (Larminat et al., 2002, Tutt et al., 2001) sont dues au crossing-over ou au SSA. La présence de crossing-over en absence de BRCA2 validerait cette quatrième hypothèse.

**CHAPITRE 2:
MATÉRIELS ET MÉTHODES**

2. Matériels et méthodes

2.1 Culture de cellules

Les lignées cellulaires CAPAN-1, HCC1937, MCF7, HCT116 et CAPAN-2 proviennent de l'ATCC. Les CAPAN-1 et les HCC1937 ont été maintenues dans le milieu RPMI 1640 (Gibco). Les MCF7 ont été maintenues dans le milieu MEM (Gibco). Les HCT116 et les CAPAN-2 ont été maintenues dans le milieu McCoy's 5A (Wisent). Tous les milieux de culture ont été additionnés de 10% (pour les MCF7, HCT116 et CAPAN-2) ou de 15% (pour les CAPAN-1 et HCC1937) de sérum de veau fœtal (Wisent), de 50 µg/mL de gentamycine (Wisent) et de 250 µg/mL d'amphotéricine B (fongizone, Gibco), un agent antifongique. De plus, le RPMI 1640 a été supplémenté avec 4,5 g/L de glucose, 10 mM d'HEPES et 1 mM d'acide pyruvique. Toutes les cellules ont été maintenues à 37°C, dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules ont été passées tous les 3 ou 4 jours.

2.2 Transfection de cellules

2.2.1 Agents de sélection

La concentration optimale des différents antibiotiques utilisés pour éliminer les cellules qui n'expriment pas le gène de sélection a été déterminée pour les CAPAN-1. Un million de cellules non-transfectées ont étéensemencées en duplicata dans des pétris 100 mm, et soumises à des concentrations croissantes d'agents de sélection. La concentration optimale retenue correspond à la concentration immédiatement au-dessus de celle qui permet d'éliminer toutes les cellules, à savoir 0,5 µg/mL pour la puromycine (Sigma), 85 µg/mL pour l'hygromycine (Boehringer-Mannheim) et 225µg/mL pour le G418 (Gibco).

2.2.2 Électroporation

Les conditions d'électroporation pour les cellules CAPAN-1 ont été déterminées à l'aide d'un électroporateur BioRad dans des cuvettes de 4 mm à des voltages variant de 0 à 350 V inclusivement. Deux millions de cellules ont été électroporées avec 1- 25 μg d'ADN plasmidique qui exprime un gène de résistance (puromycine (*Puro*), hygromycine (*Hyg*), néomycine (*Néo*)). Suite à l'électroporation, les cellules ont été incubées à température ambiante pendant 10 minutes avant d'êtreensemencées dans du milieu complet. 48 heures plus tard, l'antibiotique a été ajouté aux cellules qui ont été cultivées pendant 15 jours dans ce milieu de sélection, en changeant le milieu tous les 3 ou 4 jours. Les colonies résistantes ont été fixées et colorées avec une solution de cristal violet (3% formaldéhyde, 4% acide acétique et 1% cristal violet dans l'éthanol 70%), afin de les compter. Les cellules CAPAN-1 se transfectent efficacement à 350 V.

2.3 Construction de vecteurs

Les vecteurs ont été construits en utilisant les techniques classiques de biologie moléculaire (Current Protocol in Molecular Biology, sections 3.1, 3.5, 3.10 et 3.14) et en suivant les recommandations des fournisseurs d'enzymes (NEB, Amersham). Les extrémités franches ont été générées à partir d'extrémités 3' récessives avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *Escherichia coli* (NEB). La T4 DNA ligase (NEB) a été utilisée pour unir les fragments. Les fragments d'ADN provenant des diverses digestions enzymatiques ont été récupérés par électroélution à partir du gel d'agarose 0,7%. L'électroélution consiste en l'excision des fragments voulus du gel d'agarose suivie d'une centrifugation sur laine de silicone. Les fragments

d'ADN sont ensuite précipités à l'éthanol 95% et rincés à l'éthanol 70% pour éliminer les sels, avant d'être resuspendus dans l'eau.

Après traitement à la ligase, l'ADN a été introduit dans des bactéries *Escherichia coli* électrocompétentes de souche *sure cells*. Ces bactéries sont déficientes pour la RH. L'électroporation a été faite à 2500 V, 200 Ω et 21 μ F dans des cuvettes de 2 mm (Bio Rad). Les bactéries électroporées ont été ressuspendues dans 1 mL de milieu SOC, incubées pendant une heure à 37°C avec agitation, étalées sur des géloses solides de Luria Broth contenant 0,7% d'agar et 50 μ g/mL d'ampiciline (Wisent) puis incubées toute la nuit à 37°C.

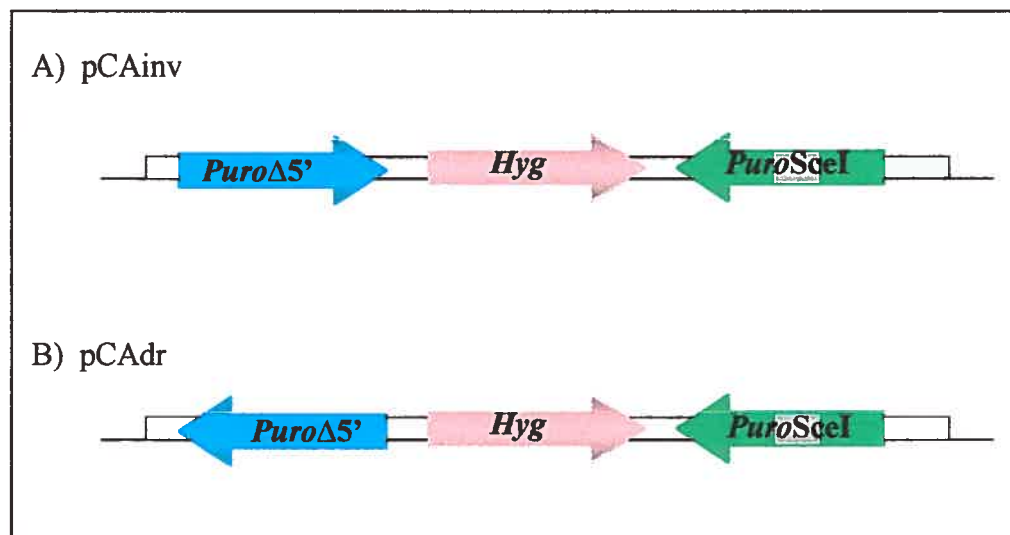
Les colonies bactériennes ont été analysées pour la présence du vecteur voulu selon deux techniques : le cracking gel, où l'ADN plasmidique est extrait rapidement des bactéries à l'aide d'un tampon (0,05M Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 2mM EDTA, 0,4M sucrose, bleu de bromophénol), et la méthode de Grunstein & Hogness, où les colonies sont transférées sur membranes de nylon et hybridées avec une sonde radioactive (Grunstein and Hogness, 1992). L'ADN plasmidique a été extrait par lyse alcaline des colonies identifiées (Birboim, 1983; Birboim and Doly, 1979), analysé par des enzymes de restrictions, et visualisé sur gel d'agarose 0,7%. Pour une transfection optimale des cellules, l'ADN plasmidique a été purifié à l'aide d'un kit d'extraction en suivant les recommandations du fabricant (Qiagen).

2.3.1 Construction de pCAinv et pCAAdr

La construction des plasmides pCAinv et pCAAdr s'est faite en plusieurs étapes. Les plasmides ont pour squelette le vecteur pUC19 (NEB) et contiennent deux copies non fonctionnelles du gène *Puro*. La copie *Puro*Scel contient le site de reconnaissance de la méganucléase I-SceI, tandis que la copie *Puro* Δ 5' est tronquée dans la région 5' du gène. Les deux copies sont séparées

par le gène *Hyg*. L'orientation de *Puro* Δ 5' distingue les deux plasmides : elle est en répétition inversée avec la copie *Puro*SceI dans pCAinv, et directe dans pCAdr (inv pour inverse et dr pour directe) (figure 8).

Figure 8: Représentation schématique des plasmides rapporteurs. A) pCAinv. B) pCAdr. *Puro* Δ 5' en bleu: une copie du gène *Puro* non fonctionnelle tronquée dans la région 5'. *Hyg* en rose: le gène de l'hygromycine. *Puro*SceI en vert et blanc: une copie du gène *Puro* non fonctionnelle contenant une délétion de 3 pb qui a été remplacée par le site de la méganucléase I-SceI. L'orientation du *Puro* Δ 5' différencie les deux vecteurs.



Le gène *Hyg* a été excisé du vecteur pCEP4 (Invitrogen) à l'aide des enzymes *Sa*I et *Nru*I (position 1316 et 3180 respectivement) puis introduit dans le site *Xba*I de pUC19 (position 423) pour générer le plasmide pUCHyg (figure 9 a). Le gène *Puro* Δ 5' a été excisé du vecteur pGK*Puro* à l'aide des enzymes *Bst*EII et *Hinc*II (position 723 et 1738 respectivement) puis introduit dans les deux orientations dans le plasmide pUCHyg au site *Acc*65I à la position 408 de pUC19 afin de générer les plasmides pUCHyg*Puro* Δ 5'i et pUCHyg*Puro* Δ 5'd (figure 9 b et c).

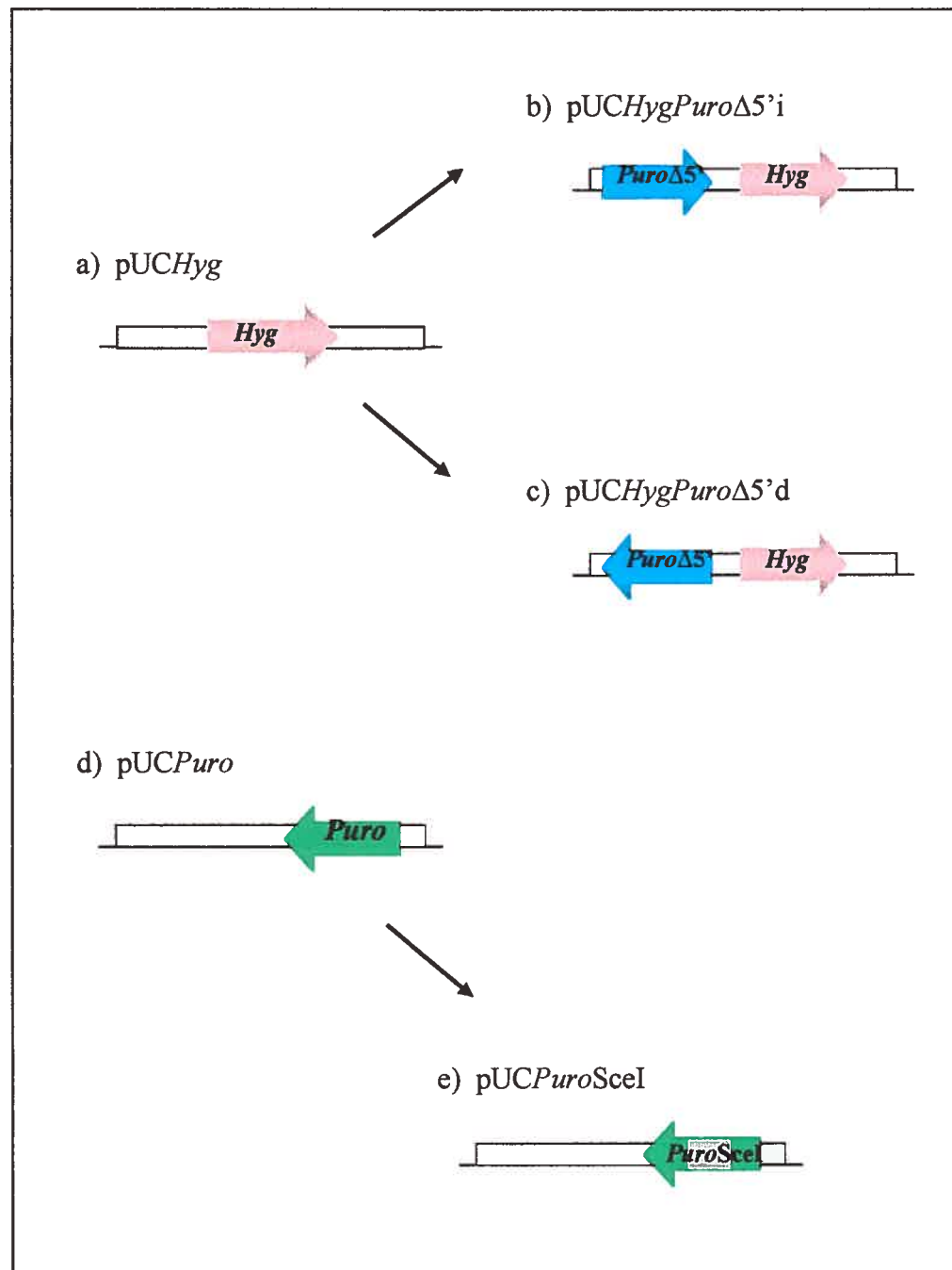


Figure 9: Représentation schématique des intermédiaires de pCAInv et pCAAdr.
 a) Le plasmide pUCHyg dans lequel le gène de la puromycine délété en 5' (*PuroΔ5'*) a été inséré pour générer les plasmides pUCHygPuroΔ5'i (b) et pUCHygPuroΔ5'd (c). d) Le plasmide pUCPuro dans lequel l'endonucléase I-SceI a été introduite pour générer le plasmide pUCPuroScel (e).

Le gène *Puro* a été excisé du vecteur pGK*Puro* par l'enzyme *SalI* (position 35 et 1738) puis introduit dans le site *SalI* du vecteur pUC19 (position 429) pour obtenir le plasmide pUC*Puro* (figure 9 d). Le site de reconnaissance de la méganucléase I-*SceI* a été introduit dans le plasmide pUC*Puro*, entre les sites *BssHIII* et *EagI* (position 1036 à 1049 respectivement), pour générer le plasmide pUC*PuroSceI* (figure 9 e). Le gène *PuroSceI* a été excisé de pUC*PuroSceI* à l'aide de l'enzyme *SalI* afin de l'insérer dans le site *SalI* des plasmides pUCHyg*Puro*Δ5'i et pUCHyg*Puro*Δ5'd de manière à obtenir pCAinv et pCAdr (figure 8).

2.3.2 Analyse des plasmides pCAinv et pCAdr

En plus d'une analyse exhaustive par des enzymes de restrictions, les vecteurs pCAinv et pCAdr, ainsi que chacune de leurs composantes, ont été analysés fonctionnellement par transfection dans les cellules HCT116. Les HCT116 sont déficientes dans le gène *MLH1* du système de réparation des bases mal appariées, mais permettant la RH (Villemure and Belmaaza, 1999). Le tableau II montre que le gène *Hyg* est fonctionnel, que les gènes *PuroSceI* et *Puro*Δ5' ne confèrent pas une résistance à l'antibiotique puromycine et que les plasmides pCAinv et pCAdr sont recombino-gènes, puisque nous obtenons des colonies puromycine résistantes (*Puro*^R) suite à l'induction de la CDB par l'enzyme de restriction I-*SceI*.

2.4 Établissement et analyse des clones cellulaires parentaux

Les vecteurs pCAinv et pCAdr linéarisés avec l'enzyme de restriction *AhdI* ont été électroporés dans la lignée cellulaire CAPAN-1. Les cellules transfectées ont été maintenues pendant quatre semaines dans l'hygromycine. Les clones hygromycine résistants (*Hyg*^R) ont été repiqués et amplifiés

individuellement pour l'analyse par Southern Blot et par réaction de polymérase en chaîne (PCR).

Tableau II. Analyse fonctionnelle des constructions plasmidiques dans les cellules HCT116.

Plasmide	Puro ^R	Hyg ^R
pUCPuro	111	NA
pUCPuroSceI	0	NA
pUCHygPuro Δ 5'i	0	17
pUCHygPuro Δ 5'd	0	2
pCAinv	ND	9
pCAinv/AhdI	ND	52
pCAinv/SceI	32	ND
pCAAdr	ND	20
pCAAdr/AhdI	ND	7
pCAAdr/SceI	22	ND

Les résultats indiqués représentent la moyenne de deux transfections (ou de six transfections pour pCAinv/SceI et pCAAdr/SceI).

NA : non applicable

ND : non déterminé

2.4.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique des cellules a été faite selon la méthode de *salting out* (Current protocols in molecular biology, section 2.2). Les cellules ont été rincées au PBS puis incubées pendant 10 minutes avec un tampon de lyse (1 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM NaCl, 10 % Sarkosyl et 10 mg/mL protéinase K (Gibco)). Les cellules ont ensuite été transférées dans un eppendorf et incubées toute la nuit à 56°C. L'ADN a été purifié par des extractions au phénol-chloroforme, précipité avec de l'éthanol 95% et récupéré

à l'aide d'une tige de verre. Les sels présents dans l'ADN ont été éliminés par rinçages à l'éthanol 70% et 95% respectivement. L'ADN séché à l'air a été resuspendu dans du TE (1 mM EDTA pH8,0; 10 mM Tris-HCl pH 7,6) contenant 300 µg/mL de RNase A (Boehringer-Mannheim).

2.4.2 Southern Blot

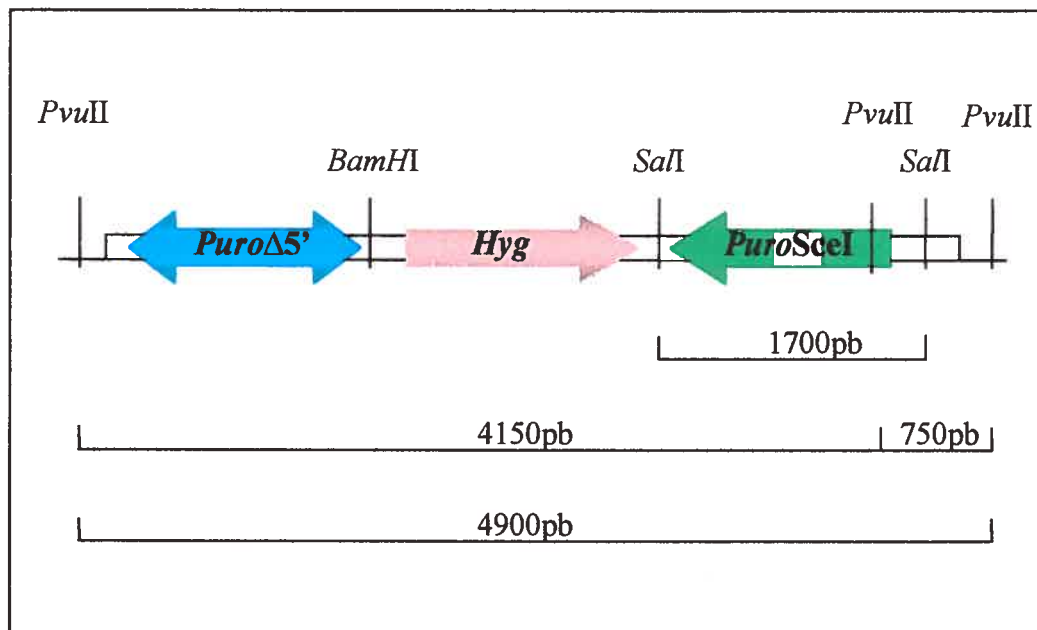
De 10 à 20 µg d'ADN génomique ont été digérés avec des enzymes de restriction (*PvuII*, *SalI* ou *BamHI*) qui reconnaissent des sites uniques dans le vecteur et avec un enzyme de restriction (*XbaI*) qui coupe plusieurs fois dans le génome sans toutefois couper le vecteur (figure 10). L'ADN digéré a ensuite été migré sur un gel d'agarose 1%, dénaturé dans une solution de 0,4 M NaOH/1,5 M NaCl, puis transféré sur une membrane de nylon chargé positivement (Hybond N+, Amersham). La membrane a ensuite été incubée 3 heures à 68°C avec la solution d'hybridation (4,5X SSC, 7,6% formamide, 1,5 mM EDTA, 0,8 % lait écrémé, 8% sulfate dextran, 0,8% SDS, 10 mg ADN de sperme de saumon). Par la suite, une sonde marquée au P³² a été ajoutée à la solution d'hybridation et incubée 16 heures à 68°C. Le lendemain, suite aux nombreux lavages avec des solutions de 1X SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium) et 0,3X SSC (45 mM NaCl, 4,5 mM citrate de sodium) contenant 1% de SDS, la membrane a été exposée à un film à rayon-X.

2.4.3 PCR

Les clones parentaux ont aussi été analysés par PCR à l'aide de trois paires d'amorces : pUC469 (5'-TGACCATGATTACGCCAAGCT-3') et hyg4419 (5'-GCTGTGTAGAAGTACTCGCCG-3') amplifient un fragment de 2324 pb, pUC315 (5'-AAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGA-3') et hyg1891 (5'-CGGCGAGTACTTCTACACAGC-3') amplifient un fragment de 2412 pb, et pUC469 et pUC315 amplifient un fragment de 4736 pb. Les réactions de PCR

ont été effectuées sur 400 ng d'ADN génomique avec 200 μ M dNTP, 2,5% DMSO, 1,5 mM $MgCl_2$, 100 ng de chaque amorce, le tampon et 2,6 unités de l'ADN polymérase de la trousse *Expand High Fidelity PCR System* (Boehringer Mannheim). La réaction de PCR a été accomplie selon le programme suivant : 2 minutes de dénaturation à 95°C, 30 cycles d'amplification incluant une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'appariement d'une minute à 56°C et une étape de synthèse d'une minute à 72°C. Une période de synthèse d'ADN de 10 minutes à 72°C permet de finaliser les réactions amorcées. Les produits de PCR sont par la suite analysés sur gel d'agarose 0,7%.

Figure 10: Représentation schématique de l'analyse par Southern Blot des plasmides pCAinv et pCAAdr. Les enzymes indiquées génèrent les fragments attendus d'une copie intacte. L'enzyme *Bam*HI qui coupe une seule fois dans le plasmide a permis de déterminer le nombre de copie. Les fragments ont été révélés par des sondes puromycine et hygromycine.



2.5 Complémentation des clones parentaux avec BRCA2

Les clones parentaux ont été transfectés avec le plasmide pCDNA3 β HA/BRCA2 (Chen et al., 1998a) linéarisé avec l'enzyme de restriction *PvuI* à l'aide de la trousse *Effectene Transfection Reagent* (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Ce plasmide contient l'ADNc de BRCA2, l'épitope HA (hémagglutinine) et le gène *Néo* codant pour la résistance au G418. Les cellules transfectées ont été maintenues en sélection pendant 3 semaines dans le G418 et les clones résultants (G418^R) ont été repiqués et amplifiés individuellement.

2.5.1 Extraction de l'ARNm

L'ARNm a été extrait des cellules à l'aide du Trizol (Invitrogen) et du chloroforme, précipité avec de l'isopropanol, et rincé à l'éthanol 70% pour éliminer les sels. L'ARNm a finalement été resuspendu dans 50 μ L d'eau.

2.5.2 RT-PCR

L'ARNm a été transcrit en ADNc à l'aide de la reverse transcriptase (RT) et des amorces (hexamères) de la trousse *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) en suivant les recommandations du fournisseur. La réaction de PCR a été accomplie en utilisant 2 μ L d'ADNc avec 200 μ M dNTP, 3,5 mM MgCl₂, 10 μ M de chaque amorce, le tampon et 2,6 unités de l'ADN polymérase de la trousse *Expand High Fidelity PCR System* (Boehringer Mannheim). La réaction de PCR a été accomplie selon le programme suivant : 5 minutes de dénaturation à 94°C, 30 cycles d'amplification incluant une étape de dénaturation d'une minute à 94°C, une étape d'appariement d'une minute à 67,5°C et une étape de synthèse de deux minutes à 72°C. Les amorces utilisées pour les réactions de PCR sont

brca2Fwt (5'-GGGATTTTTAGCACAGCAAGTG-3') et brca2R6983 (5'-GAATGTGTGGCATGACTTGG-3') qui amplifient un fragment de 829 pb, et 18sF (5'-TGAGGCCATGATTAAGAGGG-3') et 18sR (5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG-3') qui amplifient un fragment de 642 pb.

2.5.3 Extraction des protéines

Les cellules ont été centrifugées, et après ajout du tampon de lyse contenant du SDS (62,5 M Tris-HCl pH 6,8, 6 M urée, 10% glycérol, 2% SDS) et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 1,5 µg/mL aprotinine, 1 µg/mL leupeptine, 1 µg/mL pepstatine), les culots ont été soniqués. Alternativement, les culots de cellules ont été incubés 45 minutes sur glace dans un tampon de lyse contenant du Triton (20 mM Tris-HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0,1% SDS) et les mêmes inhibiteurs de protéases pour permettre la lyse, puis centrifugés pour récupérer les protéines dans le surnageant.

2.5.4 Technique de transfert de Western

Les protéines extraites (50 µg) ont été séparées selon leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide 5% dénaturant (29 acrylamide:1 bis) pendant 20 heures (3 heures à 60V et 17 heures à 35V), puis transférées par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) pendant 4 heures à 60V selon le protocole de Sambrook, Fritsh et Manniatis (chapitre 18). La protéine BRCA2 (384 kDa) a été détectée par chemiluminescence (Amersham) avec un anticorps polyclonal anti-BRCA2 (Ab2; Oncogene) et un anti-anticorps couplé à la peroxidase (Oncogene). Des extraits protéiques des lignées cellulaires BRCA2^{+/+}, MCF7 et CAPAN-2, qui proviennent d'un cancer du sein et d'un adénocarcinome du pancréas respectivement, ont été utilisés comme contrôles positifs. Alternativement, la protéine BRCA2 couplée à l'épitope HA a été

détectée avec un anticorps monoclonal anti-HA et un anti-anticorps couplé à la peroxidase (Oncogene). Comme contrôle positif pour l'anti-HA, une protéine couplée à l'épitope HA d'environ 32 kDa, a été ajoutée au gel une heure avant la fin de la migration.

2.6. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires

Les cellules ont été centrifugées, et les culots ont été incubés 30 minutes sur glace dans un tampon de lyse contenant du NP40 (0,5% NP40, 50 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 100 μM sodium vanadate, 5 mM NaF) et des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 1,5 μg/mL aprotinine, 1 μg/mL leupeptine, 1 μg/mL pepstatine) puis centrifugés pour récupérer la fraction cytoplasmique dans le surnageant. Le nouveau culot, qui contient les noyaux, a été lavé avec le même tampon de lyse, mais en absence de NP40. La pureté des noyaux a été visualisée au microscope avant de procéder à la lyse nucléaire avec un tampon contenant du SDS, comme décrit à la section 2.5.3.

2.6.1 Localisation cytoplasmique et nucléaire de RAD51

Les protéines (25 μg) de la fraction cytoplasmique et nucléaire ont été séparées sur un gel de polyacrylamide 9% dénaturant (29 acrylamide:1 bis) puis transférées par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) selon le protocole de Sambrook, Fritsh et Manniatis (chapitre 18). La protéine RAD51 (37 kDa) a été détectée par chemiluminescence (Amersham) avec un anticorps monoclonal anti-RAD51 (Ab2; Oncogene) et un anti-anticorps couplé à la peroxidase (Oncogene). Des extraits cytoplasmiques et nucléaires de la lignée cellulaire BRCA2^{+/+} HCC1937 qui provient d'un cancer du sein BRCA1-déficiente ont été utilisés comme contrôle positif.

2.7 Fréquence et taux de recombinaison homologue

Les colonies Puro^R (recombinantes) ont été fixées et colorées avec une solution de cristal violet (3% formaldéhyde, 4% acide acétique et 1% cristal violet dans de l'éthanol 70%). La fréquence de ces événements a été déterminée en divisant le nombre de colonies Puro^R par le nombre de cellules mises en culture en présence de la puromycine. Les événements de recombinaison entre les répétitions directes (pCA_{dr}) peuvent déléter le gène *Hyg*. Ainsi, pour détecter ces événements, les cellules ont été maintenues dans un milieu sans hygromycine pendant deux semaines avant l'ajout de la sélection puromycine.

La fréquence ne mesure pas les événements de recombinaison indépendants qui peuvent s'amplifier durant la division cellulaire puisqu'elle permet de déterminer le nombre d'événements de recombinaison qui sont déjà présents à l'intérieur d'une population définie de cellules. Par contre, le taux mesure le nombre d'événements de recombinaison/ par cellule/ par génération puisqu'il se calcule à partir d'une population de cellules qui ne contient aucun recombinant au départ; les recombinants s'acquièrent (s'amplifient) au fur et à mesure que la population cellulaire croît. Ainsi, pour déterminer le taux, un sous-clone (100 à 1000 cellules) de chaque clone a étéensemencé de 10 à 15 fois dans une plaque de 24 puits et amplifié jusqu'à ce qu'il soit confluent dans un pétri 100 mm. Lorsque confluentes, les cellules ont été comptées et mises en sélection dans la puromycine afin de déterminer la fréquence de recombinaison pour chaque sous-clone.

Le taux se calcule en utilisant les fréquences des 10 à 15 sous-clones selon la formule décrite par Luria et Delbrück (Luria et Delbrück, 1943) et modifiée par Capizzi et Jameson (Capizzi and Jameson, 1973) : $Cr = CaN_i \ln (CaN_i)$, où r = nombre de recombinants Puro^R (moyenne des sous-clones), a = taux

(nombre recombinants/ par cellule/ par génération), N_t = nombre de cellules avant ajout de la sélection puromycine (moyenne des sous-clones) et C = nombre de sous-clones analysé. Capizzi et Jameson ont utilisé un programme informatique pour écrire sous forme de tableaux les valeurs de CaN_t en fonction de Cr , pour des valeurs de Cr allant de 1 à 9800 (Capizzi and Jameson, 1973). Ainsi, connaissant les valeurs de r , N_t et C , le produit Cr est formé, et la valeur correspondante de CaN_t est trouvée dans les tableaux de Capizzi et Jameson afin de déterminer le taux selon la formule suivante : $a = CaN_t/CN_t$ (Capizzi and Jameson, 1973).

2.8 Induction de la cassure double brin

La cassure double brin a été induite au site I-SceI par la transfection d'un vecteur (p β actineSceI) qui exprime la méganucléase I-SceI. Le vecteur p β actineSceI a été co-transfecté avec un plasmide (pFRED25) exprimant GFP (*Green Fluorescent Protein*) à l'aide du réactif fugene 6 (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fournisseur afin de déterminer l'efficacité de la transfection. Parallèlement, le plasmide GFP a été co-transfecté avec un vecteur contrôle (pSGnéo) afin de déterminer l'efficacité de l'induction de la cassure par I-SceI. Entre 7 et 10 jours après la transfection, les cellules ont été mises en sélection en présence de la puromycine pour sélectionner les recombinants (Puro^R). La fréquence de RH spontanée est calculée en divisant le nombre de colonies Puro^R sur le nombre de cellules co-transfectées (pSGnéo/pFRED25) qu'il y avait avant ajout de la sélection puromycine. Alors que la fréquence de RH induite par la cassure est calculée en divisant le nombre de colonies Puro^R sur le nombre de cellules co-transfectées (p β actineSceI/pFRED25) qu'il avait avant ajout de la sélection puromycine. Finalement, pour tenir compte de l'efficacité de transfection, la fréquence de RH induite par la cassure a également été calculée en divisant le

nombre de colonies Puro^R sur le nombre de cellules co-transfectées (p β actineScel/pFRED25) exprimant GFP. Dans ce cas, le nombre de colonies Puro^R obtenues suite à la co-transfection GFP/I-Scel a été corrigé en fonction du nombre de clones Puro^R obtenus suite à la co-transfection GFP/pSGnéo, puisque toutes les cellules sont capables de faire de la RH spontanée.

2.9 Analyse des recombinants

Les événements de recombinaison obtenus avec les plasmides pCAinv et pCAAdr ont été analysés par PCR en utilisant les mêmes amorces et les mêmes conditions décrites à la section 2.4.3.

**CHAPITRE 3:
RÉSULTATS**

3. Résultats

3.1 Approche expérimentale

Afin de caractériser le rôle de *BRCA2* dans la RH et le maintien de la stabilité du génome, nous avons analysé l'effet de l'expression d'un *BRCA2* sauvage sur la fonction et la localisation cellulaire de RAD51 dans les cellules CAPAN-1 *BRCA2*-déficientes. Les cellules CAPAN-1 proviennent d'un cancer de l'épithélium du pancréas humain et expriment une protéine BRCA2 tronquée en C-terminal à cause d'une délétion d'une thymine à la position 6174, une mutation fréquente dans la population juive (figure 11) (Goggins et al., 1996). Les cellules CAPAN-1 ne réparent pas les CDB induites par une RI et sont hypersensibles aux agents qui produisent des CDB, tels que la mitoxantrone, l'amsacrine et l'étoposide (Abbott et al., 1998). Avant tout, nous avons établi des lignées (clones) CAPAN-1 distinctes contenant dans leur génome un plasmide rapporteur, soit pCAinv ou pCAAdr (figure 12). Les deux plasmides contiennent deux copies non fonctionnelles du gène *Puro* en orientation inversée (pCAinv) ou dans la même orientation (pCAAdr). Un événement de RH reconstitue un *Puro* fonctionnel qui confère aux cellules la résistance à l'antibiotique puromycine. L'emploi des deux orientations nous permettra tout d'abord de tester l'hypothèse voulant que BRCA2 contrôle la résolution de la jonction de Holliday (figure 7), et de déterminer le mécanisme qui engendre les délétions entre les répétitions directes qui augmentent en absence d'un *BRCA2* fonctionnel (Larminat et al., 2002; Tutt et al., 2001).

3.1.1 Établissement de clones cellulaires CAPAN-1 stables

Les cellules CAPAN-1 ont été électroporées indépendamment avec les plasmides pCAinv et pCAAdr linéarisés par *AhdI* et soumises à la sélection hygromycine. Les colonies Hyg^R ont été repiquées, amplifiées dans du milieu

contenant de l'hygromycine, et leur ADN génomique a été extrait et analysé par Southern Blot afin de déterminer le nombre de copies et la structure des plasmides. Une intégration simple facilitera l'analyse de la structure des recombinants par PCR (figure 13). Parmi plusieurs clones Hyg^R stables analysés, seulement trois clones intacts contiennent une intégration unique: deux avec pCAdr (d2 et d26) et un avec pCAinv (i10). Les CAPAN-1 poussent très lentement et se sont avérées extrêmement difficiles à transfecter, même en changeant les conditions d'électroporation, en purifiant l'ADN plasmidique ou en changeant de technique de transfection comme la lipofectamine, l'effectene ou le calcium-phosphate. Cette faible efficacité de transfection des CAPAN-1 a également été rapportée par d'autres études (Chen et al., 1998b; Moynahan et al., 2001; Wang et al., 2002).

Figure 11: Représentation schématique de la protéine BRCA2 mutée dans les cellules CAPAN-1. Dans les CAPAN-1, BRCA2 contient un seul allèle muté, l'autre étant délété. L'allèle muté contient une délétion d'une thymine à la position 6174 à l'intérieur du motif BRC7.

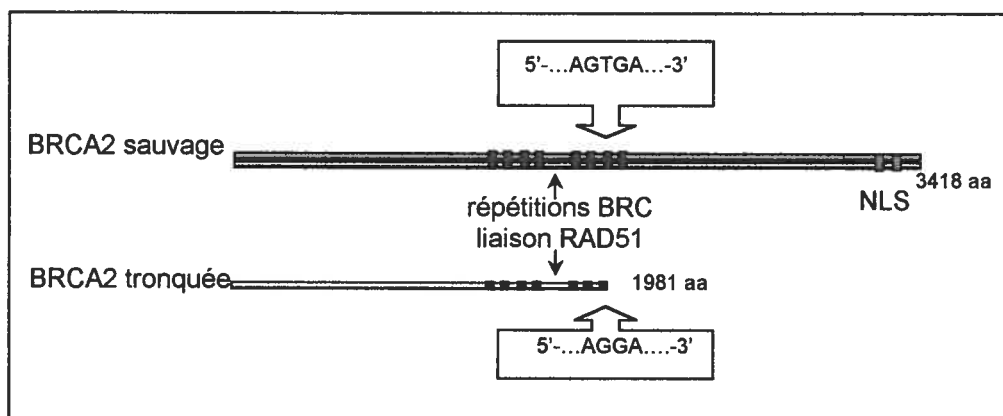


Figure 12: Représentation schématique de l'approche expérimentale.

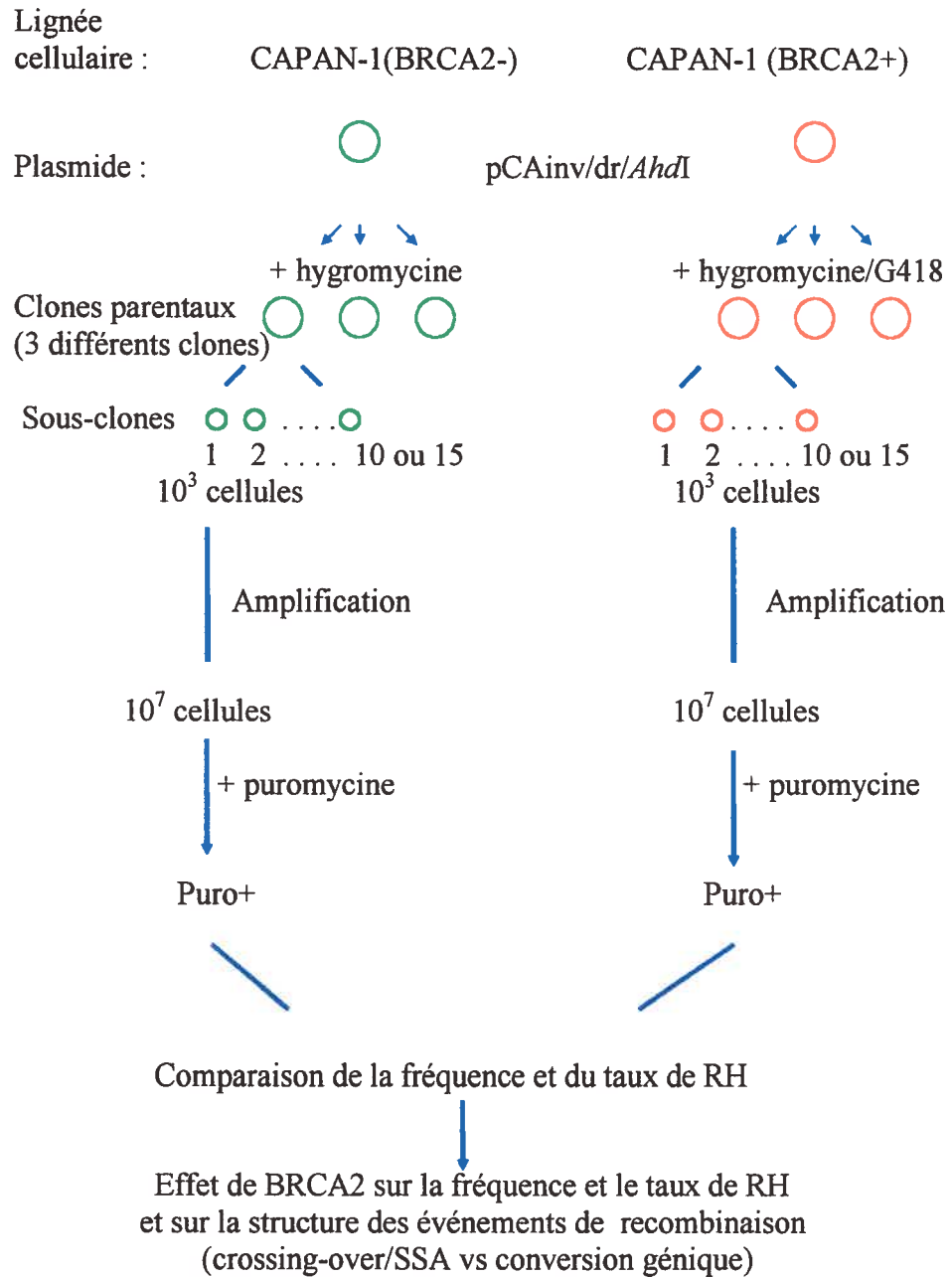
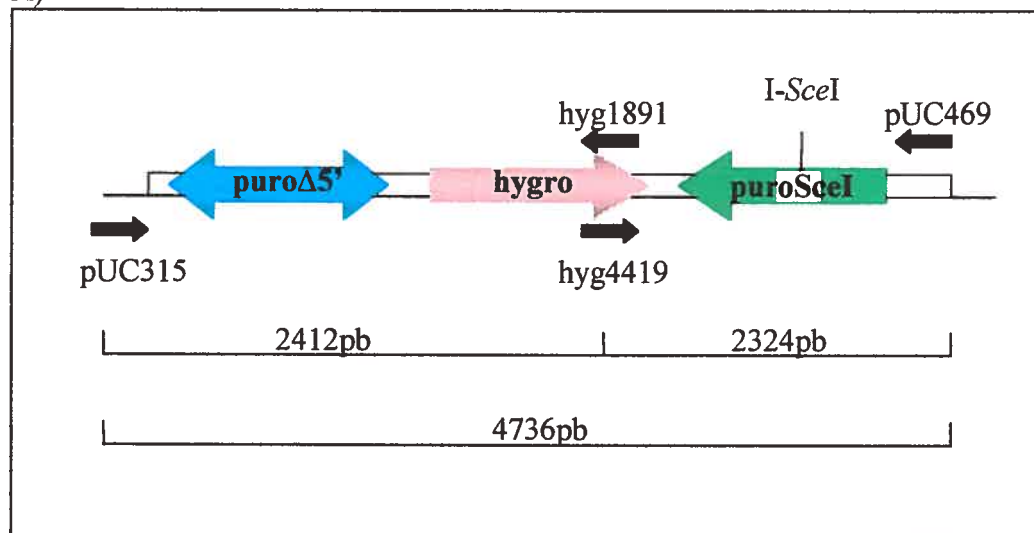
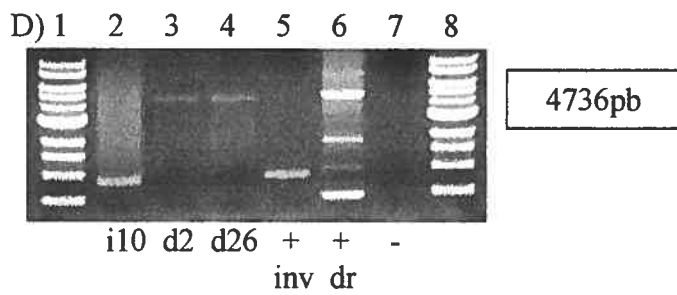
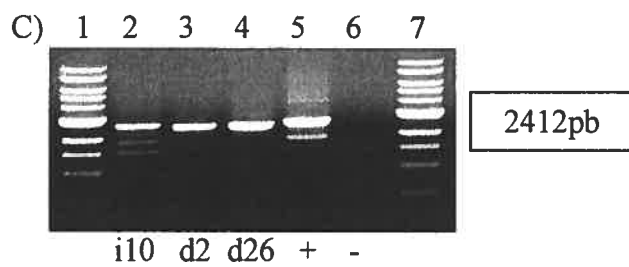
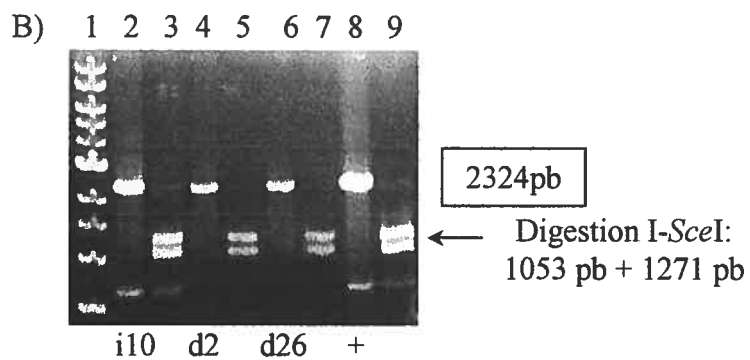


Figure 13: Analyse des clones parentaux par PCR. A) Représentation schématique des plasmides pCAinv et pCAdr avec la taille du fragment amplifié pour chaque paire d'amorce utilisée (flèches noires). B) Analyse des clones parentaux avec les amorces pUC469 et hyg4419 qui amplifient un fragment de 2324 pb. Ligne 1 : marqueur de poids moléculaire (du bas vers le haut: 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 kb). Lignes 2, 4 et 6 : clones parentaux i10, d2 et d26 respectivement. Ligne 8 : contrôle positif; pCAinv avant intégration. Lignes 3, 5, 7 et 9 : digestion par l'endonucléase I-SceI du fragment de 2324 pb des clones parentaux i10, d2, d26 et du contrôle positif respectivement. C) Analyse des clones parentaux avec les amorces pUC315 et hyg1891 qui amplifient un fragment de 2412 pb. Lignes 2, 3 et 4 : clones parentaux i10, d2 et d26 respectivement. Ligne 5 : contrôle positif; pCAinv avant intégration. Ligne 6 : contrôle négatif; réaction de PCR sans ADN. D) Analyse des clones parentaux avec les amorces pUC469 et pUC315 qui amplifient un fragment de 4736 pb. Lignes 2, 3 et 4 : clones parentaux i10, d2 et d26 respectivement. Lignes 5 et 6 : contrôle positif avec pCAinv et pCAdr avant intégration respectivement. Ligne 7 : contrôle négatif; réaction de PCR sans ADN. Cette paire d'amorce ne fonctionne pas avec pCAinv, possiblement à cause de la formation des structures secondaires qui bloquent la polymérisation. Le signal dans les lignes 3 (d2) et 4 (d26) est plus faible que celui du contrôle positif (ligne 6) car l'ADN des clones parentaux d2 et d26 était moins concentré que celui du contrôle positif lors de la réaction de PCR.

A)





3.1.2 Complémentation des clones parentaux avec BRCA2

Les trois clones parentaux i10, d2 et d26 ont été transfectés avec un plasmide portant l'ADNc de *BRCA2* fusionné à un épitope HA et le gène *Néo* qui confère aux cellules une résistance à l'antibiotique G418. Les clones G418^R ont été analysés pour l'expression de *BRCA2* par RT-PCR en utilisant une amorce (brca2Fwt) spécifique au type sauvage, soit au niveau du nucléotide T délété dans le *BRCA2* endogène des CAPAN-1 (figure 11). La deuxième amorce (brca2R6983) se lie un peu plus loin dans la séquence de *BRCA2*.

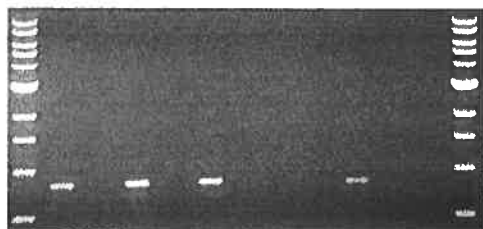
L'analyse de 200 clones G418^R n'a révélé que 3 clones i10 (i10/B29, i10/B33, i10/B49), 2 clones d2 (d2/B43, d2/B74), et 3 clones d26 (d26/B6, d26/B12, d26/B21) expriment l'ARNm de *BRCA2* (figure 14). L'expression de la protéine *BRCA2* dans les clones complémentés i10/B29, i10/B33, i10/B49, d2/B43, d2/B74, d26/B6, d26/B12 et d26/B21 a été confirmée par Western Blot en utilisant un épitope HA. Un exemple de cette analyse est illustré à la figure 15.

3.2 Localisation cellulaire de la protéine RAD51

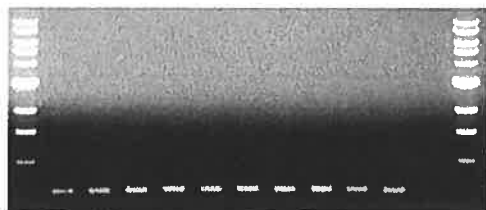
Des études antérieures faites avec les CAPAN-1 ont suggéré que *BRCA2* transporte *RAD51* du cytoplasme au noyau (Davies et al., 2001; Venkitaraman, 2001a). Pour confirmer cette hypothèse, nous avons analysé la localisation cellulaire de *RAD51* avant et après expression de *BRCA2* dans les CAPAN-1. Contrairement aux cellules CAPAN-1 où *RAD51* est majoritairement cytoplasmique (Davies et al., 2001), les clones complémentés avec *BRCA2* i10/B29, i10/B49 et d2/B74 montrent la présence de *RAD51* dans le noyau (figure 16). Par contre, le clone complémenté avec *BRCA2* d2/B43 est similaire au clone parental d2, démontrant une localisation fortement cytoplasmique (figure 16).

Figure 14 : Analyse de l'expression de BRCA2 par RT-PCR. L'ARNm a été transcrit en ADNc par RT, et soumis au PCR pour les clones CAPAN-1 parentaux G418^R i10 (a), d2 (b) et d26 (c). Gels du haut : les amorces brca2Fwt et brca2R6983 amplifient un fragment de 829 pb de l'ADNc de BRCA2. Gels du bas, contrôle positif pour la RT-PCR : les amorces 18sF et 18sR amplifient un fragment de 642 pb de l'ADNc de la 18s. Les numéros représentent les clones CAPAN-1 G418^R. Lignes aux deux extrémités: marqueur de poids moléculaire (du bas vers le haut: 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 kb). M: contrôle positif; la lignée cellulaire MCF7 (BRCA2^{+/+}). C : contrôle négatif; la lignée cellulaire CAPAN-1 BRCA2-déficiente. Ctl- : contrôle négatif; réaction de PCR sans ADNc.

a) M C 29 32 33 38 45 47 49 63 ctl-



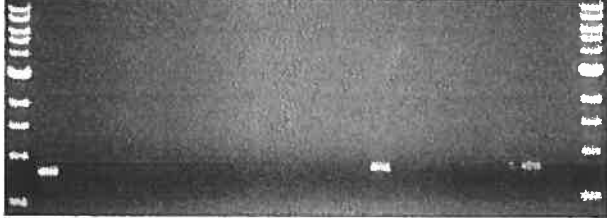
BRCA2: 829pb



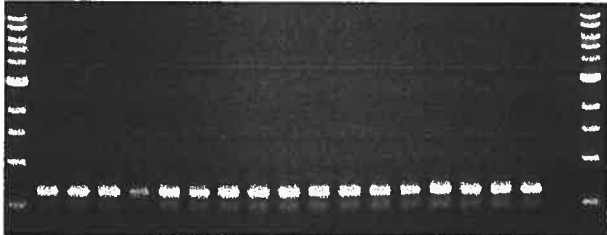
18S: 642pb

M C 29 32 33 38 45 47 49 63 ctl-

b) M C 3 6 9 16 19 25 32 34 40 43 46 49 50 61 74 ctl-



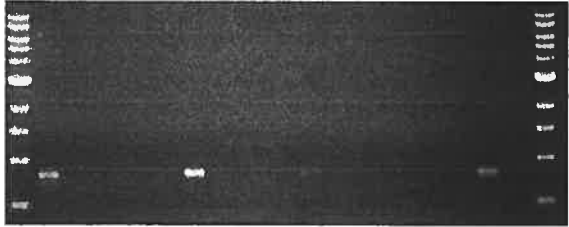
BRCA2: 829pb



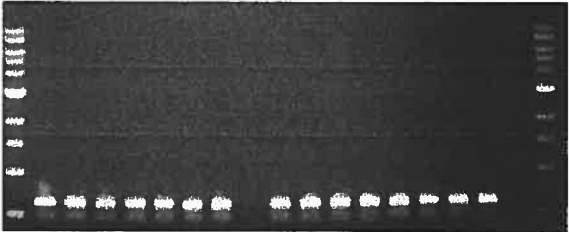
18S: 642pb

M C 3 6 9 16 19 25 32 34 40 43 46 49 50 61 74 ctl-

c) M C 1 3 5 6 7 9 10 12 13 14 16 17 20 21ctl-



BRCA2: 829pb



18S: 642pb

M C 1 3 5 6 7 9 10 12 13 14 16 17 20 21 ctl-

Figure 15 : Expression de la protéine BRCA2 dans les clones CAPAN-1 G418^R.

A) Expression de BRCA2 endogène dans les lignées cellulaires MCF7 (BRCA2^{+/+}), CAPAN-2 (BRCA2^{+/+}), et CAPAN-1 exprimant un BRCA2 tronqué en C-terminal. La protéine BRCA2 (384 kDa) a été détectée à l'aide d'un anticorps anti-BRCA2 contre la partie C-terminale de BRCA2. M : marqueur de poids moléculaire de 250 kDa.

B) Expression de BRCA2 couplée à l'épitope HA dans les clones CAPAN-1 complémentés i10/B29 et i10/B49. La protéine HA-BRCA2 (384 kDa) a été détectée à l'aide d'un anticorps anti-HA. Ctl + : contrôle positif pour l'épitope HA, soit une protéine de 32 kDa couplée à l'épitope HA visualisée entre 250 et 384 kDa car sa migration a débuté après celle des échantillons. Contrôle négatif : CAPAN-1 qui n'expriment pas l'épitope HA.

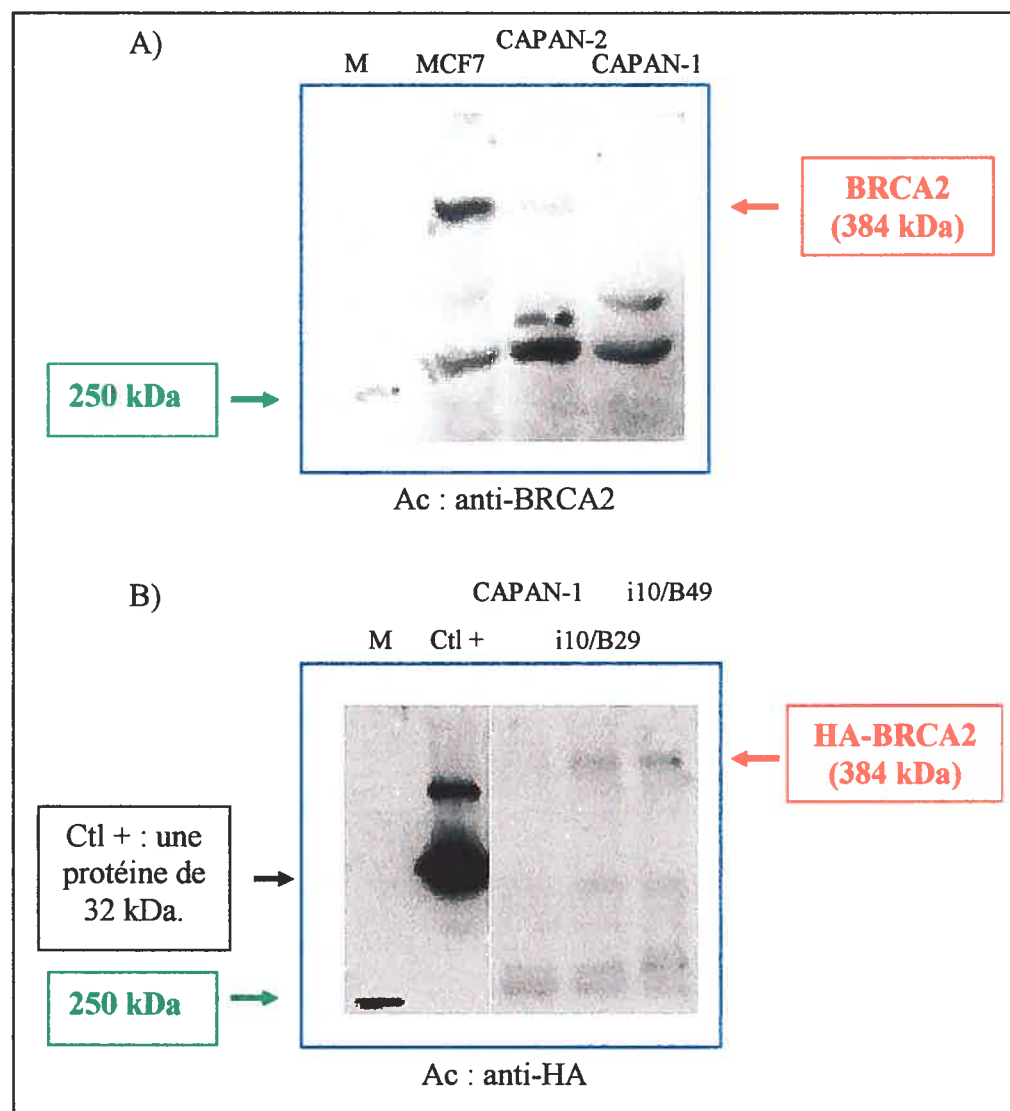
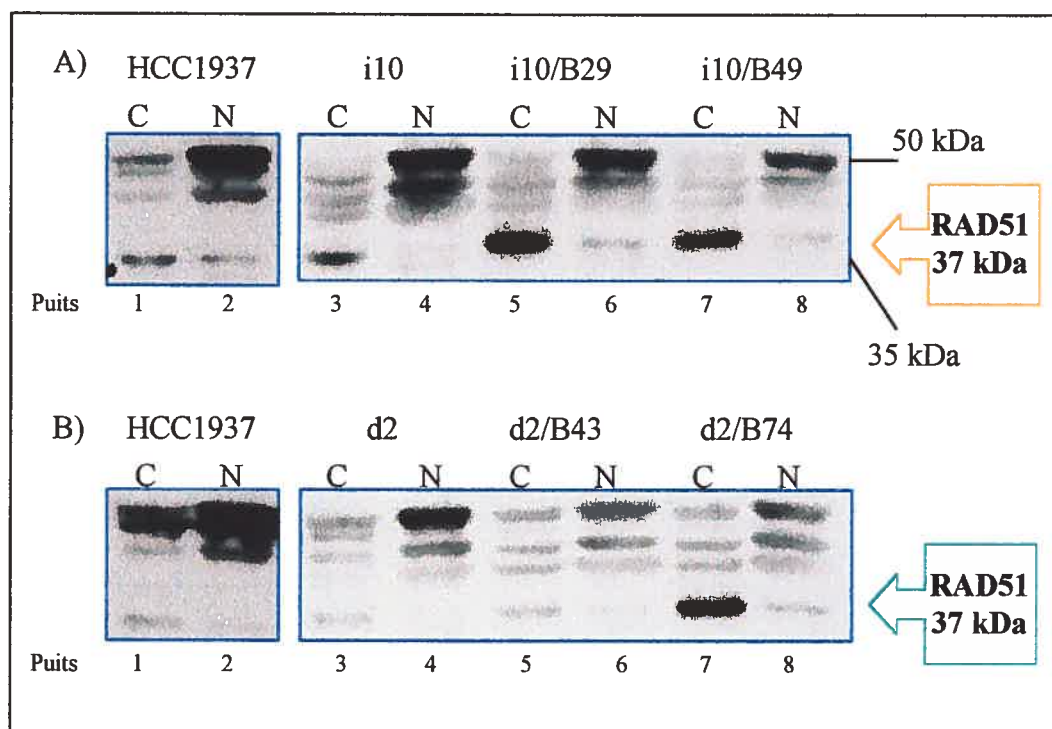


Figure 16 : Localisation cellulaire de la protéine RAD51 dans les cellules BRCA2⁺ vs BRCA2⁻. La protéine RAD51 dans les fractions cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) a été révélée par un anticorps monoclonal anti-RAD51. Dans les cellules HCC1937 qui expriment un BRCA2 sauvage, RAD51 se trouve dans les deux extraits (A et B). Dans les clones CAPAN-1 parentaux (i10 et d2), RAD51 est majoritairement cytoplasmique (A et B). Tandis que dans ces mêmes clones complémentés avec BRCA2 (i10/B29, i10/B49, d2/B43, d2/B74), RAD51 se trouve aussi dans la fraction nucléaire (A et B). La forte bande à 50 kDa, présente dans toutes les fractions nucléaires, est une protéine fortement nucléaire avec laquelle interagit l'anticorps anti-RAD51.



La présence de RAD51 dans les fractions nucléaires des clones complémentés i10/B29, i10/B49 et d2/B74 n'est pas le résultat d'une contamination provenant de la fraction cytoplasmique pour plusieurs raisons. Premièrement, la technique qui a été utilisée pour extraire et séparer la fraction cytoplasmique de la fraction nucléaire ne permet pas la contamination de la fraction nucléaire. D'une part, suite à la lyse de la membrane cytoplasmique, le surnageant qui contient la fraction cytoplasmique est prélevé et le culot qui

contient les noyaux est lavé plusieurs fois pour éliminer toute trace de protéine cytoplasmique. D'autre part, avant de procéder à la lyse nucléaire, les noyaux ont été visualisés au microscope pour s'assurer qu'ils étaient 100% purs. Deuxièmement, la présence de la forte bande à 50 kDa, qui est plus ou moins de même intensité dans toutes les fractions nucléaires, montre que les fractions nucléaires ne sont pas contaminées: si elles étaient contaminées, le peu de RAD51 qui est uniquement présent dans les fractions nucléaires des clones complémentés i10/B29, i10/B49 et d2/B74, devrait également être présent dans les fractions nucléaires des autres clones (i10, d2 et d2/B43). Troisièmement, s'il y avait contamination, nous n'aurions pas observé de différence entre les fréquences et les taux de RH des clones parentaux et des clones complémentés (voir section suivante).

3.3 Effet de BRCA2 sur la fréquence et le taux de recombinaison homologue spontanée

La fréquence indique le nombre d'événements de RH dans une population cellulaire en division, tandis que le taux mesure le nombre d'événements de RH/ par cellule/par génération (Capizzi and Jameson, 1973). La fréquence est déterminée en divisant le nombre de recombinants Puro^R par le nombre de cellules mis en sélection, tandis que le taux est calculé à partir des fréquences de plusieurs sous-clones issus du même clone parental (figure 12). Avec les répétitions inversées, la fréquence de RH spontanée des clones complémentés est de 22 à 36 fois plus faible que celle des mêmes clones non-complémentés (tableau III). Par contre, la fréquence ne diminue que de 3 à 5 fois avec les répétitions directes (tableau III). En présence de BRCA2, le taux diminue de 4 à 10 fois avec les répétitions inversées et seulement de 1 à 3 fois avec les répétitions directes (tableau IV).

Tableau III. Fréquence de la RH spontanée pour les clones parentaux non-complémentés et complémentés avec BRCA2.

Clone parental (BRCA2 ^{-/-})		Clone complémenté (BRCA2 ⁺)		Ratio ^a (parent /complémenté)
<i>Répétitions inversées</i>				
i10	2,0 ± 0,2 x 10 ⁻⁴	i10/B29	8,8 ± 4,3 x 10 ⁻⁶	22,7
		i10/B49	5,5 ± 1,5 x 10 ⁻⁶	36,4
<i>Répétitions directes</i>				
d2	7,1 ± 3,6 x 10 ⁻⁶	d2/B43	1,3 ± 0,2 x 10 ⁻⁶	5,5
		d2/B74	1,4 ± 1,0 x 10 ⁻⁶	5,1
d26	6,4 ± 0,4 x 10 ⁻⁶	d26/B6	2,1 ± 0,3 x 10 ⁻⁶	3,0
		d26/B12	1,4 ± 0,1 x 10 ⁻⁶	4,6

La fréquence indiquée est la moyenne de deux à cinq expériences. La fréquence a été déterminée en divisant le nombre de clones Puro^R par le nombre de cellules mis en sélection.

^a Le ratio indique le nombre de fois que la fréquence spontanée diminue en présence de la protéine sauvage BRCA2. Selon le test de khi carré, cette diminution est statistiquement significative car $p = 0,0111$ en comparant i10 à i10 complémenté et $p = 0,0054$ en comparant d2 à d2 complémenté. Toutefois, cette diminution s'approche de la significativité en comparant d26 à d26 complémenté : $p = 0,0603$.

Tableau IV. Taux de la RH spontanée des clones parentaux non-complémentés et complémentés avec BRCA2.

Clone parental (BRCA2 ^{-/-})		Clone complémenté (BRCA2 ⁺)		Ratio ^a (parent /complémenté)
<i>Répétitions inversées</i>				
i10	8,546 x 10 ⁻⁶	i10/B29	2,087 x 10 ⁻⁶	4,1
		i10/B49	8,447 x 10 ⁻⁷	10,1
<i>Répétitions directes</i>				
d2	1,526 x 10 ⁻⁶	d2/B43	5,623 x 10 ⁻⁷	2,7
		d2/B74	1,287 x 10 ⁻⁶	1,2
d26	1,066 x 10 ⁻⁶	d26/B6	7,179 x 10 ⁻⁷	1,5
		d26/B12	3,444 x 10 ⁻⁷	3,1

Le taux a été calculé à l'aide de la formule décrite par Capizzi et Jameson (Capizzi and Jameson 1973).

^a Le ratio indique le nombre de fois que le taux diminue en présence de la protéine BRCA2 sauvage.

3.4 Effet de BRCA2 sur l'efficacité de la réparation de la cassure double brin

Une des copies du gène *Puro* non fonctionnelles contient le site de la méganucléase *I-SceI*. *I-SceI* de *Saccharomyces cerevisiae* reconnaît un site de clivage de 18pb et permet d'introduire une CDB à un site précis dans le génome des mammifères (Jasin, 1996). La probabilité de retrouver le site *I-SceI* dans le génome des mammifères est très mince puisque le site de reconnaissance est long. Le système *I-SceI* est donc un outil très utile pour étudier les voies de réparation des CDB dans les cellules de mammifères. L'induction d'une CDB par *I-SceI* stimule la RH et la recombinaison non homologue de 100 à 10 000 fois (Jasin, 1996).

La CDB a été induite suite à la co-transfection des cellules avec un vecteur (p β actineSceI) qui exprime la méganucléase *I-SceI* et un vecteur qui exprime la protéine GFP. Ce dernier nous a permis de déterminer l'efficacité de transfection qui était autour de 0,5 % pour les clones non-complémentés et complémentés : le taux de transfection est faible car, tel que décrit à la section 3.1.1, les CAPAN-1 sont extrêmement difficile à transférer (Chen et al., 1998b; Moynahan et al., 2001; Wang et al., 2002). Le vecteur GFP a également été co-transfecté avec le vecteur pSGnéo qui exprime la néomycine comme contrôle afin de déterminer l'efficacité de *I-SceI*. Dans ce cas, la fréquence de RH induite par *I-SceI* peut aussi être déterminée en divisant le nombre de Puro^R par le nombre de cellules qui expriment GFP (tableau V).

Avec les répétitions inversées et en absence d'un *BRCA2* fonctionnel, la fréquence de RH induite par *I-SceI* n'augmente pas par rapport à celle de la RH spontanée, mais augmente de 510 fois pour les répétitions directes (tableau V). Par contre dans les clones complémentés, la fréquence de RH induite augmente

de 613 fois par rapport à la fréquence de RH spontanée pour les répétitions inversées et augmente de 1027 à 3800 fois pour les répétitions directes par rapport à celle de la RH spontanée (tableau V).

Tableau V. Fréquence de la RH spontanée versus fréquence de la RH induite par I-SceI en absence et en présence de BRCA2.

Clone	Fréquence ^a		Ratio ^b (I-SceI /spontanée)
	spontanée	I-SceI	
<i>Répétitions inversées</i>			
i10 (BRCA2 ^{-/-})	5,7 ± 1,6 x 10 ⁻⁵	4,1 ± 1,1 x 10 ⁻⁵	0,72 (0)
i10/B29 (BRCA2 ⁺)	1,0 ± 0,1 x 10 ⁻⁷	3,2 ± 1,2 x 10 ⁻⁷	3,2 (613)
<i>Répétitions directes</i>			
d2 (BRCA2 ^{-/-})	9,7 ± 1,4 x 10 ⁻⁷	2,8 ± 1,1 x 10 ⁻⁶	2,9 (510)
d2/B74 (BRCA2 ⁺)	2,0 ± 0,1 x 10 ⁻⁷	2,1 ± 0,1 x 10 ⁻⁶	10,5 (3800)
d26/B12 (BRCA2 ⁺)	9,4 ± 5,9 x 10 ⁻⁷	3,7 ± 1,7 x 10 ⁻⁶	3,9 (1027)

^a La fréquence indiquée est la moyenne de deux expériences. La fréquence a été déterminée en divisant le nombre de clones Puro^R par le nombre de cellules mis en sélection 7 jours après la co-transfection par les plasmides exprimant I-SceI et GFP ou par les plasmides exprimant la néomycine et GFP.

^b Le ratio indique le nombre de fois que la fréquence augmente en présence de l'endonucléase I-SceI. Le ratio entre parenthèse indique le nombre de fois que la fréquence augmente en présence de I-SceI en tenant compte de l'efficacité de transfection. Dans ce cas, la fréquence a été déterminée comme étant le nombre de Puro^R divisé par le nombre de cellules qui expriment le GFP.

3.5 Effet de BRCA2 sur la structure des recombinants

Les clones Puro^R ont été analysés par PCR afin de déterminer le type de recombinant. Un événement de RH peut être de type conversion génique ou crossing-over, les deux étant dépendant de RAD51 (figure 7). Contrairement à la conversion génique qui garde une structure intacte, un événement de CO peut générer deux produits distincts dépendamment de l'orientation (figure 17). Un crossing-over entre les répétitions inversées (pCAinv) inverse les séquences intercalaires (dans ce cas le gène de *Hyg*), tandis qu'un événement de crossing-over entre les répétitions directes (pCA_{dr}) délète le gène *Hyg* et ne laisse qu'une seule copie *Puro* fonctionnelle. La délétion entre les répétitions directes peut également être produite par un événement de SSA, un mécanisme RAD51-indépendant (figure 17). Un événement de SSA ne peut pas avoir lieu entre les répétitions inversées car les brins d'ADN monocaténaux flanquant la CDB ne sont pas complémentaires, ils sont identiques et ne peuvent pas s'apparier. Ainsi, contrairement aux répétitions directes, l'emploi des répétitions inversées est une mesure directe des événements de crossing-over.

L'analyse des recombinants Puro^R par PCR a été faite en utilisant les mêmes amorces employées pour les clones parentaux (non-recombinants) (figures 13, 18 et 19). Avec les répétitions directes dans les clones parentaux non-complémentés, 10% (3/29) des recombinants spontanés étaient de type conversion génique et 90% (26/29) étaient des délétions en absence de BRCA2 (tableau VI). Suite à l'induction de la CDB, 100 % (10/10) des recombinants étaient des délétions (tableau VII). Après complémentation de ces clones avec *BRCA2*, les proportions sont identiques, soit 10% de conversion génique (2/20) et 90% de délétions (18/20) pour les événements spontanés (tableau VI). Suite à l'induction de la CDB, les proportions de conversion génique augmentent à 50% (6/12) et celle des délétions baissent à 50% (tableau VII). Ainsi, en

présence de répétitions directes et en présence de BRCA2, il y a tendance à aller vers la conversion génique suite à l'induction de la CDB.

Pour les répétitions inversées dans les clones non-complémentés, 93 % (13/14) des recombinants spontanés étaient de type conversion génique et 7 % (1/14) étaient de type crossing-over. Cette proportion n'a pas changé après complémentation de ces clones avec *BRCA2* (tableau VI). Les résultats étaient similaires pour les recombinants induits par *I-SceI* (tableau VII).

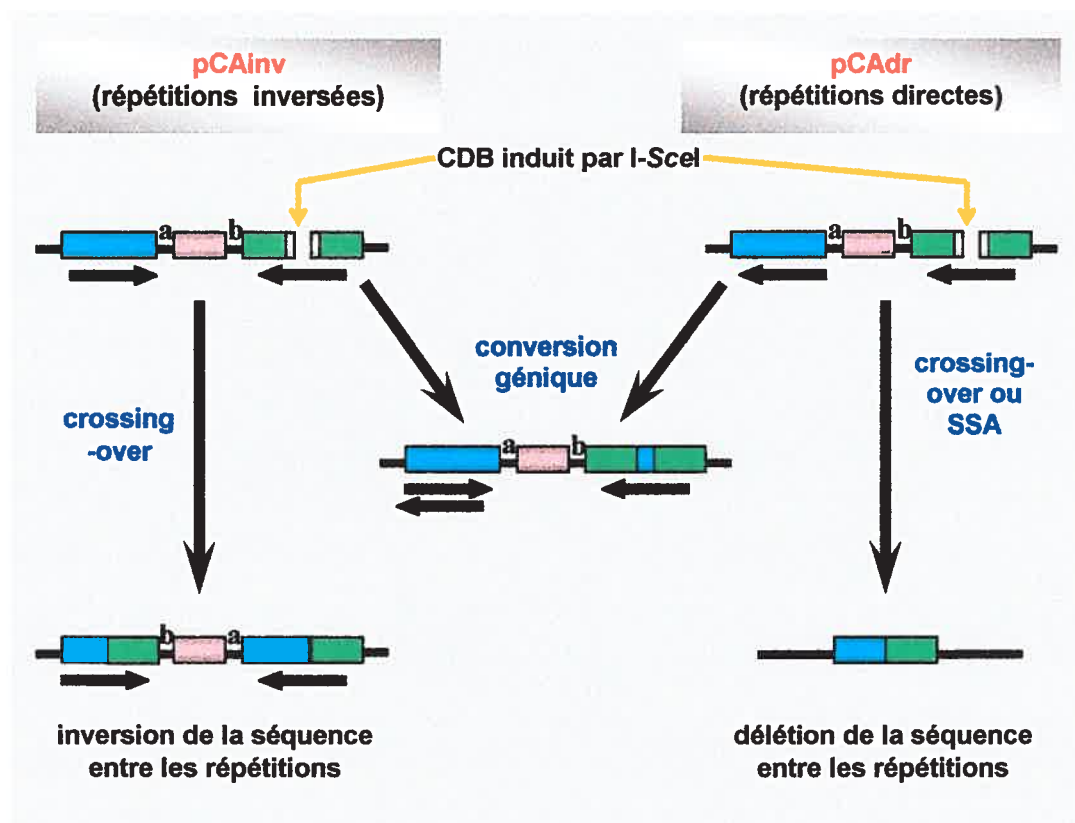


Figure 17 : Recombinaison homologue entre des répétitions inversées (pCAinv) ou directes (pCAAdr). Gène *PuroΔ5'* (■), gène *PuroSceI* (■) et gène hygromycine (■). Un événement de RH spontanée ou de réparation de la CDB induite par *I-SceI* génère un *Puro* fonctionnel.

Figure 18: Analyse des recombinants obtenus avec les répétitions inversées (pCAinv). Les événements de conversion génique amplifiés avec les amorces pUC469 et hyg4419 génèrent un fragment de 2324 pb (a) qui se distingue de celui du parent par la perte du site I-SceI et le gain du site *EagI* (b). Les événements de crossing-over inversent l'orientation du gène de l'hygromycine (c) et par conséquent génèrent un fragment de 3038 pb avec les amorces pUC469 et hyg1891 (d). La forte bande présente dans la ligne 3 du panel d est une bande non spécifique caractéristique à ce recombinant.

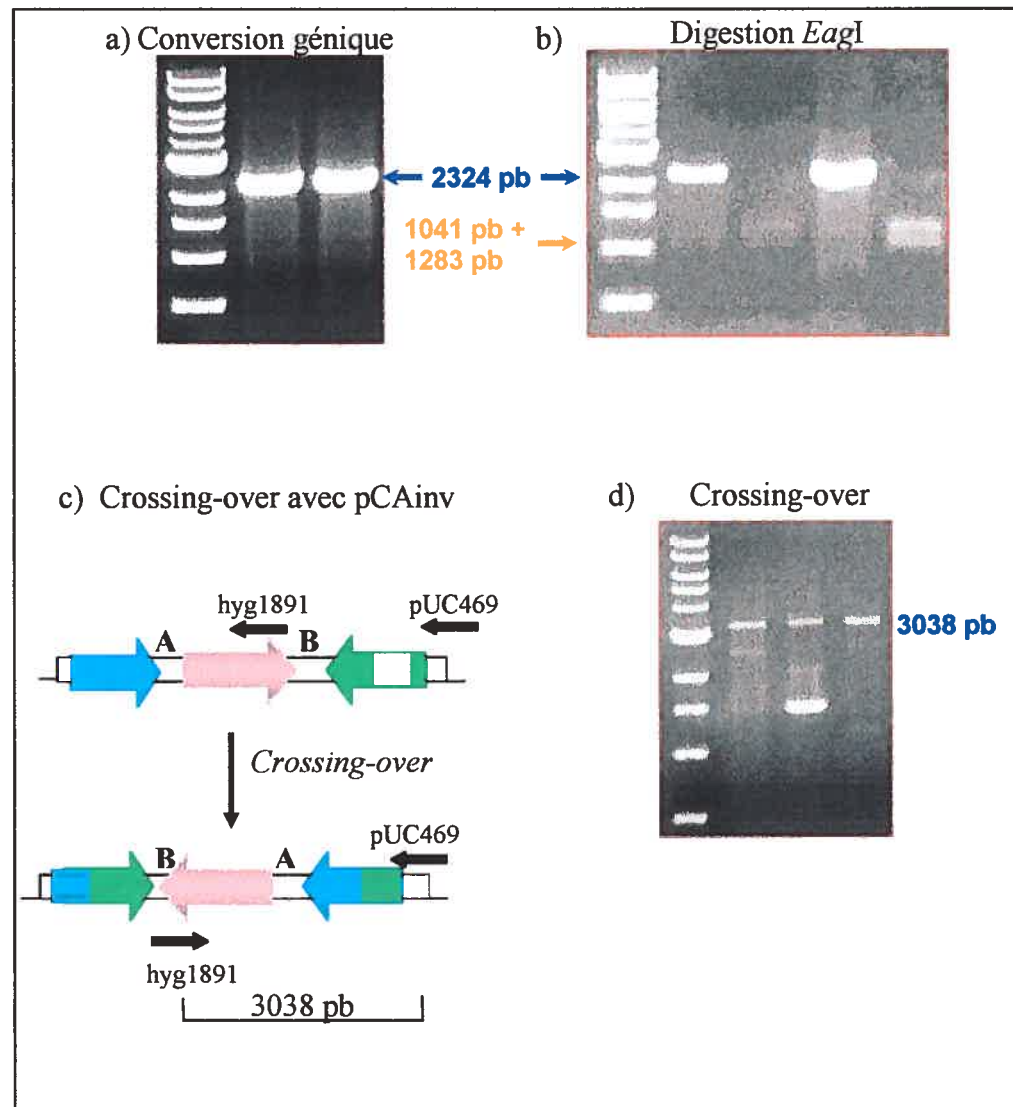


Figure 19: Analyse des recombinants obtenus avec les répétitions directes (pCAdr). Événements de conversion génique amplifiés avec les amorces pUC469 et hyg4419 (a et b) (voir figure 18). Événements de conversion génique et de délétion amplifiés avec les amorces pUC469 et pUC315 génèrent respectivement un fragment de 4736 pb (c et e) et un fragment de 1836 pb (c et f) qui se digère par *EagI* (d).

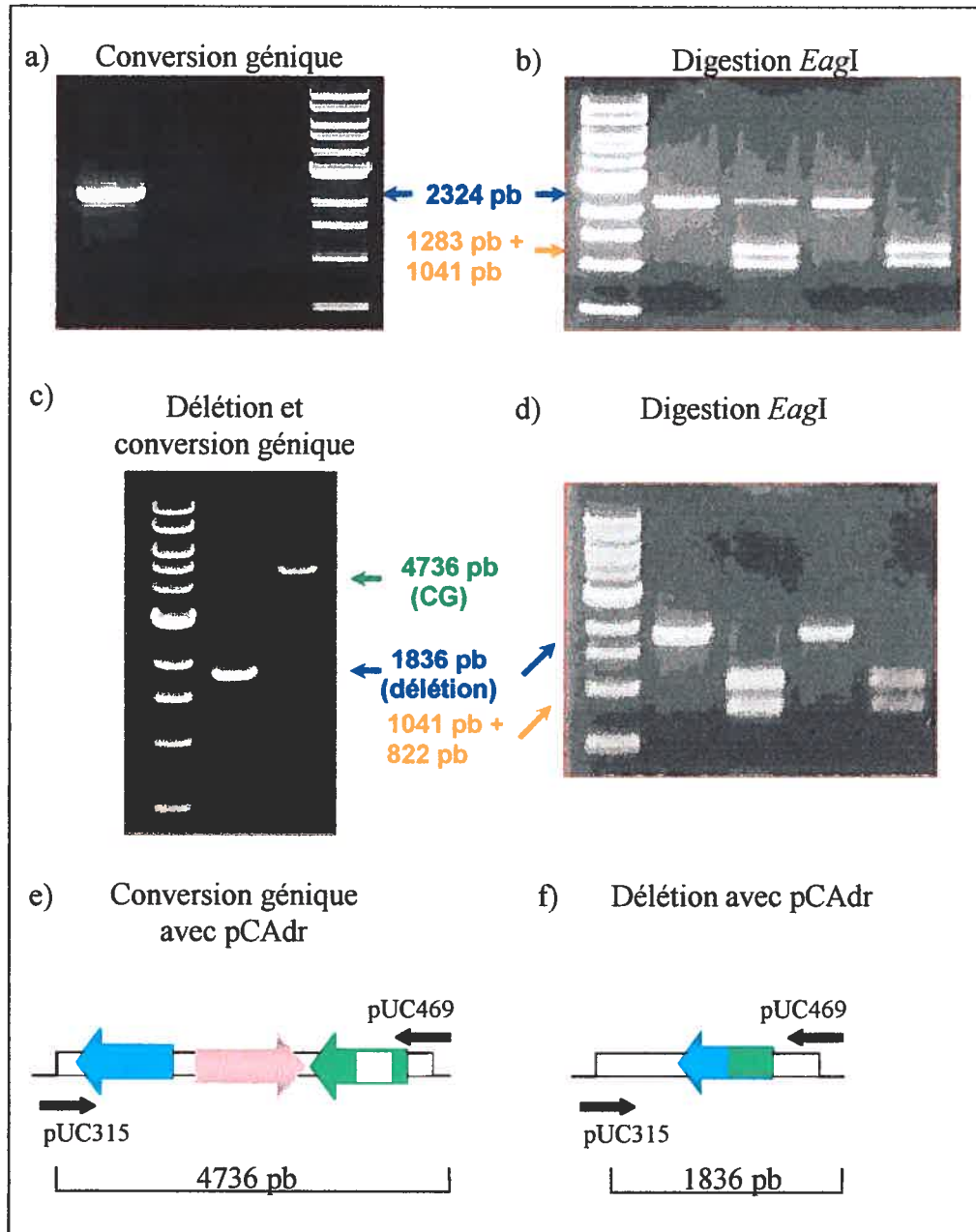


Tableau VI. Effet de BRCA2 sur la structure des recombinants spontanés.

Clone	Nombre de recombinants analysés ^a	CG	CO	délétion (CO/SSA) ^b
<i>Répétitions inverses</i>				
i10 (BRCA2 ^{-/-})	14	13/14 (92.9%)	1/14 (7.1%)	NA
i10/B49 (BRCA2 ⁺)	15	14/15 (93.3%)	1/15 (6.9%)	NA
<i>Répétitions directes</i>				
d2 (BRCA2 ^{-/-})	15	3/15 (20%)	NA	12/15 (80%)
d26 (BRCA2 ^{-/-})	14	0/14 (0%)	NA	14/14 (100%)
Total	29	3/29 (10,3%)		26/29 (89,7%)
d2/B74 (BRCA2 ⁺)	10	0/10 (0%)	NA	10/10 (100%)
d26/B12 (BRCA2 ⁺)	10	2/10 (20%)	NA	8/10 (80%)
Total	20	2/20 (10%)		18/20 (90%)

^a Les recombinants analysés représentent des événements indépendants qui proviennent des expériences différentes lors de la détermination du taux.

^b Le CO et le SSA génèrent le même produit, soit une délétion de séquence entre les répétitions directes.

CG: conversion génique

CO: crossing-over

SSA: *single-strand annealing*

NA: non applicable

Tableau VII. Effet de BRCA2 sur la structure des recombinants induits par l'endonucléase I-SceI.

Clone	Nombre de recombinants analysés ^a	CG	CO	délétion (CO/SSA) ^b
<i>Répétitions inverses</i>				
i10 (BRCA2 ^{-/-})	14	13/14 (92.9%)	1/14 (7.1%)	NA
i10/B29 (BRCA2 ⁺)	15	14/15 (93.3%)	1/15 (6.9%)	NA
<i>Répétitions directes^c</i>				
d2 (BRCA2 ^{-/-})	10	0/10 (0 %)	NA	10/10 (100%)
d2/B74 (BRCA2 ⁺)	12	6/12 (50%)	NA	6/12 (50%)

^a Les recombinants analysés représentent des événements indépendants qui proviennent des transfections avec I-SceI.

^b Le CO et le SSA génèrent le même produit, soit une délétion de séquence entre les répétitions directes.

CG: conversion génique

CO: crossing-over

SSA: *single-strand annealing*

NA: non applicable

^c La tendance à aller vers la conversion génique en présence de BRCA2 (d2 vs d2/B74) est très significative, p= 0,0152 (probabilité exacte de Fisher).

**CHAPITRE 4 :
DISCUSSION**

4. Discussion

L'approche expérimentale que nous avons développée nous a permis d'examiner le rôle de BRCA2 dans la RH sur le même contexte génétique, contrairement à d'autres études qui ont comparé des lignées cellulaires différentes (Davies et al., 2001; Larminat et al., 2002; Moynahan et al., 2001). Toutes les lignées cellulaires (clones CAPAN-1) que nous avons complétées avec BRCA2 dérivent de la même lignée cellulaire contenant une copie intacte du plasmide rapporteur. Cette approche nous a permis d'éclairer certains aspects obscurs sur la fonction de BRCA2 dans la RH et le maintien de la stabilité du génome. Nos résultats démontrent premièrement que l'expression de BRCA2 dans les cellules CAPAN-1 reconstitue le transport de RAD51 du cytoplasme au noyau. Deuxièmement, BRCA2 inhibe l'activité de RAD51 en absence de dommages à l'ADN. Troisièmement, suite à l'induction d'une CDB, BRCA2 facilite la fonction de RAD51 afin de réparer efficacement ce dommage, et prévenir ainsi les mutations par délétions. Quatrièmement, BRCA2 agit au niveau de l'initiation de la réparation mais n'affecte pas la résolution de l'intermédiaire de recombinaison en événements de crossing-over. La perte de ces contrôles après l'inactivation de BRCA2 nous semble être l'événement clé dans l'instabilité génomique et la tumorigénèse.

4.1 BRCA2 transporte RAD51 du cytoplasme au noyau

In vitro, comme *in vivo*, BRCA2 lie directement plusieurs molécules de RAD51 via ses motifs BRC (Chen et al., 1998a; Chen et al., 1998b; Marmorstein et al., 1998; Mizuta et al., 1997; Powell et al., 2002; Sharan and Bradley, 1997; Wong et al., 1997). Cette interaction semble être spécifique à RAD51 puisque les répétitions BRC n'interagissent avec aucun autre gène homologue à *RAD51* comme *XRCC2*, *XRCC3*, *RAD51B*, *RAD51C*, et *RAD51D*

(Davies et al., 2001). Des mutations dans ces gènes engendrent également une défectuosité dans la RH et la réparation de l'ADN, et de l'instabilité génomique. Dans le même ordre d'idée, les répétitions BRC n'interagissent pas avec DMC1, l'homologue de RAD51 qui est spécifique à la RH méiotique, ni avec RAD52 ou RAD54 (Davies et al., 2001).

Bien que leur fonction soit essentiellement nucléaire, BRCA2 et RAD51 sont réparties en parts égales entre le cytoplasme et le noyau dans les cellules normales (Davies et al., 2001; Yoshikawa et al., 2000). Par contre, dans les cellules CAPAN-1, RAD51 est majoritairement cytoplasmique (Davies et al., 2001), possiblement liée à la forme tronquée de BRCA2 qui a perdu son NLS (Spain et al., 1999). Ces données indiquent que dans les cellules normales, BRCA2 pourrait transporter RAD51 du cytoplasme au noyau (Davies et al., 2001; Venkitaraman, 2001a). Nos résultats supportent cette hypothèse puisqu'ils démontrent que l'expression de BRCA2 sauvage dans les cellules CAPAN-1 rétablit le transfert de RAD51 au noyau (figure 16), indiquant ainsi que la séquestration de RAD51 dans le cytoplasme des CAPAN-1 n'est pas due à d'autres mutations qui s'accumulent de manière spontanée dans les cellules BRCA2-déficientes (Patel et al., 1998). Cependant, BRCA2 ne semble pas être le seul transporteur de RAD51 puisqu'un faible niveau de RAD51 s'est révélé associé à la chromatine des cellules CAPAN-1 synchronisées en phase S (Tarsounas et al., 2003). Ces molécules de RAD51 sont probablement suffisantes pour permettre la prolifération des cellules CAPAN-1, mais pas assez pour permettre une réparation efficace des CDB lorsque ces cellules sont traitées avec des agents qui endommagent l'ADN (Abbott et al., 1998; Zheng et al., 2000).

Contrairement aux cellules CAPAN-1, dans les cellules ES de souris exprimant un Brca2 tronqué en C-terminal, Rad51 n'est pas séquestrée dans le cytoplasme (Moynahan et al., 2001; Sarkisian et al., 2001), malgré que la partie

C-terminale de BRCA2 présente 72% d'homologie entre la souris et l'homme (Sharan et al., 1997; Tavtigian et al., 1996). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le NLS dans la protéine Brca2 de souris se situerait au niveau de la partie N-terminale (Sarkisian et al., 2001), contrairement à celui du BRCA2 humain qui se trouve dans la partie C-terminale (Bertwistle et al., 1997; Yano et al., 2000).

En plus de rétablir le transport de RAD51 du cytoplasme au noyau, la complémentation par BRCA2 semble également augmenter l'expression de RAD51 dans la fraction cytoplasmique des clones complémentés (figure 16). Il est possible que BRCA2, étant aussi un facteur de transcription (Fuks et al., 1998, Milner et al., 1997, Milner et al., 2000), augmente l'expression de *RAD51*. Toutefois, une grande partie du pool de RAD51 demeure séquestrée dans le cytoplasme à cause de la présence de BRCA2 tronquée qui a la capacité de lier plus d'une molécule de RAD51. De plus, la majorité du pool de RAD51 n'est pas transporté au noyau à cause du faible niveau de complémentation des CAPAN-1, d'où la présence de la faible bande de RAD51 dans les fractions nucléaires des clones complémentés (figure 16).

4.2 BRCA2 inhibe la fonction de RAD51 *in vivo*

Dans les cellules CAPAN-1 complémentées, la fréquence et le taux de la RH spontanée diminuent beaucoup plus avec les répétitions inversées (environ 30 et 7 fois respectivement) qu'avec les répétitions directes (environ 5 et 2 fois respectivement) (tableaux III et IV). Puisque la RH entre les répétitions inversées est uniquement RAD51-dépendante (Klein, 1995; Lambert et al., 1999), nos résultats indiquent qu'en absence de CDB, BRCA2 pleine longueur inhibe la fonction de RAD51 (voir section 4.4.1 pour le mécanisme). L'augmentation de la RH spontanée dans les cellules CAPAN-1 non-

complémentées (tableaux III et IV) s'explique par la présence de RAD51 au niveau de la chromatine (Tarsounas et al., 2003), indiquant que RAD51 est active en absence de BRCA2.

4.3. BRCA2 facilite la fonction de RAD51 au niveau des cassures doubles brins et promeut les événements de conversion génique

Les cellules BRCA2-déficientes accumulent des CDB et sont sensibles aux agents qui produisent ce type de dommages (Abbott et al., 1998; Zheng et al., 2000). De plus, la formation des foyers nucléaires RAD51 diminue dans les cellules BRCA2-déficientes suite à l'induction des CDB par RI (Yu et al., 2000; Yuan et al., 1999). Dans les cellules de souris *Brca2*-déficientes, la réparation des CDB par RH RAD51-dépendante (conversion génique) diminue de 4 à 6 fois par rapport aux cellules normales (Moynahan et al., 2001; Tutt et al., 2001). Dans les cellules CAPAN-1, la fréquence de réparation de ce type de dommage diminue de 4 à 10 fois par rapport aux cellules CAPAN-1 complémentées (tableau V). Cette diminution est peut être sous-estimée au vu de la complémentation partielle des cellules CAPAN-1 (figure 15). Ces observations indiquent que BRCA2 est nécessaire pour la réparation des CDB par RH RAD51-dépendante.

4.4. Comment BRCA2 contrôle-t-elle l'activité de RAD51?

4.4.1 Au niveau de la recombinaison homologue spontanée

Les étapes précises par lesquelles la RH spontanée se fait dans les cellules ne sont pas encore bien connues, mais des modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer les divers résultats qui apparaissent sur les analyses des recombinants (conversion génique vs crossing-over). Il s'agit du modèle de Holliday

(Holliday, 1964) et du modèle de Meselson et Radding (Meselson and Radding, 1975). L'analyse des premiers recombinants chez la levure dévoila que dans environ 50% des cas, la recombinaison par crossing-over est associée à un événement de conversion génique, et que la fréquence des événements de crossing-over n'est pas répartie uniformément le long du chromosome. Holliday a donc proposé un modèle de RH symétrique pour expliquer la relation entre les crossing-over et la conversion génique (figure 20) (Holliday, 1964). Or, suite à la proposition du modèle de Holliday, de nouvelles études faites chez *Ascobolus immersus* et chez la levure ont montré que les hétéroduplexes sont rarement symétriques et en conséquence, les produits de recombinaison prédits par le modèle de Holliday sont rarement détectés. Ainsi, Meselson et Radding ont proposé un nouveau modèle de RH pour tenir compte des produits de recombinaison provenant d'hétéroduplexes asymétriques (figure 21) (Meselson and Radding, 1975). Ces deux modèles impliquent une cassure simple brin (CSB) sur les deux partenaires (modèle de Holliday) ou sur un seul des deux partenaires (modèle de Meselson et Radding) comme étape d'initiation de la RH. Par contre, le rôle de la CSB dans l'initiation de la RH s'avère difficile à tester à cause d'un manque d'essai expérimental direct (Strathern et al., 1991). De plus, lorsque la fourche de réplication traverse une CSB, une CDB en résulte et il devient difficile de distinguer entre les recombinants issus de ces deux lésions. Ainsi, il a été proposé que la RH spontanée pourrait être initiée par une CDB puisque la fréquence de RH augmente jusqu'à 1000 en présence de CDB (Szostak et al., 1983). Dès lors, plusieurs autres études supportent le concept des CDB dans l'initiation de la RH (Bollag et al., 1989; Cervantes et al., 2000; Dernburg et al., 1998; Haber, 1992; Thaler and Stahl, 1988; Vedel and Nicolas, 1999).

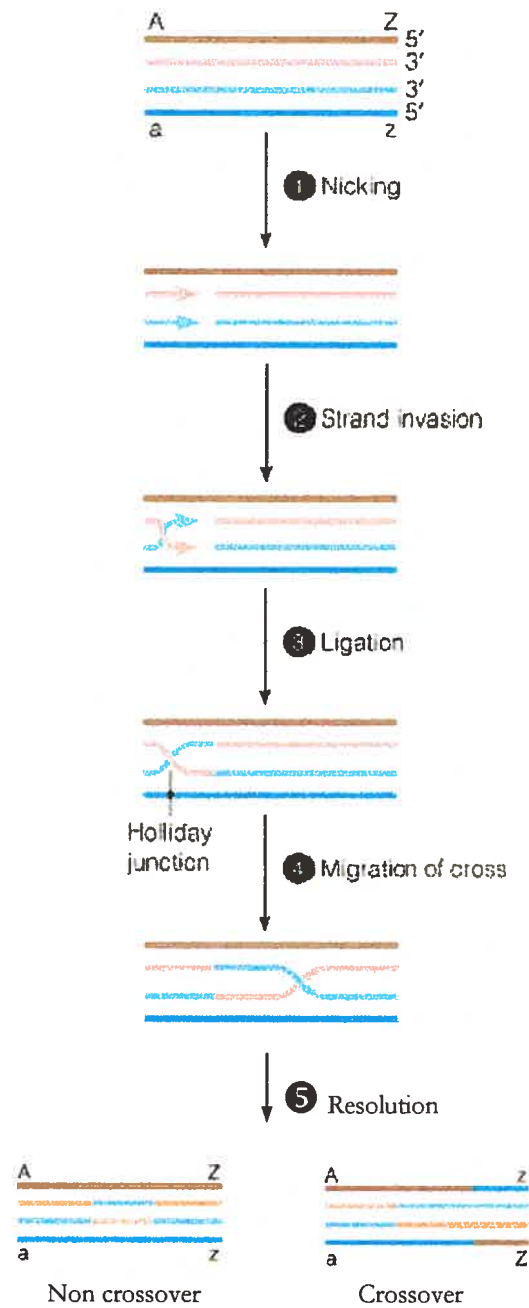


Figure 20 : Modèle de Holliday (1964). 1) Induction de la CSB. 2) Échange des extrémités 5' entre les duplex afin de créer deux hétéroduplexes symétriques. 3) Ligation avec les extrémités 3' de manière à former une jonction de Holliday. 4) Migration de la jonction. 5) Résolution de la jonction pour générer un non crossover ou un crossover (modifiée de www.aw-bc.com/mathews/ch25/fi2.sp20.htm).

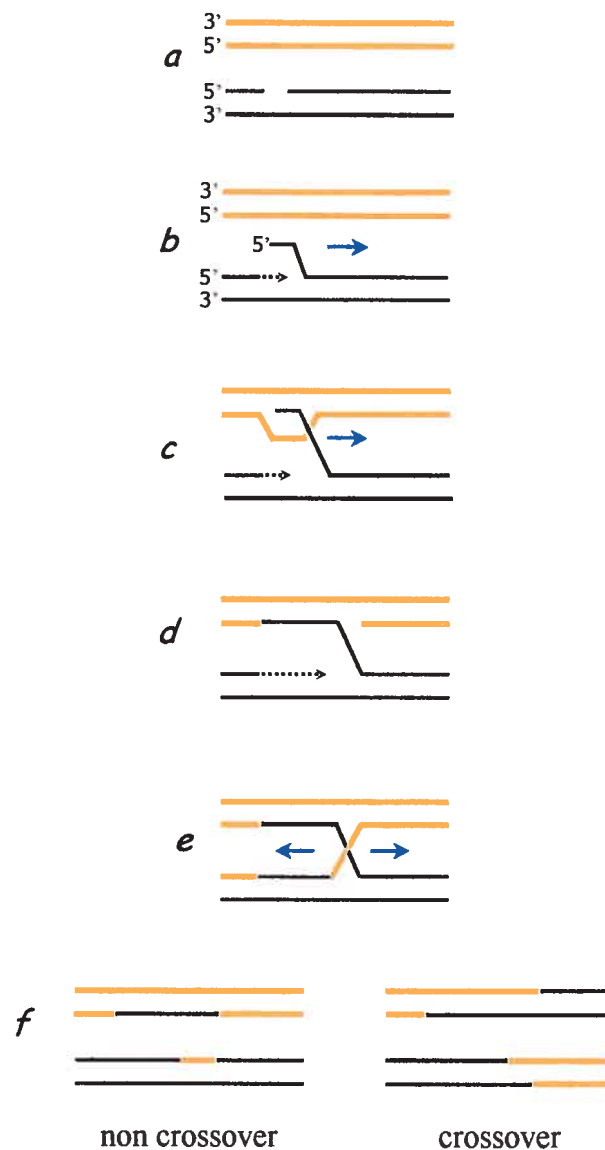


Figure 21 : Modèle de Meselson et Radding (1975). A) Présence d'une CSB. B) Synthèse d'ADN amorcé à l'extrémité 3' générée par la CSB et déplacement de l'extrémité 5'. C) Invasion du duplexe homologue par l'extrémité 5' de manière à former un hétéroduplexe asymétrique et à déplacer une boucle d'ADN simple brin (*D-loop*). D) Dégradation de la boucle par des nucléases. E) Ligation des extrémités pour former la jonction de Holliday et migration de cette jonction peut entraîner la formation d'hétéroduplexes symétriques ou asymétriques. F) Résolution de la jonction pour générer un non-crossover ou un crossover.

Cependant, la diminution de la fréquence de RH spontanée et l'augmentation de la fréquence de RH induite par I-SceI en présence de BRCA2 (tableaux III et IV vs tableaux V) ou de BRCA1 (Cousineau I., Abaji C. et Belmaaza A., manuscrit en préparation) supportent l'idée que la RH spontanée est initiée par des CSB (Meselson and Radding, 1975). De plus, dans le laboratoire, il a été démontré que la RH spontanée et celle induite par I-SceI sont différenciellement affectées par la divergence de séquence et le système de réparation des bases mal appariées (Villemure and Belmaaza, 1999). L'ensemble de ces résultats montre que la RH spontanée et celle induite par une CDB se font par deux mécanismes différents, plutôt que par le même mécanisme (Paques and Haber, 1999).

Cette conclusion est également supportée par l'observation que suite à un dommage, les foci BRCA1, dont quelques-uns contiennent aussi BRCA2 et RAD51, ne coïncident pas avec la cinétique de réparation des CDB ni avec leur nombre estimé dans la cellule, indiquant que ces foci se forment au niveau d'autres types de dommages (Paull et al., 2000), possiblement des étendues d'ADN simple brin créées lorsque les cellules sont traitées à l'UV ou à l'hydroxyurée par exemple (Scully et al., 2000). Il est donc possible que BRCA1 et BRCA2 répondent à ce type de dommage simple brin, estimé être plus fréquent que les CDB (Hutchinson, 1993), pour coordonner sa réparation par un autre mécanisme plus efficace, éliminant ainsi le risque associé à la RH (figure 21). Un mécanisme plus efficace pourrait être une ligation simple (figure 22). Il a été démontré que BRCA1 et BRCA2 promeuvent l'activité de l'ADN ligase durant la réparation par excision de bases ou de nucléotides (Abbott et al., 1999; Bogliolo et al., 2000; Cressman et al., 1999; Gowen et al., 1998; Le Page et al., 2000). BRCA1 s'associe avec l'exonucléase RAD50/MRE11/NBS1 et l'hélicase BLM *in vivo* (Wang et al., 2000; Zhong et al., 1999). En plus, BRCA1 associée avec l'ADN inhibe l'activité exonucléase et/ou hélicase de RAD50/MRE11/NBS1 *in vitro* (figure 22 a à c) (Paull et al.,

2001). Par contre, BRCA2 inhibe la formation de RAD51 en filament nucléoprotéique (figure 22 d). L'interaction entre les peptides BRC et RAD51 inhiberait la polymérisation de RAD51, la formation du filament, et ainsi sa fonction (Davies et al., 2001; Pellegrini et al., 2002; Xia et al., 2001). Le bout 5' simple brin sera alors clivé par l'endonucléase FEN1 (flap endonucléase 1) (Harrington and Lieber, 1994) qui agit aussi comme une exonucléase 5'-3' sur une CSB (figure 22 a) ou sur une brèche simple brin (figure 22 b) (Harrington and Lieber, 1995; Siegal et al., 1992).

4.4.2 Au niveau de la cassure double brin

Il a été suggéré que BRCA2 séquestre RAD51 sous une forme prête à être localisée aux sites endommagés où elles deviennent actives pour la réparation (Davies et al., 2001). L'activation pourrait impliquer soit un relâchement de RAD51 ou soit un changement structurel du complexe BRCA2-RAD51 par une modification post-traductionnelle de RAD51 (Chen et al., 1999c; Yuan et al., 1998) et/ou de BRCA2 (Chen et al., 1998a; Lee et al., 2003; Venkitaraman, 2002) en réponse aux CDB. En effet, BRCA2 est phosphorylée en G2/M par la kinase mitotique Polo-like, Plk1, dans les régions intercalant les répétitions BRC (Lee et al., 2003). Cependant, l'interaction BRCA2-RAD51 ne semble pas être nécessaire pour la localisation et la fonction de RAD51 au site de la CDB. Dans les cellules CAPAN-1, RAD51 forme des foyers nucléaires durant la phase S en absence de BRCA2 (Tarsounas et al., 2003), et nos résultats indiquent que RAD51 est active en absence de BRCA2 puisque dans les cellules CAPAN-1 la RH spontanée RAD51-dépendante est de 30 fois plus élevée par rapport aux cellules CAPAN-1 complémentées (tableau III). Ces observations indiquent qu'au niveau des CDB, BRCA2 agit en aval de RAD51 pour faciliter sa fonction. Bien que ce rôle facilitant demeure inconnu, BRCA2, qui a la capacité de lier l'ADN simple brin (Yang et al., 2002) en réponse aux

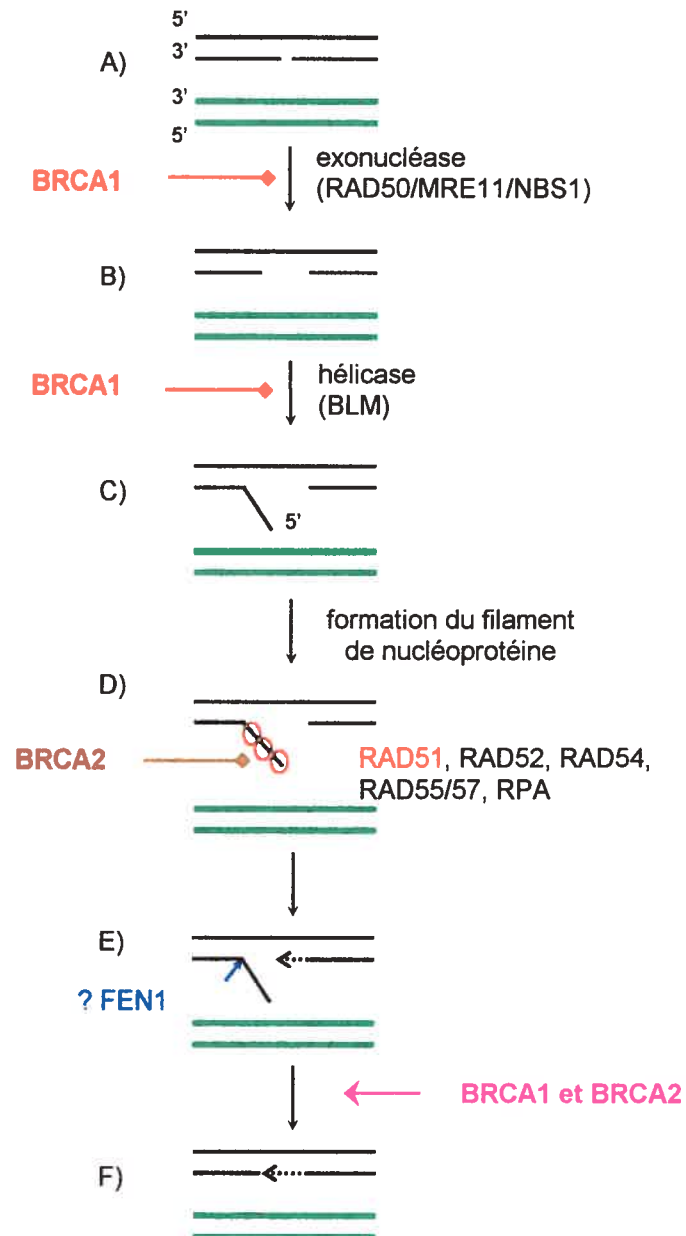


Figure 22: Modèle de réparation d'une cassure simple brin en présence de BRCA1 et BRCA2. A) Présence d'une CSB. B) Façonnage des extrémités de la cassure par une exonucléase telle que RAD50/MRE11/NBS1 et ouverture de l'ADN par une hélicase telle que BLM. BRCA1 lie ces protéines *in vivo* et diminue leur fonction *in vitro*. C) Génération d'un bout 5' simple brin. D) Formation du filament de nucléoprotéine par RAD51 (rouge) (voir figure 7). BRCA2 inhibe la formation de ce filament. E) Clivage du bout 5' libre, possiblement par l'endonucléase FEN1. F) BRCA1 et BRCA2 activent la ligation pour terminer la réparation (voir texte).

CDB, pourrait faciliter la formation du filament nucléoprotéique en déchargeant RPA et en chargeant RAD51 sur l'ADN simple brin (Powell et al., 2002).

En présence d'une CDB, BRCA2 pourrait également faciliter la fonction de RAD51 en rendant la chromatine plus accessible aux protéines impliquées dans la RH, car la fréquence de RH induite par I-SceI augmente en présence de BRCA2 (tableau V). En effet, BRCA2 démontre une activité d'acétylase transférase lorsqu'il interagit avec P/CAF, un co-activateur de l'histone acétylase transférase (Fuks et al., 1998). Son interaction avec EMSY l'implique aussi dans le remodelage de la chromatine puisque EMSY interagit avec des protéines qui modulent la structure de la chromatine et co-localise avec l'histone phosphorylé H2AX au site du dommage (Hughes-Davies et al., 2003). De plus, son interaction avec BRCA1 (Chen et al., 1998a), qui interagit avec des histones acétylases telles que SWI/SNF, p300/CBP (Pao et al., 2000; Yarden and Brody, 1999) et qui induit un relâchement de la chromatine (Hu et al., 1999; Miyake et al., 2000), implique aussi BRCA2 dans le remodelage.

4.5 BRCA2 inhibe les délétions au niveau des cassures doubles brins

Dans les cellules CAPAN-1, 100% des événements induits par I-SceI entre les répétitions directes représentent des délétions, contrairement aux cellules complémentées avec BRCA2 où cette proportion diminue de 50% suite à une augmentation de la conversion génique (tableau VII). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les cellules de souris et de hamster chinois BRCA2-déficientes où les événements de réparation par conversion génique diminuent de 40 à 75% par rapport aux cellules qui expriment un BRCA2 sauvage (Larminat et al., 2002; Moynahan et al., 2001; Tutt et al., 2001).

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer la diminution de la conversion génique et l'augmentation des délétions entre les répétitions directes. Les deux hypothèses invoquent deux rôles différents pour BRCA2 durant la réparation. La première veut qu'en absence de BRCA2, et par conséquent de la conversion génique, la réparation de la cassure soit canalisée vers les délétions par SSA (figure 4). Cette hypothèse implique BRCA2 dans l'initiation de la réparation, et semble être supportée par l'observation que les délétions augmentent aussi aux dépens de la conversion génique dans les cellules de souris et de levure Rad51-déficientes (Ivanov et al., 1996; Lambert and Lopez, 2000). La deuxième hypothèse implique BRCA2 dans la résolution de l'intermédiaire de recombinaison, à savoir la jonction de Holliday (Figure 7). Ceci découle du fait que les réarrangements chromosomiques majeurs tels que les triradials et les quadriradials dans les cellules BRCA2-déficientes ne peuvent être expliqués que par une augmentation des événements de crossing-over entre les chromatides sœurs des chromosomes hétérologues (Scully et al., 2000). L'observation que BRCA2 peut lier la jonction de Holliday via BRAF35 (Marmorstein et al., 2001) semble ajouter du support à cette hypothèse. Cependant, nos résultats indiquent que BRCA2 n'affecte pas la résolution de l'intermédiaire de recombinaison puisque les proportions de crossing-over et de conversion génique entre les répétitions inversées dans les cellules CAPAN-1 restent les mêmes après expression de BRCA2 (tableaux VI et VII). Ainsi, nos résultats démontrent que l'augmentation des délétions entre les répétitions directes en absence de BRCA2 serait due à une augmentation des événements de SSA au lieu des événements de crossing-over.

4.6 L'instabilité génétique dans les cellules BRCA2-déficientes

Il a été proposé que les réarrangements chromosomiques présents dans les cellules BRCA2-déficientes sont dus à une réparation inappropriée des CDB

durant les phases S-G2, où l'expression de BRCA2 est maximale (Vaughn et al., 1996; Wang et al., 1997), car la RH RAD51-dépendante est déficiente (Davies et al., 2001; Larminat et al., 2002; Moynahan et al., 2001; Tutt et al., 2001). Le premier scénario tentant d'expliquer la présence de ces réarrangements est que la réparation des CDB est canalisée vers les voies mutagéniques RAD51-indépendantes, soit le NHEJ et le SSA (Larminat et al., 2002; Tutt et al., 2001). Toutefois, l'inactivation d'une des protéines impliquées dans la voie du NHEJ, telles que XRCC4 et Ku, amène aussi à l'instabilité génétique (Difilippantonio et al., 2000; Gao et al., 2000), indiquant que le NHEJ maintient la stabilité du génome. De plus, la fréquence du NHEJ ou du SSA diminuent dans les cellules BRCA1-déficientes (Moynahan et al., 1999; Zhong et al., 2002; Cousineau I., Abaji C. et Belmaaza A., manuscrit en préparation). En outre, ni le NHEJ et ni le SSA n'expliquent la présence des triradials et des quadriradials, les réarrangements les plus fréquemment observés dans les cellules BRCA1- et BRCA2-déficientes (Venkitaraman, 2002). La présence de ces réarrangements impliquerait une augmentation des événements de crossing-over entre les chromatides sœurs des chromosomes hétérologues (Scully et al., 2000). Ce deuxième scénario n'a pas été retenu car les crossing-over résultent d'un processus de réparation RAD51-dépendant, qui est déficient dans les cellules BRCA1- et BRCA2-déficientes. À la lumière de nos résultats, nous proposons que ce type de réarrangements ne résulte pas d'une aberration dans la réparation des CDB mais plutôt d'une augmentation de la RH spontanée. Une augmentation de 30 fois des événements de crossing-over de manière spontanée (tableau III) pourra donc avoir un effet plus prononcé sur l'instabilité du génome qu'une diminution modeste de 4-6 fois de la réparation des CDB. Une augmentation de 30 fois de la fréquence de conversion génique spontanée (tableau III) peut aussi engendrer des mutations (perte d'hétérozygoté) et contribuer au développement de cancers. Par exemple, la conversion génique a été impliquée dans le neuroblastome (Cavenee et al., 1983) et dans plusieurs autres maladies génétiques incluant la

déficiences de l'hydrolase du stéroïde 21, la déficience du complément humain C4, la maladie de Gaucher, la maladie de von Willebrand, l'atrophie musculaire de la moelle épinière et PKD1 (polycystic kidney disease) (Chen and Ferec, 2000).

4.7 Inactivation des points de contrôle du cycle cellulaire et la transformation des cellules BRCA2-déficientes

Normalement, une défectuosité dans la réparation de dommages à l'ADN mène à l'arrêt du cycle cellulaire ou à la mort cellulaire par apoptose. Dans les cellules qui acquièrent des mutations dans BRCA2, on s'attend à ce que la perte de l'allèle sauvage résulte en l'arrêt du cycle cellulaire, et si le dommage demeure irréparable, à la mort cellulaire. Effectivement, des mutations dans Brca2 chez la souris mènent à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort embryonnaire (Connor et al., 1997; Friedman et al., 1998; Ludwig et al., 1997; Sharan et al., 1997; Suzuki et al., 1997). Toutefois, les cellules épithéliales du sein et de l'ovaire développent des tumeurs au lieu de mourir, créant ainsi un paradoxe intéressant. Qu'est ce qui est unique à ces cellules qui leur permettent d'échapper à l'apoptose? Un scénario qui expliquerait bien ce phénomène est l'haplo-insuffisance. Nous avons récemment démontré que les cellules MCF-7 hémizygotiques pour BRCA1 ont un niveau de RH spontanée plus élevé et un niveau de réparation des CDB plus bas que les mêmes cellules exprimant un niveau normal de BRCA1 après complémentation avec un BRCA1 sauvage (Cousineau I., Abaji C. et Belmaaza A., manuscrit en préparation). Ainsi, il est probable que la perte d'un premier allèle de BRCA2 diminuerait la fonction de BRCA2 (haplo-insuffisance) et engendrerait de l'instabilité génétique, et en conséquence, la perte d'un des points de contrôle (Jonkers et al., 2001). Par exemple, dans un cancer pancréatique hétérozygote pour BRCA2, il y a déjà inactivation d'un des points de contrôle du cycle cellulaire et, l'inactivation du

second allèle de BRCA2 se fait tardivement (Goggins et al., 2000). P53 pourrait être une de ces protéines des points de contrôle puisque des mutations dans p53 sont fréquentes dans les tumeurs BRCA1- ou BRCA2-déficientes (Ramus et al., 1999; Smith et al., 1999). De même, des mutations dans p53 renversent la prolifération déficiente des MEFs *Brca2*^{-/-} en inhibant l'apoptose médiée par p53 (Brugarolas and Jacks, 1997; Ludwig et al., 1997). Ainsi l'inactivation de p53 coopère avec l'inactivation de BRCA2 pour promouvoir la transformation néoplasique (Dasika et al., 1999; Zhang et al., 1998). Également, les tumeurs BRCA1-déficientes réduisent l'expression de *Bcl-2*, un gène anti-apoptotique (Freneaux et al., 2000). Ceci pourrait aussi être le cas dans les cancers sporadiques du sein et de l'ovaire, puisque 50-70% sont dus à la perte d'un allèle de BRCA1 et 30-50%, à la perte d'un allèle de BRCA2 (Cleton-Jansen et al., 1995; Futreal et al., 1994). Puisque la région génomique de BRCA2 est composée de 47% de séquences répétitives (20% de séquences *Alu* et 27% de LINE et de MER) et que la région génomique de BRCA1 est composée de 42% de séquences *Alu* (Smith et al., 1996), il est facile d'imaginer comment une augmentation de la RH spontanée peut avoir lieu entre ces séquences répétitives pour inactiver le second allèle de BRCA1 ou BRCA2.

Il n'est toujours pas connu pourquoi des mutations dans BRCA1 et BRCA2 sont spécifiques au développement de tumeurs dans le sein et l'ovaire sachant que leur fonction dans le maintien de la stabilité du génome est fondamentale pour toutes les cellules de l'organisme. Toutefois, nous proposons que le rôle principal de BRCA1 et BRCA2 dans le maintien de la stabilité du génome est de protéger les cellules contre les dommages induits par les métabolites de l'estrogène (Cavalieri et al., 2000; Liehr, 2000) (figure 22). En réponse à l'estrogène, une mutation dans un allèle BRCA1 ou BRCA2 augmenterait les réarrangements génomiques spontanés, et ainsi le risque d'éliminer le deuxième allèle et de développer le cancer.

CHAPITRE 5 :
CONCLUSION

5. Conclusion

L'ensemble de nos résultats et les données actuelles sur la fonction de BRCA2 nous permettent de proposer un scénario où BRCA2 joue plusieurs rôles dans la réparation de dommages à l'ADN et le maintien de la stabilité du génome humain. Tout d'abord, BRCA2 s'associe avec RAD51 et la transporte au noyau, sans toutefois savoir si cette translocation est dépendante ou non d'une réponse cellulaire aux dommages tels que les CSB et les CDB. Ces derniers peuvent surgir spontanément durant la phase S du cycle cellulaire où l'ADN est non seulement accessible à la machinerie de réplication, mais est aussi vulnérable aux attaques par les radicaux libres tels que les métabolites de l'estrogène. En absence de dommages et au niveau d'une CSB, BRCA2 inhibe la fonction de RAD51 à promouvoir des réactions de RH spontanée. Ainsi, BRCA2 assure la stabilité du génome en activant la réparation de ce type de dommage par excision de bases ou de nucléotides et en empêchant un échange génétique complexe qui est à l'origine des réarrangements chromosomiques tels que les triradials, les quadriradials, les translocations, les inversions et les délétions. Par contre, au niveau des CDB, BRCA2 facilite la fonction de RAD51 puisque la RH est le seul mécanisme précis pour réparer ce type de dommage, faire progresser les fourches de réplication et aussi assurer la stabilité du génome et la survie de la cellule. BRCA2 pourrait discriminer entre les CSB et les CDB via sa capacité de lier les segments d'ADN simple brin et double brin, et en conséquence inhiber ou faciliter la fonction de RAD51. Ainsi, dans ce scénario, contrairement à d'autres, BRCA2 est toujours active dans le noyau, et cette activité dépend du type de dommage à réparer.

Il serait intéressant d'investiguer comment BRCA2 facilite la fonction de RAD51 au niveau des CDB. Pour vérifier si BRCA2 facilite la formation du filament de nucléoprotéine en déchargeant la protéine RPA et en chargeant RAD51 sur l'ADN simple brin, nous pourrions surexprimer RPA dans les

cellules CAPAN-1. Un excès de RPA pourrait interférer avec BRCA2 et diminuer la réparation par RH. D'autre part, pour déterminer si le domaine de transactivation de BRCA2 (exon 3) est impliqué dans le remodelage de la chromatine ou si il est simplement impliqué dans la transcription, nous pourrions surexprimer EMSY dans les cellules MCF7 (BRCA2^{+/+}) qui contiennent déjà le vecteur rapporteur pCAinv. EMSY est une protéine qui lie l'exon 3 de BRCA2. Elle inhibe l'activité transcriptionnelle de BRCA2 et fortifie le lien entre BRCA2 et le remodelage de la chromatine puisque EMSY interagit aussi avec des protéines qui modulent la structure de la chromatine. Ainsi, si BRCA2 est impliquée dans le remodelage de la chromatine, la fréquence de RH induite par une CDB devrait diminuer au lieu d'augmenter en présence de EMSY.

6. RÉFÉRENCES

6. Références

Abbott, D. W., Freeman, M. L., and Holt, J. T. (1998). Double-strand break repair deficiency and radiation sensitivity in BRCA2 mutant cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 90, 978-985.

Abbott, D. W., Thompson, M. E., Robinson-Benion, C., Tomlinson, G., Jensen, R. A., and Holt, J. T. (1999). BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem* 274, 18808-18812.

Adair, G. M., Rolig, R. L., Moore-Faver, D., Zabelshansky, M., Wilson, J. H., and Nairn, R. S. (2000). Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *Embo J* 19, 5552-5561.

Adams, M. D., McVey, M., and Sekelsky, J. J. (2003). Drosophila BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* 299, 265-267.

Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72, 1117-1130.

Averbeck, D. (2000). [Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]. *Cancer Radiother* 4, 335-354.

Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J. N., Ried, T., Tagle, D., and Wynshaw-Boris, A. (1996). Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86, 159-171.

Baskaran, R., Wood, L. D., Whitaker, L. L., Canman, C. E., Morgan, S. E., Xu, Y., Barlow, C., Baltimore, D., Wynshaw-Boris, A., Kastan, M. B., and Wang, J. Y. (1997). Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* 387, 516-519.

Baumann, P., Benson, F. E., and West, S. C. (1996). Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87, 757-766.

Baumann, P., and West, S. C. (1997). The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *Embo J* 16, 5198-5206.

Belmaaza, A., and Chartrand, P. (1994). One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat Res* 314, 199-208.

Belmaaza, A., Milot, E., Villemure, J. F., and Chartrand, P. (1994). Interference of DNA sequence divergence with precise recombinational DNA repair in mammalian cells. *Embo J* 13, 5355-5360.

Belmaaza, A., Wallenburg, J. C., Brouillette, S., Gusew, N., and Chartrand, P. (1990). Genetic exchange between endogenous and exogenous LINE-1 repetitive elements in mouse cells. *Nucleic Acids Res* 18, 6385-6391.

Bennett, C. B., Lewis, A. L., Baldwin, K. K., and Resnick, M. A. (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5613-5617.

Benson, F. E., Baumann, P., and West, S. C. (1998). Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* 391, 401-404.

Benson, F. E., Stasiak, A., and West, S. C. (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *Embo J* 13, 5764-5771.

Bertwistle, D., Swift, S., Marston, N. J., Jackson, L. E., Crossland, S., Crompton, M. R., Marshall, C. J., and Ashworth, A. (1997). Nuclear location and cell cycle regulation of the BRCA2 protein. *Cancer Res* 57, 5485-5488.

Bignell, G., Micklem, G., Stratton, M. R., Ashworth, A., and Wooster, R. (1997). The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum Mol Genet* 6, 53-58.

Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100, 243-255.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Bogliolo, M., Taylor, R. M., Caldecott, K. W., and Frosina, G. (2000). Reduced ligation during DNA base excision repair supported by BRCA2 mutant cells. *Oncogene* 19, 5781-5787.

Bollag, R. J., Waldman, A. S., and Liskay, R. M. (1989). Homologous recombination in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 23, 199-225.

Bork, P., Blomberg, N., and Nilges, M. (1996). Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat Genet* 13, 22-23.

Brenneman, M. A., Wagener, B. M., Miller, C. A., Allen, C., and Nickoloff, J. A. (2002). XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell* 10, 387-395.

Brown, E. J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 397-402.

Brugarolas, J., and Jacks, T. (1997). Double indemnity: p53, BRCA and cancer. p53 mutation partially rescues developmental arrest in Brca1 and Brca2 null mice, suggesting a role for familial breast cancer genes in DNA damage repair. *Nat Med* 3, 721-722.

Brush, G. S., Morrow, D. M., Hieter, P., and Kelly, T. J. (1996). The ATM homologue MEC1 is required for phosphorylation of replication protein A in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15075-15080.

Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B., and Siliciano, J. D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.

Capizzi, R. L., and Jameson, J. W. (1973). A table for the estimation of the spontaneous mutation rate of cells in culture. *Mutat Res* 17, 147-148.

Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J. G., Rogan, E., and Roy, D. (2000). Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 75-93.

Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., and White, R. L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305, 779-784.

Cervantes, M. D., Farah, J. A., and Smith, G. R. (2000). Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Mol Cell* 5, 883-888.

Chaturvedi, P., Eng, W. K., Zhu, Y., Mattern, M. R., Mishra, R., Hurle, M. R., Zhang, X., Annan, R. S., Lu, Q., Faucette, L. F., *et al.* (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* 18, 4047-4054.

Chen, C. F., Chen, P. L., Zhong, Q., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999a). Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G(2)/M checkpoint control. *J Biol Chem* 274, 32931-32935.

Chen, G., Yuan, S. S., Liu, W., Xu, Y., Trujillo, K., Song, B., Cong, F., Goff, S. P., Wu, Y., Arlinghaus, R., *et al.* (1999b). Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem* 274, 12748-12752.

Chen, J., Silver, D. P., Walpita, D., Cantor, S. B., Gazdar, A. F., Tomlinson, G., Couch, F. J., Weber, B. L., Ashley, T., Livingston, D. M., and Scully, R. (1998a). Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 2, 317-328.

Chen, J. J., Silver, D., Cantor, S., Livingston, D. M., and Scully, R. (1999c). BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res* 59, 1752s-1756s.

Chen, J. M., and Ferec, C. (2000). Gene conversion-like missense mutations in the human cationic trypsinogen gene and insights into the molecular evolution of the human trypsinogen family. *Mol Genet Metab* 71, 463-469.

Chen, M., Tomkins, D. J., Auerbach, W., McKerlie, C., Youssoufian, H., Liu, L., Gan, O., Carreau, M., Auerbach, A., Groves, T., *et al.* (1996). Inactivation of Fac in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat Genet* 12, 448-451.

Chen, P. L., Chen, C. F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1998b). The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5287-5292.

Clark, A. J. (1996). *recA* mutants of *E. coli* K12: a personal turning point. *Bioessays* 18, 767-772.

Cleton-Jansen, A. M., Collins, N., Lakhani, S. R., Weissenbach, J., Devilee, P., Cornelisse, C. J., and Stratton, M. R. (1995). Loss of heterozygosity in sporadic breast tumours at the BRCA2 locus on chromosome 13q12-q13. *Br J Cancer* 72, 1241-1244.

Clever, B., Interthal, H., Schmuckli-Maurer, J., King, J., Sigrist, M., and Heyer, W. D. (1997). Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *Embo J* 16, 2535-2544.

Connor, F., Bertwistle, D., Mee, P. J., Ross, G. M., Swift, S., Grigorieva, E., Tybulewicz, V. L., and Ashworth, A. (1997). Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating *Brca2* mutation. *Nat Genet* *17*, 423-430.

Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J., and Marians, K. J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* *404*, 37-41.

Cressman, V. L., Backlund, D. C., Avrutskaya, A. V., Leadon, S. A., Godfrey, V., and Koller, B. H. (1999). Growth retardation, DNA repair defects, and lack of spermatogenesis in *BRCA1*-deficient mice. *Mol Cell Biol* *19*, 7061-7075.

D'Andrea, A. D., and Grompe, M. (1997). Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. *Blood* *90*, 1725-1736.

Dasika, G. K., Lin, S. C., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A., and Lee, E. Y. (1999). DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* *18*, 7883-7899.

Davies, A. A., Masson, J. Y., McIlwraith, M. J., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A. R., and West, S. C. (2001). Role of *BRCA2* in control of the *RAD51* recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* *7*, 273-282.

de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and te Riele, H. (1995). Inactivation of the mouse *Msh2* gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* *82*, 321-330.

de Wind, N., Dekker, M., van Rossum, A., van der Valk, M., and te Riele, H. (1998). Mouse models for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 248-255.

Dellaire, G., Lemieux, N., Belmaaza, A., and Chartrand, P. (1997). Ectopic gene targeting exhibits a bimodal distribution of integration in murine cells, indicating that both intra- and interchromosomal sites are accessible to the targeting vector. *Mol Cell Biol* 17, 5571-5580.

Dernburg, A. F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., and Villeneuve, A. M. (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94, 387-398.

Difilippantonio, M. J., Zhu, J., Chen, H. T., Meffre, E., Nussenzweig, M. C., Max, E. E., Ried, T., and Nussenzweig, A. (2000). DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 404, 510-514.

Digweed, M., Reis, A., and Sperling, K. (1999). Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays* 21, 649-656.

Eggleston, P., and Zhao, Y. (2001). A sensitive and rapid assay for homologous recombination in mosquito cells: impact of vector topology and implications for gene targeting. *BMC Genet* 2, 21.

Eisen, J. A., Sweder, K. S., and Hanawalt, P. C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res* 23, 2715-2723.

Ellis, J., and Bernstein, A. (1989). Gene targeting with retroviral vectors: recombination by gene conversion into regions of nonhomology. *Mol Cell Biol* 9, 1621-1627.

Elson, A., Wang, Y., Daugherty, C. J., Morton, C. C., Zhou, F., Campos-Torres, J., and Leder, P. (1996). Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13084-13089.

Enomoto, T. (2001). Functions of RecQ family helicases: possible involvement of Bloom's and Werner's syndrome gene products in guarding genome integrity during DNA replication. *J Biochem (Tokyo)* 129, 501-507.

Essers, J., Hendriks, R. W., Swagemakers, S. M., Troelstra, C., de Wit, J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., and Kanaar, R. (1997). Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* 89, 195-204.

Featherstone, C., and Jackson, S. P. (1999). DNA double-strand break repair. *Curr Biol* 9, R759-761.

Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D. T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., *et al.* (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 62, 676-689.

Frankenberg-Schwager, M. (1989). Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol* 14, 307-320.

Freneaux, P., Stoppa-Lyonnet, D., Mouret, E., Kambouchner, M., Nicolas, A., Zafrani, B., Vincent-Salomon, A., Fourquet, A., Magdelenat, H., and Sastre-Garau, X. (2000). Low expression of bcl-2 in Brca1-associated breast cancers. *Br J Cancer* 83, 1318-1322.

Friedman, L. S., Thistlethwaite, F. C., Patel, K. J., Yu, V. P., Lee, H., Venkitaraman, A. R., Abel, K. J., Carlton, M. B., Hunter, S. M., Colledge, W. H., *et al.* (1998). Thymic lymphomas in mice with a truncating mutation in Brca2. *Cancer Res* 58, 1338-1343.

Fuks, F., Milner, J., and Kouzarides, T. (1998). BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene* 17, 2531-2534.

Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T., and Ohta, K. (1998). Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *Embo J* 17, 6412-6425.

Futamura, M., Arakawa, H., Matsuda, K., Katagiri, T., Saji, S., Miki, Y., and Nakamura, Y. (2000). Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1. *Cancer Res* 60, 1531-1535.

Futreal, P. A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L. M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y., and *et al.* (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 266, 120-122.

Gao, Y., Ferguson, D. O., Xie, W., Manis, J. P., Sekiguchi, J., Frank, K. M., Chaudhuri, J., Horner, J., DePinho, R. A., and Alt, F. W. (2000). Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* 404, 897-900.

Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A. D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* 7, 249-262.

Gatei, M., Young, D., Cerosaletti, K. M., Desai-Mehta, A., Spring, K., Kozlov, S., Lavin, M. F., Gatti, R. A., Concannon, P., and Khanna, K. (2000). ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 25, 115-119.

Gatei, M., Zhou, B. B., Hobson, K., Scott, S., Young, D., and Khanna, K. K. (2001). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *J Biol Chem* 276, 17276-17280.

Goggins, M., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (2000). BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol* 156, 1767-1771.

Goggins, M., Schutte, M., Lu, J., Moskaluk, C. A., Weinstein, C. L., Petersen, G. M., Yeo, C. J., Jackson, C. E., Lynch, H. T., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (1996). Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 56, 5360-5364.

Gonzalez, R., Silva, J. M., Dominguez, G., Garcia, J. M., Martinez, G., Vargas, J., Provencio, M., Espana, P., and Bonilla, F. (1999). Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 loci in breast cancer: pathological correlations. *Br J Cancer* 81, 503-509.

Gowen, L. C., Avrutskaya, A. V., Latour, A. M., Koller, B. H., and Leadon, S. A. (1998). BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science* 281, 1009-1012.

Gowen, L. C., Johnson, B. L., Latour, A. M., Sulik, K. K., and Koller, B. H. (1996). Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet* 12, 191-194.

Gray, M. D., Shen, J. C., Kamath-Loeb, A. S., Blank, A., Sopher, B. L., Martin, G. M., Oshima, J., and Loeb, L. A. (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 17, 100-103.

Grunstein, M., and Hogness, D. S. (1992). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. 1975. *Biotechnology* 24, 117-121.

Haber, J. E. (1992). Exploring the pathways of homologous recombination. *Curr Opin Cell Biol* 4, 401-412.

Haber, J. E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24, 271-275.

Haber, J. E. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16, 259-264.

Hakem, R., de la Pompa, J. L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmair, A., Billia, F., *et al.* (1996). The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* 85, 1009-1023.

Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., and King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250, 1684-1689.

Harrington, J. J., and Lieber, M. R. (1994). The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease. *Embo J* 13, 1235-1246.

Harrington, J. J., and Lieber, M. R. (1995). DNA structural elements required for FEN-1 binding. *J Biol Chem* 270, 4503-4508.

Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5, 282-304.

Houghtaling, S., Timmers, C., Noll, M., Finegold, M. J., Jones, S. N., Meyn, M. S., and Grompe, M. (2003). Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev* 17, 2021-2035.

Howlett, N. G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., *et al.* (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297, 606-609.

Hu, Y. F., Hao, Z. L., and Li, R. (1999). Chromatin remodeling and activation of chromosomal DNA replication by an acidic transcriptional activation domain from BRCA1. *Genes Dev* 13, 637-642.

Huang, S., Li, B., Gray, M. D., Oshima, J., Mian, I. S., and Campisi, J. (1998). The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'-->5' exonuclease. *Nat Genet* 20, 114-116.

Hughes-Davies, L., Huntsman, D., Ruas, M., Fuks, F., Bye, J., Chin, S. F., Milner, J., Brown, L. A., Hsu, F., Gilks, B., *et al.* (2003). EMSY Links the BRCA2 Pathway to Sporadic Breast and Ovarian Cancer. *Cell* 115, 523-535.

Hunter, N., and Kleckner, N. (2001). The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* 106, 59-70.

Hussain, S., Witt, E., Huber, P. A., Medhurst, A. L., Ashworth, A., and Mathew, C. G. (2003). Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Hum Mol Genet* 12, 2503-2510.

Hutchinson, F. (1993). Induction of large DNA deletions by persistent nicks: a new hypothesis. *Mutat Res* 299, 211-218.

Hyrien, O. (2000). Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie* 82, 5-17.

Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., and Haber, J. E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 693-704.

Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* 12, 224-228.

Jiang, H., Xie, Y., Houston, P., Stemke-Hale, K., Mortensen, U. H., Rothstein, R., and Kodadek, T. (1996). Direct association between the yeast Rad51 and Rad54 recombination proteins. *J Biol Chem* 271, 33181-33186.

Johnson, R. D., and Jasin, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J* 19, 3398-3407.

Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M., and Berns, A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* 29, 418-425.

Karow, J. K., Chakraverty, R. K., and Hickson, I. D. (1997). The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. *J Biol Chem* 272, 30611-30614.

Karran, P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 10, 144-150.

Kato, M., Yano, K., Matsuo, F., Saito, H., Katagiri, T., Kurumizaka, H., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama, F., Sakamoto, G., *et al.* (2000). Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J Hum Genet* 45, 133-137.

Khanna, K. K. (2000). Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst* 92, 795-802.

Khanna, K. K., and Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27, 247-254.

Klein, H. L. (1995). Genetic control of intrachromosomal recombination. *Bioessays* 17, 147-159.

Kojic, M., Yang, H., Kostrub, C. F., Pavletich, N. P., and Holloman, W. K. (2003). The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell* *12*, 1043-1049.

Kolomietz, E., Meyn, M. S., Pandita, A., and Squire, J. A. (2002). The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* *35*, 97-112.

Kowalczykowski, S. C. (2002). Molecular mimicry connects BRCA2 to Rad51 and recombinational DNA repair. *Nat Struct Biol* *9*, 897-899.

Kraus, E., Leung, W. Y., and Haber, J. E. (2001). Break-induced replication: a review and an example in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8255-8262.

Labuda, D., Zietkiewicz, E., and Mitchell, GA. (1995). Alu elements as a source of genome variation: deleterious effects and evolutionary novelties. In: Maraia RJ, editor. *The impact of short interspersed elements (SINEs) on the host genome*. R.G. Landes. 1-22.

Lambert, S., and Lopez, B. S. (2000). Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *Embo J* *19*, 3090-3099.

Lambert, S., Saintigny, Y., Delacote, F., Amiot, F., Chaput, B., Lecomte, M., Huck, S., Bertrand, P., and Lopez, B. S. (1999). Analysis of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cell, using tandem repeat sequences. *Mutat Res* *433*, 159-168.

Larminat, F., Germanier, M., Papouli, E., and Defais, M. (2002). Deficiency in BRCA2 leads to increase in non-conservative homologous recombination. *Oncogene* 21, 5188-5192.

Lavin, M. F., Concannon, P., and Gatti, R. A. (1999). Eighth International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (ATW8). *Cancer Res* 59, 3845-3849.

Lavin, M. F., and Khanna, K. K. (1999). ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol* 75, 1201-1214.

Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J., and Sarasin, A. (2000). BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* 60, 5548-5552.

Lee, H., Trainer, A. H., Friedman, L. S., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Ponder, B. A., and Venkitaraman, A. R. (1999). Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2. *Mol Cell* 4, 1-10.

Lee, M., Daniels, M. J., and Venkitaraman, A. R. (2003). Phosphorylation of BRCA2 by the Polo-like kinase Plk1 is regulated by DNA damage and mitotic progression. *Oncogene*.

Liao, D., Pavelitz, T., Kidd, J. R., Kidd, K. K., and Weiner, A. M. (1997). Concerted evolution of the tandemly repeated genes encoding human U2 snRNA (the RNU2 locus) involves rapid intrachromosomal homogenization and rare interchromosomal gene conversion. *Embo J* 16, 588-598.

Liehr, J. G. (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* *21*, 40-54.

Lim, D. S., and Hasty, P. (1996). A mutation in mouse *rad51* results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in *p53*. *Mol Cell Biol* *16*, 7133-7143.

Lin, F. L., Sperle, K., and 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*, 1020-1034.

Lin, F. L., Sperle, K., and Sternberg, N. (1990). Intermolecular recombination between DNAs introduced into mouse L cells is mediated by a nonconservative pathway that leads to crossover products. *Mol Cell Biol* *10*, 103-112.

Lin, W. C., and Desiderio, S. (1995). V(D)J recombination and the cell cycle. *Immunol Today* *16*, 279-289.

Liu, C. Y., Flesken-Nikitin, A., Li, S., Zeng, Y., and Lee, W. H. (1996). Inactivation of the mouse *Brca1* gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development. *Genes Dev* *10*, 1835-1843.

Ludwig, T., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E., and Efstratiadis, A. (1997). Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of *Brca1*, *Brca2*, *Brca1/Brca2*, *Brca1/p53*, and *Brca2/p53* nullizygous embryos. *Genes Dev* *11*, 1226-1241.

Lundin, C., Erixon, K., Arnaudeau, C., Schultz, N., Jenssen, D., Meuth, M., and Helleday, T. (2002). Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 22, 5869-5878.

Lundin, C., Schultz, N., Arnaudeau, C., Mohindra, A., Hansen, L. T., and Helleday, T. (2003). RAD51 is involved in repair of damage associated with DNA replication in mammalian cells. *J Mol Biol* 328, 521-535.

Luo, G., Santoro, I. M., McDaniel, L. D., Nishijima, I., Mills, M., Youssoufian, H., Vogel, H., Schultz, R. A., and Bradley, A. (2000). Cancer predisposition caused by elevated mitotic recombination in Bloom mice. *Nat Genet* 26, 424-429.

Luo, G., Yao, M. S., Bender, C. F., Mills, M., Bladl, A. R., Bradley, A., and Petrini, J. H. (1999). Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7376-7381.

Luria, S.E. and Delbrück, M (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28, 491-511.

Maacke, H., Jost, K., Opitz, S., Miska, S., Yuan, Y., Hasselbach, L., Luttgies, J., Kalthoff, H., and Sturzbecher, H. W. (2000). DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 19, 2791-2795.

Marmorstein, L. Y., Kinev, A. V., Chan, G. K., Bochar, D. A., Beniya, H., Epstein, J. A., Yen, T. J., and Shiekhattar, R. (2001). A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell* 104, 247-257.

Marmorstein, L. Y., Ouchi, T., and Aaronson, S. A. (1998). The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13869-13874.

Marston, N. J., Richards, W. J., Hughes, D., Bertwistle, D., Marshall, C. J., and Ashworth, A. (1999). Interaction between the product of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 and DSS1, a protein functionally conserved from yeast to mammals. *Mol Cell Biol* 19, 4633-4642.

Mazin, A. V., Zaitseva, E., Sung, P., and Kowalczykowski, S. C. (2000). Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing. *Embo J* 19, 1148-1156.

McIlwraith, M. J., Van Dyck, E., Masson, J. Y., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., and West, S. C. (2000). Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins. *J Mol Biol* 304, 151-164.

Merel, P., Prieur, A., Pfeiffer, P., and Delattre, O. (2002). Absence of major defects in non-homologous DNA end joining in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 21, 5654-5659.

Meselson, M. S., and Radding, C. M. (1975). A general model for genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 358-361.

Meyn, M. S. (1993). High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. *Science* 260, 1327-1330.

Michel, B., Flores, M. J., Viguera, E., Grompone, G., Seigneur, M., and Bidnenko, V. (2001). Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8181-8188.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W., and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.

Milner, J., Fuks, F., Hughes-Davies, L., and Kouzarides, T. (2000). The BRCA2 activation domain associates with and is phosphorylated by a cellular protein kinase. *Oncogene* 19, 4441-4445.

Milner, J., Ponder, B., Hughes-Davies, L., Seltmann, M., and Kouzarides, T. (1997). Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 386, 772-773.

Miyake, T., Hu, Y. F., Yu, D. S., and Li, R. (2000). A functional comparison of BRCA1 C-terminal domains in transcription activation and chromatin remodeling. *J Biol Chem* 275, 40169-40173.

Mizuta, R., LaSalle, J. M., Cheng, H. L., Shinohara, A., Ogawa, H., Copeland, N., Jenkins, N. A., Lalande, M., and Alt, F. W. (1997). RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6927-6932.

Mohaghegh, P., and Hickson, I. D. (2002). Premature aging in RecQ helicase-deficient human syndromes. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1496-1501.

Mohindra, A., Hays, L. E., Phillips, E. N., Preston, B. D., Helleday, T., and Meuth, M. (2002). Defects in homologous recombination repair in mismatch-repair-deficient tumour cell lines. *Hum Mol Genet* 11, 2189-2200.

Morrison, C., Shinohara, A., Sonoda, E., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., Weichselbaum, R. R., and Takeda, S. (1999). The essential functions of human Rad51 are independent of ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol* 19, 6891-6897.

Moynahan, M. E., Chiu, J. W., Koller, B. H., and Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 4, 511-518.

Moynahan, M. E., Pierce, A. J., and Jasin, M. (2001). BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 7, 263-272.

Mudgett, J. S., and Taylor, W. D. (1990). Recombination between irradiated shuttle vector DNA and chromosomal DNA in African green monkey kidney cells. *Mol Cell Biol* 10, 37-46.

Nakanishi, K., Taniguchi, T., Ranganathan, V., New, H. V., Moreau, L. A., Stotsky, M., Mathew, C. G., Kastan, M. B., Weaver, D. T., and D'Andrea, A. D. (2002). Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol* 4, 913-920.

New, J. H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S. C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 391, 407-410.

Nordling, M., Karlsson, P., Wahlstrom, J., Engwall, Y., Wallgren, A., and Martinsson, T. (1998). A large deletion disrupts the exon 3 transcription activation domain of the BRCA2 gene in a breast/ovarian cancer family. *Cancer Res* 58, 1372-1375.

Orr-Weaver, T. (1996). Meiotic nondisjunction does the two-step. *Nat Genet* 14, 374-376.

Osman, F., and Subramani, S. (1998). Double-strand break-induced recombination in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58, 263-299.

Pao, G. M., Janknecht, R., Ruffner, H., Hunter, T., and Verma, I. M. (2000). CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1020-1025.

Paques, F., and Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 349-404.

Pastink, A., Eeken, J. C., and Lohman, P. H. (2001). Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutat Res* 480-481, 37-50.

Patel, K. J., Yu, V. P., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Colledge, W. H., Friedman, L. S., Ponder, B. A., and Venkitaraman, A. R. (1998). Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* 1, 347-357.

Paull, T. T., Cortez, D., Bowers, B., Elledge, S. J., and Gellert, M. (2001). Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6086-6091.

Paull, T. T., and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* *1*, 969-979.

Paull, T. T., and Gellert, M. (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* *13*, 1276-1288.

Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* *10*, 886-895.

Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T. L., and Venkitaraman, A. R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* *420*, 287-293.

Petukhova, G., Stratton, S., and Sung, P. (1998). Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature* *393*, 91-94.

Pichierri, P., Franchitto, A., Piergentili, R., Colussi, C., and Palitti, F. (2001). Hypersensitivity to camptothecin in MSH2 deficient cells is correlated with a role for MSH2 protein in recombinational repair. *Carcinogenesis* *22*, 1781-1787.

Powell, S. N., Willers, H., and Xia, F. (2002). BRCA2 Keeps Rad51 in Line. High-Fidelity Homologous Recombination Prevents Breast and Ovarian Cancer? *Mol Cell* *10*, 1262-1263.

Prince, P. R., Emond, M. J., and Monnat, R. J., Jr. (2001). Loss of Werner syndrome protein function promotes aberrant mitotic recombination. *Genes Dev* *15*, 933-938.

Puchta, H., Dujon, B., and Hohn, B. (1996). Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 5055-5060.

Rahman, N., and Stratton, M. R. (1998). The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet* *32*, 95-121.

Ramus, S. J., Bobrow, L. G., Pharoah, P. D., Finnigan, D. S., Fishman, A., Altaras, M., Harrington, P. A., Gayther, S. A., Ponder, B. A., and Friedman, L. S. (1999). Increased frequency of TP53 mutations in BRCA1 and BRCA2 ovarian tumours. *Genes Chromosomes Cancer* *25*, 91-96.

Reitmair, A. H., Schmits, R., Ewel, A., Bapat, B., Redston, M., Mitri, A., Waterhouse, P., Mittrucker, H. W., Wakeham, A., Liu, B., and et al. (1995). MSH2 deficient mice are viable and susceptible to lymphoid tumours. *Nat Genet* *11*, 64-70.

Richardson, C., and Jasin, M. (2000). Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* *20*, 9068-9075.

Richardson, C., Moynahan, M. E., and Jasin, M. (1998). Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev* *12*, 3831-3842.

Rijkers, T., Van Den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A. G., Baarends, W. M., Van Sloun, P. P., Lohman, P. H., and Pastink, A. (1998). Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* *18*, 6423-6429.

Rio, P., Segovia, J. C., Hanenberg, H., Casado, J. A., Martinez, J., Gottsche, K., Cheng, N. C., Van de Vrugt, H. J., Arwert, F., Joenje, H., and Bueren, J. A. (2002). In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood* *100*, 2032-2039.

Rothstein, R., Michel, B., and Gangloff, S. (2000). Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev* *14*, 1-10.

Rubin, E., and Levy, A. A. (1997). Abortive gap repair: underlying mechanism for Ds element formation. *Mol Cell Biol* *17*, 6294-6302.

Saintigny, Y., Delacote, F., Vares, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbek, D., and Lopez, B. S. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *Embo J* *20*, 3861-3870.

Sakagami, K., Tokinaga, Y., Yoshikura, H., and Kobayashi, I. (1994). Homology-associated nonhomologous recombination in mammalian gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8527-8531.

Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. In *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 2nd ed. Cold spring harbour laboratory press, Chap.18.

Sarkisian, C. J., Master, S. R., Huber, L. J., Ha, S. I., and Chodosh, L. A. (2001). Analysis of murine Brca2 reveals conservation of protein-protein interactions but differences in nuclear localization signals. *J Biol Chem* *276*, 37640-37648.

Schubert, E. L., Lee, M. K., Mefford, H. C., Argonza, R. H., Morrow, J. E., Hull, J., Dann, J. L., and King, M. C. (1997). BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am J Hum Genet* 60, 1031-1040.

Schwab, M., Claas, A., and Savelyeva, L. (2002). BRCA2: a genetic risk factor for breast cancer. *Cancer Lett* 175, 1-8.

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D. M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-275.

Scully, R., and Livingston, D. M. (2000). In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 408, 429-432.

Scully, R., and Puget, N. (2002). BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast cancer. *Biochimie* 84, 95-102.

Scully, R., Puget, N., and Vlasakova, K. (2000). DNA polymerase stalling, sister chromatid recombination and the BRCA genes. *Oncogene* 19, 6176-6183.

Serova, O. M., Mazoyer, S., Puget, N., Dubois, V., Tonin, P., Shugart, Y. Y., Goldgar, D., Narod, S. A., Lynch, H. T., and Lenoir, G. M. (1997). Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes? *Am J Hum Genet* 60, 486-495.

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

Sharan, S. K., and Bradley, A. (1997). Murine Brca2: sequence, map position, and expression pattern. *Genomics* 40, 234-241.

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

Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457-470.

Shinohara, A., and Ogawa, T. (1998). Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature* 391, 404-407.

Siegel, G., Turchi, J. J., Myers, T. W., and Bambara, R. A. (1992). A 5' to 3' exonuclease functionally interacts with calf DNA polymerase epsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9377-9381.

Simchen, G., and Hugerat, Y. (1993). What determines whether chromosomes segregate reductionally or equationally in meiosis? *Bioessays* 15, 1-8.

Smit, A. F. (1999). Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9, 657-663.

Smith, K. N., and Nicolas, A. (1998). Recombination at work for meiosis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 200-211.

Smith, P. D., Crossland, S., Parker, G., Osin, P., Brooks, L., Waller, J., Philp, E., Crompton, M. R., Gusterson, B. A., Allday, M. J., and Crook, T. (1999). Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions. *Oncogene 18*, 2451-2459.

Smith, T. M., Lee, M. K., Szabo, C. I., Jerome, N., McEuen, M., Taylor, M., Hood, L., and King, M. C. (1996). Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res 6*, 1029-1049.

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

Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., and Takeda, S. (1999). Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol 19*, 5166-5169.

Spain, B. H., Larson, C. J., Shihabuddin, L. S., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1999). Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A 96*, 13920-13925.

Strathern, J. N., Weinstock, K. G., Higgins, D. R., and McGill, C. B. (1991). A novel recombinator in yeast based on gene II protein from bacteriophage ϕ 1. *Genetics 127*, 61-73.

Sugawara, N., Ivanov, E. L., Fishman-Lobell, J., Ray, B. L., Wu, X., and Haber, J. E. (1995). DNA structure-dependent requirements for yeast RAD genes in gene conversion. *Nature* 373, 84-86.

Sugawara, N., Paques, F., Colaiacovo, M., and Haber, J. E. (1997). Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9214-9219.

Sung, P. (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* 265, 1241-1243.

Sung, P. (1997a). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem* 272, 28194-28197.

Sung, P. (1997b). Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev* 11, 1111-1121.

Sung, P., and Robberson, D. L. (1995). DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* 82, 453-461.

Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Hakem, R., Elia, A., Yoshida, R., Mo, R., Nishina, H., Chuang, T., Wakeham, A., Itie, A., *et al.* (1997). Brca2 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Genes Dev* 11, 1242-1252.

Suzuki, N., Shiratori, M., Goto, M., and Furuichi, Y. (1999). Werner syndrome helicase contains a 5'→3' exonuclease activity that digests DNA and RNA strands in DNA/DNA and RNA/DNA duplexes dependent on unwinding. *Nucleic Acids Res* 27, 2361-2368.

Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J., and Stahl, F. W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25-35.

Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and 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, 5497-5508.

Takata, M., Tachiiri, S., Fujimori, A., Thompson, L. H., Miki, Y., Hiraoka, M., Takeda, S., and Yamazoe, M. (2002). Conserved domains in the chicken homologue of BRCA2. *Oncogene* 21, 1130-1134.

Tarsounas, M., Davies, D., and West, S. C. (2003). BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* 22, 1115-1123.

Tashiro, S., Walter, J., Shinohara, A., Kamada, N., and Cremer, T. (2000). Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *J Cell Biol* 150, 283-291.

Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., van Gent, D. C., Shiraishi, T., Verkaik, N. S., vanHeems, D., Ito, E., Nakamura, A., Sonoda, E., *et al.* (2002). Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* 420, 93-98.

Tavtigian, S. V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacius, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D., *et al.* (1996). The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 12, 333-337.

The Breast Cancer Linkage Consortium. (1999). Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 91, 1310-1316.

Thaler, D. S., and Stahl, F. W. (1988). DNA double-chain breaks in recombination of phage lambda and of yeast. *Annu Rev Genet* 22, 169-197.

Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., Sarkaria, J. N., Cliby, W. A., Shieh, S. Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R. T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13, 152-157.

Trujillo, K. M., Yuan, S. S., Lee, E. Y., and Sung, P. (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* 273, 21447-21450.

Tsubouchi, H., and Ogawa, H. (1998). A novel mre11 mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol* 18, 260-268.

Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and Morita T (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6236-6240.

Tutt, A., Bertwistle, D., Valentine, J., Gabriel, A., Swift, S., Ross, G., Griffin, C., Thacker, J., and Ashworth, A. (2001). Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *Embo J* 20, 4704-4716.

Van Dyck, E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., and West, S. C. (1999). Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 398, 728-731.

Vaughn, J. P., Cirisano, F. D., Huper, G., Berchuck, A., Futreal, P. A., Marks, J. R., and Iglehart, J. D. (1996). Cell cycle control of BRCA2. *Cancer Res* 56, 4590-4594.

Vedel, M., and Nicolas, A. (1999). CYS3, a hotspot of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Effects of heterozygosity and mismatch repair functions on gene conversion and recombination intermediates. *Genetics* 151, 1245-1259.

Venkitaraman, A. R. (2001a). Chromosome stability, DNA recombination and the BRCA2 tumour suppressor. *Curr Opin Cell Biol* 13, 338-343.

Venkitaraman, A. R. (2001b). Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* 114, 3591-3598.

Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108, 171-182.

Villemure, J. F., Abaji, C., Cousineau, I., and Belmaaza, A. (2003). MSH2-deficient human cells exhibit a defect in the accurate termination of homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 63, 3334-3339.

Villemure, J. F., and Belmaaza, A. (1999). Effects of sequence divergence on the efficiency of extrachromosomal recombination in mismatch repair proficient and deficient mammalian cell lines. *Somat Cell Mol Genet* 25, 79-90.

Villemure, J. F., Belmaaza, A., and Chartrand, P. (1997). The processing of DNA ends at double-strand breaks during homologous recombination: different roles for the two ends. *Mol Gen Genet* 256, 533-538.

Vispe, S., Cazaux, C., Lesca, C., and Defais, M. (1998). Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* 26, 2859-2864.

Wang, H., Zeng, Z. C., Bui, T. A., DiBiase, S. J., Qin, W., Xia, F., Powell, S. N., and Iliakis, G. (2001). Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. *Cancer Res* 61, 270-277.

Wang, S., Magoulas, C., and Hickey, D. (1999). Concerted evolution within a trypsin gene cluster in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 16, 1117-1124.

Wang, S. C., Lin, S. H., Su, L. K., and Hung, M. C. (1997). Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 247-251.

Wang, S. C., Shao, R., Pao, A. Y., Zhang, S., Hung, M. C., and Su, L. K. (2002). Inhibition of cancer cell growth by BRCA2. *Cancer Res* 62, 1311-1314.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14, 927-939.

Ward, J. F. (1995). Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat Res* 142, 362-368.

Welsh, P. L., Schubert, E. L., and King, M. C. (1998). Inherited breast cancer: an emerging picture. *Clin Genet* 54, 447-458.

Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol* 42, 225-249.

Weng, Y. S., and Nickoloff, J. A. (1998). Evidence for independent mismatch repair processing on opposite sides of a double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 59-70.

West, S. C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 435-445.

Whitney, M. A., Royle, G., Low, M. J., Kelly, M. A., Axthelm, M. K., Reifsteck, C., Olson, S., Braun, R. E., Heinrich, M. C., Rathbun, R. K., *et al.* (1996). Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. *Blood* 88, 49-58.

Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V., and Bartel, P. L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J Biol Chem* 272, 31941-31944.

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 378, 789-792.

Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., and et al. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265, 2088-2090.

Xia, F., Taghian, D. G., DeFrank, J. S., Zeng, Z. C., Willers, H., Iliakis, G., and Powell, S. N. (2001). Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8644-8649.

Xiao, Y., and Weaver, D. T. (1997). Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 25, 2985-2991.

Xu, X., Weaver, Z., Linke, S. P., Li, C., Gotay, J., Wang, X. W., Harris, C. C., Ried, T., and Deng, C. X. (1999). Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* 3, 389-395.

Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E. E., Bronson, R. T., Meyn, M. S., and Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev* 10, 2411-2422.

Yamamoto, K., Ishiai, M., Matsushita, N., Arakawa, H., Lamerdin, J. E., Buerstedde, J. M., Tanimoto, M., Harada, M., Thompson, L. H., and Takata, M. (2003). Fanconi anemia FANCG protein in mitigating radiation- and enzyme-induced DNA double-strand breaks by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* 23, 5421-5430.

Yang, Y., Kuang, Y., De Oca, R. M., Hays, T., Moreau, L., Lu, N., Seed, B., and D'Andrea, A. D. (2001). Targeted disruption of the murine Fanconi anemia gene, *Fancg/Xrcc9*. *Blood* 98, 3435-3440.

Yano, K., Morotomi, K., Saito, H., Kato, M., Matsuo, F., and Miki, Y. (2000). Nuclear localization signals of the BRCA2 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 171-175.

Yarden, R. I., and Brody, L. C. (1999). BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4983-4988.

Yoshikawa, K., Ogawa, T., Baer, R., Hemmi, H., Honda, K., Yamauchi, A., Inamoto, T., Ko, K., Yazumi, S., Motoda, H., *et al.* (2000). Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer* 88, 28-36.

Yu, V. P., Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L. A., van Gool, A. J., West, S. C., and Venkitaraman, A. R. (2000). Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* 14, 1400-1406.

Yuan, S. S., Lee, S. Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G. E., and Lee, E. Y. (1999). BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res* 59, 3547-3551.

Yuan, Z. M., Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kharbanda, S., Wang, R., Sung, P., Shinohara, A., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1998). Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem* 273, 3799-3802.

Zhang, H., Tomblin, G., and Weber, B. L. (1998). BRCA1, BRCA2, and DNA damage response: collision or collusion? *Cell* 92, 433-436.

Zheng, L., Li, S., Boyer, T. G., and Lee, W. H. (2000). Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* 19, 6159-6175.

Zhong, Q., Boyer, T. G., Chen, P. L., and Lee, W. H. (2002). Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brca1-null fibroblasts. *Cancer Res* 62, 3966-3970.

Zhong, Q., Chen, C. F., Li, S., Chen, Y., Wang, C. C., Xiao, J., Chen, P. L., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999). Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 285, 747-750.

Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L., and Nussenzweig, A. (2001). Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 11, 105-109.

ANNEXES

MSH2-deficient Human Cells Exhibit a Defect in the Accurate Termination of Homology-directed Repair of DNA Double-Strand Breaks¹

Josée-France Villemure, Christine Abaji, Isabelle Cousineau, and Abdellah Belmaaza²

Department of Biochemistry, Université de Montréal, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7 [J.-F. V.], and Department of Biochemistry [C. A.], Molecular Biology Program [I. C.], and Department of Microbiology and Immunology [A. B.], Université de Montréal, Centre de Recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1

ABSTRACT

Mutations in the mismatch repair (MMR) genes *hMSH2* and *hMLH1* have been associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Tumor cell lines that are deficient in MMR exhibit a high mutation rate, a defect in the response to certain types of DNA damage and in transcription-coupled repair, as well as an increase in the rate of gene amplification. We show here that *hMSH2*-deficient tumor cell lines lost most of their ability to accurately repair plasmid DNA double-strand breaks (DSBs) by homologous recombination, compared with MMR-proficient or *hMLH1*-deficient tumor cell lines. In all of these cell lines, DSB repair occurred almost exclusively by nonreciprocal homologous recombination: gene conversion (GC). However, there were two types of GC products: precise and rearranged. The rearranged products contained deletions or insertions of sequences and represented GC intermediates trapped at various stages and shunted to nonhomologous end joining. In MMR-proficient or *MLH1*-deficient cells, >50% of GC products were of the precise type, whereas in two *MSH2*-deficient backgrounds, this proportion decreased to 8%, whereas that of rearranged GC products increased by 2-fold. These results seem to predict a novel way by which *MSH2*-deficiency could promote mutation: deletion or insertion mutations associated with DSB repair, which may also contribute to cancer predisposition.

INTRODUCTION

MMR³ is a highly conserved repair system that corrects mismatches arising during DNA replication and safeguards genomic integrity (1–5). Defective MMR is strongly associated with HNPCC, an autosomal dominant inherited disease characterized by early onset colon tumors, as well as cancers of the endometrium, stomach, upper urinary tract, small intestine, and ovary (6, 7). MMR consists of at least seven proteins, including four bacterial MutL homologues, *hMLH1*, *hMLH3*, *hPMS1*, *hPMS2*, and three MutS homologues, *hMSH2*, *hMSH3*, and *hMSH6*. Defects in *hMSH2* and *hMLH1* appear to be the cause of most HNPCCs (8).

MMR proteins function as heterodimeric complexes. *hMSH2* can form a heterodimer with either *hMSH3* or *hMSH6*. *hMSH2* is a uniformly essential component of all of the heterodimers, whereas *hMSH3* and *hMSH6* modify substrates specificity. *hMSH2*-*hMSH6* heterodimer recognizes single bp mismatches and small IDLs, whereas *hMSH2*-*hMSH3* heterodimer recognizes an overlapping set

of small IDLs as well as larger IDLs, containing up to 12 nucleotides (9, 10). The relatively low number of *hMSH6* and *hMSH3* mutations in HNPCC kindreds has been attributed to their imparted redundancy in substrate specificity. *hMLH1* can form a heterodimer with *hPMS2*, *hPMS1*, or *hMLH3* (11). The three types of *hMutL* complexes are presumably functionally redundant. *hMutS* plays a central role in initiating mispair recognition and binding, and *hMutL* acts as a molecular matchmaker between *hMutS* and downstream proteins to complete the repair process (1–5). Therefore, both *hMSH2* and *hMLH1* are critically important to MMR activity, as reflected by their predominant alteration in HNPCC patients, as well as in most sporadic tumors with microsatellite instability.

The majority of cells deficient in MMR exhibit a mutator phenotype characterized by a 100–1000-fold increment in the rate of spontaneous mutation at microsatellites and coding sequences (12–15). However, studies on mice with MMR gene knockout indicate that mutations of MMR genes other than *hMSH2* and *hMLH1* may induce a mutator phenotype but not necessarily an increase in colon tumors, implying that a mutator phenotype alone may not be sufficient for intestinal tumor formation (16). In addition to editing replication, MMR proteins have also been implicated in the editing of recombination between divergent sequences, in transcription-coupled repair of DNA damage, and are also thought to function as lesion sensors for certain types of DNA damage that kill by triggering apoptosis (1, 3–5, 17). Moreover, MMR proteins inhibit gene amplifications (18, 19) and have been associated with the fidelity of DNA DSB repair, although the underlying mechanisms remain unknown (19–23).

DNA DSBs are common lesions that occur in all of the cells, and DSB repair is a fundamental mechanism of genome protection. There are two major DSB repair pathways in mammalian cells: homologous recombination and NHEJ (24). Defects in either pathway have been linked with genome instability and cancer (25–27). In mammalian cells, DSB repair by homologous recombination occurs almost exclusively by GC: a nonreciprocal transfer of genetic information from an intact homologous duplex to a broken duplex (28–30). In this pathway (31), DSBs are first processed to yield 3'-ended single-strand tails (Fig. 1a) that invade a homologous donor duplex (Fig. 1b). DNA synthesis is then primed from the 3' end of the invading strand, which results in the copying of donor information (Fig. 1c). DSB repair may be completed through displacement of the newly synthesized strand from the donor template and its annealing with the 3' noninvading single-stranded end to elicit GC only (Refs. 32–36; Fig. 1d). DSB repair by GC occurs with fidelity and reflects the capacity of cells to precisely restore the damaged DNA with no loss or gain of nucleotide sequences (Fig. 1d). NHEJ differs from GC in that there is no requirement for extensive homology between DSB ends, and is potentially error-prone, as nucleotide insertions and deletions are tolerated at the rejoining sites. GC and NHEJ compete with one another (37), but very little is known about how eukaryotic cells elect one or the other (38). Under certain circumstances, eukaryotic cells can couple GC and NHEJ to seal DSBs and ensure their genome stability (Fig. 1e; Refs. 30, 32–34, 39–45). In these cases, GC intermediates are interrupted at various stages and shunted to NHEJ, being characterized by deletions, insertions, or duplications of DNA sequences at

Received 10/16/02; accepted 4/8/03.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by the National Cancer Institute of Canada for the Terry Fox Run, and in part by the Canadian Breast Cancer Research Initiative (to A. B.). A. B. is a scholar of the Cancer Research Society/Medical Research Council of Canada, and of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). J. F. V. and C. A. were the recipients of Candelor fellowships.

² To whom requests for reprints should be addressed, at CHUM-Hôpital Notre-Dame, Institut du Cancer de Montréal, 1560, rue Sherbrooke est, Pavillon J.A. de Séve, Y-5634, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Phone: (514) 890-8000, extension 28946; Fax: (514) 412-7591; [redacted]

³ The abbreviations used are: MMR, mismatch repair; HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer; DSB, double-strand break; IDL, insertion/deletion loop; CMV, cytomegalovirus; GC, gene conversion; PGC, precise gene conversion; NHEJ, nonhomologous end joining; L1, long interspersed nuclear element; L1Md, long interspersed nuclear element of the mouse *Musculus domesticus*.

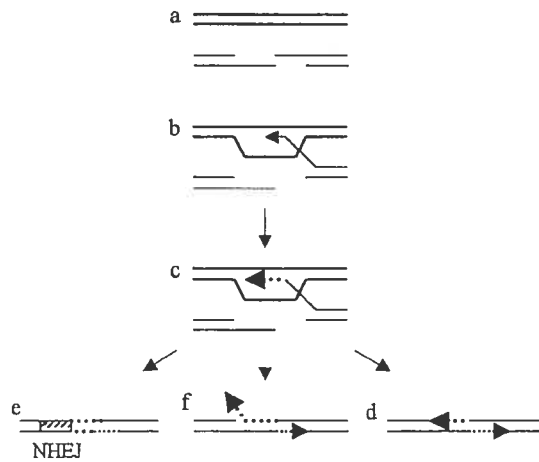


Fig. 1. The one-sided invasion model proposed for DSB repair (32, 33). In this model, only 1 3' single-strand at a DSB (a) invades an intact homologous duplex (b) and primes new DNA synthesis to stabilize the intermediate (c). Resolution of such an intermediate can occur by unwinding of the newly synthesized strand, which can engage with the noninvading strand in annealing, leading to a PGC product (d), or in NHEJ, resulting in a rearranged product (e). When the newly synthesized strand is longer than the noninvading single-strand, NHEJ would lead to insertion/duplication at the joining site, whereas strand annealing would generate an intermediate with a protruding 3' tail (f). Such an intermediate can be resolved to a PGC product (d) or to a rearranged GC product (e) in the absence of stabilizing factors (see text).

NHEJ junctions (30, 32–34, 39–46). Such rearranged GC products can be as frequent as PGC products (32–34, 39–41).

Here, we report that the proportions of precise and rearranged GC products vary according to the MMR status of the cells. In MMR-proficient or MLH1-deficient cells, >50% of GC products were of the precise type as has been reported with several distinct MMR proficient backgrounds (30, 32–34, 39–45), whereas in two MSH2-deficient cell lines, this proportion decreased to 8%, whereas that of rearranged products increased by 2-fold. These results suggest a defect in the accurate termination of GC in MSH2-deficient cells and seem to predict a novel way by which MSH2-deficiency could promote mutation: deletion or insertion mutations associated with DSB repair.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Culture. The tumor cell lines used in these experiments originated from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). They were: the MMR-proficient human colorectal carcinoma cell line SW480 (47), the hMLH1-deficient colorectal carcinoma cell line HCT116 (47), the hMSH2-deficient colorectal carcinoma cell line LoVo (48), and the hMSH2-deficient uterine tumor cell line SK-UT-1 (49) grown in Leibovitz's L15, McCoy's, Ham's F12, and MEM media, respectively. All of the media were supplemented with 10% fetal bovine serum (20% for LoVo cells), and gentamicin (50 µg/ml). Except for SW480 cells, which were cultured without CO₂, all of the other cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Plasmid Construct and Cell Transfections. The recombination reporter plasmid pST100, shown in Fig. 2, was linearized with I-SceI restriction enzyme (Fig. 2) and introduced with the plasmid pGKpuro into cells by electroporation as described previously (44). The electroporated cells were divided in two separate cultures. Forty-eight h later, puromycin (Sigma, St. Louis, MO) containing medium was added to one third of the transfected cells, and G418 (Geneticin; Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) containing medium was added to the remaining two thirds. The media were changed two to three times per week, and the surviving colonies were counted, picked, and expanded in their corresponding medium for additional analysis.

PCR Analysis of DSB Repair Products. Genomic DNA from individual G418^R colonies (recombinants) was extracted and digested with the restriction enzyme *Nae*I that cut once in pST100 at the *neo*3' cassette. Colonies with

single integration events were determined by Southern blot hybridization, using the *Hyg* gene as a probe. More than 80% of G418^R colonies analyzed contained single pST100 recombinant molecules. For analysis of the recombinants (Fig. 2), the following primer pairs were used in PCR: (a) *Neo*952 (5'-ccacgacgggctctctgcgag-3') and *neo*1300 (5'-gtcacgacgagatctcgcgctc-3') amplify the 1.4 kb fragment, or 1.4 and 2.4 kb fragments, between the realigned *neo* cassettes; (b) *Neo*800 (5'-gaatagcctctccaccaag-3') and *hyg*4419 (5'-gctgtgtagaagtactcggc-3') amplify the 2.1 kb fragment between the transferred *neo*5' cassette and the *Hyg* gene; (c) *Neo*1300 and *hyg*4419 amplify the 3.6 kb fragment between the *neo*3' cassette and the *Hyg* gene; (d) *Neo*800 and pUC469 (5'-tgaccatgattacccaagct-3') amplify the 1.7 kb fragment between the *neo*5' cassette and pUC sequences; and (e) *Neo*1300 and pUC469 amplify the 3.2 kb fragment between the inverted *neo*3' cassette and pUC sequences

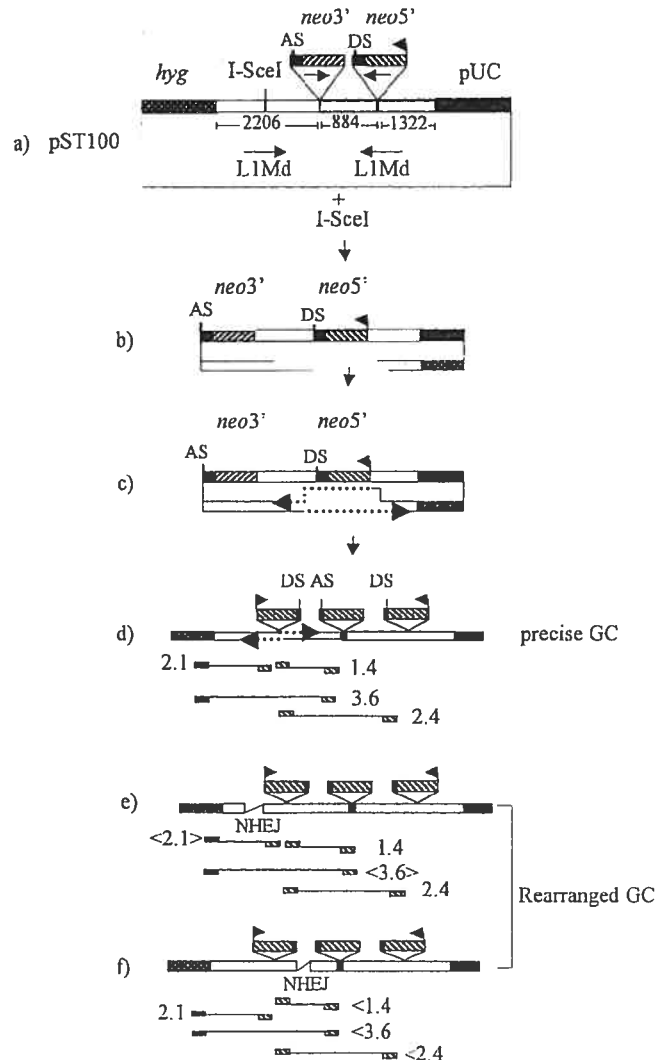


Fig. 2. Schematic representation of the reporter plasmid pST100 and some expected GC products. The arrows in pST100 (a) indicate the 5' to 3' orientation of LIMd sequences used as the intron, and the *neo* gene truncated cassettes (*neo*3' and *neo*5'). The *neo*3' cassette, which contains the 3' end of the *Neo* gene coding sequences and an acceptor splice site (AS), is between the two inverted LIMd copies. The *neo*5' cassette, which contains the HSV-TK gene promoter (arrow), the 5' coding region of *Neo* gene, and a donor splice site (DS), is within 1 LIMd copy. Cutting at the I-SceI site generates two DSB ends that are perfectly homologous to the 884 and 1322 bp segments flanking the *neo*5' cassette (a and b). Either end can invade and initiate DSB repair (32, 34, 39). After strand invasion, priming of DNA synthesis, release of the newly synthesized strand by unwinding and its annealing with the noninvading strand (c), a PGC product would result (d). GC intermediates shunted to NHEJ contain NHEJ junctions on either side of the transferred *neo*5' cassette (e and f), depending on which end is used for initiation and which end is used for termination (32, 34, 39). NHEJ junctions are expected to exhibit deletions and/or insertions of DNA sequences and, thus, their corresponding PCR fragments would be smaller or bigger than those corresponding to PGC products (d-f).

(Fig. 2). PCR amplifications were conducted with the Expand High Fidelity PCR System kit (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) in a thermal cycler for 30 cycles. The PCR products were analyzed by restriction enzymes, Southern blot hybridization, and DNA sequencing as described previously (44).

Complementation Experiments. Complete *hMLH1* and *hMSH2* cDNAs used to correct the MMR deficiency of HCT116, LoVo, and SK-UT-1 cells, respectively, were generous gifts from Drs. Nick Nicolaides (Magainin Institute of Molecular Medicine, Plymouth Meeting, PA) and Richard Kolodner (Ludwig Institute for Cancer Research, La Jolla, CA), respectively. These cDNAs were subcloned in pCEP-4 under control of the CMV promoter. The plasmid pCEP-4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) replicates autonomously in human cells and contains the *Hyg* gene. After transfection with pCEP-cDNA constructs, 20 *HYG^R* clones were picked for each cell line, and their protein extracts were subjected to Western blot analysis, using antibodies against hMSH2 (Ab-3) and hMLH1 (Ab-2) at 2 μ g/ml, and affinity-purified rabbit antiserum against these antibodies at a dilution of 1:1000 (Oncogene, Boston, MA). SW480 cells express hMSH2 and hMLH1, and nontransfected LoVo and SK-UT-1 cells express only hMLH1, whereas nontransfected HCT116 cells express hMSH2 but not hMLH1 (data not shown). However, except for 3 clones expressing MLH1 at a barely detectable level, none of the 60 *HYG^R* clones analyzed was expressing hMSH2 or hMLH1. Because the *Hyg* gene is upstream of the CMV promoter and both are transcribed in the same orientation, we thought that the lack of cDNA expression might be because of transcriptional interference: epigenetic silencing of the CMV promoter by transcriptional activity of the upstream *Hyg* gene (50). Therefore, we inverted the orientation of the *Hyg* gene relative to the CMV promoter. We analyzed 20 new *HYG^R* clones from each cell line, but again none of these was expressing the transfected cDNA. While conducting these studies, it was reported that the expression of *MSH2* and *MLH1* cDNAs is toxic to LoVo and HCT116 cells (51). This would explain why, in our hands, only *HYG^R* clones that did not express hMSH2 or hMLH1 grew in culture.

RESULTS

Rationale of the Experiment. The intron-based inverted repeat recombination assay system used in this study was described previously (44). Briefly, recombination between two inverted introns, L1 (L1Md) sequences, will realign two flanking inverted neomycin-resistance (*Neo*) gene truncated cassettes (*neo5'* and *neo3'*; Fig. 2). This produces a spliceable *Neo* gene that confers resistance to G418 drug. The use of intron allows the detection of both precise and rearranged products (Ref. 44; Figs. 1 and 2).

A DSB was introduced in one copy of the intron L1Md at the I-SceI restriction site in the reporter plasmid pST100 (Fig. 2). The linear plasmid pST100 was introduced with circular pGKpuro into the following human cancer cell lines: MMR-proficient SW480, hMSH2-deficient LoVo and SK-UT-1, and hMLH1-deficient HCT116. These cell lines have been widely used to study the effects of MMR on mutation rates, DNA damage tolerance, microsatellite instability, and genome rearrangements (1, 3–5, 18, 19). The plasmid pGKpuro contains the puromycin gene that confers puromycin (PURO) drug resistance to cells; its inclusion was a convenient way for assessing transfection efficiencies and for normalizing recombination frequency data obtained in different experiments. It allowed the comparison of

Table 2 Outcome of DSB repair in MMR-proficient and -deficient cell lines

Cell lines	G418 ^R /PCR ^a	GC	Precise GC ^b	GC-NHEJ ^c
LTK (MMR ⁺)	41	39	21/39 (54%)	18/39 (46%)
SW480 (MMR ⁺)	33	32	18/32 (56%)	14/32 (44%)
HCT116 (<i>mlh1</i> ⁻)	46	43	25/43 (58%)	18/43 (42%)
SK-UT-1 (<i>msh2</i> ⁻)	27	26	02/26 (8%)	24/26 (92%)
LoVo (<i>msh2</i> ⁻)	34	33	03/33 (9%)	30/33 (91%)

^a G418^R/PCR: G418^R colonies analyzed by PCR.

^b Precise GC is decreased by 7-fold in MSH2-deficient SK-UT-1 and LoVo cells compared with MSH2-proficient LTK⁻, SW480, and HCT116 cells (*P* < 0.001, χ^2).

^c GC-NHEJ: GC associated with NHEJ increased by 2-fold in MSH2-deficient SK-UT-1 and LoVo cells compared with MSH2-proficient cells (*P* < 0.001, χ^2).

normalized recombination frequencies (44, 52, 53), expressed here as the number of stable G418^R colonies divided by the number of PURO^R colonies. Recombinant molecules of pST100, which do not replicate autonomously, must integrate randomly by nonhomologous recombination into the genome of transfected cells to generate stable G418^R colonies. Analysis of the recombinants was done by PCR on genomic DNA of stable G418^R colonies that had integrated single copy recombinant molecules as determined by Southern blot hybridization, using the *Hyg* gene as a probe (see "Materials and Methods").

Homologous Recombination Frequencies. MMR-proficient cells recombined transfected DNA more efficiently than MMR-deficient cells (Table 1). The frequency of homologous recombination (homologous:nonhomologous ratio) with MMR-proficient SW480 cells was 8-fold higher than with either MLH1-deficient HCT116 or MSH2-deficient SK-UT-1 cells, and 2-fold higher than with MSH2-deficient LoVo cells.

PCR Analysis of G418^R Colonies. DSB repair by GC will transfer, presumably through DNA synthesis (Fig. 1), the *neo5'* cassette from the intact L1Md copy to the broken L1Md copy (Fig. 2). GC can occur within one pST100 molecule (Fig. 2) or between two pST100 molecules (data not shown). Such events can be characterized by PCR using different sets of primer pairs on genomic DNA of G418^R colonies. A GC event would generate PCR fragments of 1.4 kb between the two realigned *neo3'* and *neo5'* cassettes, 2.1 kb between the transferred *neo5'* cassette and the *Hyg* gene, 3.6 kb between the *neo3'* cassette and the *Hyg* gene, and 2.4 kb between the two *neo5'* cassettes when the original *neo5'* cassette is maintained after integration of the recombinant molecule (Fig. 2).

DSB Repair Occurs Almost Exclusively by GC. PCR analysis of G418^R colonies with MMR-proficient SW480, MLH1-deficient HCT116, MSH2-deficient LoVo, or SK-UT-1 cells revealed that DSB repair products were almost exclusively GC events (Table 2). Analysis of G418^R colonies in previous studies on the MMR-proficient mouse LTK⁻ cell line (44) gave similar results (Table 2). Representatives of these recombinants can be seen in Fig. 3.

Two Types of GC Products. With MMR-proficient SW480 and LTK⁻ cells, and MLH1-deficient HCT116 cells, >50% of GC products were precise, whereas in MSH2-deficient LoVo and SK-UT-1 cells, only 8% were of the precise type (Table 2). Representatives of the precise type are shown in Fig. 3A (*a* and *b*), and their corresponding full-length PCR fragments (1.4 and 2.4 kb, 2.1 kb, 1.7 kb, 3.6 kb, and 1.4 kb) appear in Fig. 3B (*Lanes 2–6*, respectively). Restriction enzyme analysis of 1.4-kb PCR fragments from 40 distinct recombinants disclosed similar patterns, and sequencing of 3 revealed no small deletions, insertions, or substitutions of nucleotides compared with the parental L1Md sequence (data not presented). The remaining GC products were rearranged, because they generate PCR fragments that are smaller or bigger than those generated with precise products (Fig. 3A, *panels c–e*; Fig. 3B, *Lanes 7–14*). Restriction enzyme analysis of these fragments showed deletions and insertions of variable sizes, and DNA se-

Table 1 The efficiency of DSB repair in MMR-proficient and -deficient human cells

Cell lines	Experiments ^a	G418 ^R colonies	PURO ^R colonies	Frequency of recombination
SW480 (MMR ⁺) pST100 SceI	4	46	530	8.68%
HCT116 (<i>mlh1</i> ⁻) pST100 SceI	6	75	5413	1.38%
SK-UT-1 (<i>msh2</i> ⁻) pST100 SceI	4	74	7380	1.00%
LoVo (<i>msh2</i> ⁻) pST100 SceI	3	112	2395	4.6%

^a Each experiment represents ≥ 5 transfections.

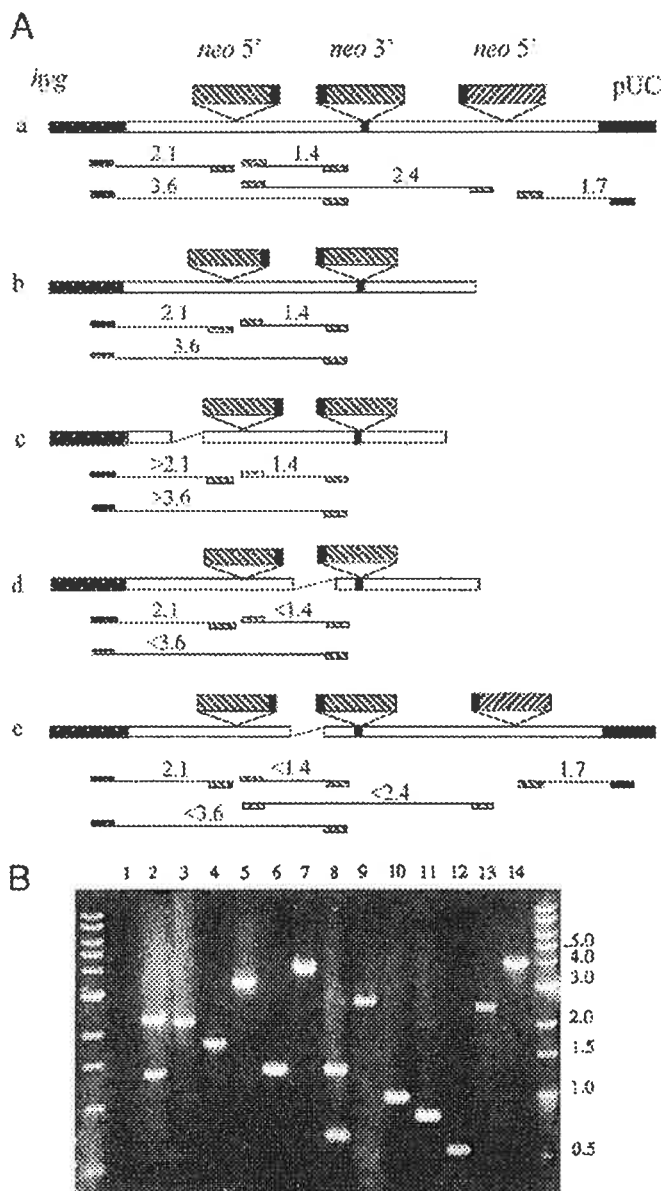


Fig. 3. *A*, schematic representation of recombinant molecules analyzed by PCR. PGC (*a* and *b*) and rearranged GC with deletions (*c-e*) or duplications (*c*) generate PCR fragments smaller or bigger than the expected full length. *B*, PCR analyses of DSB repair products. PCR bands diagnostic of PGC products: 1.4 kb and 2.4 kb (Lane 2), 2.1 kb (Lane 3), 1.7 kb (Lane 4), 3.6 kb (Lane 5), and 1.4 kb (Lane 6). PCR bands diagnostic of rearranged GC products (see *c-e* in Fig. 2): *c*, >3.6 kb (Lanes 7 and 14) and >2.1 kb (Lane 13); *d*, <3.6 kb (Lane 9) and <1.4 kb (Lanes 10-12); *e*, <1.4 and 2.4 kb (Lane 8). Negative control for PCR: pST100 mixed with genomic DNA of nontransfected cells (Lane 1).

quencing of 5 reduced-size PCR fragments smaller than 1.4 kb (Fig. 3B, Lanes 10-12) revealed NHEJ flanked on both sides by pST100 L1 sequences (Fig. 3A, panels *d* and *e*), whereas sequencing of three bigger size PCR fragments, between the transferred *neo5'* cassette and the *Hyg* gene, evinced NHEJ with insertions and duplications of L1 sequences (Fig. 3A, panel *c*; Fig. 3B, Lanes 7, 13, and 14). The NHEJ junctions between the transferred *neo5'* cassette and the *Hyg* gene incurred both deletions and insertions (Fig. 3A, panel *c*), whereas those between the two realigned *neo3'* and *neo5'* cassettes all presented deletions (Fig. 3A, panels *d* and *e*). Insertions that would lengthen the intron were not detected; they probably interfere with intron splicing (44).

DISCUSSION

The decreased frequency of homologous recombination (homologous:nonhomologous ratios) observed with MMR-deficient cells relative to wild-type cells could be attributable either to reduced homologous recombination efficiency or to increased nonhomologous integration efficiency. Although our results cannot discriminate between these two possibilities because of unsuccessful complementation of MSH2- or MLH1-deficient cells (see "Materials and Methods"), recent studies have indicated the heightened efficiency of nonhomologous integration of linearized plasmid or retroviral DNAs in hMSH2- and hMLH1-deficient cells (19). However, our frequency data show no correlation between the efficiency of nonhomologous integration and the proportions of precise and rearranged GC products (Tables 1 and 2). The ratio of homologous:nonhomologous recombination obtained with MMR-proficient cells was 8-fold higher than with MLH1-deficient HCT116 cells, and yet both cell lines gave similar proportions of precise and rearranged products. The ratio observed with MSH2-deficient SK-UT-1 cells was similar to that obtained with HCT116 cells, yet both cell lines presented different proportions of precise and rearranged products. Similarly, the ratio with LoVo cells was 4-fold higher than with SK-UT-1 cells, but these two cell lines gave similar proportions of precise and rearranged products.

The NHEJ joints in the rearranged GC products analyzed were flanked on both sides by pST100 sequences, indicating that such joints occurred before nonhomologous integration of the recombinants in the chromosomes of host cells. Such rearranged GC products occur in all of the organisms studied (30, 33, 34, 39-45, 54) and are best explained with the one-sided invasion model proposed for DSB repair (Fig. 1), in which only one DSB end invades the homologous template and primes DNA synthesis, whereas the other end terminates DSB repair either by annealing or by NHEJ (32-34, 39). In this model, the length and nature of the sequences acquired by the recipient broken molecule are only dependent on the extent of DNA polymerization. In this way, if DNA synthesis extends beyond the homologous region shared by the two participant duplexes and continues into flanking nonhomologous sequences, NHEJ of the released, newly synthesized strand and the noninvading end would generate a recipient molecule with insertions/duplications (30, 32-34, 39-46). However, if DNA synthesis does not extend across the shared homologous region, NHEJ would generate a recipient molecule with deletions. Unlike insertions/duplications, deletion events would be detected only under nonselective conditions (32-34, 39, 54).

In MMR-proficient cells, the proportion of GC associated with NHEJ events can reach but never exceed that of PGC events, even when no constraints are imposed on such events (32, 34, 39-42, 44). However, in 2 MSH2-deficient cells, the proportion of PGC products decreased by 7-fold, and that of rearranged products increased by 2-fold, compared with MMR-proficient or MLH1-deficient cells (Table 2). These results suggest a defect in the accurate termination of GC in MSH2-deficient cells. Although the exact molecular mechanism underlying such a defect remains to be elucidated, two possibilities can be entertained. First, because NHEJ became highly efficient in MMR-deficient cells (19), this process would out-compete homologous recombination (strand annealing) in terminating DSB repair (Fig. 1). However, the fact that NHEJ increased in both MSH2- and MLH1-deficient cells (19), and that inaccurate termination of DSB repair decreased only in MSH2-deficient cells argues against this possibility. Second, increased NHEJ events may be a consequence of the formation of unstable GC intermediates; e.g., the annealed region between the newly synthesized strand and the noninvading end could be very short (Fig. 1*d*) and/or contain protruding 3' single-strand tails

(Fig. 1f). The latter would be expected to form when the released, newly synthesized strand is longer than the noninvading end. In yeast, removal of such protruding 3' nonhomologous tails from GC intermediates involves the participation of the nucleotide excision repair endonuclease RAD1-RAD10 and the heterodimer MSH2-MSH3, but not MSH6, MLH1, or PMS1 proteins (55). It has been postulated that the MSH2-MSH3 complex stabilizes GC intermediates by binding to unpaired 3' nonhomologous single strands at the ends of the annealed region, and this allows RAD1/RAD10 to locate and cleave such unpaired strands (55). Mutations in *XPF/ERCC1*, the mammalian homologue of *RAD1/RAD10*, also lead to an increased proportion of homologous recombination associated with NHEJ when nonhomologous termini are present at DSBs (56). Taking these studies into consideration, it is easy to imagine that unstable GC intermediates would unwind and be shunted to NHEJ, which could explain the shift from precise to rearranged GC products.

The results reported show a defect in the accurate termination of DSB repair by GC, and an increase in the coupling of GC and NHEJ in MSH2-deficient cells. This seems to predict an additional way by which MSH2 deficiency could contribute to the accumulation of genomic rearrangements and, thus, to cancer predisposition.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Nick Nicolaides (Magainin Institute of Molecular Medicine, Plymouth Meeting, PA) and Richard Kolodner (Ludwig Institute for Cancer Research, San Diego, CA) for providing the cDNA of hMLH1 and hMSH2, respectively. We also thank Shona Teijeiro, Fatima Zouanat, Nathalie Marçal, Zeinab Daher, and Caroline Lejeune for their technical assistance, and Ovid Da Silva for editing this text.

REFERENCES

1. Modrich, P., and Lahue, R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.*, *65*: 101-133, 1996.
2. Umar, A., and Kunkel, T. A. DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur. J. Biochem.*, *238*: 297-307, 1996.
3. Buemeyer, A. B., Deschenes, S. M., Baker, S. M., and Liskay, R. M. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.*, *33*: 533-564, 1999.
4. Kolodner, R. D., and Marsischky, G. T. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, *9*: 89-96, 1999.
5. Harfe, B. D., and Jinks-Robertson, S. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu. Rev. Genet.*, *34*: 359-399, 2000.
6. de la Chapelle, A., and Peltomaki, P. Genetics of hereditary colon cancer. *Annu. Rev. Genet.*, *29*: 329-348, 1995.
7. Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, *87*: 159-170, 1996.
8. Peltomaki, P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum. Mol. Genet.*, *10*: 735-740, 2001.
9. Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M. F., Guerrette, S., Marsischky, G. T., Kolodner, R., and Fishel, R. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *93*: 13629-13634, 1996.
10. Marsischky, G. T., Filosi, N., Kane, M. F., and Kolodner, R. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev.*, *10*: 407-420, 1996.
11. Kondo, E., Horii, A., and Fukushima, S. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic Acids Res.*, *29*: 1695-1702, 2001.
12. Kat, A., Thilly, W. G., Fang, W. H., Longley, M. J., Li, G. M., and Modrich, P. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*: 6424-6428, 1993.
13. Bhattacharyya, N. P., Skandalis, A., Ganesh, A., Groden, J., and Meuth, M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *91*: 6319-6323, 1994.
14. Shibata, D., Peinado, M. A., Ionov, Y., Malkhosyan, S., and Perucho, M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat. Genet.*, *6*: 273-281, 1994.
15. Eshleman, J. R., Lang, E. Z., Boverfand, G. K., Parsons, R., Vogelstein, B., Willson, J. K., Veigl, M. L., Sedwick, W. D., and Markowitz, S. D. Increased mutation rate at the *hprt* locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*, *10*: 33-37, 1995.

16. Prolla, T. A., Baker, S. M., Harris, A. C., Tsao, J. L., Yao, X., Bronner, C. E., Zheng, B., Gordon, M., Reneker, J., Amheim, N., Shibata, D., Bradley, A., and Liskay, R. M. Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1. Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nat. Genet.*, *18*: 276-279, 1998.
17. Li, G. M. The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis. *Oncol. Res.*, *11*: 393-400, 1999.
18. Chen, S., Bigner, S. H., and Modrich, P. High rate of CAD gene amplification in human cells deficient in MLH1 or MSH6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *98*: 13802-13807, 2001.
19. Lin, C. T., Lyu, Y. L., Xiao, H., Lin, W. H., and Whang-Peng, J. Suppression of gene amplification and chromosomal DNA integration by the DNA mismatch repair system. *Nucleic Acids Res.*, *29*: 3304-3310, 2001.
20. de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and te Riele, H. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell*, *82*: 321-330, 1995.
21. de Wind, N., Dekker, M., Claij, N., Jansen, L., van Klink, Y., Radman, M., Riggins, G., van der Valk, M., van't Wout, K., and te Riele, H. HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions. *Nat. Genet.*, *23*: 359-362, 1999.
22. Abuin, A., Zhang, H., and Bradley, A. Genetic analysis of mouse embryonic stem cells bearing Msh3 and Msh2 single and compound mutations. *Mol. Cell. Biol.*, *20*: 149-157, 2000.
23. Elliott, B., and Jasin, M. Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, *21*: 2671-2682, 2001.
24. Jeggo, P. A. DNA breakage and repair. *Adv. Genet.*, *38*: 185-218, 1998.
25. Khanna, K. K., and Jackson, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.*, *27*: 247-254, 2001.
26. Pierce, A. J., Stark, J. M., Araujo, F. D., Moynahan, M. E., Berwick, M., and Jasin, M. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.*, *11*: S52-S59, 2001.
27. Venkataraman, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, *108*: 171-182, 2002.
28. Richard, M., Belmaaza, A., Gusew, N., Wallenburg, J. C., and Chartrand, P. Integration of a vector containing a repetitive LINE-1 element in the human genome. *Mol. Cell. Biol.*, *14*: 6689-6695, 1994.
29. Taghian, D. G., and Nickoloff, J. A. Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, *17*: 6386-6393, 1997.
30. Johnson, R. D., and Jasin, M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.*, *19*: 3398-3407, 2000.
31. Osman, F., and Subramani, S. Double-strand break-induced recombination in eukaryotes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, *58*: 263-299, 1998.
32. Belmaaza, A., Wallenburg, J. C., Brouillette, S., Gusew, N., and Chartrand, P. Genetic exchange between endogenous and exogenous LINE-1 repetitive elements in mouse cells. *Nucleic Acids Res.*, *18*: 6385-6391, 1990.
33. Belmaaza, A., and Chartrand, P. One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat. Res.*, *314*: 199-208, 1994.
34. Villemure, J.-F., Belmaaza, A., and Chartrand, P. The processing of DNA ends at double-strand breaks during homologous recombination: different roles for the two ends. *Mol. Gen. Genet.*, *256*: 533-538, 1997.
35. Allers, T., and Lichten, M. Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell*, *106*: 47-57, 2001.
36. Hunter, N., and Kleckner, N. The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell*, *106*: 59-70, 2001.
37. Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J., and Jasin, M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *95*: 5172-5177, 1998.
38. Haber, J. E. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.*, *16*: 259-264, 2000.
39. Belmaaza, A., Milot, E., Villemure, J. F., and Chartrand, P. Interference of DNA sequence divergence with precise recombinational DNA repair in mammalian cells. *EMBO J.*, *13*: 5355-5360, 1994.
40. Sakagami, K., Tokinaga, Y., Yoshikura, H., and Kobayashi, I. Homology-associated nonhomologous recombination in mammalian gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *91*: 8527-8531, 1994.
41. Puchta, H., Dujon, B., and Hohn, B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *93*: 5055-5060, 1996.
42. Rubin, E., and Levy, A. A. Abortive gap repair: underlying mechanism for Ds element formation. *Mol. Cell. Biol.*, *17*: 6294-6302, 1997.
43. Richardson, C., Moynahan, M. E., and Jasin, M. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev.*, *12*: 3831-3842, 1998.
44. Villemure, J. F., and Belmaaza, A. Effects of sequence divergence on the efficiency of extrachromosomal recombination in mismatch repair proficient and deficient mammalian cell lines. *Somat. Cell Mol. Genet.*, *25*: 79-90, 1999.
45. Tremblay, A., Jasin, M., and Chartrand, P. A double-strand break in a chromosomal LINE element can be repaired by gene conversion with various endogenous LINE elements in mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, *20*: 54-60, 2000.
46. Richardson, C., and Jasin, M. Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, *20*: 9068-9075, 2000.

47. Parsons, R., Li, G. M., Longley, M. J., Fang, W. H., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Modrich, P. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*, *75*: 1227-1236, 1993.
48. Umar, A., Boyer, J. C., Thomas, D. C., Nguyen, D. C., Risinger, J. I., Boyd, J., Ionov, Y., Perucho, M., and Kunkel, T. A. Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. *J. Biol. Chem.*, *269*: 14367-14370, 1994.
49. Risinger, J. I., Umar, A., Boyer, J. C., Evans, A. C., Berchuck, A., Kunkel, T. A., and Barrett, J. C. Microsatellite instability in gynecological sarcomas and in hMSH2 mutant uterine sarcoma cell lines defective in mismatch repair activity. *Cancer Res.*, *55*: 5664-5669, 1995.
50. Villemure, J-F., Savard, N., and Belmaaza, A. Promoter suppression in cultured mammalian cells can be blocked by the chicken β -globin chromatin insulator 5'HS4 and matrix/scaffold attachment regions. *J. Mol. Biol.*, *312*: 963-974, 2001.
51. Zhang, H., Richards, B., Wilson, T., Lloyd, M., Cranston, A., Thorburn, A., Fishel, R., and Meuth, M. Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res.*, *59*: 3021-3027, 1999.
52. Saparbaev, M., Prakash, L., and Prakash, S. Requirement of mismatch repair genes MSH2 and MSH3 in the RAD1-RAD10 pathway of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *142*: 727-736, 1996.
53. Adair, G. M., Scheerer, J. B., Brothman, A., McConville, S., Wilson, J. H., and Nairn, R. S. Targeted recombination at the Chinese hamster APRT locus using insertion versus replacement vectors. *Somat. Cell Mol. Genet.*, *24*: 91-105, 1998.
54. Orr-Weaver, T. L., and Szostak, J. W. Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *80*: 4417-4421, 1983.
55. Sugawara, N., Paques, F., Colaiacovo, M., and Haber, J. E. Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *94*: 9214-9219, 1997.
56. Adair, G. M., Rolig, R. L., Moore-Faver, D., Zabelshansky, M., Wilson, J. H., and Nairn, R. S. Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *EMBO J.*, *19*: 5552-5561, 2000.

