N°d'ordre NNT : 2017LYSE1045

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)
N° ED340

Spécialité de doctorat : Oncologie
Discipline : Biologie Cellulaire & Moléculaire

Soutenue publiquement le
17 mars 2017
par
Elise BERTHEL

Recherche des ARNm dont la traduction est régulée par la protéine BRCA1 :

Vers l'identification de nouveaux outils théranostiques des tumeurs du sein déficientes en *BRCA1*

Devant le jury composé de :

Mr le Dr Thierry Dubois, IR, HDR – Institut Curie	Rapporteur
Mr le Dr. Stéphan Vagner, DR INSERM – Institut Curie	Rapporteur
Mme le Pr. Caroline Moyret-Lalle, PU – CRCL	Examinatrice
Mr le Pr. Yves-Jean Bignon, PU PH - Université d'Auvergne	Examinateur
Mme le Dr. Nicole Dalla Venezia, CR, HDR CNRS – CRCL	Directrice de Thèse

RESUME en français

BRCA1 est l'un des deux gènes majeur de prédisposition au cancer du sein. Les multiples partenaires protéiques de BRCA1 lui confèrent de nombreuses fonctions par lesquelles elle peut assurer la surveillance de l'intégrité cellulaire. L'équipe dans laquelle j'ai mené ma thèse a identifié un nouveau partenaire protéique de BRCA1, la protéine de liaison au poly(A) des ARN messagers PABP1, et a ainsi mis en lumière l'implication de BRCA1 dans la régulation de la traduction. De plus, de récents travaux suggèrent que dans des conditions dangereuses pour la cellule et potentiellement oncogéniques, comme par exemple un stress endommageant l'ADN (génotoxique), la synthèse protéique est fortement altérée. Mon travail de thèse a eu pour objectif de démontrer que cette nouvelle fonction de BRCA1 contribue, comme ses fonctions nucléaires, à son rôle de suppresseur de tumeur. Durant ma thèse, j'ai identifié les ARNm « cibles » de BRCA1 par la technique d'immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques (RIP), j'ai validé que ces ARNm « cibles » de BRCA1 lui sont associés pour leur régulation traductionnelle en réalisant une analyse comparative du contenu des polysomes de cellules épithéliales mammaires MCF-7 exprimant de façon transitoire un ARN interférent dirigé contre BRCA1 par la technique que j'ai mise en place au laboratoire, les profils polysomiques. Par la suite, j'ai établi les conditions de stress génotoxique induisant la localisation cytoplasmique de BRCA1, et en collaboration avec des cliniciens du Centre Léon Bérard j'ai permis l'acquisition d'échantillons tumoraux. Ceci nous permettra d'identifier parmi ces cibles de nouveaux marqueurs diagnostiques ou encore de nouvelles cibles thérapeutiques pour les cancers du sein déficientes en *BRCA1*.

TITRE en anglais

Search of mRNAs whose translation is directly regulated by the BRCA1 protein: Towards the identification of new therapeutic tools for BRCA1-deficient breast tumors

RESUME en anglais

BRCA1 is one of the two major breast cancer susceptibility genes. The numerous binding partners of BRCA1 allow it to participate to several cellular pathways which globally contribute to its cell surveillance capacity. The team in which I performed my PhD identified a new binding partner of BRCA1, the Poly(A)-Binding Protein 1 and, consequently, a new function of this tumor suppressor, namely, the translation regulation. Moreover, recent studies suggest that under conditions dangerous for the cell and potentially oncogenic, such as a genotoxic stress, protein synthesis is strongly altered. My thesis work was aimed at demonstrating that this new function of BRCA1 contributes, like its nuclear functions, to its role of tumor suppressor. During my thesis, I identified the mRNAs "targets" of BRCA1 by the technique of immunoprecipitation of the ribonucleoprotein complexes (RIP), I validated that these mRNAs "targets" of BRCA1 are associated to it for their translational control by realizing a comparative analysis of the contents of the polysomes of MCF-7 mammary epithelial cells transiently expressing an interfering RNA directed against BRCA1 by the technique that I have set up in the laboratory, the polysomal profiles. Subsequently, I established the conditions of genotoxic stress inducing the cytoplasmic localization of BRCA1, and in collaboration with clinicians of the Center Léon Bérard Hospital, I allowed the acquisition of tumor samples. This will allow us to identify among these targets new diagnostic markers or new therapeutic targets for breast cancers deficient in *BRCA1*.

DISCIPLINE : Biologie Cellulaire et Moléculaire, Oncologie.

MOTS-CLES : Cancer du sein, BRCA1, Suppresseur de Tumeur, Traduction, Biomarqueurs, ARNm

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Centre de Recherche en Cancérologie de LYON (CRCL), UMR Inserm 1052 - CNRS 5286

Centre Léon Bérard, Bâtiment Cheney A, 28 rue Laënnec, 69373 LYON Cedex 08

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

A Papa & Maman,

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni mon respect, ni même la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette voie, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.

Je vous dédie cette thèse.

Remerciements

Nicole, mes premiers remerciements sont pour toi. Tu as su me guider depuis mon Master jusqu'en Thèse. Tu m'as aidée à trouver ma place dans un milieu qui n'est pas toujours facile : ce monde fascinant qu'est la recherche scientifique ! Je te remercie pour ton professionnalisme et ton franc-parler. Il surprend beaucoup, surtout au début, mais au terme de 4 années passées à tes côtés je crois sincèrement que c'est ta plus grande qualité. Surtout ne change pas... Je pense réellement que l'honnêteté est la clé des relations humaines. Un grand merci pour la confiance que tu m'as accordée. Tu as toujours écouté mon opinion, peu importe le résultat final, tu as toujours écouté et discuté mes idées et je veux que tu saches à quel point je suis consciente de la chance que j'ai eu de travailler avec toi, dans ces conditions. Merci également de m'avoir soutenue dans toutes mes démarches, que ce soit au niveau des collaborations, de l'enseignement, de ma volonté d'engagement auprès des enfants malades, ou encore lorsque j'ai participé au concours de vulgarisation scientifique « MT180sec » (ce qui m'a quand même valu de nombreuses remontrances « de vocabulaire » par la suite en réunion d'équipe... !). Tu m'as toujours encouragée dans toutes mes tentatives, et vraiment je t'en suis très reconnaissante. Je te remercie pour ton humanité, et pour nos nombreuses conversations extra-scientifiques à propos de la famille, et de la vie, en général... ses bonheurs comme ses malheurs. Bref, un grand MERCI pour tout, et ... « patin-couffin »... ☺

Anne, quelle chance j'ai eu de tomber sur une Alsacienne !! Je n'aurais pu rêver meilleure « professeur » pour me former à la paillasse. C'est un peu cliché (mais me connaissant tu ne m'en tiendras pas rigueur) : A la paillasse, tu m'as réellement appris tout ce que je sais ! Merci d'avoir toujours pris le temps de m'expliquer les choses, à grand renfort de petits dessins ! Merci pour le support technique ET artistique que tu m'as apporté, tu as toujours été là pour m'aider dans mes réalisations et je suis très heureuse de t'avoir embarquée dans l'aventure des P'tits Génies et plus heureuse encore que tu participes pleinement à son évolution. J'ai hâte que tu me racontes ces nouvelles aventures quand je serai loin d'ici !

Un grand MERCI,

Au CRCL, en la personne d'Alain Puisieux, pour m'avoir accueillie dans cette structure ou j'ai pu réaliser mon Master et poursuivre en Thèse afin d'obtenir le titre de Docteur.

Martin Dutertre & **Mathieu Gabut**, les membres de mon Comité de Suivi de Thèse. Merci d'avoir accepté de suivre mon travail pendant ces trois dernières années, et de m'avoir guidée dans ma recherche, nos discussions m'ont été très utiles tout comme vos remarques & suggestions.

Stéphan Vagner & **Thierry Dubois**, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et d'évaluer mon travail. Je suis très honorée que vous siégiez dans mon Jury de Thèse.

Caroline Morey-Lalle & **Yves-Jean Bignon**, merci à tous les deux d'avoir accepté de siéger dans mon Jury de thèse et d'évaluer mon travail, j'en suis également très honorée.

La Fondation ARC, pour avoir financé ma 4e année de thèse. Un grand MERCI à tous les bénévoles et donateurs de la Fondation. C'est grâce à l'argent collecté lors de vos actions que la fin de ma thèse a pu être réalisée dans les meilleures conditions.

Pendant mes années au CRCL, j'ai eu la chance d'être intégrée dans deux Equipes de Recherches, qui, bien que différentes dans leur fonctionnement, m'ont toutes les deux beaucoup apporté tant au niveau Professionnel qu'Humain.

L'Equipe Génétique du Cancer du Sein, qui m'a accueillie au Centre. Merci à tous ses anciens membres pour leur aide et nos échanges lors de nos réunions.

Sylvie, tu es la première que j'ai rencontrée lors d'un séminaire en Master, c'est toi qui m'as donné envie de travailler sur BRCA1, et c'est grâce à toi que j'ai ensuite rencontré Nicole. Merci pour tes précieux conseils lors de mes oraux. J'espère que tout se passe bien dans ton nouveau centre.

Estelle, merci pour ton aide lors de mon arrivée en Master. Tu as tout de suite fait en sorte que je trouve ma place en arrivant dans l'équipe, pour que je prenne la suite de ton travail. Merci pour ton aide lors de la préparation de mes oraux, tes commentaires n'ont pas toujours été faciles à écouter mais m'ont beaucoup appris et je t'en remercie sincèrement. J'espère que la vie te comblera de tous les petits bonheurs... ici ou ailleurs. Au travail ou en dehors, tu le mérites sincèrement.

Monique, merci pour tes conseils expérimentaux, ton aide à la paillasse, et pour tes encouragements lors de mes nombreux allers-retours (et problèmes !) à l'Université ! **David**, merci pour ton aide lors de la préparation de mes oraux en anglais. **Francesca** & **Laure**, merci pour votre gentillesse, votre disponibilité à parler de mon projet de recherche... ou de bien d'autres choses ! **Charlotte,** ton arrivée a été comme une bouffée d'oxygène dans un 5e étage qui se vidait ! Contrairement à nos penderies... suite à nos achats groupés en ligne ! Merci pour ta bonne humeur contagieuse ! J'espère que ta nouvelle carrière t'apportera satisfaction à Lyon, ou ailleurs. Enfin Merci à nos super stagiaires de l'époque, Charlotte et ses bons gâteaux banane-chocolat, Oriane, et enfin la super Marina qui a travaillé sur mon projet, merci beaucoup !

Bon courage à tous pour la suite.

L'Equipe Domaines Nucléaires & Pathologies. Merci à tous d'avoir fait que ce changement d'Equipe se passe de la meilleure des façons !

Jean-Jacques. Merci d'avoir toujours veillé à ce que je me sente bien et que je trouve ma place dans ton Equipe. Je te remercie pour ton implication dans mon projet de recherche, au travers de nos réunions. Un entretien avec toi m'avait été présenté comme une « Diazothérapie » ! Je te remercie donc pour ces « Thérapies-Scientifiques » car elles m'ont permis de développer mon raisonnement scientifique et même si toutes les perspectives n'ont pas toujours été simples à concevoir, cela m'a beaucoup aidé à murir mon projet ainsi que mes réflexions. Merci également de m'avoir convaincu du sens de notre travail. Grâce à toi je suis maintenant persuadée que nous « Créons de la connaissance », et que c'est bien cela le plus important. Enfin, Merci pour la relecture et les corrections que tu as apporté au manuscrit et pour tous tes conseils qu'ils soient expérimentaux ou rédactionnels. J'espère que le prochain quinquennat se passera sereinement pour toute l'Equipe.

Virginie, tu es toujours disponible pour une réponse aux questions inattendues ! Merci pour toute l'aide que tu m'as apporté pendant ma thèse ! Ton calme, ta sérénité et ton efficacité au

travail sont à la fois inspirants et incroyables ! J'espère un jour posséder toutes ces qualités. **Fred**, merci pour nos discussions théoriques, techniques...et musicales ! **Hichem.** Un Merci tout particulier pour toi ! Pour ta gentillesse, tes blagues et toutes nos discussions... scientifiques ... et moins scientifiques ! Ne changes pas, ta bonne humeur fait partie des éléments essentiels au « bon vivre » qui règne dans cette équipe ainsi qu'au 4e Cheney A...

« The Girl's Office » ! Un grand MERCI ! Désolée Piero, mais ce bureau est définitivement celui des filles, des rires (non plutôt des éclats de rire) et des discussions et interrogations de l'absurde ! **Nabila, Flora, Marion** & **Samaneh** un Grand MERCI pour tout, je suis heureuse de vous connaitre, d'avoir partagé votre bureau et je vous souhaite de tout cœur le meilleur pour vos fins de thèse et pour l' « après » thèse !

Nathalie, merci pour tout ce que tu es. Tu es une belle personne et je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance. Merci pour tes histoires, nos rires et surtout MERCI de te laisser embarquer dans mes idées les plus folles. Je ne sais pas comment j'ai fait pour arriver à te convaincre, mais je te remercie réellement d'accepter de relever mes challenges qu'ils soient professionnels ou non, entre gâteaux et abdos... ! Je te souhaite d'être heureuse et épanouie... ou que tu sois, car tu le mérites vraiment.

Lucie, ma rouquine préférée ! Merci pour nos midis entre filles rythmés au son des potins & de nos éclats de rire ! Tu es une fille super gentille, attachante, & drôle (souvent malgré toi, et à travers le récit de tes histoires... et en cela on se ressemble beaucoup !) et je suis heureuse de te compter parmi mes Amies. J'espère sincèrement que ta Thèse se déroulera de la meilleure des façons et que tu me donneras des nouvelles de son avancée... enfin... juste en attendant que toi et Nath viennent me raconter ça sous le Soleil !

Thomas ...mouhahahaha ! Merci ! D'être comme tu es... et surtout merci de m'avoir montré qui tu es. Ne change pas ! Garde cet état d'esprit un peu fou mais qui me fait tant rire ! Bon courage pour la suite et si jamais tu te décides à faire une thèse... mouhahahah... non, je ne te dis pas... tu verras !

Enfin un grand MERCI à tous les autres, **Maggie**, Merci pour nos discussions féeriques & artistiques, merci également pour ton implication dans l'Association des P'tits Génies. J'ai apprécié tes idées, tes créations et ton envie de bien faire avec les enfants ! **Hélène**, merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, et pour ton aide si précieuse quand il s'agit de passer des commandes imprévues ! Merci **Karine, Fabien,** & **Philippe** pour nos discussions et vos suggestions sur mon projet.

Enfin Merci à tous les gens de « passage » chez nous, qui rythment nos vies au Labo ! Jenny, Wannapa, Maxime, Hugo, Nazife, Paul, Elyes, Elizabeth, Masaru, bon courage à tous pour la suite, ou que vous atterrissiez !

L'Equipe Gabut. C'est une vraie joie de partager un même étage, ainsi qu'un bureau avec vous tous. Merci Fleur, en particulier, pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour toujours t'inquiéter de savoir comment je vais, même si je ne réponds pas toujours par la positive ! Merci également Sébastien de m'avoir fait découvrir le monde du NMD avant que tu ne rejoignes l'équipe de Mathieu. Enfin bon courage à (je l'espère !) nos futurs remplaçants, Pauline, Caroline, Rachel, & Verda (j'espère que tu pourras décrocher ta bourse de thèse !)

Pendant mes années au CRCL, j'ai eu la chance incroyable de rencontrer et de travailler aux côtés de personnes qui ont contribué, non seulement à mon apprentissage, mais également au fait que j'aie envie, chaque matin, de venir travailler. Parce qu'une Thèse ne devrait pas s'écrire (ni se lire d'ailleurs !) mais parce qu'elle se vit, je tiens à remercier toutes ces personnes qui ont fait de ces dernières Années, les années les plus Belles & Enrichissantes de toutes ma (courte) Vie !

Un grand MERCI

Baptiste, y' a pas à dire...le 6e sans toi c'est plus pareil. Le CRCL non plus d'ailleurs ! Si tu savais à quel point je suis reconnaissante d'avoir eu, ne serait-ce que la chance d'avoir vécu tout cela avec toi, ici. Quelle chance j'ai eu de rencontrer un vrai Ami au travail... avec d'aussi bons et sûrs goûts musicaux !! ... (C'est évident que je suis la seule à le penser... et je ne comprends toujours pas pourquoi !). Garde cet état d'esprit, cette envie de rendre les endroits où tu passes plus vivants et plus joyeux, à grand renfort de Patrick Sébastien s'il le faut ! Garde également cette Foi que tu as en la Recherche publique notamment, et en notre système, bien qu'imparfait. Je pense sincèrement que tu y mérites ta place et je suis certaine que tu arriveras à te la créer. Je te le souhaite. Et je le souhaite à La Recherche Française. Elle a cruellement besoin de gens comme toi, capables d'être à la fois brillants et pleins d'idées tout en ne négligeant pas l'aspect Humain. Tu es quelqu'un de bien. Je sais, il n'y a qu'une « Princesse » pour sortir ce genre de choses, mais je le pense. Je te souhaite à toi, ainsi qu'à Alyson, tout le bonheur possible. Et j'espère vous revoir souvent, chez les p'tits Suisses... ou, qui sait ? Plus loin encore ... (OUI. Ceci est une invitation).

Mélanie – « Jacky-bout-en-train » Merci d'avoir toujours écouté (et ri) à toutes mes Histoires et Théories... et il y en a eu ! C'était agréable de venir discu-heu-bosser au 6e étage avec vous... Tu savais bien quels étaient mes malheurs de thésarde...et mes envies de voyages ! A ce propos, je vous souhaite à toi et Flo une bonne aventure, et même si je sens d'ici que vos photos vont m'énerver, j'espère que vous en profiterez pleinement !

Amélien, « le Visage du CRCL « je n'aurai jamais pensé trouver une personne qui aime autant que moi porter des chemises et se saper pour les soirées ! Comme je te l'ai dit le jour de ta soutenance, en te croisant la première fois dans l'ascenseur j'ai tout de suite su qu'on allait bien s'entendre ! Je suis donc heureuse d'avoir fait ta connaissance, et je te souhaite sincèrement de trouver ta voie, tu as beaucoup à offrir (hum hum je ne parle pas de ça !) et j'espère sincèrement qu'on se reverra... enfin, ce qui est sûr, c'est que dans 10 ans ton visage juvénile apparaitra toujours sur les enveloppes du CLB !

Nico, je ne sais pas si tu mérites mes Remerciements puisqu'à ce jour je n'ai toujours pas vu les tiens... Je ne sais d'ailleurs même pas s'ils existent vraiment ! Mais on va dire que pour mes regards condescendants et mes interventions pas toujours heureuses à l'entrée du cinéma, je te dois bien ça !! Alors un grand Merci pour ta gentillesse à mon égard ! J'espère que tu te plairas à Marseille et que nous aurons l'occasion de nous revoir en France... ou ailleurs !

Marie, merci pour ta joie de vivre contagieuse, pour nos discussions et (mes) théories fumeuses, et les fous-rires qui ont suivi ! Merci également de m'avoir permise de voir qui tu es. Nul doute que cela m'a rendue plus ouverte et tolérante, et pour cela un grand Merci. Je vous souhaite à

toi et Elsa, que de belles choses pour la suite et je suis certaine que de nombreux moments de bonheur pointeront vite leurs bouts du nez…

Florian, merci d'avoir fait en sorte que mon intégration chez les Diaz se passe bien ! Ta bonne humeur, tes blagues et tes histoires m'ont tout de suite mise dans le bain et ça a été un vrai plaisir de travailler (et de sortir !) à tes côtés. Bonne chance pour l'Angleterre, j'espère que les P'tits Anglais seront aussi friands de ta chemise ouverte et de ton esprit blagueur que nous ! J'espère qu'on se recroisera pour une p'tite virée… salsa… ou LGBT !

Rémy, pour ta Folie et ton aide à la préparation du concours BMIC, merci pour tes questions qui surgissaient de nulle part. En revanche, je ne te remercie pas pour l'annonce des résultats. Sans rancune, mais il est encore trop tôt pour en rire ;) !

Plus que des collègues, de vrais Amis. (Preuve qu'on change, et que nos règles aussi pendant une thèse !)

Les p'tits Génies. Merci à tous les bénévoles, vous êtes trop nombreux pour tous vous citer…Et quelle joie c'est pour moi de le dire! Oh, et puis après tout… un énorme MERCI à Pauline M, Bastien, Clémentine, Mélanie F, Anne, Maggie, Marion C, Francesca, Stéphane A, Sofiane, Nabila, Margaux, Elena, Mélanie B, Marion Bo, Fleur, Aurore, Amina, Manon Br, Marion Br, Quhnh, Clément, Mathieu, Sarah, Giacomo, Laetitia G, Patricia, Stéphane G, Stéphanie G, Chloé, Matthias, Sandrine, Henri-Philippe, Sophie, Maud, Lucie, Solène, Nadine, Marie-Cécile, Julie, Flora, Sandra, Nathalie, Mélanie P, Anna, Samaneh, Ivana, Laura, Joël, Christophe & Dorian.

Merci pour ces deux belles années d'Ateliers Scientifiques avec les Enfants, merci pour votre implication et votre disponibilité, rien de tout ceci n'aurait été possible sans vous… Je crois que c'est l'une des choses dont je suis la plus fière ici…

Merci à Elise Tabet & Géraldine Battista de m'avoir aidée dans cette entreprise. Enfin, un grand MERCI à Virginie & Coline d'avoir accepté de reprendre le flambeau, j'en suis très heureuse. Je souhaite également la Bienvenue à Claire ☺. Bonne chance à vous tous.

Le Groupe « Foray », Merci Nicolas de m'avoir initiée à ce monde fascinant que sont les Irradiations & les Shuttling ! Tu es une personne passionnée et passionnante ! Merci de m'avoir fait découvrir les Trésors Scientifiques de cette belle ville qu'est Lyon. Je garde en mémoire également cette devise que tu aimes tant d'Arthur Schopenhauer :

« **T**oute vérité franchit trois étapes.
D'abord, elle est ridiculisée.
Ensuite, elle subit une forte opposition.
Puis, elle est considérée comme ayant toujours été une évidence. »

Merci également à Clément, qui n'a pas hésité à s'enfermer dans un « placard à balai » une partie de la nuit pour m'aider dans mes cinétiques longues en M2 ;). Merci Mélanie, Lauriane & Adeline d'avoir accepté de partager vos créneaux d'irradiations et votre expérience avec moi ! Bonne Chance à tous pour la suite, j'espère sincèrement vous revoir… qu'on soit sur le même continent… ou pas !

Le 5e étage, Cheney D. Merci à tous les membres et ex-membre de l'Equipe Chang ! En particulier Chang, Philippe, Anca, Doriane, Julie, Samuel, bon courage à tous pour la Suite ! Merci à mes co-thésards & copains de galère, Romain, Matthieu & Margaux. Bon courage pour la fin de vos thèses ! Enfin, merci à Stéphane, toujours disponible pour discuter « Malheurs de thésards » ou... Rugby !

Le 6e étage, Cheney D. Merci à tous ceux qui sont passés par chez vous et qui ont fait de cet étage un endroit où il fait bon vivre, et où on aime s'arrêter discuter ! En particulier Virginie, Serge M, Béa, Nelly, Sabine, Mélanie, Julie, Virginie, Léa et tous les autres !

Le 1e & 4e étage, Cheney D plus particulièrement Lucie, Joël, Matthias & Carla. Je vous souhaite bon courage pour la fin de vos Thèses/Post-Doc, Bonne Chance pour la suite, et j'espère que, où vous serez, nous garderons contact.

Le 3e étage, Cheney D, ou plus simplement l' »Equipe Caux » ! En particulier Coline, Marion, Margaux, Estelle, Suzanne, Lyvia & Elena. Bon courage à toutes pour la suite.

A tous les anciens, Merci. Amandine, Gabriel, Justine, Sophie, Rana, Rami, Marc, Alain, Chloé, Anne-Cécile, merci pour les moments que l'on a partagés, à discuter autour d'un gouter au 5e (ou au 6e), aux soirées BMIC, aux soirées « Péniches » de Lyon. Ou que vous soyez, je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos carrières en espérant tous vous recroiser au détour d'un labo... ou d'un voyage !

Le Département Plasticité des Cellules Cancéreuses et tous ses membres. Cela a été une joie d'interagir avec vous tous, et d'avoir fait partie du 1er Comité d'Organisation avec Julie, Joël, Hubert & Florian.

La Cellule de Gestion, en particulier Julie & Cathy pour votre aide au quotidien.

Les Secrétaires & Gestionnaires, en particulier Annick, Sophie, Dominique, Basma & Cidem. Merci pour votre gentillesse, et votre aide, si précieuse !

Le personnel du CRCL, en particulier Céline, Jeremy, Ines, Hervé. Merci pour votre gentillesse à vous tous ainsi que votre efficacité. Merci de faciliter notre travail au quotidien.

Pendant ma Thèse, j'ai également eu la chance de collaborer avec Chercheurs & Cliniciens, ce qui a largement contribué à développer mes connaissances.

Lauriane, merci pour tout ce que tu as fait pour m'aider dans ma démarche clinique. Je n'aurais pu mener le projet Ajora sans toi. Tu t'es toujours rendu disponible pour moi et notre projet et tu as toujours répondu à toutes mes questions... et il y en avait ! Je suis très heureuse d'avoir mené ce Projet avec Toi et j'espère qu'il ouvrira la voie à de nombreuses autres collaborations « jeunes » chercheurs-cliniciens aussi fructueuse que la nôtre.

Isabelle Treilleux, merci pour votre disponibilité, votre aide, ainsi que pour vos explications lors du déroulement de notre Projet Ajora.

Amélie & Laetitia, merci pour votre aide sur le Projet Ajora. Merci pour votre gentillesse et toutes vos explications. J'ai beaucoup aimé venir observer la construction des TMA, et la

validation des anticorps. Ca été très enrichissant, et cela m'a permis de mieux comprendre le projet et ses limites.

Olivier Gandrillon & Sandrine Giraud, Merci de m'avoir accueillie dans l'équipe afin d'utiliser l'appareil à gradients. Merci pour vos conseils, en particulier toi Sandrine, pour tous tes commentaires et explications pendant la réalisation des profils ainsi que pour ta gentillesse à mon égard.

Valérie, MERCI pour tout ! Tu m'as appris tout ce que je sais sur l'appareil à gradients...et ses problèmes techniques ! Merci pour nos après-midi à la Doua, à sacrifier des Schtroumpfs en mode « mimi-cracra », merci donc pour ton aide, mais aussi pour ta gentillesse et ta bienveillance. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi.

Aleth Calle & Guy Mouchiroud, merci à tous les deux pour votre compréhension ainsi que pour votre confiance. Merci d'avoir accepté de me confier votre matériel lorsque nous en avions cruellement besoin. Merci Aleth pour votre aide et votre gentillesse.

La Plateforme ProfileXpert, en particulier Catherine Rey pour m'avoir aidé à la paillasse et m'avoir accueillie dans vos laboratoires pour que j'observe vos techniques, et Joël Lachuer pour votre aide à la réalisation des Puces.

L'Equipe pédagogique de Biologie Cellulaire de l'Université Claude Bernard qui m'a accueillie pour mes trois ans de monitorat. Merci Dominique Baas et Dominique Le Guellec pour votre confiance. Merci à Christophe, Jérôme et Claire, auprès de qui je me suis formée. Cela a été un vrai plaisir d'apprendre à vos côtés. Un merci tout particulier à Jérémy et Emma avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à échanger pendant nos enseignements, bonne chance à vous pour la suite ainsi qu'à tous les autres pour la fin de vos thèses...et tout ce qui suivra !

Un grand merci bien sûr à tous mes Amis proches et toute ma Famille qui m'ont soutenue durant ces dernières années et dont certains seront encore là pour me soutenir le jour J.

Un Merci particulier à Mimi, ma Marraine, & Francis, à Alain, Brigitte, tous les cousins de St Dizier, Tonton Gilles, Stéphane & Laurence ainsi que Clément, mon filleul, et Clara. Merci Eliane, Pascale, et toute la Famille Milet.

Un Grand Merci,

Andréa, tu as été ma première encadrante ! Merci pour tout ! J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, même si cela n'a pas duré très longtemps. J'ai aimé ta rigueur, ta détermination, ton esprit, et ta gentillesse. Merci également d'être toujours disponible pour une traduction ou une correction de CV ! Bon courage & Bonne chance pour la suite.

Daniel, je ne te connais pas depuis longtemps mais j'ai apprécié chacun des moments que nous avons passés ensemble. Je te remercie pour tes précieux conseils sur l'Australie, nul doute que si je finis du côté de Melbourne tu y seras pour beaucoup ! J'ai passé de très bonnes soirées avec toi et je suis heureuse de t'avoir intégré au groupe ☺. J'espère que ta nouvelle vie à Boston te rendra heureux, et qu'on aura l'occasion de se recroiser… qui sait… pourquoi pas au Mexique ?! Sinceramente espero. Una vez más, gracias por todo.

A tous les autres, les copains du **Glup**, en particulier Ju, Oliv' & Aude-Line. **Quentin**, qui même s'il faut te supplier de venir à nos soirées, c'est toujours un plaisir de t'y voir ! Les copains de promo, **Pauline** dont je suis certaine on entendra parler pendant longtemps dans le monde de la recherche scientifique, **Axel, Gweltaz**, & **Julien** qui êtes passés juste avant moi, félicitations pour vos thèses… Messieurs les Docteurs !

J'ai une pensée très émue en pensant aux copains et copines avec qui j'ai évolué tout au long de ces Années, que nous ayons choisi des cursus semblables ou non, et qui seront avec moi en ce « dernier jour » d'Ecole !

Fannélya & **Amandine** …le collège et le lycée !! Vous êtes mes plus vieilles amies et je dis ça avec beaucoup de bienveillance ☺ Je n'ai pas de mots pour vous dire comme je suis heureuse de vous avoir près de moi en ce moment si particulier après tant d'années d'amitié… Et je ne peux pas m'empêcher de sourire en nous revoyant au lycée et de penser « Aie aie aie les filles si vous saviez ce que vous réserve la suite !». Et je suis fière. Fière des femmes qu'on est devenues. Fière de vous compter parmi mes Amies. Et vive les p'tits citrons ! ☺

Maud, ma première belle rencontre dans cette grande Ecole qu'est l'Université. Parfois, les plus belles Amitiés commencent avec peu de choses… comme … une paire de converses® ! J'ai beaucoup de chance d'avoir une Amie telle que toi, pour qui jamais aucune de nos idées ou trouvailles n'est de trop ! Il n'y a qu'avec toi que je peux réaliser toutes ces choses qui me passent par la tête ! Une capitale ? Un Opéra Ultra-glauque ? Une robe colorée ? Une séance photo sous une pluie torrentielle ? Pour toi rien n'est jamais un obstacle, et je ne compte plus les souvenirs inoubliables que nous avons (et les photos qui vont avec !). Tu es mon Amie-Ame-Sœur. Et même si nous seront loin l'une de l'autre dans le futur, je pense que la vraie

Amitié ce n'est pas d'être inséparables, c'est d'être séparés et que rien ne change. Et mise à part notre garde-robe qui, elle, ne cesse de changer, mon affection pour toi ne fait qu'augmenter... « Plus qu'hier...mais moins que Demain ». Je ne sais pas ce que nous réserve l'Avenir, mais un grand MERCI pour tout ce qu'on a déjà vécu...et tout ce que l'on va encore vivre & découvrir ensemble !

Marie, ma Brenda. Quelle immense joie cela a été de te rencontrer ! Une autre Patrickette... Moi qui pensais être la seule...et te voilà !! Comme je suis heureuse d'être tombée sur toi ! C'est fou comme certaines personnes ont le don de nous faire rire un peu plus fort, rendent nos sourires plus vrais et rendent nos vies meilleures, et tu es définitivement de ces personnes. Avec toi, la vie est une fête, les serviettes tourbillonnent, et peu importe au final si personne d'autre ne comprend ! Il y a encore tellement d'Aventures qui n'attendent que Nous ! Alors ma Brenda... Fais ta valise, car après les Ptits Anglais...à nous les Ptits Jap' ☺

Les Bobby's, avec lesquels on a été pour la plupart, sur les mêmes bancs de fac... avec une mention spéciale pour Greg : Notre 1er (et pas le dernier !) des Docteurs de la famille Bobby's ! Merci pour nos soirées... Merci d'êtres comme vous êtes... et il faut bien le dire, assez différents de moi ! Vous avez (largement ?!) contribué à me faire changer et à évoluer dans bien des domaines (et je ne parle pas uniquement de carottes !) et je vous en remercie. Je dois vous dire aussi que je suis fière de m'être accrochée à ce groupe, aux personnalités si particulières et uniques et d'avoir grandi à vos côtés tout au long de nos études... Je suis Heureuse d'avoir la chance de connaitre les personnes merveilleuses qui partagent vos vies, et la mienne désormais, pour former une belle Famille. Vous êtes, tous, de ces amis qui peuvent faire des mauvais moments de bons souvenirs et des bons souvenirs des moments inoubliables. Avec vous, la vie est simplement plus belle ! J'espère sincèrement que les Kms qui nous sépareront très prochainement ne changeront rien, et en attendant de vous voir au Pays des Kangourous, j'espère retrouver, à notre retour, une Famille Bobby's agrandie (à +3..+5 au moins... !) mais toujours aussi unie. ♡

Stéphanie, ma co-voyageuse. Nous n'avons pas été à l'école ensemble, en tout cas pas à celle à laquelle j'ai été habituée mais en ce qui concerne l'école du voyage, de la découverte, de la remise en question, tu as été la meilleure des profs... et la meilleure des acolytes avec laquelle je pouvais vivre tout ça. Jean-Luc Gendry a écrit : « Ce qui importe ce n'est pas le voyage. C'est celui avec lequel on voyage." Ici, en l'occurrence c'est celle avec qui je me suis lancée à la découverte de nouveaux horizons. Tu es l'Amie avec un grand A, celle avec qui je veux découvrir le monde...et le refaire ! Nos voyages m'ont tant apporté... et m'ont permis de souffler, de respirer pendant ces années de thèse, et surtout de me remettre en question et, pour cela, un grand MERCI. Nous sommes l'une et l'autre le témoin de bien des évènements marquants de nos Vies, et je suis fière d'avoir construit cela avec toi.

J'ai également une forte pensée pour des personnes qui ne sont plus avec nous aujourd'hui.

Mamie, tous ces moments heureux passés avec toi, réconfort de mon enfance. Si je ferme les yeux assez longtemps, je peux les voir. Tu me manques, tout comme ton sourire, tes yeux complices...ton indulgence quand tu recevais mes confidences... Tu savais si bien ce que c'est d'être la deuxième dans une Fratrie. Tu nous as quittés juste après l'obtention de ma bourse de

thèse, mais je sais que tu es fière que je participe à la recherche contre le cancer, et j'aurais aimé que tu sois là aujourd'hui pour voir l'aboutissement de mon travail.

Christiane, Gilles, Jean, Jacquy et Jacky :

Vous êtes mon inspiration.

Vos combats m'ont touchée, ils m'ont fait me dépasser. Grâce à eux, je fais partie de ceux qui pensent qu'il n'y a pas de barrière infranchissable. Il faut y croire un peu, car après tout, il y a bien des fleurs qui poussent dans le sable. Vivre c'est accepter la douleur, les échecs et les décès. Mais c'est aussi savoir puiser sa force pour affronter ces épreuves dans de petits moments de bonheur, que j'ai eu la chance de partager avec chacun d'entre vous. Je me rappelle les bons repas à Pouilly-les Nonains et à Mably, je me rappelle les soirées discothèque à St Dizier...qui se faisaient en fait dans un salon, à danser sur « Lettre à Elise » ou encore sur « Laisse-moi t'aimer », je me rappelle les apéros, 5 allée de la chainerie, ou encore de ceux dans un jardin fleuri à Ouches. Vous me manquez... Je suis sûre qu'on se reverra un jour... mais pas encore.

Dans chaque larme s'attarde un espoir, et vous êtes le mien. MERCI.

Le meilleur pour la Fin, comme de coutume.

Clément,

Mon petit Prince... la personne qui ne faisait pas partie de mes plans... ni de mes échelles d'ailleurs !! Tu m'as appris, de la plus belle des façons, que l'imprévu peut être une merveilleuse chose. Qu'avoir des principes et des règles c'est bien, mais que les remettre en cause de temps à autre ça peut être pour le mieux. Parce qu'en vrai, j'avais tout prévu pour cette fin de thèse... tout... sauf toi ! Merci d'être toujours là pour moi, à écouter mes récits, souvent improbables, à partager mes fous rires, à me remonter le moral quand je suis triste ou fatiguée (et c'est arrivé un paquet de fois ces derniers mois.. !), tu m'encourages quand je baisse les bras, et tu me consoles quand je subis un échec. Tu fais cela sans jamais te défaire ni de ta bonne humeur ni de ton beau et grand sourire... Merci de m'aimer telle que je suis. Tu transformes chaque instant de ma vie en un conte de fée, et tu fais réellement de moi quelqu'un de meilleur, de plus tolérant, et je remercie le destin de t'avoir mis sur ma route. Tu es ma plus belle rencontre ici. Tu es ma plus Belle Rencontre tout court.

Je ne sais pas ce que nous réserve l'Avenir, je n'aurais en tout cas pu rêver d'un meilleur compagnon de route... Je suis prête pour tout ce que la vie a à nous offrir, pour les galères comme pour les bonheurs et les grandes aventures ...

En France... or elsewhere...

A mes Sœurs, on manque trop souvent les occasions pour exprimer son attachement et ses sentiments aux êtres qu'on chérit. Voilà pourquoi je profite de cette occasion spéciale pour vous dire à quel point vous comptez pour moi.

Julie, tu as toujours été un modèle pour moi. « Souvent imitée jamais égalée »... J'ai beaucoup d'admiration pour toi, ainsi que pour ton travail, pour ton courage, et ta ténacité. Tu as une capacité et une force incroyable tout en étant d'une douceur et d'un calme (presque) absolu (oui, presque parce que l'agression aux plantes vertes fait un peu baisser ta côte !) Tu es une

belle personne, animée d'une passion sans limites, et d'un amour inconditionnel. Je suis fière que tu sois ma sœur. Une fois n'est pas coutume j'englobe Cédric ! C'est quelqu'un de bien pour toi, et je suis très heureuse que vous vous soyez trouvés. Je vous souhaite tout le bonheur que l'on peut imaginer et vouloir pour les gens qu'on aime.

Camille, merci d'avoir toujours cru en moi, mélange de naïveté et d'admiration pour son ainée sans doute ! J'aimerais que tu prennes conscience de la jeune femme merveilleuse que tu es, et que tu as toujours été. Je souhaite que tu comprennes quelle femme exceptionnelle tu pourrais devenir si tu t'en donnais juste un peu la peine. On est seul Maitre de son Destin. Alors ne t'enfermes pas dans un état d'esprit, crois en toi, et surtout n'aie pas peur de voir plus grand ! « A tendre vers les Etoiles, on peut se mouiller les pieds... mais pas se salir les Mains ». Alors déploie tes ailes et envoles toi ! La vie s'étend juste devant toi et elle a tellement plus à offrir à une jeune Femme. Je veux plus pour toi. Tu sais bien... « Toujours Plus » ...

A mes chers parents : Pascal & Nathalie

Vous êtes mes modèles, le secret de ma force.

Papa, dans ta détermination, ton courage à toute épreuve et ton honnêteté. Maman, dans ta bonté, ta patiente et ton dévouement à notre égard. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance. Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie, pour le bien-être de notre famille, de notre clan. Je vous suis très reconnaissante d'avoir toujours su me guider sans m'imposer vos choix ... franchement je ne sais pas comment vous avez réussi ça ! Merci Maman, d'avoir éveillé ma curiosité dans différents domaines de façons créatives et subtiles plus que scolaires ! Merci Papa de m'avoir emmené au jardin avec toi. Nul doute que mon intérêt scientifique vient de là. Merci de m'avoir laissé bavarder... pour finalement m'apprendre à bien parler. Merci, à tous les deux, de m'avoir aidé à développer mon intelligence, pas uniquement celle que l'on tire des bouquins, mais celle qu'on apprend de la vie et des autres. Celle qui permet d'être bien préparée et armée pour avancer dans la vie, en affronter les tourments, en apprécier les petits bonheurs. Merci d'avoir toujours veillé à ce que je n'oublie pas d'où je viens et ce qui fait que je suis arrivée ou je suis. Merci d'être tout simplement mes parents, c'est à vous que je dois cette réussite, et je suis fière de vous l'offrir.

Pour finir... Rien de surprenant me connaissant...

Un très grand merci à Kinder®, Milka®, Lindt®, avec une dédicace particulière pour les Kinder ChocoFresh® et les Kinder Country® sans lesquels tout ce travail n'aurait sans doute pas été possible et surmontable. (Et je dis cela sérieusement !)








hope
Institut d'Hématologie
et d'Oncologie Pédiatrique


Un siècle de Lumières
CRCL
ELISE BERTHEL

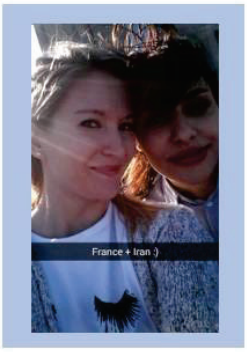


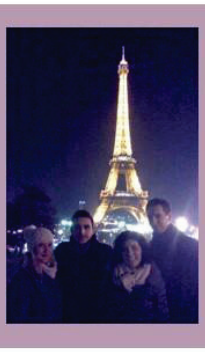

Église comble pour le concert
des enfants malades du cancer








France + Iran :)





Mercí ...













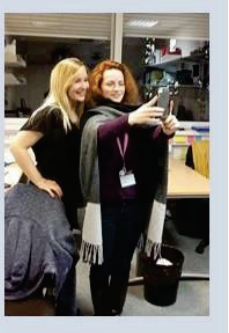

THÈSE
219




We Ribosome

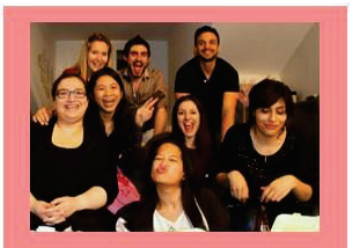







La Vache qui rit



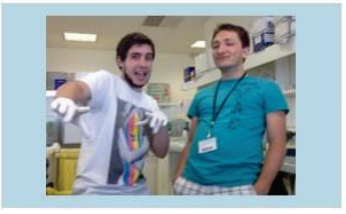
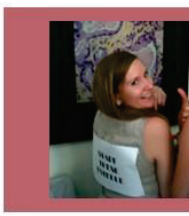
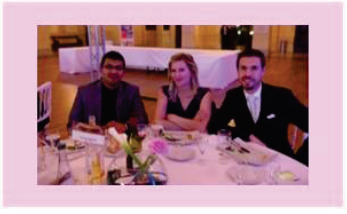
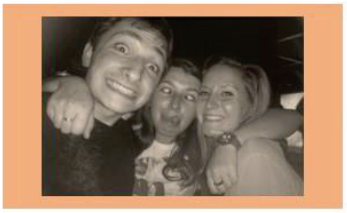


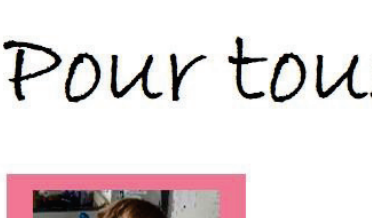






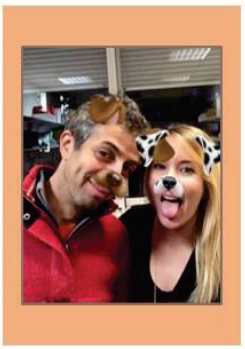
Pink

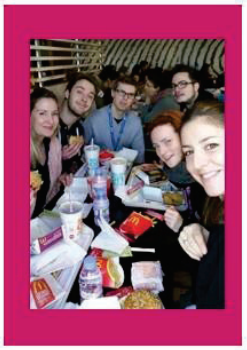






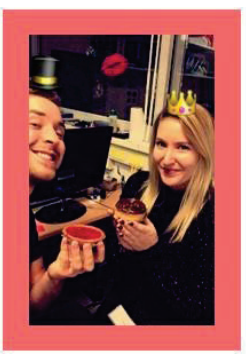
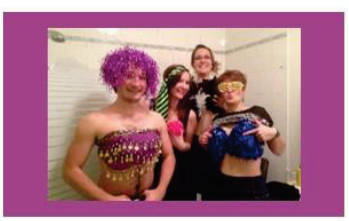
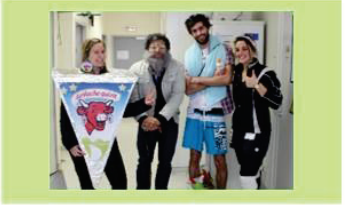



17 mars
2017







Pour tous ces bons moments
Signé
Un admirateur secret
Les p'tits
Génies
du mercredi

« **P**our réaliser une chose vraiment extraordinaire, commencez par la rêver. Ensuite, réveillez-vous calmement et allez d'un trait jusqu'au bout de votre rêve sans jamais vous laisser décourager. »

*Walter Elias Disney dit **Walt Disney***

Producteur, Réalisateur, Scénariste et Faiseur de Contes de Fées...

Sommaire

Introduction Bibliographique 1

Chapitre 1 : *BRCA1*, gène de prédisposition au cancer du sein 1

A. La glande mammaire 1

B. Le cancer du sein 1

1. Les différents types de cancer du sein 1
1.1 Classification selon le degré d'extension
1.2 Classification selon le grade
1.3 Classification selon le profil d'expression de récepteurs hormonaux et le statut HER2
1.4 Classification selon le profil d'expression multigénique
1.5 Nouvelle classification du sous-type « triple négatif »

2. Une stratégie thérapeutique qui s'adapte aux différentes formes de tumeurs mammaires 6
2.1 La chirurgie
2.2 La radiothérapie
2.3 La chimiothérapie
a) Les cytotoxiques
b) Les thérapies ciblées
2.4 Hormonothérapie

3. Les facteurs de risques 8
3.1 Prédisposition génétique au cancer du sein
a) Identification des gènes suppresseurs de tumeur *BRCA*
b) Les gènes suppresseurs de tumeur *BRCA* et l'hypothèse du « Two-Hit »
c) Les autres gènes de prédisposition au cancer du sein et les risques associés
3.2 Mutations *BRCA1* dans les cancers du sein héréditaires et sporadiques
3.3 Mutations de *BRCA1* : pourquoi un cancer du sein ou de l'ovaire ?

Conclusion du Premier Chapitre 17

Chapitre 2 : La protéine BRCA1 18

A. Du gène à la protéine BRCA1 18

1. Structure et régulation du gène *BRCA1* 18

2. Le transcrit BRCA1 18

3. La protéine BRCA1 19
3.1. Les domaines structuraux
a. Le domaine RING

b. Le tandem BRCT
3.2. La région centrale de BRCA1
a. Mécanismes de transport de BRCA1
b. Régulation du transport de BRCA1

B. Fonctions Nucléaires de BRCA1 22

1. BRCA1 maintient l'intégrité du génome 22
1.1 La protéine BRCA1 est recrutée aux sites de cassures de l'ADN
1.2 La protéine BRCA1 participe aux points de contrôle du cycle cellulaire
a) Le point de contrôle G1/S
b) Le point de contrôle intra-S
c) Le point de contrôle G2/M
1.3 BRCA1 participe à la réparation de l'ADN
a)BRCA1 dans la recombinaison homologue
b) Défauts de réparation par recombinaison homologue et phénotype « BRCAness »
c) BRCA1 dans la NHEJ

2. BRCA1 forme de multiples complexes transcriptionnels qui contribuent à la stabilité du génome 28

2.1 BRCA1 co-active la transcription de gènes
a. Exemple de p53
b. Exemple de STAT1
2.2 BRCA1 co-inhibe la transcription de gènes
a. Exemple de c-Myc
b. Exemple de Erα
2.3 Activité co-activatrice et co-inhibitrice de BRCA1 sur le même gène

C. Les fonctions cytoplasmiques de la protéine BRCA1 31

1. La protéine BRCA1 régule les centrosomes 31

2. La protéine BRCA1 module l'apoptose 32

3. Fonctions cytoplasmiques de BRCA1 identifiées par notre laboratoire 34
3.1 BRCA1 régule la lipogenèse
3.2 BRCA1 contrôle la traduction de certains ARNm

Conclusion du Deuxième Chapitre 37

Chapitre 3 : Traduction, BRCA1 & Cancer 38

A. Traduction canonique : Mécanisme général 38

1. L'initiation de la traduction 38
1.1 Les ARN de transfert (ARNt)
1.2 Les facteurs d'initiation de la traduction

1.3 Assemblage du ribosome
1.4 Interaction entre la coiffe et la queue poly (A)

2. L'élongation de la traduction 40

3. La terminaison de la traduction 41

B. La protéine BRCA1 et la machinerie traductionnelle 41

1. La protéine BRCA1 et les ARN 41

2. BRCA1 et le ribosome 43

C. Régulations spécifiques de l'initiation de la traduction par des éléments ARN en cis et des facteurs protéiques en trans 44

1. Les motifs TOP 44

2. Les uORF 45

3. Les IRES 46

4. Régulation par les miR 48

D. Régulation de la traduction dans un contexte pathologique : le Cancer 49

1. Altérations de la machinerie traductionnelle dans le cancer 49
1.1 Altération de l'expression des facteurs d'initiation de la traduction (eIFs)
1.2 Altérations des ribosomes dans le cancer

2. Suppresseurs de tumeurs et régulation traductionnelle 51

Conclusion du Troisième Chapitre 54

Résumé de Mon Projet de Thèse 55

A. Approche scientifique 55

B. Hypothèse et projet de thèse 55

C. Objectifs du travail de thèse 56

1. Détermination de(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) BRCA1 régule la traduction et identification de ses ARNm cibles 56

2. Validation des cibles de BRCA1 dans un contexte de stress 56

3. Validation de cibles de BRCA1 comme nouveaux marqueurs des tumeurs déficientes en *BRCA1* 57

Résultats 59

Article 1 – Un rôle inattendu du suppresseur de tumeur BRCA1 dans la traduction: vers un nouvel outil théranostique pour les cancers féminins 62

Discussion 70

Partie 1, Recherche fondamentale : BRCA1 régule la traduction d'ADAT2, CCNL2, DBF4B et TRIM45 70

A. BRCA1 est un co-facteur traductionnel 70

1. Identification des ARNm qui interagissent avec les complexes multi-protéiques contenant BRCA1 par la technique d'immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques (RIP) 70

2. ARNm cibles de BRCA1 : Structure & Fonctions des protéines codées 72
2.1 Discussion technique
2.2 FNBP4, GOLGA8a, et RHPN1
2.3 ADAT2
2.4 CCNL2
2.5 DBF4B
2.6 TRIM45
2.7 Conclusion

3. Existe-t-il un mode de traduction commun aux ARNm cibles de BRCA1 ? 77

B. ARNm cibles de BRCA1 & Stress génotoxique 80

Partie 2, Recherche appliquée : Le projet translationnel AJORA 83

A. Appel d'offre 83

B. Le projet 84

C. Anticorps & Constitution des TMA 85

D. Résultats attendus et Perspectives 87

Conclusion Générale 88

Liste des publications, communications & distinctions 90

A. Publications 91

B. Communications Orales 91

C. Communications par affiche 92

D. Prix & Distinctions 92

Annexes 93

Annexe 1 : Article 2 – BRCA1 affecte la signalisation PP6 à travers son interaction avec ANKRD28 ... 94

Annexe 2 : Article 3 – L'inhibition de HDAC6 surexprime CD20 et augmente l'efficacité des anticorps monoclonaux anti-CD20 96

Annexes 3-5 : Projet Ajora 98

Références Bibliographiques 101

Table des illustrations

Verso Pages

Figure 1 Le sein 2

Figure 2 Gènes de prédisposition au cancer du sein et risques associés 12

Figure 3 Conséquences de la mutation germinale BRCA1 dans les cellules somatiques et les cellules cancéreuses du sein 17

Figure 4 Structure primaire et domaines de la protéine BRCA1 19

Figure 5 Régions d'interaction de la protéine BRCA1 avec certains de ses partenaires protéiques 20

Figure 6 Principaux mécanismes moléculaires de transport de la protéine BRCA1 22

Figure 7 La protéine BRCA1 est recrutée aux sites de cassures doubles brins de l'ADN 23

Figure 8 Fonctions de la protéine BRCA1 en réponse aux dommages à l'ADN 28

Figure 9 Les complexes transcriptionnels formés par BRCA1 29

Figure 10 Schéma général représentant les grandes étapes de l'initiation de la traduction 38

Figure 11 La protéine PABP1, structure & fonction dans l'initiation de la Traduction 40

Figure 12 Domaines clés du ribosome impliqués dans la traduction 41

Figure 13 Recrutement du complexe de pré-initiation 43S dans les mécanismes coiffe-dépendant et coiffe-indépendant de l'initiation de la traduction 48

Figure 14 Les éléments de la machinerie traductionnelle, et les éléments régulateurs sont altérés dans le cancer 49

Figure 15 BRCA1 est une protéine multifonctionnelle dont l'activité dépend de sa localisation cellulaire et de ses partenaires protéiques 82

Liste des principales abréviations

4E-BP: eIF4E-Binding Protein

A

aa: acide aminé

ACCA: Acétyl-coA Carboxylase α

ADN: Acide Désoxyribonucléique

A-EJ: Alternative End-Joining

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: Acide Ribonucléique messager

ARNt: Acide Ribonucléique de transfert

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR: ATM-Related

B

BARD1: BRCA1 Associated RING Domain 1

BRCA1/2: Breast Cancer 1/2

BRCT: BRCA1 C-terminal

C

Chk1/2: Checkpoint Kinase 1/2

CL: Cross-Link

E

eIF: eukaryotic Initiation Factor

EMCV: Encephalomyocarditis Virus

H

HBOC: Human Breast and Ovarian Cancer

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2

hnRNP: heterogenous nuclear Ribonucleoprotein

HR: Homologous Recombination

I

IHC: Immunohistochimie

IR: Ionising Radiation

IRES: Internal Ribosome Entry Site

ITAF: IRES trans-acting Factor

K

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

L

LOH: Loss Of Heterozygosity

M

Met-ARNti: ARN de transfert méthionine initiateur

miARN: micro-ARN

miRISC: miRNA-Induced Silencing Complex

MRN: MRE11-RAD50-Nibrin

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

N

NES: Nuclear Export Sequence

NHEJ: Non-Homologous End Joining

NLS: Nuclear Localisation Signal

NR: Non Relevant

P

PABC: PABP1 C-terminal

PABP1: Poly(A)-Binding Protein 1

PAIP1/2: PABP-Interacting Protein 1/2

PAM1/2: PABP-interacting Motif 1/2

PARP: poly(ADP-Ribose) Polymérase

pb : paire de bases

PLA : Proximity Ligation Assay

PTB : Polypyrimidine Tract Binding protein 1

R

RBP: RNA Binding Protein

RH: Récépteurs Hormonaux

RING: Really Interesting New Gene

RIP: Ribonucleoprotein Immunoprecipitation

RdR: Ratio de Ratio

RRM: RNA Recognition Motif

T

TMA : Tissue MicroArrays

TOP: Terminal Oligopyrimidine tract

U

uORF: upstream Open Reading Frame

UTR : Untranslated Region

UV : Ultraviolet

Préambule

La compréhension des mécanismes favorisant l'apparition du cancer du sein mais également ceux contrôlant les voies de résistance aux traitements reste un enjeu majeur de santé publique. Le Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL, Lyon, France) que j'ai rejoint en master 2 a pour objectif le développement d'une recherche translationnelle forte**,** au service des personnes malades. Dans le cadre d'un financement ministériel, j'ai eu l'opportunité d'intégrer l'équipe du Dr. Jean-Jacques Diaz, spécialisée dans l'étude du rôle émergeant des ribosomes dans le développement des cancers. Sous la tutelle de Nicole Dalla Venezia j'ai étudié le rôle de la protéine BRCA1 dans la régulation de la traduction des ARNm. L'avancée de ce projet fondamental a permis l'émergence d'un projet translationnel en collaboration étroite avec les médecins et anatomo-pathologistes du Centre Léon Bérard, qui pourrait ouvrir de nouvelles voies diagnostiques et thérapeutiques.

Introduction Bibliographique

Chapitre 1 : BRCA1, gène de prédisposition au cancer du sein

A. La Glande mammaire

Le rôle physiologique de la glande mammaire est de produire du lait. Ainsi, lors du cycle de gestation/lactation, la glande mammaire va subir un certain nombre de modifications morphologiques résultant de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales mammaires. Ces phénomènes conduisent à la fonction sécrétoire ultime de la glande et sont contrôlés par de nombreux facteurs dont les hormones que sont les œstrogènes, la progestérone, et la prolactine (Brisken & O'Malley 2010).

Dans chaque sein, la glande mammaire est une masse de densité variable essentiellement composé de tissu adipeux, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, et d'un compartiment glandulaire situé au niveau du mamelon qui représente environ 60% du volume du sein. Elle s'organise en une vingtaine de lobes (1,5 à 3 cm de long pour 1 à 2 cm de diamètre). Chaque lobe est composé de 20 à 40 lobules (0,1 et 1 mm), et chaque lobule contient 10 à 100 alvéoles. L'alvéole, cavité arrondie en forme de cul de sac, constitue l'unité sécrétrice de la glande : elle est tapissée d'un épithélium comprenant plusieurs couches de cellules épithéliales (luminales) bordées par des cellules myoépithéliales (ou basales). Les cellules épithéliales permettent à l'alvéole de produire du lait, alors que les cellules myoépithéliales sont en contact avec la matrice extracellulaire composée de fibroblastes et de vaisseaux sanguins. Les alvéoles sont entourées de cellules adipeuses. Les vaisseaux lymphatiques sont connectés aux ganglions se situant à proximité du sein : au niveau des aisselles, au-dessus de la clavicule et au niveau du sternum.

B. Le cancer du sein

Le cancer du sein est de loin le cancer le plus fréquent chez la femme dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement, avec une estimation de 1,7 millions de nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 2008. C'est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes dans 140 pays (23% des cancers chez la femme) (source : http://globocan.iarc.fr et World Cancer Research Fund International, http://www.wcrf.org).
Depuis les dernières estimations de 2008, il apparait que l'incidence du cancer du sein a augmenté de 20% et la mortalité associée de 14%. Avec 522 000 décès/an, le cancer du sein reste la première cause de mort par cancer chez les femmes que ce soit dans les pays développés ou en voie de développement.
Selon les estimations réalisées en 2015 en France, 54 000 nouveaux cas seraient détectés chaque année et presque 12 000 personnes décèderaient chaque année (source : Institut National du Cancer, http://www.e-cancer.fr/).

1. Les différents types de cancer du sein

Lorsqu'un cancer du sein est suspecté après examens par palpation et mammographie, des biopsies suivies par des examens histologiques permettent d'en affirmer le caractère malin. Une évaluation est alors réalisée sur la tumeur afin de définir entre autre son type histologique, son étendue, son

agressivité et sa positivité à la présence de récepteurs aux œstrogènes (ER, pour estrogen receptor), à la progestérone (PR, pour progesterone receptor) et à la surexpression de HER2 (human epidermal growth factor receptor 2).

Une grande majorité des cancers du sein sont des adénocarcinomes (95%), ce qui signifie qu'ils se développent à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire. Ils apparaissent le plus souvent à partir des cellules des canaux et plus rarement à partir des cellules des lobules. On distingue les adénocarcinomes *in situ* et les adénocarcinomes infiltrants. Des formes rares de carcinomes peuvent également se développer parmi lesquelles le cancer médullaire. Dans 75% des cas, la tumeur infiltre le tissu environnant et est alors dite invasive contre 25% des cas où la tumeur est non invasive au diagnostic (Figure 1).

1.1 Classification selon le degré d'extension

Les différents degrés d'un cancer du sein sont définis par trois critères. La taille et l'infiltration de la tumeur (noté T0 à T4), l'atteinte ou non de ganglions lymphatiques (noté N0 à N3 selon l'importance de l'atteinte des ganglions) et enfin la présence (M1) ou l'absence (M0) de métastases.
Cette classification est appelée TNM pour « Tumor, Nodes, Metastasis ».

1.2 Classification selon le grade

Le grade histopronostique de Scarff Bloom et Richardson (SBR) permet d'évaluer l'agressivité d'une tumeur (Liu et al., 1993). Il est établi à partir de trois paramètres, notés de 1 à 3 chacun : l'architecture, les atypies nucléaires et l'activité mitotique de la tumeur. Plus une tumeur est agressive, plus les cellules qui la composent sont de types indifférenciés et perdent leurs caractéristiques d'origine. Leurs noyaux changent de forme et sont de tailles variables.

Critères	**Paramètres (notés de 1 à 3)**		
	1	**2**	**3**
Architecture de la tumeur	Présence de tubes	Partiellement tubulaire	Aucun tube
Atypies nucléaires	Noyaux réguliers & monomorphes	Atypie modérée	Noyaux pléomorphes & atypie marquée
Nombre de mitoses*	0 où 1	2	au moins 3

* *Le nombre de mitoses est recherché sur 20 champs au fort grossissement. Le nombre de mitose le plus important par champ est retenu.*

L'addition des trois critères permet d'obtenir le grade : le grade I avec un total de 3 à 5 correspond aux tumeurs les moins agressives, le grade II avec un total de 6 à 7 correspond aux tumeurs intermédiaires et enfin le grade III avec un total de 8 et 9 correspond aux tumeurs les plus agressives.
Le Grade SBR est réalisé sur tous les types histologiques de cancer infiltrant sauf le carcinome médullaire.

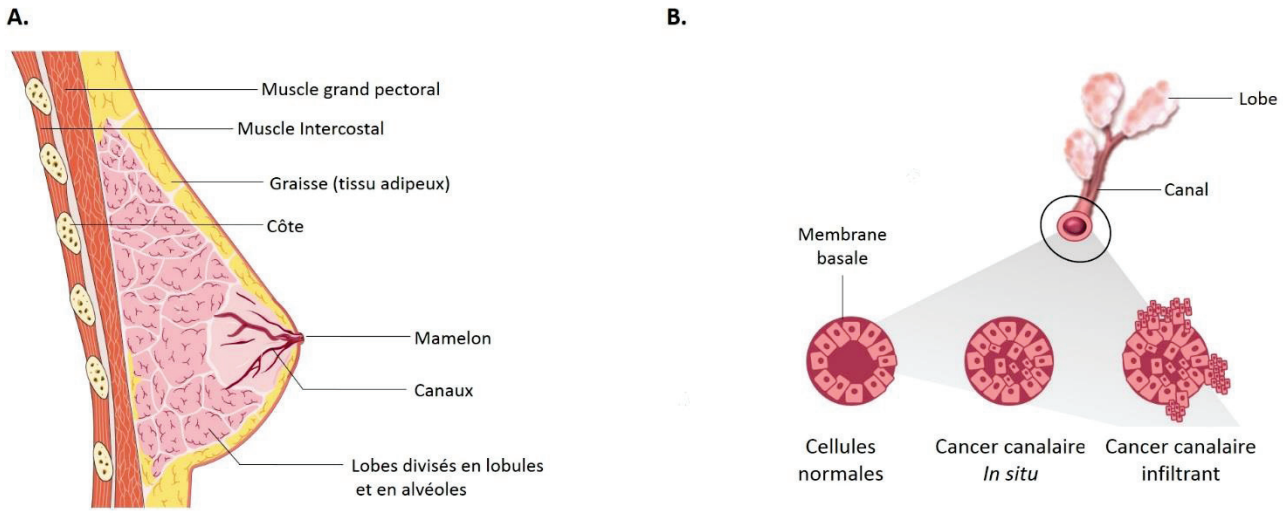


Figure 1 : Le sein

A. Représentation schématique de la glande mammaire. Le tissu glandulaire est majoritairement situé au niveau du mamelon et représente environ 60% du volume du sein. Un sein possède 15 à 20 lobes (1,5 à 3 cm de long pour 1 à 2 cm de diamètre), eux même composés de 20 à 40 lobules (0,1 et 1 mm), lesquels sont constitués de 10 à 100 alvéoles. Une tumeur peut se former au niveau des lobes ou des canaux (plus fréquent). Dans ce dernier cas le cancer peut être *in situ* ou infiltrant. (Figure adaptée de la banque d'image SERVIER)

B. Représentation schématique des cancers canalaires *in situ* et infiltrant. La tumeur peut être contenue *in situ* : 25% des cas de cancer du sein sont non invasif au diagnostic. Plus généralement, dans 75% des cas, la tumeur infiltre le tissu environnant et est alors dite invasive (Source internet: site www.ligue-cancer.net)

1.3 Classification selon le profil d'expression de récepteurs hormonaux et le statut HER2

Les statuts des récepteurs hormonaux (RH) et HER2 permettent de définir des sous-types tumoraux. Initialement, ces sous-types tumoraux ont été décrits par Sorlie et Perou, à partir du profil d'expression génique de 65 échantillons tumoraux de cancer du sein (Perou et al. 2000).
Cette classification est obtenue après l'analyse au microscope de coupes de tumeurs marquées avec différents anticorps pour distinguer trois sous-types.

- **Les tumeurs positives pour les récepteurs hormonaux (RH+)** expriment les récepteurs aux œstrogènes (ER+) et/ou à la progestérone (PR+). Elles représentent environ 70% des cancers du sein. Il s'agit d'une famille hétérogène tant sur le plan pronostic qu'en termes de sensibilité aux traitements, bien qu'elle réponde à la thérapie endocrinienne.

- **Les tumeurs positives pour HER2** sont caractérisées par une amplification et une surexpression du gène *ERBB2* conduisant à une surexpression de la signalisation HER2. La protéine HER2, codée par le proto-oncogène *ERBB2*, est un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) et un membre de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR). HER2 forme des hétérodimères avec les trois autres membres de la famille EGFR, donnant différents complexes avec différentes activités kinase associées à différentes fonctions physiologiques. *ERBB2* est amplifié et surexprimé dans environ 20% des carcinomes du sein. Les tumeurs dites HER2+ présentent une forte prolifération cellulaire (*via* l'activation des voies de signalisation comme MAPK ou PI3K/AKT). Le nombre de thérapies HER2-ciblées a considérablement augmenté ces dernières années. Ces traitements constitués d'inhibiteurs de l'activité RTK spécifique pour HER2 ou élargie aux membres de la famille EGFR ont significativement amélioré la survie globale et spécifique des patients atteints de cancer du sein HER2 + (Polyak & Metzger Filho 2012).

- **Les tumeurs triples négatives (TN)** sont définies par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, et l'absence de surexpression et d'amplification d'*HER2*. De plus, un grand nombre de ces tumeurs présentent une mutation du gène *BRCA1* accompagnée d'une LOH conduisant à la perte d'expression des 2 allèles du gène *BRCA1* (phénotype « BRCAness »). Par ailleurs, ces cancers surexpriment le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), présentent une amplification de l'oncogène *C-myc*, des mutations du gène *TP53* et une grande instabilité génomique. Ils représentent environ 15 % des cancers du sein. Ces tumeurs sont donc insensibles à l'hormonothérapie, l'arsenal thérapeutique disponible est considérablement réduit pour traiter ces tumeurs. Le pronostic de survie des patientes atteintes de ce sous type de cancer est faible (Bianchini et al. 2016).

1.4 Classification selon le profil d'expression multigénique

Grâce aux nouvelles technologies utilisant l'ADN complémentaire (ADNc), le niveau d'accumulation des ARN messagers (ARNm) de plusieurs milliers de gènes a pu être analysée simultanément (Cancer Genome Atlas, 2012)(Sorlie et al. 2001). Ces recherches ont abouti à la proposition d'une nouvelle

classification moléculaire des cancers du sein. L'immuno-marquage de cytokératines (CK) spécifiques des cellules luminales et basales a, pour sa part, contribué à la validation de cette nouvelle approche. De façon plus générale, le sous-type permet de définir un « comportement métastatique » (Kennecke et al. 2010). Ces techniques ont permis d'identifier au moins 4 sous-types moléculaires de cancers du sein invasifs pouvant correspondre à des pronostics et des traitements différents : les sous-types luminaux A et B, HER2+, Basal, Claudin-Low.

- **Les tumeurs de sous-types luminaux A et B** présentent une forte expression de Erα. Les cellules produisent les cytokératines 8, 18 et 19 comme les cellules normales de type luminal qui tapissent les canaux et les glandes mammaires face à la lumière (lumen). Ces cellules tumorales surexpriment aussi trois facteurs de transcription : le facteur GATA-binding protein 3 (GATA3), la X-boxe binding protein 1 (XBP1) et le facteur nucléaire hépatocytaire 3α (HNF-3α). Pour distinguer le type luminal A du type luminal B, le niveau d'expression du marqueur de prolifération Ki-67 est utilisé : le sous-type luminal A étant moins agressif que le B, le marquage correspondant à Ki-67 est moins prononcé dans le sous-type luminal A que dans le B. Les tumeurs dites luminales A sont faiblement prolifératives et sont définies par un indice Ki67 inférieur à 20% et un niveau d'expression des récepteurs aux œstrogènes plus élevé que dans le sous-type luminal B (Inic et al. 2014). Les cancers associés à des tumeurs de sous-type luminal A ont un excellent pronostic, rechutent peu, bien que peu sensibles à la chimiothérapie. En revanche, il est davantage possible de traiter les cancers associés à des tumeurs luminales B avec de la chimiothérapie.

- **Les tumeurs dites « HER2+ »** sont caractérisées par une forte expression des protéines HER2 et GRB7 (Growth Factor Receptor Bound protein 7), codées par deux gènes voisins sur le bras long du chromosome 17. Cette surexpression est souvent associée à une augmentation du nombre de copies de gènes codant pour ces protéines.

- **Les tumeurs dites basales (ou « basal-like »)** ont un profil d'expression correspondant à celui des cellules basales correspondant aux couches profondes des canaux ou des glandes. Les carcinomes du sein de type basal sont désignés ainsi en raison de l'expression constitutive par les cellules néoplasiques de gènes normalement exprimés dans les cellules basales et/ou myoépithéliales du sein tels que les cytokératines basales (CK5/6, 14 et 17), la p-cadhérine et la cavéoline 1. De plus, on note une absence des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et pas de surexpression de la protéine HER2 également dans ces tumeurs. Les caractéristiques de ce sous-type sont encore très controversées et il n'existe pas à ce jour de consensus pour le définir. Bien que les sous-types triple négatifs et « basal-like » soient souvent assimilés, une distinction doit être faite car il a été démontré que seulement 71% des cancers de sous-types triple négatifs étaient de type « basal-like » et que seulement 77% des cancers de type « basal-like » présentaient un sous-type triple négatifs (Bertucci et al. 2008)

- **Les tumeurs Claudin-Low** présentent une faible expression de gènes de la famille des Claudines (CLDN), dont les CLDN3, 4 et 7. Leurs caractéristiques suggèrent un passage de type épithélial à mésenchymateux et une forte proportion en cellules souches cancéreuses.

- **Un cinquième sous-type est parfois appelé « Normal-like »**, son profil d'expression est proche de celui des cellules mammaires normales. Cependant, il est encore extrêmement controversé car il est possible que les données permettant de caractériser ce sous-type soient le résultat d'un artefact (Badve et al. 2011).

Les sous-types « triple négatifs » et « basal-like » sont des catégories qui restent quant à elles, très hétérogènes. Ces cancers se développent avec une fréquence relativement élevée chez les femmes (10-17%) et présentent des pronostics défavorables, avec une tendance à atteindre surtout des femmes jeunes. Il apparait donc important de mieux comprendre la biologie de ces types de cancer pour identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. De nouvelles études moléculaires plus poussées ont permis une nouvelle classification de ces sous-types particuliers.

1.5 Nouvelle classification du sous-type « triple négatif »

Cette classification se base sur l'analyse plus approfondie du sous-type « basal-like » ou « triple négatif ».

Lehmann et ses collègues ont rassemblé les données de 21 bases de données différentes et ont analysé le profil génomique de 587 cancers du sein du sous-type « triple négatif ». Ils ont ainsi mis en évidence 6 nouvelles catégories dans ce sous-type, qui sont présentées ci-dessous (Lehmann et al. 2011). Ces données ont été confirmées par Prat et al. en 2013 (Prat et al. 2013).

- **Le sous-type « Basal-like » 1 (BL1)** est enrichi pour les voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire, la division et la prolifération (ex : forte expression de l'ARN messager Ki-67). Dans ce sous-type, la sous-expression de gènes impliqués dans le contrôle des cycles cellulaires s'accompagne d'une surexpression de la voie de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN.
- **Le sous-type « Basal-like » 2 (BL2)** est enrichi dans l'expression de facteurs de croissance (voies de signalisation EGF, WNT β-caténine…). Ce sous-type exprime aussi de nombreux récepteurs à ces facteurs de croissance.
- **Le sous-type Immunomodulateur (IM)** est enrichi dans des voies de signalisation utilisées par les cellules immunitaires : les voies de signalisation des cytokines, des antigènes, et des cellules « Natural killer » (NK).
- **Le sous-type Mésenchymateux (M)** est enrichi dans les voies de signalisation impliquées dans la mobilité cellulaire et dans la différenciation (voies de signalisation mTOR, WNT, TGFβ, ALK, régulation de l'actine par Rho).
- **Le sous-type « Mesenchymal stem-like » (MSL)** est enrichi dans les mêmes voies de signalisation que le sous-type M mais avec l'expression de gènes impliqués dans des voies contrôlant la signalisation des facteurs de croissance (EGFR, PDGF (Platelet-derived growth factor), TGFβ (Transforming growth factor beta), dans la différenciation (avec des gènes associés à l'EMT –transition épithélio-mésenchymateuse) et dans l'angiogenèse. Dans ce sous-type, des gènes liés au statut de cellules souches sont surexprimés, tandis que les claudines sont faiblement exprimées.
- **Le sous-type Luminal** exprime des récepteurs des androgènes (LAR – luminal androgen receptor). Il n'exprime pas ER (en accord avec son statut de « triple négatif »), mais surexprime des gènes impliqués dans la régulation des hormones incluant la synthèse des stéroïdes et le métabolisme des androgènes et des oestrogènes.

L'identification de lignées cellulaires représentant des sous-types de tumeurs TNBC permet de fournir des modèles clés pour des études précliniques avec la possibilité de développer de nouveaux agents thérapeutiques. Certaines grandes voies de signalisation étant communes à plusieurs de ces sous-types, une caractérisation moléculaire plus poussée de ces sous-types (analyses génomiques, microARN, épigénétiques, perte de fonction à l'aide d'ARN interférent) permettra d'identifier de nouveaux composants de ces voies de signalisation pouvant être ciblés pour le développement futur de nouvelles molécules pour soigner les TNBC.

2. Une stratégie thérapeutique qui s'adapte aux différentes formes de tumeurs mammaires

La chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie cytotoxique utilisée seule ou en combinaison avec une thérapie ciblée, l'hormonothérapie, et plus récemment l'immunothérapie sont différents traitements disponibles. Le choix du traitement dépend de nombreux paramètres qui sont la taille de la tumeur, son stade, le grade, le statut de ses récepteurs hormonaux, mais aussi des facteurs de risque. Des référentiels thérapeutiques sont mis au point et corrigés annuellement pour adapter au mieux la prise en charge des patients à la diversité particulière des cancers du sein.

Le traitement d'un cancer du sein localisé comprend en principe au minimum une chirurgie, généralement complétée par un ou plusieurs traitements préventifs de rechute nommés traitements "adjuvants" (chimiothérapie, radiothérapie, hormonothérapie)

2.1 La chirurgie

La chirurgie reste la pierre angulaire du traitement du cancer du sein localisé, il est exceptionnel qu'elle ne soit pas indiquée. Elle constitue une stratégie essentielle afin d'envisager l'éradication de la tumeur. Deux techniques sont envisageables. La tumorectomie, traitement conservateur, est utilisé dans le traitement des tumeurs de petites tailles (2cm ou un peu plus si les seins sont volumineux). L'exérèse doit être uni-centrique, les marges saines et le résultat esthétique correct. Ce traitement conservateur présente des limites telles que la taille de la tumeur, son caractère évolutif, la présence des mutations des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*. La deuxième technique est la mastectomie, traitement radical visant à pratiquer l'exérèse monobloc de la glande mammaire.

2.2 La radiothérapie

Elle utilise les rayonnements ionisants (photons X) délivrés par des accélérateurs. L'énergie choisie s'exprime en Gray (Gy), ce qui représente l'énergie d'un rayonnement ionisant apportant une énergie d'un joule à un milieu homogène d'une masse d'un kg (1Gy= 1J/Kg). Cette énergie est adaptée à l'épaisseur du tissu à traverser et de la tumeur à traiter. L'ionisation du milieu par transfert d'énergie produit des radicaux libres instables qui induisent des coupures sur les brins d'acide désoxyribonucléique (ADN), ce qui provoque la mort cellulaire. Seules les cellules en division sont radiosensibles. Cette radiosensibilité est supérieure dans le tissu tumoral du fait de la division rapide de ses cellules. La radiothérapie doit être débutée rapidement après chimiothérapie et intervention chirurgicale. La dose moyenne minimale est de 50Gy en 25 séances (2Gy/séance).

2.3 La chimiothérapie

La chimiothérapie adjuvante a fait ses preuves depuis longtemps pour la prévention des rechutes de cancer du sein (diminution du risque de 5 à plus de 50%). Elle a pour but de supprimer d'éventuelles cellules tumorales résiduelles non détectables. La chimiothérapie peut aussi parfois être utilisée avant

la chirurgie pour contrôler rapidement la maladie, augmenter les chances de garder le sein ou permettre une chirurgie qui n'était pas faisable initialement. La chimiothérapie peut faire appel à différentes classes médicamenteuses. On en distinguera deux grandes : les cytotoxiques et les thérapies ciblées.

a) La chimiothérapie cytotoxique

La chimiothérapie cytotoxique a pour principe l'utilisation de molécules anti-cancéreuses qui inhibent la synthèse de l'ADN ou induit des lésions irréversibles dans l'ADN conduisant à la mort cellulaire. La chimiothérapie est efficace sur les cellules à croissance rapide, incluant les cellules tumorales mais également les cellules saines à renouvellement élevé (cellules sanguines, les muqueuses ou la peau). Ceci explique les nombreux effets indésirables rapportés pour ces molécules (Exemples de cytotoxiques injectables : les taxanes, le doxocétal, les anthracyclines, le 5 fluoro-uracile etc).

b) Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées utilisent des molécules agissant plus spécifiquement sur des anomalies moléculaires identifiées dans la cellule tumorale ou dans les cellules de son microenvironnement. Ces traitements visent à diminuer le risque de métastase. Actuellement, les inhibiteurs de HER2 et les anti-angiogéniques sont parmi les plus développés, et les inhibiteurs de PARP (Poly ADP-ribose Polymérase 1) sont des molécules actuellement en développement en oncologie, en particulier dans les cancers du sein et de l'ovaire.

-Les inhibiteurs de HER2 sont utilisées dans le cas de cancers mammaires qui surexpriment la protéine de surface HER2. Celle-ci est ciblée par les inhibiteurs extra ou intracellulaires. Les inhibiteurs extracellulaires (Trastuzumab ou Herceptin®) sont des anticorps monoclonaux humanisés recombinants de la sous-classe des immunoglobulines G1 qui se lient avec une grande affinité au domaine extracellulaire de la protéine HER2 empêchant ainsi le clivage protéolytique de son domaine extracellulaire. Cette thérapie, associée à de la chimiothérapie cytotoxique, a transformé le pronostic des patientes avec une réduction de moitié du risque de rechute et de mortalité en plus de celle conférée par la chimiothérapie cytotoxique seule et les autres traitements. L'Herceptin® est proposée seulement si le cancer est infiltrant, si la tumeur exprime fortement la protéine HER2 à la surface des cellules tumorales et lorsqu'il y a également une indication de chimiothérapie.
Les inhibiteurs intracellulaires (Lapatinib ou Tyverb®) sont des doubles inhibiteurs de tyrosines kinases inhibant de façon irréversible les récepteurs EGFR (Epidermal Growth Factor receptor) et HER2.

-Les anti-angiogéniques sont des molécules visant à bloquer l'angiogenèse. Ce mécanisme correspond à la formation de néo vaisseaux à partir du réseau vasculaire déjà existant, essentiel à l'approvisionnement de la tumeur en oxygène et nutriments. Seul le Bévacizumab ou Avastin® est actuellement indiqué dans le traitement du cancer du sein métastasé, seul ou en association. Il s'agit également d'un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 qui se fixe au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

- Les inhibiteurs de la PARP agissent sur le système de réparation de l'ADN en synergie avec la perte de fonction des protéines BRCA1 ou BRCA2 dans les cellules tumorales, provoquant une importante instabilité génétique qui conduit à la mort de la cellule par le principe de létalité synthétique. Le bénéfice clinique des inhibiteurs de la PARP est démontré pour les cancers de l'ovaire chez les patientes porteuses de mutation germinale du gène *BRCA1*. Leur utilité dans les cancers du sein

« triples négatifs », dont beaucoup sont liés à une mutation de *BRCA1*, est actuellement en cours d'évaluation.

2.4 Hormonothérapie

L'hormonothérapie vise à modifier la sécrétion d'hormones ou à bloquer leur action afin d'empêcher la prolifération des cellules tumorales. Elle est proposée si la tumeur exprime au moins l'un des deux récepteurs aux hormones (ER et PR) et si un bénéfice est attendu sur le risque de rechute, ce qui est fréquemment le cas. Ces traitements diminuent de 30 à 60% les risques de rechute à la fois sous forme de métastases, de rechute locale ou de nouveau cancer. Plusieurs traitements sont possibles : Le traitement anti-œstrogènes (Tamoxifène®) qui bloque le fonctionnement du récepteur aux œstrogènes sur les cellules tumorales potentiellement restées dans l'organisme ou susceptibles de se développer. Il peut donc à la fois prévenir une rechute du cancer traité (local ou métastatique) et l'apparition d'un nouveau cancer du sein. Les inhibiteurs d'aromatase (Letrozole®, Anastrozole®, Exemestane®), médicaments réservés aux femmes ménopausées, bloquent le fonctionnement de l'enzyme aromatase qui aide à la conversion d'hormones stéroïdes en œstrogènes et qui est donc capable de fabriquer des hormones œstrogènes après la ménopause lorsque les ovaires ne fonctionnent plus. Leur efficacité est démontrée pour la réduction du risque de rechute et pour la prévention d'un nouveau cancer du sein. Enfin, le blocage ovarien qui peut être utilisé chez les femmes non ménopausées pour induire une ménopause artificielle, en complément du Tamoxifène® ou si celui-ci était contre-indiqué. Ces traitements sont administrés sous forme d'une injection sous cutanée ou intra-musculaire une fois tous les mois ou tous les trois mois (Enantone®, Decapn eptyl®, Zoladex®).

La biologie des tumeurs RH+ est toujours très étudiée afin de comprendre les mécanismes de résistance et d'adaptation à l'hormonothérapie. De nombreuses molécules sont en cours d'essais pour tenter d'améliorer son efficacité. Un inhibiteur de mTOR, l'évérolimus (Affinitor ®) associé à l'exémestane (Aromastine®), un inhibiteur de l'aromatase a déjà obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2013.

L'utilisation de ces différents traitements sur des tumeurs primaires ne suffit pas toujours à empêcher le développement de métastases. Les métastases à distance correspondent à l'installation dans un autre organe que le sein et ses ganglions adjacents, de cellules tumorales responsables, à l'origine, du cancer du sein. Elles sont souvent sensibles à de nombreux traitements. Néanmoins, sauf cas exceptionnel, une guérison définitive ne peut pas être obtenue : la maladie passe dans une phase « chronique » avec traitements au long cours. Le suivi est plus rapproché, avec des examens réguliers visant à évaluer la tolérance et l'efficacité des traitements prescrits. Les traitements sont nombreux et dépendent de chaque cas. Ils reposent également sur des chimiothérapies, une hormonothérapie lorsque le cancer du sein a des caractéristiques de sensibilité potentielle, des thérapies ciblées, de la radiothérapie ciblée sur une lésion spécifique, de la chirurgie, et des biphosphonates en cas de métastases osseuses, capables de diminuer le risque de complications de ces lésions (fractures par exemple). Dans de nombreuses situations, des essais cliniques sont disponibles visant à proposer de nouveaux traitements alternatifs pour plus d'efficacité à long terme.

3. Les facteurs de risques

Un certain nombre de facteurs peuvent influencer l'apparition du cancer du sein. On distinguera les facteurs de risque environnementaux (exposition au soleil, mode de vie, contraception, nutrition, surpoids) des facteurs de risque propres à l'individu (âge, genre, durée d'exposition aux hormones de

la puberté à la ménopause, histoires familiales et mutations génétiques). Ainsi, le risque de développer un cancer du sein augmente avec l'âge qui constitue l'un des facteurs de risque les plus important et le mieux documenté : l'incidence du cancer du sein est très faible avant 30 ans (25 cas pour 100 000), après quoi elle augmente de façon linéaire jusqu'à l'âge de 80 ans où elle atteint un plateau et décroît légèrement ensuite (Singletary 2003). De plus, ce risque augmente chez les femmes dont un parent proche a développé un cancer du sein. Il augmente également avec la consommation de tabac, le surpoids ou l'alcool. Ce dernier augmente les taux d'œstrogènes qui jouent un rôle prépondérant dans le développement de certains sous-types de cancer du sein.
Enfin, l'exposition aux radiations ionisantes, une source de carcinogenèse maintenant bien connue, est également associée à une augmentation du risque de développer un cancer du sein, comme cela a pu être observé chez les jeunes filles exposées aux radiations durant la seconde guerre mondiale ou chez les femmes traitées par radiothérapies dans la région de la poitrine pour des lymphomes hodgkiniens (Singletary et al., 2003).

Les influences hormonales affectant la croissance et la différenciation de la glande mammaire sont également bien connues pour moduler le risque de cancer du sein. En effet, des premières règles précoces (avant 12 ans) et des ménopauses tardives (après 55 ans) augmentent le risque de cancer du sein (Blamey et al. 2004). A l'inverse, les grossesses précoces menées à terme ont un effet protecteur, et le risque de cancer du sein décroît pour chaque grossesse supplémentaire. L'allaitement diminue encore le risque, d'autant plus que la durée totale d'allaitement (tous enfants confondus) augmente. Il est à noter que si les grossesses ne sont protectrices que lorsque menées à terme, les grossesses qui finissent par un avortement spontané ou induit n'augmentent quant à elles pas le risque de développer un cancer du sein (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2004). Etant donné que les contraceptions hormonales sont parmi les médicaments les plus prescrits dans le monde, leur association potentielle avec l'augmentation du risque de cancer du sein a également été étudiée. Il existe une légère et transitoire augmentation du risque pendant la prise de la contraception (orale ou injectée) qui commence à décroître peu après l'arrêt de la prise et qui disparaît 10 ans après l'interruption. Néanmoins cette élévation du risque relatif s'applique généralement à un âge inférieur à 35 ans, où le risque de cancer du sein est très faible et donc peu susceptible d'augmenter le taux d'incidence global. Au contraire, l'exposition à des traitements hormonaux de remplacement chez les femmes ménopausées a lieu à une période où le risque de cancer du sein est élevé. Très répandu depuis les années 1970 pour traiter les symptômes de la ménopause et protéger de l'ostéoporose, il a été montré que l'utilisation d'un tel traitement, lorsqu'il combinait œstrogènes et progestérone, augmentait effectivement le risque de développer un cancer du sein (Singletary et al., 2003). L'association du risque avec l'utilisation d'œstrogènes seuls n'a en revanche pas encore été clairement démontrée.
Enfin, l'histoire familiale constitue un facteur de risque majeur. C'est en 1866 que Paul Broca fût le premier à décrire une famille avec une haute fréquence de cancers du sein : la notion d'héritabilité du cancer du sein était née. A l'heure actuelle, on estime qu'environ 5 à 10% des cancers du sein sont dus à une prédisposition génétique, causée par des mutations dans les gènes de prédisposition à haute pénétrance (Graffeo et al. 2016).

3.1 Prédisposition génétique au cancer du sein

a) Identification des gènes suppresseurs de tumeur *BRCA*

Un gène suppresseur de tumeur *ou antioncogène* est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire. Contrairement aux oncogènes qui deviennent hyperactifs dans les cellules cancéreuses, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs est impliquée dans le processus de transformation maligne. Les cancers familiaux (10 % des cancers humains) sont associés à une altération constitutionnelle (ou germinale) d'un gène. Cette altération est donc présente dans toutes les cellules de notre organisme, gamètes incluses, elle peut donc être transmise à la descendance souvent *via* un mode de transmission autosomique dominant. Historiquement, le premier gène suppresseur de tumeur cloné a été le gène du rétinoblastome, *RB1*. Ce gène remplit parfaitement les critères précédents. En effet, il inhibe la progression du cycle cellulaire à la transition G1-S et, suite à la stimulation par des facteurs de croissance externes, sa phosphorylation lève l'inhibition et permet le passage du point de contrôle du cycle. Des études de délétions chromosomiques et de liaison génétique ont permis l'identification des gènes de prédisposition au cancer du sein *BRCA* (BReast CAncer) 1 et 2, dans les années 90. Le gène *BRCA1* a été lié au cancer du sein grâce à une étude de liaison sur un large groupe de familles à survenue précoce du cancer du sein. Cette analyse a permis de le situer sur le chromosome 17, en position 17q21 (Skol, Sasaki, and Onel 2016). En 1994, le gène BRCA1 a été cloné et des mutations induisant des délétions ont été identifiées dans sa séquence codante, dans des familles ayant de multiples cas de cancer du sein. Au même moment, il a été découvert que les familles avec une haute fréquence de cancers du sein chez les hommes n'étaient pas porteuses de mutations de *BRCA1*, suggérant l'existence d'un autre gène de prédisposition au cancer du sein. Le gène *BRCA2* a ainsi été découvert en 1995, à nouveau par étude de liaison et clonage positionnel en utilisant des familles de cancer du sein. Il est situé sur le chromosome 13 en position 13q12.3, et a effectivement été identifié comme un gène de prédisposition majeur au cancer du sein chez l'homme (Skol, Sasaki, & Onel 2016).

Parmi les cancers du sein dus à une prédisposition génétique, environ 20% sont attribués à des mutations germinales des deux gènes majeurs de prédisposition *BRCA1* et *BRCA2*. La mutation de ces gènes augmente le risque de développer un cancer du sein à un âge jeune, habituellement avant la ménopause, un cancer dans les deux seins (cancer du sein bilatéral) et enfin un cancer de l'ovaire, essentiellement à partir de 40 ans.

Plus précisément, les mutations des gènes BRCA augmentent les risques de cancers de la manière suivante (Antoniou et al. 2003):

		BRCA1		***BRCA2***	
		Sein	**Ovaire**	**Sein**	**Ovaire**
Risques	Cancer avant 70ans	40-85%	10-63%	40-85%	10-63%
	Cancer avant 45ans	25%	10%	7%	1%
	En fonction du gène *affecté*	65%	45%	45%	11%
	Cancer du sein controlatéral	3,8-6,4%		2,1-4,2%	
	Cancer de l'ovaire associé		24%		8%

Les hommes peuvent également être porteurs de ces mutations : lorsque la mutation touche *BRCA2* les porteurs ont un plus haut risque de développer un cancer du sein que ceux porteurs de mutations de *BRCA1*.

b) Les gènes suppresseurs de tumeur *BRCA* et l'hypothèse du « Two-Hit »

Au tout début des années 1900, Theodor Boveri étudie « les processus par lesquels un nouvel individu avec des caractéristiques propres est créé à partir du matériel génétique de ses parents » et fonde ainsi la théorie chromosomique de l'hérédité. Ses découvertes lui ont permis de prédire un certain nombre de concepts sur l'initiation du cancer et la croissance tumorale dont beaucoup se sont révélés corrects avec l'évolution des techniques expérimentales. Il avait notamment émis l'hypothèse de « chromosomes inhibiteurs » qui seraient physiquement perdus dans les tumeurs malignes.
Ces « chromosomes inhibiteurs » participeraient à un mécanisme de surveillance de la cellule normale jusqu'à ce qu'un stimulus extracellulaire spécifique lève l'inhibition et permette la division cellulaire.
Dans les années 70 c'est Alfred Knudson, qui en se basant sur ces théories, établit un modèle mathématique et émet l'hypothèse du « two-hit ». Cette hypothèse formule que deux « hits » sont requis pour l'inactivation complète d'un gène suppresseur de tumeur, suggérant que la prédisposition au cancer résulte de l'héritage d'une mutation spécifique dans un gène suppresseur de tumeur (elle est donc héritée de façon dominante) mais que l'initiation de la tumorigenèse requiert des altérations somatiques résultant en la perte de la copie sauvage du même gène (King et al. 2007). Pour l'heure, dans les cancers du sein lié aux gènes *BRCA* quelques mutations somatiques de l'allèle sauvage de ces gènes ont pu être mises en évidence. L'hyperméthylation aberrante des promoteurs des deux gènes *BRCA* est un mécanisme qui inactive l'expression de ces gènes dans une proportion non négligeable de cancers du sein sporadiques, cependant cela n'a que très rarement été retrouvé dans les tumeurs associées à *BRCA1* ou *BRCA2*. En revanche, dans les tumeurs des patients prédisposés au cancer du sein, plusieurs études ont fait part d'une perte d'hétérozygotie (LOH : Loss Of Heterozygosity) touchant l'allèle sauvage des gènes *BRCA*, confirmant le statut de suppresseur de tumeur de ces deux gènes. La LOH de *BRCA* peut se produire par la délétion ou par conversion génique.
Une étude sur des échantillons de tumeurs de patientes atteintes d'un cancer du sein causé par la mutation *BRCA1* a montré que parmi 18 cas porteurs de LOH, 11 avaient perdu l'allèle mutant et non l'allèle sauvage, ce qui suggère que la perte de l'allèle sauvage de *BRCA* ne serait pas nécessaire pour initier la tumorigenèse (Roy, Chun, & Powell 2012).
Cependant, il est important de garder à l'esprit les problèmes méthodologiques liés à la mesure de la LOH par PCR dans les échantillons de tumeurs micro disséquées: une toute petite quantité de tissu normal peut contaminer et fausser l'analyse en produisant des résultats de type « allèle sauvage ». En outre, les mécanismes épigénétiques conduisant au « silence » de l'allèle de type sauvage, qui ne peuvent pas être détectés par PCR, doivent également être considérés. En l'absence de LOH, l'haplo-insuffisance de l'activité *BRCA1* pourrait donc provoquer suffisamment d'instabilité génomique pour favoriser la tumorigénèse. Bien que certaines données suggèrent que la perte de l'allèle sauvage puisse ne pas être requise pour tous les cas de tumorigénèse associés aux gènes *BRCA*, la LOH se produit dans la plupart des cas. Pour l'heure, nous ne savons pas si l'hétérozygotie de *BRCA1* et *BRCA2* favorise la perte de l'allèle sauvage ou si la perte de l'allèle est aléatoire.

c) Les autres gènes de prédisposition au cancer du sein et les risques associés

Parce que l'identification des mutations de *BRCA1* ou *BRCA*2 ne suffisent pas à expliquer la totalité des cancers du sein à composante héréditaire, d'autres gènes de prédisposition ont été recherchés. Aucun gène prédisposant aussi fortement au cancer du sein n'a pu être identifié à ce jour, néanmoins, ces recherches ont effectivement abouti à l'identification de gènes conférant un risque moindre. Les variants génétiques associés au risque de cancer du sein peuvent être classés en trois catégories qui sont les mutations à haute pénétrance, à pénétrance modérée et enfin à faible pénétrance (Foulkes et al., 2008)(Melchor & Benítez, 2013) (Figure 2).
Les mutations à haute pénétrance sont rares dans la population mais associées à un risque élevé. Les variants de *BRCA1* et *BRCA2* font partie de cette catégorie. En dépit des hauts risques conférés par les mutations à forte pénétrance, ces mutations sont rares dans la population et en 2010, il était estimé qu'elles n'expliqueraient ainsi qu'un assez faible pourcentage (20-25%) du risque familial. Les allèles de haute pénétrance, autres que *BRCA1* et *BRCA2*, ont été identifiés en raison de leur implication dans des syndromes prédisposant au cancer (InCA, Cancer Genome Atlas, 2012), il s'agit de mutations affectant les gènes codant pour les protéines P53, PTEN, STK11 et E-cadhérine (Fergus J. Couch, Katherine L. Nathanson 2014) :
-**P53** joue un rôle important dans la signalisation de réparation de l'ADN et de mort cellulaire. La mutation du gène *TP53* est retrouvée chez les personnes atteintes du syndrome de Li Fraumeni, qui se manifeste par une augmentation du risque de développer un cancer du sang, un cancer du cerveau et un sarcome.
-**PTEN** (Phosphatase and TENsin homolog) inhibe la voie PI3K/AKT/mTOR. La mutation du gène codant cette protéine est retrouvée chez les personnes atteintes du syndrome ou maladie de Cowden qui prédispose également aux cancers colorectaux et de la thyroïde
-**STK11** (Sérine/Thréonine Kinase 11) aussi appelé PJS ou LKB1, régule de nombreuses protéines impliquées notamment dans le contrôle de l'apoptose. La mutation du gène codant pour cette protéine est retrouvée chez les personnes atteintes du syndrome de Peutz-Jeghers. La présence de cette maladie provoque une augmentation du risque de cancers colorectaux, de cancers de l'ovaire et du testicule.
-La **E-cadherine** est codée par le gène CDH1. Cette protéine se trouve à l'intérieur de la membrane des cellules épithéliales. La E-cadhérine appartient à une famille de protéines appelées cadhérines dont la fonction est l'adhésion cellulaire afin de former des tissus organisés. La E-cadhérine est l'une des protéines de la famille des cadhérines la plus décrite. En plus de son rôle dans l'adhésion cellulaire, la E-cadhérine est impliquée dans la transmission de signaux chimiques dans les cellules, en contrôlant la maturation et le mouvement des cellules et en régulant l'activité de certains gènes. La E-cadhérine agit également comme une protéine suppresseur de tumeur, en empêchant les cellules de croître et de se diviser trop rapidement ou d'une manière incontrôlée.

En raison de la faible augmentation du risque conféré par les variants à pénétrance modérée et de leur fréquence relativement faible dans la population, ces derniers contribueraient quant à eux à moins de 3% du risque relatif familial (Fergus et al., 2014). Il s'agit de mutations affectant principalement les gènes codant pour les protéines CHK2, ATM, PALB2 et BRIP1.
-**CHK2** (checkpoint kinase 2) est active lors de cassures d'ADN qui induit l'arrêt du cycle cellulaire
-**ATM** (Ataxia Telangectasia Mutated) est une kinase phosphorylée lors de cassures d'ADN qui permet d'activer des voies impliquées dans la réparation de l'ADN. Chez les personnes atteintes d'ataxie-

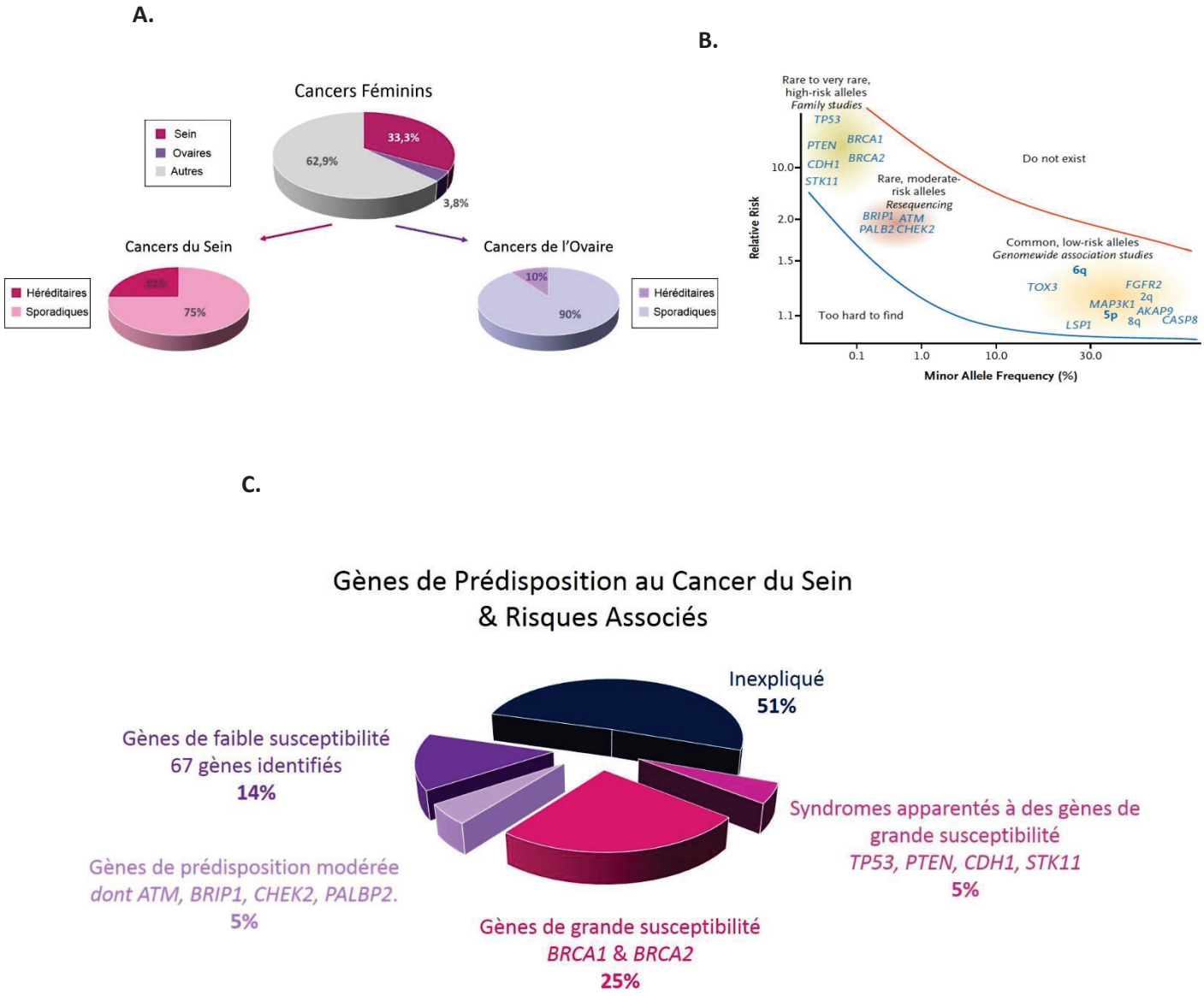


Figure 2 : Gènes de prédisposition au cancer du sein et risques associés.

A. Les cancers féminins. Le cancer du sein représente plus de 30% des cancers féminins, et il est la 1e cause de mortalité par cancers chez les femmes. Le cancer de l'ovaire ne représente qu'une petite part des cancers féminins (moins de 4%), en revanche, souvent associé à un très mauvais pronostic le dépistage étant souvent réalisé à un stade avancé de la pathologie.

B. Loci et Gènes de Susceptibilité au Cancer du Sein. L'étude de grandes familles qui présentaient de multiples cas de cancer du sein héréditaires ont permis d'identifier les gènes de prédisposition *BRCA*. Pendant longtemps, il a été considéré que seuls ces gènes prédisposaient au cancer du sein (Figure extraite de Foulkes WD, N Engl J Med. 2008)

C. Estimation de la contribution au risque relatif de cancer du sein familial des allèles de prédisposition au cancer du sein. *BRCA1* et *BRCA2* expliquent la grande majorité du risque de développer un cancer du sein familial. Cependant, un grand nombre de familles ne portent aucune mutation pour ces gènes et donc, les cancers du sein, dans ces familles pourraient être causés par l'héritage d'un ou plusieurs gènes de prédisposition au cancer de faible pénétrance. (Figure adaptée de Melchor L & Benítez J, Hum Genet. 2013)

télangiectasies on observe des signes neurologiques, des télangiectasies (dilatations de petits vaisseaux sanguins près de la surface de la peau), une sensibilité accrue aux infections et un risque augmenté de cancers.

- **PALB2** (ou FANCN) est un partenaire protéique de BRCA2 nécessaire à l'ancrage de BRCA2 aux structures nucléaires, lui permettant ainsi de jouer son rôle dans le processus de réparation de l'ADN double-brin par recombinaison homologue. Les mutations du gène codant pour cette protéine sont retrouvées chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi (maladie autosomique récessive associée à une instabilité chromosomique). Ces mutations produisent un phénotype très similaire à celui résultant des mutations dans *BRCA2.*

-**BRIP1** (ou BACH1) est une hélicase qui interagit avec la protéine BRCA1 et joue un rôle dans la réparation de l'ADN. Les mutations du gène codant pour cette protéine sont également retrouvées chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi.

Enfin, les polymorphismes de faible pénétrance sont communs dans la population mais associés à une faible augmentation du risque, ils expliqueraient environ 8% du risque familial.

En conclusion, si l'on ajoute les risques conférés par les mutations à haute pénétrance, à pénétrance modérée et enfin à faible pénétrance, plus de 50% du risque relatif familial reste inexpliqué et seule une partie du risque de développer un cancer du sein est expliquée par les variants génétiques découverts à ce jour.

Les variants génétiques associés au risque de cancer du sein ne suffisent pas à expliquer entièrement le risque familial, il se pourrait donc que les 50% du risque restant inexpliqué soient dus à des variants communs ayant des effets encore plus faibles sur l'augmentation du risque ou des variants rares présents parmi les SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) disponibles par les GWAS (Genome-Wide Association Study). De plus, il est possible qu'une partie du risque familial soit expliquée par un modèle polygénique impliquant une combinaison de plusieurs variants qui individuellement n'ont que très peu d'impact sur le risque et sont donc difficiles à identifier (Mavaddat et al. 2010).

Néanmoins, les mutations affectant ces différents gènes sont, elles, maintenant bien connues et bien qu'il n'existe pas encore de traitements spécifiques et adaptés à la présence de ces mutations elles font l'objet de dépistages. Les patientes qui présentent une de ces altérations génétiques peuvent recevoir une hormonothérapie préventive lorsqu'une mastectomie n'est pas envisageable afin de diminuer les risques de développer un cancer. Cependant, il est encore difficile d'évaluer la balance bénéfice-risque (Sénéchal et al. 2016)

3.2 Mutations *BRCA1* dans les cancers du sein héréditaires et sporadiques

Dans les tumeurs héréditaires du sein, la base de données «Breast Cancer Information Core » (BIC, http://research.nhgri.nih.gov/bic/) qui regroupe une collection internationale des variants de *BRCA1* et *BRCA2* fait état d'environ 1700 mutations germinales distinctes de *BRCA1* dans le monde. Selon cette même base de données, 55% de ces mutations sont uniques. Pour le moment, aucun « point chaud mutationnel » n'a été décrit car ces mutations sont réparties tout le long du gène et ne se concentrent pas dans une zone particulière. La plupart des mutations germinales de *BRCA1* identifiées sont des mutations ponctuelles ou des délétions/insertions de quelques nucléotides. Cependant, il a également été décrit de plus grands réarrangements, tels que des pertes ou duplications d'exons sur le gène *BRCA1* (Mazoyer, 2005). Ces différentes mutations peuvent être silencieuses, faux-sens, non-

sens, entraîner des décalages du cadre de lecture, des modifications d'épissage ou des régions non traduites des ARNm (5' et 3'UTR).
En revanche, la majorité des mutations associées au risque de cancer du sein sont plutôt des mutations non-sens ou entrainant un décalage du cadre de lecture, ayant pour conséquence la formation d'un codon-stop prématuré. La plupart du temps ces variants sont reconnus et dégradés par le mécanisme du NMD (Non-Sens Mediated Decay) mais lorsque ce n'est pas le cas, cela aboutit à la formation de protéines tronquées. Dans une étude des variants de *BRCA1* recensés en France, les auteurs ont montrés que certains exons contiennent davantage de variants que d'autres. De plus, ces exons correspondent aux domaines fonctionnels connus RING et BRCT de la protéine BRCA1 (Caputo et al. 2012)
La perte de fonction de la protéine BRCA1 est donc très étroitement liée à ces mutations, que ce soit dans le cadre de la dégradation du transcrit par le NMD, qui conduit à l'absence de protéine BRCA1, ou par le biais de la perte des domaines fonctionnels de la protéine, qui peut alors être présente mais non fonctionnelle.
Pour finir, il est important de noter que déterminer si les mutations faux-sens recensées sont associées au risque est beaucoup plus difficile faute de connaitre les conséquences fonctionnelles sur la protéine. La plupart des mutations demeurent encore non classifiées. Pour y remédier, certaines études visent à développer des tests fonctionnels et structuraux notamment pour les variants situés dans le domaine fonctionnel BRCT (Lee M et al. 2010).

Dans les tumeurs sporadiques du sein (et de l'ovaire) une diminution ou une absence d'expression de l'ARNm ou de la protéine BRCA1 a été rapportée dans de nombreuses études. Cependant, en raison de la diversité des tumeurs (nombre, statut hormonal, statut de méthylation du promoteur *BRCA1*, analyse du taux de transcrit/protéine, techniques utilisées, etc…) il est très difficile d'évaluer le pourcentage de cancers sporadiques présentant une réelle baisse de l'expression de BRCA1. En 2012, une équipe a montré une baisse de l'expression de la protéine BRCA1 dans 35% des 95 tumeurs analysées indépendamment de leur statut et une absence totale de BRCA1 dans 22% d'entre elles (Bal et al. 2012).
Pour expliquer la diminution/perte de l'expression de BRCA1 dans les cancers sporadiques, des mutations ont été recherchées et contrairement aux cancers du sein héréditaires, très peu de mutations sporadiques de BRCA1 ont été identifiées à ce jour. Approximativement 2% des tumeurs sporadiques du sein présentent une mutation somatique de *BRCA1* (source internet : http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic)(Forbes et al. 2014). En revanche dans les cancers du sein sporadiques, la perte d'hétérozygotie (LOH) est fréquemment observée au locus *BRCA1* (30-50% des cas) et celle-ci est bien associée à une diminution du niveau de l'ARNm de *BRCA1*.
Un autre mécanisme alternatif aux mutations génétiques qui permet l'inactivation des gènes par mécanisme épigénétique (dont les suppresseurs de tumeur comme *BRCA1*) est l'hyperméthylation de son promoteur (Galizia et al. 2010). En effet, la méthylation aberrante de résidus cytosines dans les îlots de di-nucléotides CpG au sein de certains promoteurs conduit à la condensation de l'ADN voisin et à l'inhibition de la transcription. La méthylation aberrante du promoteur de *BRCA1* a été observée dans 9 à 25% des cancers du sein sporadiques (et 5 à 31% des cancers de l'ovaire).
D'autres mécanismes peuvent expliquer la diminution/perte de l'expression de BRCA1 dans les cancers du sein sporadiques. L'un d'eux est lié à la surexpression de deux protéines HMGA-1 (high-mobility group proteins type A1) et ID4 (inhibitor of differenciation 4) impliquées toutes deux dans la transcription. HMGA-1 appartient à une famille de protéines contrôlant la conformation de l'ADN, et

ID4 appartient à une famille de régulateurs dominants-négatifs des facteurs de transcription hélice-tour-hélice. Enfin, notre laboratoire a montré que certains micro ARN, les miR-146a et miR-146b-5p, peuvent également être à l'origine d'une diminution de l'expression de BRCA1 dans les cancers du sein sporadiques triples-négatifs (Garcia et al. 2011).

3.3 Mutation de *BRCA1* : pourquoi un cancer du sein ou de l'ovaire ?

Pourquoi une mutation affectant le gène *BRCA1* codant pour une protéine ubiquitaire prédispose-t-elle uniquement aux cancers du sein et de l'ovaire ? Bien qu'aucune réponse claire n'ait encore vue le jour, celle-ci se trouve peut-être dans ces deux organes touchés. Une caractéristique commune entre le sein et l'ovaire est que ce sont deux organes soumis à de fortes régulations hormonales. En effet, les cellules épithéliales de ces deux organes sont sujettes à de forts signaux de croissance et une forte stimulation hormonale pendant le cycle menstruel normal. Plusieurs théories sont apparues pour expliquer la spécificité tissulaire des cancers liés à BRCA1 mais aucune n'est encore définitive (Sedic & Kuperwasser 2016).

La croissance hormones-dépendante au cours de chaque cycle menstruel produit des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO, en anglais : reactive oxygen species, ROS) qui sont des espèces chimiques oxygénées et qui provoquent des dommages oxydatifs à l'ADN. La conséquence de ces dommages est la production d'un sous-ensemble de lésions conduisant à des cassures double-brin de l'ADN. En d'autres termes, ces dommages oxydatifs peuvent produire un stress réplicatif à l'ADN qui sollicite la voie de réparation par recombinaison homologue (RH) nécessitant les protéines BRCA1 et BRCA2. BRCA1 serait nécessaire à la réparation de ces cassures œstrogènes-dépendantes et que l'absence de BRCA1 conduit à une instabilité génomique. Fait important, les lésions de l'ADN induites par les œstrogènes et l'instabilité génomique se produisent indépendamment d'ERα. Enfin, en réprimant transcriptionnellement l'expression de l'enzyme de métabolisation des œstrogènes CYP1A1, BRCA1 entraîne une réduction du métabolisme des œstrogènes et des lésions de l'ADN par les œstrogènes dans les cellules mammaires (Savage and Harkin 2015). Cette hypothèse intègre les caractéristiques communes de BRCA1 et BRCA2 et pourrait expliquer la prédisposition au cancer du sein et de l'ovaire (Roy, Chun, & Powell 2012).

Les cancers du sein déficients en BRCA1 présentent principalement des caractéristiques du sous-groupe «basal», comme le manque d'expression des récepteurs aux œstrogènes. Ces caractéristiques cliniques pourraient être expliquées par les résultats de plusieurs groupes de recherche suggérant que les mutations *BRCA1* affectent la différenciation précoce des progéniteurs ER négatifs de la lignée mammaire et favorisent ainsi la carcinogenèse. En effet, l'inactivation du gène *BRCA1* conduirait à l'arrêt de la croissance et à d'autres altérations génétiques dans les cellules tumorales en évolution, puis l'instabilité chromosomique entraînerait une évolution rapide en tumeurs présentant des caractéristiques de type basal (Venkitaraman et al., 2009; Venkitaraman et al., 2014).

Enfin, de nouvelles évidences suggèrent que les porteuses de mutations *BRCA1* présentent de forts taux de progestérones circulantes qui pourraient jouer un rôle dans la susceptibilité au cancer du sein. Les femmes porteuses de mutations *BRCA1* présentent de faibles taux d'ostéoprotégérine (OPG) qui est un récepteur soluble se liant au ligand RANK (RANKL), une molécule produite par les ostéoblastes. La liaison RANKL-RANK engendre la différenciation des ostéoclastes. Lorsque l'ostéoprotégérine se lie

à RANKL, elle bloque l'interaction de celui-ci avec le récepteur RANK, interaction responsable de la différenciation et de l'activation des ostéoclastes. Il a été montré un effet protecteur lorsque l'expression d'OPG est élevée chez les femmes. Cet effet protecteur n'a été observé que chez des femmes pré-ménopausées étant donné que les porteuses de mutations *BRCA1* présentent typiquement un âge au diagnostic relativement jeune (inférieur à 50 ans).
Récemment il a été montré un dysfonctionnement de ce système RANK et de son ligand (RANKL) chez ces patientes : l'expression de RANK est plus élevée dans les cellules des progéniteurs de type luminal des patientes présentant une mutation *BRCA1* contrairement aux cellules issus de sujets non atteints ou de patientes présentant une mutation du gène *BRCA2.* La progestérone induit une augmentation de l'expression du ligand RANKL uniquement dans le tissu mammaire. Cela suggère un effet local de la progestérone qui pourrait expliquer la spécificité tissulaire du développement tumoral en réponse aux hormones (Kotsopoulos, Singer, and Narod 2016).

Conclusion du Premier Chapitre

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont deux gènes majeurs de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire. Une mutation dans l'un de ces deux gènes entraine une diminution ou une perte totale de l'expression de l'ARNm ou de la protéine correspondant. Et même si les mutations qui affectent ces gènes ne suffisent pas à expliquer la totalité du risque héréditaire, aucun autre gène ne prédispose autant les porteuses de telles mutations à développer un cancer du sein ou de l'ovaire. De plus, l'absence de l'expression de la protéine BRCA1 est souvent trouvée dans ces cancers, qu'ils soient héréditaires ou sporadiques. Les tumeurs associées à une perte de *BRCA1* (*BRCA1* déficientes) ont un phénotype agressif avec un haut grade histologique et sont pour la plupart triples négatives ou de type basal. En d'autres termes ces tumeurs présentent un très mauvais pronostic. L'arsenal thérapeutique disponible est considérablement réduit (certains traitements comme l'hormonothérapie sont inutilisables). Pour l'heure, il n'existe pas de traitements adaptés aux cancers *BRCA1* déficients. En revanche, connaitre le statut mutationnel de *BRCA1* permet de gérer les conséquences familiales en proposant un suivi médical spécifique aux familles. De plus, certains traitements novateurs sont en cours d'essais cliniques afin d'apporter une réponse thérapeutique très spécifique et dépendante de la présence ou non de la mutation *BRCA1*. L'Olaparib® par exemple, est un inhibiteur des enzymes PARP (poly- (ADP-riboses) polymérases) visant à conduire à la mort des cellules cancéreuses par apoptose selon le principe appelé « létalité synthétique »(Lord and Ashworth 2016). En effet, les voies de réparation de l'ADN, recombinaison homologue dépendante de BRCA1 et voie PARP, sont complémentaires. Si la voie de la recombinaison homologue est défectueuse en raison d'une mutation de *BRCA1* et que la seconde voie est bloquée artificiellement par un inhibiteur de PARP, la cellule meurt alors qu'elle reste viable si une seule des deux voies est défectueuse (Figure 3). Ces inhibiteurs exploitent ce talon d'Achille des cellules cancéreuses et sont susceptibles d'être synergiques avec des agents entraînant des cassures de l'ADN comme la radiothérapie, les inhibiteurs de topo-isomérase I ou des agents alkylants comme les sels de platine. L'Olaparib® est un traitement d'entretien chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire séreux de haut grade, en rechute sensible au platine, à partir de deux lignes ou plus de chimiothérapies à base de platine et porteuse d'une mutation (somatique ou germinale) des gènes *BRCA.* Il a obtenu son AMM en 2015 dans cette indication. Il est actuellement en cours de tests pour le cancer du sein triple négatif avec présence d'une mutation *BRCA1* (Institut Gustave Roussy, étude : CSET 2137, Site internet : https://www.gustaveroussy.fr/fr/cset-2137).

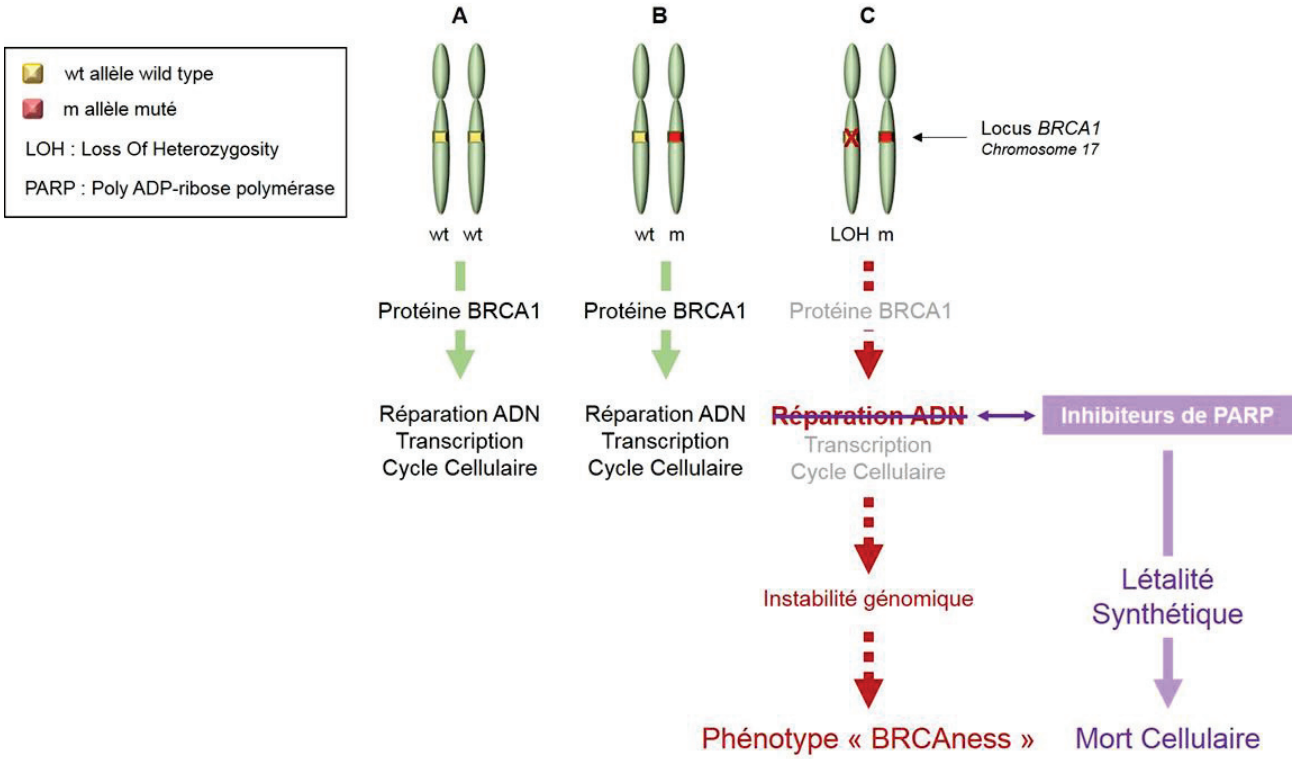


Figure 3 : Conséquences de la mutation germinale *BRCA1* dans les cellules somatiques et les cellules cancéreuses du sein

A. Le gène suppresseur de tumeur *BRCA1* code une protéine dont les fonctions biologiques jouent un rôle central dans la réparation de l'ADN, la régulation transcriptionnelle et les points de contrôle du cycle cellulaire.

B. Chez les patientes atteintes de mutation germinale *BRCA1,* un allèle du gène est muté et le second allèle de type sauvage code pour une protéine BRCA1 fonctionnelle. Les mutations bi-alléliques de *BRCA1* dans la lignée germinale sont responsables de l'anémie de Fanconi.

C. Dans les cellules de cancer du sein avec une mutation germinale du gène BRCA1, un allèle est muté et l'autre est perdu (communément par une délétion), qui est responsable d'une perte d'hétérozygotie. L'absence de protéine BRCA1 fonctionnelle conduit à un défaut de réparation de l'ADN et à une instabilité génomique conférant un phénotype BRCAness. L'inhibition de PARP dans ces cellules, basée sur le concept de létalité synthétique conduit à la mort cellulaire. (Figure adaptée de Vincent-Salomon A et al., Oncotarget, 2015)

Chapitre 2 : La protéine BRCA1

A. Du gène à la protéine BRCA1

1. Structure et régulation du gène *BRCA1*

Le gène *BRCA1* a été cloné et localisé, chez l'Homme, sur le chromosome 17 en position q21 en 1994, après un effort international intensif (Miki et al. 1994) (Graffeo et al. 2016). *BRCA1* est un gène de grande taille puisqu'il recouvre 81 kilobases (Kb) d'ADN génomique et possède une séquence codante de 5,6 kb. Il se compose de 24 exons dont la taille peut varier de 40 paires de bases (pb) pour l'exon 18, à 3425 pb pour l'exon 11. Ce dernier représente à lui seul environ 60% de la séquence codante de *BRCA1*. Une autre particularité de ce gène est que les exons 1A et 1B ainsi que l'exon 4 de *BRCA1* ne sont pas codants. Les régions introniques, quant à elles, représentent environ 90% de la séquence de *BRCA1* et leur taille varie de 403pb à 9,2 kb. Enfin, le gène *BRCA1* est riche en séquences répétées de type *Alu* qui représentent 41,5% du gène, tandis la présence d'autres séquences répétées est relativement faible puisque ces dernières représentent 4,8% du gène (Smith et al. 1996) (Silver and Livingston 2012).

La région promotrice de *BRCA1* a une structure complexe. En effet, une duplication partielle de la région 5' de *BRCA1* a conduit à la création d'un pseudogène contenant les exons 1A, 1B et 2 de *BRCA1* situé tête-bêche avec le gène *NBR1* (Neighbor of BRCA1 gene 1) qui se trouve en amont de *BRCA1*, ainsi qu'à la création d'un nouveau gène *NBR2* (Neighbor of BRCA1 gene 2) contenant les exons 1A, 1B et 3 du gène *NBR1*. *NBR2* est situé entre le pseudogène *BRCA1* et le gène *BRCA*1, et se trouve tête-bêche avec BRCA1. *NBR2* partage donc partiellement avec *BRCA1* la même région ce qui suggère davantage de possibilités de régulation du gène *BRCA1*. (Mueller and Roskelley 2003)(Xu, Chambers, and Solomon, 1997). En effet, les sites de transcription de *BRCA1* et *NBR2* ne sont séparés que par 218 pb, de plus ces gènes partagent une région promotrice minimale de 56 pb. Cela permet que la transcription de ces deux gènes diverge tandis que la transcription unidirectionnelle de l'un ou l'autre de ces gènes de façon préférentielle est dirigée par des répresseurs distincts qui se lient à des séquences situées dans le premier intron de chacun d'eux (Suen et al. 2005).
Le promoteur de *BRCA1* est également sensible à la liaison du facteur de transcription GABPα/β (GA-Binding Protein) qui constitue un activateur transcriptionnel de *BRCA1* (Atlas et al. 2000), au facteur de transcription ETS-2 (Baker et al. 2003), possède un site CREB (Atlas, Stramwasser, and Mueller 2001) et peut être méthylé (Madgnier et al, 2000) (Mueller and Roskelley 2003).

2. Le transcrit BRCA1

Le transcrit BRCA1 a une taille de 7,8 kb et contient 22 exons après épissage. A ce jour, de nombreux variants d'épissage de BRCA1 ont été observés dans différents tissus mais leur régulation ainsi que leurs fonctions sont encore très peu connues. Il a été rapporté que certains variants d'épissage de BRCA1 qui résultent de l'élimination d'exons (exon 5, 11, 2 à 10, 9 à 11, 14 à 17, ou 14 à 25) et dans lesquels le cadre de lecture originel est dans la plupart des cas conservé, sont associés à des lignées de cancers du sein (Lixia M, Zhijian C, Chao S, Chaojiang G, 2007). Il a été montré que la transcription de *BRCA1* peut être initiée à partir de deux sites distincts et séparés de 277 pb. Cela permet d'inclure de façon alternative les exons 1A et 1B (Xu et al. 1995). Ces deux transcrits sont ubiquitaires bien que le transcrit 1A soit plus spécifique de la glande mammaire et le 1b plus spécifique du placenta. De plus, il apparait que la séquence protéique qui est codée par ces deux transcrits est identique en raison du codon d'initiation situé dans l'exon 2. En revanche, la traduction du transcrit contenant l'exon 1B serait

moins efficace que celle du transcrit contenant l'exon 1A en raison de structures secondaires plus stables dans la 5'UTR ainsi que la présence de trois uORF (upstream Open Reading Frames)(Sobczak and Krzyzosiak 2002). Une grande partie de la séquence codante de BRCA1 (environ 60%) est contenue dans l'exon 11 qui possède entre autres, le domaine d'interaction nécessaire à la liaison de BRCA1 et RAD51 pour la réparation de l'ADN. Il a été montré que certaines isoformes de BRCA1, provenant de l'épissage alternatif de l'exon 11 sont différentes selon les lignées ou tissus normaux *versus* tissus cancéreux. Il apparait également que ces isoformes peuvent être différents entre les phases du cycle cellulaire (Orban and Olah 2001). Ces isoformes comprennent l'ARNm complet ainsi que les variants Δ11 (perte de l'exon 11), Δ11q (perte partielle de l'exon 11), Δ9,10,11q (perte des exons 9, 10 et 11 en partie) enfin le variant IRIS (In-frame Reading of BRCA1 11 Splice variant). Une équipe de recherche a émis l'hypothèse que le variant IRIS pourrait coder pour une protéine de 1399 acides aminés (à partir d'un cadre de lecture couvrant les exons 1 à 11). La protéine BRCA1-IRIS serait nucléaire, n'interagirait pas avec son partenaire habituel BARD1 et serait associée à la chromatine. De plus, dans un contexte de surexpression de BRCA1-IRIS, en l'absence de la protéine BRCA1 entière et fonctionnelle, la tumorigenèse serait favorisée (ElShamy & Livingston 2004). Ces données n'ont cependant pas été confirmées par d'autres laboratoires.

Dans le processus de développement tumoral, il a été suggéré que des mutations se produisant dans tous les éléments génétiques en dehors de la région codante (le promoteur, la 5'UTR, la 3'UTR) pourraient favoriser l'apparition du cancer. Ces mutations entraîneraient une malignité en affectant les sites d'épissage et les introns modifiant ainsi le mode d'épissage entier. Il est important de noter que ces altérations peuvent affecter des oncogènes tels que *TERT* ou *miR-2*1 ainsi que des gènes suppresseurs de tumeur tels que *TP53*, *APC, RB1*. Ces mutations situées dans les régions non codantes des transcrits ou supposées silencieuses affectent ainsi la régulation de ces gènes à partir de la transcription, de l'épissage, de la stabilité de l'ARNm jusqu'à à la traduction et, par conséquent, pourraient jouer un rôle important dans la tumorigenèse. Cependant l'implication de ces mutations nécessite des études fonctionnelles pour élucider les mécanismes sous-jacents permettant le développement tumoral (Diederichs et al. 2016).

3. La protéine BRCA1

La protéine BRCA1 se compose de 1863 acides aminés. Elle a une masse moléculaire de 220 kilo-dalton (kDa). Il s'agit donc d'une grande protéine pour laquelle uniquement deux domaines structuraux ont été identifiés : Un domaine RING dans la région N-terminale de la protéine, et un tandem de deux domaines BRCT dans la région C-terminale de BRCA1 (Silver & Livingston 2012) (Figure 4).

3.1. Les domaines structuraux

a. Le domaine RING

Le domaine RING de BRCA1 est localisé au niveau des exons 2 à 7 de BRCA1 (acides aminés 1 à 109) et permet des interactions protéine-protéine et protéine-ADN. Ce domaine est composé d'un motif « RING finger » très conservé (de la famille des domaines en doigt de zinc) et de deux hélices α antiparallèles qui l'entourent. Le RING finger est composé de sept résidus Cystéine et d'un résidu Histidine conservés qui permettent la fixation de deux atomes de Zn^{2+} (Meza et al. 1999a). On retrouve ce motif dans de nombreuses protéines aux fonctions très variées. Le domaine RING de BRCA1 est le site d'hétérodimérisation de BRCA1 avec la protéine BARD1 (BRCA1-Associated RING Domain protein 1), qui contient elle aussi un domaine RING. Cette interaction confère à l'hétérodimère BRCA1-BARD1

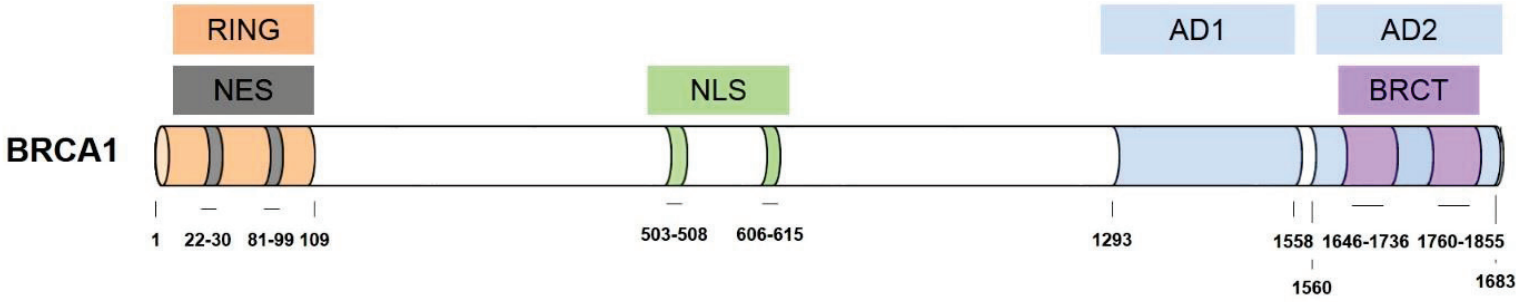


Figure 4 : Structure primaire et domaines de la protéine BRCA1.

BRCA1 est une protéine de 1863 aa. Elle possède un domaine RING en N-terminal (aa 1 à 109), et un domaine C-terminal de liaison aux protéines phosphorylées, le domaine BRCT (pour BRCA1 C-terminal) composé de deux modules BRCT (aa 1646 à 1736 et 1760 à 1855). BRCA1 possède également deux signaux de localisation nucléaire ou NLS (Nuclear Localisation Signal) (NLS1 : aa 503-508 et NLS2 : aa 606-615) et deux séquences d'export nucléaire ou NES (Nuclear Export Sequences) (NES1 : aa 22-30, NES2 : aa 81-99). Enfin, deux domaines d'activation de la transcription ont été identifiés en C-terminal (AD1 : aa 1293-1558, et AD2 : 1560- 1863). La position de chaque domaine est indiquée.

une activité d'E3-ubiquitine ligase (Wu L et al. 1996)(Zeidner, Buescher, and Phiel 2011)(Mallery, Vandenberg, and Hiom 2002)

b. Le tandem BRCT

La région C-terminale de la protéine BRCA1 contient deux séquences fortement conservées appelée chacune « domaine BRCT » (BRCA1 C-terminal). Ce domaine peut être retrouvé seul, en tandem, en multiples tandems voire même en fusion avec d'autres domaines fonctionnels (Leung and Glover 2011). Il est retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire tel que p53 (Koonin, Altschul, and Bork 1996). Le domaine BRCT de BRCA1 se compose d'un feuillet β central de 4 brins entouré d'un côté par une hélice α unique (α_2) et par deux autres hélices α sur le côté opposé (α_1 et α_3). Au sein du tandem BRCT de la protéine BRCA1, les deux domaines BRCT sont connectés par une charnière de 23 acides aminés, le premier domaine (BRCT1) correspondant aux acides aminés 1646 à 1736 et le deuxième (BRCT2), aux acides aminés 1760 à 1855. De plus, les deux domaines BRCT interagissent entre eux par l'intermédiaire des acides aminés hydrophobes de l'hélice α2 de BRCT1 et de ceux des hélices α1 et α3 de BRCT2 (Williams, Green, and Glover 2001)

Les tandems BRCT ont la capacité d'interagir avec des phosphoprotéines. La séquence consensus minimale liée à un tandem BRCT est constituée de quatre résidus (pS/pT-X-X-X) dans laquelle le résidu en +3 est responsable de l'essentiel de la spécificité de liaison. Le tandem BRCT de BRCA1 reconnaît une phospho-Sérine suivie d'une Phénylalanine en +3 (Wu Q, Jubb, and Blundell 2015).

3.2. La région centrale de BRCA1

Située entre les domaines RING et BRCT, elle ne comporte pas de domaines structurés. Il a été proposé que cette longue région puisse servir de plateforme permettant à différents facteurs nécessaires à la fonction de BRCA1 d'interagir entre eux. Pour l'heure, elle permet surtout les interactions de BRCA1 avec d'autres protéines, notamment celles impliquées dans la réponse aux cassures de l'ADN et à sa réparation, puisqu'elle contient les sites de liaison aux protéines p53, BRCA2, RB, Rad50, Rad51, c-Myc, et FANCA. Cette région contient aussi une partie d'un domaine appelé le « Serine Cluster Domain », présumé riche en sites de phosphorylations pour les kinases ATM et ATR et enfin, deux domaines identifiés comme domaines de liaison à l'ADN par des expériences *in vitro* comportant les acides aminés 498 à 663 et 936 à 1057 (Mark et al. 2005). La région centrale de BRCA1 est également la région désordonnée de la protéine (intrinsically disordered, ID). Bien que cette région de la protéine BRCA1 ait été peu explorée par rapport aux régions correspondant à ses deux domaines structuraux RING et BRCT, il a été rapporté qu'elle permet l'interaction de BRCA1 avec plusieurs protéines contribuant à son rôle suppresseur de tumeur (p53, BRCA2 etc.). La région ID apporterait donc une contribution importante à l'implication de BRCA1 dans de nombreuses voies qui supportent son rôle global dans la surveillance cellulaire (Mark et al. 2005)(Figure 5).

En 1996 et 1997, deux équipes indépendantes identifient deux signaux de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signals) codés par l'exon 11 (NLS1 : aa 503 à 508 et NLS2 : aa 606 à 615) (C. F. Chen et al. 1996; Thakur et al. 1997). L'identification de deux séquences d'export nucléaire (NES, Nuclear Export Sequence) dans la région N-terminale de BRCA1 (NES1 : aa 22 à 30, NES2 : aa 81 à 99) en 2000 et en 2005, a permis que BRCA1 soit aujourd'hui considérée comme une protéine nucléo-cytoplasmique (Thompson, Robinson-Benion, and Holt 2005)

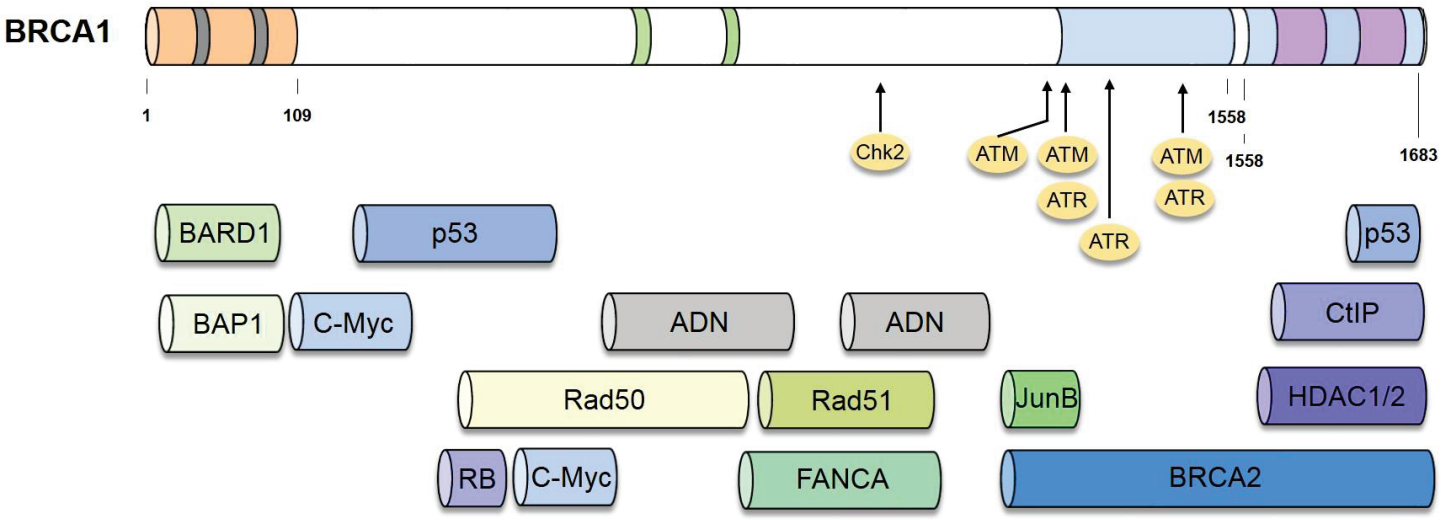


Figure 5 : Régions d'interaction de la protéine BRCA1 avec certains de ses partenaires protéiques.

De nombreuses protéines peuvent interagir avec BRCA1. La plupart d'entre elles sont impliquées dans la réparation de l'ADN (p53, Rad50, Rad51). La protéine BARD1 interagit avec BRCA1 *via* son domaine RING. Le domaine BRCT de BRCA1 lui permet d'interagir avec de nombreuses protéines dont BRCA2. La partie C-terminale de BRCA1 est riche en sites de phosphorylation pour les kinases ATM et ATR. Enfin, la région centrale, a priori non structurée, contient deux domaines de liaison à l'ADN (aa 498 à 663 et 936 à 1057).

La protéine BRCA1 a également été observée dans des compartiments cellulaires spécifiques : dans la fraction membranaire des lignées MDA-MB468 et MCF-7 (Thomas et al. 1996) ainsi qu'au niveau des centrosomes, de la mitochondrie, et du réticulum endoplasmique (Henderson, 2012).

a. Mécanismes de transport de BRCA1

Les deux signaux de localisation nucléaire NLS de BRCA1 sont fonctionnels bien que seul le NLS1 soit essentiel à la localisation de nucléaire de BRCA1. L'entrée de BRCA1 dans le noyau passe par la voie classique importine α/β *via* l'interaction de la NLS1 avec l'importine α (Chen et al. 1996). Les deux séquences d'export NES permettent quant à elles à la protéine BRCA1 d'être transportée dans le cytoplasme *via* la voie classique du transporteur CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1).

En plus des voies classiques de transport permettant à la protéine BRCA1 d'aller-et-venir entre noyau et cytoplasme il a été montré que certains de ses partenaires protéiques peuvent la retenir dans l'un ou l'autre de ces compartiments cellulaires. Ainsi lorsque BARD1 interagit avec BRCA1, elle masque ses NES, dont il a été montré qu'ils se trouvent à l'interface entre les domaines RING de BRCA1 et de BARD1 lorsque ces deux protéines interagissent. Cela empêche de ce fait la liaison de CRM1 à BRCA1 et provoque ainsi la rétention de BRCA1 dans le noyau. A l'inverse, une autre protéine a été identifiée comme interagissant avec les NLS de BRCA1 : il s'agit de la protéine BRAP2. Elle se lie aux NLS de BRCA1 avec une meilleure affinité que l'importine α et provoque ainsi sa rétention dans le cytoplasme (Fabbro, Schuechner, Au, & Henderson, 2004; Li et al., 1998).

b. Régulation du transport de BRCA1

Quels sont les mécanismes qui régulent la localisation subcellulaire de la protéine BRCA1 ? Les déplacements de BRCA1 dans les compartiments cellulaires sont-ils importants pour ses fonctions ? Ce n'est qu'assez récemment que ces questions ont commencé à être abordées et sont encore loin d'être élucidées. BRCA1 subit plusieurs types de modifications post-traductionnelles, incluant la phosphorylation, l'ubiquitination et la SUMOylation ce qui pourrait influencer son trafic nucléaire. Il a été montré que la localisation de la protéine BRCA1 change au cours du cycle cellulaire. En effet, la phosphorylation de BRCA1 sur sa sérine 988 change au cours du cycle cellulaire ce qui entraine une relocalisation transitoire de BRCA1 dans la région périnucléaire au début de la phase S. Il a également été montré que BRCA1 est relocalisée dans le cytoplasme (au niveau des centrosomes) au début de la phase S, un phénomène partiellement médié par le transporteur CRM1. Cet export nucléaire de BRCA1 pourrait être un mécanisme calcium-dépendant, cependant les conséquences d'une telle régulation doivent encore être explorées (Henderson 2012).
Il a aussi été proposé que la protéine kinase AKT1 inhibe la réparation homologue de l'ADN par la rétention cytoplasmique des protéines BRCA1 et RAD51. Cependant ce procédé n'exigerait pas la phosphorylation de BRCA1 directe par AKT1 (Plo et al. 2008).
Enfin la localisation subcellulaire de BRCA1 a été étudiée suite à des stress génotoxiques. Plusieurs équipes ont ainsi pu mettre en évidence une relocalisation partielle de la protéine BRCA1 dans le cytoplasme dans ces conditions cellulaires. Suite à des radiations ionisantes (IR) ou des rayons ultraviolets (UV) provoquant des dommages à l'ADN, la forme phosphorylée S988 de BRCA1 serait relocalisée dans la région périnucléaire en phase S. Un modèle de localisation de BRCA1 a été proposé selon lequel, lorsque l'ADN est endommagé, et suivant le type de dommage (agents génotoxiques, type de lésions/cassures) BRCA1 favoriserait soit la réparation de l'ADN dans le noyau, soit l'apotose dans le cytoplasme (Yang & Xia 2010). Si on intègre ce modèle, on peut penser que la régulation de la

localisation subcellulaire de BRCA1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de ses fonctions. On peut également envisager que ses fonctions cytoplasmiques participent à son rôle de suppresseur de tumeur et donc au maintien de l'intégrité du génome comme cela a déjà été montré pour deux autres suppresseur de tumeurs : APC (« Adenomatous Polyposis Coli ») (Brocardo & Henderson 2008) et p53 (Green & Kroemer 2009)(Figure 6).

B. Fonctions nucléaires de BRCA1

Révéler les fonctions cellulaires de la protéine BRCA1 est depuis une vingtaine d'années un problème fascinant à résoudre pour les scientifiques. Le contraste est fort entre la découverte relativement aisée des anomalies du gène codant pour BRCA1, et les difficultés à bien discerner ses fonctions physiologiques. Parce que BRCA1 a pendant longtemps été considérée comme une protéine exclusivement nucléaire, la majorité de ses fonctions les plus décrites, et les plus étudiées, concernent ses fonctions au sein du noyau. Il s'agit bien sûr de son rôle dans la réparation de l'ADN ou encore dans la régulation de la transcription. Cependant, il est maintenant établi que certaines de ses fonctions sont associées à sa localisation cytoplasmique, telles que son rôle dans l'apoptose, la régulation du nombre et du fonctionnement des centrosomes ou encore la régulation de la lipogenèse et de la traduction des ARNm. Dans la plupart des cas, les nouvelles fonctions de BRCA1 ont pu être mises en évidence grâce à l'identification de partenaires protéiques. C'est pourquoi un grand nombre d'études explorant les fonctions de BRCA1 ont été initiées par la recherche des partenaires protéiques de BRCA1 et notamment, de ses deux domaines structuraux identifiés, le domaine RING et le domaine BRCT. Dans l'ensemble, la plupart des fonctions de BRCA1 identifiées à ce jour semblent contribuer à son rôle de suppresseur de tumeur. Elles lui confèrent une fonction de maintien de l'intégrité du génome, essentiellement par l'activation et la coordination des différents voies de réponse à un stress génotoxique, depuis l'arrêt du cycle cellulaire nécessaire au temps de la réparation, jusqu'à l'apoptose des cellules trop endommagées.

Dans cette partie, je m'attacherai donc à décrire les principales fonctions de BRCA1 en insistant sur ses fonctions cytoplasmiques, bien que moins nombreuses et moins décrites que ses fonctions nucléaires. Je m'intéresserai principalement à son rôle dans le contrôle de la traduction des ARNm, fonction que j'ai étudiée pendant ma thèse.

1. BRCA1 maintient l'intégrité du génome

Suite au clonage du gène *BRCA1*, différentes équipes ont rapidement suggéré que la protéine BRCA1 puisse agir dans la réponse aux dommages à l'ADN. Plusieurs observations solides ont permis de proposer cette fonction pour BRCA1. D'abord il a été montré que BRCA1 interagit avec la protéine RAD51, acteur majeur de la réparation des cassures double brins par recombinaison homologue (RH). Lorsque les cellules subissent un stress génotoxique, BRCA1 co-localise durant la phase S, dans des foci nucléaires (agrégats de protéines) contenant aussi RAD51 (Scully et al. 1997). Ensuite, le domaine BRCT est un domaine conservé et retrouvé dans de nombreuses autres protéines impliquées dans la réparation et le métabolisme de l'ADN (Callebaut and Mornon 1997). Enfin, les cellules souches embryonnaires et fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) Brca1-/- sont très sensibles aux radiations ionisantes (IR) et présentent de nombreuses anomalies chromosomiques (Shen et al. 1998). Ces observations suggéraient donc fortement que BRCA1 puisse être impliquée dans les voies de réparations de l'ADN et confortaient son rôle de suppresseur de tumeur. Cette fonction de BRCA1 est

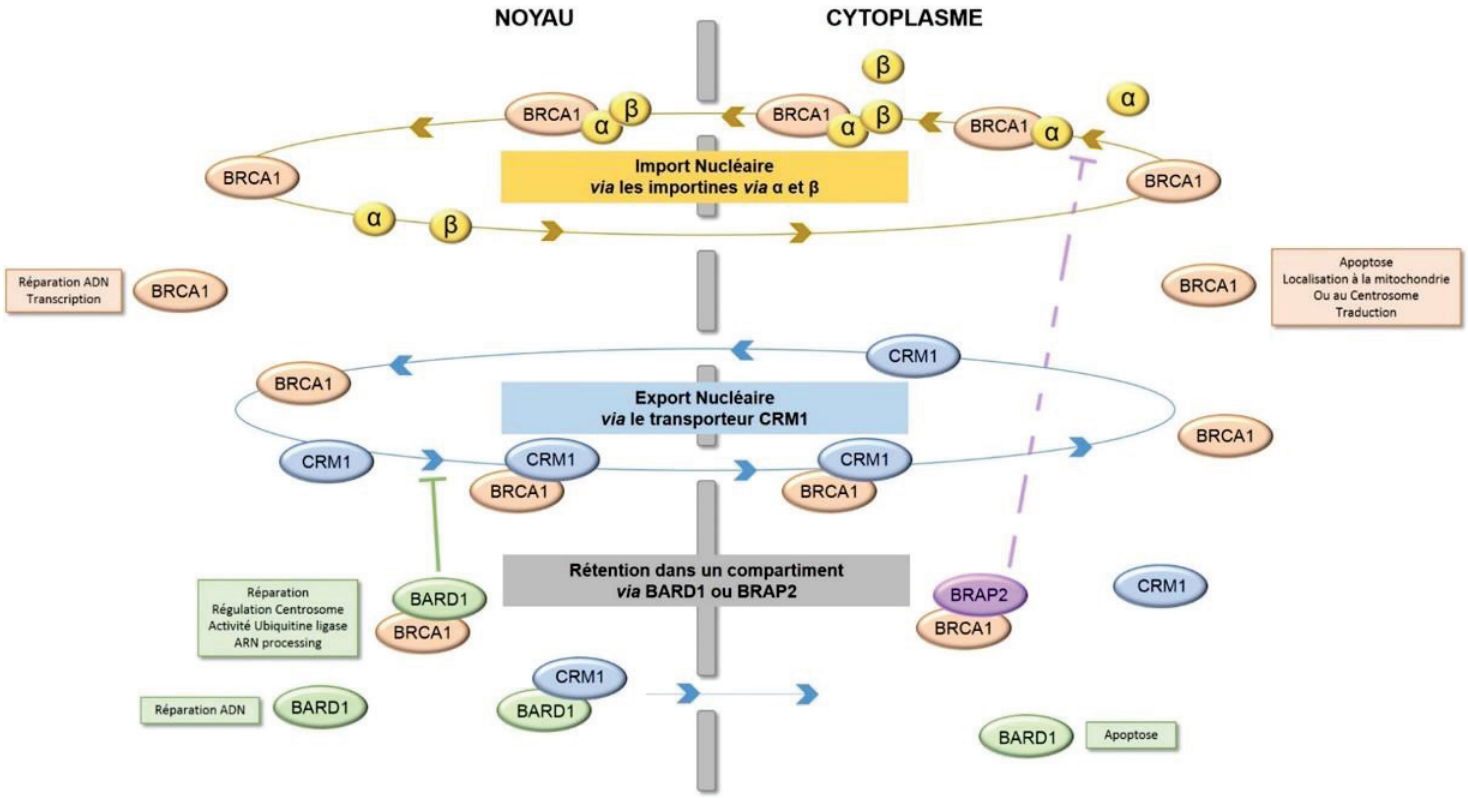


Figure 6 : Principaux mécanismes moléculaires de transport de la protéine BRCA1

L'import nucléaire de BRCA1 repose sur l'interaction de l'importine avec les NLS de BRCA1 et donc du système importine α /β. Son export dépend de l'interaction du transporteur CRM1 avec ses NES. Lorsque BARD1 interagit avec BRCA1, elle masque ses NES, empêche de ce fait la liaison de CRM1 à BRCA1 et provoque ainsi la rétention de BRCA1 dans le noyau. A l'inverse, BRAP2 se lie aux NLS de BRCA1 avec une meilleure affinité que l'importine α et provoque ainsi sa rétention dans le cytoplasme. Les principales fonctions associées à la localisation de la protéine BRCA1 sont indiquées dans les encadrés. (Figure adaptée de Beric R. Henderson, 2005)

à l'heure actuelle encore la plus étudiée. On sait aujourd'hui que BRCA1 participe à de nombreuses étapes de la réponse à l'endommagement de l'ADN grâce à sa capacité d'interaction avec des protéines impliquées dans ces différentes étapes, et notamment grâce à sa présence au sein de différents complexes protéiques : BRCA1-A, BRCA1-B et BRCA1-C. BRCA1 intervient à plusieurs niveaux : elle est recrutée aux sites des cassures, elle participe aux points de contrôle du cycle cellulaire G1/S, intra-S et G2/M et participe à la réparation par recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination), et par Non-homologous end-joining (NHEJ). Dans l'ensemble, cela lui donne un rôle central de coordinateur de la réponse à l'endommagement de l'ADN, et plus particulièrement de la réponse aux cassures double brin. Les cassures double brins (CDBs) sont considérées comme la forme la plus menaçante de dommages à l'ADN, car l'intégrité des deux brins d'ADN est compromise simultanément. Les CDBs peuvent se produire sous forme de sous-produits de la réplication de l'ADN ou pendant l'exposition aux IR et à d'autres composés génotoxiques. Dans les cellules de mammifères, les CDBs sont réparées par RH, qui est la plupart du temps exempte d'erreurs, ou par NHEJ, qui est moins fidèle (Savage & Harkin 2015).

1.1 La protéine BRCA1 est recrutée aux sites des cassures

Les agents génotoxiques, telle que les radiations ionisantes, provoquent des cassures double brins de l'ADN et ceci conduit très rapidement à l'auto-phosphorylation de la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) sur sa sérine 1981, ce qui l'active. Une fois activée, ATM phosphoryle H2AX sur sa sérine 139 et très vite, des foci nucléaires contenant la forme phosphorylée de H2AX (γ-H2AX) sont observables aux sites des cassures. En effet, γ-H2AX permet en tout premier lieu le remodelage de la chromatine autour de la cassure ainsi que le recrutement des protéines clé de la réparation, dont BRCA1. La protéine MDC1 « Mediator of DNA-damage Checkpoint protein 1 » reconnaît ensuite γ-H2AX *via* son domaine BRCT, et son accumulation aux sites de cassures va permettre la formation des foci contenant BRCA1 (Lou et al. 2003; Stewart et al. 2003). MDC1 est phosphorylée par ATM, et permet le recrutement du complexe à activité E3-ubiquitine ligase RNF8-UBC13 « RING-Finger protein 8, Ubiquitin-Conjugating enzyme 13 » qui va ubiquitiner les histones au niveau ou à proximité des sites de cassure. Elles vont ensuite être reconnues par le domaine UIM « Ubiquitin-Interacting Motif » de RAP80 « Receptor Associated Protein 80 ». Les protéines BRCA1, RAP80 et Abraxas (aussi appelée CCDC98) interagissent au sein d'un même complexe ce qui permet la réponse à l'endommagement de l'ADN et le recrutement de BRCA1 aux sites de cassure. Il a été montré que les protéines RNF8 et UBC13 sont nécessaires au recrutement du complexe nommé BRCA1-A contenant entre autres BRCA1, Abraxas, RAP80 et BRCC36 aux sites de cassure et que RAP80 interagit avec les histones H2A et H2B ubiquitinylées par RNF8 et RNF168. Le modèle proposé dans la littérature est que les chaînes de poly-ubiquitine des histones créées par RNF8 et RNF168 aux sites de cassure vont permettre le recrutement de RAP80 et, par son intermédiaire, de tout le complexe BRCA1-A au site ou l'ADN endommagé (B. Wang et al. 2013; Savage and Harkin 2015). En revanche, la structure et la dynamique de formations des différents foci restent encore à préciser afin de mieux comprendre les évènements successifs permettant la réparation de l'ADN (Figure 7).

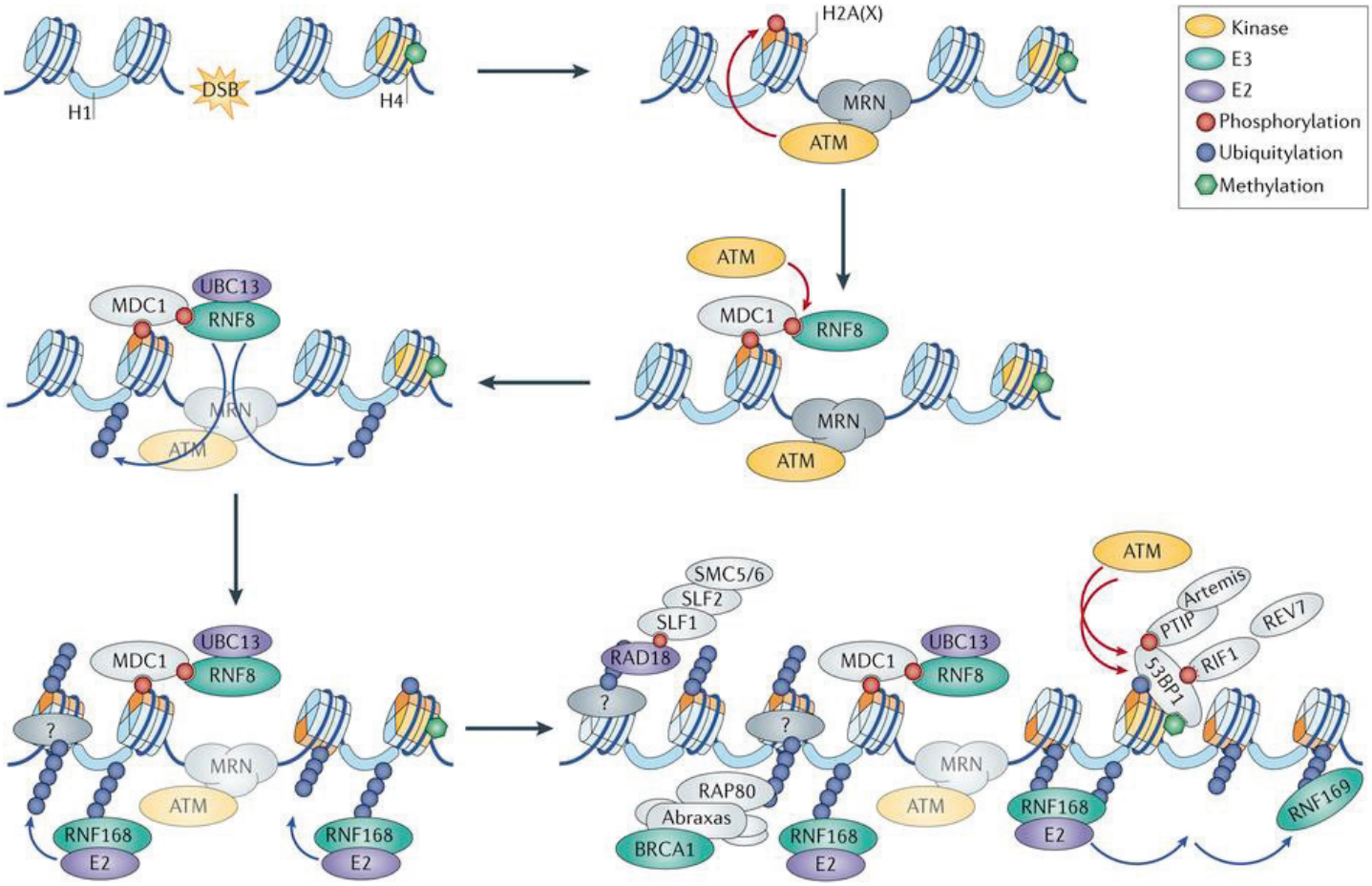


Figure 7 : La protéine BRCA1 est recrutée aux sites de cassures doubles brins de l'ADN. (Figure extraite de Petra Schwertman, Simon Bekker-Jensen & Niels Mailand, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016)

1.2 BRCA1 participe aux points de contrôle du cycle cellulaire

La détection des dommages à l'ADN comprend l'activation de points de contrôle qui retardent le cycle cellulaire avant ou pendant la réplication (G1 / S ou points de contrôle intra-phase) ou avant la division cellulaire (point de contrôle G2 / M) pour s'assurer que les erreurs génétiques ne soient pas transmises aux générations suivantes. Ce « retard de cycle » est permis pour que la réparation de l'ADN puisse s'effectuer.

a) Le point de contrôle G1/S

Le suppresseur de tumeur p53 est le principal acteur de ce point de contrôle. Après l'exposition des cellules aux IR ou Ultraviolets (UV), il est rapidement phosphorylée sur sa sérine 15, respectivement par ATM ou par ATR (ATM-Related). p53 va ensuite permettre la transcription de *CDKN1A* (p21) et induire l'arrêt du cycle cellulaire. Or il a été montré que BRCA1 est nécessaire à la phosphorylation de p53 par ATM ou ATR suivant l'agent génotoxique utilisé (IR ou UV), et que BRCA1 doit être elle-même préalablement phosphorylée sur ses sérines 1423 ou 1524 par ATM ou ATR (Fabbro, Savage, et al. 2004). En absence de BRCA1, les cellules continuent leur progression dans le cycle cellulaire au-delà de la phase S après le traitement des cellules aux IR. Cela est dû à l'absence d'induction de p21, ce qui démontre l'implication de BRCA1 dans le point de contrôle G1/S. En revanche, BRCA1 ne serait pas nécessaire au point de contrôle G1/S en réponse aux UV (Shorrocks et al. 2004).

b) Le point de contrôle intra-S

Suite aux dommages causés à l'ADN, les kinases ATM et ATR activent les kinases Chk2 (Checkpoint Kinase 2) et Chk1 (Checkpoint Kinase 1) respectivement. Ces kinases activées, inhibent en les phosphorylant les phosphatases Cdc25 A/B/C qui, elles, sont des régulateurs positifs de la progression dans le cycle cellulaire (Reinhardt HC 2010). Le complexe ATM/Chk2 est activé en réponse aux cassures double brin suite à des radiations ionisantes alors que le complexe ATR/Chk1 l'est préférentiellement suite à des lésions induites par des UV ou le blocage de la réplication. Néanmoins, après IR, Chk1 peut aussi être phosphorylée par ATM et participer à l'activation des points de contrôle intra-S et G2/M, ce qui suggère que ces deux voies sont étroitement liées (Gatei et al. 2003). La phosphorylation de la sérine 1387 de BRCA1 par ATM en réponse aux IR semble être nécessaire à l'activation du point de contrôle intra-S. De plus, il a été montré que BRCA1 est nécessaire à l'activation de Chk1 en réponse aux IR et que les deux protéines interagissent *in vivo* (Yarden et al. 2002). Il a été proposé qu'avant l'exposition à un stress ou à l'endommagement de l'ADN, Chk1 est associée à la chromatine. Suite à un stress génotoxique ou réplicatif, Chk1 est phosphorylée sur sa sérine 317 ce qui provoque sa dissociation d'avec la chromatine. En absence de BRCA1 cette dissociation n'est plus effective ce qui laisse penser que la protéine BRCA1 est importante pour la phosphorylation de Chk1 et sa localisation. Ceci pourrait expliquer qu'en l'absence de BRCA1 on observe un défaut d'activation du point de contrôle intra-S.

D'autre part, BRCA1 pourrait participer à l'activation du point de contrôle intra-S via le complexe applelé BRCA1-B qui contient les protéines BRCA1, BACH1 (BRCA1-Associated C-terminal Helicase 1) et TopBP1 (Topoisomerase (DNA) II Binding Protein 1) et ce, de façon indépendante de Chk1 et Chk2. Les protéines BRCA1 et BACH1 interagissent *via* le domaine BRCT de BRCA1 en phases S et G2/M du cycle. Leur interaction est requise pour la progression en phase S. De plus, la diminution par ARN interférent de la quantité des protéines BRCA1, BACH1 ou TopBP1 conduit à une plus faible diminution de la synthèse d'ADN après traitement aux IR que dans les cellules contrôles. Ceci suggère que le

complexe BRCA1-B est bien impliqué dans le point de contrôle intra-S. Enfin, la diminution de la quantité des protéines BACH1 par ARN interférent n'affecte pas la phosphorylation de Chk1 après IR et donc le complexe BRCA1-B utiliserait une voie indépendante de Chk1 pour l'activation du point de contrôle intra-S (Greenberg et al. 2006; Savage & Harkin 2015).

c) Le point de contrôle G2/M

Les évènements nécessaires à l'activation du point de contrôle G2/M sont similaires au point de contrôle intra-S, après endommagement de l'ADN. En revanche, l'activation du point de contrôle G2/M par BRCA1 nécessite sa phosphorylation par ATM sur une autre sérine, la sérine 1423 (elle-même non nécessaire à l'activation du point de contrôle intra-S). L'activation du point de contrôle par ATM retarde de façon transitoire la transition entre la phase G2 et la phase M alors que l'activation du point de contrôle par ATR arrête les cellules en G2 pendant une plus longue période (B. Xu et al. 2002). La participation de BRCA1 au point de contrôle G2/M médiée par ATR pourrait impliquer son interaction avec BACH1 et être indépendante de Chk1, alors que la participation de BRCA1 au point G2/M médiée par ATM pourrait, elle, impliquer l'interaction entre BRCA1 et la protéine CtIP (CtBP-Interacting Protein) et l'activation de Chk1 par ce complexe (Yarden et al. 2002)(Brown & Baltimore 2003).

Enfin, le complexe BRCA1-A, impliqué dans la localisation de BRCA1 aux sites de cassures pourrait intervenir également dans le point de contrôle G2/M. La déplétion de RAP80 ou Abraxas par ARN interférent, ainsi que celle de BRCC36 (un autre composant de BRCA1-A), empêche l'activation du point de contrôle G2/M suite à une exposition aux IR d'une façon similaire à ce qui peut être observé lors de la déplétion de BRCA1 ou de CtIP. De plus, la déplétion de RAP80 comme celle d'Abraxas inhibe la phosphorylation de Chk1 en réponse aux IR, suggérant que BRCA1-A participe aussi à l'activation du point G2/M via l'activation de Chk1 (Kim, Huang, and Chen 2007)(Wang B et al. 2013).

1.3 BRCA1 participe à la réparation de l'ADN

La recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination) et la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ : Non Homologous End-Joining) sont les deux principales voies de réparation de cassures double brin. La réparation par excision de nucléotide (NER : Nucleotide Excision Repair) qui peut avoir lieu par deux voies, la voie génomique globale (GG-NER : Global Genomic NER) et la voie couplée à la transcription (TC-NER Transcription-Coupled NER, ou TCR : Transcription-Coupled Repair), la réparation par excision de base (BER : Base Excision Repair) et la réparation des mésappariements (MMR : Mismatch Repair) sont les principaux mécanismes de réparation des lésions simple brin. BRCA1 est essentiellement impliquée dans la réparation des cassures double brin par HR et NHEJ. C'est pourquoi je ne détaillerais que ces deux voies ci-après, bien que son implication dans d'autres voies de réparation telles que la TCR a été suggérée.

a) BRCA1 dans la recombinaison homologue

La réparation par recombinaison homologue (HR) répare les cassures double brin en utilisant une chromatide sœur intacte comme matrice pour la réparation. Cela implique que la HR ne peut s'effectuer que durant les phases S et G2 du cycle. La HR est un processus relativement long (comparativement à la NHEJ) qui implique une série d'évènements complexes. La réparation par recombinaison homologue démarre par la résection d'un seul brin qui aboutit à la formation de deux extrémités 3' simple brin recouvertes par la protéine RPA au site de cassure. Ensuite, le complexe BRCA2/PALB2 (Partner And Localizer with BRCA2) remplace RPA par RAD51 ce qui permet à une

séquence homologue de servir de matrice pour la synthèse d'ADN à partir de l'extrémité 3', après quoi la structure formée, appelée jonction de Holliday, permet la restauration des deux fragments d'ADN originaux (Roy, Chun, and Powell 2012).

BRCA1 intervient très rapidement lors de ce processus puisqu'elle permet la formation des extrémités 3' simple brin en réponse aux IR, par son interaction avec le complexe MRN (MRE11-RAD50-Nibrin). Après l'identification d'un complexe appelé BRCA1-C contenant BRCA1, CtIP et MRN, son implication dans la résection simple brin a été démontrée. En effet, CtIP est l'intermédiaire permettant la liaison entre le fragment C-terminal de BRCA1 et la Nibrin et il a été montré que l'interaction de BRCA1 avec CtIP et le complexe MRN est essentielle à la formation des extrémités 3' simple brin en réponse aux IR. Enfin, BRCA1 stabilise la forme activée de NF-κB qui facilite la formation des extrémités 3' simple brin. BRCA1 est également impliquée dans la réparation par recombinaison homologue *via* son interaction avec BRCA2, protéine essentielle à cette voie de réparation (J. Chen et al. 1998)(Roy, Chun, and Powell 2012). En effet, BRCA1 interagit avec PALB2, un partenaire protéique de BRCA2. PALB2 est nécessaire à la localisation de BRCA2 aux sites d'ADN endommagés et donc au recrutement de RAD51 pour en recouvrir les extrémités 3' simple brin. Il a été montré que PALB2 interagit avec BRCA1 et BRCA2 de façon indépendante, via ses extrémités N et C-terminale respectivement et que l'interaction entre BRCA1 et PALB2 se fait via leur motifs « coiled-coil » respectifs. L'interaction entre BRCA1, PALB2 et BRCA2 semble requise pour la localisation de ces deux dernières et celle de RAD51 aux sites de cassures et elle est donc importante pour le bon fonctionnement de la réparation par recombinaison homologue. Celle-ci doit être favorisée en phases S et G2 (par rapport à la réparation par NHEJ), et évitée en phase G1, puisqu'il n'y a alors pas de chromatide sœur disponible (He et al. 2009; Lin & Scott 2012).

b) Défaut de réparation par recombinaison homologue et phénotype « BRCAness »

Lorsque les protéines BRCA1 ou BRCA2 sont non fonctionnelles, la recombinaison homologue est dysfonctionnelle. La réparation des cassures double brin se poursuit alors en utilisant des mécanismes de réparation non conservateurs peu fidèles mais susceptibles de fournir des cibles thérapeutiques potentielles. Les patientes porteuses de mutations BRCA1 présentent, dans leurs tumeurs, une mutation du gène *BRCA1* accompagné d'une LOH. Ceci conduit à la perte d'expression des 2 allèles du gène *BRCA1*, définissant le phénotype « BRCAness » (Lord & Ashworth, 2016). Chez ces patientes, les tumeurs démontrent une incapacité à réparer les cassures double brin par recombinaison homologue, ce qui explique probablement leur sensibilité accrue aux agents alkylants tels les sels platine. (Kristeleit et al., 2016).

Les inhibiteurs de la PARP-1 ont été développés pour les cancers de l'ovaire épithélial présentant une mutation *BRCA* après qu'il ait été observé *in vitro* une augmentation considérable de la sensibilité à l'inhibition de PARP, en exploitant un concept connu sous le nom de « létalité synthétique ». La létalité synthétique survient lorsqu'une combinaison de défauts dans deux ou plusieurs gènes ou protéines conduit à la mort cellulaire, tandis qu'un seul défaut est compatible avec la viabilité cellulaire. Chez les patientes mutées *BRCA1*, l''inhibition de PARP conduit au blocage des fourches de réplication, ce qui augmente le nombre de cassures double brin et conduit ainsi à une grande instabilité génomique et à la mort cellulaire par apoptose ou par «létalité synthétique» (Curtit et al. 2015).

L'instabilité génomique constitue une cible thérapeutique importante dans les cancers gynécologiques, et pas seulement à cause de l'avènement des inhibiteurs de PARP, mais également parce que des mutations germinales ou somatiques homozygotes dans d'autres acteurs de la

réparation de l'ADN tels que RAD51C, RAD51D et BRIP1, augmentent la sensibilité aux cancers gynécologiques.

Des études *in vitro* ont démontré que la carence d'autres protéines associées à la recombinaison homologue telles que ATM, CHEK1, CHEK2 et CDK12, conduit également à l'inhibition de la réparation de l'ADN et donc à une sensibilité aux dommages à l'ADN. Ainsi dans le cancer ovarien épithélial sporadique et d'autres cancers dus à la présence de mutations *BRCA,* il semble crucial de bien comprendre les mécanismes de dommages à l'ADN et ses acteurs afin de développer de nouvelles cibles potentielles et encore étendre le succès des inhibiteurs de la réparation de l'ADN, illustré par les inhibiteurs de PARP.

L'Atlas du génome du cancer (TCGA) a identifié des mutations maintenant reconnues comme étant liées à la voie de réparation par recombinaison homologue dans environ 30% des cancers séreux de l'ovaire de haute grade. Cela comprend des mutations somatiques des gènes *BRCA* (3%), *ATM* et *ATR* (2%), la famille *FANC* (5%) et l'hyperméthylation de *RAD51* (3%), ainsi que des mutations germinales dans *BRCA1* (9%) ou *BRCA2* (8%) (Kristeleit et al., 2016; Lord & Ashworth, 2016).

L'identification des signatures de réarrangement structurel du phénotype «BRCAness » a été rendue possible par le développement de techniques de profil génomique à haut débit, y compris les techniques d''hybridation génomique (CGH), et le génotypage du polymorphisme mono-nucléotidique (SNP). L'équipe de Marc-Henri Stern a ainsi pu analyser une grande série de tumeurs survenues dans un contexte familial afin d'identifier une signature tumorale qui orienterait vers le défaut génétique en cause, potentiellement utilisable en pratique diagnostique. Ils ont ainsi identifié des réarrangements de grande taille dans l'ADN dont la taille et le nombre serait caractéristique de mutations *BRCA.* Ils proposent un test « clinique » dont l'objet serait la recherche de ces réarrangements afin de repérer les tumeurs déficientes pour la recombinaison homologue et ainsi les orienter vers un traitement approprié (Rieunier et al. 2012; Popova et al. 2016) .

c) BRCA1 dans la NHEJ

A l'inverse de la réparation par recombinaison homologue, la réparation par NHEJ est active tout le long du cycle, entrant donc en compétition avec la réparation par recombinaison homologue pour la réparation des cassures double brin durant les phases S et G2, d'autant qu'il s'agit d'un mécanisme beaucoup plus rapide (Grabarz et al. 2012). Cependant, il s'agit d'un mécanisme de réparation connu comme étant susceptible d'engendrer un plus grand nombre d'erreurs que la HR et c'est pourquoi le rôle de BRCA1 dans cette voie reste encore incertain. Les divergences de résultat concernant l'implication de BRCA1 dans la réparation par NHEJ pourraient s'expliquer par le fait qu'il existe différents sous-types de NHEJ et que BRCA1 pourrait avoir un rôle totalement différent dans chacun de ces sous-types (Bau, Mau, and Shen 2006). Il existe deux voies de NHEJ. La première, dite voie canonique de NHEJ (C-NHEJ) qui, contrairement à la réparation par recombinaison homologue, ne nécessite pas de résection simple brin des extrémités 3'. Cette voie de réparation peut médier la ligation précise des extrémités double brin si celles-ci sont cohésives et complémentaires ou si elles sont franches, et dans ce cas, constitue un mécanisme de réparation n'introduisant pas d'erreurs (Grabarz et al. 2012). La seconde voie de NHEJ dite alternative « Alternative End Joining » (A-EJ) permet la jonction des extrémités par l'utilisation fréquente des micro-homologies de 2 à 8 nucléotides qui sont distantes de la cassure, contrairement à celles utilisées par le C-NHEJ qui ne provoque que des modifications minimes au site de jonction. Pour cela, la voie A-EJ est considérée comme hautement mutagène. La réparation par A-EJ est indépendante de Ku80 et XRCC4, deux protéines essentielles à la

réparation par C-NHEJ. Or la protéine BRCA1 interagit avec ces différentes protéines lors de la recombinaison homologue. On peut donc se demander quelle voie BRCA1 favorise pour la résection simple brin : la voie de réparation A-EJ malgré son fort potentiel mutagène, ou plutôt la réparation par C-NHEJ.

Il a été montré que BRCA1 facilite la réparation par NHEJ la plus précise, son absence résultant en des modifications plus importantes au site de cassure et que ceci est dépendant de sa phosphorylation sur sa sérine 988 par la kinase Chk2 (Coupier et al. 2004; H. C. Wang et al. 2006). D'autre part, il a été montré que BRCA1 interagit avec Ku80 qui reconnaît les extrémités cassées de l'ADN (via sa participation à un hétérodimère Ku80/Ku70) et initie la réparation par C-NHEJ, impliquant plus fortement BRCA1 dans la réparation par C-NHEJ. D'ailleurs c'est au cours de la phase G1 du cycle que l'interaction de BRCA1 avec Ku80 est la plus importante (Jiang G et al. 2013). Dans l'ensemble, ces études ont permis de proposer un modèle dans lequel le choix du mode de réparation des cassures double brin est étroitement régulé en fonction du cycle. BRCA1 favoriserait les mécanismes de réparation les moins inducteurs d'erreur en fonction de la phase durant laquelle l'ADN est endommagé. Ainsi, BRCA1 favoriserait la recombinaison homologue pendant les phases S, G2 et M du cycle (via son interaction avec MRE11 et CtIP), et la réparation par C-NHEJ durant la phase G1 (via son interaction avec Ku80) (Figure 8).

2. BRCA1 forme de multiples complexes transcriptionnels qui contribuent à la stabilité du génome

En plus de promouvoir la réparation de l'ADN et la stabilité du génome directement, BRCA1 est connue pour former de multiples complexes qui régulent la transcription des gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires, y compris la réparation de l'ADN. Un rôle de BRCA1 dans la transcription a été suggéré pour la première fois par Miki *et al*., en 1994 en raison du nombre élevé de résidus d'acides aminés acides dans son extrémité C-terminale, caractéristique commune aux domaines d'activation de nombreux facteurs de transcription (Savage & Harkin 2015).
Il est maintenant largement admis que BRCA1 affecte la transcription de plusieurs façons. Tout d'abord BRCA1 fait partie du complexe ARN polymérase II (ARN *pol* II) *via* son interaction avec l'ARN hélicase A, une enzyme qui « dénoue » les duplexes ARN/ADN (Anderson et al. 1998). La transcription comporte différentes étapes conduisant à la synthèse de l'ARNm. Il a été montré que BRCA1 interagit avec la forme catalytiquement active, c'est-à-dire hyperphosphorylée de l'ARN *pol* II, suggérant qu'elle interviendrait préférentiellement dans les étapes post-initiation de la transcription plutôt que dans l'activation de la transcription elle-même (Krum et al. 2003). Le partenaire nucléaire de BRCA1, BARD1 est également associé à l'ARN *pol* II. Il a été suggéré que le complexe BRCA1-BARD1 pourrait ubiquitiner ce complexe en réponse à l'endommagement de l'ADN par UV et ainsi induire la dissociation du complexe et faciliter l'accès au site de cassure à la machinerie de réparation (Kleiman et al. 2005). Actuellement, le rôle exact de BRCA1 dans la régulation de la transcription par son interaction avec la machinerie transcriptionnelle reste encore à déterminer. Par exemple, nous ne savons pas exactement dans quelle(s) étape(s) BRCA1 est impliquée : initiation, élongation, maturation. Grâce aux différentes études menées, on sait que BRCA1 pourrait utiliser sa liaison à l'ARN *pol* II pour permettre la transcription de certains gènes. Mais lorsque cette machinerie transcriptionnelle rencontre de l'ADN endommagé, permettre la dégradation/dissociation de la machinerie de transcription en cours, faciliterait l'accès à la machinerie de la réparation de l'ADN.

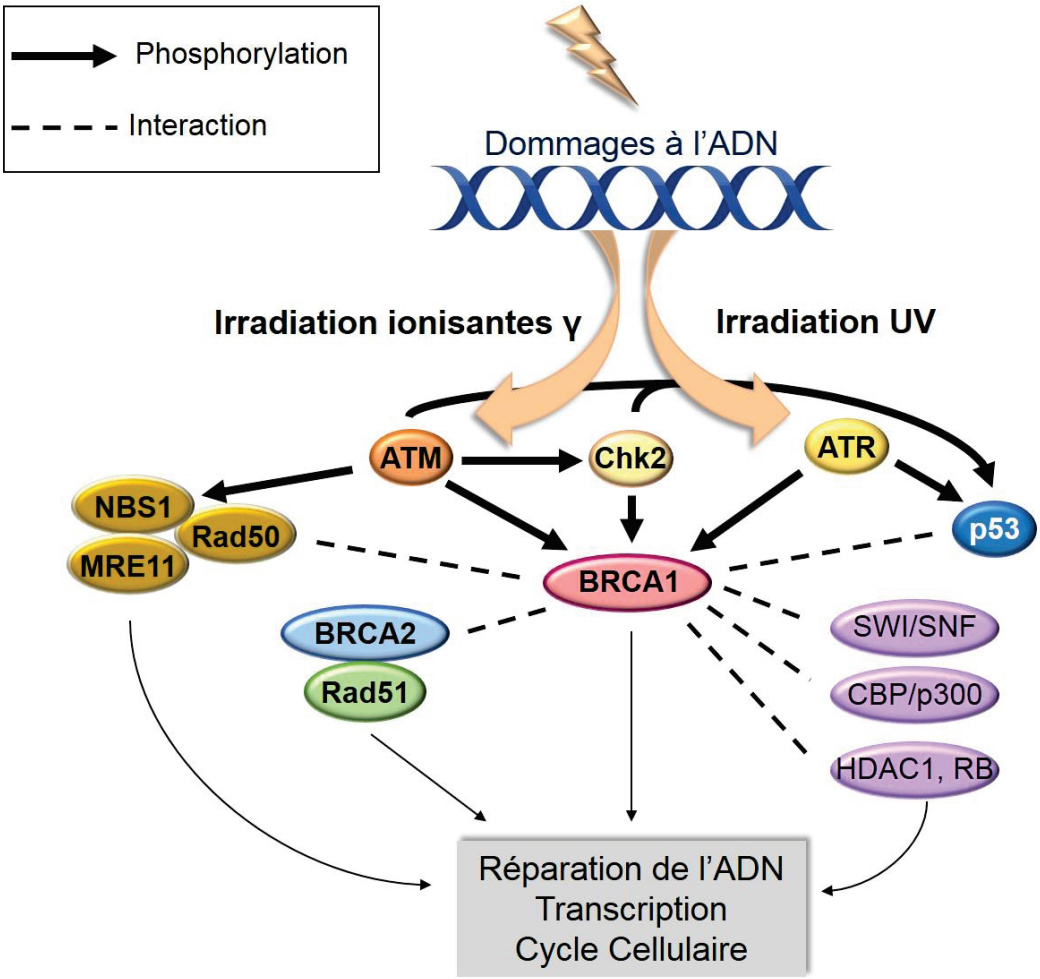


Figure 8 : Fonctions de la protéine BRCA1 en réponse aux dommages à l'ADN.

La protéine BRCA1 peut être activée et donc phosphorylée par différentes kinases en fonctions du stress cellulaire causé à la cellule. Ainsi, lorsque la cellule est irradiée par radiations ionisantes c'est ATM qui est activée, tandis qu'en conditions d'irradiation aux ultraviolets (UV) c'est la kinase ATR. Suivant la voie activée, BRCA1 interagit avec différents complexes, toujours dans le but de réparer les cassures. Ceci sera notamment permis par la régulation de la transcription ainsi que la régulation du cycle cellulaire.

Pour faciliter ce processus, et permettre à la machinerie transcriptionnelle de se positionner et d'accéder à l'ADN, la structure de la chromatine doit être modifiée. L'acétylation des histones par les histones acétyl-transférases (HAT) et le remodelage de la chromatine par des complexes enzymatiques composés de plusieurs sous-unités (dont le complexe Swi/Snf qui hydrolyse l'ATP pour altérer les interactions entre les histones et l'ADN) sont deux mécanismes majeurs permettant l'altération de la chromatine. Or, il a été montré que BRCA1 interagit avec des HAT, des histones déacétylases (HDAC) ainsi qu'avec différentes sous-unités du complexe de remodelage de la chromatine Swi/Snf (Kalkhoven 2004). Ceci suggère que le rôle de BRCA1 dans la transcription passe aussi par sa capacité à interagir avec les facteurs de remodelage de la chromatine.

Pour le moment, aucune étude n'a pu mettre en évidence la capacité de BRCA1 à interagir avec une séquence d'ADN spécifique, BRCA1 serait donc plutôt un cofacteur transcriptionnel capable d'activer ou de réprimer l'activité des facteurs de transcription avec lesquels elle interagit, plutôt qu'un facteur d'initiation de la transcription capable d'agir seul (Savage & Harkin 2015). BRCA1 serait ainsi capable de réguler positivement ou négativement la transcription d'un même gène en fonction des facteurs de transcription avec lesquels elle s'associe (Figure 9).

2.1 BRCA1 co-active la transcription de gènes

a) Exemple de p53

Il a été montré que BRCA1 interagit avec p53 au niveau de deux régions, l'une située à l'extrémité N-terminale de BRCA1 et l'autre à l'extrémité C-terminale (Chai et al. 1999). De plus, BRCA1 stabilise p53 et augmente son activité transcriptionnelle à partir de promoteurs de réponse à p53 connus tels que ceux du régulateur du cycle cellulaire CDKN1A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A, aussi appelée p21 ou Cip1) ou de l'activateur d'apoptose BAX (BCL2-associated X protein). La phosphorylation de BRCA1 en réponse aux lésions de l'ADN par ATM et ATR sur ses sérines 1423 et 1524 respectivement est nécessaire pour la signalisation et l'activation de p53 médiée par ATM, régulant ainsi la transcription de p21, p53-dépendante. En outre, BRCA1 semble moduler la transcription de quelques gènes cibles de p53 en réponse à des lésions de l'ADN. BRCA1 favoriserait la transcription des gènes de réparation d'ADN et d'arrêt du cycle cellulaire mais pas de gènes pro-apoptotiques régulés par p53 (Savage and Harkin 2015).

b) Exemple de STAT1

BRCA1 interagit avec le domaine d'activation C-terminal de STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1). Ces deux protéines activent ensemble la transcription de CDKN1A dont le promoteur contient des éléments de réponse à l'interféron gamma (IFNγ) (Ouchi et al. 2000). Il a été proposé que BRCA1 induit *via* STAT1 la transcription de gènes impliqués dans l'apotose induite par l'IFNγ. Il a d'ailleurs été montré que la 2,5 oligoadenylate synthetase (2,5 OAS), un autre gène de réponse à l'IFNγ dont la transcription est induite de façon dépendante à BRCA1 et STAT1, est un médiateur de cette apoptose induite par BRCA1 et l'IFNγ (Savage and Harkin 2015). Ainsi le rôle de BRCA1 aux voies de réponses à l'IFNγ suggère qu'elle pourrait être impliquée dans l'immunité innée et l'immunosurveillance des tumeurs.

2.2 BRCA1 co-inhibe la transcription de gènes

a) Exemple de c-Myc

La protéine BRCA1 interagit avec le proto-oncogène c-Myc *via* la région hélice-tour-hélice de c-Myc et de deux régions N-terminales de BRCA1. BRCA1 inhibe la transcription dépendante de c-Myc ainsi que

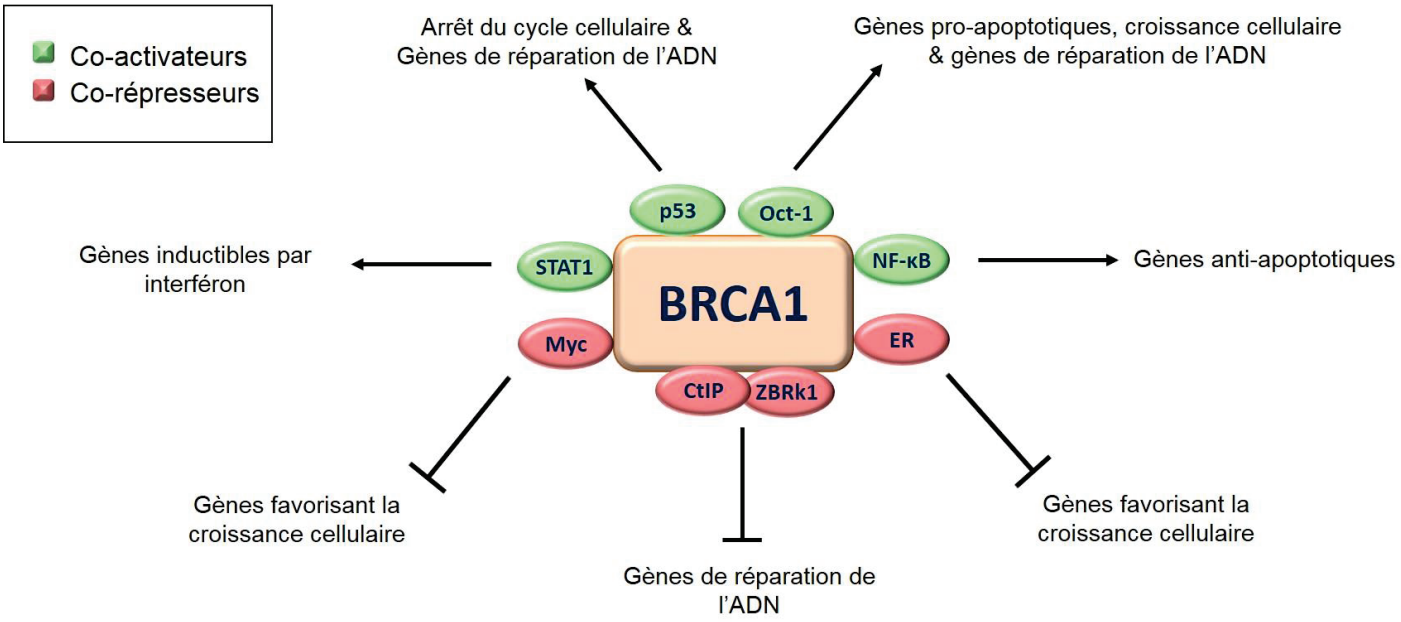


Figure 9 : Les complexes transcriptionnels formés par BRCA1

La protéine BRCA1 forme de nombreux complexes transcriptionnels et selon ses partenaires protéiques, le complexe présente un effet co-activateur ou co-répresseur sur la transcription de gènes impliqués dans différentes voies cellulaires. (Figure adaptée de Savage & Harkin, FEBS J, 2015)

la transformation induite par l'association de c-Myc et H-Ras, en inhibant par exemple l'activité transcriptionnelle de c-Myc sur son gène cible hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), gène qui code une enzyme clé pour la carcinogenèse (Xiong et al. 2003). L'activité inhibitrice de BRCA1 pourrait se faire par son recrutement au sein d'un complexe appelé Nmi-c-Myc-BRCA1 *via* son interaction avec la protéine Nmi (N-Myc Interacting protein) qui fonctionne comme un adaptateur permettant de recruter BRCA1 et c-Myc (Li, Lee, and Avraham 2002).

b) Exemple de Erα

La voie de signalisation de réponse aux œstrogènes est également connue pour être affectée par BRCA1 à différents niveaux. Les estrogènes entrent dans la cellule, et, dans le cytoplasme, se lient au récepteur d'ERα stimulant la dimérisation et l'activation du récepteur, pour ensuite aller dans le noyau (Poulard et al. 2010). Les récepteurs activés lient alors les éléments de réponse aux œstrogènes dans les promoteurs et stimulent la transcription des gènes cibles. L'œstrogène en général, favorise la prolifération et donc l'expression d'un certain nombre de gènes prolifératifs associés au cancer et à l'instabilité génomique telles que les cyclines E et D, le récepteur à la progestérone, le facteur de croissance épithéliale et facteur de croissance endothélial vasculaire (Savage and Harkin 2015). Le lien entre la signalisation des œstrogènes et le développement du cancer du sein est indiqué par l'efficacité puissante du traitement de cette maladie par des médicaments anti-œstrogènes tels que le tamoxifène. BRCA1 est connu pour se lier au récepteur aux œstrogènes indépendamment de la présence du ligand, via deux points de contact dans sa région N-terminale (aa 67-100 et 101-133) et une région située dans le domaine C-terminal d'activation de la transcription et de liaison au ligand d'ERα, le domaine AF-2 (aa 282-420). La partie N-terminale de BRCA1 permettrait donc son interaction avec ERα tandis que son domaine C-terminal serait porteur de l'activité répressive (Fan et al. 2001). Parallèlement à cela, BRCA1 réprime sévèrement l'expression d'un certain nombre de gènes endogènes régulés par ERα, tels que le facteur de croissance endothelial vasculaire, une protéine impliquée dans la croissance tumorale et l'angiogenèse.

2.3 Activité co-activatrice et co-inibitrice de BRCA1 sur le même gène

En plus de réguler l'expression d'ERα, on sait que BRCA1 et Oct-1 coopèrent dans la transactivation de l'inhibiteur du cycle cellulaire induit par des lésions de l'ADN et pro-apoptotique GADD45 (Growth Arrest and DNA-Damage-inducible gene 45). Cela empêche ainsi la propagation de l'ADN endommagé aux cellules filles et/ou favorise l'apoptose, contribuant à nouveau au maintien de la stabilité génomique. La transcription du gène est donc activée suite à des conditions de stress cellulaire et plus particulièrement à des traitements endommageant l'ADN (Savage & Harkin 2015). Il a été montré que BRCA1 intervient dans l'induction de la transcription de GADD45 de façon indépendante de p53 (Jin et al. 2000). L'analyse du promoteur de GADD45 a montré qu'il contient deux motifs OCT-1 et une boîte CAAT qui sont des motifs de liaison pour les facteurs de transcription Oct-1 et NF-Y. Ces motifs constituent les éléments de réponse à BRCA1 qui se lie à eux *via* son interaction avec le facteur de transcription Oct-1 et la sous-unité NF-YA de NF-Y. A l'inverse d'Oct-1 et NF-YA, l'interaction de BRCA1 avec le facteur de transcription ZBRK1 réprime la transcription de GADD45 (Zheng et al. 2000). La surexpression de BRCA1 permet de lever cette inhibition par ZBRK1 (Savage & Harkin 2015). La découverte que BRCA1 est nécessaire pour, à la fois, le complexe de répression transcriptionnelle de GADD45 pré-endommagement (BRCA1 / ZBRk1) et le complexe d'activation de transcription post-dommage à l'ADN (BRCA1 / OCT1) a suggéré que BRCA1 peut recevoir et/ou transduire un signal de

« switch » aux protéines de liaison du promoteur et/ou au mécanisme de répression / activation en réponse à des lésions de l'ADN.

Une étude a pu mettre en évidence le rôle de BRCA1 sur la régulation de la transcription de son propre gène par une boucle d'autorégulation de la transcription de *BRCA1*. La surexpression de BRCA1 diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur de *BRCA1* et la quantité d'ARN pré-messager de BRCA1 endogène présent dans les cellules sur-exprimant BRCA1 de façon stable. La déplétion de BRCA1 a l'effet inverse. Selon cette étude, BRCA1 se lie à son promoteur *via* un complexe contenant RB et E2F-1. Enfin, les auteurs montrent qu'en condition de stress génotoxique, ce complexe est dissocié, ce qui induit l'augmentation de la transcription de BRCA1 (Cabello et al. 2010).

C. Les fonctions cytoplasmiques de la protéine BRCA1

1. La protéine BRCA1 régule les centrosomes

La phase M de la division cellulaire comporte deux événements : la division du noyau, ou mitose, et la division du cytoplasme, ou cytodiérèse. Au cours de cette division, les différents composants d'une cellule parentale (qui ont doublé au cours de l'interphase précédente) sont partagés entre les deux cellules filles. La duplication cellulaire nécessite la duplication du centrosome. Il s'agit d'un organite cellulaire qui est le centre organisateur des microtubules de la cellule. Au cours d'un cycle cellulaire, le centrosome est dupliqué une seule fois, et les deux centrosomes migrent aux pôles opposés de la cellule pour former le fuseau mitotique permettant la ségrégation des chromosomes. Il est donc un acteur essentiel au bon déroulement de la mitose et sa duplication est un mécanisme très contrôlé. Lorsqu'un dysfonctionnement se produit, cela mène à l'amplification des centrosomes avec pour conséquence des erreurs de ségrégation des chromosomes et une instabilité génétique. Cela est notamment observé dans la plupart des tumeurs solides, dont les tumeurs mammaires.

Dans plusieurs études, la présence de la protéine BRCA1, ainsi que celle de BARD1, ont été observées tout au long du cycle cellulaire au niveau du centrosome (Sankaran et al. 2006). BRCA1 s'associe avec les centrioles pères des centrosomes non dupliqués. Dès le début de la duplication, BRCA1 s'associe avec les centrioles filles. Ainsi, les centrosomes dupliqués sont tous les deux liés à BRCA1. Dès lors que l'association de BRCA1 aux centrosomes a été rapportée, il a été montré que BRCA1 co-immunoprécipitait avec la tubuline γ qui est un composant du centrosome important pour la nucléation des microtubules lorsqu'elle forme un complexe en anneau appelé γ-Tubulin Ring Complex (γTuRC) (Brodie & Henderson 2012). Le recrutement de BRCA1 aux centrosomes pourrait dépendre de son interaction avec CRM1 (*via* ses NES) pour son export nucléaire, qui est également connue pour être localisés aux centrosomes. Il a également été suggéré que la kinase Aurora A, un partenaire du domaine C-terminal de BRCA1, pourrait contribuer à la rétention de BRCA1 aux centrosomes. La présence de BRCA1 aux centrosomes serait donc indépendante de son interaction avec BARD1 ou la tubuline γ. En revanche, il a été montré que le complexe BRCA1/BARD1 ubiquitine la tubuline γ *in vitro* sur ses lysines 48 et 344. Or, lorsque la tubuline γ mutée sur sa lysine 48 est exprimée dans la cellule, on observe une amplification des centrosomes suggérant que BRCA1 intervient dans la régulation de la duplication des centrosomes. De plus, l'inhibition de l'expression de BRCA1 par ARN interférent dans des lignées mammaires ou la modification de la tubuline γ se traduit par le même phénotype: un surnombre des centrosomes. Ce résultat suggère une relation BRCA1-tubuline γ significative ayant une forte incidence sur la biologie de la cellule mammaire (Parvin 2009). En plus de son contrôle dans la duplication, BRCA1 contrôle l'appariement des centrioles comme cela a été montré par la présence de

mutations faux sens de BRCA1 situées dans le domaine RING, certaines mutations ayant des effets sur les deux processus. Enfin il a été montré que BRCA1 prévient la séparation prématurée des centrioles et empêche qu'ils se dupliquent à nouveau avant que la mitose n'ait eu lieu.

La protéine BRCA1 régule donc le nombre des centrosomes mais il a également été suggéré que BRCA1 puisse réguler leur fonction. Il a été montré *in vitro* que l'activité d'ubiquitination du complexe BRCA1/BARD1 inhibe directement la fonction de nucléation des microtubules du centrosome. De même, l'ubiquitination de la tubuline γ, qui ne conduit pas à sa dégradation par le protéasome, empêcherait son recrutement aux centrosomes et préviendrait ainsi la nucléation des microtubules (Parvin 2009). Dans une autre étude, les auteurs ont montré que l'expression d'une forme mutée de BRCA1 n'ayant pas d'activité E3 ubiquitine ligase conduit au même phénotype que l'inhibition de BRCA1 par ARN interférence, c'est-à-dire l'amplification et l'hyperactivité des centrosomes, confirmant ainsi l'implication de l'activité E3 ubiquitine ligase de BRCA1 dans son contrôle des centrosomes. En plus de la tubuline γ, il a été suggéré que BRCA1 ubiquitine une ou plusieurs autres protéines du centrosome qui seraient des protéines adaptatrices permettant la localisation du complexe γTuRC aux centrosomes. Ainsi, BRCA1 inhiberait la nucléation des microtubules. Enfin, il a été montré que l'inhibition de la nucléation des microtubules par l'activité E3 ubiquitine ligase de BRCA1 variait au cours du cycle, permettant à la cellule de finalement se diviser. Il est apparu que l'effet inhibiteur de BRCA1 sur la nucléation des microtubules est forte durant la phase S mais moins importante durant la phase M. De plus, l'activité ubiquitine ligase de BRCA1 serait plus faible en présence de centrosomes mitotiques. Dans cette étude, les auteurs montrent que la phosphorylation de BRCA1 par la kinase Aurora A, une kinase essentielle à la maturation des centrosomes, induit une diminution de l'activité ubiquitine ligase de BRCA1, tandis que sa déphosphorylation par la phosphatase 1α l'augmente. De façon intéressante, la région contenant le gène codant la kinase Aurora A est fréquemment amplifiée dans les cancers du sein et la surexpression de cette kinase conduit à des phénotypes similaires à ceux observés lors de l'inhibition de BRCA1, c'est-à-dire l'absence de point de contrôle G2/M et l'amplification du nombre de centrosomes (Meraldi, Honda, and Nigg 2004) .

2. La protéine BRCA1 module l'apoptose

Les processus de suicide cellulaire appelé mort cellulaire programmée ou apoptose implique l'action séquentielle de protéases, les caspases, qui déclenchent la mort cellulaire en dégradant des substrats cellulaires du noyau et du cytoplasme. Les caspases existent dans toutes les cellules sous formes de précurseurs inactifs (procaspases) dont l'activation d'un premier contingent de caspases dites initiatrices entraîne l'activation séquentielle des caspases dites effectrices notamment la caspase-3, au cours d'une cascade protéolytique. Le processus d'activation peut être initié par divers types de signaux intra- et extra-cellulaires. Deux voies principales d'activation sont actuellement identifiées : la voie extrinsèque des récepteurs à domaines de mort (Fas, TNF), et la voie intrinsèque mitochondriale. L'activation des caspases, et indirectement de tout processus apoptotique, est régulée par des membres d'autres familles protéiques, en particulier la famille du proto-oncogène *Bcl-2*. L'apoptose est donc un mécanisme régulateur essentiel qui intervient dans l'homéostasie tissulaire et dans divers processus physiologiques clés. Ainsi, tout dysfonctionnement de ce programme peut s'avérer délétère pour l'organisme et conduire au développement de diverses pathologies, en particulier le cancer.

La protéine BRCA1 est depuis longtemps connue pour son implication dans ce mécanisme. L'invalidation conditionnelle du gène Brca1 murin dans les cellules mammaires conduit à l'augmentation de l'apoptose de ces cellules (Xu et al. 1999). A l'inverse, plusieurs études montrent que la surexpression de la protéine dans des lignées humaines mammaires tumorales augmente l'apoptose et confère à ces cellules une sensibilité plus importante à l'apoptose induite par différents stress (génotoxique, poisons du fuseau mitotique). Il a également été suggéré que BRCA1 puisse moduler l'apoptose des cellules en fonctions du stress auquel elles sont soumises, et notamment suivant les agents anti-cancéreux utilisés. Ainsi, ces cellules mammaires cancéreuses seraient sensibilisées aux drogues du fuseau mitotique telles que le paclitaxel ou vinorelbine (Quinn et al. 2003). En revanche, elles seraient plus résistantes aux drogues endommageant l'ADN. Les résultats des différents laboratoires qui étudient l'implication de BRCA1 dans l'apoptose présentent des conclusions assez différentes, ce qui peut s'expliquer par l'utilisation de modèles cellulaires, de niveaux d'expression de BRCA1 et de stress différents. Il a ainsi pu être montré que la protéine BRCA1 est dégradée par le protéasome en réponse à une forte dose d'IR (50Gy) ce qui induit l'activation de l'apoptose, tandis qu'elle n'est pas dégradée suite à une plus faible dose (5Gy) sur les cellules MCF-7 et HeLa (W. Liu et al. 2010). Ce qui ressort de ces différentes études est que BRCA1 module la réponse apoptotique (pro ou anti-apoptotique) en fonction du stress appliqué aux cellules.

Quels sont les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le rôle de BRCA1 dans l'apoptose ? Il a été montré que BRCA1 module la réponse apoptotique en participant à différentes voies.
La première fait intervenir son activité transcriptionnelle puisque BRCA1 permet la transcription de gènes comme *IRF-7, MxA, CDKN1A* en réponse à l'IFNγ (Buckley et al. 2007). Il a également été montré que BRCA1 peut induire l'apoptose lorsqu'elle est surexprimée *via* l'activation de *GADD45* dont BRCA1 est un cofacteur transcriptionnel (Harkin et al. 1999). Cela induirait l'apoptose dans les cellules de façon dépendante de l'activation de JNK/SAPK (c-Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase) activée en amont par *GADD45*. Une autre étude a montré que l'activation de JNK par BRCA1 et l'augmentation de l'expression de Fas retrouvées dans les cellules MCF7 n'induit pas l'activation des caspases 8 et 9 et l'apoptose de ces cellules à moins que les kinases ERK1 et 2 soient inhibées. En effet, au contraire de la kinase JNK/SAPK qui est activée par des stress et qui tend à inhiber la prolifération et/ou à induire l'apoptose, les kinases ERK1 et 2 sont activées par les mitogènes (donc par le sérum) et favorisent la croissance et la survie cellulaire (Yan et al. 2002). En fonction des lignées cellulaires, l'inhibition de cette voie paraît donc nécessaire à l'activité pro-apoptotique de BRCA1.
Une deuxième voie permettant à BRCA1 de moduler la réponse apoptotique pourrait passer par sa phosphorylation sur ses sérines 1423 et 1524 par ATR suite à l'irradiation par UV (Martin and Ouchi 2005). Cela permettrait la dissociation de BRCA1 du complexe XIAP-BRCA1, ce qui induirait la dissociation du complexe XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis)-caspase9, activerait la caspase 9 qui pourrait alors cliver et activer la caspase 3. Il a également été montré que suite à l'irradiation des cellules par les rayons UV, BRCA1 est clivée par la caspase 3, ce qui produit un fragment C-terminal d'un poids moléculaire apparent de 90 kDa (Zhan et al. 2002). Ce fragment C-terminal de BRCA1 serait le porteur de son activité pro-apoptotique. De plus, son expression est corrélée avec l'activation de GADD45 et la phosphorylation de JNK, confirmant l'implication de ce fragment dans l'apoptose induite par BRCA1 passant par cette voie. Il a été montré dans les lignées mammaires tumorales humaines T47D et MDA-MB-231 que le fragment p90 de BRCA1 est également généré lors de stress variés (agents créant des liaisons inter-brins dans l'ADN, drogues anti-cancer comme le cisplatine). La formation du fragment p90 serait donc une réponse communes à différentes voies apoptotiques et il semble même

qu'il ait une activité pro-apoptotique nécessitant l'intégrité du domaine BRCT (Dizin et al. 2008). Enfin il a été montré que p90 est principalement cytoplasmique, ce qui suggère que BRCA1 module l'apoptose depuis le cytoplasme.

Il est important de noter que la localisation subcellulaire de BRCA1 semble intervenir dans son rôle de modulation de l'apoptose. Il a d'ailleurs été montré que la rétention de BRCA1 dans le noyau inhibe l'apoptose. La surexpression de BRCA1 ainsi que celle de son partenaire protéique nucléaire BARD1 inhibe l'apoptose dans différentes lignées de cancer du sein (MCF-7, T47D, HCC1937). Il a donc été proposé qu'en facilitant la rétention nucléaire de BRCA1, BARD1 inhibe la fonction pro-apoptotique de BRCA1, et donc favorise la réparation de l'ADN et la survie cellulaire. Plusieurs études ont d'ailleurs rapporté un enrichissement cytoplasmique de BRCA1 lorsque les cellules sont soumises à des stress génotoxiques (IR, UV) mais les conclusions divergent en raison des différentes cinétiques de relocalisation cytoplasmique de BRCA1 observées. Quelques équipes s'intéressent à l'importance de la localisation de BRCA1 dans la cellule pour ses fonctions (Yang & Xia 2010). Certaines d'entre elles ont pu montrer que, bien que la présence de BRCA1 dans le noyau soit nécessaire pour la réparation des cassures double brin de l'ADN et que sa séquestration dans le cytoplasme sensibilise les cellules aux IR ou au traitement par le cisplatine, cette sensibilisation n'est pas uniquement due à l'incapacité de BRCA1 à réparer l'ADN lorsqu'elle est dans le cytoplasme. L'utilisation de formes mutées pour BRCA1 déficientes pour la réparation de l'ADN a permis de montrer que les deux fonctions, cytotoxicité et réparation, sont découplées et que la cytotoxicité induite par BRCA1 en réponse à un stress génotoxique est dépendante de sa localisation cytoplasmique. De plus, la co-expression de formes sauvages de BRCA1 ou de p53 sauvages ou mutées dans leur région d'interaction dans les cellules HCC1937 déficientes en p53 et BRCA1 a permis de confirmer l'importance de p53 dans l'export nucléaire et la cytotoxicité de BRCA1 en réponse aux IR. Ces résultats confirment que la cytotoxicité de BRCA1 est bien associée à sa localisation cytoplasmique, bien qu'ils soient essentiellement basés sur l'utilisation de formes mutées exogènes de BRCA1 et ne résolvent donc pas la question de la localisation subcellulaire de la forme endogène de cette protéine suite à un stress génotoxique. Cette question cruciale reste donc encore une énigme à résoudre. Il a néanmoins pu être proposé un modèle selon lequel la réserve nucléaire de BRCA1 participe à la coordination de la réparation des dommages à l'ADN, alors que la réserve cytoplasmique pourrait induire l'apoptose des cellules endommagées lorsque la réparation de l'ADN est incomplète ou inefficace (Yang & Xia 2010).

3. Fonctions cytoplasmiques de BRCA1 identifiées par notre laboratoire

3.1 BRCA1 régule la lipogenèse

Nous venons de le voir, les fonctions de BRCA1 lui sont, pour la plupart, conférées par ses partenaires protéiques. En outre, ces liaisons protéiques impliquent souvent le domaine BRCT capable de lier les phosphopeptides selon la séquence consensus pS-X-X-F. Dans le but de comprendre l'importance du domaine BRCT dans les fonctions de BRCA1 et d'identifier de nouveaux partenaires protéiques de ce domaine, l'équipe que j'ai rejointe a identifié un partenaire majeur. Il s'agit de l'Acétyl-CoA Carboxylase Alpha (ACCA) (Magnard et al. 2002). Les expériences de « GST pull-down » réalisés au laboratoire ont permis de montrer que l'ensemble du domaine BRCT est nécessaire pour l'interaction de BRCA1 avec ACCA et que cette interaction est conservée chez les souris comme chez les Hommes. De plus, les mutations germinales affectant le domaine BRCT abolissent l'interaction. Notre équipe a montré que la phosphorylation d'ACCA sur sa sérine 1263 (et uniquement sur cette sérine) est

nécessaire à son interaction avec le domaine BRCT de même qu'avec la protéine BRCA1 entière (Ray et al. 2006). Nos résultats ont été confirmés par un autre laboratoire qui a pu mettre en évidence une interaction directe entre le domaine BRCT de la protéine BRCA1 humaine et un peptide contenant les acides aminés 1258 à 1271 d'ACCA phosphorylée sur la sérine 1263 (Shen & Tong 2008).

ACCA est une enzyme très conservée chez les eucaryotes. Elle catalyse la première étape de la synthèse des acides gras à longue chaîne. Naturellement, la découverte de l'interaction BRCA1/ACCA a soulevé la question de l'implication de BRCA1 dans le métabolisme lipidique. Notre laboratoire a ainsi pu montrer que l'inhibition de BRCA1 par ARN interférent dans les cellules mammaires tumorales MCF-7 augmente la synthèse lipidique (Moreau et al. 2006). Inversement, la surexpression de BRCA1 dans ces cellules est associée à une diminution de la synthèse lipidique.

L'enzyme ACCA est inactivée lorsqu'elle est phosphorylée sur la sérine 79 par l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase). Notre laboratoire s'est donc intéressé au rôle de BRCA1 sur l'activité d'ACCA lorsque ces deux protéines interagissent. Nous avons montré que BRCA1 interagit avec la forme phosphorylée d'ACCA, ce qui protège cette dernière de la déphosphorylation et lui permet de rester inactive. Cela explique le control négatif qu'exerce BRCA1 sur la synthèse lipidique. Enfin, notre laboratoire a montré que la phosphorylation d'ACCA varie au cours du cycle cellulaire, notamment la phosphorylation de la sérine 1263 qui est requise pour l'interaction avec BRCA1. Il apparait que la phosphorylation d'ACCA est plus importante au cours de la phase G2/M ce qui est également la phase du cycle au cours de laquelle BRCA1 et ACCA interagissent le plus fortement (Ray et al. 2009).

On peut se demander si la régulation négative qu'exerce BRCA1 sur la synthèse lipidique participe à son rôle de suppresseur de tumeur. En fait la lipogenèse est maintenant considérée comme une caractéristique métabolique nécessaire aux tumeurs (Han et al. 2006). Il a été montré que lorsqu'on inhibe ACCA par ARN interférent, la lipogenèse est significativement diminuée, la croissance cellulaire est inhibée, et l'apoptose dans les cellules tumorales mammaires est plus importante. De plus l'augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes de la lipogenèse ACCA et FASN (Fatty Acid Synthase) ainsi que l'augmentation de la synthèse des acides gras qui en découle coïncide avec la transition entre les lésions pré-malignes et le cancer du sein invasif (Chajès et al. 2006). On peut donc penser que le control négatif de la lipogenèse par BRCA1 participe à son rôle de suppresseur de tumeur et au maintien de l'intégrité cellulaire. Les mutations germinales situées dans le domaine BRCT de BRCA1 pourraient ainsi empêcher la formation du complexe BRCA1/ACCA ce qui aurait des conséquences sur la tumorigenèse.

3.2 BRCA1 contrôle la traduction de certains ARNm

Au laboratoire, toujours dans le but de rechercher des partenaires protéiques du domaine BRCT de BRCA1, une expérience de double hybride utilisant ce domaine comme appât, a permis de mettre en évidence l'interaction de BRCA1 avec la protéine de liaison au poly(A) des ARN messagers, PABP1 (Poly(A)-Binding Protein 1) (Dizin et al. 2006). L'équipe a par la suite vérifiée par des expériences de co-immunoprécipitation que cette interaction se produisait avec les protéines cellulaires BRCA1 et PABP1. Il a ainsi pu être montré que lorsque BRCA1 possède un domaine BRCT tronqué en position 1853 (Y1853X) elle n'interagit plus avec PABP1. De plus, lorsque la protéine BRCA1 est surexprimée, la synthèse protéique globale augmente de 20% ce qui n'est pas le cas après la surexpression de la forme mutée BRCA1-Y1853X. A l'inverse, l'inhibition de BRCA1 par ARN interférent diminue la synthèse protéique globale de 20% sans que la stabilité d'un ARNm rapporteur ne soit modifiée. Ceci suggère

que BRCA1 n'influe probablement pas sur la stabilité des ARNm et que le contrôle qu'elle exerce sur la synthèse protéique est médié par son interaction avec PABP1. Le laboratoire a pu montrer que les protéines BRCA1 et PABP1 interagissent dans le cytoplasme. Une analyse transcriptomique des ARNm présents dans la fraction polysomique (c'est-à-dire activement traduits) des cellules épithéliales mammaires tumorales MCF-7 exprimant de façon transitoire des ARN interférents (siRNA) dirigés contre BRCA1 ou contrôle, a été conduite. Pour s'affranchir d'un éventuel effet de BRCA1 sur la transcription, le transport nucléo-cytoplasmique ou la stabilité des ARNm, le signal polysomique de chaque ARNm a été normalisé avec son signal cytoplasmique. A l'issue de cette analyse, 840 ARNm, soit environ 7% de la totalité des ARNm exprimés dans les cellules MCF-7, présentaient une traduction modifiée de façon significative en absence de BRCA1 (augmentée pour 563 ARNm et diminuée pour 277 ARNm). De plus, notre équipe a montré par une approche de fractionnement cellulaire séquentiel que la protéine BRCA1 est retrouvée dans la fraction ribosomique des cellules, et qu'elle est associée aux fractions sub-polysomales de façon comparable au facteur d'initiation eIF4G (Dacheux et al. 2013). L'étude de cette nouvelle fonction, l'identification des ARNm directement régulés pour leur traduction, appelés « ARNm cibles » de BRCA1 a été l'un des objectifs principaux de mon travail de thèse.

Conclusion du chapitre 2

La protéine BRCA1 possède de nombreuses fonctions qui s'exercent dans le noyau et dans le cytoplasme. La spécificité de ses fonctions dépend des partenaires avec lesquels BRCA1 interagit dans chacun des compartiments. Des fonctions cytoplasmiques semblent donc complémentaires des fonctions nucléaires pour le bon maintien de l'intégrité de la cellule. Dans ce contexte, la régulation de la traduction par BRCA1 *via* son interaction avec PABP1 pourrait de même participer à son rôle de suppresseur de tumeur.

Chapitre 3 : Traduction, BRCA1 & Cancer

L'expression des gènes est certes régulée au niveau transcriptionnel mais elle l'est également au niveau post-transcriptionnel, *via* les étapes d'épissage, d'export, de contrôle de la stabilité des ARNm. Enfin, la traduction des ARNm en protéine est l'étape ultime de l'expression génique. Elle permet à la cellule de pouvoir s'adapter plus rapidement à l'environnement extérieur, contrairement à la transcription, et donc d'adapter les concentrations protéiques au besoin de la cellule.

A. Traduction canonique : Mécanisme général

La traduction consiste à passer d'une information sous forme d'une séquence de nucléotides (ARNm) à une séquence en acides aminés (protéine). La traduction, pour être effective, nécessite plusieurs acteurs : l'ARNm, le ribosome, des ARNt porteur de leur aa et de nombreux facteurs protéiques. Elle comporte trois étapes qui sont l'initiation, l'élongation, et la terminaison. Durant l'initiation de la traduction, s'effectue l'identification du codon initiateur AUG. Ceci conduit à l'appariement de l'ARNt méthionine initiateur et la formation d'un ribosome complet 80S compétent pour l'élongation. La majeure partie de la régulation de la traduction s'effectue lors de cette première étape, souvent considérée comme l'étape limitante de la traduction. Le signal du début de la traduction est très important : il détermine le cadre de lecture. En cas de décalage, toute la protéine synthétisée sera erronée (Besse and Ephrussi 2008). Parce que l'initiation de la traduction est considérée comme l'étape limitante, et parce que ses mécanismes moléculaires sont actuellement les mieux compris, l'essentiel de ce chapitre portera sur le contrôle de l'initiation de la traduction (Figure 10).

1. L'initiation de la traduction

1.1 Les ARN de transfert (ARNt)

Pendant le scanning de la région 5'UTR par la sous-unité 40S du ribosome, le premier codon rencontré d'initiation porte le codon correspondant à l'acide aminé méthionine. L'ARN de transfert initiateur dit ARNtmet, joue un rôle crucial dans la cellule. Il doit lire le codon d'initiation, permettant ainsi au ribosome de débuter la traduction dans une localisation correcte. Ce début d'initiation de la traduction est critique car si l'ARNtimet reconnaît un mauvais cadre de lecture cela peut engendrer une synthèse protéique aberrante ayant des conséquences graves pour la cellule. De plus, la disponibilité des ARNt est une étape limitante pour la traduction. L'ARNt est le seul à lier le site P du ribosome durant le cycle traductionnel mais également les facteurs d'élongation (EF-tu chez la levure, eEIF-A chez les eucaryotes). De plus, l'ARNt methionyl initiateur doit se distinguer des autres ARNt, tel que l'ARNt methionyl élongateur, qui contribue à l'ajout de résidus de méthionine durant l'élongation de la chaine peptidique contrairement aux mitochondries de mammifères, où il n'existe qu'un seul ARNt portant la méthionine servant à la fois d'initiateur et d'élongateur (Takeuchi et al. 2001).

1.2 Les facteurs d'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction chez l'homme requiert au moins une douzaine de facteurs d'initiation. L'ARNt initiateur aminoacétylé est livré au site P du ribosome sous forme d'un complexe ternaire (TC) avec le facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2) lié au GTP. Le complexe ternaire lie la sous-unité 40S avec l'aide des facteurs eIF1, eIF1A, et eIF3, formant ainsi le complexe de pré-initiation 43S. Ce complexe va ensuite pouvoir se lier à l'extrémité 5' de l'ARNm, facilité par eIF3, eIF4F et PABP1. Il est ainsi prêt à scanner le messager jusqu'à la rencontre du codon d'initiation. Les facteurs impliqués dans la

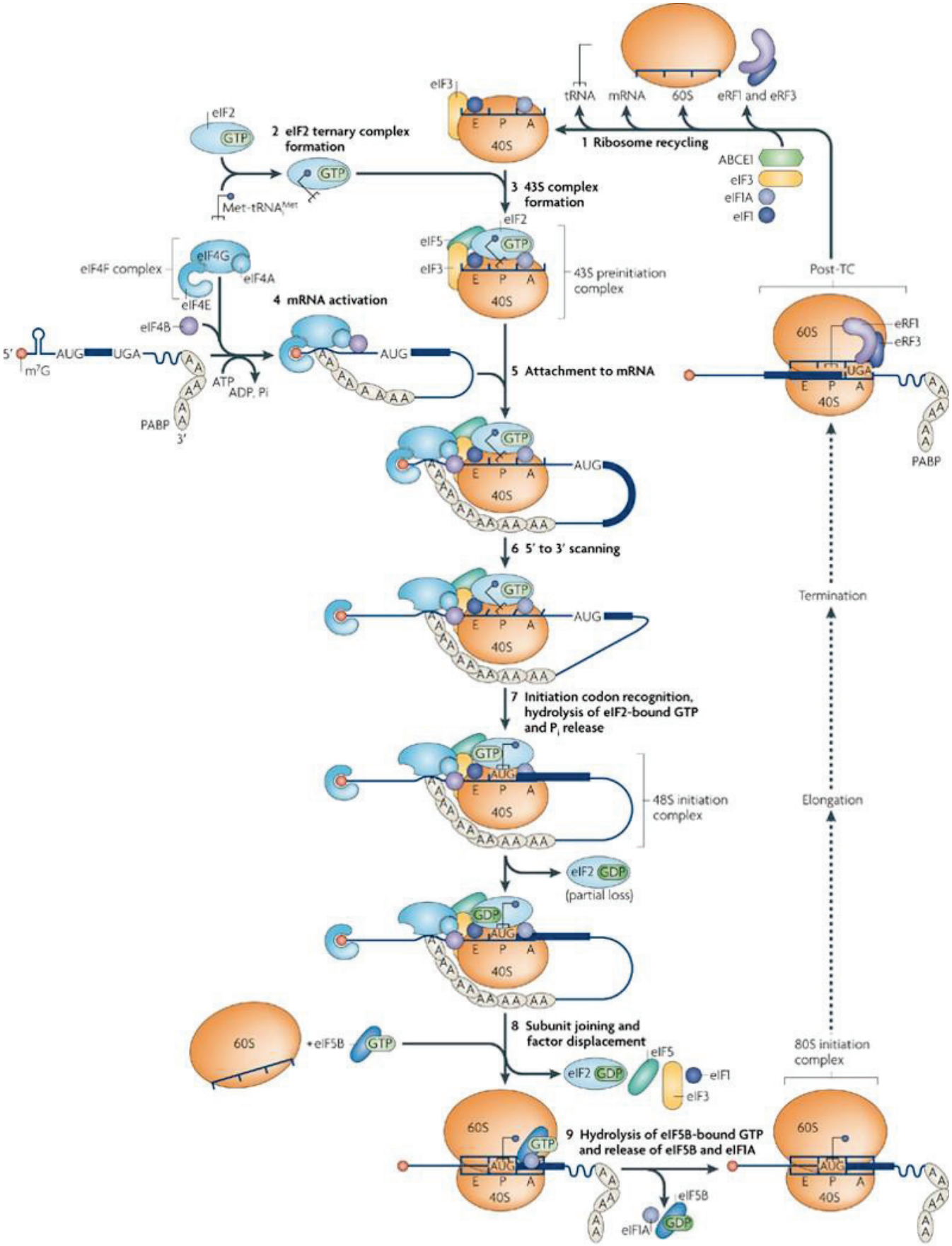


Figure 10 : Schéma général représentant les grandes étapes de l'initiation de la traduction.
(Figure extraite de Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV, Nat Rev Mol Cell Biol. 2010)

reconnaissance de ce codon sont eIF1 qui facilite la liaison du complexe ternaire, puis se dissocie du complexe 43S après la sélection du codon AUG. Il régule le relargage du phosphate d'eIF2 après hydrolyse du GTP par eIF5. Il y a également eIF1A qui facilite la liaison du complexe, interagit avec eIF5 pour la sélection du codon AUG. eIF2, est un facteur associé à une molécule de GTP, qui lie l'ARNt pour former le complexe. Celui-ci délivre l'ARNt à la sous-unité 40S. L'hydrolyse du GTP devient irréversible au moment de la reconnaissance du codon d'initiation AUG. Le facteur eIF3 interagit avec de nombreux eIFs. Il facilite le chargement de l'ARNm sur le complexe 43S. Le facteur eIF4G est une protéine centrale du complexe eIF4F qui lie la coiffe 7-methyl-G. Enfin le facteur eIF5 est une protéine GTPase activatrice d'eIF2. Son interaction avec eIF1A est importante pour la sélection du codon AUG de terminaison (Besse & Ephrussi 2008).

1.3 Assemblage du ribosome

Comme les ribosomes de toutes les espèces, le ribosome eucaryote présente une organisation asymétrique en deux sous-unités (SU), une grande et petite SU, nommées selon leur coefficient de sédimentation : 60S et 40S, respectivement. L'assemblage des deux sous-unités forme le ribosome dont le coefficient de sédimentation est 80S, de masse moléculaire d'environ 4.3 MDa chez les mammifères. Chaque SU contient des ARNr en complexe avec des protéines ribosomiques (PR) : chez l'homme, la SU 40S comprend l'ARNr 18S ainsi que 33 PR, tandis que la SU 60S contient les ARNr 28S, 5,8S et 5S avec 47 protéines ribosomiques. Au sein du ribosome, il se forme donc un très grand nombre d'interactions protéine-protéine, ARNr-protéine, et ARNr-ARNr. Ces interactions sont cruciales pour le mécanisme de traduction.

Au niveau du codon d'initiation, l'hydrolyse du GTP porté par eIF2 est réalisée par le facteur eIF5 (Lee et al. 2002; Shin et al. 2002). Cette hydrolyse induit un changement de conformation permettant ainsi la libération du complexe eIF2/GDP de la sous-unité ribosomique 40S et la dissociation du complexe de pré-initiation au niveau du site A (aminoacyl) de liaison de l'ARNt$_{met}$. La sous-unité ribosomique 60S rejoint alors le complexe de pré-initiation avec la participation du facteur eIF5B et l'ARNt$_{met}$. Il se place au niveau du site P (peptidyl-transferase) du complexe ribosomique 80S nouvellement formé (Pestova et al. 2000). La synthèse peptidique peut alors commencer (Roll-Mecak et al. 2001). L'interaction entre les facteurs eIF1A et eIF5B joue un rôle à la fois dans l'initiation de la traduction, en stabilisant la liaison de l'ARNt$_{met}$ sur le site P du ribosome, et dans le relargage des eIFs du ribosome (Marintchev et al. 2003).

1.4 Interaction entre la coiffe et la queue poly (A)

Depuis le début des années 90, la queue poly(A) s'est montrée nettement stimulatrice du processus traductionnel (Sachs, Sarnow, and Hentze 1997). A l'extrémité 3' de presque tous les ARNm eucaryotes se trouve une queue poly(A). Celle-ci est recouverte par les protéines de liaison au poly(A) des ARNm (PABP, Poly(A)-Binding Protein) qui permettent à l'ARNm de se circulariser par la jonction entre la coiffe et la queue poly(A). Chez le xénope, la mutation du signal de polyadénylation ou la modification chimique de l'extrémité 3' du messager inhibe largement la traduction (Simon, Tassan, and Richter 1992). Des expériences ont montré plus spécifiquement le rôle de la queue poly(A) dans le recrutement de la sous-unité ribosomique 60S au contact du messager (Munroe & Jacobson, 1990). De plus des mutants de S. cerevisiae ont montré la nécessité de la présence de protéine liant la queue poly(A), PABP, pour une traduction efficace (Tarun & Sachs, 1996). Bien que la queue poly(A) n'est pas essentielle pour la traduction (Searfoss & Wickner, 2000) les ARNm polyadénylés sont traduits plus

efficacement que ceux sans queue poly(A) (Borman, Michel, and Kean 2000). Il a de plus été montré que la queue poly(A) et la coiffe agissent en synergie pour stimuler la traduction (Preiss and Hentze 1998) et il est maintenant couramment accepté que cette action combinée de la coiffe et la queue poly(A) passe par la circularisation de l'ARNm, qui fait intervenir PABP1. En effet, cette circularisation est rendue possible par l'interaction simultanée du facteur d'initiation eIF4G avec eIF4E lié à la coiffe d'une part et avec PABP1 liée à la queue poly(A) d'autre part.

Les protéines PABP sont séparées en deux catégories en fonction de leur phylogénie et de leur localisation subcellulaire. On distingue ainsi les PABP nucléaires et cytoplasmiques. La PABP nucléaire (ou PABPN1), découverte en 1991 à travers son rôle sur la polyadénylation (Wahle, 1991) et qui est aussi impliquée dans la maturation des ARN prémessagers, ne présente que peu de ressemblance avec les PABP cytoplasmiques. Les PABP cytoplasmiques, quant à elles, sont essentiellement impliquées dans la traduction et la dégradation de l'ARNm. Bien que les mammifères codent plusieurs PABP cytoplasmiques, presque toutes les études se sont focalisées sur PABP1 (ou PABPC1). La structure des PABP cytoplasmiques est très conservée. La protéine PABP1 humaine est une protéine ubiquitaire constituée de 636 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 70 kDa. Elle possède quatre motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM, RNA-Recognition Motifs) non identiques situés dans sa région N-terminale et connectés à un domaine C-terminal d'environ 75 acides aminés appelé PABC (PABP C-terminal) reliés par une région non structurée riche en résidus proline (Mangus, Evans, and Jacobson 2003). Les motifs RRM de PABP1 sont responsables de sa liaison à l'ARNm. Les RRM 1 et 2 de PABP1 sont suffisants pour lier un poly(A) de 23 nucléotides, le tandem RRM 3/4 est aussi capable d'interagir avec ce poly(A) mais avec une affinité légèrement réduite, alors que chaque RRM pris séparément est incapable de lier (RRM1) ou avec une affinité très réduite (RRM 2, 3 et 4) un poly(A) (Kühn and Pieler 1996). Différentes études structurales ont montré que le domaine PABC est un domaine impliqué dans des interactions protéine-protéine, qui reconnaît notamment les protéines possédant un motif conservé de 12 acides aminé appelé PAM2 (PABP-interacting Motif 2). Parmi ces protéines se trouvent les protéines régulatrices de la traduction PAIP1 (PABP-Interacting Protein 1) et PAIP2, au sein de laquelle le motif PAM2 a été identifié (Kozlov et al. 2004).

A l'heure actuelle, la principale fonction de PABP1 identifiée est sa capacité à stimuler l'initiation de la traduction, essentiellement *via* son interaction avec la queue poly(A). Bien que cette fonction ait lieu dans le cytoplasme, siège de la traduction, il est à noter que PABP1, bien que majoritairement cytoplasmique, est une protéine capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Peu de données sont disponibles sur le rôle de PABP1 dans le noyau chez les mammifères, mais certaines observations suggèrent qu'elle pourrait avoir une influence sur les évènements nucléaires de biogenèse et de maturation des ARNm (Lemay et al. 2010) (Figure 11).

2. L'élongation de la traduction

L'élongation de la traduction correspond à la formation de la chaine polypeptidique par addition d'un nouvel acide aminé. Lors de l'élongation, le polypeptide, protéine en devenir, forme une chaine qui sort petit à petit du ribosome. Cette chaine passe par un tunnel de sortie qui est formé par le ribosome entre le centre de transfert de la liaison peptidique (PTC) et la surface de la SU 60S. Ce tunnel joue un rôle dans le repliement de la protéine en cours de synthèse. Le ribosome contient également trois sites A (aminoacyl), P (peptidyl transférase), et E (exit) dans lesquels l'ARNt est présent au cours de l'élongation. En particulier, au site A se fixe l'aminoacyl-ARNt intégré dans ce site par eEF1a et un GTP. Dans le site A, la position de l'ARNt est telle que la boucle de l'anticodon interagit directement avec le

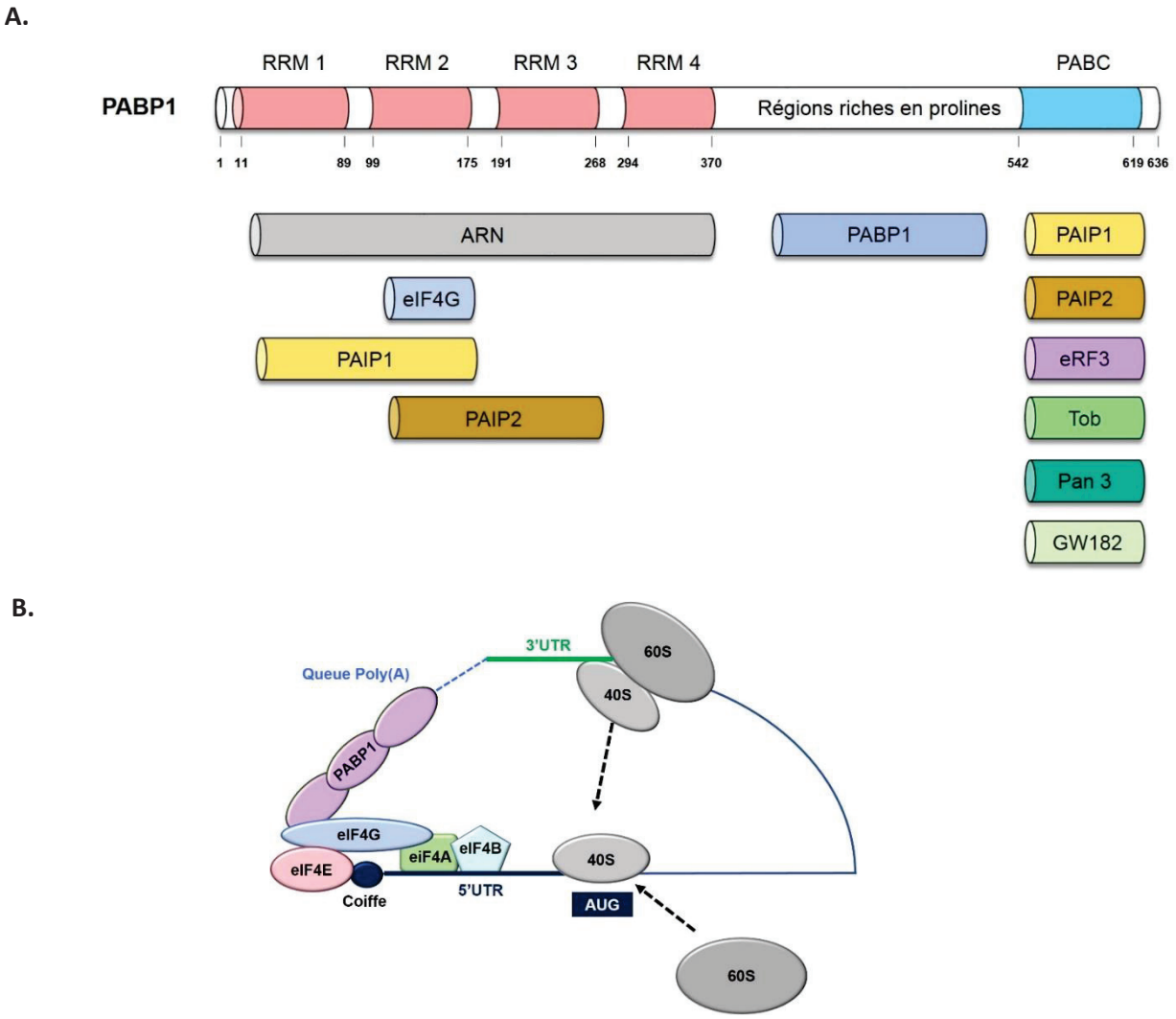


Figure 11 : La protéine PABP1, structure & fonction dans l'initiation de la traduction

A. Structure de la protéine PABP1 et régions d'interaction avec ses partenaires protéiques. PABP1 est une protéine de 636 aa. Elle possède quatre motifs de liaison à l'ARN appelés RRM 1 à 4 (RNA Recognition Motif), et un motif C-terminal de liaison aux protéines, le domaine PABC (pour PABP C-terminal). Les positions de ces domaines sont indiquées. Entre les RRM et le domaine PABC se trouve une région riche en prolines impliquée dans l'homodimérisation de PABP1. En plus de leur capacité à lier l'ARN, les RRM peuvent interagir avec différents partenaires protéiques tels qu'eIF4G (RRM2), PAIP1 (RRM1 et 2) et PAIP2 (RRM2 et 3). La queue poly(A) des ARNm se fixe préférentiellement sur les RRM1 et RRM2. Le domaine PABC est également un domaine de liaison aux protéines qui reconnaît notamment les protéines possédant un motif PAM2 (PABP-interacting Motif 2) telles que PAIP1, PAIP2, le facteur de terminaison eRF3, les facteurs de déadénylation Tob et Pan3 et le composant du complexe miRISC GW182 (TNRC6 chez les mammifères).

B. Le rôle de PABP1 et de la queue poly(A) durant la traduction. PABP1 peut se lier à la queue poly(A) *via* ses RRM 1 et 2, ainsi qu'à la protéine eIF4G ce qui permet ainsi la circularisation de l'ARNm et l'initiation de la traduction par le complexe eiF4F dont fait partie eIF4G. Le recyclage des ribosomes est également facilité par cette circularisation de l'ARNm.

codon de l'ARNm permettant l'appariement entre les deux séquences. Les interactions formées entre l'ARNr 18S et l'ARNt au site A ont pour fonction de vérifier le bon appariement codon-anticodon, et ainsi contrôlent le respect du code génétiques. Ces interactions seraient formées par 3 nucléotides de l'ARNr 18S, conservés de manière universelle. Il est proposé que bien que ces interactions forcent l'appariement du codon et de l'anticodon, elles tolèrent le non-appariement de la 3e base du codon, induisant ainsi une potentielle dégénérescence du code génétique. Quand l'association codon-anticodon est reconnue par le ribosome, un signal est transmis à eEF1A qui cible l'hydrolyse du GTP et par conséquent entraîne la dissociation d'eEF1A du ribosome. Après la formation de l'attachement du peptide, le ribosome contient un ARNt-peptidyl et un ARNt-deacylé dans le site P. La précision de ce mouvement ARNt - ARNm est essentielle pour la traduction. En effet, une erreur dans ce processus résulterait de la perte du cadre de lecture. Les trois étapes du cycle d'élongation, le décodage, le transfert du peptide lié, la translocation, sont répétées jusqu'à ce que la séquence complète de l'ARNm soit lue et qu'un codon stop marquant la terminaison soit vu par le centre de décodage de la petite sous-unité ribosomique (Ramakrishnan et al. 2002) (Figure 12).

3. La terminaison de la traduction

Durant la traduction de l'ARNm, la protéine nouvellement synthétisée est relarguée à partir du ribosome, ainsi lors de la translocation, le site A ribosomique est placé au niveau du codon stop. Chez les eucaryotes supérieurs, les facteurs de relarguage du polypeptide (eRF) gouvernent l'hydrolyse du dernier ARNt-peptidyl dans les ribosomes avec le relarguage de la chaîne polypeptidique naissante en présence des codons stop (UUA, UGA, UAG). Il existe chez les eucaryotes un seul facteur de relarguage, eERF1, qui décode les trois codons stop (Frolova et al. 1994). De plus, un facteur de relarguage de la superfamille des GTPases participe à la terminaison. Chez les eucaryotes, le facteur essentiel est le facteur eERF3 qui forme un complexe avec eERF1 et stimule l'hydrolyse de l'ARNt-peptidyl, une fois que le complexe ternaire eERF1/eERF3/ribosome est formé. Le peptide, l'ARNt déacylé puis l'ARNm sont alors relargués du ribosome (Inge-Vechtomov et al., 2003).

B. La protéine BRCA1 et la machinerie traductionnelle

La protéine BRCA1 participe à de nombreuses fonctions dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme et celles-ci semblent participer à son rôle dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Ses capacités lui sont notamment conférées par ses capacités d'interaction avec de nombreux partenaires. Aussi plusieurs équipes ont tenté de savoir si BRCA1 pouvait se lier à l'ARNm à l'instar de sa capacité de liaison à l'ADN (Paull et al. 2001). Notre équipe s'intéresse particulièrement à cette question depuis la découverte dans notre laboratoire de l'interaction des protéines BRCA1 et PABP1. Parce que cette interaction intervient dans le cytoplasme, siège de la traduction des ARNm, nous avons pensé que BRCA1 pourrait médier la traduction des ARNm en s'associant à ces derniers. Cependant, de plus en plus de données extérieures à notre laboratoire suggèrent que BRCA1 n'est pas capable de lier directement l'ARN.

1. La protéine BRCA1 et les ARN

Une protéine capable d'interagir directement avec un ARN est appelée une RNA-Binding Protein (RBP). Bien que ce terme soit utilisé pour définir les différentes protéines qui, en général, interviennent dans les complexes ribonucléoprotéiques, je ne qualifierai de RBP dans ce manuscrit, que les protéines capable d'interagir directement, c'est-à-dire de lier sans intermédiaire, l'ARN. Alors, la protéine BRCA1 est-elle une RBP ?

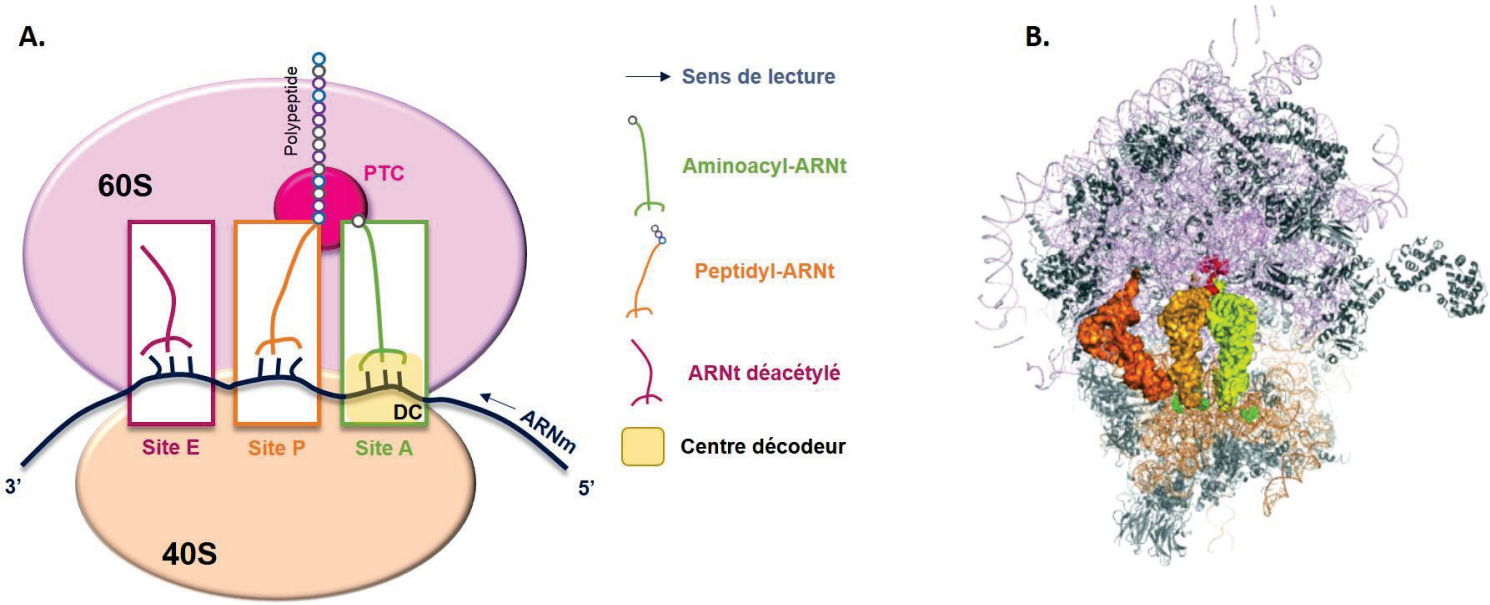


Figure 12 : Domaines clés du ribosome impliqués dans la traduction.

A. Représentation schématique de la position des ARNt dans le ribosome. Le site A est le site d'entrée de l'ARNt, l'aminoacyl-ARNt présente la boucle anti-codon de manière à ce que cette dernière interagisse avec le codon de l'ARNm, dans le centre de décodage (DC). L'extrémité de l'aminoacyl-ARNt portant l'acide aminé correspondant au codon de l'ARNm, est proche de celle du peptidyl-aminoacyl positionné au site P, et elles sont localisées dans le centre de transfert de la liaison peptidique (PTC). Le peptidyl-aminoacyl est lié au polypeptide en cours de synthèse. L'ARNt au site E est déacétylé et prêt à être expulsé du ribosome dès l'entrée d'un nouvel ARNt au site A. La flèche représente le sens de déplacement du ribosome sur l'ARNm.

B. Structure du ribosome 80S humain avec la position prédite des ARNt. En vert, l'aminoacyl-ARNt au site A, en orange le peptidyl-ARNt au site P, et enfin l'ARNt déacétyléen rouge au site E. En rose, est représenté le peptide en cours de synthèse. Thermus thermophilus. Cette image a été générée par Gabriel Therizols, ancien doctorant dans notre laboratoire, à l'aide du logiciel PyMOL en croisant les données sur le ribosome humain (à partir de Anger AM et *al.,* Nature, 2013) et les données sur les ARNt de Thermus thermophilus (à partir de Voorhees RM et *al.,* Nat Struct Mol Biol, 2009).

En 1999, il est établit que le domaine RING de la protéine BRCA1 ne lui permet pas de lier les ARN (Meza et al. 1999b). Depuis, un certain nombre d'études mentionnent BRCA1 comme étant néanmoins une protéine capable d'interagir avec l'ARN. La première publication faisant ce constat, montre en 2002 que la perte d'expression de la protéine BRCA1 dans des lignées mammaires conduit à la perturbation du chromosome X normalement inactif dans ces cellules. Lorsqu'elle est présente, BRCA1 colocalise normalement avec des marqueurs du chromosome X inactif (ARN XIST). Dans cette étude les auteurs réalisent une immunoprecipitation de la chromatine (Chromatin ImmunoPrecipitation, ChIP) avec un anticorps dirigé contre BRCA1. Après l'extraction des ARN contenus dans les ChIP et leur analyse par RT-qPCR (Reverse Transcriptase, suivie d'une réaction de polymérase en chaîne quantitative ou RT-pPCR) ils montrent que BRCA1 interagit avec son partenaire nucléaire BARD1 pour lier l'ARN XIST (Ganesan et al. 2002). Bien que les auteurs explicitent le fait qu'ils ne savent pas si cette interaction est directe ou non, leur étude est citée comme référence pour l'association directe de BRCA1 avec l'ARN (source internet : http://www.uniprot.org/) (Bateman et al. 2015). Dans bon nombre d'étude par ChIP, l'agent de fixation utilisé est le formaldéhyde qui permet de fixer les molécules entre elles, notamment les macros complexes protéiques sur la chromatine. Mais ce mode de fixation ne permet pas de déterminer si la protéine immunoprécipitée lie l'ARN directement ou *via* un partenaire protéique.

Plus récemment, une équipe a montré que BRCA1 accélère la maturation de certains transcrits primaires de microARN (pri-miARN) (Kawai and Amano 2012). Dans cet article, BRCA1 serait capable d'interagir directement avec de l'ARN branché, et notamment les structures tige-boucle des pri-miARN, alors qu'elle ne lierait que faiblement l'ARN simple brin et les duplex d'ARN non branchés. C'est pourquoi BRCA1 ne lie que très faiblement les miARN matures. Enfin, les auteurs ont montré que BRCA1 interagit avec le complexe DROSHA qui clive les pri-miARN pour former les précurseurs des microARN (pre-miARN) dans le noyau, ainsi qu'avec DDX5, une hélicase à ARN appartenant au complexe DROSHA, Smad3 et p53, qui ont été impliquées dans la maturation des miARN, et DHX9, une autre hélicase à ARN qui pourrait prendre part au processus de maturation des miARN par BRCA1/DROSHA. Cette capacité de BRCA1 à lier directement de l'ARN branché n'a cependant pas été retrouvée dans d'autres laboratoires et de nouvelles investigations doivent être menées afin de déterminer la région de BRCA1 capable de lier ces structures. La même année, deux nouvelles études utilisant les UV apportent des réponses concernant le protéome et les RBP. La fixation ou cross-link par UV crée un pontage covalent entre 2 molécules et ceci permet la fixation de toutes les protéines qui interagissent directement avec un ARN donné. L'utilisation de ce procédé suivie d'une capture des ARN à l'aide d'oligo(dT) permet de récupérer et de purifier les ARN poly(A) et leurs RBPs. L'analyse en spectrométrie de masse de ces protéines permet de les identifier. Ainsi deux études indépendantes ont recherché les RBP présentes dans les cellules 293T (Baltz et al. 2012) et HeLa (Castello et al. 2012). Plus de 800 RBPs ont été identifiées dans ces études. Il est à noter que BRCA1 n'a été retrouvée dans aucune de ces deux études, ainsi que dans les études ultérieures utilisant la technique de cross-link par les UV (Castello et al. 2013).

En étudiant les mécanismes de transcription couplés à la réparation de l'ADN, une équipe a identifié une nouvelle fonction de la protéine BRCA1 : son rôle dans l'épissage des ARN. L'identification d'un nouveau partenaire protéique de BRCA1, BCLAF1, servirait de médiateur à la formation d'un complexe d'épissage BRCA1-ARNm suite à des dommages à l'ADN. Et bien que ce complexe semble favoriser l'épissage de certains ARNm sur lesquels il se fixe en réponse au stress génotoxique appliqué, il n'a cependant pas été montré que BRCA1 lie directement les ARNm en question (Savage et al. 2014). De

la même manière, Hatchi *et al*., ont proposé un modèle selon lequel les protéines BRCA1 et la senataxin (SEXT) interagissent et que le complexe qu'elles forment est recruté dans les régions de terminaison de la transcription notamment au niveau de structures particulières appelées : R-Loop. Une boucle R est une structure d'acide nucléique à trois brins, composée d'un hybride ADN/ARN. Ces « R-loop » peuvent être formées dans diverses circonstances et peuvent être tolérées ou éliminées par des composants cellulaires. Le terme «R-loop» a été donné pour refléter la similitude de ces structures avec les boucles D, le "R" dans ce cas représente l'implication de l'ARN. En l'absence du complexe BRCA1/SEXT les auteurs observent des défauts dans la terminaison de la transcription avec persistance des « R-loop ». Cependant ici encore la liaison directe de BRCA1 avec l'ARN engagé dans la « R-Loop » n'a pu être mise en évidence (Hatchi et al. 2015). La technique d'immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques (RIP) permet de récupérer les ARN et les complexes protéiques associés après cross-link au paraformaldéhyde (PFA) et utilisation d'un anticorps dirigé contre l'une des protéines du complexe. Plusieurs études ont utilisé la technique des RIP avec un anticorps dirigé contre BRCA1 afin d'identifier les partenaires de celle-ci. Il a été suggéré que la protéine BRCA1 liée au complexe RAP80 lie un long ARN non codant (lncRNA) DDSR1, afin de médier la réparation de l'ADN par recombinaison homologue en réponse à l'endommagement à l'ADN (Sharma et al. 2015). Enfin, il a également été montré que des petits ARN (small RNA) induits après cassures double brins de l'ADN, et appelés diRNA, favorisent la réparation de l'ADN par le recrutement de Rad51 et BRCA1 aux sites de cassures. Une fois encore, l'interaction entre la protéine BRCA1 et le diRNA semble indirecte (Q. Wang and Goldstein 2016).

En résumé, bien que la protéine BRCA1 soit souvent associée aux complexes ribonucléoprotéiques contenant certains de ses partenaires protéiques et des ARN, il n'a pas encore pu être mis en évidence à ce jour une interaction directe entre BRCA1 et les ARN. Les études utilisant le cross-link aux UV permettent de déterminer directement les RBP puisqu'il s'agit d'une fixation d'une protéine sur un ARN donné et non la fixation d'un complexe entier (ChIP, RIP). Pour l'heure, on ne peut considérer la protéine BRCA1 comme une RBP au sens strict.

2. BRCA1 et le ribosome

Le rôle des ribosomes dans la traduction est clairement montré depuis les années 1950-1960 (McQuillen et al., 1959; Palade, 1975). Cependant ce n'est que récemment que les techniques de biochimie et biophysique structurales, telle que la cristallographie aux rayons X et la cryo-électromicroscopie permettent l'étude de la structure tridimensionnelle du ribosome. La résolution de la structure du ribosome bactérien a notamment donné lieu au prix Nobel de chimie pour V. Ramakrishnan, A. Steitz et A. Yonath en 2009 ; et la première structure du ribosome eucaryote a été publiée par le groupe de M. Yusupov en 2010 (Ben-Shem et al. 2010). Les ARN polymérases (ARN pol-I, -II et -III) sont des complexes enzymatiques responsables de la transcription des ARN chez les eucaryotes. L'ARN *pol* I permet la synthèse des ARN ribosomiques (tous sauf l'ARNr 5S), l'ARN *pol* II catalyse la formation de l'ARN messager et enfin l'ARN *pol* III est responsables de la synthèse d'ARN courts comme l'ARN de transfert, quelques snARN et l'ARN ribosomique 5S. Depuis la découverte de l'implication de BRCA1 dans le contrôle de la transcription *via* le complexe qu'elle forme avec BRAD1 et l'ARN *pol* II (Kleiman et al. 2005), il a été suggéré que BRCA1 puisse interagir avec les acteurs de la machinerie traductionnelle. Il a été rapporté que BRCA1 pourrait inhiber la transcription *via* l'ARN *pol* III par son association avec les sous-unités Brf du facteur de transcription TFIIIB, vital à l'initiation par l'ARN *pol* III. Cette régulation négative de l'enzyme catalysant la synthèse de l'ARN ribosomique 5S

avait déjà été observée pour d'autres suppresseurs de tumeurs tels que p53, PTEN, RB entre autres (Veras, Rosen, and Schramm 2009). Enfin il a été montré que BRCA1 est associé aux nucléoles (structure nucléaire, centre de la synthèse des ARN ribosomiques (ARNr) et d'assemblage des sous-unités ribosomiques) avec le facteur de réparation des cassures double brins RNF8. Après exposition des cellules à des radiations γ, ils transloquent aux sites de cassures, dans les foci de réparation. Ensemble, BRCA1 et RNF8 pourraient être impliqués dans le contrôle de la synthèse protéique en influant sur la biogenèse du ribosome en réponse aux dommages à l'ADN (Guerra-Rebollo et al. 2012). Il a également été montré très récemment que BRCA1 pourrait réguler la transcription des ARN ribosomiques *via* son association avec la machinerie de l'ARN *pol* I et que son association à ce complexe est plus faible suite à l'endommagement de l'ADN dans les cellules mammaires tumorales humaines. Les auteurs proposent que BRCA1 s'associe à l'ADNr par la machinerie transcriptionnelle de l'ARN *pol* I, régulant sa stabilité et la formation du complexe au cours de l'initiation et / ou de l'allongement en réponse aux lésions de l'ADN (Johnston et al. 2016). Ainsi la protéine BRCA1 pourrait influer sur l'expression des ribosomes *via* son implication dans la régulation de la transcription des ARN polymérases.

C. Régulations spécifiques de l'initiation de la traduction par des éléments ARN en cis et des facteurs protéiques en trans

Chez les eucaryotes, l'initiation est la phase la plus complexe du processus de traduction et est régulée selon deux grands mécanismes. Ils sont de deux types : ceux qui influent sur l'activité et la disponibilité des facteurs d'initiation de la traduction et affectent potentiellement tous les évènements d'initiation faisant intervenir le mécanisme de scanning, et ceux qui utilisent des éléments de séquence ou de structure internes aux ARNm via la liaison de protéines ou de miARNs et régulent ainsi spécifiquement la traduction de certains ARNm ou sous-ensembles d'ARNm.

1. Les motifs TOP

Les motifs TOP (Terminal OligoPyrimidine tract) sont présents dans la 5'UTR des ARNm codant des protéines qui interviennent dans la machinerie traductionnelles et qui sont régulées par la croissance cellulaire. Leur traduction est favorisée dans des conditions cellulaires prolifératives tandis qu'elle est fortement inhibée dans des conditions de croissance défavorables. Ainsi, suivant la stimulation de la cellule par des facteurs de croissance par exemple, les ARNm contenant un motif TOP sont presque entièrement associés aux polysomes, alors que dans des conditions de stress cellulaire qui sont accompagnées d'un arrêt de la croissance (privation en sérum, apoptose), ces ARNm sont relocalisés dans la fraction subpolysomale (Hamilton et al. 2006). Le motif TOP est caractérisé par la première base après la coiffe qui est un résidu cytosine suivi d'un alignement ininterrompu de 4 à 14 pyrimidines. Les ARNm contenant un motif TOP sont ceux codant pour les protéines ribosomales (toutes les protéines ribosomales analysées jusqu'ici sont codées par des ARNm à motif TOP), tous les facteurs d'élongation, PABP1, et certaines sous-unités d'eIF3 (Iadevaia et al. 2008). Pour l'heure on ne connait pas encore les mécanismes par lesquels les ARNm contenant un motif TOP sont régulés de façon coordonnée au niveau traductionnel. Il a été proposé que la voie mTOR pourrait réguler les ARNm à motif TOP *via* mTORC1, 4E-BPs, eIF4G comme effecteurs en aval (Thoreen et al. 2012). Selon cette étude, les ARNm à motif TOP auraient spécifiquement besoin qu'eIF4G intervienne dans l'ancrage d'eIF4E à la coiffe, ce qui serait moins nécessaire pour d'autres ARNm. La phosphorylation des 4E-BPs

par mTORC1 permettrait ainsi l'interaction d'eIF4E avec eIF4G et donc la stimulation de la traduction de ces ARNm. Il a également été suggéré que des facteurs protéiques agissant en *trans* pourraient contrôler l'association des ARNm à motif TOP avec les ribosomes, que ce soit positivement ou négativement (Meyuhas 2000). Ainsi des facteurs solubles capables de se lier aux motifs TOP des ARNm et de réprimer leur traduction ont été caractérisés : la protéine de liaison aux polypyrimidines PTB (Polypyrimidine Tract Binding protein) (Garcia-Blanco, Jamison, and Sharp 1989) qui a déjà été impliquée dans la régulation de l'initiation de la traduction des ARNm contenant un IRES dans leur 5'UTR, les protéines putatives de liaison à l'ARN CNBP (Cellular Nucleic acid Binding Protein) (Pellizzoni et al. 1998), la protéine ribosomale humain S6 AUF1 qui pourrait participer la régulation négative de la traduction des ARNm à motif TOP lors d'un traitement à la rapamycine (Kakegawa et al. 2007) et TIA-1 et TIAR qui inhiberaient la traduction des ARNm à motif TOP en se liant à ce motif lors d'une carence en acides aminés et en provoquant leur accumulation dans les granules de stress (Damgaard and Lykke-Andersen 2011). Enfin, il a été montré que le microARN 10a se fixe à une séquence en aval du motif TOP des ARNm codant pour des protéines ribosomales régulant ainsi positivement leur traduction (Ørom, Nielsen, and Lund 2008).

2. Les uORF

Des études bio-informatiques ont révélé que 35 à 50% des gènes de mammifères codent des ARNm qui contiennent au moins une petite séquence codante en amont de la séquence codante principale, ou uORF (upstream Open Reading Frame) (Calvo, Pagliarini, and Mootha 2009; Resch et al. 2009). Lors du scanning, la traduction de la séquence principale n'a lieu que si, après avoir terminé la traduction de l'uORF, le ribosome ré-initie la traduction en aval au codon initiateur de la séquence principale. Dans ce cas, la sous-unité 40S du ribosome reste connectée à l'ARNm après la terminaison et continue à scanner (Meijer and Thomas 2002). Il s'agit d'un mécanisme très inefficace car l'efficacité de ré-initiation est faible en présence soit de longs uORF soit d'uORF séparés par de courtes distances, le complexe ternaire n'ayant alors pas le temps de se reformer dans ce dernier cas (Luukkonen, Tan, and Schwartz 1995). Cependant il a été rapporté que les uORF peuvent stimuler la traduction de certains ARNm dans des conditions de stress cellulaire, conditions dans lesquelles la formation de nouveaux complexes ternaires est restreinte par la phosphorylation d'eIF2α (Jackson et al., 2010). L'exemple type de la stimulation de la traduction d'un ARNm par ses uORF est la levée de la répression de la traduction de l'ARNm de GCN4 (qui possède quatre uORF) chez la levure en conditions de carence en acides aminés (Hinnebusch, 2005). Cela permet aux cellules de rapidement répondre à la privation en acides aminés en initiant un programme d'expression de gènes adapté : la protéine GCN4 est un activateur transcriptionnel d'une trentaine de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés. De la même façon chez les mamifères ce mécanisme participe à la réponse UPR (Unfolded Protein Response). Lors d'un stress du réticulum endoplasmique, la kinase PERK est activée, phosphoryle eIF2α, et permet de diminuer la disponibilité en complexes ternaires. Ainsi, la traduction de la plupart des ARNm est inhibée, mais celle d'ATF4, une protéine qui active la transcription des gènes de la voie UPR, est au contraire stimulée (Harding et al. 2000). Enfin, d'autres mécanismes ont été avancés pour la régulation de la traduction par les uORF. Certains de ces mécanismes pourraient influer sur la stabilité de l'ARNm et notamment provoquer sa dégradation par la voie NMD (Gaba, Jacobson, and Sachs 2005) (Mocquet, Durand, and Jalinot 2015). De façon générale, les uORF semblent donc constituer un élément de régulation très répandu qui, par des systèmes de contrôles plus ou moins complexes, permettent une adaptation rapide à différents contextes cellulaires.

3. Les IRES

Le mécanisme dit de scanning dépendant de la coiffe a longtemps été considéré comme l'unique mécanisme permettant l'initiation de la traduction des ARNm eucaryotes. Mais l'étude de l'expression des gènes viraux à la fin des années 1980 a conduit à la découverte d'un mécanisme alternatif d'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes qui permet de recruter directement la sous-unité 40S à proximité du codon d'initiation indépendamment de la coiffe et du scanning (Komar and Hatzoglou 2011). Ce mécanisme est appelé « site d'entrée interne du ribosome » ou IRES (Internal Ribosome Entry Site), et dépend de la présence particulière d'une structure en 5' qui a originellement été découverte dans le génome ARN de deux picornavirus : le poliovirus (Pelletier and Sonenberg 1988) et le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV : Encephalomyocarditis Virus) (Jang et al. 1988). Les ARN de ces virus sont naturellement non coiffés dans le cytoplasme des cellules hôtes et sont pourtant traduits efficacement. En effet lors d'une infection virale des cellules, la traduction des ARNm coiffés de la cellule hôte est inhibée en raison du clivage de certains facteurs canoniques d'initiation de la traduction (dont eIF4G) par les protéases virales (Ehrenfeld, 1982). Cela confère un avantage sélectif aux ARNm viraux qui peuvent alors détourner les éléments de la machinerie traductionnelle de la cellule hôte dont ils ont besoin pour leur propre traduction (Ali et al. 2001).

L'analyse des IRES viraux a montré qu'ils se trouvent généralement dans de longues 5'UTR formant des structures secondaires et tertiaires complexes qui sont probablement à l'origine d'interactions entre les IRES et les éléments de la machinerie traductionnelle canonique, permettant l'initiation indépendante de la coiffe (Spriggs et al. 2008). La traduction des ARNm viraux nécessite généralement moins de facteurs canoniques d'initiation que la traduction des ARNm cellulaires coiffés. Il existe même le cas du virus CrPV (Cricket Paralysis Virus), dont la traduction peut avoir lieu sans qu'aucun de ces facteurs ne soit impliqué puisque son IRES interagit directement avec la sous-unité 40S du ribosome (Schuler et al. 2006). En plus de certains facteurs canoniques d'initiation de la traduction, certains IRES nécessitent l'intervention de facteurs non canoniques appelés ITAF (IRES trans-acting factors). Les ITAF sont des protéines cellulaires de liaison aux ARN impliquées dans un certain nombre d'autres fonctions cellulaires, mais qui ne sont en revanche pas impliquées dans l'initiation canonique de la traduction (Fitzgerald and Semler 2009). Certaines ITAF sont maintenant connues comme les protéines de la famille hnRNP (heterogenous nuclear Ribonucleoprotein), la protéine PTB (ou hnRNP I). Avec l'émergence des études sur le protéome et en particulier sur les protéines capables de lier l'ARN (RBP), de plus en plus de RBP sont rapportés comme étant des ITAF. Bien qu'initialement découverts dans les ARN viraux, des éléments IRES ont également pu être identifiés dans certains ARNm cellulaires. Il a été proposé un modèle selon lequel la traduction de certains ARNm est maintenue grâce à la présence d'IRES dans leur 5'UTR dans des conditions où la traduction est globalement inhibée, comme lors de stress divers, de l'apoptose ou de la mitose. Ce modèle permettrait d'expliquer comment les protéines impliquées dans la réponse à ces stress peuvent continuer à être synthétisées. Mais si l'existence des IRES viraux a été bien décrite et est couramment acceptée, celle des IRES cellulaires a été et reste encore largement controversée malgré l'identification de nouveaux IRES cellulaires. En général leur identification se fait par l'utilisation d'ARNm rapporteurs bicistroniques qui contiennent deux ORFs codant pour deux protéines séparés par une région intercistronique dans laquelle est cloné l'IRES à tester. Ainsi, la traduction de la deuxième protéine n'est possible que si la séquence insérée possède effectivement une activité IRES. Mais cette approche comporte de nombreux biais qui peuvent conduire à de faux positifs (présence d'un site d'épissage, ré initiation de la traduction par reprise du

scanning après la traduction du premier ORF etc.). De plus, parce que l'efficacité de la traduction des IRES est faible, la significativité biologique de ces éléments a longtemps été discutée (Kozak 2001; Schneider et al., 2001; Gilbert 2010; Jackson, 2013) (Terenin et al. 2016). En dépit de cela, il est maintenant admis qu'une traduction dépendante des IRES puisse avoir lieu pour certains ARNm cellulaires. Les dernières études utilisent de façon plus systématique des contrôles expérimentaux pour se prémunir des biais précédemment décrits et cela a notamment permis de confirmer la présence d'un IRES dans la 5'UTR de p27kip1 (Jiang et al. 2007).

Lors de stress cellulaires, pendant l'apoptose ou encore pendant la mitose, la traduction dépendante de la coiffe est inhibée tandis que 3 à 5% des ARNm cellulaires restent associés aux polysomes, c'est-à-dire qu'ils demeurent activement traduits (Spriggs et al. 2008; J. D. Thomas and Johannes 2007; Qin and Sarnow 2004). De façon intéressante, des IRES ont été identifiés dans la 5'UTR de beaucoup de ces ARNm, alors que d'autres étaient déjà connus comme possédant un IRES. La plupart de ces ARNm qui continuent d'être activement traduits en situation de stress cellulaire, codent pour des protéines impliquées dans les décisions du devenir de la cellule telles que des protéines pro- ou anti-apoptotiques, des facteurs de croissance, des facteurs de transcription, des protéines du cycle cellulaire (Stoneley and Willis 2004). Il est important de noter que tous les IRES ne sont pas nécessairement actifs dans chaque condition induisant la diminution de la traduction dépendante de la coiffe. Ainsi, l'ARNm de c-myc est associé aux polysomes durant l'apoptose (Bushell et al. 2006), mais pas durant la mitose (Qin and Sarnow 2004). De la même façon, l'activité d'un IRES peut beaucoup varier entre différentes lignées cellulaires. Par exemple, l'IRES de c-myc est vingt fois plus actif dans les cellules HeLa que dans les cellules MCF7 (Stoneley et al. 2000). Cela est attribué à l'intervention d'ITAF dont l'activité sur les IRES varie en fonction de leur disponibilité, de leur modification post-traductionnelle ou encore de leur localisation subcellulaire. Certaines ITAF seraient communes à plusieurs IRES et pourraient entrer en compétition. Parmi ces ITAF on retrouve les protéines de la famille hnRNP (dont PTB) qui sont très abondantes, majoritairement nucléaires mais capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. En plus de leur rôle dans la régulation de l'activité des IRES, elles interviennent à différentes étapes du métabolisme de l'ARNm (épissage, maturation de l'extrémité 3', export nucléaire, localisation subcellulaire de l'ARNm). Il y a également les protéines DAP5, un membre de la famille eIF4G, homologue de la partie C-terminale d'eIF4G (pouvant se lier à eIF4A, eIF3 mais pas eIF4E ni PABP1 (L Marash and Kimchi 2005). La forme clivée DAP5/p86 régulerait l'activité des IRES de c-myc, Apaf-1, XIAP, HIAP2 et de DAP5 lui-même, sa forme entière ayant, elle, été impliquée dans la traduction des IRES de Bcl2, CDK1 et p53 (Marash et al. 2008) (Weingarten-Gabbay et al. 2013). De la même façon plusieurs ITAF peuvent agir sur un même IRES (par exemple PTB, PCBP2, DAP5, etc. ont toutes été identifiées comme des ITAF stimulant l'activité de l'IRES de c-myc) et ainsi permettre une activation différentielle en fonctions des conditions cellulaires, chaque IRES étant activé par un stress ou une condition cellulaire spécifique. Le mode d'action de ces différents ITAF est loin d'être compris et peut avoir un effet positif comme négatif sur l'IRES. La protéine DAP5, par son homologie avec eIF4G, pourrait aider à recruter certains facteurs canoniques d'initiation, les IRES cellulaires ayant recours à certains de ces facteurs tout comme une partie des IRES viraux. Il a également été proposé que les ITAF puissent agir comme des protéines chaperonnes en remodelant la structure ARN des IRES pour faciliter le recrutement d'autres ITAF ou de la sous-unité 40S du ribosome. Il a par exemple été montré que l'IRES de l'ARNm d'Apaf-1, une protéine pro-apoptotique, est tout d'abord lié par l'ITAF Unr qui remodèle la structure secondaire de l'IRES et révèle ainsi un site de liaison pour nPTB (neural PTB). La fixation de PTB au niveau de l'IRES facilite ensuite le recrutement

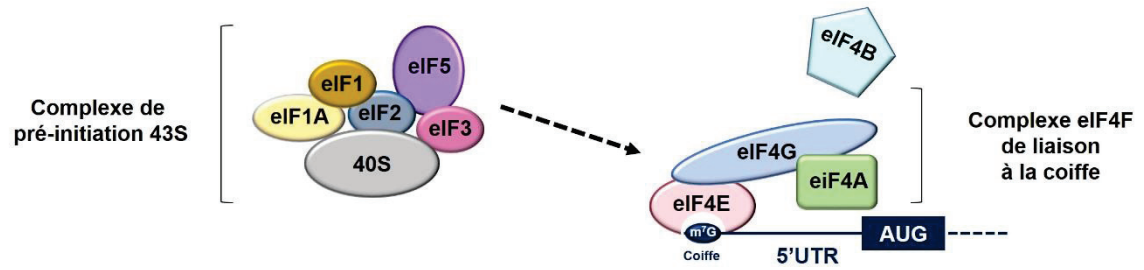
de la sous-unité 40S du ribosome à nouveau grâce à des changements structuraux (Mitchell et al. 2003). De plus, il a été montré par plusieurs études que la localisation subcellulaire des ITAF est importante pour l'activité des IRES (Lewis & Holcik 2008). Deux mécanismes ont pu être proposés dans la littérature, le premier consiste en l'association des ITAF à leurs IRES cibles dans le noyau et leur séquestration dans ce compartiment, empêchant leur association avec la machinerie traductionnelle. Suite à un stress cellulaire diminuant la traduction dépendante de la coiffe et nécessitant la traduction de ces ARNm, les ITAF associés à leurs ARNm pourraient transloquer dans le cytoplasme, permettant ainsi l'initiation de leur traduction. Dans le deuxième mécanisme, les ITAF sont des protéines majoritairement nucléaires et donc séparés de leurs ARNm cibles se trouvant eux dans le cytoplasme et, à nouveau suite à un stress ou suivant la réception de signaux appropriés, transloqueraient dans le cytoplasme où ils pourraient s'associer à leurs ARNm cibles pour permettre leur traduction. Enfin, dans certains cas, l'activité des ITAF pourrait dépendre de leurs modifications post-traductionnelles influant sur leur localisation ou leur affinité de liaison à leurs IRES cible (Komar & Hatzoglou 2011).

La liste des ARNm possédant un IRES ne cesse donc d'augmenter et, en se basant sur le pourcentage d'ARNm restant associés aux polysomes suite à différents stress, donc activement traduits, il a été estimé qu'environ 10% des ARNm humains pourraient contenir une séquence IRES (Spriggs et al. 2008)]. La base de données IRESite (http://www.iresite.org) a pour objectif de présenter les données expérimentales supportant l'existence de chaque IRES répertorié. A ce jour, 115 IRES cellulaires ont été expérimentalement validés (dernier bilan en 2009). En revanche, le fait que la traduction dépendante de ces IRES puisse à elle seule expliquer le maintien de la traduction de certains ARNm dans des conditions de stress, ou que ce mécanisme soit totalement indépendant de la coiffe sont des hypothèses encore largement discutées (Gilbert 2010; Richard J. Jackson 2013) (Figure 13).

4. Régulation par les miR

Tout comme l'extrémité 5', l'extrémité 3' de l'ARNm contribue à la régulation de sa traduction. Elle est le site privilégié d'appariement par complémentarité partielle des bases de petits ARN régulateurs (d'environ 21 nucléotides) appelés micro-ARN (Fabian & Sonenberg, 2012). On estime qu'environ la moitié du génome humain est contrôlée par les miARN (Hinnebusch, 2009). Les miARN inhibent la traduction des ARNm en permettant le recrutement et la formation du complexe miRISC (miRNA-Induced Silencing Complex) sur l'ARNm cible. Ce complexe est composé chez les mammifères de l'une des quatre protéines Argonautes (AGO1-4) et de la protéine GW182 (Glycine-Tryptophane repeatcontaining protein 182) qui interagit avec les Argonautes et pour laquelle il existe trois paralogues chez l'homme, TNRC (trinucleotide repeat-containing protein) 6A, 6B et 6C (Fabian and Sonenberg 2012). Les mécanismes de la répression de la traduction par les miARN sont loin d'être élucidés. Au cours des nombreuses études in vitro et in vivo qui se sont intéressées au problème il a été montré que miRISC pouvait effectuer sa fonction répressive soit en inhibant la traduction en elle-même, au niveau de l'initiation comme à des étapes post-initiation, soit par déadénylation, décoiffage et dégradation de l'ARNm cible (S. Hinnebusch 2009). La façon dont miRISC provoque ces évènements, l'ordre dans lequel ils ont lieu et les partenaires protéiques impliqués restent sujets à controverse. Il a été suggéré que GW182 interagit directement avec PABP1 *via* un motif PAM2 situé dans la partie C-terminale de GW182 et le domaine PABC de PABP1 et que cette interaction permettrait l'inhibition de la traduction des ARNm en inhibant la circularisation de l'ARNm ainsi qu'en interférant dans la liaison de PABP1 avec eIF4G (Fabian et al. 2009) et les PAIPs (Tritschler et al., 2010). Plusieurs équipes ont utilisé des études à l'échelle du génome pour déterminer l'effet de l'action des miARN sur les niveaux

A.



B.

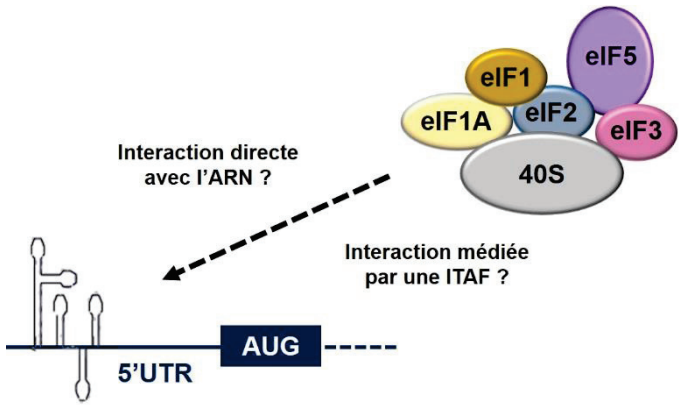


Figure 13 : Recrutement du complexe de pré-initiation 43S dans les mécanismes de traduction coiffe-dépendant et coiffe-indépendant de l'initiation de la traduction

A. Dans la traduction coiffe-dépendante, le complexe eIF4F reconnait et se fixe sur la coiffe située en 5'UTR de l'ARNm. Ensuite, le complexe 43S se fixe à l'ARN pour le scanner jusqu'à trouver un codon d'initiation AUG, favorable à l'initiation de la traduction. Après l'hydrolyse du GTP, la sous-unité 60S rejoint le complexe pour former le ribosome compétent pour les étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison de la synthèse protéique.

B. Dans le mécanisme coiffe-indépendant de l'initiation de la traduction, le complexe 43S se lie à des structures particulières de type IRES situées dans la 5'UTR de l'ARNm, de façon dépendante ou indépendante de facteurs canoniques et non-canoniques (ITAF) de la traduction afin de faciliter l'initiation au codon AUG approprié.

d'ARNm et de protéines (Baek et al. 2008). Ces études ont montré que la régulation des miR s'effectue à deux niveaux, aussi bien sur la répression de la traduction des ARNm que sur leur stabilité (Guo et al. 2010). Plus récemment, le modèle qui semble émerger, est que les miARN agissent en premier lieu en inhibant la traduction d'une façon indépendante de la déadénylation et, seulement ensuite, causant la déadénylation, l'excision de la coiffe et la dégradation de l'ARNm cible (Fabian & Sonenberg, 2012).

D. Régulation de la traduction dans un contexte pathologique : Le Cancer

La traduction est la dernière étape de l'expression génique et pendant longtemps son importance dans la tumorigenèse n'a pas été explorée en profondeur. Toutefois, à l'heure actuelle il est bien établi que le contrôle de la traduction est un élément important dans le développement et la progression des cancers, impliquant aussi bien la dérégulation de la synthèse protéique globale que la dérégulation de la traduction d'ARNm spécifiques qui stimulent la survie des cellules tumorales, l'angiogenèse, la transformation, l'invasion et les métastases. Dans cette partie, je décrirai les différents éléments de la machinerie traductionnelle ou voies de contrôle de la traduction qui sont dérégulés plus particulièrement dans le cancer du sein en insistant sur la perturbation de l'initiation de la traduction (Figure 14).

1. Altérations de la machinerie traductionnelle dans le cancer

1.1 Altération de l'expression des facteurs d'initiation de la traduction (eIFs)

Il a été montré qu'au cours du développement tumoral, l'expression des gènes qui codent pour les facteurs d'initiation de la traduction est soit augmentée soit diminuée dans les tumeurs humaines (Ruggero 2013). Ainsi, les composants du complexe eIF4F (eIF4E, eIF4G et eIF4A) sont globalement surexprimés dans le cancer. Dans le cancer du sein plus particulièrement, il a été observé un niveau d'expression d'eIF4E élevé correspondant à une amplification du gène (Kerekatte et al. 1995). La surexpression d'eIF4E semble être une caractéristique commune à tous les carcinomes du sein, qui a lieu dans un très nombre de cas dès les premiers stades de la maladie, et qui peut être corrélée à un mauvais pronostic et un plus grand risque de rechute. Il est à noter que la surexpression d'eIF4E a aussi été observée dans d'autres types de cancers comme le cancer de l'ovaire et que cette surexpression correspond également à un mauvais pronostic (De Benedetti and Graff 2004). La protéine eIF4G est également surexprimée dans la plupart des cancers du sein inflammatoires, une forme rare mais particulièrement grave de la maladie qui peut en partie être expliquée par les conséquences de la surexpression d'eIF4G sur la synthèse protéique (Silvera et al. 2009). Le rôle d'eIF4A dans le développement du cancer a été encore peu étudié, mais on observe une surexpression de cette protéine dans certains carcinomes hépatocellulaires primaires (Shuda et al. 2000) et dans des lignées cellulaires issues de mélanomes (Eberle, Krasagakis, and Orfanos 1997). On observe également une surexpression de la sous-unité régulatrice d'eIF2, eIF2α dans certaines tumeurs hématologiques et solides (Ruggero, 2013) et cette surexpression a été associée à une agressivité accrue de cancers du cerveau (Tejada et al. 2009) ou de lymphomes (Wang S et al. 1999). Pour finir, il a été rapporté une dérégulation de l'expression de plusieurs sous-unités du facteur d'initiation eIF3 dans différents cancers (Dong and Zhang 2006). Ainsi, la sous-unité eIF3h est amplifiée en même temps que l'oncogène Myc dans le cancer du sein et de la prostate (Nupponen et al. 1999). Les sous-unités eIF3a, b et i sont aussi surexprimées dans les cancers du sein (Dong & Zhang 2006). et de manière générale,

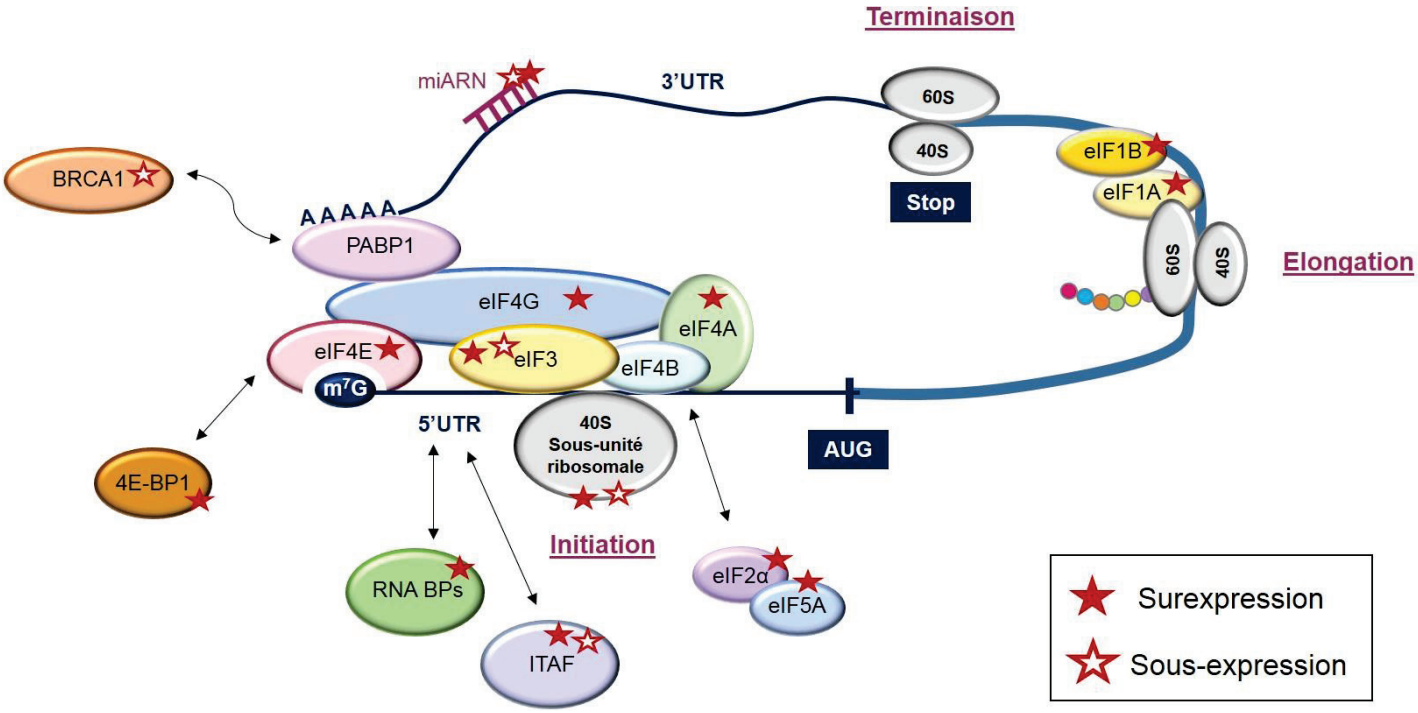


Figure 14 : Les éléments de la machinerie traductionnelle, et les éléments régulateurs sont altérés dans le cancer. Sur ce schéma, les éléments de la machinerie traductionnelle qui sont altérés dans le cancer, avec des conséquences probables sur la tumorigenèse, sont marqués d'une étoile. Il peut être observé soit une surexpression et/ou mutation/amplification du facteur dans les tumeurs humaines, soit une sous-expression et/ou mutation/délétion du facteur. (Figure adaptée de Bilanges B & Stokoe D, Oncogene, 2007)

les sous-unités d'eIF3 sont plutôt surexprimées dans l'ensemble des cancers pour lesquels leur expression a été analysée (Ruggero, 2013). A l'inverse, la sous-unité eIF3e voit son expression diminuée dans les cancers du sein et du poumon en association avec une perte d'hétérozygotie. De la même façon, dans plusieurs cancers, l'expression d'eIF3f est diminuée (Shi et al. 2006). D'ailleurs, la surexpression des sous-unités eIF3e et eIF3f ne transforme pas les cellules mais inhibe au contraire la synthèse protéique, la prolifération cellulaire et induit l'apoptose, suggérant qu'eIF3e et eIF3f pourraient fonctionner comme des suppresseurs de tumeur au niveau traductionnel. On observe également la dérégulation d'autres facteurs d'initiation de la traduction dans le cancer, ainsi que certains facteurs d'élongation ou encore des ITAF (Ruggero, 2013).

1.2 Altérations des ribosomes dans le cancer

Une des caractéristiques principales des cellules cancéreuses est leur statut hyperprolifératif. Cela nécessite une forte activité de synthèse protéique et donc la production d'une grande quantité de ribosomes. L'importance de la biogenèse du ribosome dans le processus de développement tumoral a été remarqué voilà plus de cent ans lorsque les biologistes ont observé que les cellules transformées ont des nucléoles plus volumineux (Silvera et al., 2010). Le nucléole étant le siège de la synthèse des ARN ribosomiques et de l'assemblage des ribosomes, un lien a été établi entre une augmentation de la taille et de l'activité des nucléoles et le degré de transformation maligne. De plus, un lien plus direct entre ribosome et cancer a été découvert avec l'identification de mutations dans les composants ribosomaux liés à la tumorigenèse et grâce à l'identification de pathologies génétiques liées aux ribosomes et prédisposant au cancer (Ruggero et al., 2013). Il pourrait y avoir une spécificité cellulaire et tissulaire associée à ces pathologies et donc l'idée selon laquelle la composition et l'activité des ribosomes est identique dans toutes les cellules et tous les tissus de l'organisme commence à être remise en cause. Le ribosome est maintenant envisagé comme un élément actif dans la régulation de la machinerie traductionnelle plutôt que uniquement comme une «usine » à produire des protéines.
Un exemple particulièrement bien décrit de pathologie ribosomique associée à une prédisposition au cancer est la dyskératose congénitale liée à l'X (X-DC : Xlinked Dyskeratosis Congenita). La X-DC est la forme la plus commune et grave de dyskératose congénitale et est due à des mutations du gène DKC1 codant pour la dyskérine. La dyskérine est une enzyme conservée au cours de l'évolution responsable de la pseudouridylation d'environ 100 résidus uridine spécifiques dans l'ARN ribosomique (Jingwei Ni, Amy L. Tien, 1997; Lafontaine et al., 1998). Le rôle de ces modifications de l'ARN ribosomique dans le contrôle de la traduction est resté longtemps mal compris. Il a récemment été montré que la pseudouridylation de l'ARN ribosomique joue un rôle dans le maintien du cadre de lecture en plus de son rôle dans la traduction dépendante des IRES (Jack et al. 2011). Il a été montré que la méthylation de l'ARN ribosomique est elle aussi impliquée dans la traduction dépendante des IRES d'ARNm cellulaires spécifiques (Basu et al. 2011). Enfin, une étude conduite au laboratoire a mis en évidence l'importance de la méthylation sur la fidélité de traduction et plus particulièrement sur la traduction IRES-dépendante. Ces résultats montrent que l'inactivation de p53 diminue la fidélité de traduction *via* un mécanisme dépendant de la fibrillarine (FBL), une des méthyl-transférase des ARNr (Marcel et al., 2013). Ces études impliquent donc les modifications post-transcriptionnelles de l'ARN ribosomique dans la régulation de certains modes de traduction et certains ARNm spécifiques. Reste à déterminer si la traduction d'ARNm contenant d'autres éléments régulateurs que les IRES peut être affectée par les modifications post-transcriptionnelles de l'ARN ribosomique, quelles sont les voies régulant ces

modifications post-transcriptionnelles ou encore, dans certains cas, par quels mécanismes ces modifications affectent la traduction d'ARNm spécifiques.
Une autre maladie associée aux ribosomes est l'anémie de Blackfan-Diamond dans laquelle des mutations dans différentes protéines du ribosome provoquent des dysfonctionnements de la moelle osseuse et un risque accru d'apparitions de leucémies et de tumeurs solides (Lipton, 2011). Bien que le lien entre les mutations des protéines ribosomiques et le risque accru de cancer dans cette maladie ne soit pas encore bien compris, il est à noter que la surexpression de certaines protéines ribosomiques a été associée avec les cancers (Ruggero & Pandolfi, 2003)(Lai & Xu, 2007) .

La hausse de la prolifération et de la croissance est également liée à une sur-activation des voies mitogéniques et des voies favorisant la croissance cellulaire dans les cancers, notamment via l'altération de l'expression et/ou de l'activité d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur. Et ce sont ces altérations qui conduisent à une augmentation de la production de ribosomes (Ruggero & Pandolfi, 2003). Il a ainsi été rapporté une sur-activation de la voie PI3K-Akt-mTOR induisant une sur-activation de mTOR (Pópulo et al., 2012). D'autre part, les protéines des familles Ras et Raf sont des oncogènes reconnus et sont fréquemment mutées dans les cancers (Zebisch & Troppmair 2006)(Garnett & Marais 2004; Mccubrey et al. 2007), induisant la signalisation de ERK et sur-activant la transcription par l'ARN Pol I. Cette voie est également activée par les récepteurs à l'EGF « Epidermal Growth Factor », de la famille des récepteur kinase de tyrosines) qui peuvent être mutés dans les cancers. A ces données s'ajoute la surexpression de CK2 observée dans plusieurs cancers (Ruzzene et al. 2010) qui induit directement et indirectement la biogenèse des ribosomes.
Comme nous l'avons vu, le proto-oncogène c-Myc est très fréquemment surexprimé ou sur-activé dans les cancers, et induit par conséquent une augmentation de la biogenèse des ribosomes (Oskarsson & Trumpp 2005). La sur-expression et la sur-activation de c-Myc conduirait également à l'altération de la composition des ribosomes, suggérant que son effet transformant intervient aussi dans la biogenèse de ribosomes (Barna M *et al*., 2008).
La protéine Netrine-1 est un ligand de récepteurs à dépendance, secrété en conditions normales, qui favorise la survie cellulaire. La Nétrine-1 est fréquemment surexprimée dans les cancers (Delcros and Mehlen 2013). Dans une étude conduite en collaboration avec notre équipe, il a été montré qu'une isoforme tronquée de Nétrine-1 (ΔN-Nétrine-1) est exprimée par certaines cellules cancéreuses, et est localisée dans les nucléoles. Cette isoforme permet le recrutement du complexe d'initiation de la transcription des ADNr et une augmentation de la prolifération cellulaire (Delloye-Bourgeois et al. 2012). Ces résultats suggèrent que la prolifération induite par la Nétrine-1 dans les cellules cancéreuses dépendrait, au moins en partie, d'une augmentation de la synthèse des ARNr.
C'est ainsi que l'ensemble de ces données montrent que la biogenèse des ribosomes est augmentée dans les cancers, et que cette altération a lieu à plusieurs niveaux. De façon générale, les mutations dans des facteurs importants dans la biogenèse des ribosomes, ou dans les composants du ribosome lui-même, pourraient conduire à la formation de ribosomes spécifiques dont l'activité serait altérée avec des conséquences sur la régulation de la traduction d'ARNm spécifiques et la tumorigenèse.

2. Suppresseurs de tumeurs et régulation traductionnelle

Le surpresseur de tumeur BRCA1 est impliqué dans la régulation de la traduction par son interaction avec la protéine de liaison à la queue poly(A) des ARNm, PABP1. Il semble qu'elle régule spécifiquement la traduction de certains ARNm. Or, il apparait que plusieurs autres suppresseurs de

tumeurs puissent être impliqués dans la régulation de la traduction et ce, à différents niveaux. Quels sont ces surpresseurs de tumeurs impliqués dans la traduction ? Et à quel(s) niveau(x) sont-ils impliqués ?

Les résultats issus de plusieurs études, désignent 13 gènes suppresseurs de tumeurs comme étant impliqués dans la tumorigenèse mammaire (ou HBOC pour « Human Breast and Ovarian Cancer »). Parmi eux, les gènes codant les protéines majeures de prédisposition *BRCA1* et *BRCA2* mais également *ATM, TP53, PTEN, STK11* (Vogelstein et al. 2013)(Nielsen, van Overeem Hansen, and Sørensen 2016). Il est intéressant de noter qu'hormis p53, aucune de ces protéines n'a été à ce jour identifiée comme une RBP ou un ITAF par les études à large échelle menées récemment (Castello et al. 2012; Baltz et al. 2012)(Pichon et al. 2012). Mais de façon plus générale, certains suppresseurs de tumeurs associés à certains cancers sont impliqués dans la traduction. En voici quelques exemples.

Dans les cancers, les mutations ou pertes d'hétérozygotie du gène suppresseur de tumeur *TP53* aboutissent à la perte de l'activité de ce dernier. Ainsi, les cellules tumorales ayant perdu l'activité de la protéine p53 perdent également la répression de la synthèse des ARNr, aboutissant à une sur-production de ribosomes. De plus, notre équipe a montré que la levée de la répression de la protéine fibrillarine par P53 induit une régulation traductionnelle différentielle de gènes clés dans la survie et le développement tumoral. Ces travaux démontrent pour la première fois qu'un changement de modifications post-transcriptionnelles des ARNr, altère qualitativement la traduction, et participe au développement tumoral (Marcel et al. 2013)(Marcel, et al., 2015). L'analyse du génome (Genome-wide) a montré que p53 régule l'expression de plusieurs RBP, et des données montrent que p53 agit comme une RBP elle-même. Des analyses biochimiques ont démontré que p53 lie directement l'ARN avec une affinité supérieure à la liaison à l'ADN. Par ailleurs, une partie de la protéine p53 cytoplasmique est associée à la fraction polysomique. Ces données soutiennent un rôle de P53 dans le contrôle direct de l'ARN spécifique comme illustré par les exemples des ARNm FGF2 et CDK4 dont p53 serait un ITAF (Kondo et al. 2006) (Marcel et al., 2015).
Enfin, la protéine p53 régule l'expression des ARN *pol* I et ARN *pol* III et pourrait interagir avec la protéine PABP1 (Vogelstein et al. 2013)(Source internet : Uniprot).

Le gène suppresseur de tumeur pRb est muté dans de nombreux cancers (Di Fiore et al. 2013). Ces mutations empêchent l'inhibition d'UBF et sont responsables d'une élévation de la biogenèse de ribosomes dans les cellules tumorales. Un autre gène suppresseur de tumeur, ARF, est fréquemment retrouvé muté ou délété dans les cancers. Ainsi, ARF n'exerce pas son activité de répression de la biogenèse des ribosomes ce qui induit une augmentation de celle-ci (Forys JT et al., 2014).
Le suppresseur de tumeur PTEN induit l'inhibition de mTOR et lorsque des mutations ou délétions récurrentes affectent ce gène, cela contribue à induire fortement l'activité de mTOR dans les cellules tumorales (Vogelstein et al. 2013). PTEN est le régulateur négatif le plus important de la voie de signalisation PI3K. PTEN régule la prolifération et la survie cellulaire, et joue également un rôle dans la régulation de la stabilité génomique, la migration cellulaire, et le microenvironnement des tumeurs. Des changements dans les niveaux d'expression de la protéine PTEN, dans sa localisation et dans son activité enzymatique par divers mécanismes moléculaires peuvent générer des syndromes héréditaires tel que le syndrome de Cowden, et des cancers sporadiques (Milella et al. 2015).
Il semble donc que plusieurs suppresseurs de tumeurs soient impliqués dans la tumorigenèse mammaire et que certains d'entre eux interviennent également dans la régulation de la traduction à

différents niveaux. Cependant en dehors de p53, aucune des protéines codées par ces gènes, ni même la protéine BRCA1, ne semble pouvoir interagir directement au niveau des ARNm.

Conclusion du Troisième Chapitre

La traduction est un processus cellulaire très régulé. Tout changement dans l'expression ou les voies de régulation des composants de la machinerie traductionnelle est susceptible de conduire à la transformation cellulaire. Dans ce contexte, l'implication de *BRCA1*, un suppresseur de tumeur, dans la régulation de la traduction, est énigmatique et pose la question du rôle de cette régulation dans la protection vis-à-vis de la tumorigenèse.

Résumé de Mon Projet de Thèse

A. Approche scientifique

Comme nous venons de le voir, le cancer du sein est une maladie fréquente qui touche près de 10% des femmes du monde occidental. *BRCA1* est un gène majeur de prédisposition au cancer du sein. L'expression de la protéine BRCA1 dans le tissu tumoral est absente dans la majorité des cas familiaux porteurs de mutations BRCA1. D'autre part, le gène *BRCA1* est impliqué dans les cancers du sein sporadiques puisqu'il est sous-exprimé dans environ un tiers de ces cancers, surtout dans les tumeurs de grade élevé et dans les tumeurs de type « triple-négatif » (ER-, PR-, HER2-) (Staff, Isola, and Tanner 2003).

La protéine onco-suppressive BRCA1 joue un rôle majeur de maintien de l'intégrité du génome en participant aux mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN. BRCA1 exerce pleinement cette fonction en conditions de stress, notamment stress génotoxique. Son inactivation conduit à une instabilité génétique et à une prédisposition au cancer. La protéine BRCA1 intervient également dans la régulation transcriptionnelle et le contrôle du cycle cellulaire qui contribuent, eux aussi, à la surveillance de la cellule. Notre groupe s'intéresse depuis plusieurs années aux fonctions de la protéine BRCA1. Nous avons découvert que la protéine BRCA1 interagit avec PABP1 (Poly(A) Binding Protein 1), protéine essentielle de la traduction, et que par cette interaction, BRCA1 est impliquée dans la régulation de la synthèse protéique (Dizin et al. 2006; Dacheux et al. 2013)

Il est alors probable que cette nouvelle fonction de BRCA1 dans la régulation de la traduction, contribue, elle aussi, au maintien de l'intégrité du génome et soit cruciale en conditions de stress génotoxique. Cette hypothèse est soutenue par des études récentes montrant que, dans des conditions de stress et notamment de dommages à l'ADN, la protéine BRCA1 est délocalisée dans le cytoplasme où a lieu la synthèse protéique, selon une cinétique qui reste à préciser (Yang and Xia 2010). De plus, il a été montré que lors d'un stress génotoxique, la traduction de la plupart des ARNm est réprimée, à l'exception de certains ARNm dont la traduction est maintenue, voire stimulée. Ce mécanisme adaptatif de traduction est encore mal connu. Des éléments régulateurs en cis, comme par exemple les IRES, mais également des protéines habituellement non impliquées dans la traduction, comme par exemple les ITAF, pourraient former des complexes non canoniques initiateurs de la traduction de ces ARNm (Spriggs et al. 2008).

B. Hypothèse et projet de thèse

L'ensemble de ces données nous a conduits à proposer un modèle selon lequel, par sa liaison à PABP1, BRCA1 fonctionne comme un facteur non canonique de l'initiation de la traduction pour réguler la traduction d'ARNm spécifiques. Cette nouvelle fonction pourrait, comme les autres fonctions de BRCA1, contribuer à son rôle de suppresseur de tumeur. C'est ainsi que mon projet de thèse a consisté à identifier les ARNm ciblés directement par la protéine BRCA1 pour la régulation de leur traduction. Puis j'ai étudié les conséquences d'un stress génotoxique sur ce control de la traduction qu'exerce BRCA1. Enfin, je me suis attachée à montrer l'importance de l'activité traductionnelle de BRCA1 dans sa fonction de suppresseur de tumeur.

C. Objectifs du travail de thèse

Afin de répondre à cette hypothèse, ma thèse a comporté trois grandes parties :

1. Détermination de(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) BRCA1 régule la traduction et identification de ses ARNm cibles.

Pour ce faire, j'ai recherché la place de BRCA1 dans les complexes traductionnels par des expériences de co-immunoprécipitation avec différents facteurs clés de la traduction bien décrits. J'ai utilisé une technique complémentaire, le PLA « Proximity Ligation Assay », qui permet de visualiser l'interaction des protéines BRCA1 et PABP1 par leur co-localisation dans le cytoplasme. J'ai privilégié les acteurs de l'initiation de la traduction qui partagent avec BRCA1 des sites communs d'interaction pour PABP1, comme le facteur d'initiation eIF4G.

Dans un deuxième temps, j'ai cherché à comprendre le mécanisme de sélection des ARNm pour la régulation de leur traduction par BRCA1. Une des limites de l'analyse transcriptomique des ARNm polysomiques est que parmi les cibles identifiées, certaines sont des cibles secondaires résultant d'un effet indirect de BRCA1 sur leur traduction. Pour ma part, j'ai recherché dans les cellules MCF-7 les ARNm associés aux complexes protéiques contenant BRCA1 en effectuant une immunoprécipitation de BRCA1 suivie d'une extraction des ARNm co-immunoprécipités et de leur analyse par puce Affymetrix. En croisant mes résultats avec ceux obtenus par l'équipe (Dacheux et al. 2013), j'ai définis un sous-ensemble d'ARNm présentant à la fois une traduction régulée par BRCA1 et une association à BRCA1. Nous avons considérés ces ARNm comme des cibles de BRCA1.

2. Validation des cibles de BRCA1 dans un contexte de stress

La protéine BRCA1 est une protéine onco-suppressive dont la plupart des fonctions sont activées après dommages à l'ADN. Il a été montré que lors d'un stress génotoxique, la traduction de la plupart des ARNm est réprimée, à l'exception de certains ARNm qui restent associés aux polysomes. Il s'agit essentiellement d'ARNm codant des protéines de réponse au stress (c'est-à-dire impliquées dans la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, etc…). Le mécanisme de traduction de ces ARNm est encore mal connu. Des éléments régulateurs en cis, comme par exemple les IRES (Internal ribosome entry site), et aussi des protéines habituellement non impliquées dans la traduction, comme par exemple les ITAF (IRES-trans acting factor), pourraient former des complexes non canoniques initiateurs de la traduction de ces ARNm. Notre hypothèse est que BRCA1 pourrait participer à de tels complexes. L'activité traductionnelle de BRCA1 contribuerait alors à coordonner l'expression de gènes en réponse aux dommages subis par l'ADN. Cette hypothèse est appuyée par des études montrant que les conditions de dommages à l'ADN favorisent la localisation cytoplasmique de BRCA1 (Yang and Xia 2010).

Ce travail avait donc pour but de déterminer si BRCA1 induit préférentiellement l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la surveillance de la cellule lorsque celle-ci est en danger. Pour cela, la régulation traductionnelle par BRCA1 de ses ARNm cibles a été quantifiée dans des cellules épithéliales mammaires soumises à des radiations ionisantes.

Dans un premier temps, j'ai analysé la cinétique de délocalisation de la protéine BRCA1 dans des cellules MCF-7 exposées à des radiations ionisantes d'une dose de 2Gy qui est la dose couramment utilisée dans le traitement des cancers mammaires par radiothérapie, en collaboration avec le Dr.

Nicolas Foray, chercheur en radiobiologie au CRCL (Lyon). La relocalisation de BRCA1 ayant été observée en présence de doses d'irradiations bien supérieures, et selon une cinétique qui reste à préciser (Okada and Ouchi 2003; H. Wang et al. 2010), j'ai déterminé par fractionnement nucléo-cytoplasmique et immunofluorescence, le temps post-irradiation nécessaire au recrutement cytoplasmique de BRCA1 dans nos conditions. Puis, j'ai recherché parmi les cibles précédemment identifiées, celles dont la traduction est différemment régulée par BRCA1 dans ces conditions de stress. Pour ce faire, j'ai récupéré les ARNm associés aux polysomes et donc activement traduits dans des cellules MCF7 déplétées ou non en BRCA1 et soumises aux irradiations.

3. Validation de cibles de BRCA1 comme nouveaux marqueurs des tumeurs déficientes en BRCA1

Il a été montré que la détermination du taux de BRCA1 par immunohistochimie (IHC) pourrait fournir des informations additionnelles cliniquement intéressantes pour la classification des cancers du sein et constituer un facteur pronostique. Cependant, cette détermination est délicate en raison d'un manque de spécificité des anticorps anti-BRCA1 disponibles qui rend leur utilisation en immunohistochimie très peu fiable (Milner et al. 2013). Dans ce contexte, la possibilité d'identifier de nouveaux marqueurs liés au niveau d'expression de BRCA1 s'avère particulièrement intéressante pour les cliniciens pour contourner cette difficulté technique qui limite l'utilisation de BRCA1 comme outil clinique.
J'ai donc recherché si les ARNm cibles préalablement identifiés comme étant des cibles de BRCA1 et dérégulés dans les cellules MCF-7 déplétées en BRCA1, le sont également dans les tumeurs du sein mutées pour *BRCA1*. Ce travail a été réalisé en IHC avec la participation du Docteur Isabelle Treilleux, Médecin anatomo-pathologiste du Centre Léon Bérard à Lyon. Nous avons recherché si certaines de ces cibles constituent des marqueurs tumoraux spécifiques des tumeurs déficientes en BRCA1. L'expression de la protéine BRCA1 est diminuée dans la plupart des cas familiaux porteurs de mutations BRCA1, et le gène *BRCA1* est sous-exprimé dans environ un tiers des cancers du sein sporadiques, surtout dans les tumeurs de grade élevé et dans les tumeurs de type « basal-like » ou « triple-négative » (ER-, PR-, HER2-). Or, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'anticorps anti-BRCA1 suffisamment puissant et spécifique pour être validé et utilisé en routine en IHC. Aussi, découvrir des marqueurs tumoraux spécifiques des tumeurs déficientes en BRCA1 serait d'autant plus intéressante que la détermination du statut de BRCA1 dans les tumeurs familiales et aussi sporadiques pourrait permettre de prévoir la réponse de ces tumeurs à différents traitements et de proposer le plus adapté. Par exemple, avec le développement des inhibiteurs de PARP dans la prise en charge des cancers du sein sporadiques, il devient pertinent vu le nombre de patientes ayant une indication de chimiothérapie, d'essayer de déterminer s'il existe des facteurs prédictifs de réponse à ces thérapeutiques. Le niveau d'expression de BRCA1 dans la tumeur pourrait être un bon candidat mais il n'y a pas à l'heure actuelle d'outil permettant un diagnostic rapide et fiable en IHC. Des anticorps dirigés contre les protéines codées par les ARNm cibles de BRCA1 que j'ai identifié au cours de ma thèse pourraient représenter alors des outils pertinents utilisés en IHC pour évaluer si une tumeur exprime ou n'exprime pas la protéine BRCA1.

Les inhibiteurs de PARP sont utilisés chez des femmes porteuses de mutation BRCA1 et chez des femmes atteintes d'un cancer du sein « triple négatif (ER-, PR- et HER2-) » qui ne peuvent être soignées par hormonothérapie. Malheureusement, des cas de résistance au traitement ont été notés à plusieurs reprises. Dans ce contexte, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques s'avère cruciale.

Ainsi, mon travail de thèse nous a permis de proposer que l'une des cibles traductionnelles de BRCA1 puisse servir de biomarqueur et ainsi permettre de définir le statut mutationnel de BRCA1.

Résultats

A. Un rôle inattendu du suppresseur de tumeur BRCA1 dans la traduction: vers un nouvel outil théranostique pour les cancers féminins

Recherche des ARNm « cibles » de BRCA1 par immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques (RIP)

Notre équipe a montré que la surexpression de BRCA1 résulte en une augmentation de 20% de la synthèse protéique globale alors que sa sous-expression par interférence à l'ARN résulte en une diminution de 20% de la synthèse protéique globale (Dizin et al. 2006). Notre hypothèse est que l'effet observé sur la variation des taux de synthèse protéique en fonction de l'expression de BRCA1 résulte non pas d'une augmentation de la traduction de tous les ARNm de la cellule mais plutôt de la régulation positive ou négative de la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm par BRCA1. Une première étude large échelle menée dans notre laboratoire dans les cellules MCF-7 déplétées en BRCA1 avait permis d'établir une liste potentielle de candidats dont la traduction est dérégulée en l'absence de la protéine BRCA1 (Dacheux et al. 2013). En revanche, cette étude n'avait pas permis de distinguer les ARNm dont la traduction est directement régulée par BRCA1 de ceux qui seraient dérégulés comme conséquence secondaire de tous les programmes et voies cellulaires impactés par l'absence de BRCA1.

Aussi, afin d'identifier les cibles « directes » de l'activité traductionnelle de la protéine BRCA1, les ARNm associés au(x) complexe(s) protéique(s) contenant BRCA1 ont été isolés par la technique d'immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques (RIP) à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine BRCA1 dans un lysat total de cellules épithéliales mammaires tumorales MCF-7. J'ai ensuite pu extraire les ARNm co-immunoprécipités que j'ai ensuite analysé sur puce d'expression pan-génomique en collaboration avec la plateforme lyonnaise ProfileXpert. Cette analyse menée sur trois réplicats indépendants de RIP a été réalisée sur la puce Human Transcriptome Array GeneChip HG-ST 2.0 d'Affymetrix. Parmi les 20616 ARNm exprimés dans les cellules MCF-7, j'ai observé que 488 d'entre eux étaient présents dans les RIP BRCA1 et absents des RIP contrôle préparés avec anticorps non relevant (NR). L'analyse par RT-qPCR de 16 ARNm présents dans les échantillons analysés sur puces ainsi que dans trois nouveaux réplicats indépendants de RIP BRCA1 et RIP NR a permis de valider l'association de ces 16 ARNm à la protéine BRCA1.

Etude de la régulation de la traduction des ARNm « cibles » de la protéine BRCA1 par analyse de profils polysomiques

Afin d'étudier la régulation traductionnelle que pourrait exercer la protéine BRCA1 sur ces 16 ARNm j'ai réalisé des profils polysomiques. Cette technique permet de séparer le long d'un gradient de sucrose les constituants protéiques et ribonucléiques présents dans les fractions cytoplasmiques déplétées en mitochondries des cellules en fonction de leur densité. Ainsi, dans le haut du gradient se trouvent les éléments les moins denses (ARN et protéines libres, sous-unité 40S puis 60S) alors que le bas du gradient contient les éléments les plus denses, c'est-à-dire les polysomes (plusieurs ribosomes associés aux ARNm). La lecture de la densité optique à 254nm permet la réalisation d'un profil tandis que le collecteur « Fox Jr. Fraction collecteur® (Teledyne Isco Inc.)» permet de collecter les fractions. Les fractions polysomiques sont ensuite récupérées et regroupées pour l'analyse de leur contenu en ARNm. J'ai ainsi réalisé trois séries indépendantes de gradients à partir de cellules MCF-7déplétées ou non en BRCA1 par ARN interférent.

La quantité de chaque ARNm présente dans la fraction cytoplasmique résulte de l'efficacité des processus précédent la traduction de l'ARNm et qui sont pour l'essentiel la transcription, le transport et la dégradation de l'ARNm. Afin de mesurer l'impact de BRCA1 sur l'association des ARNm aux polysomes indépendamment de l'impact qu'elle pourrait avoir sur ces étapes antérieures à la traduction, le contenu en ARNm totaux de la fraction cytoplasmique des cellules a été analysé à partir d'une fraction de chaque extrait cytoplasmqiue.
L'analyse du taux de traduction a été effectuée par RT-qPCR et pour chaque signal obtenu, les rapports pour l'ARN polysomal (polyRNA = siBRCA1 / siControl) et pour l'ARN total (totRNA = siBRCA1 / siControl) ont été calculés. Enfin, j'ai déterminé les variations de recrutement aux polysomes dans les deux conditions (avec ou sans BRCA1) en calculant le « ratio des ratios » (ou RdR = polyRNA/totRNA). Le RdR représente donc la variation de l'association aux polysomes d'un ARNm donné en fonction de la présence ou de l'absence de BRCA1 indépendamment de la variation de quantité de cet ARNm dans le cytoplasme. J'ai considéré que les ARNm dont l'association aux polysomes est changée de façon significative en absence de BRCA1 sont ceux pour lesquels RdR ≥ 1,4 (davantage traduits en absence de BRCA1 qu'en sa présence donc régulés négativement par BRCA1) ou RdR ≤ 0,71 (soit 1/1,4 régulés positivement par BRCA1).
Ainsi, nos résultats montrent que la traduction de certains ARNm est régulée positivement par BRCA1 (RdR ≤ 0,71), alors que la traduction d'autres ARNm est régulée négativement (RdR ≥ 1,4). Pour finir, parmi les ARNm associés à BRCA1, les ARNm différemment traduits en fonction de la présence de la protéine BRCA1 dans les cellules constituent les ARNm « cibles » de BRCA1.

Etude de l'expression des protéines codées par les ARNm « cibles » de BRCA1 au niveau protéique

Parmi les ARNm « cibles » de BRCA1 seuls 6 d'entre eux codent pour des protéines pour lesquelles des anticorps sont disponibles dans le commerce. J'ai donc utilisé les anticorps disponibles, qui présentaient une spécificité pour leur cible. J'ai ainsi pu analyser l'expression des protéines ADAT2, CCNL2, DBF4B et TRIM45 dans les cellules MCF-7 déplétées en BRCA1 par ARN interférent. Comme attendu, l'expression d'ADAT2 augmente, tandis que celle des trois autres protéines diminue dans les cellules déplétées en BRCA1. Ceci confirme les résultats obtenus après l'analyse de la variation d'association des ARNm aux polysomes par profils polysomiques.

Dans le but de m'assurer que l'expression de ces protéines varie de façon coordonnée avec l'expression de BRCA1 dans les cellules, j'ai transfectée les cellules MCF-7 avec un plasmide dans lequel a été inséré la séquence codante la protéine BRCAA1 de 1863aa (pBRCA1) afin de sur-exprimer la protéine dans ces cellules. Nous avons observé un effet inverse sur l'expression des protéines analysées puisque l'expression d'ADAT2 diminue tandis que l'expression de CCNL2, DBF4B, TRIM45 augmente. J'ai également validé ces résultats dans une autre lignée épithéliale mammaire tumorale : la lignée cellulaire MDA-MB-231. Ceci suggère que l'expression de ces protéines est liée à l'expression de BRCA1 dans ces cellules.

Enfin, pour m'assurer que l'expression de ces protéines varie en fonction de la présence de BRCA1 dans les cellules et non du caractère tumoral de celles-ci, j'ai déplété en BRCA1 les cellules de la lignée mammaire immortalisée mais non transformée HMEC, et analysé l'expression de ces protéines. L'expression d'ADAT2 augmente tandis que l'expression des autres protéines diminue, comme ce que nous avons observé dans les cellules tumorales MCF-7 et MDA-MB-231. Ceci montre que l'expression

de ces cibles varie en fonction de l'expression de la protéine BRCA1 et est indépendant du modèle cellulaire utilisé.

Cette étude décrit pour la première fois les ARNm cibles de BRCA1, c'est-à-dire ceux qui sont à la fois associés à la protéine BRCA1 dans les complexes ribonucléoprotéiques, et régulés pour leur traduction par BRCA1. De façon intéressante, BRCA1 stimule spécifiquement la traduction des ARNm codant les protéines CCNL2, DBF4B et TRIM45 et régule négativement la traduction de la protéine ADAT2. Sur la base de ces résultats, nous pouvons proposer un modèle selon lequel le sens de régulation de l'expression de chacune de ces protéines par BRCA1 (régulation positive ou négative) peut s'expliquer par les fonctions que ces protéines exercent dans la cellule et ouvre de nouvelles voix diagnostiques et thérapeutiques (« théranostique ») En effet, certains des ARNm cibles de BRCA1 pourraient constituer des marqueurs de l'absence de BRCA1, et permettre ainsi de mieux distinguer et caractériser les tumeurs mammaires déficientes en *BRCA1*. Elles pourraient également, à terme, constituer de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques de ces tumeurs.

Article 1

Statut: en préparation

An unexpected role for the tumor suppressor BRCA1 in translation: towards a new therapeutic tool for breast cancer

Berthel E, Vincent A, Diaz JJ, Dalla Venezia N

Caractérisation de l'association des ARNm « cibles » à la protéine BRCA1 : Est-elle médiée par PABP1 ?

Une des questions qui reste en suspens après l'identification des ARNm associés à la protéine BRCA1, et tout en sachant qu'il est probable que cette association ne soit pas directe mais qu'elle ait lieu au sein des complexes ribonucléoprotéiques, est l'importance de la liaison BRCA1/PABP1 que notre équipe avait identifié (Dizin et al. 2006) pour cette association aux ARNm. Aussi, nous voulions savoir si BRCA1 recrute ses ARNm « cibles » pour réguler leur traduction *via* son interactant protéique, PABP1.

J'ai donc réalisé des immunoprécipitations de la protéine BRCA1 tronquée pour sa région d'interaction avec la protéine PABP1, c'est à dire dépourvue de sa partie C-terminale et de son domaine BRCT. Pour cela, j'ai utilisé un plasmide contenant la séquence codante de BRCA1, sur laquelle a été généré par mutagenèse dirigée un codon stop en position 1563. Ce plasmide est nommé pY1563X et code pour une protéine tronquée de 1563 aa. Le plasmide p3XFLAG-CMV-7 de 4,7kb contient 3 séquences « FLAG » situées en amont du site de clonage. Elles sont traduites en un polypeptide fusionné à la protéine BRCA1, et permettent de marquer et différencier la protéine BRCA1 exogène introduite dans la cellule, de la protéine BRCA1 exprimée naturellement par celle-ci.

Dans un premier temps, je me suis assurée que la forme tronquée de BRCA1, pY1563X n'interagit pas avec la protéine PABP1 par la technique du PLA (Proximity Ligation Assay). Cette technique *in situ* d'immunofluorescence est basée sur la proximité des partenaires protéiques dans la cellule. Chaque sonde PLA est fournie avec un court fragment d'ADN qui lui est attaché et lié avec les espèces spécifiques d'anticorps primaires. Lorsque les sondes PLA sont très proches, les fragments d'ADN peuvent interagir par l'addition ultérieure de deux autres oligonucléotides d'ADN. Après l'assemblage des deux oligonucléotides par ligature enzymatique, les sondes sont amplifiées à l'aide d'une polymérase. Après la réaction d'amplification, plusieurs centaines de réplications du cercle d'ADN ont eu lieu et des sondes complémentaires d'oligonucléotide avec un fluorophore mettent le produit en évidence. La forte concentration de la fluorescence dans chaque molécule est facilement visible sous le microscope à fluorescence. J'ai d'abord vérifié que l'interaction des protéines BRCA1/PABP1 confirmée en immunoprécipitation et décrite par Dizin *et al.* était bien détectable par la technique de PLA avec les protéines BRCA1 et PABP1 endogènes. J'ai ensuite pu analyser en PLA l'association de la protéine PABP1 avec la forme flaguée de BRCA1 normale (Flag-BRCA1) ainsi qu'avec la forme flaguée de BRCA1 mutante (Flag BRCA1-Y1563X).

J'ai ensuite pu réaliser des RIP avec l'anticorps ant-Flag dans des cellules 293T. Nous nous attendons à ce que, dans les RIP Flag BRCA1-Y1563X, les ARNm « cibles » de BRCA1 soient moins présent que dans les RIP Flag-BRCA1. L'analyse par RT-qPCR des ARNm co-immunoprécipités par RIP est actuellement en cours au laboratoire.

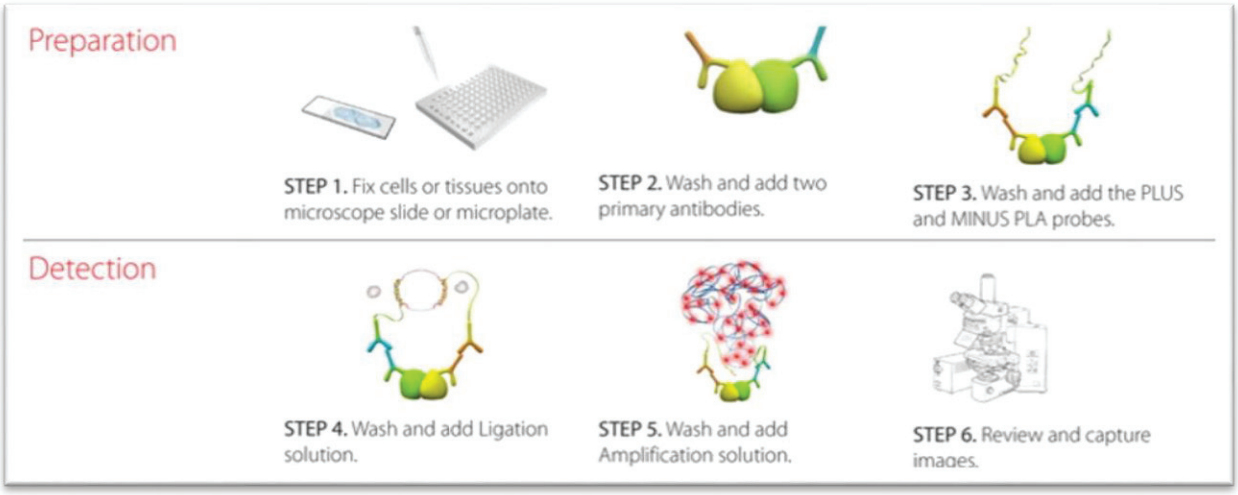


Figure 1 : La technique de Proximity Ligation Assay (PLA) pour tester l'interaction entre deux protéines

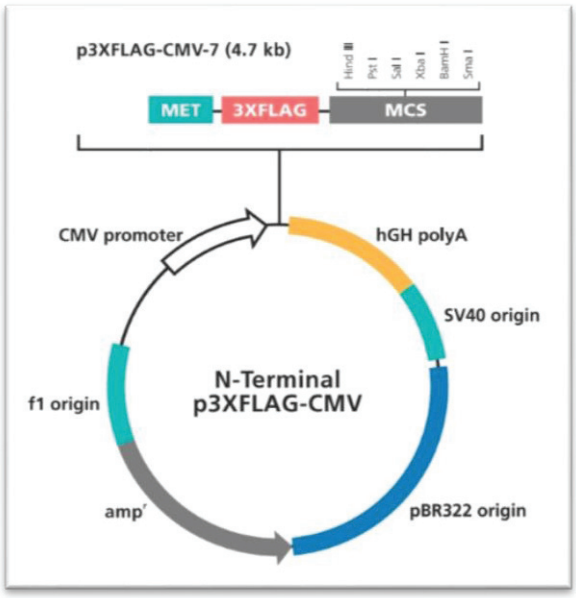


Figure 2 : Carte du vecteur p3XFLAG-CMV

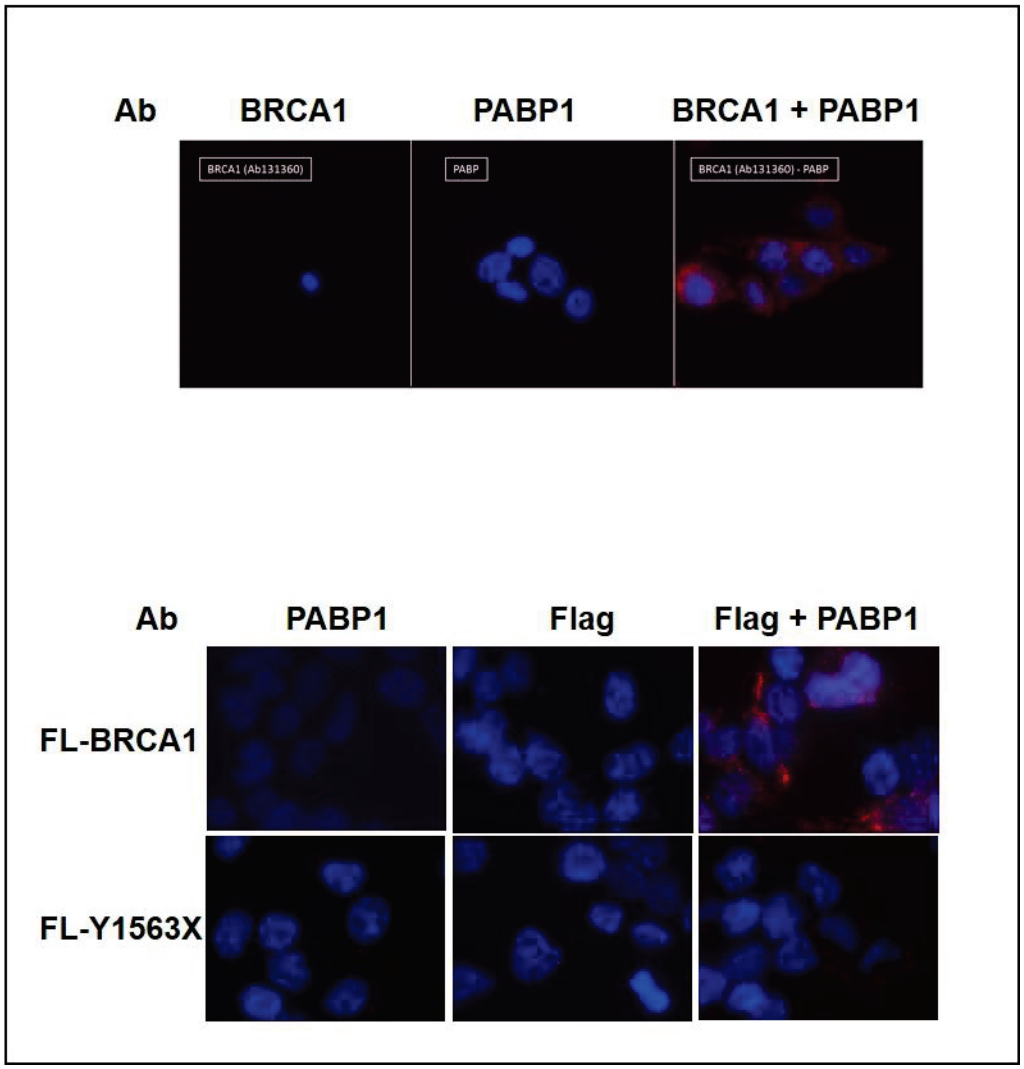


Figure 3 : Etude de l'interaction entre les protéines BRCA1, PABP1 et la forme tronquée de BRCA1 Y1563X par la technique de Proximity Ligation Assay (PLA)

Haut : Cellules 293T non transfectées. Les anticorps anti-PABP1 et anti-BRCA1 ont été utilisés seuls ou en combinaison (à droite).

Bas : Cellules 293T transfectées avec l'agent de transfection HP Xtreme Gene et les vecteurs pBRCA1 et pY1563X. Les anticorps utilisés sont les anticorps anti-PABP1 seul, l'anticorps anti-Flag seul et le mélange des deux anticorps (à droite). La présence de signaux rouges indique que les protéines interagissent.

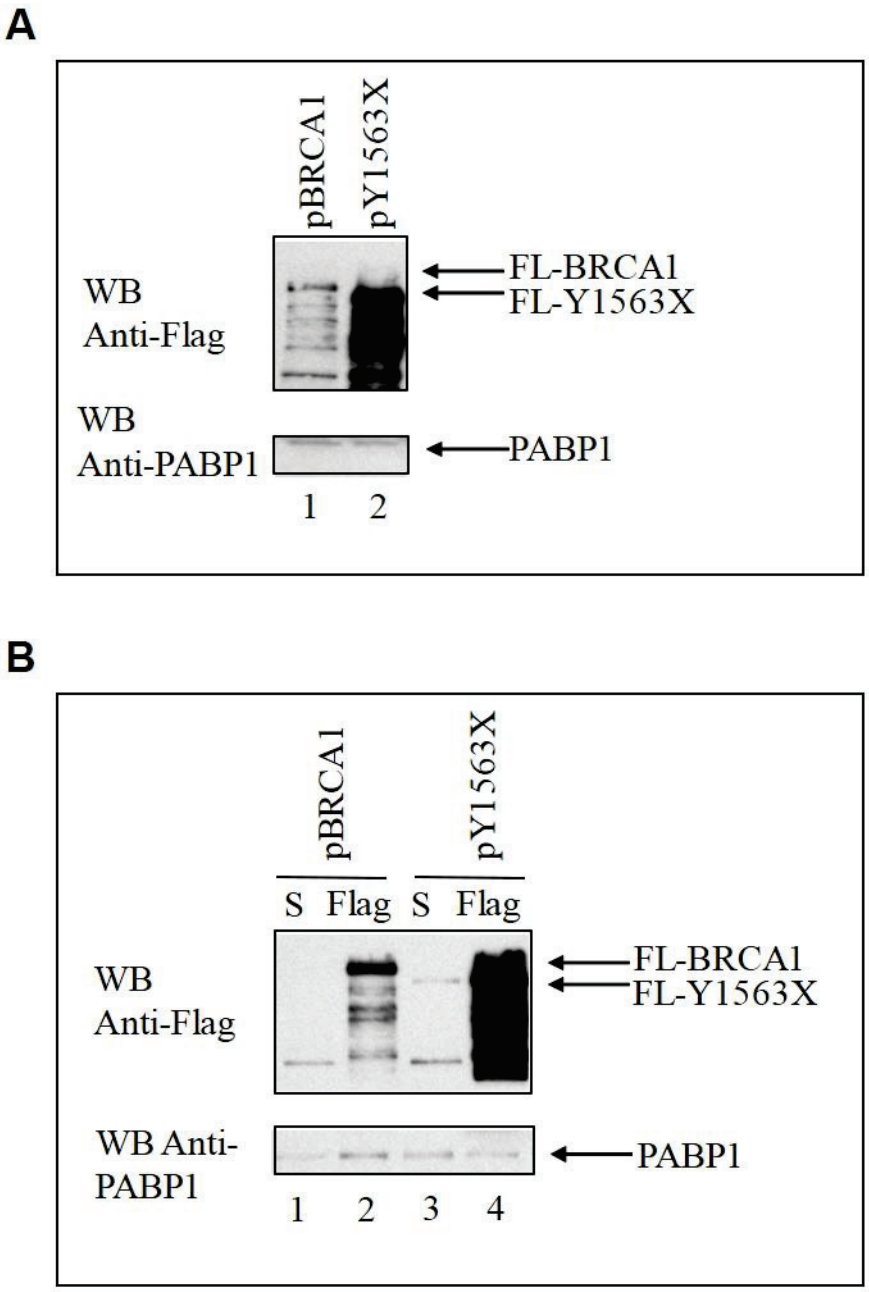


Figure 4 : Etude de l'interaction entre les protéines BRCA1, PABP1 et la forme tronquée de BRCA1 Y1563X

Les cellules 293T ont été transfectées avec l'agent de transfection HP Xtreme Gene et les vecteurs pBRCA1 et pY1563X.

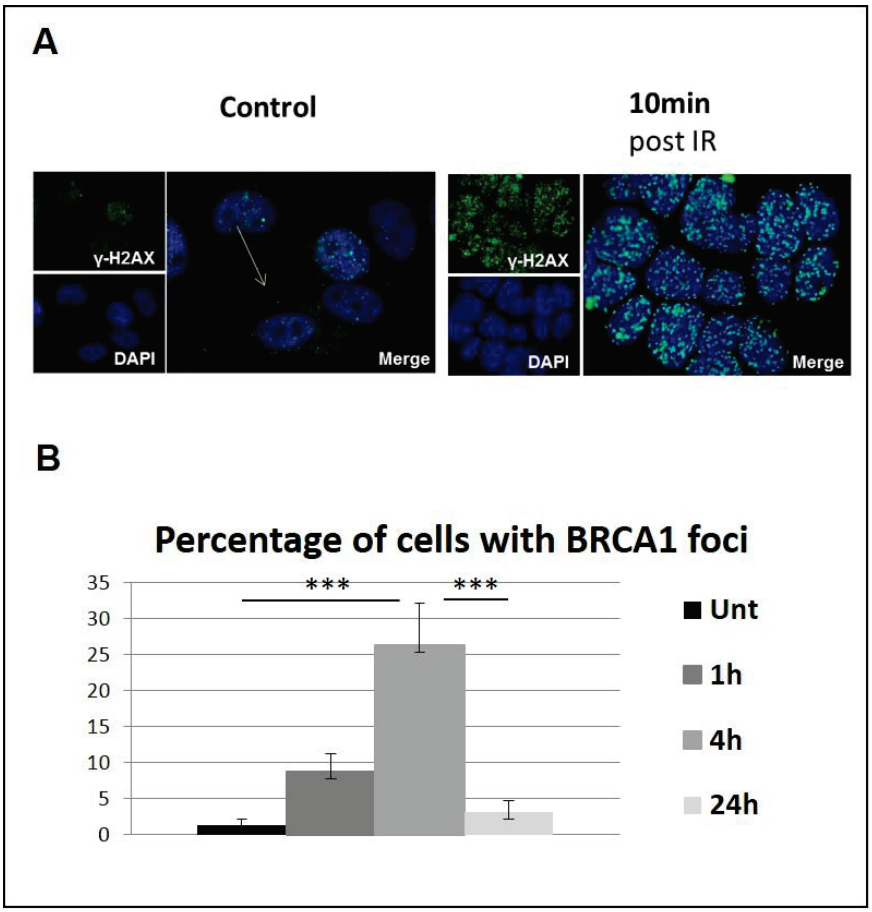
A. Contrôle de l'efficacité de transfection : analyse par Western Blot avec les anticorps anti-Flag et anti-PABP1 d'une fraction des lysats totaux.
B. IP des protéines présentes dans la seconde fraction des lysats, réalisée avec l'anticorps anti-Flag ou un anticorps anti-IgG de souris (S) comme contrôle, suivie d'une analyse par Western Blot.

Etude des ARNm « cibles » de BRCA1 après stress génotoxique

Etude de la cinétique de localisation subcellulaire de BRCA1 post-stress

Afin d'étudier le rôle dans la traduction que pourrait exercer BRCA1 suite à un stress endommageant l'ADN, il nous a fallu déterminer la cinétique de localisation subcellulaire de la protéine BRCA1 dans les cellules MCF-7 soumises à des radiations ionisantes de l'ordre de 2Gy.

Grâce à notre collaboration avec le groupe du Dr. Nicolas Foray (Groupe de Radiobiologie, CRCL), j'ai eu la possibilité d'irradier les cellules à l'hôpital. J'ai utilisé un anticorps anti-pH2AX en technique d'immunofluorescence afin de m'assurer que l'irradiation provoque des cassures doubles brins à l'ADN. Nous avons également, par cette même technique, dénombré le nombre de foci nucléaires de la protéine BRCA1 afin de nous assurer qu'elle était activée, recrutée aux cassures et donc qu'elle participe, comme attendu à son rôle dans la réparation de l'ADN. Une fois ces contrôles validés, j'ai observé la localisation sub-cellulaire de la protéine BRCA1 dans les cellules MCF-7 par immunohistochimie, ainsi que par fractionnement nucléo-cytoplasmique suivi de western blot (non montré). Comme attendu, après stress, BRCA1 est localisée dans le noyau jusqu'à 4h après stress, ce qui correspond à la formation et au nombre le plus important de foci de réparation. Après 4h, l'expression de BRCA1 augmente dans le cytoplasme et est très forte 8h post stress avant de redevenir nucléo-cytoplamsique à la fin de la cinétique.



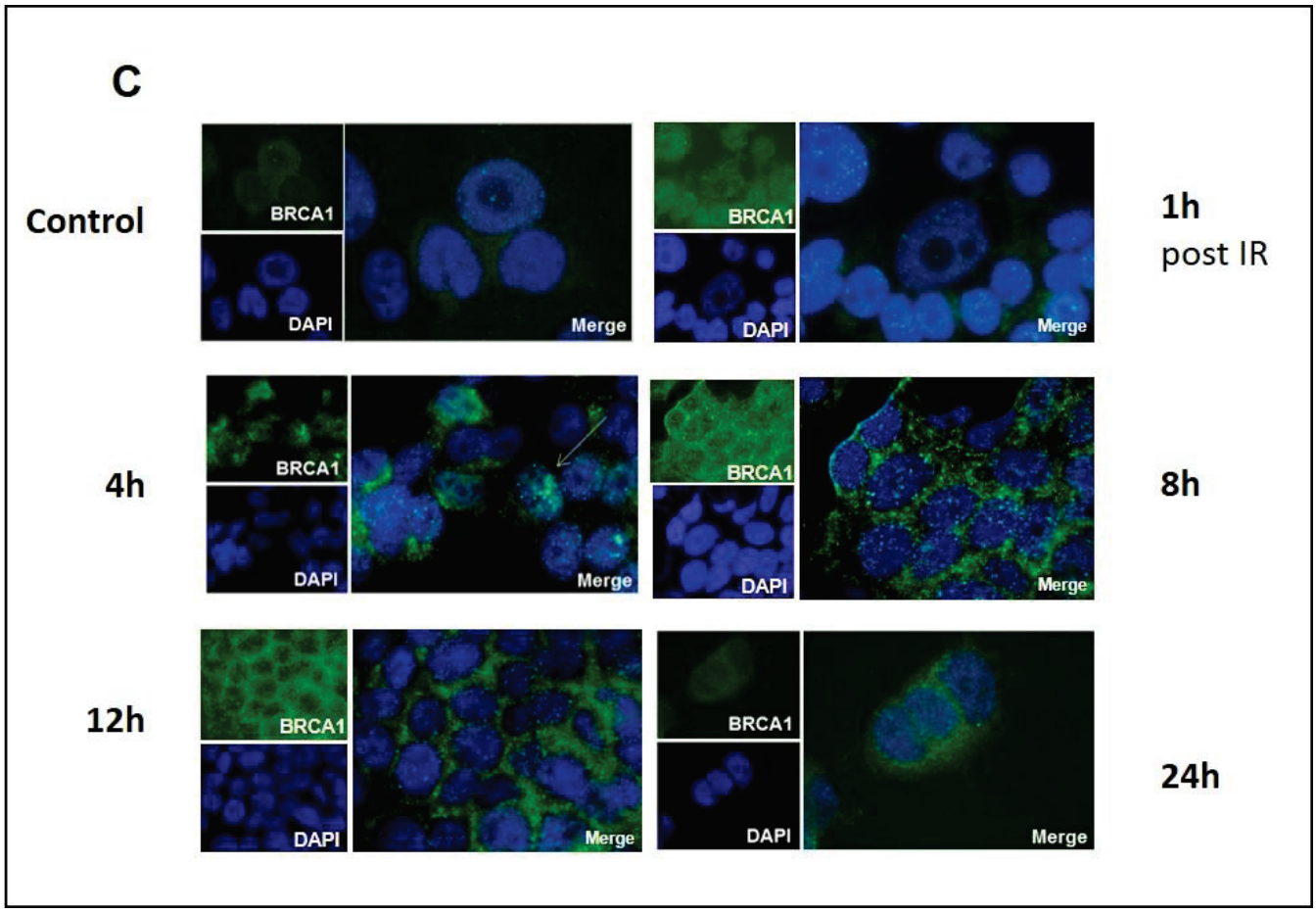


Figure 1 : Etude de la localisation subcellulaire de BRCA1 dans les cellules MCF-7 après une radiation ionisante de 2Gy

Les cellules MCF-7 ont été irradiées avec une dose de 2Gy qui est la dose journalière requise pour le traitement de cancer du sein par radiothérapie.

A. pH2AX est recrutée aux cassures double brins. Très vite après l'irradiation de nombreuses cassures apparaissent et sont visibles car la protéine H2AX est phosphorylée et recrutée sur le site de ces cassures. Suite à une irradiation de 2Gy, environ 80 cassures sont présentes dans chaque noyau.

B. Nombre de foci nucléaires de BRCA1. Les foci de réparation se forment progressivement après le stress causé aux cellules. Le nombre de foci de BRCA1 augmente entre 1h et 4h après stress, où il est maximum.

C. Localisation de la protéine BRCA1 suite au stress sur une cinétique de 24h. Dans les cellules non irradiées, la protéine BRCA1 est une protéine nucléo-cytoplasmique. Après stress, son expression augmente dans le noyau, puis, après 4h, son expression devient majoritairement cytoplasmique avant de redevenir nucléo-cytoplasmique à la fin de la cinétique.

Etude de la régulation de la traduction des ARNm « cibles » de BRCA1 post-stress

Etablir la localisation subcellulaire de la protéine BRCA1 m'a permis d'identifier le moment où le recrutement cytoplasmique de BRCA1 est le plus important post-stress. Mon objectif est maintenant d'analyser si les ARN « cibles » de la protéine BRCA1 que j'ai identifiés en conditions physiologiques, sont les mêmes post-stress et si la régulation de leur traduction par BRCA1 est modifiée, augmentée ou diminuée.

Dans un premier temps, des cellules MCF-7 ont été irradiées à une dose de 2Gy, et j'ai préparé des lysats totaux 8h après ce stress. L'analyse préliminaire par western blot de ces échantillons montre que l'expression des protéines ADAT2, CCNL2, DBF4B et TRIM45 ne semblent pas être affectées par l'irradiation (non montré).

Dans un deuxième temps, des cellules MCF-7 ont été irradiées à une dose de 2Gy et déplétées ou non en BRCA1 par ARN interférent. J'ai ensuite préparé les extraits cytoplasmiques 8h après l'irradiation des cellules pour réaliser les profils polysomiques et récupérer les fractions polysomales. L'analyse par RT-qPCR de ces ARNm sera normalisée avec celle des ARNm totaux présents dans la fraction cytoplasmique. Nous pouvons nous attendre à ce que l'activité traductionnelle de BRCA1 soit modifiée qualitativement et quantitativement. Ces analyses sont actuellement en cours au laboratoire.

Title

An unexpected role for the tumor suppressor BRCA1 in translation : towards a new therapeutic tool for breast cancer

Berthel E, Vincent A, Diaz JJ, Dalla Venezia N

CNRS UMR5286, CRCL, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 28 Rue Laennec, F-69008 Lyon, France

Abstract

BRCA1 is one of the two major breast cancer susceptibility genes. The numerous binding partners of BRCA1 allow it to participate to several cellular pathways which globally contribute to its cell surveillance capacity. We previously showed that BRCA1 regulates global translation and further showed that BRCA1 controled the translation of a limited number of mRNA. Here, by combining to approaches, the immunoprecipitation of the ribonucleoprotein complexes (RIP) and the polysome profiling, we delineated the mRNA whose translation is directly impacted by BRCA1 through their binding to this protein. We further ascertained that BRCA1 directly controls the translation of a subset of mRNA at the protein level. Several proteins were found to be down regulated in BRCA1 depleted cells (CCNL2, TRIM45, DBF4B) and other up regulated (ADAT2). This allows us to propose among these targets new diagnostic markers or new therapeutic targets for breast cancers deficient in *BRCA1*.

Introduction

Germ-line mutations of the *BRCA1* (BReast CAncer 1) gene strongly increase the risk of developing breast and ovarian cancers (1). In addition, a reduced expression of the *BRCA1* gene has been observed in about one third of sporadic breast cancers (2).

The tumour suppressor BRCA1 protein maintains genomic integrity through its implication in a number of nuclear processes, including DNA repair, transcription regulation, cell cycle checkpoint control, chromatin remodelling, protein ubiquitination and mRNA splicing (3) (4). Lately, it has become accepted that tumour suppressors such as BRCA1 achieve their central role in cell surveillance by exerting different functions in several cell compartments (5). In this context, BRCA1 has been described as a nucleo-cytoplasmic shuttling protein. Several studies have proposed a pro-apoptotic role for BRCA1 associated to its cytoplasmic localisation (6) (7). In addition, BRCA1 has been shown to be involved in the regulation of two major cytoplasmic processes that are lipogenesis and translation (8) (9).

Interestingly, BRCA1 most often achieves these different functions through its capacity to interact with various proteins involved in the corresponding processes. For example, in the nucleus, BRCA1 is involved in DNA repair *via* its interaction with RAD50 and RAD51 within the BRCA1-C and BRCA1-D master complexes. It also participates to transcriptional control through its interaction with RNA polymerase II and RNA helicase A, as well as several transcription factors (4). In the cytoplasm, BRCA1 has been shown to interact with Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor (IP3R) to stimulate apoptosis (10), with the rate-limiting enzyme for fatty acid synthesis Acetyl-CoA-Carboxylase α (ACCA) (11) (12) and with the key player in protein synthesis Poly(A) Binding Protein 1 (PABP1) (13).

Therefore, BRCA1 is a multifunctional protein acting as a scaffold for the formation of different protein complexes which, altogether, contribute to its central role in cell surveillance. However, further studies are still needed to fully appreciate the molecular mechanisms underlying the role of BRCA1 as a tumour suppressor.

In the present study, we identified the mRNA that are both associated directly or indirectly to BRCA1 and regulated at the translational level by BRCA1. These mRNA constitute direct target of the protein and play role in major processes such as cell cycle control, tRNA modification, or transcription.

Materials and Methods

Chemicals

The primary antibodies used in this study were as follows: mouse monoclonal antibodies to BRCA1 (MS110 (Calbiochem)), PABP1 (10E10 (Sigma)), β-Actin (AC-15 (Sigma)) and α-Tubulin (DM1A) (Calbiochem), rabbit polyclonal antibodies to ADAT2 (ab135429 (Abcam)), CCNL2 (A301-677A (Bethyl)), DBF4B (ab177911 (Abcam)), TRIM45 (ab84303 (Abcam)). Secondary antibodies used were peroxydase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch).

Cell culture

The human breast carcinoma cell lines MCF-7 (available from ATCC) was maintained in Dulbecco's Modified eagle's Medium (DMEM) containing 4.5g/l of glucose supplemented with 0.1mM non essential aminoacids, 1mM sodium-pyruvate, 0.01mg/ml recombinant human insulin, 10% fetal calf serum, 100ug/ml streptomycin and 100units/ml of penicillin.
The human breast carcinoma cell lines MDA-MB-231 (available from ATCC) was maintained in DMEM containing 4.5g/l of glucose supplemented with 10% fetal calf serum, 100ug/ml streptomycin and 100units/ml of penicillin.
The normal human mammary epithelial cells HMEC (available from ATCC) were maintained in DMEM-F12 supplemented with 0.5ug/ml hydrocortisone, 10ng/ml EGF, 0.3U/ml insulin, 10% fetal calf serum, 100ug/ml streptomycin and 100units/ml of penicillin.

Transfection with plasmids

For transfection, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were plated at 2.10^6 cells per 10cm diameter dish 24h before transfection with 4ug of plasmid and 20ul of ExGen 500 (Euromedex). Twenty four hours after transfection, cells were harvested. The pCDNA3 plasmid expressing full length BRCA1 protein (BRCA1) was previously described (14).

RNA interference (RNAi)

The siRNA duplexes were purchased from MWG (Germany) and provided as purified and annealed duplexes. The sequence of the siRNA against BRCA1 was si-BRCA1 5'-GGAACCUGUCUCCACAAAG-3' (13,14). The siRNA used as control was designed against luciferase: si-Control 5'- CGUACGCGGAAUACUUCGA-3'.
MCF-7, MDA-MB-231, HMEC cells were plated at $2x10^6$ cells per 10 cm diameter dish 24 h before transfection. Cells were transfected with 200 pmol/dish of siRNA and 16 µl/dish of Lipofectamine 2000 (Life Technologies) using the protocol of the supplier. Cells were harvested 72 hours after transfection.

Immunoblotting

Cells were lysed in lysis buffer A (20 mM Hepes-KOH pH 7.2, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP40, 10 % Glycerol) supplemented with protease inhibitor (Complete EDTA free,

Roche). Protein concentrations were determined by Bradford procedure (BioRad). Proteins were subjected to SDS-PAGE, and blotted onto poly-vinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore). Membranes were blocked in Tris-buffered saline solution containing 0.05 % Tween 20 and 5 % non fat milk and incubated with primary antibodies. Horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used for detection of immunoreactive proteins by chemiluminescence (ECL, GE Healthcare).

Isolation of Polysomes and total cytoplasmic RNA

Extracts from MCF7 cells were prepared by lysis at 4°C in extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl2, 250 mM sucrose, 0.7% Nonidet-P40) and nuclei were removed by centrifugation (800 g, 10 min, 4°C). The supernatant was centrifuged (12 000 g, 10 min, 4°C) to eliminate mitochondria. Then, the supernatant containing the cytoplasmic fraction was divided in two portions. One fifth of the cytoplasmic fraction was used as a source for total cytoplasmic RNA (total RNA) using Trizol (Life Technologies) extraction protocol and isopropanol precipitation. The remaining 80% of the cytoplasmic fraction was layered onto an 11 ml linear sucrose gradient (10–40% sucrose supplemented with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM DTE and 100 mg/ml cycloheximide). A 2 h centrifugation at 250 000 g and at 4°C in a SW41Ti rotor (Beckman) was performed. The gradients were collected in 15 fractions and absorbance profiles were generated at 245 nm using an ISCO UA-6 detector. Polysomal fractions were pooled for further RNA extraction using Trizol LS Reagent as described by the manufacturer (Life technologies).

RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP)

Cells were washed with ice-cold PBS and lysed in RIP buffer (25mM Tris-HCl at pH 7.4, 150mM KCl, 2mM EDTA, 0.5% NP40, 0.5mM DTT, 200U/ml RNase Out, protease inhibitors). A small fraction of the lysates (5%) was used to prepare total RNA extract and this was considered the input. The remaining lysates were then split into equal parts : half was incubated with anti-BRCA1 antibody (OP92) coupled to Dynabeads and half was incubated with non specific isotype-matched IgG (negative control) coupled to Dynabeads. Immunoprecipitates were washed seven times with RIPA buffer (50mM Tris-HCl at pH 7.4, 150mM KCl, 0.5% NP40). The RNA associated with each type of bead, and the total RNA (input) was then eluted with elution buffer (50mM Tris-HCl at pH 7.4, 5mM EDTA, 10mM DTT, 1% SDS, 200U/ml RNase Out) and digested with proteinase K. RNA was then extracted using RNeasy microkit (Qiagen).

Quantitative RT-PCR

RNA extracted from RIP and RNA extracted from the corresponding inputs was amplified and reverse-transcribed with Ovation WTA System (Nugen).

The total and polysomal RNA prepared as described above from BRCA1-depleted and control cells were purified and submitted to DNase digestion with NucleoSpin RNA XS Clean-up columns (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. Then, 250 ng of total

RNA were reverse transcribed using the M-MLV RT kit and random primers (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.
Quantitative real-time PCR (qPCR) was carried out using the Light cycler 480 II real-time PCR thermocycler (Roche). Expression of mRNAs was quantified using LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) and normalized using *POP4 or Actin* expression according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.
Immunoprecipitated RNA was expressed as fold enrichment over input compared to enrichment with negative control performed with IgG (NR) ; Fold enrichment = (IP BRCA1 - IP NR) / Input.
The ratios for the polysomal RNA (polyRNA=siBRCA1/siControl) and for total RNA (totRNA=siBRCA1/siControl) were calculated. Then a polyRNA/totRNA Ratio (Ratio of Ratio=RoR) was calculated. Only genes showing a polyRNA/totRNA Ratio greater than 1.4 or lower than 0.71 in the three replicates were retained.
The genes tested for polysome profiling and RIP are listed in Table S1.

Microarray analysis
Microarray processing and data analysis was performed at the ProfileXpert core facility (Lyon, France). Microarray analysis was performed using a high-density oligonucleotide array (Human Transcriptome Array GeneChip HG-ST 2.0, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). RNA (900 pg) was amplified with Ovation WTA System (Nugen). cDNA quantification was performed with a nanodrop and quality checked with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Inc, Palto Alto, CA, USA). Fragmentation and labelling of cDNA (3.6ug) using Encore Biotin Module kit (Nugen) were performed. Before amplification, spikes of synthetic mRNA at different concentrations were added to all samples; these positive controls were used to ascertain the quality of the process. After final purification, hybridization was performed following Affymetrix protocols (http://www.affymetrix.com). The arrays were read with a confocal laser (GeneChipH Scanner 3000 7G, Affymetrix). Then CEL files were generated using the Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) software 3.0.
The obtained data were normalized with Affymetrix Expression Console software using the MAS5 statistical algorithm. The negative control expression values (IgG) were substracted from their respective sample counterparts on a probe set basis ; the 3 replicates were then averaged. Only genes showing a IP BRCA1/IP IgG Ratio greater than 1.5 in the three replicates were retained.
The retained genes of interest were listed and classified according to their biological functions using DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (15) (https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp). This software provides a rank classification of enriched functions based on determination of *P*-values and enrichment scores.

Statistical analysis
Standard errors of the means (SEM) shown in figures are the standard deviations for the samples divided by the square root of the sample size. For results shown in each figure, at

least three independent experiments were performed, ensuring statistical independence of the values in the sample.

Results

BRCA1 associates with endogenous mRNA in MCF-7 cells

To investigate the role of BRCA1 in translation, we search for the mRNAs bound to BRCA1 using RIP analysis followed by microarray analysis of the bound mRNAs. Three independent BRCA1 RIP assays were performed from MCF-7 cells previously enriched in BRCA1 via transient transfection with BRCA1 expressing plasmid. Prior to hybridization to array, we confirmed efficient immunoprecipitation of BRCA1 by western blot analysis (Figure 1A).

The microarray analyses were performed from these three independent experiments using Human Transcriptome GeneChip HG-ST 2.0 Array (Affymetrix). Among the 20616 mRNA expressed in MCF-7 cells, 488 were identified as enriched more than 1.5 fold in BRCA1 immunoprecipitates. A Gene Ontology analysis conducted with the Functional annotation clustering analytic modules of DAVID bioinformatics resources was used to determine whether mRNA bound to BRCA1 are significantly enriched in particular functions (Table S2). Interestingly, the most enriched function conern mRNA processing, transcription regulation and apoptosis. To our knowledge, mRNA maturation has not to date been clearly associated with BRCA1 suppressor tumor activity and would be worth examining further.

In order to identify genes that demonstrated BRCA1 binding and that were differentially translated upon BRCA1 depletion, we compared the RIP microarray presented in this work and our previous translatome analysis (9). From 488 mRNA bound to BRCA1 and 840 mRNA translationally regulated by BRCA1, we identified 16 mRNA which were common to both data sets. This unexpected small number of common mRNA may be explained as follows. A large proportion of BRCA1-regulated mRNA are modulated indirectly by BRCA1 loss. It also suggests that BRCA1 ribonucleocomplexes found in the present study are non-functional in terms of regulation of translation.

In order to confirm that the mRNA identified were indeed direct target of BRCA1, we validated a subset of mRNA choosen among the 16 common mRNA and the 10 most BRCA1-associated mRNA (they present a ratio IP BRCA1/IP IgG >=4.0). Validation of these 16 mRNA was performed by RT-qPCR on RNA used for the microarrays analyses and three additional, independent RIP. RNA levels in immunoprecipitated samples were normalized to input and represented as fold enrichment relative to control IgG (Figure 1B). Fold enrichment values were from 1 to more than 120. It is noteworthy that several mRNA were highly enriched in RIP whereas their level in total cell lysates were quite low (Figure S1). These mRNA may be the most appealing putative BRCA1 targets identified in this screen. In addition, the 3 mRNA choosen in the top 10 list (CCNL2, GOLGA8a and TRIM45) were among the most enriched mRNA in RIP.

BRCA1 modulates translation of endogenous mRNA in MCF-7 cells

To investigate the functional significance of the RIP analysis, we determined whether the mRNAs bound to BRCA1 were subjected to differential translational regulation following BRCA1 depletion. BRCA1 was depleted in 3 independant experiments using previously described BRCA1-targetting siRNA (8) (13) (9). BRCA1 depletion was confirmed at the protein level prior to polysome and RNA isolations (Figure 2A).

We then compared the polysome profiles through sucrose gradients from BRCA1-depleted cells and control cells (Figure 2B). Similar and typical polysome profiles were obtained. However, for a given amount of cytoplasmic extract, the total quantity of 80S monosomes was increased and the polysomes was decreased. This decrease in ribosomes quantity was concordant with the global translation reduction we previously described (13).

We used RT-qPCR to verify the translational regulation of the 16 mRNA found to be associated with BRCA1 and presented in Figure 1B. To do so, we used a total of three independent experiments. First, for each RNA type (polysomal RNA or total RNA prepared from the same cytoplasmic extract as described in the ‘‘Isolation of polysomes and total cytoplasmic RNA’’ section), a ratio between siBRCA1 and control sample was calculated. The ratios for the polysomal RNA (polyRNA=siBRCA1/siControl) and for total RNA (totRNA=siBRCA1/siControl) were calculated. Then, a polyRNA/totRNA Ratio (Ratio of Ratio=RoR) was calculated. Only genes showing a RoR greater than 1.4 or lower than 0.71 in the three replicates were retained for further investigation. Among the 16 mRNA validated as BRCA1-associated in RIP, 7 were translationally deregulated : DBF4B, FNBP4, ADAT2, TRIM45, RHPN1, CCNL2, GOLGA8a (Figure 2C). A detailed picture of the level of these mRNA in polysomal and total cytoplasmic RNA fractions showed that, as previously shown by us (9), BRCA1 loss impacts mRNA association to polysomes whatever their abondance in the total cytoplasmic fraction (Figure S2). Taken together, these results show that BRCA1 appears to be required for the efficient translation of these mRNA.

We further determined the effect of BRCA1 depletion on the levels of 4 proteins for which antibodies were available, namely ADAT2, CCNL2, TRIM45 and DBF4B. Immunoblots were performed for BRCA1-depleted and control MCF-7 cells. ADAT2 protein was induced whereas CCNL2, TRIM45 and DBF4B were reduced in BRCA1-depleted cells (Figure 2D). These results reinforce the results obtained above at the translational level.

Analyses of four proteins predicted to be modified by BRCA1 levels in normal and tumoral mammary cell lines

To further ascertain the role of BRCA1 on the abundance of the 4 proteins studied above, we analyzed the impact of BRCA1 depletion in HMEC non tumoral mammary cells (Figure 3A). We also analyzed the impact of RNAi-mediated gene silencing of BRCA1 in the MDA-MB-231 tumoral cell line (Figure 3B). Accordingly, MCF-7 cells and MDA-MB-231 that over-expressed

BRCA1 exhibited a decreased quantity of ADAT2 protein and an increased quantity of CCNL2, TRIM45 and DBF4B proteins.

Discussion

Because BRCA1 was previously shown to act as a modulator of translation (13), through regulating a subset of mRNA (9), we here searched as to identify such targets. To do so, an unbiased search for mRNAs that physically interact, directly or indirectly, with BRCA1 protein was performed using RIP methodology. By comparing the results of three independent experiments, 2.5% of the expressed mRNA in MCF-7 cells were identified as positive hits increassing more than 1.5 fold in all three arrays. Interstingly, only 0.15% of the lncRNA were enriched in BRCA1 immunoprecipitates (5 over 3326 expressed in MCF-7 cells) and no miRNA were enriched (0 over 3590 expressed in MCF-7 cells). We examined whether the proteins encoded by these mRNA present some common features. Using DAVID softaware, we found that these proteins participate in several cellular mechanisms, such as mRNA processing, transcription and apoptosis, and are not restricted to any particular gene ontology function.

Among the mRNA bound to BRCA1, we identified a subset of 16 mRNA whose translation is impacted by BRCA1. Most of these mRNA that are both bound to BRCA1 and translationally regulated by BRCA1 were less associated to polysomes when BRCA1 was depleted compared to normal conditions. This suggests that the translation of these mRNA may be directly controled by the quantity of BRCA1 present in the cells. In this case, BRCA1 would exert a positive effect on the translation. In the case of ADAT2 mRNA which was more associated to polysomes upon BRCA1 depletion, BRCA1 may act negatively onto the translation of this mRNA.

We examined the features of the 5'UTR of these mRNA to investigate the possibility of a common feature. The analysis of 5'UTR sequences retrieved from UTRdb (16) indicated that their 5'UTR length was at least 1000bp. Using Graphclust software (17) one mRNA among all, namely DBF4B, appeared to contain an IRES into its 5'UTR sequence. It may be worth studying further the mechanism through which BRCA1 stimulates the translation of this mRNA. We may hypothesize that BRCA1 binds to this IRES via an ITAF that remains to be identified. This also let us propose that the translation regulation of DBF4B depends uponcellular stimuli, such as stress that could influence the binding and the subsequent impact of BRCA1 on its translation.

This study clearly shows that, among the 16 mRNA whose translation is directly impacted by BRCA1 through their direct or indirect binding to it, 7 of them displayed substantial modifications of their translation upon BRCA1 loss. Furthermore, the increased translation of ADAT2 and the decreased translation of CCNL2, TRIM45 and DBF4B were confirmed at the protein level in both tumoral and normal mammary cells. This effect was clearly dependant upon the abundance of BRCA1 since mammary cells that over-expressed BRCA1 displayed an opposite effect to the cells depleted in brca1. For these proteins, we identified studies corroborating their regulation in distinct tumor types. We discuss below results concerning them.

In complex with ADAT3 (Adenosine Deaminase, tRNA Specific 3), ADAT2 generates inosine at the first position of the anticodon of tRNA. Because this inosine can translate codons ending in uracil, cytosine or adenine, this modification enlarges the codon recognition capacity during protein synthesis (18). ADAT2 therefore plays a crucial role in the efficiency, the fidelity and the regulation of the translation. Interestingly, this tRNA modification has been shown to be essential to cell cycle progression in G1/S and G2/M transitions in yeast (19). We here propose that through negative translation regulation of ADAT2, BRCA1 may protect cells from an excessive codon recognition enlargement, a way to control the cellular integrity. Therefore, BRCA1 migth be implicated in regulation of translation not only through its interaction with PABP1 but also through one of its ARNm target, namely ADAT2. Recently, human diseases associated with tRNA modifications have been reported (20), including cancer and neurological disease. Mutation in ADAT3 causes intellectual disability and strabismus (21). It would be worth studying whether ADAT2 deficiency is observed in breast cancers.

By its interaction with RNA polymerase II and CDK11, CCNL2 (Cyclin L2) is a transcriptional regulator involved in pre-mRNA splicing (22) (23). Overexpression of CCNL2 can suppress the growth of SMMC 7721 human hepatocellular carcinoma cells, inducing apoptosis (22). Moreover, overexpression of CCNL2 into BCG823 human gastric cells inhibits their growth and enhances their chemosensitivity by inducing G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis (24). More recently, a preclinical study conducted in breast cancer cell lines and tissue arrays has reported that CCNL2 mRNA transcript expression was lower in basal breast cancer than in normal breast (25). In this context, our findings that BRCA1 positively regulates CCNL2 protein abundance reinforces these previous results.

In complex with CDC7, DBF4B (Protein DBF4 homolog B) is required for efficient progression of S and M phases (26) and for DNA replication (27). Here, we found that BRCA1 positively regulates the translation of the DBF4B mRNA. This leads to propose that in absence of BRCA1 such as in breast cancer, DBF4B is poorly expressed, leading to an inefficient DNA replication, an increased amount of DNA damages, that are marks of tumorigenesis.

TRIM45 (Tripartite Motif Containing 45) belongs to a family of tripartite motif (TRIM) proteins that play important roles in a variety of functions, including cell proliferation, differentiation, oncogenesis and apoptosis. TRIM45 acts as a transcriptional repressor in mitogen-activated protein kinase signaling pathway (28). TRIM45 negatively regulates the transcriptional activity of NF-kB and suppresses cell proliferation (29). In this way, knockdown of TRIM45 promotes growth of HeLa cells (30). Finally, a large scale gene expression arrays analysis conducted in breast cancer samples from Taiwanese women showed that TRIM45 expression was diminished (31). Because we identifed a positive regulation of translation of TRIM45 mRNA by BRCA1, we propose that the absence of BRCA1 leads to downexpression of TRIM45, therefore favoring cell proliferation and tumorigenesis.

To our knowledge, genome-wide association of mRNA with BRCA1 has not been described previously. In addition, few studies performing small scale analysis of BRCA1-dependent RIP identified recently some BRCA1-bound RNA. Using this approach, It has been proposed that BRCA1 may bind indirectly miRNA to regulate their biogenesis (32). BRCA1 has been implicated into mRNA splicing complex playing a role in the cellular response to DNA damage (33). Finally, BRCA1 has been dexribed to interact with lncRNA to regulate homologous recombination (34). Using Chip analysis, an indirect association between BRCA1 and DNA double-strand break (DSB)-induced small RNA (diRNA) has been reported recently (35). However, no direct association with BRCA1 has been shown until now. Two large scale analyses searching for RBP by using UV-crosslink failed to identify BRCA1 among the proteins identified (36) (37).

We may ask whether BRCA1 is the only tumour suppressor that exerts a role in translation. The notion that tumor suppresors may Impact translation has recently emerged. P53 has been reported to be a translational regulator by interfering with several molecular mechanisms regulating translation such as RNA polymerase I and III activity and ribosome composition (38). P53 has also been described as ITAF of the FGF2 mRNA IRES (39). PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog), another tumor suppressor implicated in breast cancer, also controls translation. In response to the loss of PTEN activity, the mTORC1 arm of the PI3K/AKT/mTOR pathway is activated, resulting in the phosphorylation of p70 ribosomal protein S6 kinase (S6K) and inhibition of 4EBP1 and subsequent enhanced translation of specific mRNA crucial for cell growth and proliferation (40). The tumor suppressor PDCD4 (Programmed cell death 4) is recognized as a modulator of translation through different mechanisms. It interacts with eIF4A and eIF4G to enhance translation (41). It interacts also with the IRES of XIAP and Bcl-XL as an ITAF (42). Here, by using a translational regulatory mechanism different from those previously described for these tumor suppressors, BRCA1 is worth considering as new major key player in translation. In addition, ADAT2 may constitute a new diagnostic marker or a new therapeutic target for BRCA1 deficient breast tumours. All together, these data open a new way to interpret how tumour suppressors control cell maintenance.

Bibliographie

1. Foulkes, W. D. (2008) Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* **359**, 2143-2153
2. Mueller, C. R., and Roskelley, C. D. (2003) Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res* **5**, 45-52
3. Venkitaraman, A. R. (2014) Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science* **343**, 1470-1475
4. Savage, K. I., and Harkin, D. P. (2015) BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS J* **282**, 630-646
5. Brocardo, M., and Henderson, B. R. (2008) APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. *Trends Cell Biol* **18**, 587-596
6. Henderson, B. R. (2005) Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking. *Bioessays* **27**, 884-893
7. Thompson, M. E. (2010) BRCA1 16 years later: nuclear import and export processes. *FEBS J* **277**, 3072-3078
8. Moreau, K., Dizin, E., Ray, H., Luquain, C., Lefai, E., Foufelle, F., Billaud, M., Lenoir, G. M., and Venezia, N. D. (2006) BRCA1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of biological chemistry* **281**, 3172-3181
9. Dacheux, E., Vincent, A., Nazaret, N., Combet, C., Wierinckx, A., Mazoyer, S., Diaz, J. J., Lachuer, J., and Venezia, N. D. (2013) BRCA1-Dependent Translational Regulation in Breast Cancer Cells. *PLoS One* **8**, e67313
10. Hedgepeth, S. C., Garcia, M. I., Wagner, L. E., 2nd, Rodriguez, A. M., Chintapalli, S. V., Snyder, R. R., Hankins, G. D., Henderson, B. R., Brodie, K. M., Yule, D. I., van Rossum, D. B., and Boehning, D. (2015) The BRCA1 tumor suppressor binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to stimulate apoptotic calcium release. *The Journal of biological chemistry* **290**, 7304-7313
11. Magnard, C., Bachelier, R., Vincent, A., Jaquinod, M., Kieffer, S., Lenoir, G. M., and Venezia, N. D. (2002) BRCA1 interacts with acetyl-CoA carboxylase through its tandem of BRCT domains. *Oncogene* **21**, 6729-6739
12. Ray, H., Moreau, K., Dizin, E., Callebaut, I., and Venezia, N. D. (2006) ACCA phosphopeptide recognition by the BRCT repeats of BRCA1. *Journal of molecular biology* **359**, 973-982
13. Dizin, E., Gressier, C., Magnard, C., Ray, H., Decimo, D., Ohlmann, T., and Dalla Venezia, N. (2006) BRCA1 interacts with poly(A)-binding protein: implication of BRCA1 in translation regulation. *The Journal of biological chemistry* **281**, 24236-24246
14. Vincent, A., Berthel, E., Dacheux, E., Magnard, C., and Venezia, N. L. (2016) BRCA1 affects protein phosphatase 6 signalling through its interaction with ANKRD28. *Biochem J* **473**, 949-960
15. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44-57

16. Pesole, G., Liuni, S., Grillo, G., Licciulli, F., Larizza, A., Makalowski, W., and Saccone, C. (2000) UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* **28**, 193-196
17. Heyne, S., Costa, F., Rose, D., and Backofen, R. (2012) GraphClust: alignment-free structural clustering of local RNA secondary structures. *Bioinformatics* **28**, i224-232
18. Gerber, A. P., and Keller, W. (1999) An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs. *Science* **286**, 1146-1149
19. Tsutsumi, S., Sugiura, R., Ma, Y., Tokuoka, H., Ohta, K., Ohte, R., Noma, A., Suzuki, T., and Kuno, T. (2007) Wobble inosine tRNA modification is essential to cell cycle progression in G(1)/S and G(2)/M transitions in fission yeast. *The Journal of biological chemistry* **282**, 33459-33465
20. Torres, A. G., Batlle, E., and Ribas de Pouplana, L. (2014) Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends Mol Med* **20**, 306-314
21. Alazami, A. M., Hijazi, H., Al-Dosari, M. S., Shaheen, R., Hashem, A., Aldahmesh, M. A., Mohamed, J. Y., Kentab, A., Salih, M. A., Awaji, A., Masoodi, T. A., and Alkuraya, F. S. (2013) Mutation in ADAT3, encoding adenosine deaminase acting on transfer RNA, causes intellectual disability and strabismus. *J Med Genet* **50**, 425-430
22. Yang, L., Li, N., Wang, C., Yu, Y., Yuan, L., Zhang, M., and Cao, X. (2004) Cyclin L2, a novel RNA polymerase II-associated cyclin, is involved in pre-mRNA splicing and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* **279**, 11639-11648
23. Loyer, P., Trembley, J. H., Grenet, J. A., Busson, A., Corlu, A., Zhao, W., Kocak, M., Kidd, V. J., and Lahti, J. M. (2008) Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *The Journal of biological chemistry* **283**, 7721-7732
24. Li, H. L., Huang, D. Z., Deng, T., Zhou, L. K., Wang, X., Bai, M., and Ba, Y. (2012) Overexpression of cyclin L2 inhibits growth and enhances chemosensitivity in human gastric cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* **13**, 1425-1430
25. Kren, B. T., Unger, G. M., Abedin, M. J., Vogel, R. I., Henzler, C. M., Ahmed, K., and Trembley, J. H. (2015) Preclinical evaluation of cyclin dependent kinase 11 and casein kinase 2 survival kinases as RNA interference targets for triple negative breast cancer therapy. *Breast Cancer Res* **17**, 19
26. Yoshizawa-Sugata, N., Ishii, A., Taniyama, C., Matsui, E., Arai, K., and Masai, H. (2005) A second human Dbf4/ASK-related protein, Drf1/ASKL1, is required for efficient progression of S and M phases. *The Journal of biological chemistry* **280**, 13062-13070
27. Takahashi, T. S., and Walter, J. C. (2005) Cdc7-Drf1 is a developmentally regulated protein kinase required for the initiation of vertebrate DNA replication. *Genes Dev* **19**, 2295-2300

28. Wang, Y., Li, Y., Qi, X., Yuan, W., Ai, J., Zhu, C., Cao, L., Yang, H., Liu, F., Wu, X., and Liu, M. (2004) TRIM45, a novel human RBCC/TRIM protein, inhibits transcriptional activities of ElK-1 and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 9-16
29. Shibata, M., Sato, T., Nukiwa, R., Ariga, T., and Hatakeyama, S. (2012) TRIM45 negatively regulates NF-kappaB-mediated transcription and suppresses cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **423**, 104-109
30. Sato, T., Takahashi, H., Hatakeyama, S., Iguchi, A., and Ariga, T. (2015) The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway. *Oncogene* **34**, 1280-1291
31. Huang, C. C., Tu, S. H., Lien, H. H., Jeng, J. Y., Huang, C. S., Huang, C. J., Lai, L. C., and Chuang, E. Y. (2013) Concurrent gene signatures for han chinese breast cancers. *PLoS One* **8**, e76421
32. Kawai, S., and Amano, A. (2012) BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *J Cell Biol* **197**, 201-208
33. Savage, K. I., Gorski, J. J., Barros, E. M., Irwin, G. W., Manti, L., Powell, A. J., Pellagatti, A., Lukashchuk, N., McCance, D. J., McCluggage, W. G., Schettino, G., Salto-Tellez, M., Boultwood, J., Richard, D. J., McDade, S. S., and Harkin, D. P. (2014) Identification of a BRCA1-mRNA splicing complex required for efficient DNA repair and maintenance of genomic stability. *Mol Cell* **54**, 445-459
34. Sharma, V., Khurana, S., Kubben, N., Abdelmohsen, K., Oberdoerffer, P., Gorospe, M., and Misteli, T. (2015) A BRCA1-interacting lncRNA regulates homologous recombination. *EMBO Rep* **16**, 1520-1534
35. Wang, Q., and Goldstein, M. (2016) Small RNAs Recruit Chromatin-Modifying Enzymes MMSET and Tip60 to Reconfigure Damaged DNA upon Double-Strand Break and Facilitate Repair. *Cancer Res* **76**, 1904-1915
36. Baltz, A. G., Munschauer, M., Schwanhausser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., Wyler, E., Bonneau, R., Selbach, M., Dieterich, C., and Landthaler, M. (2012) The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol Cell* **46**, 674-690
37. Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., Davey, N. E., Humphreys, D. T., Preiss, T., Steinmetz, L. M., Krijgsveld, J., and Hentze, M. W. (2012) Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**, 1393-1406
38. Marcel, V., Catez, F., and Diaz, J. J. (2015) p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. *Oncogene* **34**, 5513-5523
39. Galy, B., Creancier, L., Prado-Lourenco, L., Prats, A. C., and Prats, H. (2001) p53 directs conformational change and translation initiation blockade of human fibroblast growth factor 2 mRNA. *Oncogene* **20**, 4613-4620
40. Song, M. S., Salmena, L., and Pandolfi, P. P. (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 283-296

41. Lankat-Buttgereit, B., and Goke, R. (2009) The tumour suppressor Pdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol Cell* **101**, 309-317
42. Liwak, U., Thakor, N., Jordan, L. E., Roy, R., Lewis, S. M., Pardo, O. E., Seckl, M., and Holcik, M. (2012) Tumor suppressor PDCD4 represses internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic proteins and is regulated by S6 kinase 2. *Mol Cell Biol* **32**, 1818-1829

Legend to figures

Figure 1 : BRCA1 associates with endogenous mRNA in MCF-7 cells

A/ Western blot confirming BRCA1 immunoprecipitation using OP92 antibody when compared with non specific isotype-matched IgG (NR). Input represents 5% of total cellular cell lysate.

B/ BRCA1 immunoprecipitation was followed by RNA isolation. Immunoprecipitated RNA was quantified by RT-qPCR and expressed as fold enrichment over input compared to enrichment with negative control performed with IgG (NR). Inputs are shown in Figure S1. Results are representative of the average Fold Enrichment +/- SEM from three independent experiments.

Figure 2 : BRCA1 modulates translation of endogenous mRNA in MCF-7 cells

A/ Western blot confirming siRNA inhibition of BRCA1 levels when compared with control siRNA. Tubulin served as loading control.

B/ Polysome profiles of BRCA1-depleted cells and control cells. A decrease in polysome assembly with a concomitant increase in 80S monosomes was found in BRCA1-depleted cells.

C/ RT-qPCR analyses of differentially translated mRNA upon BRCA1 depletion. Total RNA and polysomal-associated RNA from cells transfected with BRCA1-targetting siRNA or control siRNA were reverse transcribed and 16 transcripts identified in the microarray analysis were quantified by real time PCR. qPCR analysis was performed in triplicate. Analysis of mRNA levels for each target and calculation of RoR were performed as described in Materials and Methods. Results are representative of the average RoR +/- SEM from three independent experiments.

D/ Analysis of four proteins predicted to be modified by BRCA1 depletion. Cells transfected with BRCA1-targetting siRNA or control siRNA and total protein extracts were collected 72 h later and subjected to immunoblot analysis for ADAT2, CCNL2, DBF4B and TRIM45 proteins. Blots used b-actin and a-tubulin as loading controls. The blots shown are representative of at least three independent experiments.

Figure 3 : Analyses of four proteins predicted to be modified by BRCA1 levels in normal and tumoral mammary cell lines

A and B/ HMEC Cells (A) and MDA-MB-231 cells (B) transfected with BRCA1-targetting siRNA or control siRNA and total protein extracts were collected 72 h later and subjected to immunoblot analysis for ADAT2 and DBF4B (A and B), CCNL2 and TRIM45 (A) proteins.

C and D/ MCF-7 cells (C) and MDA-MB-231 cells (D) transfected with BRCA1 expressing plasmid or empty plasmid as control were subjected to immunoblot analysis for ADAT2 and DBF4B (C and D), CCNL2 and TRIM45 (C) proteins.

Blots used b-actin and/or a-tubulin or GAPDH as loading controls. The blots shown are representative of at least three independent experiments.

Supplementary Material

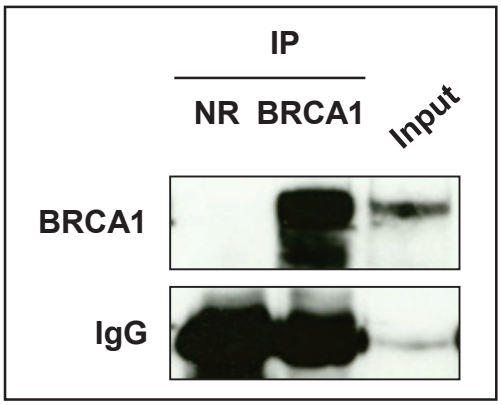
Figure S1 : Quantification by RT-qPCR of RNA in total extract of MCF-7 cells
Each RNA that was immunoprecipitated by BRCA1 antibody was quantified in total extract of MCF-7 cells (inputs) and was normalized to TRMT10B.

Figure S2 : RT-qPCR analyses of differentially translated mRNA upon BRCA1 depletion.
For each gene, the ratios for the polysomal RNA (polyRNA=siBRCA1/siControl) (grey) and for total RNA (totRNA=siBRCA1/siControl) (black) were calculated.

Table S1 : Primers used for qPCR

Table S2 : Gene ontology analysis of immunoprecipitated RNA
GO enrichment was determined using the Functional annotation clustering tools from DAVID.
Gene Ontology Analysis using DAVID Functional annotation Clustering
The Selected parameters were as follows : Enrichment Score > 1,75 and Gene Ontology (GO) terms only.

A


IP
NR BRCA1
Input
BRCA1
IgG

B

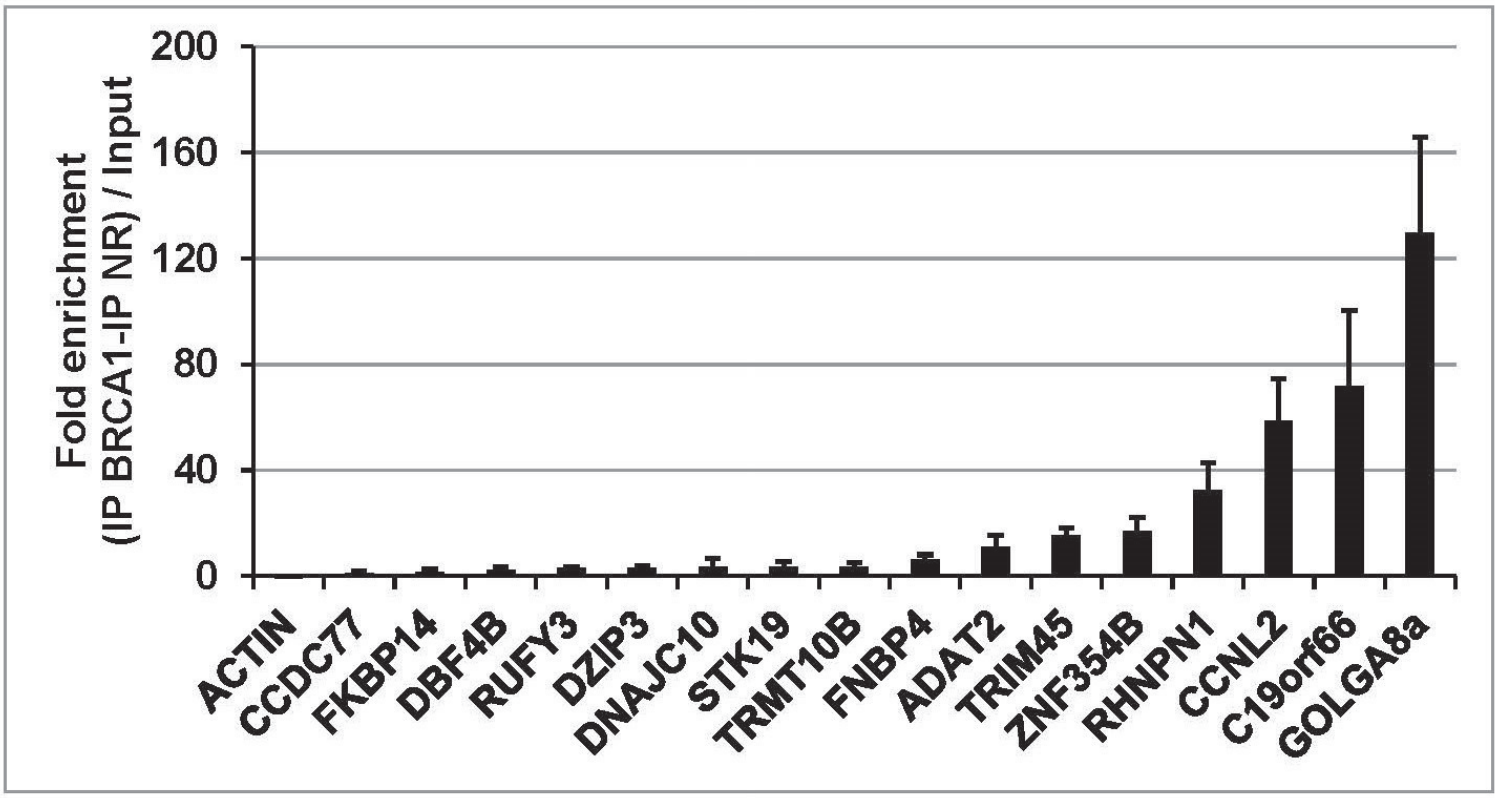
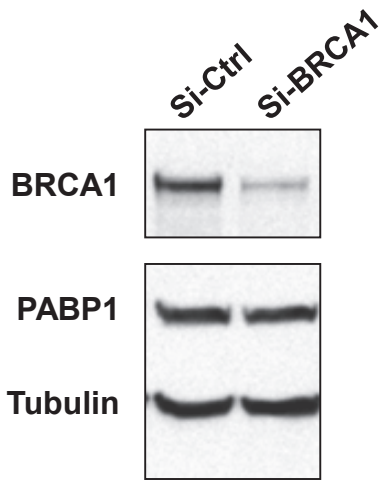

Fold enrichment
(IP BRCA1-IP NR) / Input
200
160
120
80
40
0
ACTIN
CCDC77
FKBP14
DBF4B
RUFY3
DZIP3
DNAJC10
STK19
TRMT10B
FNBP4
ADAT2
TRIM45
ZNF354B
RHNPN1
CCNL2
C19orf66
GOLGA8a

Figure 1

A


Si-Ctrl
Si-BRCA1
BRCA1
PABP1
Tubulin

B

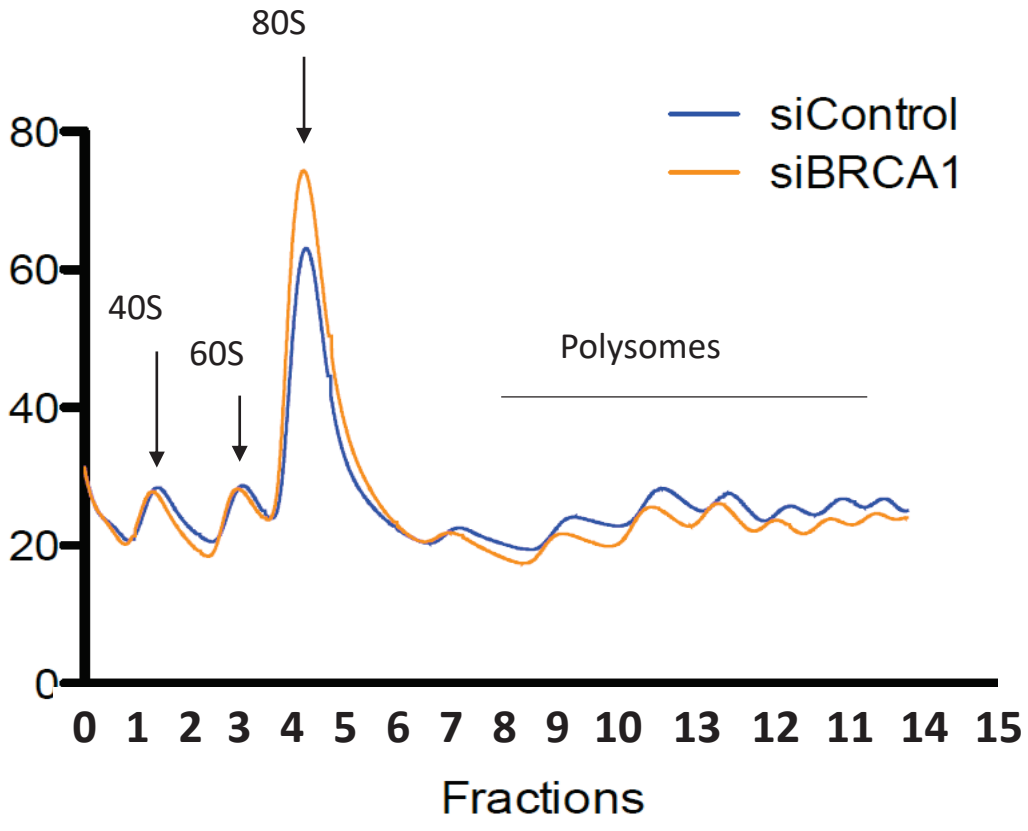
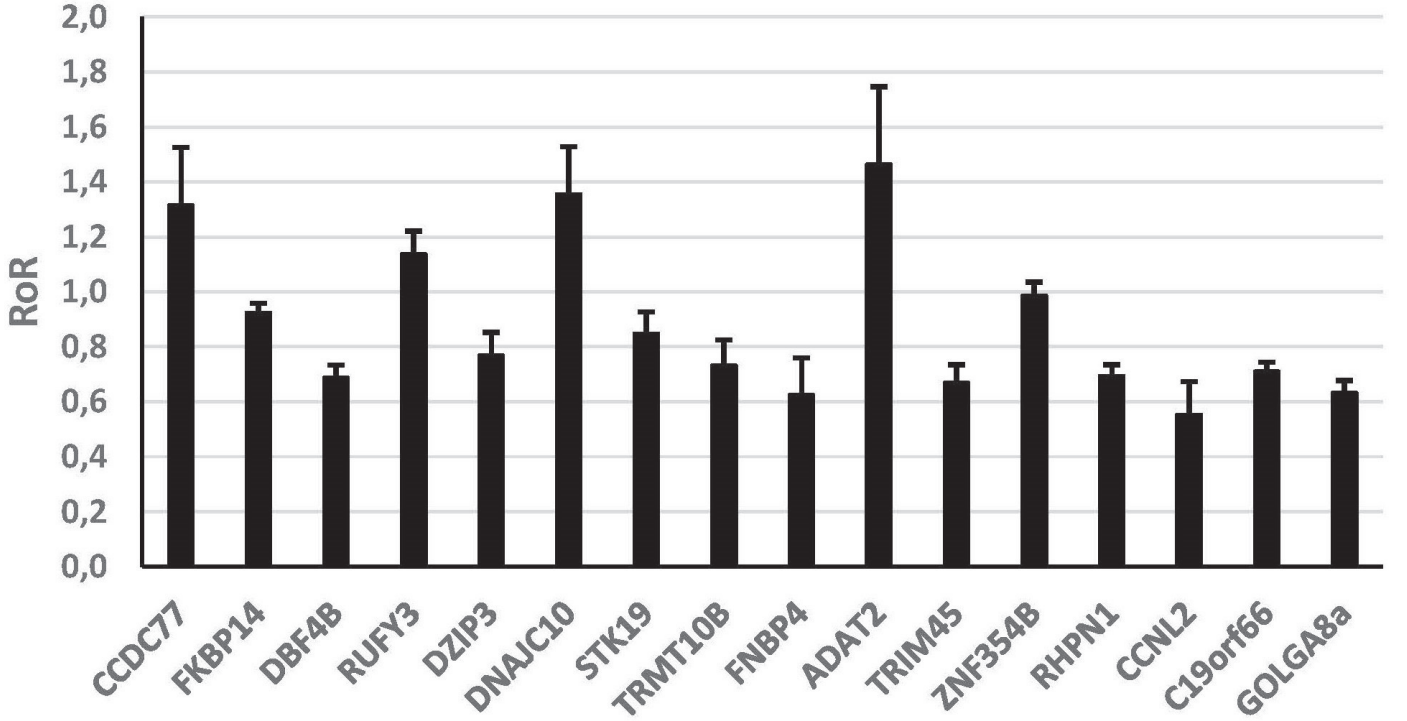

80S
40S
60S
Polysomes
siControl
siBRCA1
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 13 12 11 14 15
Fractions

Figure 2

C


RoR
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
CCDC77
FKBP14
DBF4B
RUFY3
DZIP3
DNAJC10
STK19
TRMT10B
FNBP4
ADAT2
TRIM45
ZNF354B
RHPN1
CCNL2
C19orf66
GOLGA8a

D

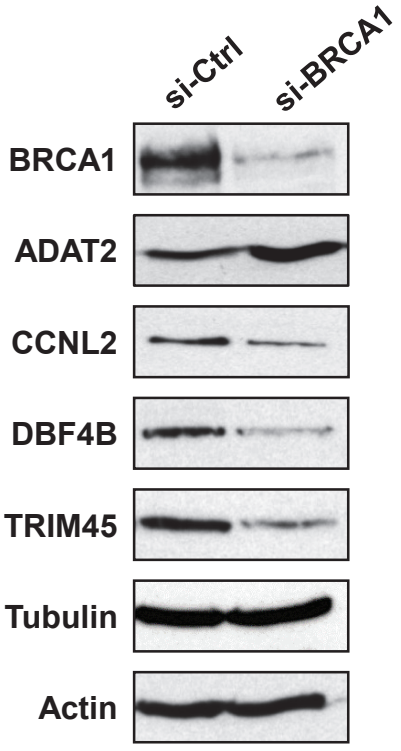

si-Ctrl
si-BRCA1
BRCA1
ADAT2
CCNL2
DBF4B
TRIM45
Tubulin
Actin

Figure 2

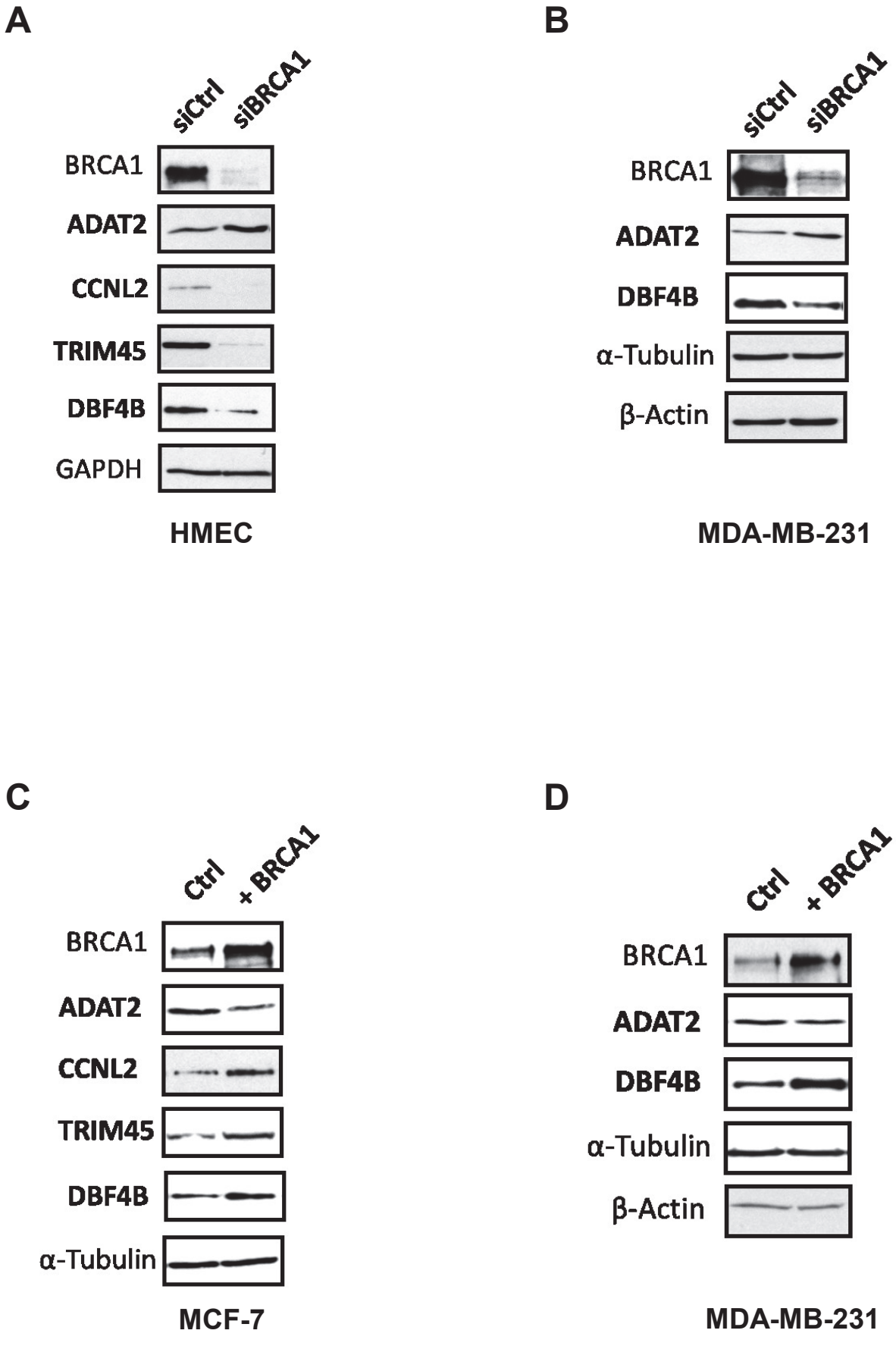

A
siCtrl
siBRCA1
BRCA1
ADAT2
CCNL2
TRIM45
DBF4B
GAPDH
HMEC
B
siCtrl
siBRCA1
BRCA1
ADAT2
DBF4B
α-Tubulin
β-Actin
MDA-MB-231
C
Ctrl
+ BRCA1
BRCA1
ADAT2
CCNL2
TRIM45
DBF4B
α-Tubulin
MCF-7
D
Ctrl
+ BRCA1
BRCA1
ADAT2
DBF4B
α-Tubulin
β-Actin
MDA-MB-231

Figure 3

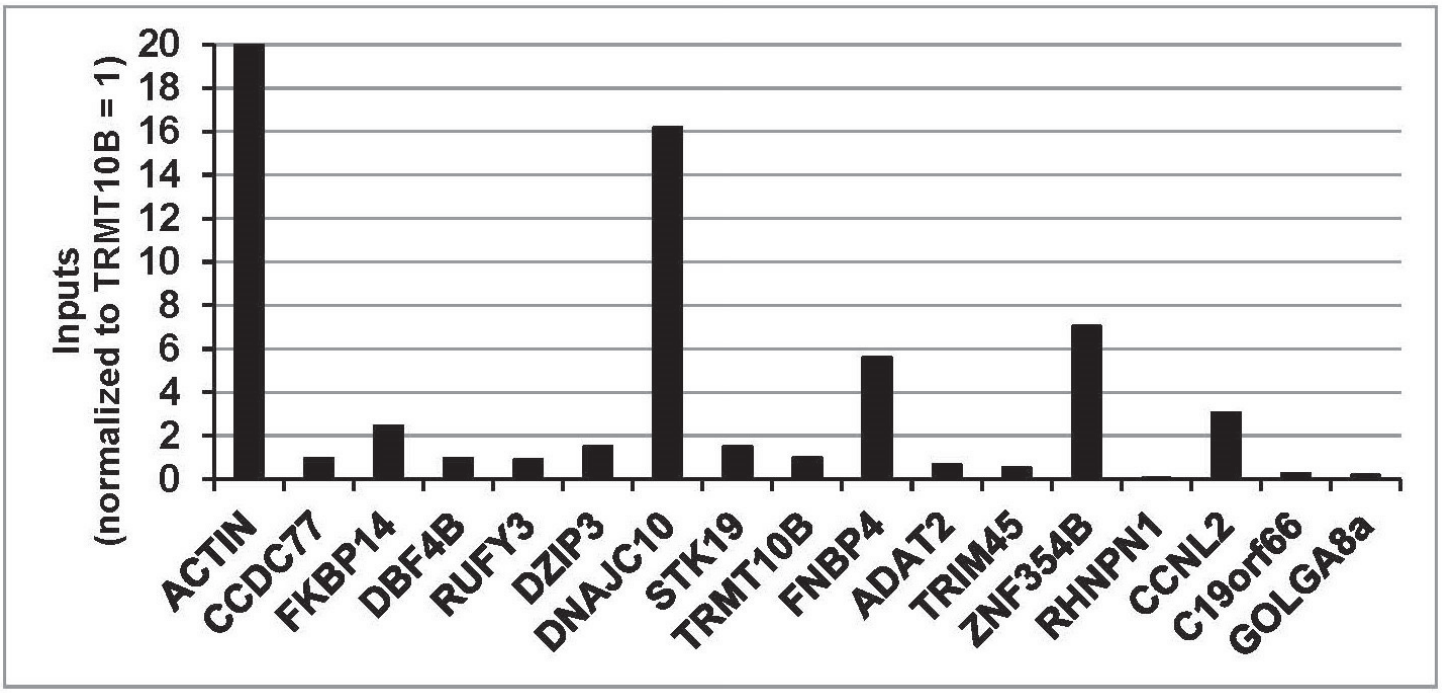

Inputs
(normalized to TRMT10B = 1)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
ACTIN
CCDC77
FKBP14
DBF4B
RUFY3
DZIP3
DNAJC10
STK19
TRMT10B
FNBP4
ADAT2
TRIM45
ZNF354B
RHNPN1
CCNL2
C19orf66
GOLGA8a

Figure S1

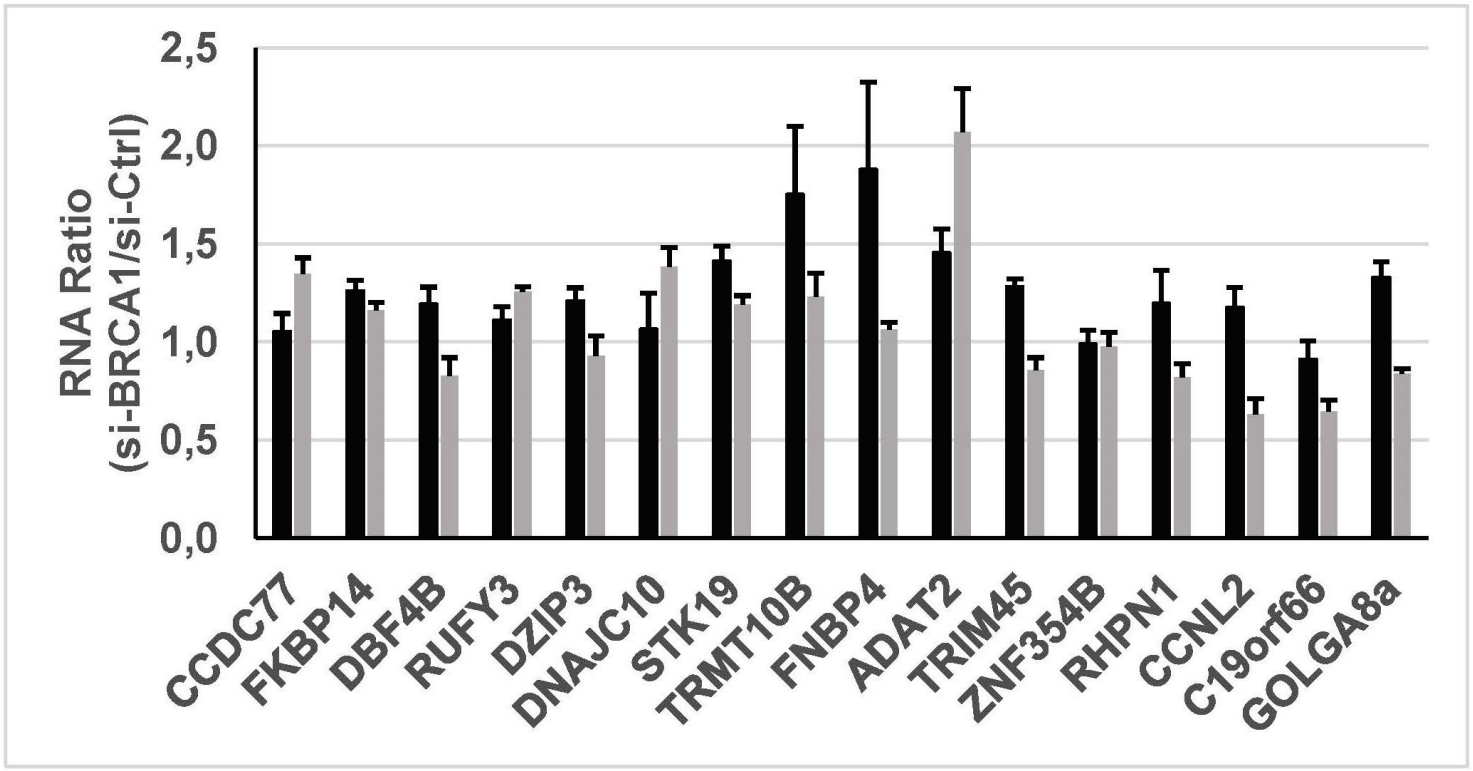

RNA Ratio
(si-BRCA1/si-Ctrl)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
CCDC77
FKBP14
DBF4B
RUFY3
DZIP3
DNAJC10
STK19
TRMT10B
FNBP4
ADAT2
TRIM45
ZNF354B
RHPN1
CCNL2
C19orf66
GOLGA8a

Figure S2

Gene	Primer F (5' > 3')	Primer R (5' > 3')
ACTIN	C T C T T C C A G C C T T C C T T C C T	T G T T G G C G T A C A G G T C T T T G
ADAT2	T G T C G T C A A A G T G G C A A G A G	G A T T T T C A T C A G G C G G A G A G
C19orf66	G G C T C T G A T G A G G A A A T T C G	T G G G C A T C C A G A T C G T T A C T
CCDC77	A A A A G T G T T G C C C G T T A T G C	G G A A A T G C A C T G C T C T T G G T
CCNL2	T G C C T G C A T T T A T C T T G C T G	A A G A A A C C A A T G G G G A C G A
DBF4B	G A C T C G G T G C C T C T A A G C A G	A C G T G C A G A A T C C T C A C T C C
DNAJC10	T G C A A T G C A G C A T G T T A G A A G	C A A T A C C A G C A G C A A A A G C A
DZIP3	T G C G G T A G A C A G T T G G A A T G	T G G A G G C A A G G T A C T C A A G G
FKBP14	T C G C T G C T T T T G T A G G G A C T	G C C C C A A T C A A A G A A G T G A C
FNBP4	G G A A G C A G C A A C A T C T A C C C	C C G T G T T C T C A T C C C A G A C T
GOLGA8a	G A T A C G C A T C G G G T A G A G G A	C A C C T C A G A G G A C A C T G C T G
POP4	G C C A A G C T C T T A A A G G C A G A	C T T T C A G G C G G T C T T C T T T G
RHPN1	G C C C A G G A A T G T G T G T T T G	C C G G T G C A C T A G C C T G T A C T
RUFY3	G G T G A T G G A G C A C T G T C T G A	G C T G T T A T C T C T G C G G C T T C
STK19	C T T G G C C T C A C C T A C C A T G T	G C T G A G C A A T G A T G A G C A G A
TRIM45	G T T G C C G T T G T C C C T A A A G A	T T G A T G C A G A C C C A C A C A G T
TRMT10B	T G T G T G A G G A T G A A T G A T G G A	G G T A C A C A A G G G T T T C C A A G G
ZNF354B	T G G G A G G T G G A G A A A G A C A G	T G A A G T T C C A G G G T T C A T C C

Table S1

Category	Term	Gene number	% GENE	Fold Enrichment	PValue
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 3.72				
GOTERM_CC_FAT	GO:0031974~membrane-enclosed lumen	61	14,73	1,74	1,3E-05
GOTERM_CC_FAT	GO:0043233~organelle lumen	59	14,25	1,71	2,9E-05
GOTERM_CC_FAT	GO:0070013~intracellular organelle lumen	58	14,01	1,72	2,9E-05
GOTERM_CC_FAT	GO:0031981~nuclear lumen	50	12,08	1,82	3,2E-05
GOTERM_CC_FAT	GO:0005730~nucleolus	26	6,28	1,97	1,5E-03
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 2.56				
GOTERM_MF_FAT	GO:0000166~nucleotide binding	74	17,87	1,56	5,3E-05
GOTERM_MF_FAT	GO:0005524~ATP binding	50	12,08	1,60	7,8E-04
GOTERM_MF_FAT	GO:0032559~adenyl ribonucleotide binding	50	12,08	1,58	1,0E-03
GOTERM_MF_FAT	GO:0030554~adenyl nucleotide binding	52	12,56	1,56	1,1E-03
GOTERM_MF_FAT	GO:0001883~purine nucleoside binding	52	12,56	1,54	1,5E-03
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 2.34				
GOTERM_CC_FAT	GO:0044451~nucleoplasm part	22	5,31	2,09	1,9E-03
GOTERM_CC_FAT	GO:0016607~nuclear speck	8	1,93	4,10	3,3E-03
GOTERM_CC_FAT	GO:0016604~nuclear body	9	2,17	2,83	1,4E-02
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 2.24				
GOTERM_BP_FAT	GO:0006396~RNA processing	25	6,04	2,22	3,9E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0008380~RNA splicing	16	3,86	2,73	8,0E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0016071~mRNA metabolic process	18	4,35	2,36	1,7E-03
GOTERM_CC_FAT	GO:0005681~spliceosome	9	2,17	3,60	3,5E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0006397~mRNA processing	15	3,62	2,27	6,7E-03
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 2.15				
GOTERM_CC_FAT	GO:0005730~nucleolus	26	6,28	1,97	1,5E-03
GOTERM_CC_FAT	GO:0043232~intracellular non-membrane-bounded organ	68	16,43	1,38	3,0E-03
GOTERM_CC_FAT	GO:0043228~non-membrane-bounded organelle	68	16,43	1,38	3,0E-03
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 1.75				
GOTERM_MF_FAT	GO:0031593~polyubiquitin binding	3	0,72	15,79	1,4E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0043130~ubiquitin binding	4	0,97	7,02	1,9E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0032182~small conjugating protein binding	4	0,97	6,77	2,0E-02

Table S2

Discussion

Partie 1
Recherche fondamentale
BRCA1 régule la traduction d'ADAT2, CCNL2, DBF4B & TRIM45

A. BRCA1 est un co-facteur traductionnel

Depuis la découverte dans notre laboratoire de l'interaction des protéines BRCA1 et PABP1 dans le cytoplasme, et le contrôle qu'exerce BRCA1 sur la synthèse protéique (Dizin et al. 2006), nous avons recherché quels étaient les ARNm cibles de l'activité traductionnelle de BRCA1. Une étude large échelle conduite au laboratoire dans les cellules MCF-7 deplétées en BRCA1 avait permis d'établir une liste de candidats dont la traduction est dérégulée en l'absence de la protéine BRCA1 (Dacheux et al. 2013). Toutefois, cette étude n'avait pas permis de déterminer si cette régulation traductionnelle induite par BRCA1 résulte des conséquences secondaires des programmes et voies cellulaires impactées par l'absence de BRCA1, ou si BRCA1 peut se comporter comme un facteur directement impliqué dans le processus de traduction en interagissant de façon plus ou moins directe avec certains ARNm pour moduler leur traduction. En effet, l'extinction de l'expression de BRCA1 par ARN interférent (environ 60 %) obtenue dans l'étude précédente au laboratoire nécessitait 72h de transfection, ce qui laisse le temps au programme d'expression génique de la cellule d'être modifié à un autre niveau que le niveau traductionnel.

Un objectif primordial de mon étude a donc été d'identifier les ARNm « cibles » de BRCA1, c'est-à-dire ceux dont la traduction est directement régulée par BRCA1 afin de comprendre comment elle participe spécifiquement au contrôle de certains d'entre eux dans la cellule.

1. Identification des ARNm qui interagissent avec les complexes multi-protéiques contenant BRCA1 par la technique d'immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques (RIP)

Une des premières étapes a été de rechercher les ARNm qui sont associés aux complexes multi-protéiques contenant BRCA1. En effet, lorsque j'ai initié ce travail il n'y avait pas d'évidence que BRCA1 puisse lier directement les ARNm (Castello et al. 2012; Baltz et al. 2012). Pour identifier les ARNm cibles de BRCA1, j'ai donc purifié les complexes protéiques contenant la protéine BRCA1, ses partenaires protéiques et les ARNm. Plusieurs techniques permettant l'isolement des complexes protéiques étaient disponibles dans la littérature. Certains laboratoires utilisent des agents chimiques tels que le formaldéhyde afin de fixer les complexes par pontage covalent, technique appelée « cross-link ». Ce procédé permet d'améliorer l'efficacité de récolte des protéines et acides nucléiques associés. En revanche, la récupération des ARNm fixés nécessite le chauffage des échantillons 5h à 70°C ce qui peut endommager une partie du matériel biologique. D'autre part, plusieurs laboratoires ont publié des résultats obtenus sans cross-link et rapportent que cette technique génère du bruit de fond et peut être une entrave à la bonne interprétation des résultats (Tcherkezian et al. 2014). La protéine BRCA1 n'étant pas une protéine capable d'interagir avec l'ARNm directement (RBP), la technique de fixation

des protéines sur les ARNm par les ultraviolets (cross-link aux UV) n'était pas adaptée. Nous avons choisi de rechercher les ARNm fixés à BRCA1 selon deux approches menées en parallèle : une préparation de RIP après cross-link (CL) au formaldéhyde du matériel cellulaire, et une préparation de RIP à partir de lysats cellulaires non traités. Ainsi, sans apriori et en fonction des résultats obtenus nous conserverions soit une des deux listes d'ARNm co-immunoprécipités soit les deux listes obtenues avec et sans CL. J'ai dans un premier temps, testé différents lots d'anticorps afin de sélectionner l'anticorps anti-BRCA1 le plus spécifique. Puis j'ai réalisé les RIP avec et sans CL. La condition CL nécessitait une sonication des échantillons ainsi qu'un dé-cross link des complexes par le chauffage des échantillons. J'ai réalisé trois séries d'immunoprécipitation avec et sans cross link sur des lysats totaux de cellules MCF-7 avec un anticorps anti-BRCA1 et un anticorps non relevant qui a servi de contrôle négatif. Les ARNm co-immunoprécipités ont été analysés avec des puces Affymetrix « Human Transcriptome Array GeneChip HG-ST 2.0 » en collaboration avec la plateforme lyonnaise ProfileXpert.

Les résultats ont montré que 704 ARNm (dont 565 transcrits à partir de gènes codants) étaient présents dans les RIP BRCA1 sans CL et 510 ARNm (dont 341 transcrits à partir de gènes codants) dans les RIP avec CL. Seulement 10 ARNm étaient communs aux deux approches. Ceci peut s'expliquer, au moins en partie, par l'utilisation de deux protocoles différents : l'un fondé sur la fixation des complexes par le formaldéhyde suivie du chauffage des échantillons, l'autre plus classique.

Nous avons dans un deuxième temps croisé chacune des deux listes d'ARNm obtenues par chacune des deux techniques de RIP avec la liste des ARNm différemment associés aux polysomes identifiés précédemment par notre laboratoire. Ces ARNm régulés pour leur traduction par BRCA1 dans des cellules MCF-7 avaient été analysés avec des puces Affymetrix « 3'IVT Array GeneChip HG-U133 » (Dacheux et al. 2013). La liste d'ARNm co-immunoprécipités par BRCA1 en condition de CL présentait 4 ARNm cibles communs avec la liste d'ARNm traductionnellement régulés. Ils codent pour des protéines aux fonctions très peu connues. En revanche, la liste d'ARNm co-immunoprécipités par BRCA1 sans CL présentait 16 cibles communes qui codent pour des protéines ayant des fonctions nécessaires au maintien de l'intégrité cellulaire et donc attendues pour BRCA1. Le nombre restreint de cibles communes aux deux études pourtant conduites dans notre laboratoire et sur les mêmes cellules peut s'expliquer par le fait que les analyses à large échelle ont été conduites avec des puces Affymetrix différentes. De plus, il est fort probable que bon nombre des ARNm dérégulés traductionnellement soient différents de ceux associés aux complexes ribonucléoprotéiques contenant BRCA1. En effet, les RIP ont été réalisées à partir de lysats totaux alors que les ARNm analysés pour leur traduction ont été préparés à partir de la fraction cytoplasmique des cellules. Tout ceci suggère qu'un grand nombre des ARN co-immunoprécipités par BRCA1 le soit pour participer à des fonctions de BRCA1 autres que la traduction.

Pour la suite de mon étude, j'ai choisi de m'intéresser aux ARNm associés à BRCA1, sans CL. Parce que ces cibles ne présentaient pas des scores d'association avec BRCA1 les plus élevés, nous avons également sélectionné les 8 cibles qui présentaient les plus forts scores d'association à BRCA1. L'utilisation des puces « Human Transcriptome Array GeneChip HG-ST 2.0 » nous a permis de savoir quels exons des gènes codants pour les ARNm cibles avaient le plus haut score d'association avec BRCA1. Nous avons donc construit des amorces complémentaires à ces exons. Dans le but de valider l'ensemble des 24 ARNm, j'ai réalisé 3 nouveaux réplicats indépendants de RIP (sans crosslink uniquement). Au final, l'analyse par RT-qPCR des 16 ARNm pour lesquels la construction des amorces a été possible, a permis de confirmer leur association à BRCA1.

2. ARNm cibles de BRCA1 : Structure & Fonctions des protéines codées

Ayant identifié les ARNm d'intérêt, c'est-à-dire ceux fortement associés à BRCA1, j'ai déterminé si cette association au sein des mêmes complexes conduisait à une modulation de l'efficacité traductionnelle de ces ARNm. En effet, l'approche à large échelle que j'ai conduite m'a amenée ensuite à valider un certain nombre de gènes par approche candidat, cela dans le but de déterminer comment les ARNm cibles de BRCA1 et les fonctions des protéines codées par ces ARNm peuvent participer au rôle de suppresseur de tumeur de BRCA1.

2.1 Discussion technique

A l'issue des expériences de RIP, nous avions obtenu une liste réduite de 16 ARNm qui étaient fortement « associés » à la protéine BRCA1. En revanche, cette technique ne permet pas de distinguer les ARNm qui sont associés à BRCA1 pour la régulation de leur traduction de ceux qui lui sont associés pour d'autres fonctions cellulaires. Pour étudier si ces ARNm sont régulés traductionnellement par la protéine BRCA1, j'ai réalisé des profils polysomiques. Cette technique, que j'ai mise en place au laboratoire, permet de récupérer les ARNm associés aux polysomes, c'est-à-dire activement traduits. J'ai réalisés des profils dans les cellules MCF-7 dépletées ou non en BRCA1 par ARN interférent afin de mimer les conditions « patientes » mutées *BRCA1* dont les tumeurs n'expriment pas, ou très peu, la protéine BRCA1. J'ai ainsi recherché si les 16 ARNm précédemment identifiés étaient différemment associés aux polysomes (c'est-à-dire différemment traduits) selon que la protéine BRCA1 était présente ou non dans les cellules. Pour chaque ARNm, la variation observée dans les polysomes a été normalisée avec la variation observée dans la fraction cytoplasmique des cellules afin d'éliminer toute variation due à un effet de BRCA1 sur la transcription, la stabilité ou le transport de ces ARNm. Parmi les 16 ARNm analysés, seulement 7 présentaient une nette régulation de leur traduction (RdR ≥ 1,4 ou ≤ 0,71). Il s'agit de DBF4B, de CCNL2, de FNBP4, de GOLGA8a, de RHPN1 et de TRIM45 régulés positivement, et d'ADAT2 dont la traduction est régulée négativement. Il est important de noter que la réalisation des profils polysomiques est une technique délicate dont la reproductibilité dépend beaucoup des conditions cellulaires, la traduction étant un mécanisme d'adaptation rapide. Il sera intéressant de considérer les ARNm DZIP3 et C19orf66 pour lesquels les RdR sont supérieurs à 0,71 mais restent inférieurs à 0,75.

La protéine BRCA1 est « associée » aux ARNm codant ADAT2, DBF4B, CCNL2, FNBP4, GOLGA8a, RHPN1 et TRIM45 et module leur traduction. Il était important de montrer que cet effet sur les ARNm se répercute sur la synthèse des protéines codées à partir de ces ARNm. Malheureusement aucun anticorps dirigé contre la protéine GOLGA8a n'était disponible dans le commerce, et les anticorps dirigés contre les protéines FNBP4 et RHPN1 se sont révélés très peu spécifiques et donc inutilisables pour nos analyses en western blot. Là encore, il sera intéressant d'approfondir nos connaissances sur l'expression de ces cibles lorsque suffisamment d'outils seront disponibles. Pour les quatre autres protéines (ADAT2, CCNL2, DBF4B et TRIM45) j'ai pu valider dans les cellules MCF-7 que leur expression varie en fonction de la présence ou l'absence de BRCA1 de manière coordonnée avec ce que j'avais observé à travers l'étude de la traduction par profils polysomiques : l'expression d'ADAT2 augmente tandis que celle des protéines CCNL2, DBF4B et TRIM45 diminue lorsque l'expression de BRCA1 est diminuée dans les cellules.

Pour conclure, en tenant compte des différentes limites techniques, j'ai obtenu quatre ARNm candidats, retrouvés et validés dans chaque expérience en partant d'une analyse large échelle jusqu'à une approche candidat, et auxquels BRCA1 s'associe, pour moduler leur traduction.

2.2 FNBP4, GOLGA8a, et RHPN1

Les régions 5'UTR de ces ARNm ne présentent pas de structures particulières de type IRES (Weingarten-Gabbay et al. 2016). De plus, il existe relativement peu de données dans la littérature concernant les protéines codées par ces ARNm.

La protéine FNBP4 (Formin binding protein 4) ou FBP30, est une protéine de 110kDa. Elle appartient à une classe de protéines qui se lient à des motifs riches en proline et arginine. Un interactant connu de FNBP4 est la protéine FMN1, impliquée dans la formation de jonctions adhérentes et la polymérisation de l'actine. FNBP4 interagit également avec les motifs riches en Arginine/Glycine flanqué de motifs riches en proline de la protéine KHDRBS1 (ou SAM68). Cette protéine est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires parmi lesquelles l'épissage alternatif, la régulation du cycle cellulaire, la formation de l'extrémité 3' de l'ARN, et de par son rôle dans de nombreuses fonctions cellulaire, elle pourrait être impliquée dans la tumorigénèse. Cette protéine est exprimée dans de nombreuses lignées (y compris les cellules MCF-7) et le traitement des cellules par radiation ionisante à une dose de 5Gy pendant 2 heures induit une augmentation de l'ARNm de FNBP4 par p53. Néanmoins, l'expression de son ARNm est inchangée dans le cancer Sein (Nourashrafeddin et al. 2015), et il a été rapporté que des mutations codant pour le gène sont responsables de microphtalmie (réduction des dimensions du globe oculaire dans ses différents diamètres, due à une anomalie congénitale) (Kondo et al. 2013).

Il existe très peu de données dans la littérature concernant la protéine GOLGA8a, qui serait impliquée dans le maintien de la structure de l'appareil de Golgi, siège de la glycosylation, de la maturation et de l'orientation des protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique granuleux. La synthèse protéique de GOLGA8a est augmentée en présence de BRCA1. Ainsi BRCA1, en modulant la traduction de GOLGA8a pourrait donc, à un autre niveau que la traduction, agir sur les protéines et leur devenir.

Enfin la protéine RHPN1 (Rhophilin 1 ou C8orf51) est une protéine de 76 kDa, pouvant servir de cible pour Rho, et ainsi interagir avec certains composants du cytosquelette. La famille Rho des petites protéines G apparentées à Ras compte plus d'une dizaine de membres dont principalement Rho, Rac et Cdc42. Ces protéines fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires de la signalisation intracellulaire. La protéine RHPN1 se lie à la forme active de Rho qui régule l'organisation du cytosquelette d'actine et contrôle la formation de fibres de stress ancrées au niveau de la plaque d'adhésion.

Il ne nous a pas été possible d'analyser l'expression de ces trois protéines, faute d'outils disponibles. Néanmoins, au vu de leurs fonctions, il sera intéressant de comprendre comment BRCA1 intervient auprès d'elles et comme cela peut participer à ses fonctions de maintien de l'intégrité cellulaire.

2.3 ADAT2

La protéine ADAT2 (tRNA-specific adenosine deaminase 2, ou DEADC1) est une protéine de 21 kDa. Il s'agit d'une enzyme jouant un rôle dans l'efficacité, la fidélité et la régulation de la traduction via les ARN de transfert (ARNt). Les ARNt, sont de courts ARN, de 70 à 100 nucléotides, qui interviennent lors de la synthèse des protéines puisqu'ils apportent les acides aminés au ribosome. Les cellules eucaryotes contiennent quelques dizaines d'ARNt différents, chacun d'entre eux étant spécifique de l'un des acides aminés. Les ARNt se replient pour adopter une structure complexe comportant plusieurs tiges-boucles dont la structure secondaire (2D) s'organise en "feuille de trèfle". En trois

dimensions, cette feuille de trèfle adopte ensuite (en raison des interactions entre les différentes régions de l'ARNt et les contraintes imposées par les structures secondaires) une forme en L. La protéine ADAT2 est une enzyme qui permet la désamination hydrolytique de l'adénine (en position 34, la première position de l'anti-codon de l'ARNt) en inosine de l'ARNt ce qui permet la reconnaissance de trois codons au lieu d'un seul : l'appariement étant possible avec l'uracile (U) mais aussi avec la Cytosine (C) et enfin avec l'Adénine (A). De plus, ADAT2 forme un hétérodimère avec la protéine ADAT3. Ainsi, ADAT2 va permettre une certaine souplesse dans la traduction du code génétique (Gerber and Keller 1999).

Des études ont montré que les mutants de levure pour ADAT2 sont caractérisés par un arrêt du cycle cellulaire en phases G1 et G2 (Tsutsumi et al. 2007). Très récemment, afin de caractériser l'influence de l'activité du complexe ADAT2/ADAT3 sur la traduction chez les mammifères, une équipe a caractérisé le transcriptome ainsi que le protéome humain au niveau de la fréquence et de la distribution des codons liés au complexe ADAT. Ils montrent que les transcrits modifiés par ADAT reconnaissent 3 types de codons appelés « ADAT-aa ». Il s'agit des codons NNC, NNU, NNA mais pas des codons NNG. Il apparait également que les protéines les plus enrichies en ADAT-aa sont composées préférentiellement de thréonine, alanine, proline et serine (ou TAPS). Ils proposent donc que l'enrichissement de ces protéines, en codons reconnus par les ARNt modifiés par le complexe ADAT, soit dû aux similitudes de ces codons TAPS (Rafels-Ybern, Attolini, and de Pouplana 2015). Enfin il a été montré que le complexe ADAT (ADAT2/ADAT3) est associé au handicap intellectuel, et que des modifications des ARNt sont liées à des pathologies humaines telles que le diabète de type 2 et la survenue du cancer (Torres, Batlle, and Ribas de Pouplana, 2014).

Dans notre étude, nous avons montré que la protéine BRCA1 s'associe à l'ARNm d'ADAT2 (et non d'ADAT3) et qu'elle module sa traduction. En effet, lorsqu'on diminue par ARN interférent la protéine BRCA1, on observe une association du transcrit d'ADAT2 plus forte aux polysomes ce qui suggère que celui-ci est plus activement traduit en absence de BRCA1. De la même façon, l'expression de la protéine ADAT2 est plus forte quand celle de BRCA1 est réduite dans les cellules MCF-7. Ceci montre que BRCA1 aurait, quand elle est présente, un effet négatif sur l'expression d'ADAT2, et pourrait participer à son rôle de maintien de l'intégrité cellulaire en réduisant la permissivité d'ADAT2 vis-à-vis du code génétique. On peut donc imaginer que si la traduction de la protéine ADAT2 n'est plus sous contrôle (en l'absence de BRCA1), son expression augmente, et une trop grande modification des ARNt pourrait favoriser la tumorigenèse. Ainsi BRCA1 pourrait être impliquée dans le contrôle de la traduction non seulement par son interaction avec PABP1, mais directement *via* une de ses cibles, ADAT2.

Afin de comprendre si l'absence de BRCA1 et de ce fait, la surexpression d'ADAT2 peut avoir un effet favorisant un contexte pathologique, je suis actuellement en train de tester au laboratoire l'effet de la surexpression de la protéine ADAT2 seule ou des protéines ADAT2 et ADAT3 ensemble sur la croissance cellulaire. En effet, après transfections des cellules mammaires tumorales MCF-7 et MDA-MB-231 par les plasmides ADAT2 ou ADAT2 et ADAT3, j'analyse la croissance de ces cellules par la technique d'IncuCyte. Les premières données préliminaires que j'ai obtenues suggèrent que la surexpression de ces protéines, ADAT2 seule, ou avec ADAT3 auraient plutôt un effet pro-prolifératif sur ces cellules. Ces observations doivent cependant encore être validées, et confirmées par d'autres techniques comme par le test MTT, qui nous permettra d'avoir un suivie des cellules vivantes selon une cinétique post-transfection. De plus, il serait intéressant de comprendre comment BRCA1 *via* son action sur la régulation de la traduction d'ADAT2, module les ARNt, et enfin comprendre comment BRCA1 aurait un

effet sur la modification des ARNt en ne modulant, à notre connaissance, qu'un seul des deux acteurs du complexe ADAT.

2.4 CCNL2

La protéine CCNL2 (Cyclin L2) est une protéine de 58 kDa, dont l'activité est essentiellement nucléaire puisqu'il s'agit d'un régulateur transcriptionnel qui participe à la régulation du processus d'épissage des ARN pré-messagers. Il a été rapporté que la protéine CCNL2 interagit avec la sous-unité p110 de la kinase cycline-dépendante PITSLRE (CDK11) (Loyer et al. 2008), avec les facteurs d'épissage SC35 et 9G8 ainsi qu'avec la forme hyper-phosphorylée de l'ARN pol II (L. Yang et al. 2004). Cette dernière équipe a montré par des tests d'épissage *in vitro* que CCNL2 stimule l'activité d'épissage. De plus, elle a montré que la surexpression de CCNL2 dans des cellules humaines d'hépato-carcinome (SMMC-7721) induit l'apoptose, ce qui implique une régulation à la hausse des protéines pro-apoptotiques p53 et BAX et une régulation négative de la protéine anti-apoptotique BCL2.De plus, l'injection de CCNL2 dans des hépato-carcinomes chez des souris « nude » inhibe la croissance tumorale et favorise l'apoptose des cellules. De la même façon une autre étude montre que la surexpression de la cycline L2 inhibe la croissance des cellules tumorales gastriques (BCG823) et permet d'augmenter leur sensibilité aux chimiothérapies telles que le fluoracil, docetaxel ou encore le cisplatin en induisant l'arrêt du cycle en G0/G1 et l'apoptose des cellules tumorales (Li et al. 2012). Plus récemment, une équipe a examiné les niveaux d'expression des ARNm et des protéines codées de différentes cycline dans les cancers du sein incluant des cancers de type triple négatifs (RH-,HER-), et rapportent que l'expression de l'ARNm de CCNL2 est diminuée dans ces cancers (Kren et al. 2015). Ici, les auteurs ne rapportent que la quantité d'ARNm de CCNL2, ce que nous savons comme étant très différent de l'analyse de la traduction, de plus ils ne rapportent l'expression de la protéine CCNL2 qu'en conditions ou des lignées cellulaires (dont MDA-MB-231) sont déplétées en CDK11.

Dans notre étude, nous avons observé que la traduction de CCNL2 varie en fonction de la présence de la protéine BRCA1 dans différentes lignées mammaires tumorales et non tumorales (MCF-7, HMEC). En effet en absence de la protéine BRCA1, l'expression de CCNL2 diminue tandis qu'en conditions de surexpression de BRCA1, on observe une augmentation de l'expression de CCNL2. Ceci est assez cohérent avec les données de la littérature et suggère que la présence de BRCA1 est requise pour assurer aux cellules un contrôle sur leur devenir. Ainsi lorsqu'elle est mutée, l'expression de CCNL2 diminue ce qui est un contexte favorable pour l'apparition du cancer. A l'inverse, BRCA1 pourrait contrôler la traduction de CCNL2 pour médier l'apotose des cellules dangereuses pour la cellule et cela pourrait intervenir dans cette fonction déjà bien connue de ce suppresseur de tumeur (Quinn et al. 2003).

2.5 DBF4B

La région 5'UTR de l'ARNm DBF4B pourrait contenir un IRES. Ainsi pour cet ARNm cible il est prévu de tester au laboratoire l'effet de BRCA1 sur sa traduction *in vitro* en utilisant un ARNm rapporteur composé de sa 5' placée en amont de la séquence codante de la luciférase. Ce test nous permettrait de déterminer si BRCA1 intervient directement dans la régulation de cet ARNm en tant que co-activateur lorsqu'elle est présente. Si la présence d'une IRES dans la 5'UTR de DBF4B est confirmée il serait particulièrement intéressant d'analyser la régulation de sa traduction dans des cellules déplétées ou non en BRCA1, et en condition de stress génotoxique. En effet, il a été rapporté que les

ARNm possédant ce type de structures sont voient leur traduction stimulée dans ces conditions cellulaires spécifiques.

La protéine DBF4B (Protein DBF4 homolog B aussi appelée DRF1 ou ASKL1) est une protéine de 67 kDa. Il s'agit d'une sous-unité régulatrice de la kinase CDC7 (Cell division cycle 7-related protein kinase) (Tenca et al. 2007). Cette dernière joue un rôle central dans la réplication de l'ADN et la prolifération cellulaire par la phosphorylation de substrat critiques qui régulent la progression des phases S et M ainsi que la réplication de l'ADN (Montagnoli et al. 2002; Yoshizawa-Sugata et al. 2005) Dans cette étude, les auteurs rapportent une baisse de la prolifération, une activation de Chk2 et une augmentation des dommages à l'ADN (avec une augmentation des foci γH2AX), et un arrêt des fourches de réplication dans les cellules HeLa lorsqu'elles sont transfectées avec un ARN interférent de DBF4B. De plus, il a été rapporté que le complexe CDC7/DBF4B peut phosphoryler MCM2 et MCM3 (Minichromosome Maintenance Complex Component 2 et 3) (Ramer et al. 2013). Ces protéines forment un complexe protéique clé du complexe de pré-réplication et peuvent être impliquées dans la formation de fourches de réplication et dans le recrutement d'autres protéines apparentées à la réplication de l'ADN par la régulation de l'activité hélicase du complexe. Plus récemment, il a été montré que la formation du complexe CDC7/DBF4B, l'association à la chromatine, et l'activité kinase de CDC7 ne sont pas inhibées lors du point de contrôle en phase S en réponse aux lésions de l'ADN. Ainsi DBF4B pourrait jouer un rôle dans ce point de contrôle S notamment *via* la régulation des kinases (dont Chk2, dont on sait maintenant qu'elle est particulièrement impliquée dans le maintien des fonctions biologiques dans les cellules non stressées (Zannini, Delia, and Buscemi 2014)) activées suite aux cassures de l'ADN et fourches de réplication bloquées qui interviennent lors de ce point de contrôle (Toshiya Tsuji, Eric Lau, Gary G. Chiang 2008). Enfin il a été proposé que la kinase CDC7 puisse constituer une cible intéressante pour le développement de drogues puisqu'il existe des inhibiteurs de cette kinase. Cependant le niveau d'expression de cette protéine (et de son partenaire DBF4B) dans les cancers n'est pas clairement définie et varie selon les études (Swords et al. 2010).

Nos travaux montrent que l'expression de la protéine DBF4B diminue lorsque la protéine BRCA1 n'est plus présente. Ainsi en conditions normales, BRCA1 veillerait *via* la régulation de la traduction de DBF4B, à une réplication efficace ainsi qu'un contrôle de phase S en réponse aux dommages à l'ADN. Ce sont des fonctions qui sont déjà bien connues pour participer au rôle suppresseur de tumeur de BRCA1, mais la découverte d'un nouvel effecteur DBF4B nous permet de proposer un modèle selon lequel en absence de la protéine BRCA1, la réparation de l'ADN n'est plus efficace, l'expression de DBF4B est diminuée impliquant un arrêt de la réplication, une augmentation des dommages à l'ADN et une sur-activation de Chk2. Ensemble, ces évènements favorisent les anomalies liées à l'ADN et par conséquent la tumorigenèse.

2.6 TRIM45

La protéine TRIM45 (Tripartite motif-containing protein 45 ou RNF99) est une protéine nucléo-cytoplasmique de 64 kDa. Il a été rapporté qu'elle peut agir comme un nouveau répresseur transcriptionnel de la voie de signalisation des MAP kinases en régulant les facteurs EIK-1 et AP-1 (Wang et al. 2004). Une équipe a également montré que TRIM45 régule négativement la transcription du facteur NF-κB induite par le TNFα en utilisant un rapporteur luciférase. Les auteurs montrent que TRIM45, dépourvu de son domaine RING, pourrait inhiber le signal NF-kB. Ces résultats suggèrent que TRIM45 agit comme un répresseur du signal NF-kB et pourrait réguler la croissance cellulaire (Shibata et al. 2012). De plus, il a été montré dans une étude large échelle que l'expression de l'ARNm de

TRIM45 est diminuée dans les cancers de sein d'une cohorte de patientes chinoises (Huang et al. 2013). Enfin, il a été montré que TRIM45 est un nouvel interactant de RACK1. Le récepteur de la C-kinase activée (RACK1) est une protéine d'échafaudage qui participe à la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC), et joue un rôle important dans la transmission du signal PKC à son substrat. De plus, des études récentes ont révélé que RACK1 joue un rôle important dans la tumorigénèse et que l'amélioration du mécanisme de la voie JNK *via* RACK1 est associée à une activation constitutive de MEK (MAPK- ERK kinase). Les auteurs montrent que l'expression de TRIM45 est induite lorsque des stimuli extracellulaires favorisent la croissance cellulaire, ce qui entraîne une atténuation de l'activation de la voie MAPK. En effet, l'addition de facteurs de croissance dans le milieu cellulaire augmente la quantité d'ARNm de TRIM45. L'extinction de TRIM45 par shRNA augmente la prolifération des cellules HeLa. Ces résultats suggèrent que TRIM45 fonctionne comme un membre de la boucle de régulation rétro-active de la voie MAPK et pourrait avoir un rôle anti-tumoral (Sato et al. 2014). On peut penser que la protéine BRCA1 favorise l'expression de TRIM45 et permet ses fonctions en régulant de façon positive son expression. A l'inverse, lorsque BRCA1 n'est plus présente, l'expression de TRIM45 est diminuée favorisant ainsi la progression cellulaire et le développement tumoral.

2.7 Conclusion

Afin de comprendre si l'absence de BRCA1 et de ce fait, la variation d'expression de ses protéines cibles peut avoir un effet qui favorise un contexte pathologique (notamment ADAT2 et TRIM45 connues pour influer la croissance cellulaire), un certain nombre de tests sont en cours au laboratoire. Pour l'heure, je teste l'expression de ces cibles sur la croissance des cellules mammaires tumorales MCF-7 et MDA-MB-231 par la technique d'IncuCyte, ainsi que par le test MTT. L'effet de BRCA1 sur ces cibles (incluant CCNL2 et DBF4B) sur l'apoptose de ces cellules par la technique de cytométrie en flux pourra également être étudié ainsi que l'importance des structures 5' des ARNm cibles, en particulier celui de DBF4B qui pourrait contenir une IRES, pour la régulation de leur traduction par BRCA1.

Pour finir, il semble que la protéine BRCA1 régule la traduction de ADAT2, CCNL2, DBF4B et TRIM45 pour potentiellement à travers elles, jouer un rôle plus en amont sur la fidélité de traduction des ARNt, sur l'épissage des transcrits, sur la réplication et les points de contrôle des phases du cycle cellulaires, et enfin sur le contrôle de la prolifération cellulaire et sur l'apoptose. Ainsi, BRCA1 agirait dur des mécanismes cellulaires dans lesquels elle a déjà été impliquée et son rôle assez bien caractérisé (réplication, points de contrôle, apoptose) mais *via* de nouveaux facteurs inconnus jusque-là. De la même façon, son rôle dans la biologie des ARN pourrait se voir élargit *via* ses cibles traductionnelles et BRCA1 pourrait être impliquée à d'autres niveaux que par son interaction avec PABP1.

3. Existe-t-il un mode de traduction commun aux ARNm cibles de BRCA1 ?

Dans la mesure où BRCA1 est un suppresseur de tumeur, il semblait peu probable qu'elle stimule la traduction de façon globale, ce qui aurait eu un effet oncogène. Et en effet, l'analyse des ARNm associés aux polysomes dans les cellules épithéliales mammaires MCF-7 déplétées ou non en BRCA1 montre que BRCA1 régule la traduction de certains ARNm uniquement, correspondant à environ 7%des ARNm exprimés dans ces cellules (Dacheux et al. 2013). Alors, comment le suppresseur de tumeur BRCA1 module-t-il la traduction de certains ARNm uniquement ?

L'effet de BRCA1 sur la régulation de la traduction de ces ARNm résulte d'un phénomène actif de stimulation ou d'inhibition de leur recrutement aux polysomes. En effet, la quantité d'ARNm associés aux polysomes peut être stable entre les deux conditions tandis que leur taux cytoplasmique varie et

vice versa. De façon encore plus intéressante, l'augmentation du taux polysomique de certains ARNm peut se faire de façon concomitante à une diminution de leurs taux cytoplasmiques, de même qu'une diminution de ces ARNm dans les polysomes peut être observée malgré une augmentation de leur taux cytoplasmique entre les deux conditions. Il est par ailleurs intéressant de noter que, bien que l'équipe ait précédemment montré que la diminution de BRCA1 par interférence ARN a un effet globalement négatif sur la synthèse protéique (Dizin et al. 2006), nos résultats présents montrent que certains ARNm voient leur traduction stimulée dans ces conditions, impliquant que BRCA1 peut aussi bien stimuler la traduction de certains ARNm qu'inhiber la traduction d'autres ARNm. Enfin, les résultats de l'équipe montrent que l'effet de BRCA1 sur la synthèse protéique dépend de son interaction avec PABP1 (Dizin et al. 2006) qui est un facteur général de traduction reconnaissant la queue poly(A) commune à pratiquement tous les ARNm cellulaires. Cette interaction ne peut donc pas expliquer pourquoi certains ARNm sont régulés par BRCA1 et d'autres pas. Ceci suggère l'existence, dans ces ARNm, d'éléments régulateurs structurels et/ou séquentiels pouvant être reconnus directement ou indirectement par BRCA1 et qui permettrait la stimulation ou l'inhibition sélective de leur traduction par cette protéine. Comme les ITAF, BRCA1 pourrait être recrutée au niveau de ces ARNm par le biais d'une ou plusieurs protéines de liaison à l'ARN (Mitchell et al. 2003). De façon intéressante , des analyses génétiques et moléculaires à grande échelle, ont identifié des protéines de liaison à l'ARN (RBP) et certaines d'entre elles ont également été rapportées comme étant des ITAFs, capables d'interagir avec les ARNm et ce, pour la régulation de leur traduction (Baltz et al. 2012; Castello et al. 2012; Pichon et al. 2012). Bien que toutes les RBP ne soient pas impliquées dans la régulation de la traduction, il a été rapporté qu'en condition de stress, et notamment d'endommagement à l'ADN, la localisation subcellulaire de certaines RBP est modifiée tout comme leur liaison à différentes molécules d'ARN, ce qui leur permet de réguler de façon coordonnée divers aspects du métabolisme de l'ARN (Dutertre et al. 2014).

La recherche de caractéristiques ou motifs communs parmi les ARNm dont la traduction est impactée par BRCA1 est un travail délicat. Néanmoins, l'identification de telles caractéristiques ou motifs communs pourraient mener à des pistes mécanistiques pour comprendre l'effet spécifique de BRCA1 sur ces ARNm. La recherche de différences dans la taille et le pourcentage en GC des 5'UTR peuvent indiquer la présence d'éléments régulateurs dans ces 5'UTR, notamment les IRES qui se trouveraient au sein de 5'UTR globalement longues, riches en GC et très structurées (Komar and Hatzoglou 2011). Nos données préliminaires indiquent que la 5'UTR des 16 ARNm cibles de BRCA1 ne présente pas de structure commune, et que seuls certains d'entre elles pourraient posséder un IRES (source internet : sites UTRdb et GraphClust). De plus les 3'UTR de ces ARNm ont toutes une taille supérieure à 1000 nt (sauf pour FNBP4 dont la 3'UTR s'étend sur 905 nt) ce qui pourrait les rendre particulièrement sensibles à la machinerie de dégradation des ARNm, le NMD, avec lequel PABP1 interagit (Mocquet, Durand, and Jalinot 2015). De la même façon, il ne semble pas que les 3'UTR de ces ARNm soient spécifiquement ciblées par un miR commun (source internet : site miRTarBase). Certains ARNm cibles possèdent même des caractéristiques propres comme cela sera détaillé ci-après.

Au regard de nos premières observations il n'apparait pas de mécanisme général pouvant expliquer le contrôle qu'exerce BRCA1 sur la traduction de ces ARNm. Au contraire, il se pourrait même que ces ARNm soient sélectionnées *via* des mécanismes, des interactants, des RBP, ou encore des structures de reconnaissances différentes. Bien sûr, de nouveaux tests expérimentaux s'avèrent nécessaires afin de le déterminer et ce, à plusieurs niveaux : l'importance des 5' et 3' UTR des ARNm cibles dans leur

mode de sélection par BRCA1, ou encore les éléments qui composent le complexe protéique permettant l'initiation de la traduction de ces cibles.

Dans un premier temps, il est prévu de tester au laboratoire l'effet de BRCA1 sur la traduction de certains ARNm dans un système de traduction *in vitro* en utilisant un ARNm rapporteur composé de la 5' et/ou de la 3'UTR des ARNm cibles d'intérêt placées respectivement en amont et en aval de la séquence codante du rapporteur, par exemple la luciférase. Les premiers ARNm à tester seraient ceux qui sont « associés » à BRCA1 et dont nous avons pu vérifier l'association différentielle aux polysomes en fonction de l'expression de BRCA1 par RT-qPCR. Contrairement aux expériences *in cellulo*, ce test nous permettrait de déterminer si BRCA1 intervient directement dans la régulation de ces ARNm en tant que co-facteur traductionnel. Le risque de cette technique est néanmoins de ne pas disposer dans le système de tous les co-facteurs traductionnels, autres que les facteurs canoniques d'initiation de la traduction, nécessaires à l'activité traductionnelle de BRCA1. Une autre piste serait d'obtenir les complexes protéiques RBP/ITAF se fixant sur chacun des ARNm cibles de BRCA1 et d'analyser s'ils sont identiques pour toutes nos cibles. Cela nous aiderait à comprendre le mécanisme qui permet à ces ARNm d'être préférentiellement régulés *via* BRCA1. Pour cela, nous pourrions, par exemple, purifier ces protéines par le système streptavidine-biotine, en synthétisant plusieurs sondes biotinylées complémentaires (sur une 20e de bases chacune) d'un même ARNm cible, et en conditions natives, récupérer les protéines se fixant sur cet ARNm par colonne de streptavidine (interaction covalente forte).

Depuis la découverte de l'interaction des protéines BRCA1 et PABP1 dans notre laboratoire nous nous sommes attachés à la caractériser dans le but de mieux comprendre le rôle de BRCA1 dans la régulation de la traduction. Nous avons pu déterminer les régions respectives de ces deux protéines pour leur interaction (données non montrées dans ce manuscrit). En effet par des tests de co-sédimentation suivis de western blot, nous avons montré que BRCA1 interagit préférentiellement avec la région N-terminale de PABP1 et plus particulièrement avec ses RRM 2,3 et 4 de façon phospho-indépendante. Il apparait également que la protéine BRCA1 n'entre pas en compétition avec d'autres partenaires protéiques de PABP1 tels que eIF4G et PAIP1, bien qu'elles partagent les mêmes sites d'interaction pour PABP1. En revanche nous ne savons toujours pas si l'interaction des protéines BRCA1 et PABP1 est directe ou indirecte, et si dans ce dernier cas, elle requiert la présence de plusieurs autres interactants protéique ou encore de la queue poly(A). Plusieurs études cristallographiques récentes mettent en évidence l'importance de la présence de l'ARN sur le changement de conformation des tandems de RRM et la flexibilité des éléments qui les relient appelés « linkers » (Safaee et al. 2012). En fonction de la conformation qu'adoptent les tandems de RRM selon que l'ARN soit présent ou non, leur interaction avec d'autres protéines est susceptible de varier comme cela a été montré pour l'interaction avec eIF4G. On peut émettre l'hypothèse que les protéines BRCA1 et eIF4G n'entrent pas en compétition, mais pourraient lier PABP1 dans deux conformations différentes. Ainsi, il serait intéressant de tester par pull-down sur des lysats cellulaires préalablement traités ou non à la RNase ou par la technique du retard sur gel ou EMSA (electrophoretic mobility shift assay) réalisée en présence ou non d'ARN poly(A), si la présence d'ARNm est requise pour l'assemblage des complexes non canoniques contenant BRCA1. Enfin, concernant la régulation négative de BRCA1 sur la traduction, on peut imaginer que BRCA1 titre PABP1, et éventuellement d'autres facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction, réduisant ainsi leur disponibilité pour traduire certains ARNm. Ainsi, l'implication de BRCA1 à ces deux niveaux de régulation peut être simultanée dans des conditions

cellulaires données, et on peut penser que la balance entre régulation positive et négative qu'exerce BRCA1 peut varier dans des conditions cellulaires particulières.

B. ARNm cibles de BRCA1 & Stress génotoxique

C'est en conditions de stress génotoxique que le rôle global de BRCA1 dans le maintien de l'intégrité cellulaire est exacerbé. Nous pensons donc que son rôle dans la régulation de la traduction peut être particulièrement adapté dans ces conditions, et c'est pourquoi je me suis également attachée pendant ma thèse à étudier cette fonction, sous stress génotoxique. Dans un premier temps, j'ai étudié la cinétique de localisation subcellulaire de BRCA1 après stress, afin de déterminer le moment où elle majoritairement cytoplasmique et donc susceptible d'impacter le plus fortement la traduction de ses ARNm cibles. Ce travail m'a permis, dans un deuxième temps, d'initier l'étude de l'impact du stress sur la traduction des ARNm cibles de BRCA1.

Les ARNm « cibles » de BRCA1 ont été identifiés dans des cellules en condition de croissance normale dans lesquelles seuls les niveaux d'expression de BRCA1 ont été changés. Néanmoins, il est probable que, comme la plupart de ses autres fonctions, la régulation de la traduction qu'exerce BRCA1 soit plus particulièrement active, ou qualitativement différente dans des conditions de stress, notamment de stress de dommages à l'ADN ou génotoxique. En effet il est maintenant bien montré que BRCA1 protège la cellule, et notamment l'intégrité de son génome, dans des conditions où celle-ci est soumise à des changements environnementaux néfastes et est donc soumise à une apoptose si les dommages sont irréparables. Cela est très bien décrit dans une situation de stress génotoxique. En effet, il a été montré par plusieurs équipes que, suite à un stress génotoxique comme l'exposition des cellules à des radiations ionisantes (IR), le cytoplasme s'enrichit en BRCA1 durant la réponse au stress. Cet enrichissement aurait lieu à partir d'1h (Okada and Ouchi 2003) ou dans le cadre d'une réponse plus tardive, 4 à 6h après irradiation (Feng et al. 2004). La localisation cytoplasmique de BRCA1 ayant été associée à sa fonction pro-apoptotique, il a été proposé un modèle dans la littérature : au cours de la réponse aux dommages de l'ADN, le réservoir nucléaire de protéines BRCA1 participe à la coordination de la réparation des dommages, tandis que les protéines BRCA1 présentes dans le cytoplasme pourraient induire l'apoptose des cellules endommagées (E. S. Yang and Xia 2010). Ainsi la localisation subcellulaire de BRCA1 serait responsable de l'efficacité des fonctions de BRCA1 dans la réparation de l'ADN ou l'apoptose. De la même façon, la traduction étant un processus cytoplasmique, l'enrichissement du cytoplasme en BRCA1 suite à un stress génotoxique pourrait également avoir pour conséquence une activation des fonctions traductionnelles de BRCA1. De plus, il a été montré que l'exposition de la cellule à des conditions environnementales spécifiques dont un stress génotoxique, favorise la mise en place d'un programme d'expression des gènes adapté. Dans ces conditions, la traduction est globalement diminuée alors que la traduction d'ARNm spécifiques qui codent pour des protéines impliquées dans la réponse à ce stress est stimulée. A l'inverse, la traduction d'ARNm codant des protéines impliquées dans la croissance et/ou la prolifération cellulaire est réprimée encore plus fortement (Pichon et al. 2012).

Dans la littérature, la cinétique de relocalisation cytoplasmique de la protéine BRCA1 suite à un stress génotoxique semble survenir à partir de 1h post-stress, mais reste à affiner. Afin d'étudier le rôle de BRCA1 dans la régulation de la traduction, fonction cytoplasmique, il était important de connaitre la localisation de BRCA1 suite au stress afin de déterminer le temps à partir duquel BRCA1 est impliquée dans ses fonctions cytoplasmiques. Je me suis donc attachée à déterminer par immunofluorescence ainsi que par fractionnement nucléo-cytoplasmique suivie de western blot (non montré) une cinétique

plus précise que celle(s) décrite(s) dans la littérature. Nous avons choisis d'appliquer un stress génotoxique à l'aide d'irradiations ionisantes. De nombreuses études administrent ce type de stress avec des doses très variables. Néanmoins, l'utilisation de fortes doses (supérieures à 5Gy) sont maintenant remises en cause car elles provoquent de très lourds dommages aux cellules et s'éloignent des conditions environnementales auxquelles les cellules sont normalement soumises. C'est pourquoi, j'ai choisi d'irradier les cellules à l'hôpital en collaboration avec le Dr. Nicolas FORAY (Groupe de Radiobiologie du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon), et de leur administrer une dose de 2Gy, qui est la dose requise pour une séance de radiothérapie dans le traitement d'un cancer du sein. Une irradiation de 2Gy provoque en moyenne 80 cassures doubles brins par noyau ce qui semble être un stress génotoxique suffisant pour étudier ses conséquences sur la localisation et les fonctions de BRCA1 post-stress. La reconnaissance des cassures de l'ADN par la forme phosphorylée de la protéine H2AX ainsi que l'activation de la réparation médiée par la kinase ATM (dont l'activation est spécifique d'une irradiation ionisante) ont pu être vérifiées dans notre laboratoire. Comme rapporté dans la littérature, j'ai observé très rapidement après-stress des foci nucléaires de BRCA1 avec une expression très marquée dans le noyau jusqu'à 4h après l'irradiation des cellules MCF-7. Ensuite, et tandis que le nombre de foci nucléaires diminuait progressivement, j'ai observé une relocalisation de la protéine BRCA1 dans le cytoplasme 4h post-stress avec un marquage cytoplasmique soutenu 8h post-stress. Enfin, 24h après le stress, le marquage de BRCA1 était similaire à celui des cellules contrôles non irradiées. Restaient visibles quelques foci pH2AX qui marquent les dommages non réparés. Une des fonctions prioritaires de BRCA1 semble être la réparation de l'ADN puisqu'il faut attendre plus de 4h pour que BRCA1 se relocalise dans le cytoplasme afin d'y exercer ses autres fonctions comme l'apoptose ou encore la traduction. Nous avons donc décidé, dans un deuxième temps, d'étudier le rôle de BRCA1 dans la traduction 8 heures après un stress génotoxique causé par des radiations ionisantes à une dose de 2Gy sur les cellules tumorales mammaires MCF-7. J'ai commencé par analyser l'expression de quelques protéines codées par les ARNm cibles de BRCA1 dans des lysats totaux préparés 8h après stress. L'expression de ces protéines ne semblait pas varier selon que les cellules aient été irradiées ou non, suggérant que ces cibles ne sont pas soumises à la régulation négative « globale » de la traduction post-stress (données préliminaires non montrées). L'analyse de l'expression des cibles dans des cellules MCF-7 à la fois déplétées ou non en BRCA1 et soumises aux irradiations est en cours au laboratoire. J'ai également réalisé des profils polysomiques de cellules contrôles et irradiées afin d'étudier la régulation de la traduction des ARNm cibles de BRCA1 et d'analyser si celle-ci est modulée différemment après stress. En effet, les observations que nous avons obtenues sans stress pourraient être exacerbées, inversées ou identiques pour chacune des cibles après stress. L'analyse par RT-qPCR de ces ARNm est également en cours au laboratoire.

Les résultats obtenus permettront de déterminer si les ARNm cibles identifiés sont les mêmes avant et après stress. Dans le cas contraire, le choix du temps post-stress (8h) auquel ont été réalisés ces tests ainsi que les cibles choisies (précédemment identifiés en conditions physiologique) pourront être remis en cause. En effet, il est tout à fait envisageable que la protéine BRCA1 contrôle d'autres ARNm dans ces conditions cellulaires spécifiques. Ainsi, la réalisation de nouvelles immunoprécipitations des complexes ribonucléoprotéiques (RIP) après stress, suivies de l'extraction et de l'analyse de ces ARNm co-imunoprécipités s'avère essentielle pour le déterminer. Néanmoins il faut une fois encore choisir à quel temps post-stress réaliser ces RIP et donc avoir identifié à quel moment l'activité traductionnelle de BRCA1 est la plus marquée. Là encore, il n'est pas impossible que la fraction de BRCA1 dans le

cytoplasme (même infime par rapport à la fraction nucléaire) puisse assumer sa fonction dans la traduction en même temps que son rôle dans la réparation de l'ADN.

L'étude de la traduction suivant un stress a permis de montrer que la répression ou la stimulation spécifique de certains ARNm dépend des éléments régulateurs présents dans leur 5' ou 3'UTR, comme les IRES et les uORF, ainsi que de la régulation de l'activité des facteurs d'initiation de la traduction par leur phosphorylation et/ou clivage. Ainsi, dans ces conditions, les mécanismes d'initiation de la traduction ainsi que les complexes initiateurs sont modifiés. Le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome pourrait ainsi se faire indépendamment de la coiffe, grâce à l'interaction entre un IRES présent dans la 5'UTR et des protéines accessoires, les ITAF. Il est d'ailleurs à noter que l'activité des ITAF pourrait elle aussi être dépendante de leur localisation subcellulaire (Lewis and Holcik 2008) (Figure15). D'autre part, eIF4G pourrait intervenir dans l'initiation sous une forme clivée, conduisant à un complexe initiateur là aussi modifié. Notre hypothèse est donc que l'activité traductionnelle de BRCA1 prendrait tout son sens, ou du moins serait modifiée, suite à l'exposition des cellules à un stress génotoxique. BRCA1, enrichie dans le cytoplasme et peut-être activée par différentes phosphorylations ou autres modifications post-traductionnelles, pourrait alors prendre part à un complexe d'initiation non canonique ciblant des ARNm spécifiques. Par ce biais, elle pourrait renforcer les interactions des différents composants du complexe et/ou la circularisation de l'ARNm via son interaction avec PABP1 d'une part et un élément de la 5'UTR ou fixé à la 5'UTR d'autre part. A l'inverse, BRCA1 pourrait inhiber la traduction de certains ARNm en interférant avec la formation de complexes d'initiations actifs en 5' de ces ARNm. Il est également envisageable que l'inhibition de la traduction de certains ARNm fasse intervenir l'interaction de BRCA1 avec des protéines impliquées dans la déadénylation ou la voie des miARN. L'étude de l'activité traductionnelle de BRCA1 dans des conditions de stress génotoxique est donc l'une des principales perspectives à court terme de l'équipe. Nous pensons en effet que ces conditions pourraient permettre de renforcer l'activité traductionnelle de BRCA1 et favoriser l'identification des mécanismes à l'origine de cette activité.

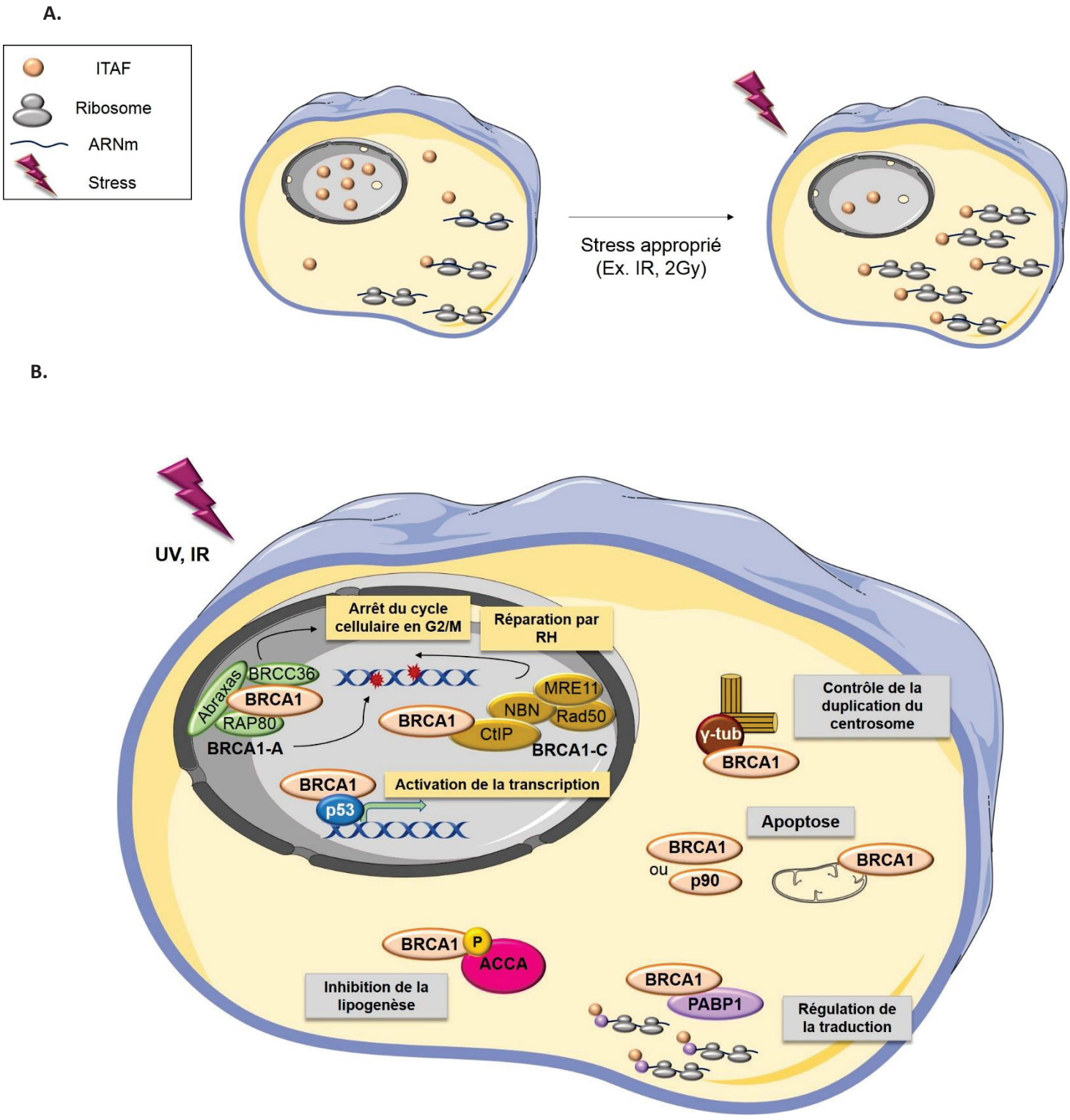


Figure 15 : BRCA1 est une protéine multifonctionnelle dont l'activité dépend de sa localisation cellulaire et de ses partenaires protéiques

A. Modèle de la régulation de la fonction des ITAF par leur localisation sub-cellulaire. Les ITAF sont des protéines maintenues dans le noyau lorsqu'elles doivent être séparées de leur ARNm cible et de la machinerie de traduction. Après le signal approprié, les ITAF s'accumulent dans le cytoplasme où ils s'associent avec leurs ARNm cibles et permettent une traduction efficace dépendante de l'IRES. Les conditions qui stimulent la traduction médiée par l'IRES atténuent la traduction globale dépendante de la coiffe. (Figure adaptée de Lewis SM & Holcik M, Oncogene, 2008)

B. Fonctions et localisation subcellulaire de BRCA1 suite à un stress. Sur cette figure sont représentées la plupart des fonctions de BRCA1 connues à l'heure actuelle. Ces fonctions dépendent pour beaucoup de la localisation subcellulaire de BRCA1 et de ses divers partenaires protéiques. Ses fonctions pourraient toutes participer à son rôle de suppresseur de tumeur et fonctionner en synergie dans certaines situations cellulaires. Ainsi, dans une cellule se trouvant en phase G2 du cycle et soumise à un stress génotoxique comme représenté ici, BRCA1 est localisée au centrosome via son interaction avec la tubuline et inhibe sa re-duplication puisqu'il a été dupliqué durant la phase S. Le stress génotoxique, quant à lui, cause des cassures double brin : dans le noyau, le macro-complexe BRCA1 participe au blocage du cycle au point de contrôle G2/M ainsi qu'à la reconnaissance des sites de cassure, après quoi, le complexe BRCA1-C active la résection simple brin nécessaire à la recombinaison homologue (la voie de réparation la plus adaptée en G2). Dans le même temps, BRCA1 active la transcription des gènes de réponse au stress dépendants du facteur de transcription p53. Dans le cytoplasme, BRCA1 inhibe la lipogenèse en séquestrant ACCA sous sa forme phosphorylée inactive, la cellule n'étant pas dans des conditions de croissance favorables et ayant besoin de mobiliser son énergie pour la réponse au stress. Toujours dans le cytoplasme, BRCA1 régule la traduction *via* son interaction avec PABP1 (Répression en réponse au stress ? Traduction d'ARNm codant des protéines de réponse au stress ?). Si la réparation n'est pas possible, BRCA1 ou sa forme clivée p90 déclenchent l'apoptose dans le cytoplasme. Ce modèle très simplifié permet d'imaginer comment la participation de BRCA1 à ces différentes fonctions pourrait lui permettre d'assurer son rôle de gardien de l'intégrité cellulaire.

Partie 2
Recherche appliquée
Le projet translationnel AJORA

Pendant ma thèse, j'ai identifié quatre ARNm cibles qui codent pour les protéines ADAT2, CCNL2, DBF4B et TRIM45. Ces protéines ont des fonctions clés et j'ai montré que leur expression est corrélée avec la présence ou l'absence de BRCA1 dans la cellule. Nous avons donc pensé que certaines de ces protéines pourraient constituer des marqueurs de l'absence de BRCA1, autrement dit des marqueurs de substitution de BRCA1, et permettre ainsi de mieux distinguer et caractériser les tumeurs mammaires déficientes en *BRCA1*. Nous avons initié une collaboration avec les cliniciens du Centre Léon Bérard à travers le projet AJORA, afin de tester notre hypothèse basée sur mes résultats de thèse et sur cette nouvelle propriété de BRCA1 découverte dans notre laboratoire: son rôle de co-facteur traductionnel.

A. Appel d'offre

L'AJORA est l'association des Jeunes Oncologues de la région Rhône-Alpes. Cette association a été fondée en 2000, et elle a pour but de favoriser l'éducation et la formation médicale de jeunes internes pratiquant l'oncologie dans notre région. Cette association est composée de résidents, de doctorants et de post-doctorants. Plus spécifiquement, au sein du Centre Léon Bérard et de notre Centre de Recherche, le CRCL, cette association favorise les collaborations entre jeunes chercheurs et jeunes cliniciens pour l'émergence de projets translationnels. En effet, une des ambitions du CRCL est de soutenir le développement d'une recherche translationnelle forte, au service des personnes malades. Ce transfert de savoirs est notamment rendu possible grâce à la forte implication des médecins cliniciens et pathologistes du Centre Léon Bérard au sein des équipes scientifiques, pour créer ainsi un vrai continuum entre la recherche fondamentale et les applications cliniques.

Pour cela, le Centre Léon Bérard a lancé en janvier 2016 un appel d'offre *via* l'association AJORA pour le financement d'un projet translationnel écrit et porté par un duo se composant d'un jeune chercheur (doctorant ou post-doctorant) et d'un jeune clinicien. Le projet devait pouvoir être réalisé en une année, impliquant une partie de recherche en laboratoire ainsi qu'une partie de recherche clinique, et devait mener à une publication. L'un des principaux critères pour l'obtention de ce financement était de mettre en avant un réel échange ainsi qu'un investissement des deux porteurs de projet dans le domaine de son collègue.

J'ai reçu cet appel d'offre à mi-parcours de ma troisième année de thèse. Mes travaux de recherche m'avaient permis de montrer que la protéine onco-suppressive BRCA1 régule spécifiquement la traduction de certains ARNm. Je venais d'identifier plusieurs ARNm avec lesquels BRCA1 interagit et dont la traduction est contrôlée par celle-ci. La traduction de l'un d'entre eux (ADAT2) étant régulée négativement par BRCA1. De plus, j'avais validé ces résultats au niveau protéique dans plusieurs lignées cellulaires mammaires tumorales (MCF-7, MDA-MB-231) et non tumorales (HMEC). Lorsque j'ai commencé ma thèse, nous avions planifié d'identifier les cibles de l'activité traductionnelle de BRCA1 et j'avais l'espoir que certaines d'entre elles puisse être testées dans des échantillons mammaires tumoraux afin de valider les tests expérimentaux que j'avais menés au laboratoire, c'est-

à-dire dans des conditions *in vitro* et sur des lignées cellulaires, chez les patientes. Mais j'espérais également proposer un début d'approche clinique pouvant faciliter le diagnostic des cancers féminins associés à une mutation du gène *BRCA1* et à une absence de la protéine.

J'ai donc cherché un collaborateur clinicien susceptible de m'aider à la réalisation d'un projet translationnel basé sur mes travaux de thèse. Très vite, j'ai été contactée par le Docteur Lauriane Eberst, jeune oncologue du Centre Léon Bérard. Ensemble, nous avons écrit un projet pour la validation d'un marqueur de substitution qui permette de connaître rapidement et à moindre coût le statut de BRCA1 chez certaines patientes atteintes de cancer. Ce projet est donc basé sur la propriété innovante du suppresseur de tumeurs BRCA1 découverte dans notre laboratoire: son rôle spécifique dans la régulation de la traduction. Il réunit les compétences médicales de Lauriane pour l'aspect clinique, et mes compétences scientifiques pour la partie recherche. Notre projet a été accepté et financé par le Centre Léon Bérard en avril 2016.

B. Le projet

La protéine onco-suppressive BRCA1 coordonne différentes voies de réparation de l'ADN et assure ainsi le maintien de l'intégrité du génome. Mutée, cette protéine est associée à un risque accru de cancer du sein et/ou de l'ovaire. Les patientes mutées *BRCA1* ont fréquemment une histoire familiale de cancer, et un âge jeune au diagnostic. Dans ce contexte génétique particulier, le cancer du sein de type « basal-like » (ou triple négatif) est fréquemment diagnostiqué. Il s'agit d'un sous-type histologique particulièrement agressif, et à haut risque métastatique. Les outils thérapeutiques sont peu nombreux, puisque ces patientes n'expriment pas les récepteurs hormonaux, et n'ont pas d'amplification de HER2 (*human epidermal growth facor receptor*), ce qui rend leur pronostic particulièrement péjoratif. Les inhibiteurs de PARP, *(poly-ADP-ribose-polymérase-1*) qui ciblent une autre voie de réparation de l'ADN, permettent chez ces patientes d'aboutir à la mort de la cellule tumorale, selon le principe de létalité synthétique. Il y a actuellement un regain d'intérêt pour cette classe thérapeutique dans le cancer du sein triple négatif. Les mutations *BRCA1* augmentent également significativement le risque de cancer épithélial de l'ovaire. Ce cancer ne représente qu'une part relative des cancers féminins (3,8 %), mais son pronostic est extrêmement mauvais, avec moins de 20% de survie à 5 ans. Le diagnostic est souvent fait à un stade avancé, et les récidives sont fréquentes. Ainsi, 3500 patientes en sont décédées en l'an 2000. Récemment, le rôle des mutations *BRCA1* dans l'ADN tumoral a été démontré : elles sont présentes chez près d'une patiente sur deux atteintes d'un adénocarcinome séreux de haut grade. Surtout, ces patientes mutées peuvent désormais bénéficier d'un traitement par l'inhibiteur de PARP, l'olaparib, qui a obtenu son AMM en 2015 dans cette indication. Environ 10% des cancers de l'ovaire sont dus à des mutations germinales de *BRCA,* qui sont donc héréditaires (contrairement aux mutations de l'ADN tumoral). L'expression de la protéine BRCA1 y est très fortement diminuée pour deux raisons : premièrement, les mutations tronquantes qui représentent plus de 80% des allèles mutés sont à l'origine de la déstabilisation de l'ARN par le mécanisme de « mRNA Decay » ; ensuite, dans les tumeurs, le processus de LOH (loss of heterozygosity) conduit à la perte de l'allèle portant le gène *BRCA1* non muté. Pour résumer, chez les patientes présentant une mutation du gène *BRCA1*, la protéine BRCA1 est donc faiblement voir plus du tout exprimée dans les tumeurs des tissus et organes atteints. Enfin, les mutations *BRCA1* sont également associées au cancer de prostate, et les inhibiteurs de PARP sont testés chez ces patients.

L'utilisation de biomarqueurs est donc particulièrement intéressante pour prédire l'efficacité des traitements, à l'ère de la médecine personnalisée. Ainsi, dans le cancer du côlon ou dans le cancer du

poumon, on utilise des marqueurs moléculaires à la fois comme outils pronostiques et prédictifs de la réponse aux traitements spécifiques. Dans le cancer du sein, la recherche d'une mutation *BRCA1* est réservée aux patientes qui ont une histoire clinique évocatrice (cas familiaux, survenue jeune). Elle est demandée par l'onco-généticien, et les résultats du séquençage peuvent prendre plusieurs mois. Cette longue latence est un frein au développement des inhibiteurs de PARP dans cette indication. Dans le cancer de l'ovaire, la mutation de *BRCA1* est désormais recherchée de façon plus routinière, mais les résultats du séquençage restent souvent longs à obtenir, ce qui est là encore un frein à l'utilisation appropriée de l'olaparib. Surtout, cette mutation n'est absolument pas recherchée dans le cancer de prostate (en dehors des essais cliniques), et son incidence est donc probablement sous-estimée.

La recherche d'une mutation *BRCA1* par une méthode plus rapide que le séquençage, et de façon plus large, est donc un enjeu thérapeutique majeur. En effet, il est crucial de savoir rapidement si le gène *BRCA1* est muté chez ces patients. Or le séquençage nécessite souvent un délai de plusieurs mois et nécessite une expertise technique. Aucune mutation « hot spot » n'existe et près de 1700 variants du gène *BRCA1* ont été répertoriés à ce jour (Breast Cancer Information Core; www.research.nhgri.nih.gov/projects/bic). La connaissance dans les plus bref délais du statut BRCA1 est donc capitale à la fois pour le choix du traitement, mais également pour gérer les conséquences familiales d'une mutation germinale.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet collaboratif : mes travaux de recherche ont montré que la protéine onco-suppressive BRCA1 régule spécifiquement la traduction de certains ARNm. Cette fonction inédite pourrait être importante autant pour expliquer ces propriétés de suppresseur de tumeur que pour son rôle dans la réparation de l'ADN. Pour sa part, Lauriane Eberst est confrontée régulièrement aux problématiques du traitement du cancer du sein et de l'ovaire. Son expérience en clinique lui a permis de se rendre compte des limites du diagnostic par séquençage d'une mutation *BRCA1*. Actuellement, il n'existe pas d'anticorps anti-BRCA1 validé et utilisé en routine en immunohistochimie. Ce type de méthode pourrait probablement ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques, car il sera bien plus facilement accessible, et surtout nettement moins couteux.

Ensemble, nous proposons que l'un au moins de ces ARNm contrôlés par BRCA1 puisse servir de «surrogate marker ». Ce marqueur permettra de prédire l'absence d'expression de la protéine BRCA1 et donc la présence de mutation ainsi que la LOH associée au niveau de l'ADN tumoral. Par exemple, pour l'ARNm d'ADAT2 dont la traduction est négativement régulée par BRCA1, on s'attend à ce que dans une tumeur où BRCA1 est mutée et donc absente, la quantité de protéine ADAT2 soit augmentée, et serve ainsi de marqueur intermédiaire afin de définir le statut BRCA1 muté ou sauvage.

Cette méthode immuno-histochimique, si elle est validée, pourrait permettre aux cliniciens d'établir rapidement et à faible coût le statut BRCA1, pour adapter au mieux le traitement, que ce soit dans le cancer du sein, le cancer de l'ovaire, ou le cancer de la prostate.

C. Anticorps & Constitution des TMA

Nous avons décidé de mener ce projet translationnel avec les quatre protéines codées par les ARNm cibles de BRCA1 pour lesquelles j'ai pu, dans différentes lignées cellulaires, valider que leur expression corrèle avec l'expression de la protéine BRCA1, que cette dernière soit sous-exprimée ou surexprimée dans ces lignées. Il s'agit des protéines ADAT2 (seule cible régulée négativement par BRCA1), CCNL2, DBF4B et TRIM45. J'ai utilisé des anticorps vendus dans le commerce, dirigés contre ces protéines pour réaliser ces tests par Western Blot. Néanmoins, ces anticorps ne sont pas vendus pour des tests en

immunohistochimie (IHC). Nous avons donc recherché auprès de différents fournisseurs (Abcam, Novusbio, etc.) des anticorps validés pour une utilisation en IHC. Pour les protéines CCNL2 et TRIM45, deux anticorps étaient disponibles pour chacune des protéines, nous les avons donc tous testés. Ces différents anticorps ont été testés sur les tissus recommandés par leur fiche d'utilisation et validés suivant les observations du Dr. Isabelle Treilleux, anatomo-pathologiste au Centre Léon Bérard.

Anticorps (Fournisseur)	Tissu	Statut	Observations - Isabelle Treilleux
ADAT2 (Abcam)	Estomac	Mis au point	Joli marquage cytoplasmique des glandes
CCNL2 (Abcam)	Intestin Grêle	Inutilisable	Faible marquage, cytoplasmique au lieu de nucléaire
CCNL2 (Novusbio)	Côlon	Mis au point	Marquage nucléaire granité, au niveau des glandes
DBF4B (Novusbio)	Rectum	Mis au point	Joli marquage cytoplasmique granulaire des glandes
TRIM45 (Abcam)	Placenta	Inutilisable	Marquage nucléaire, très ubiquitaire
TRIM45 (Novusbio)	Placenta	Mis au point	Joli marquage cytoplasmique

Après la validation des anticorps, nous avons réalisé les Tissu Micro Arrays ou TMA. Pour cela, il était absolument nécessaire de connaitre le statut mutationnel de *BRCA1* chez les patientes dont on envisageait de récupérer le prélèvement biologique. Malheureusement, lorsqu'une mutation du gène *BRCA1* est recherchée chez une patiente qui présente un cancer du sein et/ou de l'ovaire, le résultat est indiqué dans son dossier mais aucune « banque de donnée » répertoriant l'ensemble des patientes testées et le résultat pour la présence ou l'absence de mutation *BRCA1* n'est disponible à ce jour. Lauriane Eberst a donc recherché l'information dans le dossier de chaque patiente. Pour ce faire, nous avons défini plusieurs critères : nous n'avons sélectionné que des patientes diagnostiquées au CLB après 2003, présentant un cancer du sein avec un haut grade (SBR2, SBR3) pour lesquelles nous avions des prélèvements disponibles sous forme de blocs de tumeurs (et non pas sous forme de micro-biopsie). Enfin, nous avons constitué deux groupes : le groupe appelé « contrôle » qui se compose de 26 patientes pour lesquelles la mutation constitutionnelle de BRCA1 a été recherchée mais non trouvée. Autrement dit, notre groupe contrôle présente des échantillons tumoraux de cancers de sein non muté pour *BRCA1*. Le deuxième groupe se compose de 19 patientes chez lesquelles il a été trouvé une mutation du gène *BRCA1* et qui donc n'expriment pas ou à de très faibles niveaux la protéine BRCA1. En plus de ces critères, nous avons également fait en sorte que les deux groupes soient homogènes au niveau de leur composition en cancers de type triple négatifs (TN), positifs aux récepteurs hormonaux (RH+), négatifs pour l'amplification de HER2 (HER2-).

Une fois ces deux groupes constitués, je suis allée désarchiver les blocs de tumeurs concordant aux numéros des dossiers patientes. Certaines d'entre elles présentent également un cancer de l'ovaire pour lequel du matériel est disponible, cependant nous avons choisi de nous concentrer en 1e intention sur le tissu mammaire. Enfin nous avons réalisé deux TMA correspondants chacun à l'un des deux groupes. Pour chacun des TMA, les échantillons des patientes sont disposés de façon aléatoire. Ainsi, nous pourrons effectuer une « lecture en aveugle » et recouper ensuite les observations avec les caractéristiques génotypiques et phénotypiques des cancers : groupe contrôle/muté, SBR2/SBR3, TN, RH+, HER-.

Les deux TMA sont maintenant réalisés et nous attendons les résultats d'immunohistochimie pour chacun des anticorps (Voir Annexes).

D. Résultats attendus & Perspectives

L'expression de la protéine ADAT2 augmente lorsque celle de la protéine BRCA1 diminue. Au contraire, l'expression des protéines CCNL2, DBF4B et TRIM45 varie dans le même sens que celle de la protéine BRCA1. Comme il est plus aisé d'observer une augmentation de l'expression d'une protéine plutôt qu'une diminution de son expression à partir des coupes de TMA, on peut s'attendre à ce qu'il soit plus facile d'observer une variation de l'expression d'ADAT2 plutôt que de CCNL2, DBF4B ou encore TRIM45 dans le groupe muté (n'exprimant pas la protéine BRCA1). ADAT2 semble donc être le meilleur candidat. Nous pouvons penser que la variation d'expression d'ADAT2, et des 3 autres cibles soit plus forte dans les échantillons tumoraux des patientes présentant la mutation *BRCA1*, que dans les lignées dans lesquelles nous n'avions pu diminuer que partiellement l'expression de BRCA1 par ARN interférent.

Si l'expression d'ADAT2, CCNL2, DBF4B ou TRIM45 corrèle avec l'expression de BRCA1 et donc la présence d'une mutation *BRCA1* cela permettrait l'utilisation des ARNm cibles de BRCA1 comme « surrogate marker » d'une mutation du gène *BRCA1*. Pour aller plus loin afin de valider un marqueur substitut de BRCA1, en accédant aux échantillons sanguins de ces patientes, nous pourrions par utilisation de la technique récente « CellSearch » isoler les cellules tumorales circulantes (présentes chez les femmes atteintes et en plus grandes quantités chez les patientes qui récidivent) et évaluer dans ces cellules la quantité de protéine cibles de BRCA1. Cette technique novatrice pourrait, dans les années à venir, être un bon intermédiaire aux biopsies pour le suivi médical des patientes (Van Berckelaer et al. 2016).

A plus long terme cela servirait d'outil à la fois prédictif de réponse au traitement par inhibiteur de PARP, déjà utilisée en clinique, et de dépistage de mutation *BRCA1* à large échelle, en particulier chez les patients atteints de cancer du sein, de l'ovaire et de la prostate.

Conclusion Générale

BRCA1 est l'un des deux gènes majeurs de prédisposition au cancer du sein. La protéine BRCA1 quant à elle, est une protéine multifonctionnelle et l'ensemble de ses fonctions identifiées jusqu'ici pourrait participer à son rôle de suppresseur de tumeur. Les multiples partenaires protéiques de BRCA1 impliqués dans des voies cellulaires distinctes, lui confèrent de nombreuses fonctions par lesquelles elle peut assurer la surveillance globale de l'intégrité cellulaire.
L'équipe dans laquelle j'ai mené ma thèse a identifié un nouveau partenaire protéique de BRCA1, la protéine de liaison au poly(A) des ARN messagers PABP1, et a ainsi mis en lumière l'implication de BRCA1 dans la régulation de la traduction (Dizin et al. 2006). De plus, de récents travaux suggèrent que dans des conditions dangereuses pour la cellule et potentiellement oncogéniques, comme par exemple un stress qui cause des dommages à l'ADN (génotoxique), la synthèse protéique est fortement altérée. Mon travail de thèse a eu pour objectif d'explorer cette nouvelle fonction de la protéine BRCA1, et de comprendre comment elle pourrait, elle aussi, faire partie du rôle global de maintien de l'intégrité de la cellule. Lorsque j'ai débuté ma thèse, les questions étaient nombreuses : BRCA1 peut-elle se lier aux ARNm qu'elle régule traductionnellement ? Quels sont ces ARNm « cibles » ? Quelles sont les fonctions des protéines codées par ces ARNm dans la cellule ? Sont-ils importants pour le rôle suppresseur de tumeur de BRCA1 ? Mais aussi au niveau du rôle de BRCA1 dans le recrutement de ces ARN : BRCA1 est-elle une ITAF ? Se lie-t-elle à d'autres facteurs de la traduction que PABP1 ? Recrute-t-elle ses ARNm « cibles » *via* PABP1 ?

Mon travail de thèse, et celui des autres membres de mon équipe, a permis d'identifier les ARNm « cibles » de BRCA1 par la technique d'immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques (RIP). Nous avons pu également valider que certains d'entre eux sont bel et bien associés à BRCA1 pour leur régulation traductionnelle. Cette analyse, réalisée à partir du contenu des polysomes de cellules épithéliales mammaires MCF-7 exprimant de façon transitoire un ARN interférent dirigé contre BRCA1 a été permise par une technique que j'ai mise en place au laboratoire, les profils polysomiques. De façon intéressante, nous avons montré que BRCA1 régule différemment la traduction des cibles (certaines voient leur traduction augmentée et d'autres, au contraire, diminuée).
Ces résultats ont été obtenus dans des cellules en condition de croissance normale dans lesquelles seuls les niveaux d'expression de BRCA1 ont été modifiés. Néanmoins, il est probable que, comme la plupart de ses autres fonctions, la régulation de la traduction par BRCA1 soit plus particulièrement active, ou qualitativement différente dans des conditions de stress, notamment de stress génotoxique. En effet, le rôle de BRCA1 est de protéger la cellule, et notamment maintenir l'intégrité de son génome, dans des conditions où celle-ci est soumise à des changements environnementaux néfastes et, le cas échéant, d'induire son apoptose si les dommages sont irréparables. Cette situation a été particulièrement bien décrite dans le cadre de stress génotoxiques. En effet, il a été montré par plusieurs équipes que, suite à un stress génotoxique comme l'exposition des cellules à des radiations ionisantes (IR), le cytoplasme pourrait être enrichi en BRCA1 en réponse au stress suivant une cinétique qui restait à préciser.
Pendant ma thèse, j'ai établi les conditions de stress génotoxique induisant la localisation cytoplasmique de BRCA1, afin d'étudier si les cibles que nous avons précédemment identifiées sont les mêmes dans ces conditions cellulaires particulières. Nous nous attendons à ce que, dans ces

conditions qui favorisaient la mise en place d'un programme d'expression des gènes adapté, la traduction d'ARNm spécifiques codant des protéines impliquées dans la réponse à ce stress soit stimulée et que la traduction d'ARNm codant des protéines impliquées dans la croissance et/ou la prolifération cellulaire soit réprimée encore plus fortement notamment avec la participation de BRCA1.

Cette modification spécifique de la traduction dépend, entre autres, d'éléments régulateurs présents dans la 5' ou 3'UTR des ARNm, tels que les IRES et les uORF, ainsi que de la régulation de l'activité des facteurs d'initiation de la traduction ou encore de la localisation subcellulaire des protéines intervenant ponctuellement dans la traduction, les ITAF et les RBP. Ainsi, nous pensons que dans des conditions d'endommagement à l'ADN, l'activité traductionnelle de BRCA1 prendrait tout son sens, ou du moins serait adaptée à ces conditions cellulaires particulières (Figure 14).

La collaboration que nous avons établie avec le Dr. Nicolas FORAY (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) et les premiers résultats que nous avons obtenus 8h post stress, moment où l'activité traductionnelle de BRCA1 semble avoir le plus de chances d'être active, devraient nous permettre d'évaluer l'effet traductionnel de BRCA1 sur les cibles précédemment identifiées par RT-PCR quantitative. Cette perspective fait partie des projets à court terme de l'équipe.

Enfin, en collaboration avec des cliniciens du Centre Léon Bérard j'ai permis l'acquisition d'échantillons tumoraux de patientes suivies au CLB pour un cancer du sein. Connaitre le statut mutationnel de *BRCA1* est capital à la fois pour le choix du traitement, mais également pour gérer les conséquences familiales d'une mutation germinale. Malheureusement statuer sur une mutation BRCA1 reste difficile faute d'outils disponibles et reste un enjeu thérapeutique majeur. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet collaboratif : nous proposons la validation d'un marqueur de substitution de BRCA1 ou « surrogate marker » pour une utilisation éventuelle en routine à l'hôpital. Il permettra de connaitre rapidement et à faible coût le statut de BRCA1 chez ces patients. Ce nouveau biomarqueur, s'il est validé, pourra permettre aux cliniciens d'établir rapidement et à faible coût le statut BRCA1 pour établir un diagnostique mais aussi pour adapter au mieux le traitement. Autrement dit, valider un tel biomarqueur est un enjeu « théranostique » car il est crucial non seulement pour la thérapie mais aussi pour le diagnostique, à l'ère de la médecine personnalisée, pour les cancers du sein déficientes en *BRCA1.*

En conclusion, les résultats obtenus pendant ma thèse confirment l'implication de BRCA1 dans la traduction et soulignent l'importance d'identifier le(s) mécanisme(s) par lequel(s) elle exerce cette fonction, les conditions dans lesquelles elles sont spécifiquement régulées, ainsi que l'étude approfondie de ses cibles. L'étude des fonctions que ces cibles exercent dans la cellule devrait permettre d'appréhender le lien entre l'absence de BRCA1 et la survenue du cancer du sein. Enfin, ces cibles pourraient constituer de nouveaux marqueurs tumoraux et/ou de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de cibler précisément les tumeurs déficientes en *BRCA1* dans un premier temps et pourquoi pas au plus long terme dans le cancer de l'ovaire, ou encore de la prostate dans lesquels la mutation *BRCA1* est également retrouvée.

Liste des publications, communications & distinctions

A. Publications

1. **Berthel E**, Vincent A, Diaz JJ, Dalla Venezia N. *An unexpected role for the tumor suppressor BRCA1 in translation : towards a new therapeutic tool for breast cancer.* (En préparation)

2. Bobrowicz M, Dwojak M, Pyrzynska B, **Berthel E**, Dalla Venezia N, Kozikowski M, Stachura J, Malenda A, Siernicka M, Domagala A, Bojarczuk K, Zagozdzon A, Gabrysiak M, Miazek N, Zapala P, Diaz JJ, Tomczak W, Karp M, Lech-Maranda E, Firczuk M, Zerrouqi A, Golab J, Winiarska M. *HDAC6 inhibition up-regulates CD20 level and increases the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies.* **Blood** (under revisions)

3. Vincent A, **Berthel E**, Dacheux E, Magnard C, Dalla Venezia N. *BRCA1 affects Protein Phosphatase 6 signalling through its interaction with ANKRD28.* **Biochem J** 473, 949-60 (2016)

B. Communications Orales

1. **Berthel E**, Vincent A, Eberst L, Morin V, Pion N, Treilleux I, Marcel V, Diaz JJ, Dalla Venezia N.
Présentation du projet translationnel AJORA.
Journée médicale du Centre Léon Bérard.
Institut Lumière, Septembre 2016.

2. **Berthel E**, Vincent A, Eberst L, Morin V, Pion N, Treilleux I, Marcel V, Diaz JJ, Dalla Venezia N.
Un rôle inattendu du suppresseur de tumeur BRCA1 dans la traduction: Vers un nouvel outil théranostique pour les cancers féminins (Teaser).
Retraite du département « Plasticité des cellules cancéreuses » du CRCL.
Aussois, Juin 2016.

3. **Berthel E**, Dacheux E, Vincent A, Suau F, Basset A, Lachuer J, Diaz JJ, Dalla Venezia N.
BRCA1: un nouvel « trans-acting » facteur dans la régulation de la traduction des ARNm.
Retraite du département « Plasticité des cellules cancéreuses » du CRCL.
Aussois, Juin 2015.

4. **Berthel E**. *La protéine BRCA1 et le cancer du sein.*
Finale régionale du concours “Ma thèse en 180 secondes” (Vulgarisation Scientifique).
Université de Lyon, Mai 2015.

5. **Berthel E**, Vincent A, Devic C, Foray N, Dalla Venezia N.
Etude de la localisation subcellulaire de la protéine BRCA1 dans des cellules mammaires cancéreuses MCF-7 soumises à un stress génotoxique.
Journée Scientifique du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon.
Lyon, Mars 2013.

C. Communications par affiche

1. Malgorzata Bobrowicz, Joanna Stachura, Michal Dwojak, Antoni Domagala, Beata Pyrzynska, **Elise Berthel**, Nicole Dalla Venezia, Marta Siernicka, Malgorzata Firczuk and Magdalena Winiarska
L'inibition de *HDAC6 augmente la traduction de l'ARNm de CD20 et augmente l'efficacité de l'immunothérapie anti-CD20.*
58e congrès de l'ASH (American Society of Hematology)
San Diego, Décembre 2016.
(Abstract paru dans Blood 2016 128:1586).

2. **Berthel E**, Vincent A, Eberst L, Morin V, Pion N, Treilleux I, Marcel V, Diaz JJ, Dalla Venezia N.
Les Journées « Jeunes Chercheurs » de la Fondation ARC.
Paris, Décembre 2016.

3. **Berthel E**, Dacheux E, Vincent A, Suau F, Basset A, Lachuer J, Diaz JJ, Dalla Venezia N.
Congrès « Translational Control » Génopolys.
Montpellier, Avril 2015.

4. **Berthel E**, Dacheux E, Vincent A, Suau F, Basset A, Dalla Venezia N.
Congrès « Post-Transcriptional gene regulation ».
Institut Curie, Paris, Mars 2015.

5. **Berthel E**, Vincent A, Suau F, Basset A, Dacheux E, Dalla Venezia N.
Journée Scientifique de la Fédération de Recherche Santé Lyon-Est (SFR).
Lyon, Décembre 2014.

D. Prix & Distinctions

1. Allocation doctorale de recherche pour une 4e année de thèse. Financement par la Fondation ARC (6mois). Octobre, 2016.

2. Prix AJORA pour un projet translationnel mené par un jeune chercheur et un jeune clinicien. Financement CLB (1an). Avril, 2016.

3. Allocation doctorale de recherche à l'école doctorale BMIC (Biologie Moléculaire Intégrative & Cellulaire). Financement par le Ministère de L'enseignement Supérieur (3 ans). Octobre, 2013.

Annexes

Annexe 1

La protéine BRCA1 affecte la signalisation PP6 *via* son interaction avec la protéine ANKRD28

Résumé

Le suppresseur de tumeur BRCA1 est impliqué dans plusieurs processus nucléaires comprenant la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription et le remodelage de la chromatine. BRCA1 possède également certaines fonctions cytoplasmiques incluant une activité pro-apoptotique. Nous avons identifié ANKRD28 (domaine de répétition d'ankyrine 28) comme une nouvelle protéine interagissant avec BRCA1 à partir d'un criblage double hybride de levure. Nous avons confirmé cette interaction par des immunoprécipitations réciproques des deux protéines surexprimées. L'interaction endogène entre BRCA1 et ANKRD28 a également été observée par co-immunoprécipitation et localisée dans le cytoplasme par la technique de Proximity Ligation Assay (PLA). Le site principal d'interaction d'ANKRD28 sur BRCA1 est situé dans sa région centrale intrinsèquement désordonnée. Alors que l'extinction de l'ANKRD28 entraîne une déstabilisation de IκBε (inhibiteur du facteur nucléaire κBε) *via* l'activation du co-régulateur de PP6 (protéine phosphatase 6) sous stimulation au TNFα (facteur de nécrose tumorale α), la surexpression de BRCA1, au contraire, stabilise IκBε. Une forme tronquée de BRCA1 qui n'interagit pas avec la protéine ANKRD28 n'a pas cet effet. Nos résultats suggèrent que BRCA1 est un nouveau modulateur de la signalisation PP6 via son interaction avec ANKRD28. Ce nouveau processus cytoplasmique pourrait participer à la fonction suppresseur de tumeur de BRCA1.

Ma contribution à ce travail de recherche

Ce projet a été mené en parallèle de mon projet de thèse (A. Un rôle inattendu du suppresseur de tumeur BRCA1 dans la traduction: vers un nouvel outil théranostique pour les cancers féminins) dans notre laboratoire. L'interactant ANKRD28 a été recherché par la même technique de double hybride chez la levure, à l'origine de la découverte de l'interaction des protéines BRCA1 et PABP1. Ma contribution dans ce travail a consisté en l'interprétation et la discussion des résultats ainsi qu'en la proposition d'expériences à mener pour répondre aux commentaires des rapporteurs au moment de la révision du manuscrit. J'ai notamment irradié les cellules qui ont servies à la réalisation du PLA ANK/BRCA1 aux temps 0h, 1h et 4h post-stress. De plus, la mise au point que j'ai effectué post stress, afin de m'assurer de l'activation des voies de signalisation et de réparation de l'ADN par pH2AX et BRCA1 suite à un stress génotoxique de type radiation ionisante a été utilisé pour répondre aux rapporteurs et a été ajouté en « supplementary data ».

Article 2

Statut: Publié

BRCA1 affects protein phosphatase 6 signalling through its interaction with ANKRD28.

Vincent A, Berthel E, Dacheux E, Magnard C, Venezia NL.

Annexe 2

L'inhibition de HDAC6 augmente le taux de CD20 et augmente l'efficacité des anticorps monoclonaux anti-CD20

Résumé

La diminution de la concentration de CD20, une cible moléculaire pour les anticorps monoclonaux, est un problème clinique conduisant à une diminution de l'efficacité des traitements thérapeutiques à base d'anti-CD20. La modulation épigénétique du gène codant CD20 (*MS4A1*) a été proposée comme un mécanisme pour l'efficacité thérapeutique réduite des anticorps anti-CD20 et confirmée avec des inhibiteurs pan-inhibiteurs d'histones désacétylases (HDACis). Étant donné que l'utilisation de HDACi est associée à des effets secondaires importants, l'identification d'une isoforme HDAC particulièrement impliquée dans la régulation CD20 semble être d'une importance primordiale. Dans cette étude, nous démontrons pour la première fois le rôle de HDAC6 dans la régulation des niveaux de CD20. En utilisant des approches pharmacologiques et génétiques, nous montrons que l'inhibition de l'activité HDAC6 augmente significativement le niveau de la protéine CD20 et augmente l'efficacité des anticorps monoclonaux anti-CD20 dans les lignées de cellules tumorales de cellules B et les cellules malignes primaires. Nous démontrons en outre que HDAC6 influence la synthèse de novo de la protéine CD20 indépendamment de la régulation de la transcription du gène codant pour CD20.

Ainsi, la traduction de l'ARNm de CD20 est significativement plus importante après l'inactivation de HDAC6, comme le montre l'analyse des fractions d'ARNm associés aux polysomes. Nous montrons ici un nouveau rôle pour HDAC6 dans le mécanisme post-transcriptionel de la régulation du gène codant pour CD20. Ensemble, nos résultats montrent que l'inhibition de HDAC6 est une réelle stratégie thérapeutique qui doit être mise en œuvre en combinaison avec les thérapies utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD20 et ouvre de nouvelles voies pour l'utilisation clinique du HDACi actuel**.**

Ma contribution à ce travail de recherche

Ce projet a été mené en parallèle de mon projet de thèse (A. Un rôle inattendu du suppresseur de tumeur BRCA1 dans la traduction: vers un nouvel outil théranostique pour les cancers féminins) dans notre laboratoire. Afin de valider leurs observations, et de montrer que la traduction de l'ARNm de CD20 est plus importante en condition d'extinction de HDAC6, l'équipe polonaise du Dr. Winiarska nous a contactés pour nos compétences dans la régulation de la traduction. J'ai donc réalisé des profils polysomiques à partir des extraits cellulaires que les auteurs avaient préparés dans leur laboratoire. J'ai extraits les ARNm associés aux polysomes dans la condition contrôle et celle présentant une diminution de HDAC6. J'ai réalisé les RT sur ces échantillons avant de les envoyer dans leur laboratoire. Ensemble, nous avons interprété les résultats des qPCR pour l'ARNm de CD20 sur les 3 répliquats qui ont été menés et j'ai réalisé les figures du manuscrit concernant les profils.

Article 3

Statut: En révision (Blood Journal)

HDAC6 inhibition up-regulates CD20 level and increases the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies.

Bobrowicz M, Dwojak M, Pyrzynska B, Berthel E, Dalla Venezia N, Kozikowski M, Stachura J, Malenda A, Siernicka M, Domagala A, Bojarczuk K, Zagozdzon A, Gabrysiak M, Miazek N, Zapala P, Diaz JJ, Tomczak W, Karp M, Lech-Maranda E, Firczuk M, Zerrouqi A, Golab J, Winiarska M.

Annexe 3 : Liste et caractéristiques des tumeurs présentes dans la cohorte non mutée

CENTRE DE LUTTE CONTRE LE CANCER LEON BERARD

ENR – TMA AJORA – COHORTE NON MUTEE

Investigateur: N. DALLA VENEZIA | **Pathologiste**: I.TREILLEUX

Tumeurs (Patientes CLB)		Année de Naissance	Age au Diagnostic	Mutation *BRCA*	Cancer du Sein	Description	Triple negatif	Cancer de l'Ovaire	Commentaires
AN0404169	T1	1970	34	0	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante, Mastectomie
AN06004349	T2	1977	29	0	1	CCI SBR2 RH+ HER2-	0	0	Piece operatoire, pas de CT neoadjuvante
AN06005225	T3	1962	44	0	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN06001844	T4	1978	29	0	1	CCI SBR2 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN07004069	T5	1964	43	0	1	CCI RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN07005958	T6	1967	40	0	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante, Tumorectomie
AN07006654	T7	1961	46	0	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Piece operatoire, pas de CT neoadjuvante
AN08003459	T8	1958	50	0	1	CCI SBR2 RH+ HER2-	0	0	SBR1 5mm à Droite et SBR2 8mm à gauche. Pas de CT neo-adj mais SBR2
AN08004750	T9	1975	33	0	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante, Tumorectomie
AN08005527	T10	1943	65	0	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN09005108	T11	1973	36	0	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN10004792	T12	1971	39	0	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN10005990	T13	1973	37	0	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN10008448	T14	1967	43	0	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Piece opératoire, pas de CT neoadjuvante
AN11000361	T15	1947	63	0	1	CCI SBR2 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN11004851	T16	1983	28	0	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante, Tumorectomie
AN12004423	T17	1955	57	0	1	CCI SBR3	1	0	Histo=piece operatoire, pas de CT neoadjuvante
AN12005973	T18	1968	44	0	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante
AN12007901	T19	1968	44	0	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante
AN12009143	T20	1963	50	0	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante, Tumorectomie
AN12010719	T21	1971	41	0	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN12012140	T22	1968	44	0	1	CCI SBR2 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante
AN13002736	T23	1963	50	0	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante, Tumorectomie
AN13005358	T24	1970	43	0	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante, Tumorectomie
AN14002415	T25	1973	40	0	1	CCI SBR2 RH+ HER2-	0	0	SBR2
AN15009238	T26	1985	30	0	1	CCI SBR2 RH+ HER2-	0	0	Pas de CT néoadjuvante

CCI: Cancer canalaire infiltrant
CT : Chimiothérapie

Annexe 4 : Liste et caractéristiques des tumeurs présentes dans la cohorte mutée *BRCA1*

CENTRE DE LUTTE CONTRE LE CANCER LEON BERARD

ENR – TMA AJORA – COHORTE MUTEE

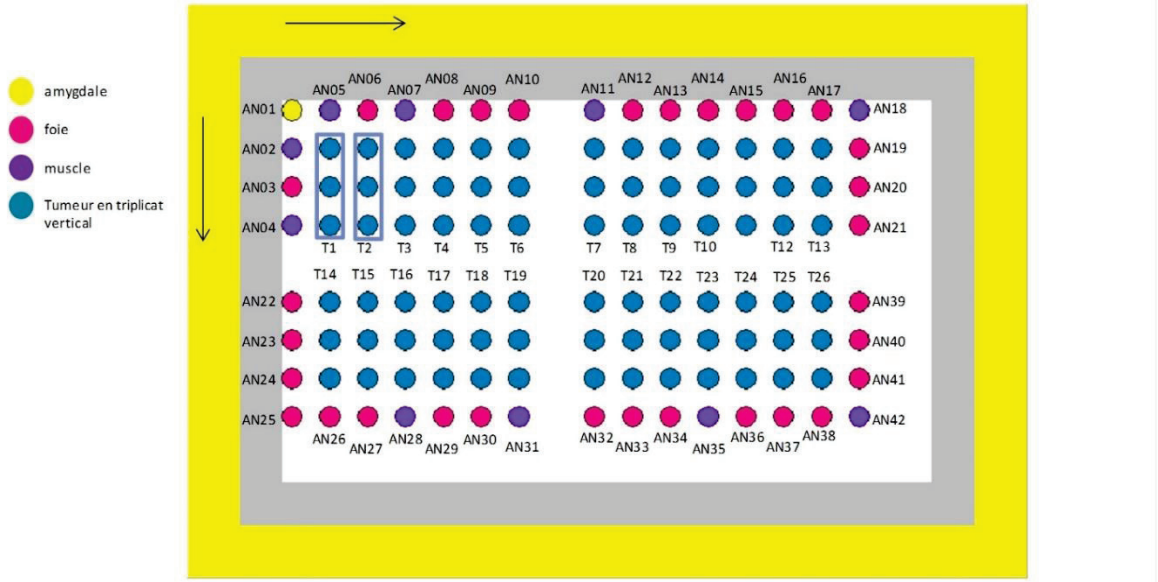
Investigateur: N. DALLA VENEZIA | **Pathologiste**: I.TREILLEUX

Tumeurs (Patientes CLB)		Année de Naissance	Age au Diagnostic	Mutation BRCA	Cancer du Sein	Description	Triple negatif	Cancer de l'Ovaire	Commentaires
AN07002067	T1	1968	39	1	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Tumorectomie (2007)+ Mastectomie bilatérale complementaire (2010,tissu sain)
AN07003513	T2	1973	34	1	1	CCI SBR3	1	0	Pas de chimiothérapie néoadjuvante, (tumorectomie)
AN07004941	T3	1953	54	1	1	CCI SBR3	1	0	Tumorectomie + Mastectomie gauche (2008) + Mastectomie controlatérale (2013)
AN07006161	T4	1959	48	1	1	CCI SBR3	1	0	CCI controlatéral (2011)+ Annexectomie (2011) Pas de cancer de l'ovaire
AN07007734	T5	1948	59	1	1	CCI SBR3	1	0	Mastectomie gauche (2007), pas de tumeur sur la mastectomie droite préventive (2012)
AN09000425	T6	1973	35	1	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Tumorectomie (2009) + Mastectomie bilatérale et annexectomie bilatérale sans tumeur retrouvée
AN09003324	T7	1969	40	1	1	CCI SBR3	1	0	Tumorectomie, pas de CT néoadjuvante
AN09005598	T8	1983	26	1	1	CCI SBR3	1	0	RAS
AN10002140	T9	1979	24	1	1	CCI SBR3	1	0	Prise en charge au CLB pour 3ème cancer; a déjà eu de la CT adjuvante pour cancer précédent
AN10005861	T10	1972	38	1	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante, tumorectomie
AN10010250	T11	1949	61	1	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Tumorectomie sein gauche ; ovaire sain congelé 09/04/2014
AN12005234	T12	1975	37	1	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	Mastectomie préventive controlatérale et annexectomie bilatérale préventive (ovaire sain)
AN12010355	T13	1955	57	1	1	CCI SBR3 RH+ HER2-	0	0	mastectomie bilatérale dans le même temps; puis annexectomie en 2013
AN13003884	T14	1979	31	1	1	CCI SBR3	1	0	Mastectomie préventive droite
AN13008098	T15	1966	47	1	1	CCI SBR3	1	0	Pas de CT néoadjuvante, Pièces opératoires
AN13009802	T16	1977	36	1	1	CCI SBR 3 RH+ HER2-	0	0	Mastectomie préventive bilatérale
AN13011128	T17	1986	27	1	1	CCI SBR3	1	0	Tumorectomie sein droit + mastectomie après chimiothérapie, N°AN=tumorectomie avant CT
AN13011665	T18	1969	44	1	1	CCI SBR3	1	1	Pas de CT néoadjuvante, Mastectomie
AN14013662	T19	1982	32	1	1	CCI SBR3	1	0	RAS

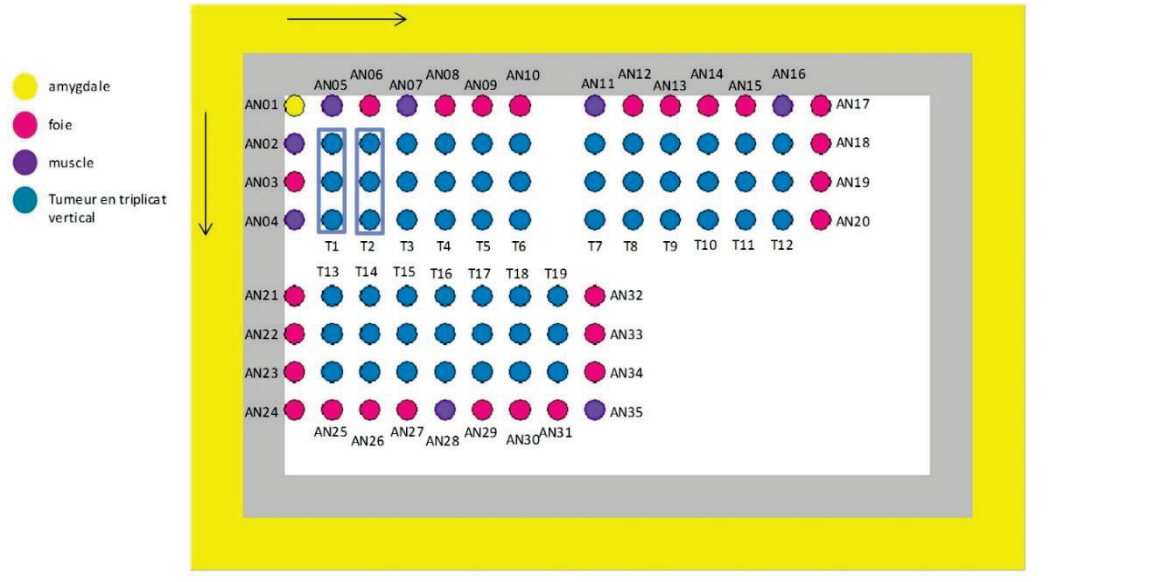
CCI: Cancer canalaire infiltrant
CT : Chimiothérapie
RAS: Rien a signaler

Annexe 5 : Plan des TMA réalisés sur le TMA Designer 2®

AJORA – BRCA1 non muté



AJORA – *BRCA1* muté



BRCA1 affects protein phosphatase 6 signalling through its interaction with ANKRD28

Anne Vincent*†‡, Elise Berthel*†‡, Estelle Dacheux*†‡, Clémence Magnard*†‡ and Nicole L. Dalla Venezia*†‡[1]

*Université Lyon I, 28 Rue Laennec, F-69008 Lyon, France
†INSERM U1052, CRCL, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 28 Rue Laennec, F-69008 Lyon, France
‡CNRS UMR5286, CRCL, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 28 Rue Laennec, F-69008 Lyon, France

The tumour suppressor BRCA1 (breast and ovarian cancer-susceptibility gene 1) is implicated in several nuclear processes including DNA repair, transcription regulation and chromatin remodelling. BRCA1 also has some cytoplasmic functions including a pro-apoptotic activity. We identified ANKRD28 (ankyrin repeat domain 28) as a novel BRCA1-interacting protein in a yeast two-hybrid screen and confirmed this interaction by reciprocal immunoprecipitations of the two overexpressed proteins. Endogenous interaction between BRCA1 and ANKRD28 was also observed by co-immunoprecipitation and located in the cytoplasm by proximity ligation assay. The main site of interaction of ANKRD28 on BRCA1 is located in its intrinsically disordered scaffold central region. Whereas ANKRD28 silencing results in a destabilization of IκBε (inhibitor of nuclear factor κBε) through its activation of PP6 (protein phosphatase 6) co-regulator upon TNFα (tumour necrosis factor α) stimulation, BRCA1 overexpression stabilizes IκBε. A truncated form of BRCA1 that does not interact with ANKRD28 has no such effect. Our findings suggest that BRCA1 is a novel modulator of PP6 signalling via its interaction with ANKRD28. This new cytoplasmic process might participate in BRCA1 tumour-suppressor function.

Key words: ANKRD28, BRCA1, cell surveillance, cytoplasmic signalling, protein interaction, protein phosphatase 6.

INTRODUCTION

Germline mutations of the *BRCA1* (breast and ovarian cancer-susceptibility gene 1) gene strongly increase the risk of developing breast and ovarian cancers [1]. In addition, a reduced expression of the *BRCA1* gene has been observed in approximately one-third of sporadic breast cancers [2].

The tumour-suppressor protein BRCA1 maintains genomic integrity through its involvement in a number of nuclear processes, including DNA repair, transcription regulation, cell cycle checkpoint control, chromatin remodelling, protein ubiquitination and mRNA splicing [3,4]. Lately, it has become accepted that tumour suppressors such as BRCA1 achieve their central role in cell surveillance by exerting different functions in several cell compartments [5]. In this context, BRCA1 has been described as a nucleocytoplasmic shuttling protein. Several studies have proposed a pro-apoptotic role for BRCA1 associated with its cytoplasmic localization [6,7]. In addition, BRCA1 has been shown to be involved in the regulation of two major cytoplasmic processes that are lipogenesis and translation [8,9].

Interestingly, BRCA1 most often achieves these different functions through its capacity to interact with various proteins involved in the corresponding processes. For example, in the nucleus, BRCA1 is involved in DNA repair via its interaction with RAD50 and RAD51 within the BRCA1-C and BRCA1-D master complexes. It also participates in transcriptional control through its interaction with RNA polymerase II and RNA helicase A, as well as several transcription factors [4]. In the cytoplasm, BRCA1 has been shown to interact with IP_3R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) to stimulate apoptosis [10], with the rate-limiting enzyme for fatty acid synthesis ACCA (acetyl-CoA carboxylase α) [11,12] and with the key player in protein synthesis PABP1 [poly(A)-binding protein 1] [13].

Therefore BRCA1 is a multifunctional protein acting as a scaffold for the formation of different protein complexes which, altogether, contribute to its central role in cell surveillance. However, further studies are still needed to fully appreciate the molecular mechanisms underlying the role of BRCA1 as a tumour suppressor.

In the present study, we explored further the molecular mechanisms of action of BRCA1, using the yeast two-hybrid approach. We report the identification of a novel BRCA1-interacting protein, ANKRD28 (ankyrin repeat domain 28). ANKRD28 was identified as a PP1 (protein phosphatase 1)-targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) K, and was named PITK (phosphatase interactor targeting K protein) [14]. ANKRD28 association with DOCK180 (dedicator of cytokinesis 180) was described to promote cell migration [15]. Finally, ANKRD28, also named PP6-ARS-A (protein phosphatase 6-ankyrin repeat subunit A), was shown to interact with PP6 and constitutes a novel regulatory subunit of PP6 with subsequent implication in IκBε [inhibitor of NF-κB (nuclear factor κB) ε] dephosphorylation upon TNFα (tumour necrosis factor α) stimulation [16]. So far, the available data on this protein are limited and only a few interacting proteins

Abbreviations: ANKRD28, ankyrin repeat domain 28; BRCA1, breast and ovarian cancer-susceptibility gene 1; BRCA1-1150Cter, BRCA1 C-terminal fragment; BRCT, BRCA1 C-terminus; CK18, cytokeratin 18; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DOCK180, dedicator of cytokinesis 180; DSB, double-strand break; E-cadherin, epithelial cadherin; HEK, human embryonic kidney; ID, intrinsically disordered; IκB, inhibitor of NF-κB; IKK, IκB kinase; IR, ionizing radiation; NF-κB, nuclear factor κB; PABP1, poly(A)-binding protein 1; PLA, proximity ligation assay; PP, protein phosphatase; PP6c, catalytic subunit of PP6; PP6R1, regulatory subunit of PP6; TNFα, tumour necrosis factor α; TopI, topoisomerase I; wt, wild-type.

[1] To whom correspondence should be addressed (email nicole.dalla-venezia@lyon.unicancer.fr).

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

have been uncovered. In the present study, we show that BRCA1, through its association with ANKRD28, operates as a novel actor in PP6 signalling.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The primary antibodies used were as follows: mouse monoclonal antibodies against BRCA1 (MS110) (Calbiochem), IκBα (clone 25) (BD Biosciences), E-cadherin (epithelial cadherin) (610181) (BD transduction Laboratories), CK18 (cytokeratin 18) (ab82254) (Abcam), TopI (topoisomerase I) (C-21) (BD Pharmingen), α-tubulin (DM1A) (Calbiochem), V5 (Life technologies) and FLAG (M2) (Sigma), and rabbit polyclonal antibodies against ANKRD28 (A300-974A and A300-975A) (Bethyl Laboratories), BRCA1 (ab131360) (Abcam), IκBε (9249) (Cell Signaling Technology), histone H3 (ab1791) (Abcam), PP6c (catalytic subunit of PP6) (A300-844A) (Bethyl Laboratories). The anti-HA (haemagglutinin) antibody (16B12) (Covance) and rabbit IgG (Abcam) were used for immunoprecipitation experiments as non-relevant anti-mouse and anti-rabbit antibodies respectively. Secondary antibodies used were horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch). TNFα was purchased from RD Systems.

Two-hybrid assay

A two-hybrid screen was performed as described previously [11,13]. Briefly, the L40 strain (Life Technologies) was co-transformed with pGBT9-BRCT (BRCA1 C-terminus) and a Gal4 transactivation-domain-tagged 11-day-old mouse embryo cDNA library (Clontech). Yeasts were plated on a leucine/tryptophan/histidine amino-acid-depleted DOB (dropout base) medium containing 1 mM 3-aminotriazole. Transformants were tested for β-galactosidase activity using a yeast colony-filter assay. Plasmids of positive colonies were used to transform an Electromax DH10B bacterial strain. The prey plasmids amplified in bacteria were retransformed with pGBT9 or pGBT9-BRCT into the L40 strain and analysed by DNA sequencing.

Plasmid constructs

Mammalian expression constructs

The pCDNA3β plasmid expressing full-length BRCA1 protein (BRCA1-wt) and the pCMV-Tag3C plasmid expressing the C-terminal fragment of BRCA1 (BRCA1-1150Cter) were described previously [17]. The FLAG/pCMV plasmid expressing the N-terminal FLAG-tagged BRCA1 (FLAG–BRCA1) was described previously [18] and was a gift from Dr P. Rio (INSERM UMR 1069, Tours, France). The pCDNA3.1/V5-His plasmid expressing the C-terminal V5-tagged ANKRD28 (V5–ANKRD28) was kindly provided by Dr D.L. Brautigan [16]. FLAG–BRCA1 mutants, namely FLAG–BRCA1-P938X, FLAG–BRCA1-Y1563X, FLAG–BRCA1-E1694X and FLAG–BRCA1-Y1853X were generated using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) with the primers 5′-GGTTGGTCAGAAAGATAAGTGAGTTGATAATGCCAAATGTAG-3′ and 5′-CTACATTTGGCATTATCAACTCACTTATCTTTCTGACCAACC-3′ for P938X, 5′-CTAGAGGGAACCCCTTAACTGGAATCTGGAATCAGC-3′ and 5′-GCTGATTCCAGATTCCAGTTAAGGGGTTCCCTCTAG-3′ for Y1563X, 5′-GTTGTTATGAAAACAGATGCTTAGTTTGTGTGTGAACGGACACTG-3′ and 5′-CAGTGTCCGTTCACACACAAACTAAGCATCTGTTTTCATAACAAC-3′ for E1694X, 5′-GGAGCTGGACACCTAACTGATACCCCAG-3′ and 5′-CTGGGGTATCAGTTAGGTGTCCAGCTCC-3′ for Y1853X. All constructs were sequenced to verify the mutations.

Bacterial expression constructs

The pGEX-BRCT plasmid was described previously [11]. The pGEX-Frg1 plasmid was generated by PCR amplification of nucleotides 1–970 of BRCA1 using the cDNA of BRCA1 cloned in pCDNA3β as the template and the following primers 5′-ATAGGATCCATGGATTTATCTGCTCTTCGC-3′ and 5′-ATAGTCGACTTCCAGCCCATCTGTTATGT-3′. The PCR product was cloned into the BamHI/SalI sites of pGEX-4T-1 (GE Healthcare). The construct was verified by DNA sequencing. The pGEX-Frg2–pGEX-Frg6 plasmids were described previously [19] and were gifts from Dr B. Lopez (UMR CNRS 8200, Paris, France) and Dr F Larminat (UMR CNRS 5089, Toulouse, France).

Cell culture and plasmid transfection

The human breast carcinoma cell line MCF7 (available from ATCC) was maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 4.5 g/l glucose supplemented with 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 0.01 mg/ml recombinant human insulin, 10 % FBS, 100 μg/ml streptomycin and 100 units/ml of penicillin. The HEK (human embryonic kidney)-293T cell line and the human cervix cancer cell line HeLa (available from A.T.C.C.) were maintained in DMEM containing 4.5 g/l glucose supplemented with 10 % FBS, 100 μg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin.

For transfection, HEK-293T cells were plated at 2×10^6 cells per 10-cm-diameter dish 24 h before transfection with 4 μg of plasmid and 20 μl of ExGen 500 (Euromedex). At 24 h after transfection, cells were processed for GST-pull-down assay or immunoprecipitation.

For transfection, HeLa cells were plated at 3×10^5 cells per well in a six-well plate 24 h before transfection with 0.5 μg of plasmid and 2.5 μl of ExGen 500 (Euromedex). At 24 h after transfection, fresh medium was added and cells were treated (or not) with TNFα and processed for immunoblotting. Western blot bands were quantified using ImageLab (Bio-Rad Laboratories) software.

Subcellular fractionation

Thermo Scientific Subcellular Protein Fractionation Kit (catalogue number 78840) was used according the supplier procedure to separate cellular cytoplasmic, nuclear, membrane and chromatin-bound fractions.

RNAi

The siRNA duplexes were purchased from MWG and were provided as purified and annealed duplexes. The sequence of the siRNA against BRCA1 (si-BRCA1) was 5′-GGAACCUGUCUCCACAAAG-3′ [13]. The sequences of the siRNAs against ANKRD28 are 5′-UCAGAAUGCUUACGGCUAU-3′ (si-ANKRD28-1), 5′-GGAAGGACAGCGUUGCAUA-3′ (si-ANKRD28-2) and 5′-GUAAUCGACUGUGAGGAUA-3′ (si-ANKRD28-3) [16]. These three siRNAs were combined for efficient silencing. The siRNA used as control was designed

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

against luciferase: 5′- CGUACGCGGAAUACUUCGA-3′ (si-Control).

HeLa cells were plated at 3×10^5 cells per well in a six-well plate 24 h before transfection. Cells were transfected with 50 pmol of siRNA and 4 μl of Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) using the protocol of the supplier. At 72 h after transfection, fresh medium was added and cells were treated (or not) with TNFα (20 ng/ml) and processed for immunoblotting.

In situ PLA (proximity ligation assay)

The PLA novel technology allows the *in situ* detection of endogenous protein interactions by immunofluorescence microscopy [20,21]. This technique consists in recognition of two proteins of interest using secondary antibodies conjugated with DNA strands. When in close proximity ($\leqslant$10 nm), these strands form a template for rolling circle amplification using fluorescent oligonucleotides. Therefore interaction between the two proteins of interest is visible as a distinct fluorescent spot.

Cells were plated on glass coverslips the day before the PLA assay. After 24 h of culture, coverslips were washed and cells were fixed with 4 % (w/v) paraformaldehyde in PBS/2 % (w/v) saccharose for 15 min. After three consecutive washes in PBS, they were permeabilized with 0.25 % Triton X-100 in PBS/10 % (w/v) saccharose and blocked for 1 h with blocking solution (PBS containing 2 % BSA). Cells were incubated for 1 h at room temperature with a mixture of two primary antibodies, one raised in rabbit, the other one in mouse, prepared in PBS/1 % (w/v) BSA. PLA probes (Duolink PLA Probe anti-mouse MINUS and Duolink PLA Probe anti-rabbit PLUS, Olink AB) were diluted 1:5 in PBS/1 % (w/v) BSA solution and all other Duolink reagents were diluted according to the manufacturer's instructions. After 1 h of incubation at 37 °C with the PLA probes, cells were washed in Buffer A (10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.05 % Tween 20) and treated with the Duolink In Situ Detection Reagents Orange (Olink AB) according to the manufacturer's instructions. In brief, cells were incubated with the ligation solution for 30 min at 37 °C. After washing in Buffer A, cells were incubated with the amplification solution for 100 min at 37 °C. Cells were then washed in Buffer B (200 mM Tris/HCl, pH 7.5, and 100 mM NaCl) followed by a quick water wash. Samples were air dried and mounted with Duolink In Situ Mounting Medium with DAPI (Olink AB). Fluorescent signals were viewed under a Nikon NiE microscope, with excitation at 372 nm and emission at 456 nm for DAPI and excitation at 554 nm and emission at 579 nm for Reagent Orange. Images were acquired under identical conditions using a $\times$60 objective. Analyses of these samples were performed using NIS Viewer software.

Immunoprecipitation and immunoblotting

Cells were lysed in lysis buffer A (50 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2 % NP40 and 10 % glycerol) supplemented with protease inhibitors (Complete™ EDTA-free, Roche). Protein concentrations were determined by Bradford procedure (Bio-Rad Laboratories). Lysates containing 1.5 mg of protein were pre-cleared by stirring with 40 μl of Protein G–Sepharose beads (GE Healthcare) for 1 h at 4 °C. After centrifugation, immunoprecipitation was performed with the pre-cleared lysate and 2 μg of antibody for 3 h at 4 °C. A 40 μl volume of Protein G–Sepharose was added and incubated for 30 min at 4 °C. After centrifugation, beads were washed three times with lysis buffer A and proteins were eluted by heating at 95 °C for 5 min in SDS loading buffer and 100 mM DTT.

Proteins were subjected to SDS/PAGE, and blotted on to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore). Membranes were blocked in TBS solution containing 0.05 % Tween 20 and 5 % (w/v) non-fat dried skimmed milk powder and incubated with primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used for detection of immunoreactive proteins by ECL (Thermo Scientific).

Where indicated, lysates were treated with TNFα (20 ng/ml) at room temperature before immunoblotting. Western blot bands were quantified using ImageLab software.

GST pull-down assay

Cells were lysed in lysis buffer A supplemented with protease inhibitors. Lysates containing 1.5 mg of protein were incubated for 30 min with 50 μl of 50 % glutathione–Sepharose beads (GE Healthcare) to eliminate non-specific interactions. After centrifugation, supernatants were incubated with 5 μg of GST or GST-fusion proteins for 1 h at 4 °C, and for a further 30 min with 50 μl of glutathione–Sepharose beads. Beads were washed three times with buffer A. Protein complexes were released by heating at 95 °C in SDS loading buffer and 100 mM DTT. Proteins were subjected to SDS/PAGE and analysed by immunoblotting as described above or visualized by Coomassie Blue staining. Coomassie Blue-stained bands on Western blots were quantified using ImageLab software. For each pull-down, the densitometry ratio (ANKRD28 detected by immunoblotting/GST-fusion protein detected by Coomassie Blue staining) was calculated and normalized to the pull-down using GST.

Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ S.E.M. Statistical significance was determined using two-tailed paired Student's t test and P values of <0.05 were considered significant.

RESULTS

Interaction of BRCA1 with ANKRD28 in human cells

A two-hybrid screen was performed with the BRCT domain of BRCA1 as bait using a cDNA library of 11-day-old mouse embryo. This screen led to the identification of PABP1 as BRCA1 interactant [13]. Among the clones obtained in this screen, a cDNA clone encoding ANKRD28 was isolated.

To investigate further the interaction between BRCA1 and ANKRD28 proteins in human cells, a vector expressing ANKRD28 fused to V5 epitope at the C-terminal end (V5–ANKRD28) was obtained from Dr D.L. Brautigan [16].

HEK-293T cells were transiently transfected with this vector together with either a control plasmid or a FLAG–BRCA1-expressing plasmid. Lysates from HEK-293T cells transiently expressing both V5–ANKRD28 and FLAG–BRCA1 were immunoprecipitated with anti-ANKRD28 or control antibody and analysed further by immunoblotting using anti-FLAG antibody. As shown in Figure 1(A), BRCA1 co-precipitated with ANKRD28. The negative control was unable to co-precipitate BRCA1. To determine further that BRCA1 interacts with ANKRD28, lysates from HEK-293T cells expressing only V5–ANKRD28 were immunoprecipitated with anti-ANKRD28 or control antibody. As shown in Figure 1(B), endogenous BRCA1 co-precipitated with ANKRD28. Western blot analysis using anti-V5 antibody ensured that anti-ANKRD28

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

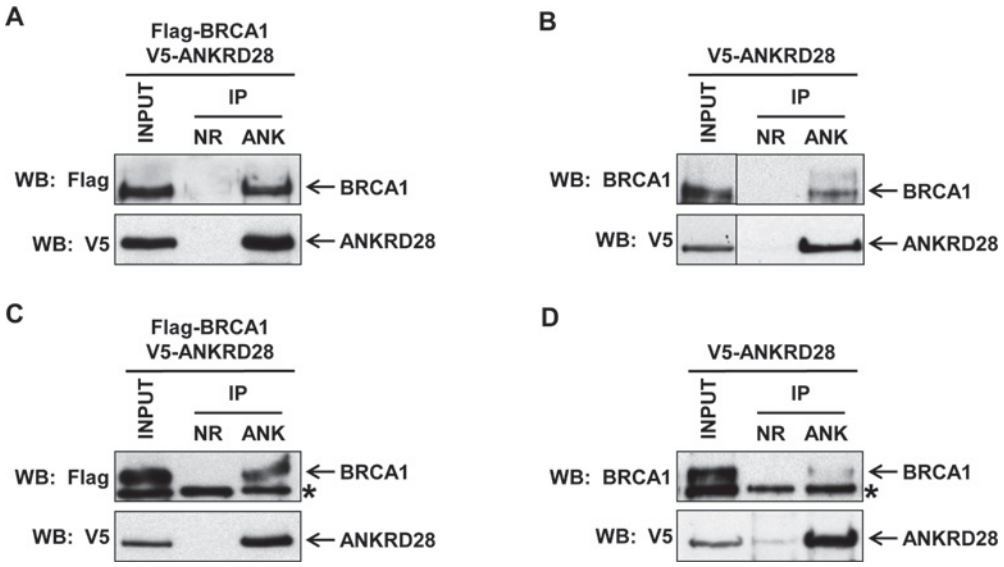


Figure 1 BRCA1 and ANKRD28 associate in human cells

The HEK-293T cells (**A** and **B**) or HeLa cells (**C** and **D**) were transfected with V5–ANKRD28-expressing plasmid together with either a FLAG–BRCA1-expressing plasmid (**A** and **C**) or a control plasmid (**B** and **D**). They were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-ANKRD28 (A300-974A) (ANK) or non-relevant (NR) antibody. The presence of ectopically expressed ANKRD28 was determined by immunoblotting using anti-V5 antibodies. The presence of endogenous and ectopically expressed BRCA1 was determined using anti-BRCA1 (MS110) and anti-FLAG antibodies respectively. Input represents 5 % of total cellular lysate. WB, Western blot. Asterisks indicate a species detected in HeLa cells both in inputs and immunoprecipitates.

antibody immunoprecipitated efficiently and specifically its target (Figures 1A and 1B).

The interaction identified between ANKRD28 and BRCA1 was also assessed in HeLa cells. As above, HeLa were transfected with V5–ANKRD28-expressing plasmid together with either a control plasmid or a FLAG–BRCA1-expressing plasmid. Immunoprecipitation with anti-ANKRD28 or control antibody showed similar results to that obtained with HEK-293T cells since exogenous, and also endogenous, BRCA1 co-immunoprecipitated with ANKRD28 (Figures 1C and 1D).

Because ANKRD28 interacts with PP6R1 (regulatory subunit of PP6) to regulate the activity of PP6 holoenzyme [16], we investigated whether BRCA1 modulates this interaction. To do so, HEK-293T cells were transfected with the previously described BRCA1-targeting siRNA [9]. Luciferase siRNA was used as a negative control. Western blot analysis using anti-BRCA1 antibody ascertained that BRCA1 was silenced. Immunoprecipitation of ANKRD28 resulted in co-precipitation of equivalent quantities of PP6R1 whether BRCA1 was silenced or not (Supplementary Figure S1). This strongly suggests that BRCA1 does not modulate the interaction between ANKRD28 and PP6R1.

To ascertain further the interaction between ANKRD28 and BRCA1, we examined whether endogenous ANKRD28 and BRCA1 form a complex. Co-immunoprecipitation experiments were performed in non-transfected breast carcinoma MCF7 cells. Immunoprecipitation of BRCA1 resulted in the co-precipitation of ANKRD28, but not the control (Figure 2A). In reciprocal experiments, anti-ANKRD28 antibody co-precipitated BRCA1, whereas control antibody led to a faint signal (Figure 2B). Using the PLA, we confirmed the BRCA1–ANRD28 endogenous interaction (Figure 2C). Because BRCA1 is a nucleocytoplasmic protein [5], and because ANKRD28 seems to be located in the cytoplasm [15], we asked whether BRCA1 interacts with ANKRD28 in this cell compartment. Localization of BRCA1 and ANKRD28 was assessed by subcellular fractionation (Figure 2D). The quality of the fractionation was verified with antibodies directed against cytoplasmic CK18, membrane-bound E-cadherin, chromatin-bound histone H3 and nuclear TopI. Results clearly show that ANKRD28 together with PP6c are exclusively cytoplasmic. As described previously, BRCA1 is mainly nuclear and associated with chromatin, present in cytoplasm and absent from membrane [7]. From these results, we clearly delineate the cellular localization of ANKRD28. We identify further cytoplasm as the sole compartment containing both ANKRD28 and BRCA1. In addition, BRCA1–ANKRD28 complexes were also detected mainly in the cytoplasm using PLA (the few dots that appeared nuclear are most likely to be localized under or above the nucleus) (Figure 2C). Therefore BRCA1 and ANKRD28 form an endogenous cytoplasmic complex in human cells.

Delineation of the interacting regions of ANKRD28 within BRCA1

The ANKRD28 protein was initially identified as a BRCA1 BRCT domain-interacting protein. To determine whether the BRCT domain was essential for the BRCA1–ANKRD28 complex formation, we investigated the effect of three *BRCA1* mutations located in this domain. HEK-293T cells were transfected with the V5–ANKRD28-expressing plasmid together with one of the following FLAG–BRCA1-expressing plasmids: three BRCA1 mutants with partial (Y1853X and E1694X) or total (Y1563X) deletion of BRCT domain and the full-length BRCA1 construct (FLAG–BRCA1-wt) serving as a positive control (Figure 3A). Western blot analysis using anti-FLAG antibody ascertained that each truncated FLAG–BRCA1 protein was expressed in an amount comparable with that of FLAG–BRCA1-wt (Figure 3B). Immunoprecipitation using anti-ANKRD28 antibody followed by immunoblotting using anti-FLAG antibody revealed that all BRCA1 mutants co-precipitated with ANKRD28 (Figure 3B). Western blot analysis using anti-V5 antibody ensured that

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

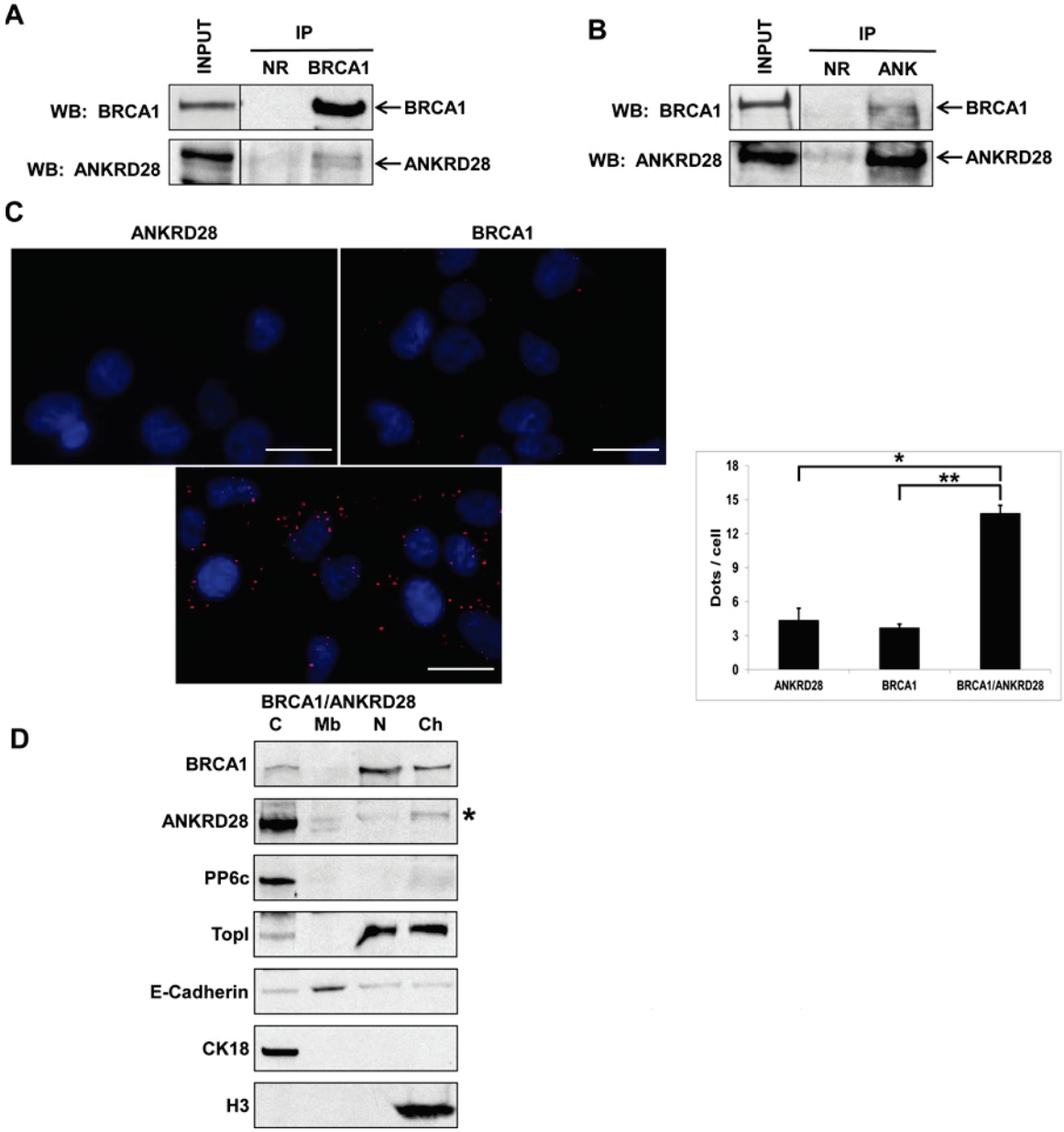


Figure 2 Identification of endogenous BRCA1–ANKRD28 complex

(**A**) The MCF7 cells were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-BRCA1 (MS110) (BRCA1) or non-relevant (NR) antibody. The presence of endogenous BRCA1 and ANKRD28 proteins was determined by immunoblotting using anti-BRCA1 (MS110) and anti-ANKRD28 (A300-974A) antibodies respectively. Input represents 5 % of total cellular lysate. WB, Western blot. (**B**) The MCF7 cells were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-ANKRD28 (A300-975A) (ANK) or non-relevant (NR) antibody. The presence of endogenous BRCA1 and ANKRD28 proteins was determined as in (**A**). (**C**) *In situ* PLA detection of the endogenous BRCA1–ANKRD28 complex. Interaction between endogenous BRCA1 and ANKRD28 was monitored using a PLA assay in MCF7 cells. Left: mouse anti-BRCA1 antibody (MS110) was used in combination with rabbit anti-ANKRD28 antibody (A300-974A). Close locations between the two proteins were observed as red fluorescent dots. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Control experiments were performed with single primary antibodies. Scale bar, 25 μm. Right: quantification of the number of dots in 100 cells. Each value represents the mean number of dots per cell. Results are means $\pm$ S.E.M. for three independent experiments. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ compared with controls (single antibodies). (**D**) Subcellular distribution of the endogenous BRCA1 and ANKRD28 proteins. A subcellular fractionation kit from Thermo Fisher Scientific was used to locate BRCA1 and ANKRD28 proteins in different cellular compartments. C, cytoplasmic extract; Mb, membrane extract; N, nuclear extract; Ch, chromatin-bound extract. A 5 % sample of each extract was subjected to immunoblotting using anti-BRCA1 (MS110), anti-ANKRD28 (A300-974A) and anti-PP6c antibodies to detect the presence of endogenous proteins. TopI served as a nuclear and chromatin marker, E-cadherin served as a membrane marker, CK18 served as a cytoplasmic marker, and H3 served as a chromatin marker. The asterisk indicates a species detected in the nuclear and chromatin fractions with anti-ANKRD28 antibody.

ANKRD28 was immunoprecipitated comparably in the four lysates. These results suggested that BRCT domain may be dispensable for the interaction of ANKRD28 with BRCA1.

To investigate further whether the BRCT domain participates in this interaction, two additional BRCA1 expressing plasmids were used: the FLAG–BRCA1-P938X and the BRCA1-1150Cter constructs that contained the N-terminal half and the C-terminal counterpart of the BRCA1 protein respectively (Figure 3A). The HEK-293T cells were transfected with V5–ANKRD28-expressing plasmid together with one of the above two

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

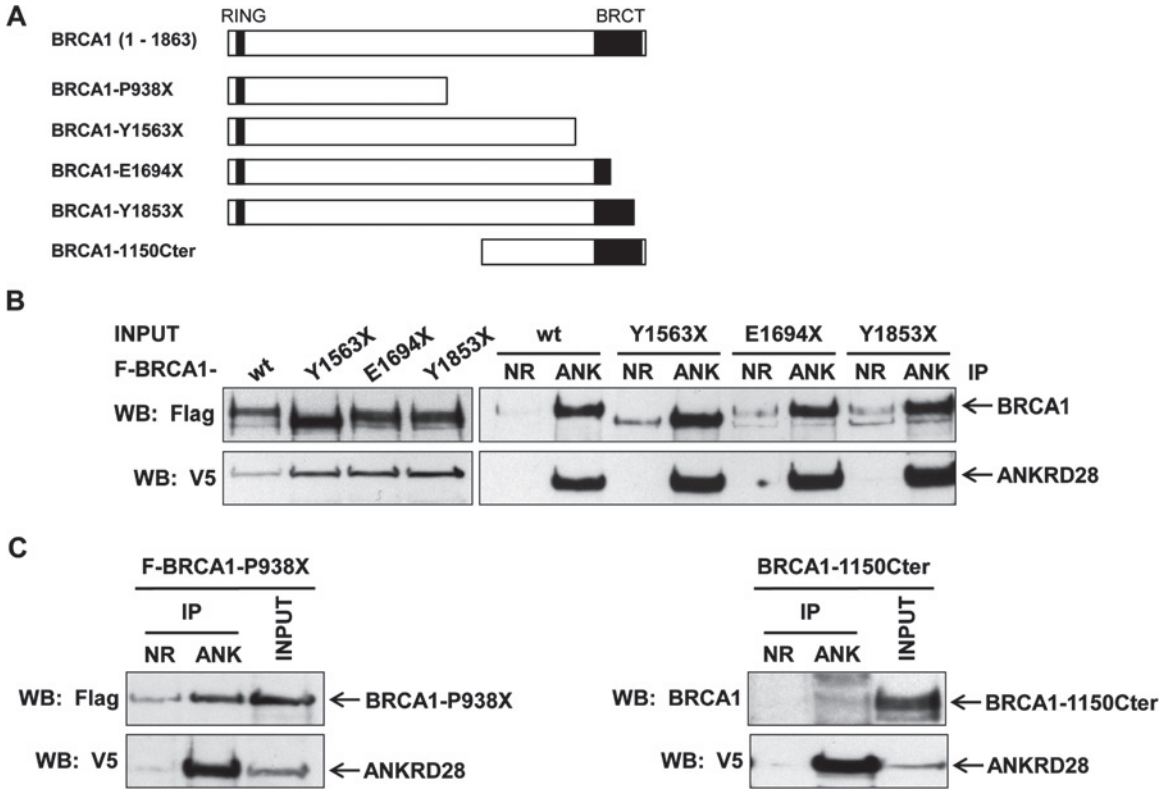


Figure 3 Truncated forms of BRCA1 interact with ANKRD28

(**A**) Schematic diagram of the BRCA1 protein and of the mutated BRCA1 proteins. BRCA1 residues are marked relative to the translation initiation site. (**B**) The HEK-293T cells were transfected with V5–ANKRD28-expressing plasmid together with wild-type or mutated FLAG–BRCA1-expressing plasmid (F-BRCA1). They were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-ANKRD28 (A300-975A) (ANK) or non-relevant (NR) antibody. The presence of ectopically expressed BRCA1 and ectopically expressed ANKRD28 was determined by immunoblotting using anti-FLAG and anti-V5 antibodies respectively. Input represents 5 % of total cellular lysate. WB, Western blot. (**C**) HEK-293T cells were transfected with V5–ANKRD28-expressing plasmid together with mutated (F-BRCA1-P938X) FLAG–BRCA1-expressing plasmid (left-hand panel) or BRCA1-1150Cter-expressing plasmid (right-hand panel). They were subjected to immunoprecipitation (IP) as in (**B**). The presence of ectopically expressed proteins was determined by immunoblotting as in (**B**) except for the BRCA1-1150Cter protein for which the anti-BRCA1 (ab131360) antibody was used.

constructs. Immunoprecipitation using anti-ANKRD28 followed by immunoblotting using anti-FLAG antibody revealed that ANKRD28 co-precipitated with the FLAG–BRCA1-P938X mutant (Figure 3C, left-hand panel). In contrast, when cells expressed the C-terminal part of BRCA1, a faint signal was obtained with anti-BRCA1 antibody (Figure 3C, right-hand panel) indicating that, if ANKRD28 co-precipitated with the BRCA1-1150Cter protein, this would be with a very weak efficiency. Therefore these results indicated that ANKRD28 interacts mostly with the BRCA1 N-terminal region encompassing the first 938 residues of BRCA1.

To more precisely delineate the interacting regions of ANKRD28 within BRCA1, GST pull-downs were performed on V5–ANKRD28 expressing HEK-293T cell lysates using six different fragments of BRCA1 encompassing the total sequence of the protein and a fragment encoding the BRCT domain (Figure 4A). Western blot analysis using anti-V5 antibody and densitometry ratios showed that ANKRD28 contacts several sites within BRCA1, but with different efficiencies (Figures 4B and 4C). ANKRD28 bound the GST–BRCA1 fragments 2 and 3 with similarly high efficiencies, whereas a weaker binding was observed with the GST–BRCA1 fragment 6 and the GST–BRCT.

Taken as a whole, these results showed that a broad N-terminal region of BRCA1 is necessary for binding to ANKRD28, with a marked implication of the region encompassing amino acids 260–802. In addition, the C-terminal BRCT-containing region hardly binds ANKRD28 by itself, but may rather reinforce the interaction between the two proteins.

BRCA1 affects the degradation of IκBε after TNFα stimulation

Because we found that BRCA1 is a new partner of ANKRD28, we investigated further whether and to what extent BRCA1 affects ANKRD28 function.

Here, we asked whether BRCA1 could affect the role of ANKRD28 as a PP6 regulator by studying IκBε degradation after TNFα stimulation as described previously [16]. TNFα activates IKKs (IκB kinases) which phosphorylate IκBs, leading to IκB ubiquitination and subsequent degradation.

To do so, we first determined the conditions of TNFα treatment inducing the strongest IκBε degradation in HeLa cells. These cells were stimulated with 20 ng/ml TNFα for different periods of time to activate IκBs degradation. As a marker for the TNFα-induced signalling, the strong reduction in IκBα levels was demonstrated after 20 and 30 min of treatment (Figure 5A). The fraction of IκBε remaining in treated cells was measured. As described previously, IκBε protein is degraded with slightly different kinetics from those of IκBα [22]: there was a statistically significant decrease in IκBε quantity by 20 min, with the largest decrease at 30 min and a progressive return to normal quantity at 120 min (Figure 5B). Approximately 50 % of IκBε remained after treatment for 30 min,

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

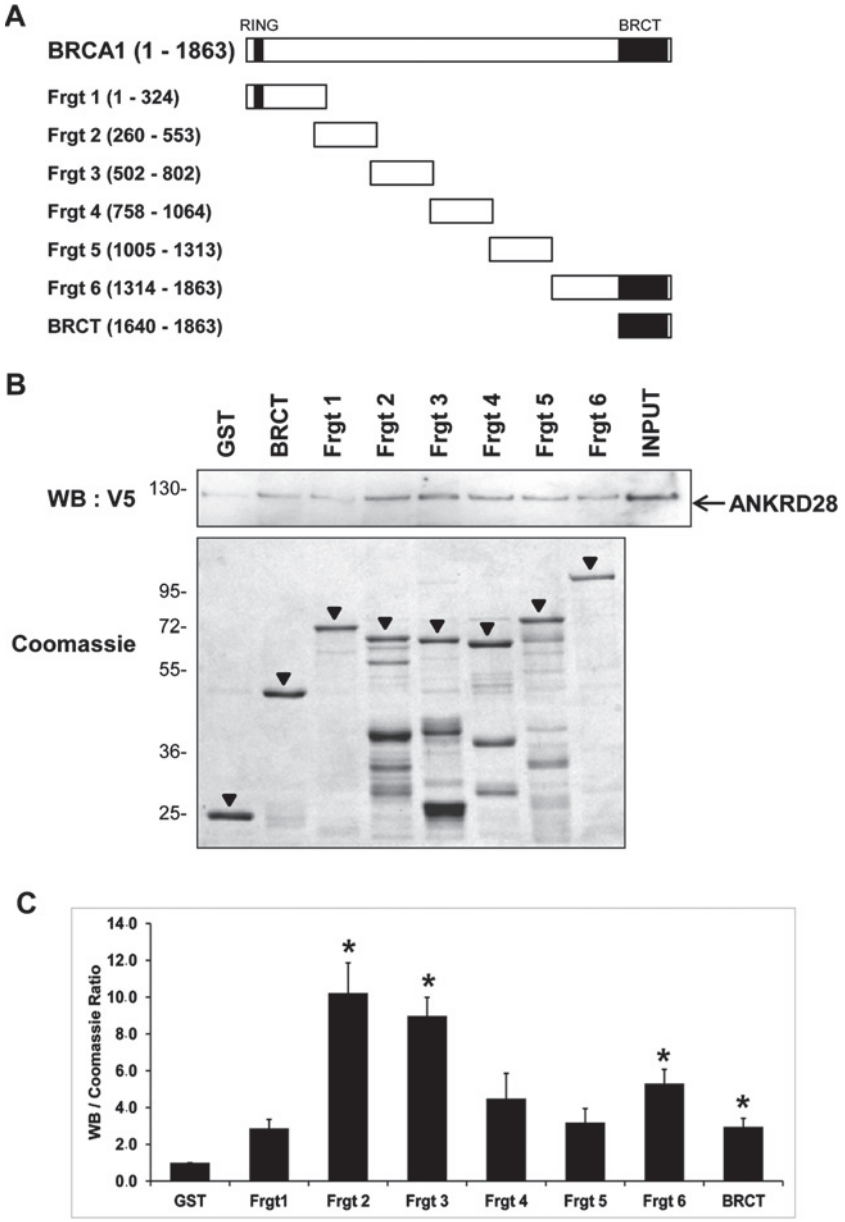


Figure 4 Mapping of interacting region of BRCA1 to ANKRD28

(**A**) Schematic diagram of the BRCA1 protein and the GST–BRCA1 fragments generated in *Escherichia coli*. BRCA1 residues are marked relative to the translation initiation site. (**B**) HEK-293T cells were transfected with V5–ANKRD28-expressing plasmid and subjected to GST pull-downs with GST–BRCA1 fragments. Associated ANKRD28 was detected by immunoblotting with anti-V5 antibody (upper panel). Input represents 5 % of the total lysate used in the pull-down. WB, Western blot. The levels of GST-fusion proteins used are shown by Coomassie Blue staining (lower panel). The arrows heads indicate the GST-fusion proteins. (**C**) For each pull-down, the densitometry ratio (ANKRD28 detected by immunoblotting/GST-fusion protein detected by Coomassie Blue staining) was calculated and normalized to the pull-down using GST (set at 1). Results are means ± S.E.M. for three independent experiments. $^{*}P < 0.05$ compared with GST.

in agreement with previous observations [16,23]. We used these conditions to measure the impact of BRCA1 on IκBε TNFα-dependent degradation.

HeLa cells were transfected with BRCA1-expressing plasmid or with empty plasmid as control, and stimulated further with TNFα for 30 min. Immunoblotting using anti-IκBα antibody showed a strong reduction in IκBα levels after 30 min of TNFα treatment and therefore ascertained that the TNFα-dependent signalling was efficient (Figure 6A). Western blot analysis using anti-BRCA1 and anti-ANKRD28 antibodies ascertained that BRCA1 was overexpressed with no effect on ANKRD28 endogenous levels, and that quantities of BRCA1 and ANKRD28 were not affected by TNFα treatment (Figure 6A). The fraction of IκBε remaining in the cells upon TNFα treatment was analysed by immunoblotting using anti-IκBε antibody. Cells overexpressing BRCA1 showed a statistically significant 2-fold increase in IκBε quantities (Figure 6B).

We investigated further the effect of the BRCA1-1150Cter truncated form, which had a minor ability to bind to ANKRD28, on the TNFα-induced IκBε degradation. Western blot analysis

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

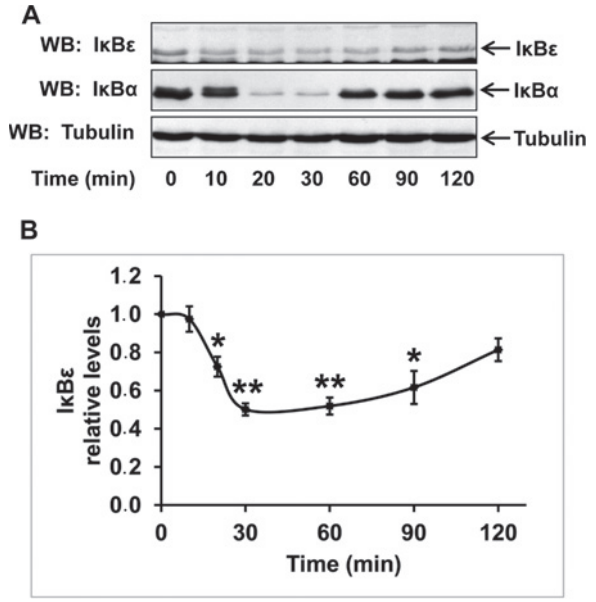


Figure 5 Degradation of IκBε in response to TNFα

(**A**) HeLa cells were treated with 20 ng/ml TNFα for 10, 20, 30, 60, 90 or 120 min and extracts were prepared for immunoblotting using anti-IκBε antibody. IκBα served as a marker for TNFα signalling. Tubulin served as loading control. WB, Western blot. (**B**) The intensity of bands corresponding to IκBε was quantified and the amount of IκBε remaining after TNFα stimulation was normalized to the samples without TNFα added (time 0 min) (set at 1). Results are means ± S.E.M. for three independent experiments. $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ compared with time 0 min.

showed that BRCA1-1150Cter was overexpressed with no effect on ANKRD28 endogenous levels, and that quantities of BRCA1-1150Cter and ANKRD28 were not affected by TNFα treatment (Figure 6C). The strong reduction in IκBα after 30 min confirmed the efficient induction of TNFα signalling (Figure 6C). In the cells that overexpressed the BRCA1-1150Cter mutant, the fraction of IκBε remaining upon TNFα treatment was not increased (Figure 6D).

When compared with endogenous BRCA1 expression, the level of BRCA1-1150Cter appeared to be slightly higher than that of exogenous full-length BRCA1 (Figures 6A and 6C). Despite this mutant being slightly more expressed than full-length BRCA1, it does not affect IκBε quantities.

Therefore a robust binding of BRCA1 with ANKRD28 is required to achieve the stimulatory effect on IκBε quantities.

To investigate further the impact of BRCA1 on TNFα-induced IκBε degradation, HeLa cells were transfected with the previously described BRCA1-targeting siRNA [9]. Luciferase siRNA was used as a negative control. Cells were treated with TNFα as in Figure 6. Western blot analysis using anti-BRCA1 and anti-ANKRD28 antibodies ascertained that BRCA1 was silenced with no effect on ANKRD28 endogenous levels. IκBα was used as a marker of TNFα signalling (Figure 7A). Unexpectedly, quantities of IκBε remaining in cells silenced for BRCA1 upon TNFα treatment were similar to that present in control cells (Figure 7B). Yet, in cells depleted in ANKRD28, IκBε was significantly decreased (1.6-fold) upon TNFα treatment, in accordance with previous studies [16].

Therefore BRCA1 overexpression results in stabilization of IκBε, whereas ANKRD28 silencing results in a comparable destabilization of IκBε, and the interaction between BRCA1 and ANKRD28 is required for the BRCA1-dependent inhibition of the degradation of IκBε.

DISCUSSION

The present study describes for the first time an interaction between BRCA1 and ANKRD28. Still poorly documented, the ANKRD28 protein seems to be mainly cytoplasmic [15,24] and contains 27 ankyrin motifs without any other functional domains. Despite the ankyrin motif being one of the most common protein–protein interaction motifs [25], few ANKRD28-interacting proteins have been uncovered. So far, ANKRD28 has been described to interact with PP1 [14], DOCK180 [15] and to constitute a novel regulatory subunit of PP6 (PP6R1) [16]. In the present study, we investigated the functional consequences of the interaction between BRCA1 and ANKRD28 for PP6 signalling.

A large-scale study reported that PP6R1 along with PP6 is associated with IκBε, but not IκBα or IκBβ [26]. Accordingly, the consequences of PP6 silencing for IκBε signalling in response to TNFα being used as a typical inducer of IκB signalling have been examined [23]. The silencing of PP6 was found to increase the level of degradation of IκBε, implying that PP6 promotes the dephosphorylation of IκBε and thereby opposes the action of IKKs [23]. Interestingly, silencing of ANKRD28 produced equivalent enhancement of IκBε degradation in response to TNFα. This led the authors to establish ANKRD28 as a novel regulatory subunit of PP6 [16].

In this context, the new cytoplasmic BRCA1–ANKRD28 complex that we have described suggests for the first time that BRCA1 operates as a novel actor in PP6 signalling.

IκB proteins negatively regulate NF-κB signalling. The NF-κB family consists of five proteins, RelA (p65), c-Rel, RelB, p50 and p52 which assemble into several homodimers and heterodimers. IκB proteins bind NF-κB dimers in the cytoplasm, preventing the NF-κB proteins from translocating to the nucleus to exert their role of transcription factors. Stimulus-responsive activation of the IKKs results in the phosphorylation-dependent degradation of IκBs which renders cytoplasmic NF-κB dimers free to translocate to the nucleus and regulate gene expression [27,28]. However, the mechanisms by which different NF-κB dimers exert some specific transcription remain poorly understood [29,30].

IκBε is one of the three canonical IκB proteins that was initially described as an inhibitor of RelA–p50 and c-Rel–p50 complex transcriptional activity, similar to IκBα [22,31]. In an attempt to determine which IκB would bind specifically to which NF-κB protein, the structure–function relationship of IκB proteins has been investigated [32]. A study reported that, unlike IκBα, IκBε associates preferentially with RelA/c-Rel in activated murine T-cells [33]. Roughly, data support the notion that some NF-κB dimers would exhibit binding preferences for certain IκBs, and the relative abundance of certain IκB proteins such as IκBε within the cell may affect the availability of specific NF-κB dimers and constitute a level of control of NF-κB transcriptional activity [34]. However, the precise mechanism by which destabilization of IκBε affects NF-κB transcriptional activity is not clearly understood. Interestingly, the difference in the kinetics of IκBε and IκBα degradation that has been previously described constitutes a level of control for the transcriptional response to TNFα [35]. In addition, the PP6 regulatory subunit ANKRD28 participates in this level of transcriptional control through its involvement in IκBε dephosphorylation and subsequent negative NF-κB regulation upon TNFα stimulation [16].

In the present study, we found that BRCA1 overexpression inhibits IκBε degradation and that the interaction of BRCA1 with ANKRD28 is required for this activity. These results lead us to propose the following model. PP6 is moderately activated by TNFα, resulting in IκBε IKK-dependent phosphorylation and subsequent IκBε degradation, leading to NF-κB nuclear

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

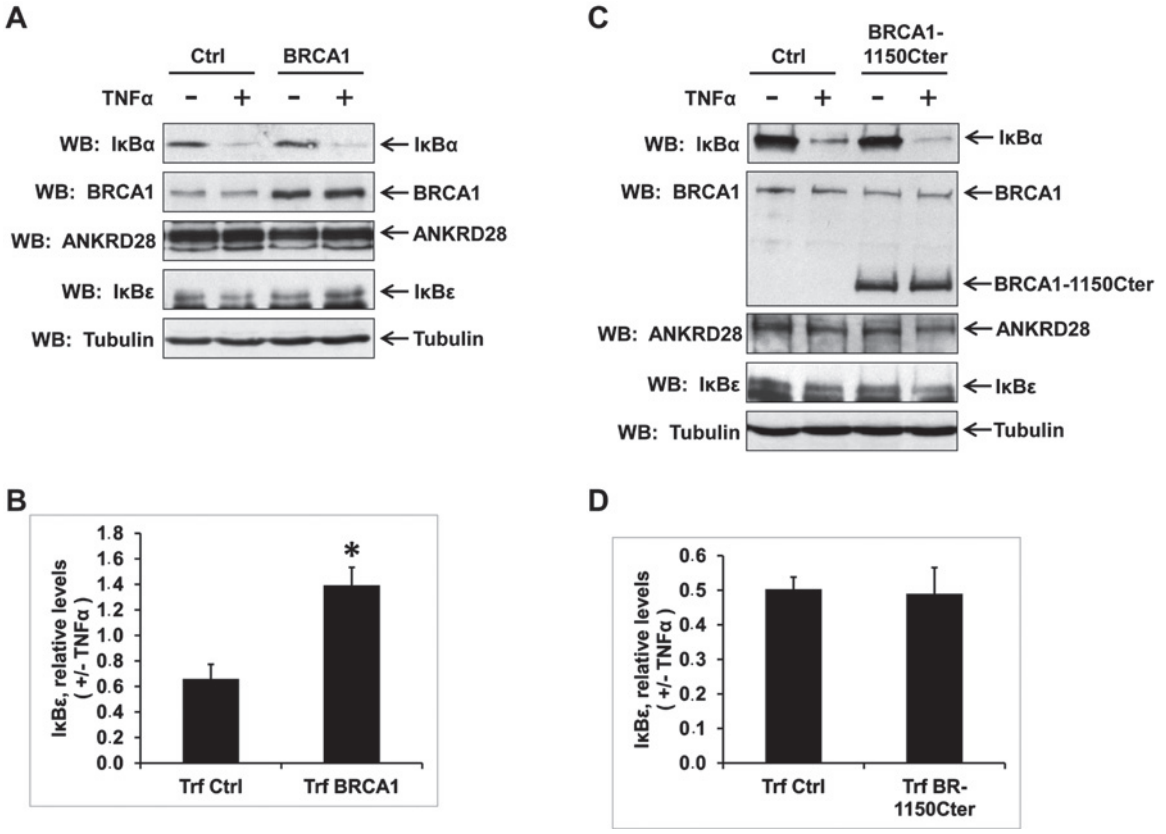


Figure 6 Degradation of IκBε in response to TNFα is affected by BRCA1 overexpression

(**A** and **C**) HeLa cells were transfected with BRCA1 or control plasmid (Ctrl) (**A**) or with BRCA1-1150Cter expressing plasmid or control plasmid (**C**). Parallel samples were treated (+) with 20 ng/ml TNFα for 30 min or non-treated (−). Proteins extracted from an equal number of HeLa cells were analysed by immunoblotting using anti-IκBε antibody. BRCA1, BRCA1-1150Cter and ANKRD28 were detected using MS110, ab131360 and A300-974A antibodies respectively. IκBα served as a marker for TNFα signalling and tubulin as loading control. WB, Western blot. (**B** and **D**) The intensity of bands corresponding to IκBε was quantified and the amount of IκBε remaining after TNFα stimulation was compared with the amount of IκBε present in cells without TNFα (set at 1). Results are means ± S.E.M. for three independent experiments. $^*P < 0.05$ compared with control plasmid.

localization and activation. Under BRCA1 overexpression, PP6 is continuously activated, preventing IκBε phosphorylation and subsequent degradation. In turn, NF-κB does not translocate to the nucleus and is inactivated. Therefore BRCA1 may constitute an additional level of regulation of NF-κB transcriptional activity in response to TNFα. Because the mechanisms by which IκBε controls NF-κB transcriptional selectivity are complex and not fully understood, the study of IκBε destabilization consequences for NF-κB transcriptional activity will need to be carried out in future work.

Some functional links between BRCA1 and NF-κB have been reported previously upon different stimuli such as oxidative stress, DNA-damaging agents or TNFα. An interaction between BRCA1 and NF-κB has been shown to be required for efficient NF-κB activation following treatment with DNA-damaging agents [36,37]. Another report described that TNFα induces the interaction between BRCA1 and the p65/RelA subunit of NF-κB leading to enhanced NF-κB transcriptional activity [38]. All of these studies provide some clues that, when located in the nucleus, BRCA1 is a transcriptional co-activator of NF-κB.

In the present study, the bulk of our experiments led us to propose the hypothesis that BRCA1 exerts a localization-dependent dual activity on NF-κB signalling. In association with ANKRD28 in the cytoplasm, BRCA1 would be a negative regulator of NF-κB signalling, whereas nuclear BRCA1 would be a co-activator of nuclear NF-κB. Because how the numerous NF-κB target genes are selectively transcribed remains poorly understood, we propose that BRCA1, through its dual activity towards NF-κB, may co-ordinate the balance between pro- and anti-apoptotic genes necessary to maintain cell integrity.

Because DNA repair is the main nuclear function of BRCA1, we may ask whether ANKRD28 affects DNA repair through its binding with BRCA1 in the cytoplasm. In response to DNA breaks, BRCA1 locates in different protein complexes visible as foci to repair the damage. After IR (ionizing radiation) that elicits DNA DSBs (double-strand breaks), the formation of γH2AX foci is considered as the earliest recognition step of DSBs and takes place within 10 min. Then, BRCA1 is recruited into distinct nuclear foci, but the kinetics of BRCA1-containing foci formation remains not fully delineated as it seems to be cell-type- and DNA-damaging-agent-dose-dependent. According to the literature, BRCA1-containing foci appear roughly within 1 h and their number may increase up to 4 h, the time required to complete DNA repair [6,7]. To investigate whether ANKRD28 alters this nuclear function of BRCA1, MCF7 cells were treated with 2 Gy of IR and the formation of γH2AX foci within 10 min ascertained the formation of DSBs. Under these conditions, and in agreement with previous reports [6,7], BRCA1 was nuclear and associated with foci as soon as 1 h and up to 4 h (results not shown). Interaction between endogenous BRCA1 and endogenous ANKRD28 was monitored simultaneously using a PLA assay. The number of BRCA1–ANKRD28 complexes

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

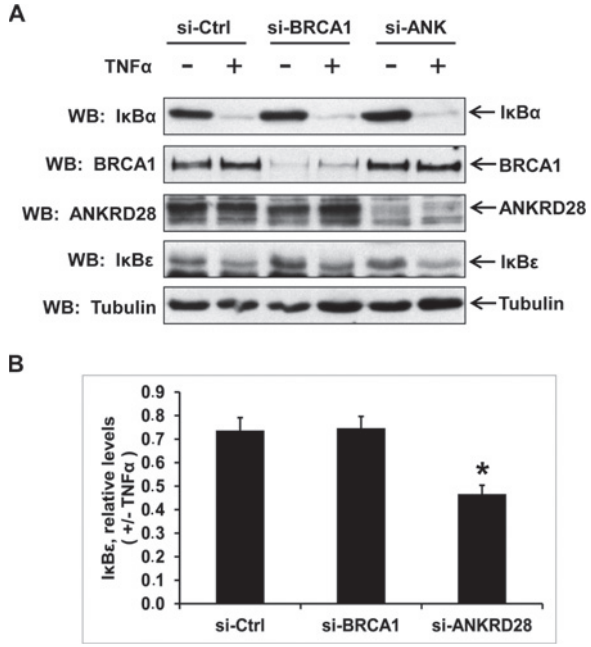


Figure 7 Degradation of IκBε in response to TNFα is affected by ANKRD28 silencing

(**A**) HeLa cells were transfected with siRNA against BRCA1 (si-BRCA1) or with a mixture of three siRNA against ANKRD28 (si-ANK) or with siRNA against luciferase as control (si-Ctrl). Parallel samples were treated (+) with 20 ng/ml TNFα for 30 min or non-treated (−). Proteins extracted from an equal number of HeLa cells were analysed by immunoblotting using anti-IκBε antibody. BRCA1 and ANKRD28 were detected using MS110 and A300-974A antibodies respectively. IκBα served as a marker for TNFα signalling and tubulin as loading control. WB, Western blot. (**B**) The amount of IκBε remaining after TNFα stimulation was quantified as in Figure 6. $^*P < 0.05$ compared with control (si-Ctrl).

identified as red dots was not significantly different at 1 h and 4 h after irradiation compared with non-treated cells. A slight, but not significant, decrease was noticed 1 h after irradiation (Supplementary Figure S2). This may result from BRCA1 nuclear shuttling preceding its association with nuclear foci. As a whole, BRCA1 association with ANKRD28 in the cytoplasm does not alter BRCA1 nuclear function in DNA repair.

While most of the BRCA1 functions delineated to date are nuclear, evidence of cytoplasmic functions is growing. Notably, a pro-apoptotic activity for BRCA1 associated with its cytoplasmic localization has been described, but the whole molecular mechanism underlying this function remains to be discovered [6,7]. In the present study, we uncovered a novel mechanism by which the tumour suppressor BRCA1 may accomplish this pro-apoptotic activity. By controlling the transcriptional activity of NF-κB in a localization-dependent manner, nuclear BRCA1 may stimulate NF-κB-dependent transcription of pro-apoptotic DNA targets whereas cytoplasmic BRCA1 may inhibit NF-κB-dependent transcription of anti-apoptotic targets.

In the present study, we showed that BRCA1 interacts with ANKRD28 through a central region encompassing amino acids 260–602. This interacting region of BRCA1 belongs to the 1480-amino-acid ID (intrinsically disordered) region of BRCA1 (encompassing amino acids 170–1649) located between its N-terminal RING finger and the tandem of two BRCT domains at its C-terminal region [39]. Although the ID region of BRCA1 has been poorly explored compared with the largely described roles of its two structural domains RING and BRCT, it has been reported to interact with several proteins contributing to its tumour suppressor role such as p53, RB, BRCA2, the oncogenes c-Myc and JunB, and some DNA-damage-repair proteins such as RAD50 and RAD51 [40]. This region interacts also with NF-κB [37,38] and PP1 [41]. In the present study, our work reinforces the notion that the ID region makes an important contribution to implicate BRCA1 in numerous pathways that support its global role in cell surveillance.

Co-ordination of two main post-transcriptional protein modifications that are phosphorylation and dephosphorylation represents one of the major intracellular signal transduction machinery. The role of kinases has been extensively investigated over many years, but regulation by cellular phosphatases remains poorly described. Emerging evidence, however, is beginning to suggest that phosphatases play a key role in regulating signal transduction [42]. A number of studies have suggested that phosphatases play a role in genome integrity maintenance. Indeed, recent studies provide evidence that phosphatases such as Wip1, PP2A or PP5 dephosphorylate and thereby regulate DNA-damage sensors such as ATM (ataxia telangiectasia mutated) or ATR (ataxia telangiectasia- and Rad3-related protein) [43–45]. More recently, PP6 has been shown to be required for DNA repair through its interaction with DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) [46] and the dephosphorylation of γ-H2AX [47] after IR. An interaction between BRCA1 and PP1 has been reported and shown further to be important for DNA repair [41,48]. The novel functional interaction between BRCA1 and PP6 that we have uncovered provides new elements of understanding PP6 functions and suggests further a possible role for PP6 in cell surveillance.

Few data have suggested that ANKRD28 is involved in cancer. A gene fusion of *ANKRD28* to *NUP98* was identified in a patient with high-risk myelodysplasia [24] and another gene fusion of *ANKRD28* to *FNDC3B* was identified in a primary urethral clear-cell adenocarcinoma [49]. A genome-wide analysis of gene expression profiles in chronic myeloid leukaemia cells showed a high overexpression of 150 genes including *ANKRD28* [50]. Gene expression profiling in the leukaemic stem-cell-enriched $CD34^+$ fraction from normal karyotype acute myeloid leukaemia identified a high transcript level for three genes, among which was *ANKRD28*. This high transcript level was associated with a significant poorer overall survival [51].

An important biological role for PP6 in mammalian cells is suggested by its recent identification in a genome-wide screen for kinases and phosphatases that affect cell survival [52]. PP6 was identified in this siRNA screen as the serine/threonine phosphatase with the largest effects on cell survival. In another study, it was shown that PP6 expression is lower in breast tumours than in benign breast diseases, suggesting a protective role of PP6 during breast cancer development [53].

In the present study, the novel interaction of ANKRD28 with the tumour-suppressor protein BRCA1 brings new evidence for the involvement of ANKRD28, and more largely phosphatases, in malignancy.

BRCA1 is involved in key cellular mechanisms mainly through its interaction with proteins themselves involved in these mechanisms [3,4]. In the present study, the potential of BRCA1 to interact with ANKRD28 and to modulate its phosphatase activity reveals a new mechanism by which BRCA1 may exert its tumour-suppressor functions.

AUTHOR CONTRIBUTION

Anne Vincent, Elise Berthel, Estelle Dacheux and Clémence Magnard performed experiments. Anne Vincent, Elise Berthel and Estelle Dacheux analysed data. Anne Vincent and Nicole Dalla Venezia prepared Figures. Anne Vincent and Nicole Dalla Venezia

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

conceived and designed research. Anne Vincent, Elise Berthel and Nicole Dalla Venezia interpreted results. Anne Vincent, Elise Berthel, Estelle Dacheux and Nicole Dalla Venezia drafted the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr D.L. Brautigan (University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VI, U.S.A.) for providing the pCDNA3.1/V5-His plasmid expressing V5-tagged ANKRD28, Dr P Rio (INSERM UMR 1069, Tours, France) for providing the FLAG/pCMV plasmid expressing the N-terminal FLAG-tagged BRCA1, Dr B Lopez (UMR CNRS 8200, Paris, France) and Dr F Larminat (UMR CNRS 5089, Toulouse, France) for providing pGEX-Frg2–pGEX-Frg6 plasmids, Dr C. Caux for providing TNFα.

FUNDING

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) (Equipe Labellisée 2008) and the Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité Départemental du Rhône. E.L.B. and E.D. were supported by a fellowship from the French Ministry of Research.

REFERENCES

1 Foulkes, W.D. (2008) Inherited susceptibility to common cancers. N. Engl. J. Med. **359**, 2143–2153 CrossRef PubMed
2 Mueller, C.R. and Roskelley, C.D. (2003) Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. Breast Cancer Res. **5**, 45–52 CrossRef PubMed
3 Venkitaraman, A.R. (2014) Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. Science **343**, 1470–1475 CrossRef PubMed
4 Savage, K.I. and Harkin, D.P. (2015) BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. FEBS J. **282**, 630–646 CrossRef PubMed
5 Brocardo, M. and Henderson, B.R. (2008) APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. Trends Cell Biol. **18**, 587–596 CrossRef PubMed
6 Henderson, B.R. (2005) Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking. BioEssays **27**, 884–893 CrossRef PubMed
7 Thompson, M.E. (2010) BRCA1 16 years later: nuclear import and export processes. FEBS J. **277**, 3072–3078 CrossRef PubMed
8 Moreau, K., Dizin, E., Ray, H., Luquain, C., Lefai, E., Foufelle, F., Billaud, M., Lenoir, G.M. and Venezia, N.D. (2006) BRCA1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase. J. Biol. Chem. **281**, 3172–3181 CrossRef PubMed
9 Dacheux, E., Vincent, A., Nazaret, N., Combet, C., Wierinckx, A., Mazoyer, S., Diaz, J.J., Lachuer, J. and Venezia, N.D. (2013) BRCA1-dependent translational regulation in breast cancer cells. PLoS One **8**, e67313 CrossRef PubMed
10 Hedgepeth, S.C., Garcia, M.I., Wagner, 2nd, L.E., Rodriguez, A.M., Chintapalli, S.V., Snyder, R.R., Hankins, G.D., Henderson, B.R., Brodie, K.M., Yule, D.I. et al. (2015) The BRCA1 tumor suppressor binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to stimulate apoptotic calcium release. J. Biol. Chem. **290**, 7304–7313 CrossRef PubMed
11 Magnard, C., Bachelier, R., Vincent, A., Jaquinod, M., Kieffer, S., Lenoir, G.M. and Venezia, N.D. (2002) BRCA1 interacts with acetyl-CoA carboxylase through its tandem of BRCT domains. Oncogene **21**, 6729–6739 CrossRef PubMed
12 Ray, H., Moreau, K., Dizin, E., Callebaut, I. and Venezia, N.D. (2006) ACCA phosphopeptide recognition by the BRCT repeats of BRCA1. J. Mol. Biol. **359**, 973–982 CrossRef PubMed
13 Dizin, E., Gressier, C., Magnard, C., Ray, H., Decimo, D., Ohlmann, T. and Dalla Venezia, N. (2006) BRCA1 interacts with poly(A)-binding protein: implication of BRCA1 in translation regulation. J. Biol. Chem. **281**, 24236–24246 CrossRef PubMed
14 Kwiek, N.C., Thacker, D.F., Datto, M.B., Megosh, H.B. and Haystead, T.A. (2006) PITK, a PP1 targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP K. Cell. Signal. **18**, 1769–1778 CrossRef PubMed
15 Tachibana, M., Kiyokawa, E., Hara, S., Iemura, S., Natsume, T., Manabe, T. and Matsuda, M. (2009) Ankyrin repeat domain 28 (ANKRD28), a novel binding partner of DOCK180, promotes cell migration by regulating focal adhesion formation. Exp. Cell Res. **315**, 863–876 CrossRef PubMed
16 Stefansson, B., Ohama, T., Daugherty, A.E. and Brautigan, D.L. (2008) Protein phosphatase 6 regulatory subunits composed of ankyrin repeat domains. Biochemistry **47**, 1442–1451 CrossRef PubMed
17 Dizin, E., Ray, H., Suau, F., Voeltzel, T. and Dalla Venezia, N. (2008) Caspase-dependent BRCA1 cleavage facilitates chemotherapy-induced apoptosis. Apoptosis **13**, 237–246 CrossRef PubMed
18 Choudhury, A.D., Xu, H. and Baer, R. (2004) Ubiquitination and proteasomal degradation of the BRCA1 tumor suppressor is regulated during cell cycle progression. J. Biol. Chem. **279**, 33909–33918 CrossRef PubMed
19 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 CrossRef PubMed
20 Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gustafsdottir, S.M., Ostman, A. and Landegren, U. (2002) Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. Nat. Biotechnol. **20**, 473–477 CrossRef PubMed
21 Soderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstrale, K., Leuchowius, K.J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.G. and Landegren, U. (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation. Nat. Methods **3**, 995–1000 CrossRef PubMed
22 Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. and Israel, A. (1997) IκBε, a novel member of the IκB family, controls RelA and cRel NF-κB activity. EMBO J. **16**, 1413–1426 CrossRef PubMed
23 Stefansson, B. and Brautigan, D.L. (2006) Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets IκBε. J. Biol. Chem. **281**, 22624–22634 CrossRef PubMed
24 Ishikawa, M., Yagasaki, F., Okamura, D., Maeda, T., Sugahara, Y., Jinnai, I. and Bessho, M. (2007) A novel gene, ANKRD28 on 3p25, is fused with NUP98 on 11p15 in a cryptic 3-way translocation of t(3;5;11)(p25;q35;p15) in an adult patient with myelodysplastic syndrome/acute myelogenous leukemia. Int. J. Hematol. **86**, 238–245 CrossRef PubMed
25 Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C. and Peng, Z.Y. (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. Protein Sci. **13**, 1435–1448 CrossRef PubMed
26 Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S. et al. (2004) A physical and functional map of the human TNF-α/NF-κB signal transduction pathway. Nat. Cell Biol. **6**, 97–105 CrossRef PubMed
27 Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF-κB signaling. Cell **132**, 344–362 CrossRef PubMed
28 Shih, V.F., Tsui, R., Caldwell, A. and Hoffmann, A. (2011) A single NFκB system for both canonical and non-canonical signaling. Cell Res. **21**, 86–102 CrossRef PubMed
29 Smale, S.T. (2012) Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF-κB family of transcription factors. Immunol. Rev. **246**, 193–204 CrossRef PubMed
30 Perkins, N.D. (2012) The diverse and complex roles of NF-κB subunits in cancer. Nat. Rev. Cancer **12**, 121–132 PubMed
31 Li, Z. and Nabel, G.J. (1997) A new member of the IκB protein family, IκBε, inhibits RelA (p65)-mediated NF-κB transcription. Mol. Cell. Biol. **17**, 6184–6190 CrossRef PubMed
32 Manavalan, B., Basith, S., Choi, Y.M., Lee, G. and Choi, S. (2010) Structure–function relationship of cytoplasmic and nuclear IκB proteins: an *in silico* analysis. PLoS One **5**, e15782 CrossRef PubMed
33 Clark, J.M., Aleksiyadis, K., Martin, A., McNamee, K., Tharmalingam, T., Williams, R.O., Memet, S. and Cope, A.P. (2011) Inhibitor of κBε (IκBε) is a non-redundant regulator of c-Rel-dependent gene expression in murine T and B cells. PLoS One **6**, e24504 CrossRef PubMed
34 Hoffmann, A., Natoli, G. and Ghosh, G. (2006) Transcriptional regulation via the NF-κB signaling module. Oncogene **25**, 6706–6716 CrossRef PubMed
35 Kearns, J.D., Basak, S., Werner, S.L., Huang, C.S. and Hoffmann, A. (2006) IκBε provides negative feedback to control NF-κB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. J. Cell Biol. **173**, 659–664 CrossRef PubMed
36 Habraken, Y., Jolois, O. and Piette, J. (2003) Differential involvement of the hMRE11/hRAD50/NBS1 complex, BRCA1 and MLH1 in NF-κB activation by camptothecin and X-ray. Oncogene **22**, 6090–6099 CrossRef PubMed
37 Harte, M.T., Gorski, J.J., Savage, K.I., Purcell, J.W., Barros, E.M., Burn, P.M., McFarlane, C., Mullan, P.B., Kennedy, R.D., Perkins, N.D. and Harkin, D.P. (2014) NF-κB is a critical mediator of BRCA1-induced chemoresistance. Oncogene **33**, 713–723 CrossRef PubMed
38 Benezra, M., Chevallier, N., Morrison, D.J., MacLachlan, T.K., El-Deiry, W.S. and Licht, J.D. (2003) BRCA1 augments transcription by the NF-κB transcription factor by binding to the Rel domain of the p65/RelA subunit. J. Biol. Chem. **278**, 26333–26341 CrossRef PubMed
39 Mark, W.Y., Liao, J.C., Lu, Y., Ayed, A., Laister, R., Szymczyna, B., Chakrabartty, A. and Arrowsmith, C.H. (2005) Characterization of segments from the central region of BRCA1: an intrinsically disordered scaffold for multiple protein–protein and protein–DNA interactions? J. Mol. Biol. **345**, 275–287 CrossRef PubMed
40 Cortese, M.S., Uversky, V.N. and Dunker, A.K. (2008) Intrinsic disorder in scaffold proteins: getting more from less. Prog. Biophys. Mol. Biol. **98**, 85–106 CrossRef PubMed
41 Liu, Y., Virshup, D.M., White, R.L. and Hsu, L.C. (2002) Regulation of BRCA1 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 1α. Cancer Res. **62**, 6357–6361 PubMed

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

42 Brautigan, D.L. (2013) Protein Ser/Thr phosphatases: the ugly ducklings of cell signalling. FEBS J. **280**, 324–345 CrossRef PubMed
43 Freeman, A.K. and Monteiro, A.N. (2010) Phosphatases in the cellular response to DNA damage. Cell Commun. Signal. **8**, 27 CrossRef PubMed
44 Filipponi, D., Muller, J., Emelyanov, A. and Bulavin, D.V. (2013) Wip1 controls global heterochromatin silencing via ATM/BRCA1-dependent DNA methylation. Cancer Cell **24**, 528–541 CrossRef PubMed
45 Kang, Y., Cheong, H.M., Lee, J.H., Song, P.I., Lee, K.H., Kim, S.Y., Jun, J.Y. and You, H.J. (2011) Protein phosphatase 5 is necessary for ATR-mediated DNA repair. Biochem. Biophys. Res. Commun. **404**, 476–481 CrossRef PubMed
46 Mi, J., Dziegielewski, J., Bolesta, E., Brautigan, D.L. and Larner, J.M. (2009) Activation of DNA-PK by ionizing radiation is mediated by protein phosphatase 6. PLoS One **4**, e4395 CrossRef PubMed
47 Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G.B., Xu, X. and Lees-Miller, S.P. (2010) Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates γ-H2AX. Mol. Cell. Biol. **30**, 1368–1381 CrossRef PubMed
48 Yu, Y.M., Pace, S.M., Allen, S.R., Deng, C.X. and Hsu, L.C. (2008) A PP1-binding motif present in BRCA1 plays a role in its DNA repair function. Int. J. Biol. Sci. **4**, 352–361 CrossRef PubMed
49 Mehra, R., Vats, P., Kalyana-Sundaram, S., Udager, A.M., Roh, M., Alva, A., Pan, J., Lonigro, R.J., Siddiqui, J., Weizer, A. et al. (2014) Primary urethral clear-cell adenocarcinoma: comprehensive analysis by surgical pathology, cytopathology, and next-generation sequencing. Am. J. Pathol. **184**, 584–591 CrossRef PubMed
50 Kaneta, Y., Kagami, Y., Tsunoda, T., Ohno, R., Nakamura, Y. and Katagiri, T. (2003) Genome-wide analysis of gene-expression profiles in chronic myeloid leukemia cells using a cDNA microarray. Int. J. Oncol. **23**, 681–691 PubMed
51 de Jonge, H.J., Woolthuis, C.M., Vos, A.Z., Mulder, A., van den Berg, E., Kluin, P.M., van der Weide, K., de Bont, E.S., Huls, G., Vellenga, E. and Schuringa, J.J. (2011) Gene expression profiling in the leukemic stem cell-enriched $CD34^+$ fraction identifies target genes that predict prognosis in normal karyotype AML. Leukemia **25**, 1825–1833 CrossRef PubMed
52 MacKeigan, J.P., Murphy, L.O. and Blenis, J. (2005) Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. Nat. Cell Biol. **7**, 591–600 CrossRef PubMed
53 Zhong, J., Liao, J., Liu, X., Wang, P., Liu, J., Hou, W., Zhu, B., Yao, L., Wang, J., Li, J., Stark, J.M., Xie, Y. and Xu, X. (2011) Protein phosphatase PP6 is required for homology-directed repair of DNA double-strand breaks. Cell Cycle **10**, 1411–1419 CrossRef PubMed

Received 17 July 2015/26 January 2016; accepted 4 February 2016
Version of Record published 29 March 2016, doi:10.1042/BJ20150797

© 2016 Authors; published by Portland Press Limited

Supplementary Figure Legend

Figure S1: BRCA1 does not affect ANKRD28 interaction with PP6R1
The 293T cells were transfected with siRNA against BRCA1 (si-BRCA1) or with siRNA against luciferase as control (si-Ctrl). **A/** Western blot confirming siRNA inhibition of BRCA1 levels when compared with control siRNA. Immunoblotting for BRCA1 using MS110 antibody. Tubulin was used as loading control. **B/** Cells were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-ANKRD28 (A300-975A) (ANK) or non relevant (NR) antibody. The presence of endogenous PP6R1 and ANKRD28 proteins was determined by immunoblotting using anti-PP6R1 (A300-968A) (Bethyl) and anti-ANKRD28 (A300-975A) antibodies, respectively. Input represents 5% of total cellular lysate. WB, western blot.

Figure S2: *In situ* PLA detection of the endogenous BRCA1-ANKRD28 complex in MCF7 cells treated with 2Gy
Interaction between endogenous BRCA1 and ANKRD28 was monitored by PLA in non treated (t=0h) and treated cells (1h and 4h). **Upper panel**: Mouse anti-BRCA1 antibody (MS110) was used in combination with rabbit anti-ANKRD28 antibody (A300-975A). Close locations between the two proteins were observed as red fluorescent dots. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Control experiments were performed with single primary antibodies. White bar represents 25 µm. **Lower panel**: Quantification of the number of dots in 100 cells. Each value represents the mean number of dots per cell. The values are means ± SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with controls (single antibodies). Gray columns: ANKRD28, White columns: BRCA1, Black columns: ANKRD28-BRCA1

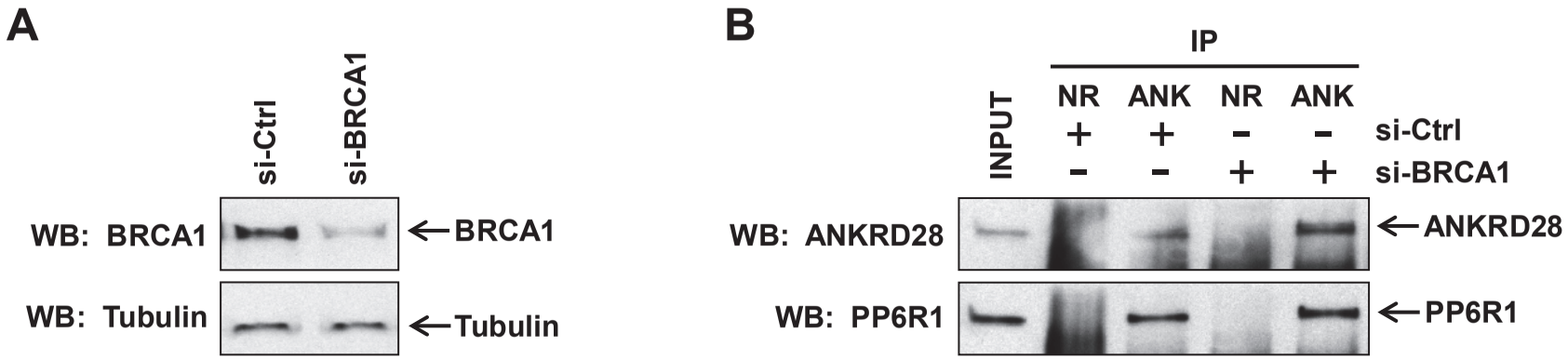
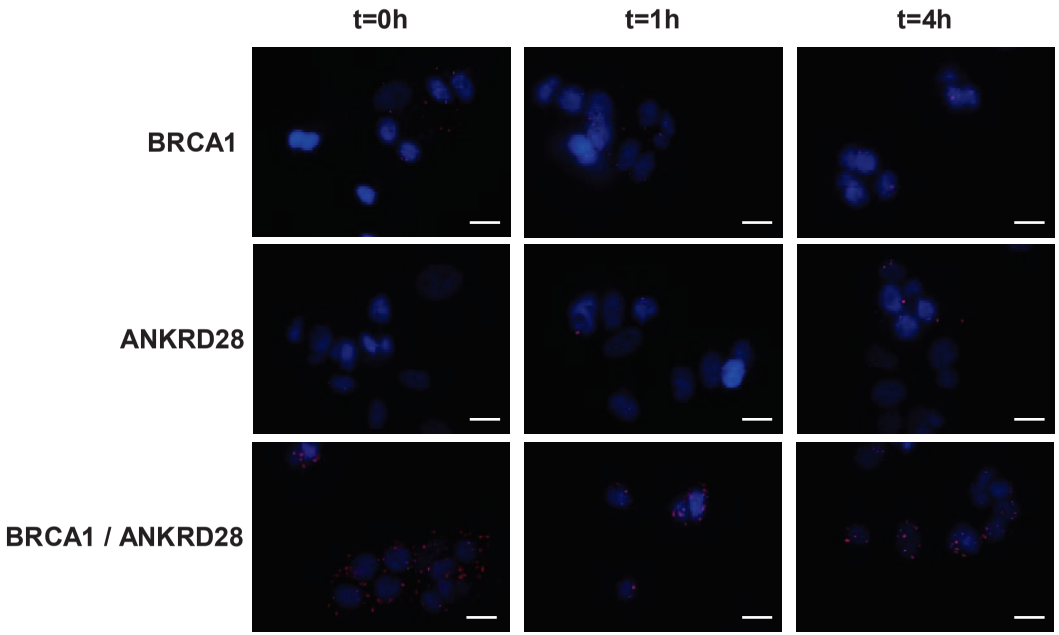

A
si-Ctrl
si-BRCA1
WB: BRCA1
BRCA1
WB: Tubulin
Tubulin
B
IP
INPUT
NR
ANK
NR
ANK
si-Ctrl
si-BRCA1
WB: ANKRD28
ANKRD28
WB: PP6R1
PP6R1

Figure S1


t=0h
t=1h
t=4h
BRCA1
ANKRD28
BRCA1 / ANKRD28

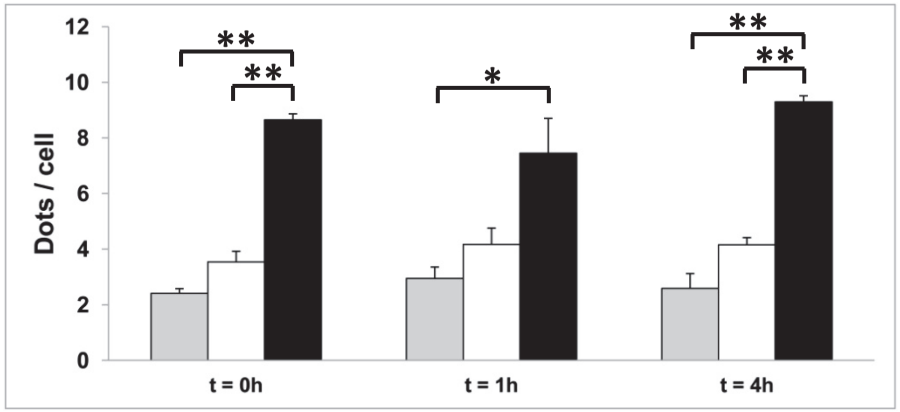

Dots / cell
12
10
8
6
4
2
0
**
**
*
**
**
t = 0h
t = 1h
t = 4h

Figure S2

HDAC6 inhibition up-regulates CD20 level and increases the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies

Malgorzata Bobrowicz[1,2], Michal Dwojak [1,2], Beata Pyrzynska[1], Elise Berthel[3], Nicole Dalla Venezia[3], Mieszko Kozikowski[1,4], Joanna Stachura [1,2], Agata Malenda[5], Marta Siernicka[1,2], Antoni Domagala[1], Kamil Bojarczuk[1], Agnieszka Zagozdzon[1], Magdalena Gabrysiak [1], Nina Miazek[1], Piotr Zapala[1], Jean-Jacques Diaz[3], Marta Karp[7], Ewa Lech-Maranda[5], Malgorzata Firczuk[1], Abdessamad Zerrouqi[1], Krzysztof Giannopoulos[7], Jakub Golab [1], Magdalena Winiarska[1]

[1] Department of Immunology, Center for Biostructure Research, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

[2] Postgraduate School of Molecular Medicine, Warsaw, Poland

[3] Centre Léon Bérard – Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Lyon, France

[4]Urology Clinic of Medical Postgraduate Education Centre, Department of Urology, European Health Centre – Otwock, Poland

[5] Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

[6] Department of Hematooncology and Bone Marrow Transplantation, Medical University of Lublin, Poland

[7]Department of Experimental Hematology, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

Correspondence: Magdalena Winiarska, E-mail: magdalena.winiarska@wum.edu.pl or Jakub Golab, e-mail: jakub.golab@wum.edu.pl

KEY POINTS

- **HDAC6 inhibition represents a novel strategy to boost the efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies**
- **HDAC6 inhibition increases CD20 level by enhancing CD20 protein *de novo* synthesis without affecting the gene expression**

ABSTRACT

Down-regulation of CD20, a molecular target for monoclonal antibodies, is a clinical problem leading to decreased efficacy of anti-CD20-based therapeutic regimens. The epigenetic modulation of CD20 coding gene (MS4A1) has been proposed as a mechanism for the reduced therapeutic efficacy of anti-CD20 antibodies and confirmed with histone deacetylases pan-inhibitors (HDACis). Considering that the use of pan HDACi is associated with substantial side effects, the identity of particular HDAC isoform involved in CD20 regulation seems to be of paramount importance. In this study, we demonstrate for the first time the role of HDAC6 in the regulation of CD20 levels. Using pharmacological and genetic approaches, we show that the inhibition of HDAC6 activity significantly increases the level of CD20 protein and augments the efficacy of anti-CD20 mAbs in established B-cell tumor cell lines and primary malignant cells. We further demonstrate that HDAC6 influences CD20 protein *de novo* synthesis independently of the regulation of CD20 gene transcription. Mechanistically, translation of CD20 mRNA is significantly enhanced following the inactivation of HDAC6, as shown by the analysis of the fractions of polysomal-associated mRNAs. Thus we indicate a new role for HDAC6 in the post-transcriptional mechanism of CD20 gene regulation. Collectively, our findings suggest that HDAC6 inhibition is a rational therapeutic strategy to be implemented in combination therapies with anti-CD20 mAbs and open up novel avenues for the clinical use of current HDACi.

KEY WORDS: CD20, mAbs, complement-dependent cytotoxicity, HDAC6, translation, B cell, lymphoma, CLL

ABBREVIATIONS: ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CDC, complement-dependent cytotoxicity; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; CLL, chronic lymphocytic leukemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; HDAC, histone deacetylase; mAb, monoclonal antibody; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; RTX, rituximab; OFA, ofatumumab

INTRODUCTION

Approval of anti-CD20 monoclonal antibodies (mAbs) as a safe and effective regimen has considerably changed the treatment paradigms in non-Hodgkin lymphoma (NHL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). However, a more widespread use of these mAbs is largely limited by resistance mechanisms [1,2]. Therefore, although anti-CD20 mAbs are incorporated into various chemotherapy-based combination regimens in all the phases of conventional treatment [3], the overall response rates to this immunotherapy are still unsatisfactory [4,5]. Poor response to anti-CD20 mAbs is especially pronounced in CLL patients, where leukemic cells express low baseline level of CD20 comparing to other B-cell malignancies [6-8]. Furthermore, in patients relapsing after initial treatment, development of resistance to anti-CD20 mAbs associated with a decrease in CD20 level is commonly reported [9-12]. Accumulating body of evidence suggests that the level of CD20 on the cell surface is a limiting factor determining the efficacy of anti-CD20 regimens [13,14]. This especially holds true for rituximab and ofatumumab - type I mAbs that trigger activation of complement cascade.

So far a number of factors regulating CD20 expression at both transcriptional and posttranscriptional levels have been identified [8,15-21]. Among them, CD20 expression has been reported to be regulated epigenetically both by DNA methyltransferases [22] and by histone deacetylases (HDACs) [23]. HDAC inhibitors (HDACis) are being explored in cancer research for their ability to restore the expression of silenced genes and have recently emerged as highly effective in combination with immunotherapies [24] including mAbs [25]. The results presented so far revealed a therapeutic potential of non-selective pan-HDAC inhibitors increasing CD20 transcription (trichostatin A, valproic acid, romidepsin and vorinostat (SAHA)) in combinations with anti-CD20 mAbs [23,26,27]. Recently, a more specific inhibitor - class I specific HDACi entinostat has been demonstrated to enhance rituximab activity *in vivo* by increasing survival rates by 30% comparing to rituximab in monotherapy [28].

HDACs are a promising target particularly in hematological malignancies [29,30], where four non-selective inhibitors have already been registered in monotherapies – romidepsin and SAHA for cutaneous T-cell lymphoma, belinostat for relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma and panobinostat for multiple myeloma (MM) [31]. However, these compounds have been noted for severe side effects, which can be burdensome in frail and heavily pretreated patients [32]. It has been postulated that these toxicities could be avoided by the use of isoform-specific inhibitors [33,34], thus various selective compounds are currently being tested in clinical trials. By now HDAC6, an atypical member of HDAC family that regulates the acetylation status and thus the functionality of cytosolic proteins, has been explored therapeutically for its role in the process of protein degradation. HDAC6 inhibition does not induce global changes in gene expression and cannot be truly considered as epigenetic modulator [35]. It rather acts as a linker to bind ubiquitinated proteins and motor protein dynein that transfers misfolded protein cargo for disposal in aggresomes [36,37]. HDAC6 also mediates the transport of the autophagic machinery to resorb protein aggregates and diminish their cytotoxicity [38]. Thus, the disruption of the aggresome pathway, similarly to proteasome inhibition, results in a massive accumulation of misfolded protein aggregates and apoptotic cell death [39]. As this strategy holds a considerable potential in aggressive B-cell tumors with a high rate of protein synthesis, HDAC6 inhibitors - ricolinostat (ACY1215) an ACY241 is currently being tested or recruiting patients in Phase I and II clinical trials in MM (NCT01583283, NCT01997840, NCT02400242), NHL (NCT02091063) and CLL (NCT02787369) and a novel compound ACY241 will be shortly tested in MM (NCT02400242). The results of preclinical studies show the increased efficacy of the combination of HDAC6 inhibitors with proteasome inhibitors in inducing stress-related cell death [40-42]. The preliminary outcomes of clinical trials show clinical benefit with mild to moderate side effects [43].

The results of our research add a new intriguing observation to the state of art regarding HDAC6 function. We demonstrate that specific inhibition of HDAC6 isoform increases CD20 protein level which correlates with increased sensitivity to anti-CD20 mAbs. By using Click-it chemistry, we

show that HDAC6 inhibition significantly increases the *de novo* synthesis of CD20 protein without affecting its total mRNA level. Moreover, by performing polysomal profiling we demonstrate that HDAC6 inhibition increases the amount of CD20 mRNA associated to polysomes, therefore actively translated. Finally, we propose HDAC6 to be a novel target to sensitize B-cells to anti-CD20 therapy.

METHODS

Cell culture

All cell lines were cultured at 37°C in a fully humidified atmosphere of 5% CO_2 in RPMI 1640 (Invitrogen), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100U/mL of penicillin and 100 μg/mL of streptomycin. Cells were passaged every other day. Human Burkitt lymphoma (Daudi, HS SULTAN, Raji) and diffuse large B-cell lymphoma (Pfeiffer) cell lines were purchased from ATCC. OCI-LY-1 was kindly provided by Prof. M.A. Shipp, HEK-293T used for lentivirus production was purchased from DSMZ. A1 cell line was obtained upon EBV transformation of normal B-cells. Normal B cells from healthy volunteers or primary cells from patients with CLL were isolated from full blood using Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich). Approval for the study was obtained from the Institutional Review Board of the Medical University of Warsaw and was conducted according to the Declaration of Helsinki. Each patient signed an informed consent for the procedures.

Reagents

Rituximab was purchased from Roche. Ofatumumab (GlaxoSmithKline) and obinutuzumab (Genentech) were generous gifts of prof. Lech-Maranda. Trichostatin A (Sigma Aldrich), SAHA (Sigma Aldrich), scriptaid (Selleckchem), tubacin (Chemietek), tubastatin A (Sigma Aldrich), ricolinostat – ACY1215 (Chmietek), homoharringtonine (Tocris) and Click-IT AHA (Thermo Scientific) were dissolved in DMSO. Cycloheximide (Sigma Aldrich) was dissolved in water. Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma Aldrich.

Staining of surface antigens

Cells were stained as described earlier [44]. Cells were incubated with saturating amounts of fluorochrome-conjugated Abs or IgG1 isotype control (Supplementary Table 1) for 30 min. Prior to analysis cells were washed and resuspended in PBS or 4 μg/ml propidium iodide. Cells were analyzed on FACScan (BD Biosciences, La Jolla, CA, USA). The MFI of PI-negative cells served as a measure for mAb binding on a per-cell basis.

Cytotoxicity assays

Propidium iodide staining in the CDC assay was performed as described earlier [16]. ADCC was assessed in CFSE/PI assay as described in [45,46]. Degranulation of NK cells was evaluated in pre-incubation model as described in [45,47]. The percentage of CD107a-positive NK cells was evaluated with FACSAria III using the BD FACSDiva Software v 6.1.3 (BD Biosciences, La Jolla, CA, USA). Apoptosis rates were assessed upon Annexin V/PI. Cell viability was analyzed using a flow cytometer (FACScan and Accurri, BD Biosciences, La Jolla, CA, USA).

Quantitative Real-time PCR

Quantitative RT-PCR was performed as described earlier [44]. Briefly, total RNA was isolated with TRIzol Reagent (Invitrogen). The specific intron-spanning primers were used for reactions with LightCycler® Fast Start DNA Master PLUS SYBRGreen I (Supplementary Table 2). The specific primers and probes were used for reactions with LightCycler® Probes Master (Roche) (Supplementary Table 3). The results were analyzed after 40 cycles of amplification and normalized to the level of the control genes (β2M, HPRT1, RPL29 and β-actin for qRT-PCR using SYBRGreen and β2m for qRT-PCR using hydrolysis probes). Experiments were performed in replicates and crossing points were determined by second derivative maximum method.

Western blotting

Protein electrophoresis and Western blotting were performed as described in [17,44]. Briefly, cells were washed with PBS, pelleted, lysed and separated on 10% SDS-polyacrylamide gel. Anti-CD20 (polyclonal, Abcam), anti-acetylated tubulin (6-11B-1, Sigma), HDAC6 (D2E5, Cell Signaling), FLAG (polyclonal,Cell Signaling) were used for O/N incubation according to manufacturer's protocol. Membranes were developed following incubation with secondary HRP-coupled secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). The chemiluminescence reaction for HRP was developed using luminol-based chemiluminescence reagent and visualized with Stella 8300 bioimager (Raytest,

Straubenhardt, Germany). The blots were re-probed with anti-β-actin-peroxidase purified immunoglobulin (clone AC-15, Sigma Aldrich) at 1:50 000 dilution for 45 min.

Plasmids and transductions

Validated pLKO.1-constructs encoding shRNA against HDAC6 (pLKO.1-shHDAC6) and scrambled shRNA (pLKO.1) were purchased from Sigma Mission. The SSFV-eGFP-HDAC6-FLAG plasmid was generated by cloning HDAC6-FLAG sequence from pBSK-HDAC6-FLAG vector (purchased from Epoch Lifescience) into HIV-SFFV-eGFP plasmid (a kind gift from dr Els Verhoeyen, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France). Two clones with HDAC6 overexpression (clone 1 and clone 2) were generated. Empty SFFV-eGFP plasmid (SSFV) was used as a control. The sequences of all constructs were confirmed by DNA sequencing. The pLVX-CD20-HISTAG and pLVX-CD20-FLAG plasmids were generated by cloning CD20-HISTAG and CD20-FLAG sequence (generated with PCR from mRNA isolated from Raji cells) into pLVX-IRES-Puro (Clontech).

Lentiviral and retroviral particles were produced as described previously [16]. To select gene of interest-containing cells either puromycin selection (2 μg/ml) or sorting for GFP-positive cells on FACSAria III cell sorter (BD Biosciences, La Jolla, USA) were performed 5 days post transduction.

Luciferase assay

Raji cells were nucleofected with the plasmid mix consisting of CD20 promoter Firefly luciferase reporter and Renilla luciferase reporter (pRL-TK) using the Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza) and Amaxa Nucleofector Technology (Lonza, Basel, Switzerland) with programme M-013. 12h after transfection cells were treated with either 10 μM tubacin or DMSO and lysed with Passive Lysis Buffer (Promega) 24h later. The relative luciferase activity was measured using a Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a multilabel reader (VictorTM X4, PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Click-IT assays

In order to evaluate *de novo* protein production Click-IT AHA assays were performed according to manufacturer's protocol. Briefly, 4×10^6 Raji cells were co-incubated for 4h with 50 μM Click-IT AHA

reagent and tested drugs (10 μM tubacin and translation inhibitors - 100 μg/ml cycloheximide and 1 μM homoharringtonine) in methionine–free medium. Afterwards the cells were washed twice with PBS.

For Alexa488 staining of novel proteins the cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde, blocked with 3% BSA and permeabilized with 0.5% Triton-X. The cells were labeled with Click-IT reaction cocktail containing Alexa488-azide and analyzed using FACS Scan for FL-1 fluorescence.

To assess the influence of tubacin on *de novo* production of CD20 the cells were lysed with 1% SDS and labeled with biotin alkyne. The lysates were precipitated twice using chloroform and methanol to eliminate unbound biotin particles. Biotin-labeled proteins were immunoprecipitated using Neutravidin Aggarose Resin (Thermo Scientific) and separated by SDS-PAGE electrophoresis. CD20 expression was subsequently assessed in biotinylated fraction by Western blotting. β-actin level in input samples served as a loading control.

Polysome isolation and profiling

Polysome isolation was essentially performed as described in [48]. Briefly, cytosolic lysates from control and tubacin-pretreated Raji cells were prepared in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2mM DTT, 250 mM sucrose, 0.7% Nonidet-P40 and 100μg/ml cycloheximide) using Dounce homogenizer, followed by two successive 10min centrifugations at 4°C at 700 g to pellet nuclei and 12 000 g to pellet mitochondria. 6 mg of cytosolic proteins were layered onto an 11 ml linear sucrose gradient (10–40% sucrose supplemented with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM DTE and 100 μg/ml cycloheximide) and sedimented by a 2 h centrifugation at 250 000 g at 4°C in a SW41Ti rotor (Beckman).The gradients were collected in 15 fractions and absorbance profiles were generated at 254 nm using an ISCO UA-6 detector (Teledyne). Polysomal fractions were pooled for further RNA extraction using Trizol LS Reagent (Life Technologies) and quantitative PCR.

RESULTS

HDAC6 isoform-specific inhibitors up-regulate CD20 level and increase the efficacy of anti-CD20 mAbs

Using subtoxic doses (Suppl. Fig.1) of highly potent HDAC6 specific inhibitors, namely: tubacin, tubastatin A and ricolinostat (ACY1215), we observed that inhibition of HDAC6 significantly increases the level of surface CD20 (Fig. 1A), as well as the amount of CD20 protein in whole-cell lysates (Fig. 1B) in Raji cells. The HDAC6 inhibition was confirmed by Western blotting for acetylated tubulin (Fig. 1B), a widely used surrogate marker for HDAC6 inhibition. At the same time all the tested compounds significantly increased the efficacy of both rituximab and ofatumumab in CDC (Fig. 1C). Since the efficacy of CDC depends also on the level of membrane-bound complement regulatory proteins (mCRPs) [14,47], we assessed CD46 and CD55 levels in Raji cells incubated with selected HDAC6 inhibitors. The levels of mCRPs underwent minor changes (Suppl. Fig. 2A), suggesting that improved efficacy of rituximab and ofatumumab following pretreatment with HDAC6 inhibitors is a consequence of increased CD20 level.

Anti-CD20 mAbs induce antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), which contributes to overall therapeutic efficacy of anti-CD20 mAbs To evaluate the effect of HDAC6 inhibition on NK cells effector function we used a model where both target Raji cells and effector NK cells pretreated for 24h with selected HDAC6 inhibitors were co-incubated for 4h in the presence of HDAC6 inhibitors and rituximab. Inhibition of HDAC6 had no effect either on the efficacy of rituximab-mediated ADCC (Suppl. Fig. 2B) or degranulation of NK cells (Suppl. Fig. 2C). We also evaluated the effect of HDAC6 inhibition on direct cytotoxicity of type II anti-CD20 mAb obinutuzumab and observed that HDAC6 inhibitors potentiated cell death triggered by obinutuzumab (Suppl. Fig. 2D). Collectively, these results indicate that HDAC6 inhibition may be an effective strategy in sensitizing tumor cells to anti-CD20 mAbs.

HDAC6 inhibition increases CD20 level and the efficacy of CDC in a panel of tumor cell lines and CLL primary cells

For further studies tubacin was used as a model compound. In a panel of established tumor cell lines with various CD20 expression level as well as in EBV-infected lymphoblastoid cell line (LCL), tubacin significantly up-regulated CD20 (Fig 2A) and potentiated the efficacy of both rituximab and ofatumumab in CDC (Suppl. Fig. 3). In a set of 22 primary CLL samples with low baseline CD20 levels (Suppl. Table 1) tubacin significantly and dose-dependently increased surface CD20 levels (Fig 2B). Although the majority of primary cells isolated from patients were resistant to CDC, we observed a significant sensitization to O-CDC following tubacin treatment (Fig 2C). Collectively, these data confirm that inhibition of HDAC6 with small-molecule inhibitors up-regulates CD20 expression in both established cell lines and primary cell. These results suggest that inhibition of HDAC6 may potentiate CDC also in patient-derived model.

The effect of HDAC6 inhibitors on CD20 level is HDAC6-specific

To demonstrate HDAC6-specific effect on CD20 level, Raji cells were stably transduced with shRNA targeting HDAC6. Knock-down of HDAC6 was confirmed both in qRT-PCR (Fig. 3A) (~70% decrease of mRNA) and Western blotting for the detection of increased acetylation of tubulin (Fig. 3B). We observed that Raji cells with silenced HDAC6 show an increased expression of both surface (Fig. 3C) and total amount of CD20 protein (Fig. 3B) comparing to control cells. The increase in CD20 level correlated with increased efficacy of R-CDC (Fig. 3D). Moreover, in cells with HDAC6 knock-down we observed no significant differences in surface levels of CD46 and CD55 complement regulatory proteins (Suppl. Fig.4A). To further confirm the role of HDAC6 in regulation of CD20 we used an inactive tubacin analog – niltubacin, as a negative control for tubacin. Incubation of Raji cells with tubacin significantly increased the level of surface CD20, while concurrent incubation with niltubacin had no effect (Suppl. Fig. 4B).

HDAC6 inhibition does not affect CD20 expression at transcriptional level

Previous studies reported that HDAC pan-inhibitors (trichostatin A, valproic acid and romidepsin) increase CD20 levels [23,26]. Here, we tested trichostatin A (TsA), scriptaid (SCR) and clinically available SAHA for their influence on CD20 level in Raji cells. Accordingly, trichostatin A (TsA), scriptaid (SCR) and clinically available vorinostat (SAHA) used in subtoxic concentrations significantly increase CD20 at both protein (Fig.4A, Suppl. Fig. 5A) and mRNA (Fig. 4B) levels, which corresponds to increased efficacy of rituximab in complement-dependent cytotoxicity (Suppl. Fig. 5B).

In contrast to HDAC pan-inhibitors neither tubacin (Fig. 5A) nor HDAC6 knock-down with shRNA (Fig. 5B) affected CD20 transcription as assessed in qRT-PCR experiments. In order to corroborate these findings, we tested the influence of tubacin on the activation of CD20 promoter. Correspondingly, luciferase assay showed rather a decrese in CD20 promoter activity activity following tubacin incubation (Fig. 5C). Moreover, in Raji cells stably transduced with a vector encoding either His-tagged or FLAG-tagged CD20 fusion protein under CMV promoter and incubated with tubacin, we observed up-regulation of the levels of both endogenous and exogenous CD20 proteins (Fig. 5D). Altogether, these observations clearly demonstrate that the effect of HDAC6 inhibitors on CD20 level is independent of the regulation of CD20 transcription and does not rely on the activity of CD20 promoter.

HDAC6 inhibition increases* de novo *CD20 protein synthesis through upregulation of CD20 mRNA translation

Since HDAC6 has been already reported to be involved in degradation, endocytosis and trafficking of intracellular vesicles, we sought to determine whether tubacin can regulate internalization of CD20 molecules using a reversible biotinylation assay. In this assay a derivative of biotin was used, which labels surface proteins and can be chemically cleaved. Cells were incubated in serum-free medium to stimulate protein endocytosis, following which cell surface proteins were effectively sequestered in the cytoplasm and biotin derivative was protected from cleavage. Analysis of the uncleaved,

endocytosed biotin represents the amount of internalized CD20 in a time-course. As presented in Suppl. Fig.6A, CD20 undergoes a slow-rate endocytosis, which is not inhibited by tubacin. To further determine the stability of CD20 protein we blocked protein synthesis in Raji cells with cycloheximide and measured the decay of surface CD20 protein by flow cytometry and total CD20 protein by immunoblotting (Suppl. Fig. 6B, C). Since no major differences were observed between control and cycloheximide-treated cells during the 48h time frame, we assumed that CD20 is essentially a very stable protein with a slow turnover rate. As a positive control, the stability of other proteins, namely FOXO1, Mcl-1, p53 was assessed. The steady state levels of these selected proteins declined significantly after 24h of incubation with cycloheximide (Suppl. Fig 6D). Based on these results we concluded that CD20 is a membrane protein with a long half-life of more than 48h and thus rejected the hypothesis that HDAC6 is directly implicated in CD20 degradation. We conclude from these experiments that HDAC6 inhibition, despite increasing CD20 protein levels, is not directly involved in accumulation and stabilization of CD20 protein.

As HDAC6 inhibition up-regulates CD20 protein level without affecting its transcription and trafficking and since CD20 is a stable protein, we next sought to determine how HDAC6 inhibition affects the translation rate of CD20 molecule. To address this issue we combined tubacin with widely-used protein translation inhibitors – cycloheximide and homoharringtonine. We observed that 24h co-incubation with translation inhibitors completely abolished the effect of tubacin on CD20 expression, as assessed with flow cytometry (Fig. 6A) and Western blotting (Fig. 6B). In order to investigate the influence of tubacin on the specific translation of CD20, a metabolic labelling of nascent proteins with methionine analogue - Click-IT AHA (L-azidohomoalanine) was performed (Suppl. Fig. 7). Briefly, Raji cells labeled with Click-IT AHA were co-incubated for 4h with tubacin or/and translation inhibitors followed by detection with alkyne-biotin. The level of CD20 protein in immunoprecipitated, biotin-labeled nascent protein fraction was determined with Western blotting (Fig. 6C). Tubacin strongly increased the level of novel CD20 protein, while cycloheximide or homoharringtonine almost completely abolished CD20 protein *de novo* synthesis. Simultaneously,

tubacin did not alter the overall level of biotin-labeled nascent proteins in whole-cell lysate, as evaluated by Western blotting (Fig. 6D). Moreover, cytometric analyses, where newly synthetized proteins were detected using Alexa 488 alkyne, confirmed that tubacin did not alter the overall level of protein translation (Suppl. Fig. 8).

To substantiate our findings on increased translation of CD20 after HDAC6 inhibition we performed polysomal profiling followed by qRT-PCR on polysomal RNA from Raji cells. We observed no changes in polysomal profiling curves between control and tubacin-pretreated cells further confirming that tubacin did not alter the overall protein translation (Fig.6E). Importantly, our findings showed a significant increase in CD20 mRNA associated to polysomes from tubacin-treated cells when compared with control cells (Fig. 6F). Together, our results clearly indicate that HDAC6 is involved in a negative posttranscriptional regulation of CD20 - HDAC6 inhibition stimulates CD20 mRNA translation and further increases CD20 protein synthesis.

DISCUSSION

HDAC6 inhibition have recently emerged as a promising therapeutic strategy for B-cell malignancies. Based on the results of *in vitro* cytotoxicity studies [42,49], HDAC6 inhibitors are currently being evaluated as monotherapy and in combinations in phase I and II clinical trials in patients with relapsed/refractory multiple myeloma and lymphoid malignancies. As it has been shown that HDAC6 is overexpressed in human CLL primary cells [50], HDAC6 inhibitors are beginning to be explored in this malignancy. Recently, a phase I clinical trial of ricolinostat in combination with BCR inhibitors has been initiated in relapsed or refractory CLL patients. Targeting HDAC6 in CLL has been further supported by recent *in vitro* data demonstrating decreased expression of immune checkpoint markers in CLL cells upon selective HDAC6 inhibition [51]. Here, we identify a novel role of HDAC6 in B – cell malignancies that could be exploited therapeutically. The results of our studies clearly show that inhibition of HDAC6 significantly increases CD20 level in a panel of established B-cell tumors as well as in primary samples from CLL patients. The observed up-regulation translates into increased efficacy of anti-CD20 mAbs, particularly into inducing CDC, which is known to strongly rely on CD20 level [13,52]. Moreover, our results demonstrate that HDAC6 inhibition increases not only the efficacy of type I anti-CD20 mAbs, but has also enhances direct tumor cell death triggered by a novel type II anti-CD20 mAb – obinutuzumab.

The attempts to sensitize B-cell tumors to anti-CD20 have already been made mostly by using non-specific pan-HDAC inhibitors [26]. However, more specific HDACi – entinostat, targeting HDAC1 and HDAC3, have been also reported to enhance the anti-tumor activity of rituximab [28]. Interestingly, the authors did not observe increased complement-dependent (CDC) nor antibody-dependent-cell-mediated (ADCC) cytotoxicity in *in vitro* settings. The reported increase in both surface and total CD20 protein level was significant but modest, thus suggesting another mechanism of this combination. In fact, entinostat seemed to potentiate rituximab-induced cell death by G1 cell cycle inhibition, p21 induction and up-regulation of adhesion molecules facilitating the interaction between tumor and immune cells.

The epigenetic modulation of CD20 coding gene has been proposed by others as a mechanism of CD20 up-regulation by HDAC pan-inhibitors [23,26]. However, HDAC6 is described as a unique member of HDAC family that does not change chromatin organization. In this work we employed highly selective HDAC6 inhibitors, namely tubacin (~350-fold selectivity for HDAC6 over HDAC1), tubastatin A (~1000-fold selectivity for HDAC6 against all other isozymes except HDAC8) and a currently tested ricolinostat (~12-15-fold selective for HDAC6 over class I HDACs). We also confirmed our observations of HDAC6-specific effect on CD20 level using Raji cells stably transduced with shRNA targeting HDAC6.

To further elucidate the mechanisms of observed CD20 regulation, we performed a series of experiments assessing the influence of HDAC6 inhibition on CD20 transcription. We demonstrated that HDAC6 inhibition did not alter CD20 mRNA level. Since HDAC6 has been mostly investigated for its effect on protein degradation, interaction and localization, we performed a reversible biotinylation assay to measure plasma membrane protein endocytic rates. So far, HDAC6 has been demonstrated to regulate EGFR [53-55] and CD133 [56] vesicular trafficking and degradation by controlling the acetylation status of alpha-tubulin and, subsequently, protein trafficking along microtubules. Here, we observed that CD20 underwent a slow-rate endocytosis which was slightly potentiated by tubacin. Here we also confirmed previously described role of HDAC6 as a negative regulator of endocytosis associated with the endosomal compartments.

From cycloheximide chase assay we concluded that CD20 is a membrane protein with a long half-life of more than 48h and thus rejected the hypothesis that HDAC6 is directly implicated in CD20 degradation. Using several complementary methods, we demonstrated that HDAC6 specifically regulates CD20 translation, without changing the overall protein translation rate. So far, the role of HDAC6 in protein translation was mainly described in the context of its participation in the formation of stress granules (SG) under stress conditions [57]. Stress granules represent a complex assembly of proteins involved in initiation and control of translation as well as various polyadenylated mRNAs whose translation has been stalled. HDAC6 has been proposed as a central component regulating SG

formation and potentially contributing to the control of RNA metabolism and translation. However, from our experiments we concluded that the increased translation of CD20 mRNA upon selective HDAC6 inhibition is not a direct consequence of impaired SG formation. SG have been described to contain 40S ribosomal subunits [58] and our polysomal profiling revealed no differences between control and tubacin-treated cells in fractions corresponding to 40S ribosomal subunits. Hence, the exact mechanism of the increased translation of CD20 mRNA induced by HDAC6 inhibition requires further studies.

To our knowledge, this is the first report showing that HDAC6 inhibition can be a therapeutic strategy successfully enhancing the efficacy of anti-CD20 mAbs. Our pre-clinical investigation might be relevant in terms of designing clinical studies and support further use of HDAC6 inhibitors in combination with anti-CD20 mAbs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MB, BP, MD and MW performed and analyzed experiments. JS, KB, MS, MKoz, AD, NM, PZ,and AZ performed experiments. Isolation of polysomes was performed by EB and data obtained from polysomal profiles were analyzed by EB, NDV and JJD. Sorting of transduced cells was performed by MG. AM, WT, MK, EL-M and KG provided primary material and were involved in manuscript preparation. AZ, MG, MF and JG provided expert advice and guidance throughout the study. All authors reviewed the manuscript.

FINANCIAL SUPPORT:

The work was supported by National Science Center 2013/09/N/NZ3/01407 (MB), 2015/16/T/NZ6/00034 (MB), 2014/13/N/NZ6/02081 (MS), 2015/18/E/NZ6/00702 (MW), 2013/11/B/NZ5/03240 (BP), European Commission 7th Framework Programme FP7-REGPOT-2012-CT2012-316254-BASTION (JG), European Commission Horizon 2020 Programme 692180-STREAM-H2020-TWINN-2015 (JG), Polish Ministry of Science and Higher Education grant IP2011 060271 (MW), DI2011 021241 (MB), DI 2014007344 (NM) and DI2013 006643 (AD), the Medical University of Warsaw grant 1M19/PM/112D/14/14 (MB), French Ministry of Research (EB), Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité Départemental du Rhône (NDV) and the Medical University of Lublin grant DS 462 (KG).

THE AUTHORS DECLARE NO CONFLICT OF INTEREST

REFERENCES

1. Bonavida B. Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance. *Semin Oncol*. 2014;41(5):667-677.
2. Perez-Callejo D, Gonzalez-Rincon J, Sanchez A, Provencio M, Sanchez-Beato M. Action and resistance of monoclonal CD20 antibodies therapy in B-cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(8):680-689.
3. Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(2):203-216.
4. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2825-2833.
5. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7359-7368.
6. Sarro SM, Unruh TL, Zuccolo J, et al. Quantification of CD20 mRNA and protein levels in chronic lymphocytic leukemia suggests a post-transcriptional defect. *Leuk Res*. 2010;34(12):1670-1673.
7. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol*. 1998;51(5):364-369.
8. Mankai A, Bordron A, Renaudineau Y, et al. Purine-rich box-1-mediated reduced expression of CD20 alters rituximab-induced lysis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Cancer Res*. 2008;68(18):7512-7519.
9. Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, et al. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;102(10):3514-3520.
10. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood*. 2009;113(20):4885-4893.
11. Pickartz T, Ringel F, Wedde M, et al. Selection of B-cell chronic lymphocytic leukemia cell variants by therapy with anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Exp Hematol*. 2001;29(12):1410-1416.
12. Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res*. 1999;5(3):611-615.
13. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 2006;12(13):4027-4035.
14. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 2001;98(12):3383-3389.
15. Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, et al. Acquirement of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1561-1570.
16. Bojarczuk K, Siernicka M, Dwojak M, et al. B-cell receptor pathway inhibitors affect CD20 levels and impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia*. 2014;28(5):1163-1167.
17. Bil J, Winiarska M, Nowis D, et al. Bortezomib modulates surface CD20 in B-cell malignancies and affects rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(18):3745-3755.
18. Lapalombella R, Yu B, Triantafillou G, et al. Lenalidomide down-regulates the CD20 antigen and antagonizes direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab on primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2008;112(13):5180-5189.

19. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol*. 2006;176(4):2600-2609.
20. Oksvold MP, Kullmann A, Forfang L, et al. Expression of B-cell surface antigens in subpopulations of exosomes released from B-cell lymphoma cells. *Clin Ther*. 2014;36(6):847-862 e841.
21. Aung T, Chapuy B, Vogel D, et al. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(37):15336-15341.
22. Ushmorov A, Leithauser F, Sakk O, et al. Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107(6):2493-2500.
23. Sugimoto T, Tomita A, Hiraga J, et al. Escape mechanisms from antibody therapy to lymphoma cells: downregulation of CD20 mRNA by recruitment of the HDAC complex and not by DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(1):48-53.
24. Park J, Thomas S, Munster PN. Epigenetic modulation with histone deacetylase inhibitors in combination with immunotherapy. *Epigenomics*. 2015;7(4):641-652.
25. Woods DM, Sodre AL, Villagra A, Sarnaik A, Sotomayor EM, Weber J. HDAC Inhibition Upregulates PD-1 Ligands in Melanoma and Augments Immunotherapy with PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res*. 2015.
26. Shimizu R, Kikuchi J, Wada T, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y. HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia*. 2010;24(10):1760-1768.
27. Zhao WL, Wang L, Liu YH, et al. Combined effects of histone deacetylase inhibitor and rituximab on non-Hodgkin's B-lymphoma cells apoptosis. *Exp Hematol*. 2007;35(12):1801-1811.
28. Frys S, Simons Z, Hu Q, et al. Entinostat, a novel histone deacetylase inhibitor is active in B-cell lymphoma and enhances the anti-tumour activity of rituximab and chemotherapy agents. *Br J Haematol*. 2015;169(4):506-519.
29. Lemoine M, Younes A. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of lymphoma. *Discov Med*. 2010;10(54):462-470.
30. Ceccacci E, Minucci S. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia. *Br J Cancer*. 2016;114(6):605-611.
31. Di Liddo R, Valente S, Taurone S, et al. Histone deacetylase inhibitors restore IL-10 expression in lipopolysaccharide-induced cell inflammation and reduce IL-1beta and IL-6 production in breast silicone implant in C57BL/6J wild-type murine model. *Autoimmunity*. 2016:1-11.
32. Gryder BE, Sodji QH, Oyelere AK. Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. *Future Med Chem*. 2012;4(4):505-524.
33. Wagner JM, Hackanson B, Lubbert M, Jung M. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics*. 2010;1(3-4):117-136.
34. Harada T, Hideshima T, Anderson KC. Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma: from bench to bedside. *Int J Hematol*. 2016.
35. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4389-4394.
36. Boyault C, Gilquin B, Zhang Y, et al. HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *EMBO J*. 2006;25(14):3357-3366.
37. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. 2003;115(6):727-738.
38. Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem*. 2005;280(48):40282-40292.

39. Hideshima T, Bradner JE, Wong J, et al. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):8567-8572.
40. Amengual JE, Johannet P, Lombardo M, et al. Dual Targeting of Protein Degradation Pathways with the Selective HDAC6 Inhibitor ACY-1215 and Bortezomib Is Synergistic in Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(20):4663-4675.
41. Mishima Y, Santo L, Eda H, et al. Ricolinostat (ACY-1215) induced inhibition of aggresome formation accelerates carfilzomib-induced multiple myeloma cell death. *Br J Haematol*. 2015;169(3):423-434.
42. Dasmahapatra G, Patel H, Friedberg J, Quayle SN, Jones SS, Grant S. In vitro and in vivo interactions between the HDAC6 inhibitor ricolinostat (ACY1215) and the irreversible proteasome inhibitor carfilzomib in non-Hodgkin lymphoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(12):2886-2897.
43. Jones SS. ACY-1215, a First-In-Class Selective Inhibitor Of HDAC6, Demonstrates Significant Synergy With Immunomodulatory Drugs (IMiDs) In Preclinical Models Of Multiple Myeloma (MM). *Blood*. 2013;122(21):1952-1952.
44. Winiarska M, Bojarczuk K, Pyrzynska B, et al. Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *MAbs*. 2014;6(5):1300-1313.
45. Siernicka M, Winiarska M, Bajor M, et al. Adenanthin, a new inhibitor of thiol-dependent antioxidant enzymes, impairs the effector functions of human natural killer cells. *Immunology*. 2015;146(1):173-183.
46. Bojarczuk K, Bobrowicz M, Dwojak M, et al. B-cell receptor signaling in the pathogenesis of lymphoid malignancies. *Blood Cells Mol Dis*. 2015;55(3):255-265.
47. Dwojak M, Bobrowicz M, Bil J, et al. Sorafenib improves rituximab and ofatumumab efficacy by decreasing the expression of complement regulatory proteins. *Blood Cancer J*. 2015;5:e300.
48. Dacheux E, Vincent A, Nazaret N, et al. BRCA1-Dependent Translational Regulation in Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8(6):e67313.
49. Santo L, Hideshima T, Kung AL, et al. Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood*. 2012;119(11):2579-2589.
50. Van Damme M, Crompot E, Meuleman N, et al. HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. *Epigenetics*. 2012;7(12):1403-1412.
51. Powers JJ, Maharaj KK, Sahakian E, et al. Histone Deacetylase 6 (HDAC6) As a Regulator of Immune Check-Point Molecules in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood*. 2014;124(21):3311-3311.
52. Horvat M, Kloboves Prevodnik V, Lavrencak J, Jezersek Novakovic B. Predictive significance of the cut-off value of CD20 expression in patients with B-cell lymphoma. *Oncol Rep*. 2010;24(4):1101-1107.
53. Deribe YL, Wild P, Chandrashaker A, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6. *Sci Signal*. 2009;2(102):ra84.
54. Gao YS, Hubbert CC, Yao TP. The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation. *J Biol Chem*. 2010;285(15):11219-11226.
55. Liu W, Fan LX, Zhou X, Sweeney WE, Jr., Avner ED, Li X. HDAC6 regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation in renal epithelial cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e49418.
56. Mak AB, Nixon AM, Kittanakom S, et al. Regulation of CD133 by HDAC6 promotes beta-catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Rep*. 2012;2(4):951-963.
57. Kwon S, Zhang Y, Matthias P. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev*. 2007;21(24):3381-3394.
58. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell*. 2009;36(6):932-941.

Figure 1. Specific HDAC6 inhibitors up-regulate CD20 level and potentiate the efficacy of anti-CD20 mAbs. (A-C) Raji cells were pre-incubated for 48h with increasing concentrations of HDAC6 specific inhibitors – tubacin, tubastatin A and ricolinostat. **(A)** The level of surface CD20 was analyzed with flow cytometry upon staining with FITC-conjugated anti-CD20 antibody. Cell viability was assessed with PI staining. The results are presented as a percentage of MFI of control cells (+/- SD). Statistical significance was determined with Kruskal-Wallis test, ****P<0.0001,***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 vs control. **(B)** The levels of CD20 and acetylated-tubulin (a marker of HDAC6 inhibition) were assessed in Western blotting in whole-cell lysates. β-actin was used as loading control. **(C)** Equal amounts of control and drug-pretreated cells were incubated for 60 min with rituximab – R-CDC or ofatumumab – O-CDC (1-100 μg/ml) and 10% human AB serum as a source of complement. Cell viability was assessed with PI staining. The survival of cells is presented as a percentage of control cells without antibody (+/- SD). Statistical significance was determined using two-way ANOVA test with Tukey's correction, **P<0.01 vs control.

Figure 2. HDAC6 inhibition increases CD20 level in a panel of B-cell tumor cell lines and primary CLL cells. (A) Daudi, Pfeiffer, Ly-1, HS-Sultan tumor cell lines as well as A1 EBV-transformed B-cells were pre-treated with 10 μM tubacin for 48h. The level of surface CD20 was analyzed with flow cytometry upon staining with FITC-conjugated anti-CD20 antibody. Cell viability was assessed with PI staining. Results are presented as a percentage of MFI of control cells (+/- SD). Statistical significance was determined with Mann-Whitney test, *P<0.05 vs control. **(B)** Peripheral blood mononuclear cells from CLL patients (n=22) were treated with increasing concentrations of tubacin for 48h. The cells were stained with CD20-FITC antibody and PI as described above. Statistical significance was determined with Kruskal-Wallis test,****P<0.0001, **P<0.01 vs control. **(C)** Primary CLL cells were pre-incubated with 20 μM tubacin for 48h. Efficacy of O-CDC was assessed with PI staining as described above. Statistical significance was determined using two-way ANOVA test with Tukey's correction, ****P<0.0001, ***P<0.001 vs control.

Figure 3. HDAC6 knock-down increases CD20 level and potentiates the efficacy of R-CDC. Raji cells were stably transduced with either pLKO.1 or pLKO.1-shHDAC6. **(A)** HDAC6 level was assessed with qRT-PCR with SYBRGreen. **(B)** The levels of CD20 and acetylated-tubulin were assessed in Western blotting. β-actin level was used as a loading control. **(C)** The level of surface CD20 was analyzed with flow cytometry upon staining with FITC-conjugated anti-CD20 antibody. Cell viability was assessed with PI staining. The results are presented as a percentage of MFI of control cells (+/- SD). Statistical significance was determined with Mann-Whitney test, *P<0.05 vs control. **(D)** R-CDC was performed as described Fig.1C. Statistical significance was determined using two-way ANOVA test with Tukey's correction, ***P<0.001 vs control.

Figure 4. Pan-HDAC inhibitors up-regulate CD20 level. Raji cells were pre-incubated for 48 with increasing concentrations of pan-HDAC inhibitors – trichostatin A, SAHA and scriptaid. **(A)** The level of surface CD20 was analyzed with flow cytometry upon staining with FITC-conjugated anti-CD20 antibody. Cell viability and statistical analysis were performed as described in Fig.1A. The results are presented as a percentage of MFI of control cells (+/- SD). Statistical significance was determined with Kruskal-Wallis test, **P<0.01 vs control. **(B)** cDNA from Raji cells pre-incubated for 24h with HDAC pan-inhibitors was used for qRT-PCR amplification of CD20 and β2M with corresponding probes labeled with FAM and DABCYL.

Figure 5. HDAC6 inhibition does not influence CD20 mRNA level and promoter activity. (A) cDNA from Raji cells pre-incubated for 24h with 10μM tubacin was used for qRT-PCR amplification of CD20 and β2M with corresponding probes labeled with FAM and DABCYL. **(B)** cDNA from Raji cells stably

transduced with either pLKO.1 or pLKO.1-shHDAC6 was used for used for qRT-PCR using SYBRGreen. **(C)** Relative luciferase activity was measured in lysates from Raji cells co-transfected with either empty vector or pGL4-wild type CD20 promoter plus pRL-SV40 and incubated with 10 μM tubacin for subsequent 24h. **(D)** Raji cells stably transduced with either pLVX, pLVX-CD20-HISTAG or pLVX-CD20-FLAG were incubated with 10 μM tubacin. The level of endogenous CD20, CD20-HISTAG and FLAG were assessed in Western blotting. β-actin level was used as loading control.

Figure 6. HDAC6 inhibition increases *de novo* CD20 synthesis. (A) Raji cells were co-incubated for 24h with 10 μM tubacin (TUB) and inhibitors of protein translation: 10 μg/ml cyclocheximide (CHX) or 200 nM homoharringtonine (HOMO). CD20 surface level was analyzed with flow cytometry as described in Fig.1A. The results are presented as a percentage of MFI of control cells (+/- SD). Statistical significance was determined with Kruskal-Wallis test, *P<0.05 vs control. **(B)** Raji cells were co-incubated with TUB, CHX, HOMO as described in Fig.6A. CD20 level in whole-cell lysates was assessed with Western blotting. β-actin was used as loading control. **(C-D)** Raji cells were co-incubated for 4h with 50μM Click-IT AHA and 10 μM tubacin as wells as inhibitors of protein translation 100 μg/ml cyclocheximide or 2 μM homoharringtonine. **(C)** Newly synthesized proteins were labeled with biotin and immunoprecipitated using Neutravidin Aggarose beads. CD20 level was assessed in biotinylated fraction using Western blotting. β-actin in input samples served as loading control. **(D)** Global *de novo* protein synthesis in control and tubacin-treated cells was assessed by Western blotting with anti-biotin antibody. **(E-F)** Control and tubacin-pretreated Raji cells were lysed in 25 mM KCl buffer and the cytoplasmic fraction was separated onto a 10–40% sucrose gradient. **(E)** Ribosome profiling of control and tubacin-treated cells. **(F)** Total RNA and polysomal-associated RNA from control and tubacin-pretreated Raji cells were reverse transcribed. CD20 level was quantified by real time PCR using SYBR Green and normalized to HPRT1 mRNA. qPCR analysis was performed in triplicates. Analysis of mRNA levels for each target was normalized to HPRT1 mRNA.

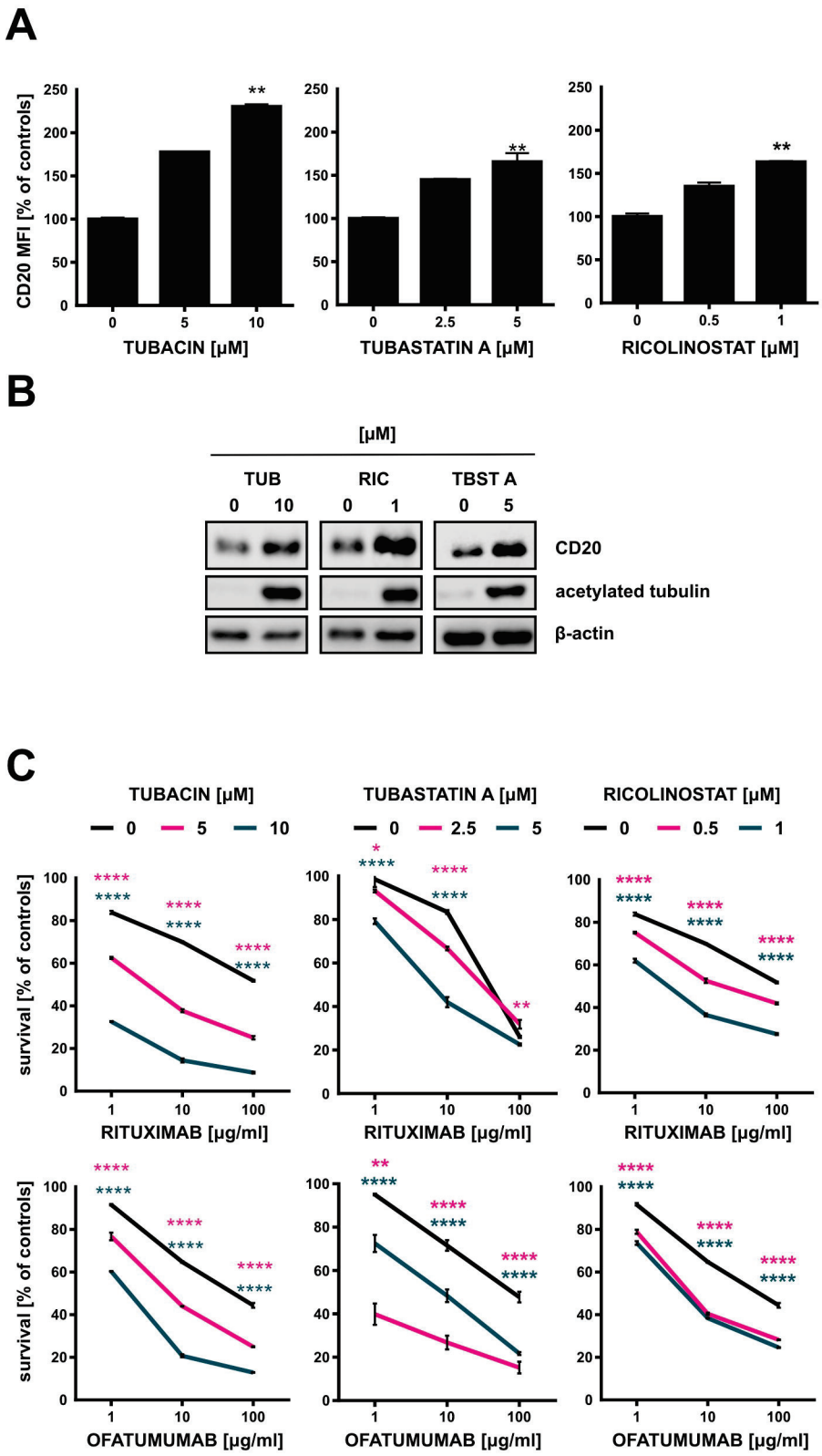

A
CD20 MFI [% of controls]
TUBACIN [µM]
TUBASTATIN A [µM]
RICOLINOSTAT [µM]
B
[µM]
TUB
RIC
TBST A
CD20
acetylated tubulin
β-actin
C
TUBACIN [µM]
TUBASTATIN A [µM]
RICOLINOSTAT [µM]
survival [% of controls]
RITUXIMAB [µg/ml]
OFATUMUMAB [µg/ml]

Figure 1

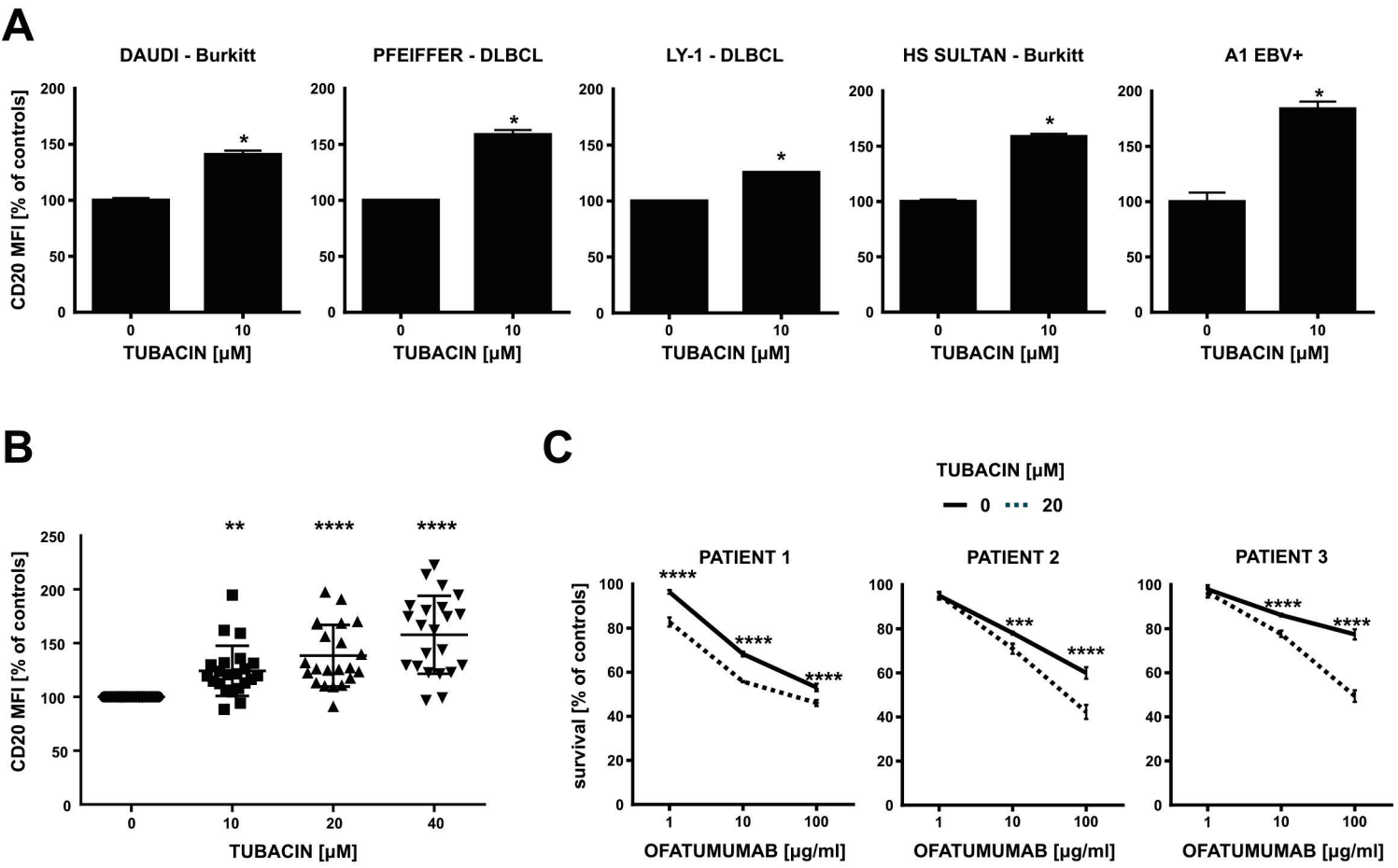

A
DAUDI - Burkitt
PFEIFFER - DLBCL
LY-1 - DLBCL
HS SULTAN - Burkitt
A1 EBV+
CD20 MFI [% of controls]
TUBACIN [µM]
B
CD20 MFI [% of controls]
TUBACIN [µM]
C
TUBACIN [µM]
0
20
PATIENT 1
PATIENT 2
PATIENT 3
survival [% of controls]
OFATUMUMAB [µg/ml]

Figure 2

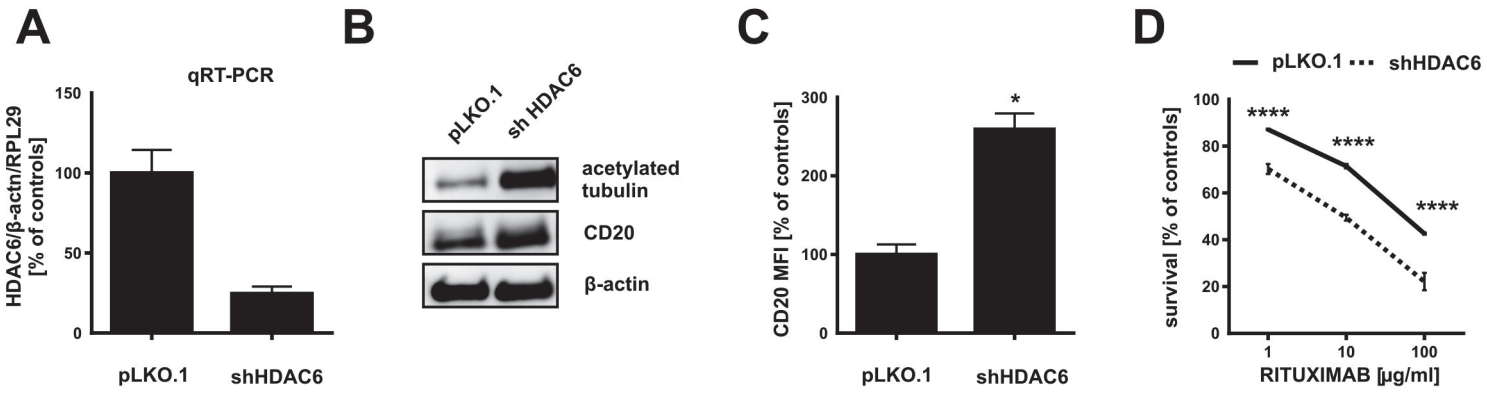

A
qRT-PCR
HDAC6/β-actn/RPL29 [% of controls]
150
100
50
0
pLKO.1
shHDAC6
B
pLKO.1
sh HDAC6
acetylated tubulin
CD20
β-actin
C
CD20 MFI [% of controls]
300
200
100
0
*
pLKO.1
shHDAC6
D
pLKO.1
shHDAC6
survival [% of controls]
100
80
60
40
20
0
****
****
****
1
10
100
RITUXIMAB [µg/ml]

Figure 3

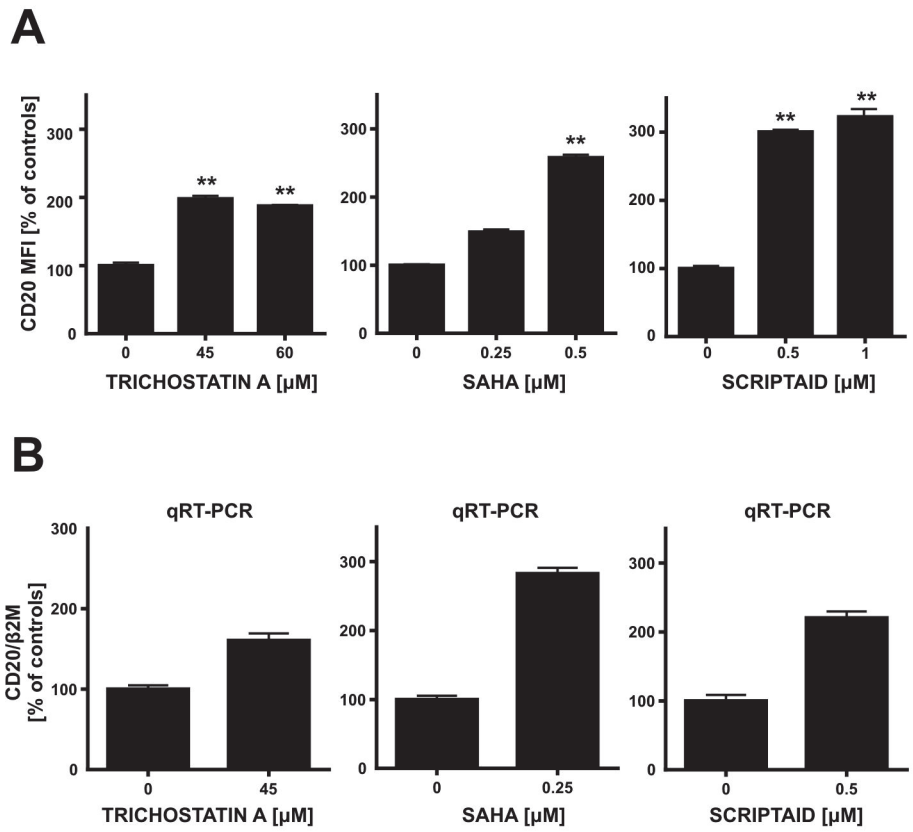

A
CD20 MFI [% of controls]
300
200
100
0
**
**
0
45
60
TRICHOSTATIN A [µM]
**
0
0.25
0.5
SAHA [µM]
**
**
0
0.5
1
SCRIPTAID [µM]
B
qRT-PCR
CD20/β2M
[% of controls]
300
200
100
0
0
45
TRICHOSTATIN A [µM]
qRT-PCR
0
0.25
SAHA [µM]
qRT-PCR
0
0.5
SCRIPTAID [µM]

Figure 4

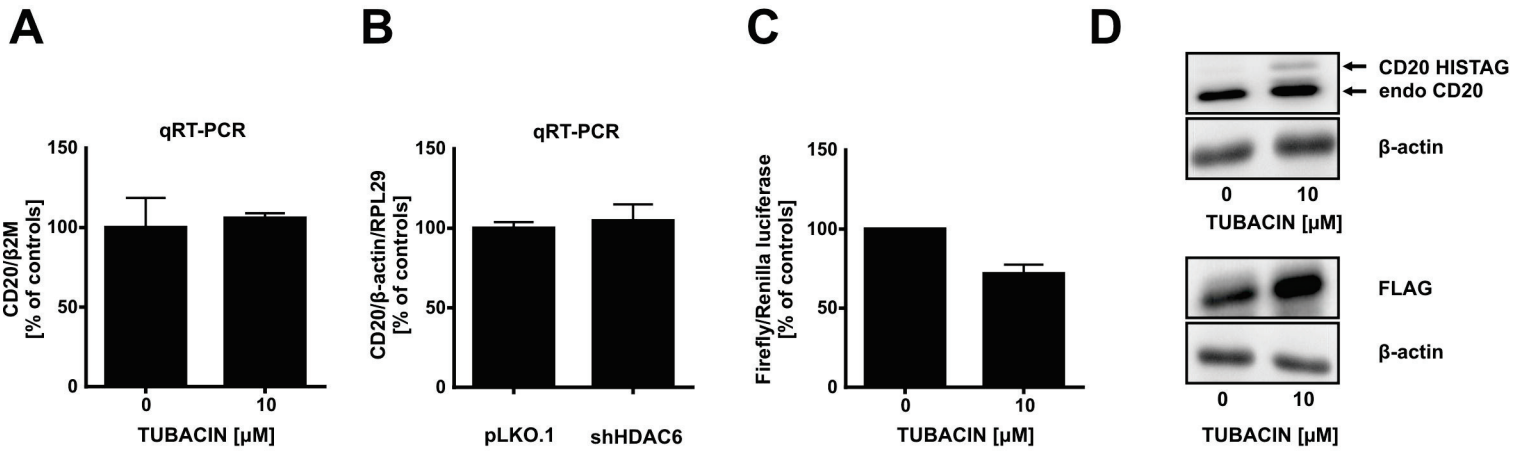
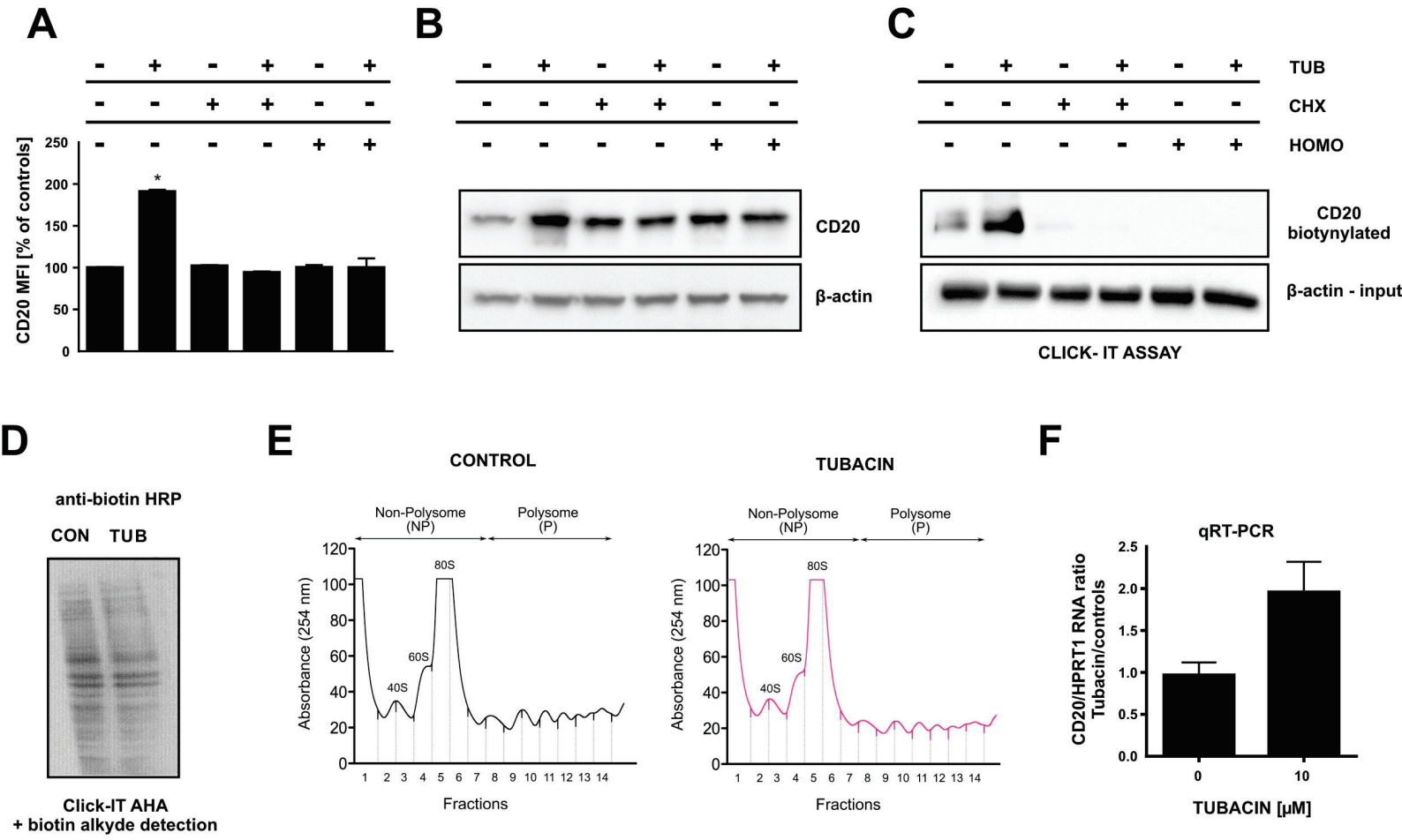
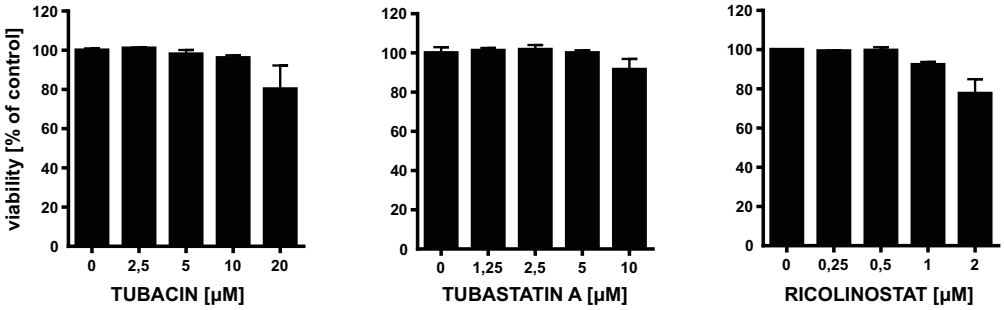

A
qRT-PCR
CD20/β2M
[% of controls]
150
100
50
0
0
10
TUBACIN [μM]
B
qRT-PCR
CD20/β-actin/RPL29
[% of controls]
150
100
50
0
pLKO.1
shHDAC6
C
Firefly/Renilla luciferase
[% of controls]
150
100
50
0
0
10
TUBACIN [μM]
D
CD20 HISTAG
endo CD20
β-actin
0
10
TUBACIN [μM]
FLAG
β-actin
0
10
TUBACIN [μM]

Figure 5

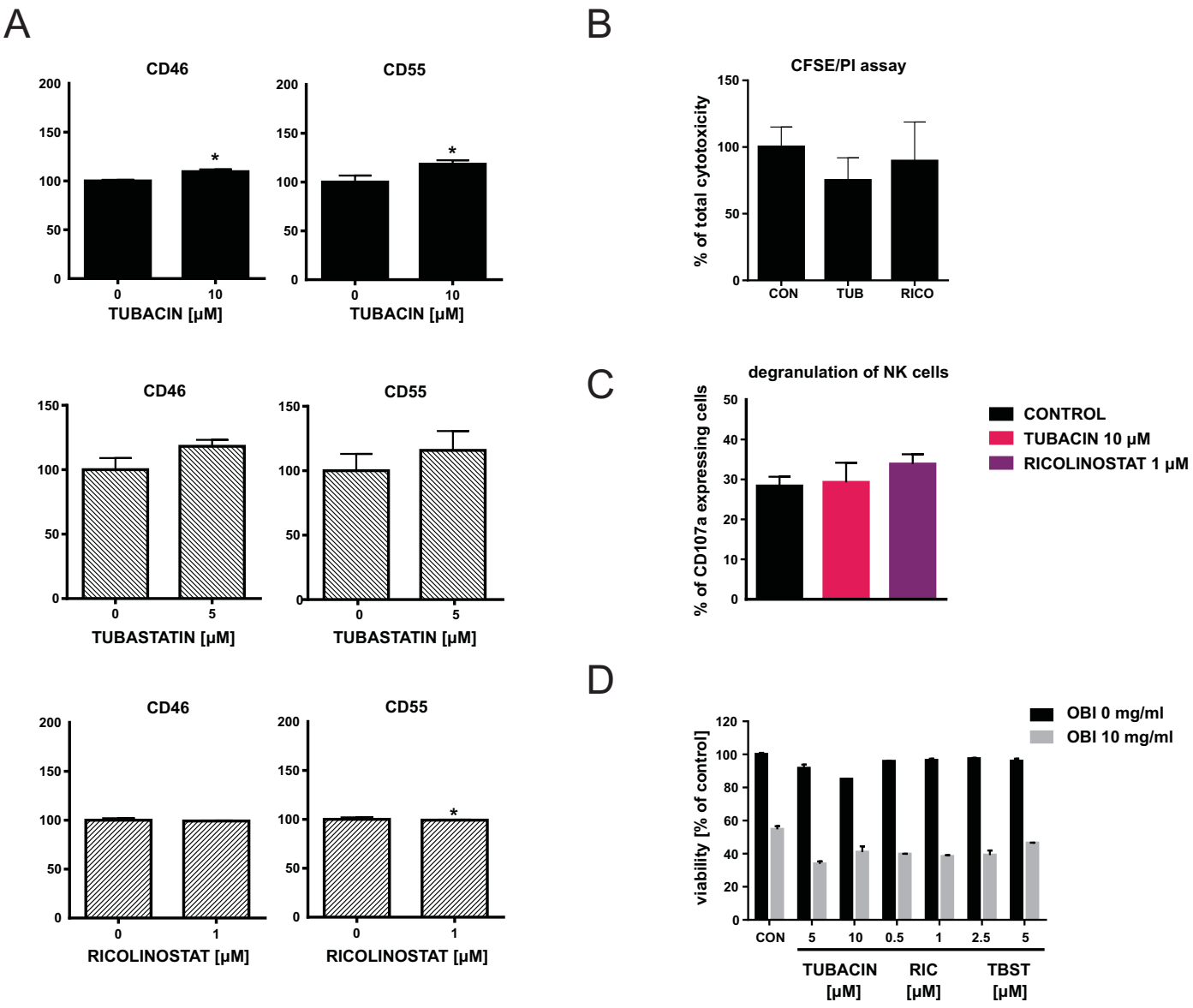

A
B
C
CD20 MFI [% of controls]
250
200
150
100
50
0
*
CD20
β-actin
TUB
CHX
HOMO
CD20 biotynylated
β-actin - input
CLICK- IT ASSAY

D
anti-biotin HRP
CON TUB
Click-IT AHA
+ biotin alkyde detection
E
CONTROL
TUBACIN
Non-Polysome (NP)
Polysome (P)
Absorbance (254 nm)
40S
60S
80S
Fractions
F
qRT-PCR
CD20/HPRT1 RNA ratio Tubacin/controls
TUBACIN [μM]

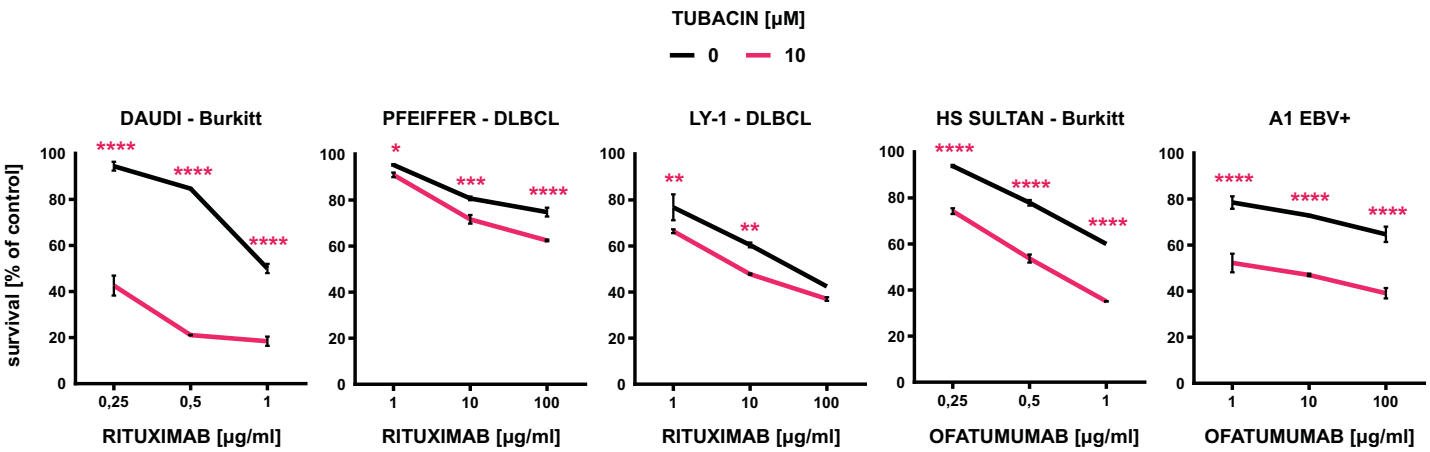
Figure 6



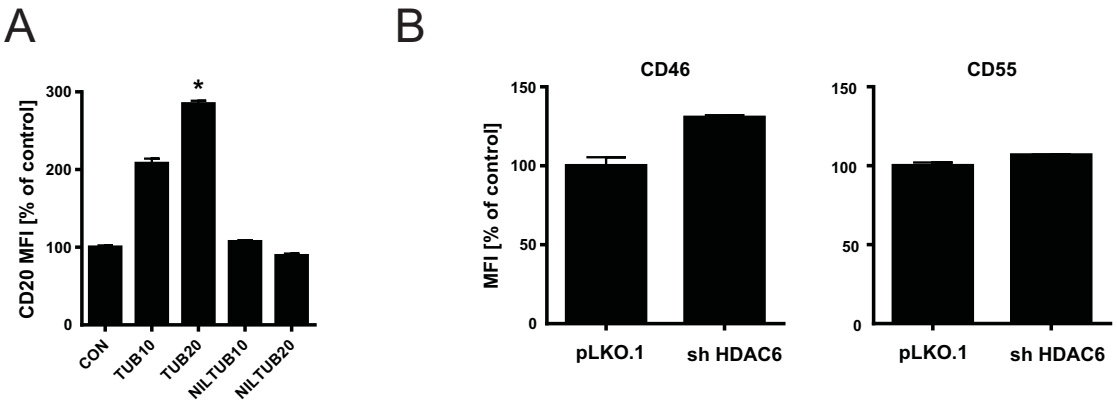
Supplementary Figure 1



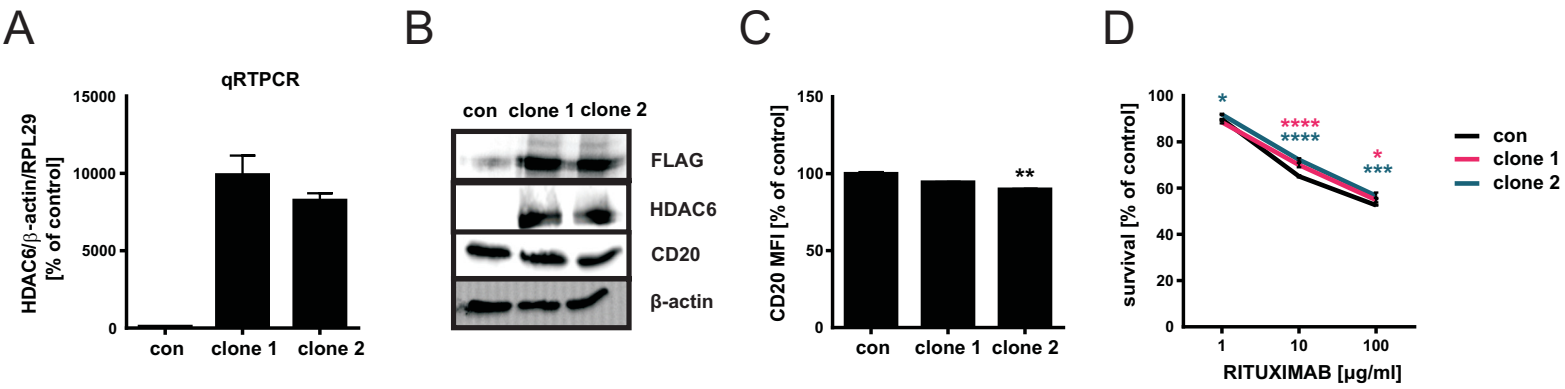
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

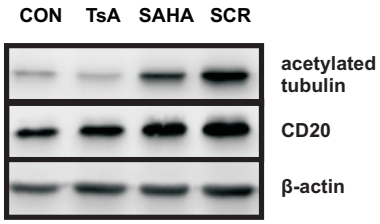


Supplementary Figure 4

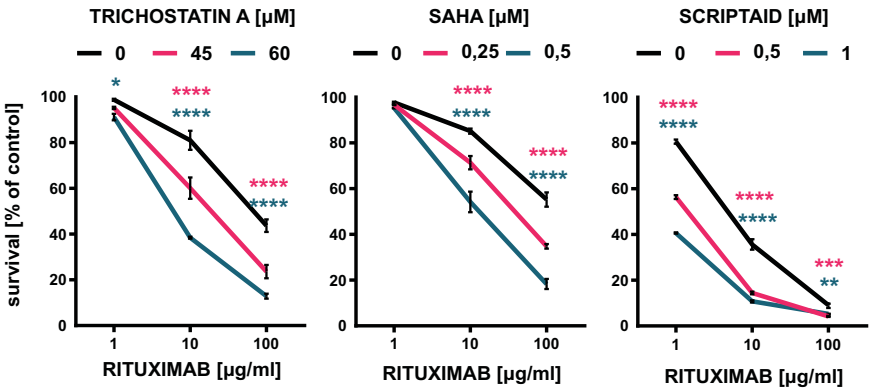


Supplementary Figure 5

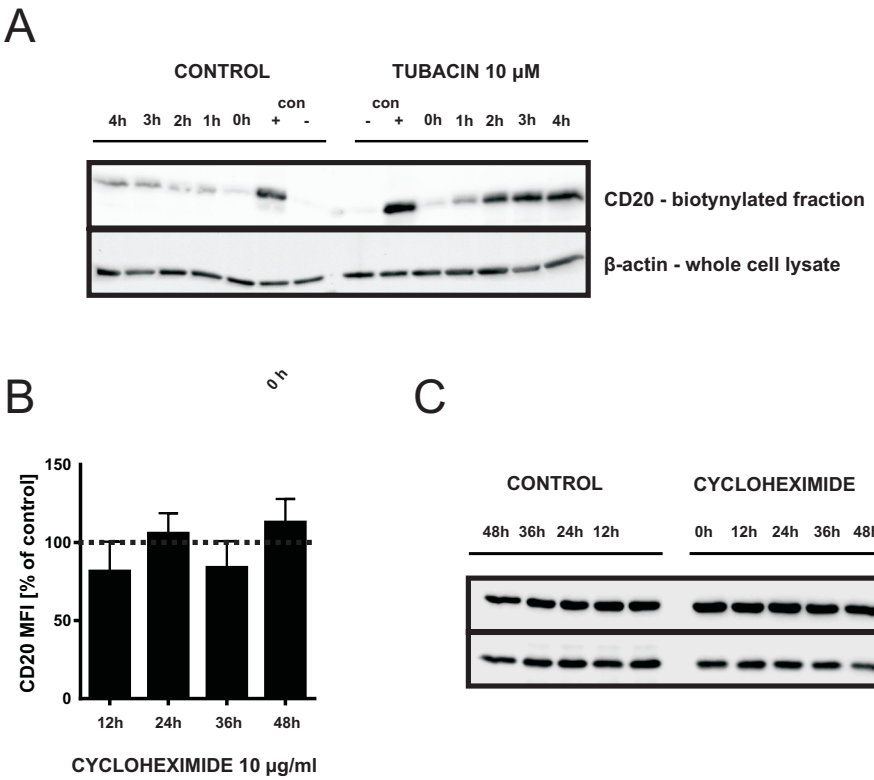
A

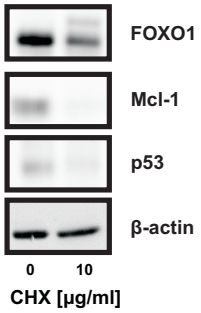


B

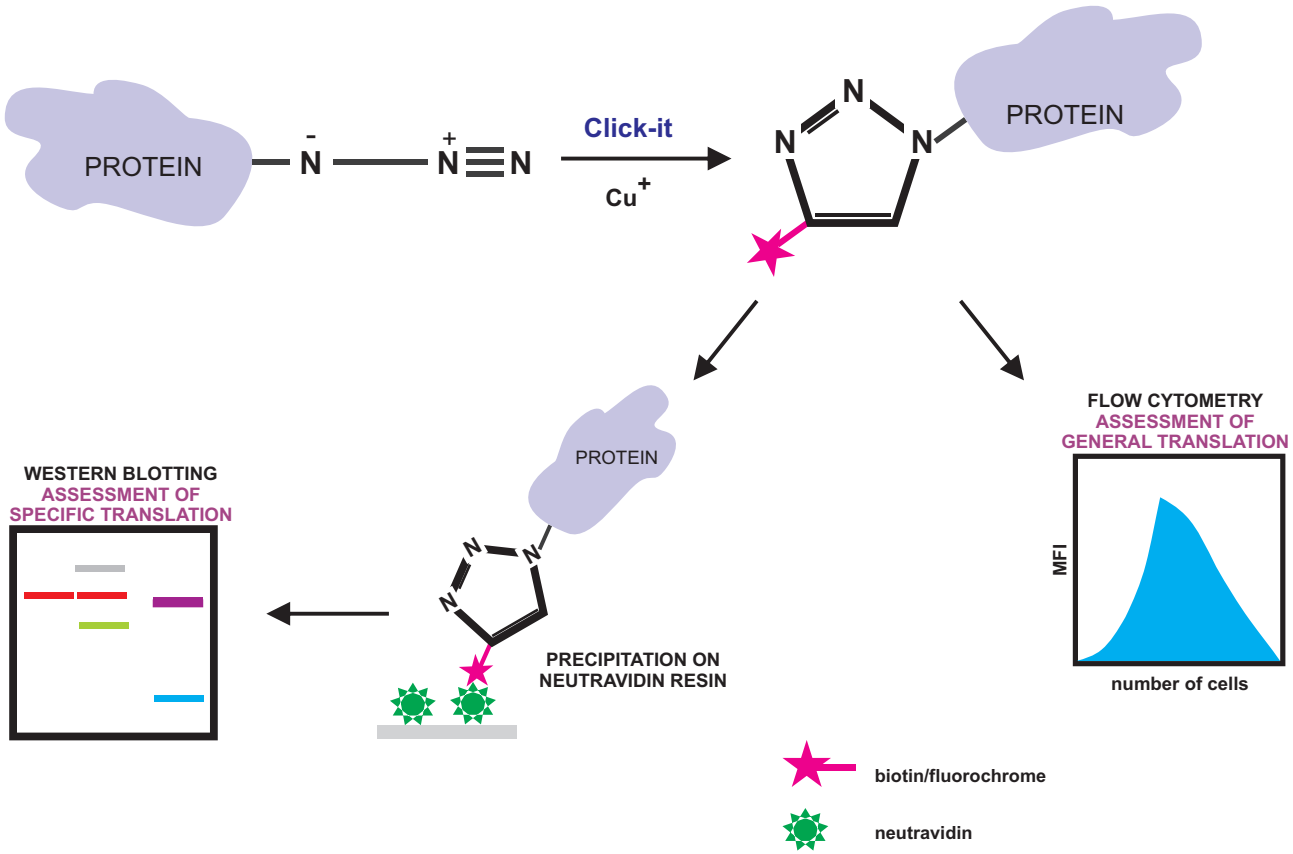


Supplementary Figure 6

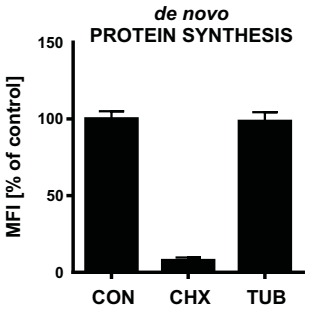




Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 8



Supplementary Figure 9

Références Bibliographiques

Ali, Iraj K., McKendrick L, Morley SJ, and Richard J. Jackson. 2001. "Truncated Initiation Factor eIF4G Lacking an eIF4E Binding Site Can Support Capped mRNA Translation." *EMBO Journal* 20 (15): 4233–42. doi:10.1093/emboj/20.15.4233.

Anderson, Schlegel, Nakajima T, Wolpin E S, and Parvin J D. 1998. "BRCA1 Protein Is Linked to the RNA Polymerase II Holoenzyme Complex via RNA Helicase A." *Nature Genetics* 19 (3): 254–56. doi:10.1038/930.

Antoniou, A, Pharoah, Narod S, Risch H.A., Eyfjord J.E., Hopper J.L., Loman N, 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." *The American Journal of Human Genetics* 72 (5): 1117–30. doi:10.1086/375033.

Atlas E, Stramwasser M, and Mueller CR. 2001. "A CREB Site in the BRCA1 Proximal Promoter Acts as a Constitutive Transcriptional Element." *Oncogene* 20 (48): 7110–14. doi:10.1038/sj.onc.1204890.

Atlas E, Stramwasser M, Whiskin K, and Mueller CR. 2000. "GA-Binding Protein Alpha/beta Is a Critical Regulator of the BRCA1 Promoter." *Oncogene* 19 (15): 1933–40. doi:10.1038/sj.onc.1203516.

Badve, Sunil, Dabbs, Schnitt, Baehner, Decker, Eusebi, Fox, et al. 2011. "Basal-like and Triple-Negative Breast Cancers: A Critical Review with an Emphasis on the Implications for Pathologists and Oncologists." *Modern Pathology* 24 (2): 157–67. doi:10.1038/modpathol.2010.200.

Baek, Daehyun, Villén, Shin, Camargo, Steven, and Bartel. 2008. "The Impact of microRNAs on Protein Output." *Nature* 455 (7209): 64–71. doi:10.1038/nature07242.The.

Baker, Guo Wei, Alicia Erbe Schaffner, and Michael C Ostrowski. 2003. "Ets-2 and Components of Mammalian SWI/SNF Form a Repressor Complex That Negatively Regulates the BRCA1 Promoter." *Journal of Biological Chemistry* 278 (20): 17876–84. doi:10.1074/jbc.M209480200.

Bal, Amanjit, Sangeeta Verma, Kusum Joshi, Anuj Singla, Ravi Thakur, Sunil Arora, and Gurpreet Singh. 2012. "BRCA1-Methylated Sporadic Breast Cancers Are BRCA-like in Showing a Basal Phenotype and Absence of ER Expression." *Virchows Archiv* 461 (3): 305–12. doi:10.1007/s00428-012-1286-z.

Baltz, Alexander G., Munschauer M, Schwanhäusser B, Vasile A, Murakawa Y, Schueler M, Youngs N, et al. 2012. "The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts." *Molecular Cell* 46 (5): 674–90. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.021.

Basu, Abhijit, Priyanka Das, Sujan Chaudhuri, Bevilacqua, Andrews, Barik, Hatzoglou, Komar, and Barsanjit Mazumder. 2011. "Requirement of rRNA Methylation for 80S Ribosome Assembly on a Cohort of Cellular Internal Ribosome Entry Sites." *Molecular and Cellular Biology* 31 (22): 4482–99. doi:10.1128/MCB.05804-11.

Bateman, Martin, O'Donovan, Magrane, Apweiler, Alpi, Antunes, et al. 2015. "UniProt: A Hub for Protein Information." *Nucleic Acids Research* 43 (D1): D204–12. doi:10.1093/nar/gku989.

Bau, Da Tian, Yi Chien Mau, and Chen Yang Shen. 2006. "The Role of BRCA1 in Non-Homologous End-Joining." *Cancer Letters* 240 (1): 1–8. doi:10.1016/j.canlet.2005.08.003.

Bertucci, Finetti, Cervera, Esterni, Hermitte, Viens, and Birnbaum. 2008. "How Basal Are Triple-Negative Breast Cancers?" *International Journal of Cancer* 123 (1): 236–40. doi:10.1002/ijc.23518.

Besse F and Ephrussi A. 2008. "Translational Control of Localized mRNAs: Restricting Protein

Synthesis in Space and Time." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (12): 971–80. doi:10.1038/nrm2548.

Bianchini, Giampaolo, Balko, Mayer, Sanders, and Gianni. 2016. "Triple-Negative Breast Cancer: Challenges and Opportunities of a Heterogeneous Disease." *Nature Reviews Clinical Oncology* 13 (11). Nature Publishing Group: 674–90. doi:10.1038/nrclinonc.2016.66.

Blamey, R., Collins J, Giorgio Crosignani P, Diczfalusy E, Heinemann L. A J, La Vecchia C, Reeves G et al. 2004. "Hormones and Breast Cancer." *Human Reproduction Update*. doi:10.1093/humupd/dmh025.

Borman, Michel, and Kean. 2000. "Biochemical Characterisation of Cap-poly(A) Synergy in Rabbit Reticulocyte Lysates: The eIF4G-PABP Interaction Increases the Functional Affinity of eIF4E for the Capped mRNA 5'-end." *Nucleic Acids Research* 28 (21): 4068–75. doi:10.1093/nar/28.21.4068.

Brisken C, O'Malley B. 2010. "Hormone Action in the Mammary Gland." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (12): a003178. doi:10.1101/cshperspect.a003178.

Brocardo M, and Henderson BR. 2008. "APC Shuttling to the Membrane, Nucleus and beyond." *Trends in Cell Biology* 18 (12): 587–96. doi:10.1016/j.tcb.2008.09.002.

Brodie, Kirsty, and Henderson BR. 2012. "Characterization of BRCA1 Protein Targeting, Dynamics, and Function at the Centrosome: A Role for the Nuclear Export Signal, CRM1, and Aurora a Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 287 (10): 7701–16. doi:10.1074/jbc.M111.327296.

Brown E, and Baltimore D. 2003. "Essential and Dispensable Roles of ATR in Cell Cycle Arrest and Genome Maintenance." *Genes and Development* 17 (5): 615–28. doi:10.1101/gad.1067403.

Buckley N, Hosey A, Gorski J, Purcell J, Mulligan J, Harkin P, and Mullan P. 2007. "BRCA1 Regulates IFN-Gamma Signaling through a Mechanism Involving the Type I IFNs." *Molecular Cancer Research : MCR* 5 (3): 261–70. doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0250.

Bushell M, Stoneley M, Yi Wen Kong, Hamilton T, Spriggs K, Dobbyn H, Xiaoli Qin, Sarnow P, Willis AE. 2006. "Polypyrimidine Tract Binding Protein Regulates IRES-Mediated Gene Expression during Apoptosis." *Molecular Cell* 23 (3): 401–12. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.012.

Cabello, Christopher M, Warner B Bair, Sarah D Lamore, Ley, Alexandra, Azimian, and Georg T Wondrak. 2010. "Transcriptional Autoregulation by BRCA1." *Cancer Research* 46 (2): 220–31. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.025.The.

Callebaut I, and Mornon JP. 1997. "From BRCA1 to RAP1: A Widespread BRCT Module Closely Associated with DNA Repair." *FEBS Letters* 400 (1). Federation of European Biochemical Societies: 25–30. doi:10.1016/S0014-5793(96)01312-9.

Calvo, Sarah E, Pagliarini DJ, and Vamsi K Mootha. 2009. "Upstream Open Reading Frames Cause Widespread Reduction of Protein Expression and Are Polymorphic among Humans." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (18): 7507–12. doi:10.1073/pnas.0810916106.

Caputo S, Benboudjema L, Sinilnikova O, Rouleau E, Béroud C, Lidereau R, Sevenet N, et al. 2012. "Description and Analysis of Genetic Variants in French Hereditary Breast and Ovarian Cancer Families Recorded in the UMD-BRCA1/BRCA2 Databases." *Nucleic Acids Research* 40 (D1): 992–1002. doi:10.1093/nar/gkr1160.

Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann B, Strein C, Davey NE, et al. 2012. "Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins." *Cell* 149 (6). Elsevier

Inc.: 1393–1406. doi:10.1016/j.cell.2012.04.031.

Castello A, Fischer B, Hentze MW, and Preiss T. 2013. “RNA-Binding Proteins in Mendelian Disease.” *Trends in Genetics* 29 (5). Elsevier Ltd: 318–27. doi:10.1016/j.tig.2013.01.004.

Chai, Y L, Cui J, Shao N, Shyam E, Reddy P, and Rao V N. 1999. “The Second BRCT Domain of BRCA1 Proteins Interacts with p53 and Stimulates Transcription from the p21WAF1/CIP1 Promoter.” *Oncogene* 18 (1): 263–68. doi:10.1038/sj.onc.1202323.

Chajès V, Cambot M, Moreau K, Lenoir G, and Joulin V. 2006. “Acetyl-CoA Carboxylase α Is Essential to Breast Cancer Cell Survival.” *Cancer Research* 66 (10): 5287–94. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1489.

Chen, Chi Fen, Shang Li, Yumay Chen, Phang Lang Chen, Z. Dave Sharp, and Wen Hwa Lee. 1996. “The Nuclear Localization Sequences of the BRCA1 Protein Interact with the Importin-a Subunit of the Nuclear Transport Signal Receptor.” *Journal of Biological Chemistry* 271 (51): 32863–68. doi:10.1074/jbc.271.51.32863.

Chen J, Silver D P, Walpita D, Cantor S B, Gazdar A F, Tomlinson G, Couch F J, et al. 1998. “Stable Interaction between the Products of the BRCA1 and BRCA2 Tumor Suppressor Genes in Mitotic and Meiotic Cells.” *Molecular Cell* 2 (3): 317–28. doi:10.1016/s1097-2765(00)80276-2.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2004. “Breast Cancer and Abortion: Collaborative Reanalysis of Data from 53 Epidemiological Studies, Including 83000 Women with Breast Cancer from 16 Countries.” *Lancet (London, England)* 363 (9414): 1007–16. doi:10.1016/S0140-6736(04)15835-2.

Coupier I, Baldeyron C, Rousseau A, Mosseri V, Pages-Berhouet S, Caux-Moncoutier V, Papadopoulo D, and Stoppa-Lyonnet D. 2004. “Fidelity of DNA Double-Strand Break Repair in Heterozygous Cell Lines Harbouring BRCA1 Missense Mutations.” *Oncogene* 23 (4): 914–19. doi:10.1038/sj.onc.1207191.

Curtit E, Benhamo V, Gruel N, Popova T, and Manie E. 2015. “First Description of a Sporadic Breast Cancer in a Woman with BRCA1 Germline Mutation.” *Oncogene* 6 (34): 616–24.

Dacheux E, Vincent A, Nazaret N, Combet C, Wierinckx A, Mazoyer S, Diaz JJ, Lachuer J, and Dalla Venezia N. 2013. “BRCA1-Dependent Translational Regulation in Breast Cancer Cells.” *PLoS ONE* 8 (6). doi:10.1371/journal.pone.0067313.

Damgaard, Kroun, and Lykke-Andersen. 2011. “Translational Coregulation of 5’TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR.” *Genes and Development* 25 (19): 2057–68. doi:10.1101/gad.17355911.

De Benedetti, and Graff. 2004. “eIF-4E Expression and Its Role in Malignancies and Metastases.” *Oncogene* 23 (18): 3189–99. doi:10.1038/sj.onc.1207545.

Delcros and Mehlen. 2013. “Les Récepteurs À Dépendance : Carrefours Entre Vie et Mort.” *Bulletin Du Cancer* 100 (12). Elsevier: 1261–74. doi:10.1684/bdc.2013.1858.

Delloye-Bourgeois C, Goldschneider D, Paradisi A, Therizols G, Belin S, Hacot S, Rosa-Calatrava M, et al. 2012. “Nucleolar Localization of a Netrin-1 Isoform Enhances Tumor Cell Proliferation.” *Science Signaling* 5 (236): ra57-ra57. doi:10.1126/scisignal.2002456.

Di Fiore, Riccardo, Antonella D’Anneo, Giovanni Tesoriere, and Renza Vento. 2013. “RB1 in Cancer: Different Mechanisms of RB1 Inactivation and Alterations of pRb Pathway in Tumorigenesis.” *Journal of Cellular Physiology* 228 (8): 1676–87. doi:10.1002/jcp.24329.

Diederichs S, Bartsch L, Berkmann J, Fröse K, Heitmann J, Hoppe C, Iggena D, et al. 2016. “The Dark Matter of the Cancer Genome : Aberrations in Regulatory Elements , Untranslated Regions ,

Splice Sites , Non-Coding RNA and Synonymous Mutations." *EMBO Molecular Medicine* 8 (5): 1–16. doi:10.15252/emmm.201506055.

Dizin E, Gressier C, Magnard C, Ray H, Décimo D, Ohlmann T, and Dalla Venezia N. 2006. "BRCA1 Interacts with poly(A)-Binding Protein: Implication of BRCA1 in Translation Regulation." *Journal of Biological Chemistry* 281 (34): 24236–46. doi:10.1074/jbc.M602176200.

Dizin E, Ray H, Suau F, Voeltzel T, and Dalla Venezia N. 2008. "Caspase-Dependent BRCA1 Cleavage Facilitates Chemotherapy-Induced Apoptosis." *Apoptosis* 13 (2): 237–46. doi:10.1007/s10495-007-0167-4.

Dong, Zizheng, and Jian Ting Zhang. 2006. "Initiation Factor eIF3 and Regulation of mRNA Translation, Cell Growth, and Cancer." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 59 (3): 169–80. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.03.005.

Dutertre M, Lambert S, Carreira A, Amor-Guéret M, and Vagner S. 2014. "DNA Damage: RNA-Binding Proteins Protect from near and Far." *Trends in Biochemical Sciences* 39 (3): 141–49. doi:10.1016/j.tibs.2014.01.003.

Eberle, Jürgen, Konstantin Krasagakis, and Constatin E. Orfanos. 1997. "Translational Initiation Factor eIF-4A1 mRNA Is Consistently Overexpressed in Humam Melanoma Cell in Vitro." *International Journal of Cancer* 71 (December 1996): 396–401. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970502)71:3<396::AID-IJC16>3.0.CO;2-E.

Ehrenfeld, Ellie. 1982. "Poliovirus-Induced Inhibition of Host-Cell Protein Synthesis." *Cell* 28 (3): 435–36. doi:0092-8674(82)90195-7 [pii].

ElShamy W and Livingston DM. 2004. "Identification of BRCA1-IRIS, a BRCA1 Locus Product." *Nature Cell Biology* 6 (10): 954–67. doi:10.1038/ncb1171.

Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans A.J, Powell S.N, McArthur G.A, and Kum Khanna H. 2004. "BRCA1-BARD1 Complexes Are Required for P53Ser-15 Phosphorylation and a G1/S Arrest Following Ionizing Radiation-Induced DNA Damage." *Journal of Biological Chemistry* 279 (30): 31251–58. doi:10.1074/jbc.M405372200.

Fabbro M, Schuechner S, W Y Au, and Henderson BR. 2004. "BARD1 Regulates BRCA1 Apoptotic Function by a Mechanism Involving Nuclear Retention." *Experimental Cell Research* 298 (2): 661–73. doi:10.1016/j.yexcr.2004.05.004.

Fabian, Mathonnet, Sundermeier, Zipprich, Svitkin, Rivas, Jinek, et al. 2009. "Mammalian miRNA RISC Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP- Dependent Deadenylation." *Molecular Carcinogenesis* 35 (6): 868–80. doi:10.1016/j.molcel.2009.08.004.Mammalian.

Fabian and Sonenberg. 2012. "The Mechanics of miRNA-Mediated Gene Silencing: A Look under the Hood of miRISC." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (6). Nature Publishing Group: 586–93. doi:10.1038/nsmb.2296.

Fan, S, Y X Ma, C Wang, R Q Yuan, Q Meng, J a Wang, M Erdos, et al. 2001. "Role of Direct Interaction in BRCA1 Inhibition of Estrogen Receptor Activity." *Oncogene* 20 (1): 77–87. doi:10.1038/sj.onc.1204073.

Feng, Zhihui, Kachnic l, Junran Zhang, Powell S.N, and Xia F. 2004. "DNA Damage Induces p53-Dependent BRCA1 Nuclear Export." *Journal of Biological Chemistry* 279 (27): 28574–84. doi:10.1074/jbc.M404137200.

Fergus J. Couch, Nathanson, and Offit. 2014. "Two Decades After BRCA: Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention." *Science* 343 (6178): 1466–70.

doi:10.1126/science.1251827.Two.

Fitzgerald K.D, and Semler B.L. 2009. “Bridging IRES Elements in mRNAs to the Eukaryotic Translation Apparatus.” *Biochim Biophys Acta* 1789 (949): 518–28. doi:10.1016/j.bbagrm.2009.07.004.Bridging.

Forbes, Beare, Gunasekaran, Leung, Bindal, Boutselakis, Ding, et al. 2014. “COSMIC: Exploring the World’s Knowledge of Somatic Mutations in Human Cancer.” *Nucleic Acids Research* 43 (D1): D805–11. doi:10.1093/nar/gku1075.

Forys JT, Kuzmicki CE, Saporita AJ, Winkeler CL, Maggi LB, Weber JD. 2014. “ARF and p53 Coordinate Tumor Suppression of an Oncogenetic IFN-B-STAT1-ISG15 Signalling Axis.” *Cell Rep* 7 (1): 514–26. doi:10.1097/OPX.0b013e3182540562.The.

Foulkes, William D. 2008. “Inherited Susceptibility to Common Cancers.” *The New England Journal of Medicine* 359 (20): 2143–53. doi:10.1056/NEJMra0802968.

Frolova, L., X. Le Goff, H. H. Rasmussen, S. Cheperegin, G. Drugeon, M. Kress, I. Arman, A. L. Haenni, J. E. Celis, and M. Philippe. 1994. “A Highly Conserved Eukaryotic Protein Family Possessing Properties of Polypeptide Chain Release Factor.” *Nature*. doi:10.1038/372701a0.

Gaba, Jacobson, and Sachs. 2005. “Ribosome Occupancy of the Yeast CPA1 Upstream Open Reading Frame Termination Codon Modulates Nonsense-Mediated mRNA Decay.” *Molecular Cell* 20 (3): 449–60. doi:10.1016/j.molcel.2005.09.019.

Galizia, Giorgetti, Piccinini, Santinelli, Loretelli, Bianchi, Gagliardini, et al. 2010. “BRCA1 Expression in Triple Negative Sporadic Breast Cancers.” *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 32 (1): 24–29.

Ganesan, Shridar, Silver, Greenberg, Dror Avni, Drapkin, Miron, Mok, et al. 2002. “BRCA1 Supports XIST RNA Concentration on the Inactive X Chromosome.” *Cell* 111 (3): 393–405. doi:10.1016/S0092-8674(02)01052-8.

Garcia-Blanco, M. A., Jamison S. F., and Sharp P. A.. 1989. “Identification and Purification of a 62,000-Dalton Protein That Binds Specifically to the Polypyrimidine Tract of Introns.” *Genes and Development* 3 (12 A): 1874–86. doi:10.1101/gad.3.12a.1874.

Garcia A, Buisson M, Bertrand P, Rimokh R, Rouleau E, Lopez B, Lidereau R, Mikaélian I, and Mazoyer S. 2011. “Down-Regulation of BRCA1 Expression by miR-146a and miR-146b-5p in Triple Negative Sporadic Breast Cancers.” *EMBO Molecular Medicine* 3 (5): 279–90. doi:10.1002/emmm.201100136.

Garnett, Mathew J., and Richard Marais. 2004. “Guilty as Charged: B-RAF Is a Human Oncogene.” *Cancer Cell* 6 (4): 313–19. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.022.

Gatei M, Sloper K, Sörensen C, Syljuäsen R, Falck J, Hobson K, Savage K, et al. 2003. “Ataxia-Telangiectasia-Mutated (ATM) and NBS1-Dependent Phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in Response to Ionizing Radiation.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (17): 14806–11. doi:10.1074/jbc.M210862200.

Gerber, A. P., and W Keller. 1999. “An Adenosine Deaminase That Generates Inosine at the Wobble Position of tRNAs.” *Science* 286 (5442): 1146–49. doi:10.1126/science.286.5442.1146.

Gilbert, Wendy V. 2010. “Alternative Ways to Think about Cellular Internal Ribosome Entry.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (38): 29033–38. doi:10.1074/jbc.R110.150532.

Grabarz, A, Barascu A, Guirouilh-Barbat J, and Lopez B. 2012. “Initiation of DNA Double Strand Break Repair: Signaling and Single-Stranded Resection Dictate the Choice between Homologous

Recombination, Non-Homologous End-Joining and Alternative End-Joining." *Am J Cancer Res* 2 (3): 249–68. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679557.

Graffeo R, Livraghi L, Pagani O, Goldhirsch A, Partridge A, and JGarber J. 2016. "Time to Incorporate Germline Multigene Panel Testing into Breast and Ovarian Cancer Patient Care." *Breast Cancer Research and Treatment*. Springer US. doi:10.1007/s10549-016-4003-9.

Green, D.R., and G. Kroemer. 2009. "Cytoplasmic Functions of the Tumor Suppressor p53." *Nature* 458 (7242): 1127. doi:10.1038/nature07986.Cytoplasmic.

Greenberg R, Sobhian B, Pathania S, Cantor S, Nakatani Y, and Livingston D. 2006. "Multifactorial Contributions to an Acute DNA Damage Response by BRCA1 / BARD1-Containing Complexes." *Genes & Development* 20: 34–46. doi:10.1101/gad.1381306.).

Guerra-Rebollo, Mateo, Franke, Huen, Lopitz-Otsoa, Rodríguez, Plans, and Thomson. 2012. "Nucleolar Exit of RNF8 and BRCA1 in Response to DNA Damage." *Experimental Cell Research* 318 (18): 2365–76. doi:10.1016/j.yexcr.2012.07.003.

Guo, Ingolia, Weissman, and David. 2010. "Mammalian microRNAs Predominantly Act to Decrease Target mRNA Levels." *Nature* 466 (7308): 835–40. doi:10.1038/nature09267.Mammalian.

Hamilton, T L, M Stoneley, K a Spriggs, and M Bushell. 2006. "TOPs and Their Regulation." *Biochemical Society Transactions* 34 (1): 12–16. doi:10.1042/BST20060012.

Han, Cox, Colditz, and Hunter. 2006. "The p53 Codon 72 Polymorphism, Sunburns, and Risk of Skin Cancer in US Caucasian Women." *Molecular Carcinogenesis* 45 (9): 694–700. doi:10.1002/mc.

Harding, Novoa, Zhang, Huiqing Zeng, Wek, Schapira, and Ron. 2000. "Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells." *Molecular Cell* 6 (5): 1099–1108. doi:10.1016/S1097-2765(00)00108-8.

Harkin, Bean, Miklos, Young Han Song, Truong, Englert, Christians, et al. 1999. "Induction of GADD45 and JNK/SAPK-Dependent Apoptosis Following Inducible Expression of BRCA1." *Cell* 97 (5): 575–86. doi:10.1016/S0092-8674(00)80769-2.

Hatchi, Konstantina Skourti-Stathaki, Ventz, Pinello, Yen, Kinga Kamieniarz-Gdula, Stoil Dimitrov, et al. 2015. "BRCA1 Recruitment to Transcriptional Pause Sites Is Required for R-Loop-Driven DNA Damage Repair." *Molecular Cell* 57 (4). The Authors: 636–47. doi:10.1016/j.molcel.2015.01.011.

He, Qiye, Jeff Johnston, Julia Zeitlinger, Kansas City, and Kansas City. 2009. "PALB2 Functionally Connects the Breast Cancer Susceptibility Proteins BRCA1 and BRCA2." *Mol Cancer Res* 33 (4): 1110–18. doi:10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus.

Henderson B.R, 2012. "The BRCA1 Breast Cancer Suppressor: Regulation of Transport, Dynamics, and Function at Multiple Subcellular Locations." *Scientifica* 2012: 1–15. doi:10.6064/2012/796808.

Hinnebusch A.G, 2005. "TRANSLATIONAL REGULATION OF GCN4 AND THE GENERAL AMINO ACID CONTROL OF YEAST*." *Annual Review of Microbiology* 59 (1): 407–50. doi:10.1146/annurev.micro.59.031805.133833.

Hinnebusch, Sonenberg. 2009. "Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets." *Cell* 136 (4): 731–45. doi:10.1016/j.cell.2009.01.042.Regulation.

Huang, Chi Cheng, Shih Hsin Tu, Heng Hui Lien, Jaan Yeh Jeng, Ching Shui Huang, Chi Jung Huang, Liang Chuan Lai, and Eric Y. Chuang. 2013. "Concurrent Gene Signatures for Han Chinese Breast Cancers." *PLoS ONE* 8 (10): 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0076421.

Iadevaia, Caldarola, Tino, Amaldi, and Loreni. 2008. "All Translation Elongation Factors and the E , F ,

and H Subunits of Translation Initiation Factor 3 Are Encoded by 59-Terminal Oligopyrimidine (TOP) mRNAs." *Rna* 14: 1730–36. doi:10.1261/rna.1037108.sequence.

Inge-Vechtomov, Zhouravleva, and Philippe. 2003. "Eukaryotic Release Factors (eRFs) History." *Biology of the Cell* 95 (3–4): 195–209. doi:10.1016/S0248-4900(03)00035-2.

Inic, Zorka, Milan Zegarac, Momcilo Inic, Ivan Markovic, Zoran Kozomara, Igor Djurisic, Ivana Inic, Gordana Pupic, and Snezana Jancic. 2014. "Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes according to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information." *Clinical Medicine Insights: Oncology* 8: 107–11. doi:10.4137/CMO.S18006.

Jack, Bellodi, Landry, Niederer, Meskauskas, Sharmishtha Musalgaonkar, Noam Kopmar, et al. 2011. "rRNA Pseudouridylation Defects Affect Ribosomal Ligand Binding and Translational Fidelity from Yeast to Human Cells." *Molecular Cell* 44 (4): 660–66. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.017.

Jang, S K, H G Kräusslich, M J Nicklin, G M Duke, A C Palmenberg, and E Wimmer. 1988. "A Segment of the 5' Nontranslated Region of Encephalomyocarditis Virus RNA Directs Internal Entry of Ribosomes during in Vitro Translation." *Journal of Virology* 62 (8): 2636–43. doi:10.1196/annals.1307.020.

Jeffrey M. Lipton, Steven R. Ellis. 2011. "Diamond Blackfan Anemia 2008 – 2009: Broadening the Scope of Ribosome Biogenesis Disorders." *Curr Opin Pediatr* 22 (1): 12–19. doi:10.1097/MOP.0b013e328334573b.Diamond.

Jiang, Guochun, Plo I, Tong Wang, Mohammad Rahman, Ju Hwan Cho, Yang E, Lopez B, and Xia F. 2013. "BRCA1-Ku80 Protein Interaction Enhances End-Joining Fidelity of Chromosomal Double-Strand Breaks in the G1 Phase of the Cell Cycle." *Journal of Biological Chemistry* 288 (13): 8966–76. doi:10.1074/jbc.M112.412650.

Jiang, Hong, Coleman, Miskimins, Srinivasan, and Miskimins. 2007. "Cap-Independent Translation through the p27 5'-UTR." *Nucleic Acids Research* 35 (14): 4767–78. doi:10.1093/nar/gkm512.

Jin S, Zhao H, Fan F, Blanck P, Fan W, Colchagie, Fornace, and Zhan Q. 2000. "BRCA1 Activation of the GADD45 Promoter." *Oncogene* 19 (35): 4050–57. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962562.

Jingwei Ni, Amy L. Tien, Maurille J. Fournier. 1997. "Small Nucleolar RNAs Direct Site-Specific Synthesis of Pseudouridine in Ribosomal RNA." *Cell* 89: 565–73. doi:10.1016/S0030-6657(08)70226-9.

Johnston R, D'Costa Z, Ray S, Gorski J, Harkin P, Mullan P, and Panov K. 2016. "The Identification of a Novel Role for BRCA1 in Regulating RNA Polymerase I Transcription." *Oncotarget* 7 (42). doi:10.18632/oncotarget.11770.

Kakegawa, Tomohito, Nozomi Ohuchi, Akiko Hayakawa, Satoru Hirata, Megumi Matsuda, Keiko Kogure, Hiroshi Kobayashi, Akira Inoue, and Roger L. Kaspar. 2007. "Identification of AUF1 as a Rapamycin-Responsive Binding Protein to the 5'-terminal Oligopyrimidine Element of mRNAs." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465 (1): 274–81. doi:10.1016/j.abb.2007.06.001.

Kalkhoven E, 2004. "CBP and p300: HATs for Different Occasions." In *Biochemical Pharmacology*, 68:1145–55. doi:10.1016/j.bcp.2004.03.045.

Kawai, Shinji, and Atsuo Amano. 2012. "BRCA1 Regulates microRNA Biogenesis via the DROSHA Microprocessor Complex." *Journal of Cell Biology* 197 (2): 201–8. doi:10.1083/jcb.201110008.

Kennecke, Hagen, Rinat Yerushalmi, Ryan Woods, Maggie Chon U Cheang, David Voduc, Caroline H

Speers, Torsten O Nielsen, and Karen Gelmon. 2010. “Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes.” *Journal of Clinical Oncology* 28 (20): 3271–77. doi:10.1200/JCO.2009.25.9820.

Kerekatte, Vaishali, Kyle Smiley, Bei Hu, Albert Smith, Frank Gelder, and Arrigo D E Benedett. 1995. “THE PROTO-ONCOGENE / TRANSLATION FACTOR eIF4E : A SURVEY OF.” *International Union Against Cance* 31: 27–31.

Kim, Hongtae, Jun Huang, and Junjie Chen. 2007. “CCDC98 Is a BRCA1-BRCT Domain-Binding Protein Involved in the DNA Damage Response.” *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (8): 710–15. doi:10.1038/nsmb1277.

King, Tari A, Li, Brogi, Yee, Gemignani, Olvera, Levine, et al. 2007. “Heterogenic Loss of the Wild-Type BRCA Allele in Human Breast Tumorigenesis.” *Annals of Surgical Oncology* 14 (9): 2510–18. doi:10.1245/s10434-007-9372-1.

Kleiman F, Wu-Baer F, Fonseca D, Kaneko S, Baer R, and Manley J.L. 2005. “BRCA1/BARD1 Inhibition of mRNA 3’ Processing Involves Targeted Degradation of RNA Polymerase II.” *Genes and Development* 19 (10): 1227–37. doi:10.1101/gad.1309505.

Komar A and Hatzoglou M. 2011. “Cellular IRES-Mediated Translation: The War of ITAFs in Pathophysiological States.” *Cell Cycle* 10 (2): 229–40. doi:10.4161/cc.10.2.14472.

Kondo, K, Cabon F, Arnal J, and Bayard F. 2006. “IRES-Dependent Regulation of FGF-2 mRNA Translation in Pathophysiological Conditions in the Mouse.” *Biochemical Society Tr* 34: 17–21.

Kondo, Yukiko, Eriko Koshimizu, Andre Megarbane, Haruka Hamanoue, Ippei Okada, Kiyomi Nishiyama, Hirofumi Kodera, et al. 2013. “Whole-Exome Sequencing Identified a Homozygous FNBP4 Mutation in a Family with a Condition Similar to Microphthalmia with Limb Anomalies.” *American Journal of Medical Genetics* 161 (7): 1543–46. doi:10.1002/ajmg.a.35983.

Koonin E, Altschul S.F, and Bork P. 1996. “…Functional Motifs….” *Nature Genetics* 13: 266–68. doi:10.1038/ng0796-266.

Kotsopoulos J, Singer C, and Narod S.A. et al. 2016. “Can We Prevent BRCA1-Associated Breast Cancer by RANKL Inhibition?” *Breast Cancer Research and Treatment* 161 (1). Springer US: 1–6. doi:10.1007/s10549-016-4029-z.

Kozak, M. 2001. “New Ways of Initiating Translation in Eukaryotes?” *Molecular and Cellular Biology* 21 (6): 1899–1907. doi:10.1128/MCB.21.23.8238-8246.2001.

Kozlov, De Crescenzo, Lim, Siddiqui, Fantus, Kahvejian, Trempe, et al. 2004. “Structural Basis of Ligand Recognition by PABC, a Highly Specific Peptide-Binding Domain Found in poly(A)-Binding Protein and a HECT Ubiquitin Ligase.” *The EMBO Journal* 23 (2): 272–81. doi:10.1038/sj.emboj.7600048.

Kren B, Unger G.M, Abedin M, Vogel R, Henzler C, Ahmed K, and Trembley J. 2015. “Preclinical Evaluation of Cyclin Dependent Kinase 11 and Casein Kinase 2 Survival Kinases as RNA Interference Targets for Triple Negative Breast Cancer Therapy.” *Breast Cancer Research* 17 (1): 19. doi:10.1186/s13058-015-0524-0.

Kristeleit R, Miller R, and Kohn E.C. 2016. “Gynecologic Cancers : Emerging Novel Strategies for Targeting DNA Repair Deficiency.” *American Society of Clinical Oncology*, 259–68.

Krum, Miranda, Lin, and Lane. 2003. “BRCA1 Associates with Processive RNA Polymerase II.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (52): 52012–20. doi:10.1074/jbc.M308418200.

Kühn, U, and Pieler T. 1996. “Xenopus poly(A) Binding Protein: Functional Domains in RNA Binding and Protein-Protein Interaction.” *Journal of Molecular Biology* 256: 20–30.

doi:10.1006/jmbi.1996.0065.

Lafontaine, D. L J, Bousquet-Antonelli C, Henry Y, Caizergues-Ferrer M, and Tollervey D. 1998. “The Box H + ACA snoRNAs Carry Cbf5p, the Putative rRNA Pseudouridine Synthase.” *Genes and Development* 12 (4): 527–37. doi:10.1101/gad.12.4.527.

Lai, M D, and J Xu. 2007. “Ribosomal Proteins and Colorectal Cancer.” *Curr Genomics* 8: 43–49. doi:10.2174/138920207780076938.

Lee J, Pestova T, Shin B-S, Cao C, Choi S, and Dever T.E. 2002. “Initiation Factor eIF5B Catalyzes Second GTP-Dependent Step in Eukaryotic Translation Initiation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (26): 16689–94. doi:10.1073/pnas.262569399.

Lee, Green, Marsillac, Coquelle, Scott Williams, Yeung, Foo, et al. 2010. “Comprehensive Analysis of Missense Variations in the BRCT Domain of BRCA1 by Structural and Functional Assays.” *Cancer Research* 70 (12): 4880–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4563.

Lehmann, Bauer, Xi Chen, Sanders, Bapsi Chakravarthy, Yu Shyr, and Pietenpol. 2011. “Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies.” *The Journal of Clinical Investigation*, 3–18. doi:10.1172/JCI45014DS1.

Lemay, Lemieux, St-André, and Bachand. 2010. “Crossing the Borders: poly(A)-Binding Proteins Working on Both Sides of the Fence.” *RNA Biology* 7 (3): 291–95. doi:10.4161/rna.7.3.11649.

Leung, Chung Yun, and J N Mark Glover. 2011. “BRCT Domains: Easy as One, Two, Three.” *Cell Cycle*. doi:10.4161/cc.10.15.16312.

Lewis S.M, and Holcik M. 2008. “For IRES Trans-Acting Factors, It Is All about Location.” *Oncogene* 27 (8): 1033–35. doi:10.1038/sj.onc.1210777.

Li, Hong Li, Ding Zhi Huang, Ting Deng, Li Kun Zhou, Xia Wang, Ming Bai, and Yi Ba. 2012. “Overexpression of Cyclin l2 Inhibits Growth and Enhances Chemosensitivity in Human Gastric Cancer Cells.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13 (4): 1425–30. doi:10.7314/APJCP.2012.13.4.1425.

Li, Huchun, Tae Hee Lee, and Hava Avraham. 2002. “A Novel Tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc Inhibits c-Myc-Induced Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene (hTERT) Promoter Activity in Breast Cancer.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (23): 20965–73. doi:10.1074/jbc.M112231200.

Li, Shang, Chia Yu Ku, Andrew A. Farmer, Yu Sheng Cong, Chi Fen Chen, and Wen Hwa Lee. 1998. “Identification of a Novel Cytoplasmic Protein That Specifically Binds to Nuclear Localization Signal Motifs.” *Journal of Biological Chemistry* 273 (11): 6183–89. doi:10.1074/jbc.273.11.6183.

Lin, George Guan-hua, and Jeffrey G Scott. 2012. “PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response.” *Curr Biol* 100 (2): 130–34. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations.

Liu, F. S. 1993. “Histological Grading and Prognosis of Breast Cancer.” *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi Chinese Journal of Pathology* 22 (1): 36–37. doi:10.1038/bjc.1957.43.

Liu, Weijun, Wenjun Zong, George Wu, Takeo Fujita, Wenqi Li, Judy Wu, and Yong Wan. 2010. “Turnover of BRCA1 Involves in Radiation-Induced Apoptosis.” *PLoS ONE* 5 (12). doi:10.1371/journal.pone.0014484.

Lixia M, Zhijian C, Chao S, Chaojiang G, Congyi Z. 2007. “Alternative Splicing of Breast Cancer Associated Gene BRCA1 from Breast Cancer Cell Line.” *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40 (1): 15–21. doi:10.5483/BMBRep.2007.40.1.015.

Lord C.J and Ashworth A. 2016. “BRCAness Revisited.” *Nature Reviews Cancer* 16 (2). Nature Publishing Group: 110–20. doi:10.1038/nrc.2015.21.

Lou, Zhenkun, Claudia Christiano Silva Chini, Katherine Minter-Dykhouse, and Junjie Chen. 2003. “Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein 1 Regulates BRCA1 Localization and Phosphorylation in DNA Damage Checkpoint Control.” *The Journal of Biological Chemistry* 278: 13599–602. doi:10.1074/jbc.C300060200.

Loyer, Trembley, Grenet, Busson, Corlu, Zhao, Kocak, Kidd, and Lahti. 2008. “Characterization of Cyclin L1 and L2 Interactions with CDK11 and Splicing Factors: Influence of Cyclin L Isoforms on Splice Site Selection.” *Journal of Biological Chemistry* 283 (12): 7721–32. doi:10.1074/jbc.M708188200.

Luukkonen, B G, W Tan, and S Schwartz. 1995. “Efficiency of Reinitiation of Translation on Human Immunodeficiency Virus Type 1 mRNAs Is Determined by the Length of the Upstream Open Reading Frame and by Intercistronic Distance.” *Journal of Virology* 69 (7): 4086–94. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=189143&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Magnard C, Bachelier R, Vincent A, Jaquinod M, Kieffer S, Lenoir G.M, and Dalla Venezia N. 2002. “BRCA1 Interacts with Acetyl-CoA Carboxylase through Its Tandem of BRCT Domains.” *Oncogene* 21 (April): 6729–39. doi:10.1038/sj.onc.

Mallery, Vandenberg, and Hiom. 2002. “Activation of the E3 Ligase Function of the BRCA1/BARD1 Complex by Polyubiquitin Chains.” *EMBO Journal* 21 (24): 6755–62. doi:10.1093/emboj/cdf691.

Mangus D.A, Evans M.C, and Jacobson A. 2003. “Poly(A)-Binding Proteins: Multifunctional Scaffolds for the Post-Transcriptional Control of Gene Expression.” *Genome Biology* 4 (7): 223. doi:10.1186/gb-2003-4-7-223.

Marash, L, and Kimchi A. 2005. “DAP5 and IRES-Mediated Translation during Programmed Cell Death.” *Cell Death and Differentiation* 12 (6): 554–62. doi:10.1038/sj.cdd.4401609.

Marash, Liberman, Henis-Korenblit, Sivan, Reem, Elroy-Stein, and Kimchi. 2008. “DAP5 Promotes Cap-Independent Translation of Bcl-2 and CDK1 to Facilitate Cell Survival during Mitosis.” *Molecular Cell* 30 (4): 447–59. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.018.

Marcel V, Catez F, and Diaz J-J. 2015. “P53, a Translational Regulator: Contribution To Its Tumour-Suppressor Activity.” *Oncogene* 34 (October 2014). Nature Publishing Group: 1–11. doi:10.1038/onc.2015.25.

Marcel V, Ghayad S.E, Belin S, Therizols G, Pierre A, Morel, Solano-Gonzàlez E, Vendrell J, et al. 2013. “P53 Acts as a Safeguard of Translational Control by Regulating Fibrillarin and rRNA Methylation in Cancer.” *Cancer Cell* 24 (3): 318–30. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.013.

M Barna, Pusic A, Zollo O, Costa M, Rego E, Kondrashov N, and Ruggero D, Rao P. 2008. “Suppression of Myc Oncogenic Activity by Ribosomal Protein Haploinsufficiency.” *Nature* 456 (7224): 971–75. doi:10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus.

Marintchev, Assen, Victoria G Kolupaeva, Tatyana V Pestova, and Gerhard Wagner. 2003. “Mapping the Binding Interface between Human Eukaryotic Initiation Factors 1A and 5B: A New Interaction between Old Partners.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1535–40. doi:10.1073/pnas.0437845100.

Mark, Wen Ying, Liao, Ying Lu, Ayeda Ayed, Rob Laister, Szymczyna, Chakrabartty, and Arrowsmith. 2005. “Characterization of Segments from the Central Region of BRCA1: An Intrinsically Disordered Scaffold for Multiple Protein-Protein and Protein-DNA Interactions?” *Journal of*

Molecular Biology 345 (2): 275–87. doi:10.1016/j.jmb.2004.10.045.

Martin S, Ouchi T. 2005. "BRCA1 Phosphorylation Regulates Caspase-3 Activation in UV-Induced Apoptosis." *Cancer Research* 65 (23): 10657–62. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2087.

Mavaddat, Antoniou, Easton, and Garcia-Closas. 2010. "Genetic Susceptibility to Breast Cancer." *Molecular Oncology*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.molonc.2010.04.011.

Mazoyer S. 2005. "Genomic Rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 Genes." *Human Mutation*. doi:10.1002/humu.20169.

Mccubrey, James A, Linda S Steelman, William H Chappell, Steven L Abrams, W T Wong, Fumin Chang, Brian Lehmann, et al. 2007. "Roles Of The RAS/MEK/ERK Pathway in Cell Growth, Malignant Transformation and Drug Resistance." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1773 (8): 1263–84. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.ROLES.

McQuillen, K, R B Roberts, and R J Britten. 1959. "Synthesis of Nascent Protein By Ribosomes in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45 (9): 1437–47. doi:10.1073/pnas.45.9.1437.

Meijer, Hedda A, and Adri A M Thomas. 2002. "Control of Eukaryotic Protein Synthesis by Upstream Open Reading Frames in the 5'-untranslated Region of an mRNA." *The Biochemical Journal* 367 (1): 1–11. doi:10.1042/BJ20011706.

Melchor, Lorenzo, and Javier Benítez. 2013. "The Complex Genetic Landscape of Familial Breast Cancer." *Human Genetics* 132 (8): 845–63. doi:10.1007/s00439-013-1299-y.

Meraldi, Patrick, Reiko Honda, and Erich A. Nigg. 2004. "Aurora Kinases Link Chromosome Segregation and Cell Division to Cancer Susceptibility." *Current Opinion in Genetics and Development* 14 (1): 29–36. doi:10.1016/j.gde.2003.11.006.

Meyuhas, Oded. 2000. "Synthesis of the Translational Apparatus Is Regulated at the Translational Level." *European Journal of Biochemistry* 267 (21): 6321–30. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01719.x.

Meza, Brzovic, King, and Klevit. 1999a. "Mapping the Functional Domains of BRCA1." *Journal of Biological Chemistry* 274 (9): 5659–65. doi:doi: 10.1074/jbc.274.9.5659.

Meza, Brzovic, King, and Klevit. 1999b. "Mapping the Functional Domains of BRCA1." *Journal of Biological Chemistry* 274 (9): 5659–65. doi:doi: 10.1074/jbc.274.9.5659.

Miki, Swensen, Shattuck-eidens, Futreal, Harshman, Tavtigian, Liu, et al. 1994. "Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1." *Science* 266 (October): 66–71. doi:10.1126/science.7545954.

MilellaM, Falcone I, Conciatori F, Cesta Incani U, Del Curatolo A, Inzerilli N, Nuzzo C M, et al. 2015. "PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors." *Front Oncol* 5 (February): 24. doi:10.3389/fonc.2015.00024.

Milner R, Wombwell H, Eckersley S, Barnes D, Warwicker J, Van Dorp E, Dearden S, et al. 2013. "Validation of the BRCA1 Antibody MS110 and the Utility of BRCA1 as a Patient Selection Biomarker in Immunohistochemical Analysis of Breast and Ovarian Tumours." *Virchows Archiv* 462 (3): 269–79. doi:10.1007/s00428-012-1368-y.

Mitchell, Sally A., Spriggs K.A., Coldwell M.J., Jackson R.J, and Willis A.E. 2003. "The Apaf-1 Internal Ribosome Entry Segment Attains the Correct Structural Conformation for Function via Interactions with PTB and Unr." *Molecular Cell* 11 (3): 757–71. doi:10.1016/S1097-2765(03)00093-5.

Mocquet V, Durand S, and Jalinot P. 2015. “How Retroviruses Escape the Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD)?” *AIDS Research and Human Retroviruses* 31 (10): 150612074147007. doi:10.1089/AID.2014.0326.

Montagnoli, A., Bosotti R, Villa F, Rialland M, Brotherton D, Mercurio C, Berthelsen J, and Santocanale C. 2002. “Drf1, a Novel Regulatory Subunit for Human Cdc7 Kinase.” *EMBO Journal* 21 (12): 3171–81. doi:10.1093/emboj/cdf290.

Moreau K, Dizin E, Ray H, Luquain C, Lefai E, Foufelle F, Billaud M, Lenoir G.M, and Dalla Venezia N. 2006. “BRCA1 Affects Lipid Synthesis through Its Interaction with Acetyl-CoA Carboxylase.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (6): 3172–81. doi:10.1074/jbc.M504652200.

Mueller CR and Roskelley C.D. 2003. “Regulation of BRCA1 Expression and Its Relationship to Sporadic Breast Cancer.” *Breast Cancer Research : BCR* 5 (1): 45–52. doi:10.1186/bcr557.

Munroe, D, and A Jacobson. 1990. “mRNA poly(A) Tail, a 3’ Enhancer of Translational Initiation.” *Molecular and Cellular Biology* 10 (7): 3441–55. doi:10.1128/MCB.10.7.3441.Updated.

Nielsen, Finn Cilius, Thomas van Overeem Hansen, and Claus Storgaard Sørensen. 2016. “Hereditary Breast and Ovarian Cancer: New Genes in Confined Pathways.” *Nature Reviews Cancer* 16 (9). Nature Publishing Group: 599–612. doi:10.1038/nrc.2016.72.

Nourashrafeddin, Seyedmehdi, Mahmoud Aarabi, Mohammad Hosein Modarressi, Marveh Rahmati, and Mohammad Nouri. 2015. “The Evaluation of WBP2NL-Related Genes Expression in Breast Cancer.” *Pathology Oncology Research* 21 (2): 293–300. doi:10.1007/s12253-014-9820-8.

Nupponen, N N, Porkka K, Kakkola L, Tanner M, Persson K, Borg A, Isola J, and Visakorpi T. 1999. “Amplification and Overexpression of p40 Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 in Breast and Prostate Cancer.” *The American Journal of Pathology* 154 (6): 1777–83. doi:10.1016/S0002-9440(10)65433-8.

Okada, Shinya, and Toru Ouchi. 2003. “Cell Cycle Differences in DNA Damage-Induced BRCA1 Phosphorylation Affect Its Subcellular Localization.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (3): 2015–20. doi:10.1074/jbc.M208685200.

Orban, T I, and Olah E. 2001. “Expression Profiles of BRCA1 Splice Variants in Asynchronous and in G1/S Synchronized Tumor Cell Lines.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280 (1): 32–38. doi:10.1006/bbrc.2000.4068.

Ørom, Ulf Andersson, Finn Cilius Nielsen, and Anders H. Lund. 2008. “MicroRNA-10a Binds the 5’UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation.” *Molecular Cell* 30 (4): 460–71. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.001.

Oskarsson, Thordur, and Andreas Trumpp. 2005. “The Myc Trilogy: Lord of RNA Polymerases.” *Nature Cell Biology* 7 (3): 215–17. doi:10.1038/ncb0305-215.

Ouchi T, Lee S W, Ouchi M, Aaronson S, and Horvath C M. 2000. “Collaboration of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in Differential Regulation of IFN-Gamma Target Genes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10): 5208–13. doi:10.1073/pnas.080469697.

Palade, G. 1975. “Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis.” *Science*, 347–58.

Parvin Jeffrey D. 2009. “The BRCA1-DependentUbiquitin Ligase, c-Tubulin, And, and Centrosomes.” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50: 649–53. doi:10.1002/em.

PaullT T, Cortez D, Bowers B, Elledge S J, and Gellert M. 2001. “Direct DNA Binding by Brca1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (11): 6086–

91. doi:10.1073/pnas.111125998.

Pelletier J and Sonenberg N. 1988. “Internal Initiation of Translation of Eukaryotic mRNA Directed by a Sequence Derived from Poliovirus RNA.” *Nature* 334 (6180): 320–25. doi:10.1038/334320a0.

Pellizzoni, L, F Lotti, S a Rutjes, and P Pierandrei-Amaldi. 1998. “Involvement of the Xenopus Laevis Ro60 Autoantigen in the Alternative Interaction of La and CNBP Proteins with the 5’UTR of L4 Ribosomal Protein mRNA.” *Journal of Molecular Biology* 281 (4): 593–608. doi:10.1006/jmbi.1998.1961.

Perou, Charles M, T Sørlie, Michael B Eisen, M van de Rijn, Stefanie S Jeffrey, Christian A Rees, Jonathan R Pollack, et al. 2000. “Molecular Portraits of Human Breast Tumours.” *Nature* 406 (6797): 747–52. doi:10.1038/35021093.

Pestova T V, Lomakin I B, Lee J H, Choi S K, Dever T E, and Hellen C U. 2000. “The Joining of Ribosomal Subunits in Eukaryotes Requires eIF5B.” *Nature* 403 (6767): 332–35. doi:10.1038/35002118.

Pichon X, Wilson L, Stoneley M, Bastide A, King H, Somers J, and Willis AE. 2012. “RNA Binding protein/RNA Element Interactions and the Control of Translation.” *Current Protein & Peptide Science* 13 (4): 294–304. doi:10.2174/138920312801619475.

Plo I, Laulier C, Gauthier L, Lebrun F, Calvo F, and Lopez B. 2008. “AKT1 Inhibits Homologous Recombination by Inducing Cytoplasmic Retention of BRCA1 and RAD5.” *Cancer Research* 68 (22): 9404–12. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0861.

Polyak, Kornelia, and Otto Metzger Filho. 2012. “SnapShot: Breast Cancer.” *Cancer Cell* 22 (4). Elsevier: 562–562.e1. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.021.

Popova T, Battistella A, Tarabeux J, Caux-moncoutier V, Golmard L, Vincent-salomon A, Houdayer C, Stoppa-lyonnet D, and Stern MH. 2016. “Genomic Hallmarks of Homologous Recombination Deficiency.” *International Journal of Cancer* 900 (July 2015): 891–900. doi:10.1002/ijc.29829.

Pópulo H, Lopes JM, and Soares P. 2012. “The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer.” *International Journal of Molecular Sciences* 13 (2): 1886–1918. doi:10.3390/ijms13021886.

Poulard C, Bouchekioua-bouzaghou K, Sentis S, Corbo L, and Le Romancer M. 2010. “Les Modifications Traductionnelles Orchestrent L’action Du Récepteur Des Œstrogènes ER a Dans Les Tumeurs Mammaires.” *Meedecine Science* 26: 636–40.

Prat, Karginova, Parker, Fan, Xiaping He, Bixby, Harrell, et al. 2013. “Characterization of Cell Lines Derived from Breast Cancers and Normal Mammary Tissues for the Study of the Intrinsic Molecular Subtypes.” *Breast Cancer Research* 142: 237–55. doi:10.1007/s10549-013-2743-3.

Preiss T and Hentze MW. 1998. “Dual Function of the Messenger RNA Cap Structure in poly(A)-Tail-Promoted Translation in Yeast.” *Nature* 392 (6675): 516–20. doi:10.1038/33192.

Qin, Xiaoli, and Peter Sarnow. 2004. “Preferential Translation of Internal Ribosome Entry Site-Containing mRNAs during the Mitotic Cycle in Mammalian Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (14): 13721–28. doi:10.1074/jbc.M312854200.

Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, and Harkin P. 2003. “BRCA1 Functions as a Differential Modulator of Chemotherapy-Induced Apoptosis.” *Cancer Research* 63 (19): 6221–28. doi:10.1016/S1359-6349(04)80219-2.

Rafels-Ybern, Attolini, and de Pouplana. 2015. “Distribution of ADAT-Dependent Codons in the Human Transcriptome.” *International Journal of Molecular Sciences* 16 (8): 17303–14. doi:10.3390/ijms160817303.

Ramakrishnan, V, Aevarsson A., Brazhnikov E., Garber M., Zheltonosova J., Chirgadze Y., al-Karadaghi S., et al. 2002. “Ribosome Structure and the Mechanism of Translation.” *Cell* 108 (4): 557–72. doi:10.1016/s0092-8674(02)00619-0.

Ramer, Suman, Richter, Stanger, Spranger, Bieberstein, and Duncker. 2013. “Dbf4 and Cdc7 Proteins Promote DNA Replication through Interactions with Distinct Mcm2-7 Protein Subunits.” *Journal of Biological Chemistry* 288 (21): 14926–35. doi:10.1074/jbc.M112.392910.

Ray H, Suau F, Vincent A, and Dalla Venezia N. 2009. “Cell Cycle Regulation of the BRCA1/acetyl-CoA-Carboxylase Complex.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (3). Elsevier Inc.: 615–19. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.090.

Ray H, Moreau K, Dizin E, Callebaut I, and Dalla Venezia N. 2006. “ACCA Phosphopeptide Recognition by the BRCT Repeats of BRCA1.” *Journal of Molecular Biology* 359 (4): 973–82. doi:10.1016/j.jmb.2006.04.010.

Reinhardt HC, Yaffe MB. 2010. “Kinases That Control the Cell Cycle in Response to DNA Damage: Chk1, Chk2, and MK2.” *Curr Opin Cell Biol* 21 (2): 245–55. doi:10.1016/j.ceb.2009.01.018.Kinases.

Resch, Ogurtsov, Rogozin, S Shabalina, and Koonin. 2009. “Evolution of Alternative and Constitutive Regions of Mammalian 5’UTRs.” *BMC Genomics* 10: 162–76. doi:10.1186/1471-2164-10-162.

Richard J. Jackson. 2013. “The Current Status of Vertebrate Cellular mRNA IRESs The Current Status of Vertebrate Cellular mRNA IRESs.” *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (2): 1–20. doi:10.1101/cshperspect.a011569.

Richard J. Jackson, Christopher U.T. Hellen, and Tatyana V. Pestova. 2010. “THE MECHANISM OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION AND PRINCIPLES OF ITS REGULATION.” *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2): 113–27. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035802.

Rieunier, Caux-moncoutier, Tirapo, Popova, and Mani. 2012. “Ploidy and Large-Scale Genomic Instability Consistently Identify Basal-like Breast Carcinomas with BRCA1 / 2 Inactivation.” *Cancer Research* 72 (21): 5454–62. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1470.

Roll-Mecak, Sik Shin, Dever, and Burley. 2001. “Engaging the Ribosome: Universal IFs of Translation.” *Trends in Biochemical Sciences* 26 (12): 705–9. doi:10.1016/S0968-0004(01)02024-2.

Roy, Rohini, Chun, and Powell SN. 2012. “Genome Protection” 12 (1): 68–78. doi:10.1038/nrc3181.BRCA1.

Ruggero Davide. 2013. “Translational Control in Cancer Etiology.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2): 1–27. doi:10.1101/cshperspect.a012336.

Ruggero Davide and Pier Paolo Pandolfi. 2003. “Does the Ribosome Translate Cancer?” *Nature Reviews. Cancer* 3 (3): 179–92. doi:10.1038/nrc1015.

Ruzzene, Di Maira, Tosoni, and Pinna. 2010. “Assessment of CK2 Constitutive Activity in Cancer Cells.” *Methods in Enzymology* 484 (C): 495–514. doi:10.1016/B978-0-12-381298-8.00024-1.

Sachs, Sarnow, and Hentze M W. 1997. “Starting at the Beginning, Middle, and End: Translation Initiation in Eukaryotes.” *Cell* 89 (6): 831–38. doi:10.1016/S0092-8674(00)80268-8.

Safaee, Kozlov, Noronha, Xie, Wilds, and Gehring. 2012. “Interdomain Allostery Promotes Assembly of the Poly(A) mRNA Complex with PABP and eIF4G.” *Molecular Cell* 48 (3). Elsevier Inc.: 375–86. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.001.

Sankaran, Starita, Simons, and Parvin JD. 2006. “Identification of Domains of BRCA1 Critical for the

Ubiquitin-Dependent Inhibition of Centrosome Function." *Cancer Research* 66 (8): 4100–4107. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4430.

Sato T H,Takahashi, Hatakeyama S, Iguchi A, and Ariga T. 2014. "The TRIM-FLMN Protein TRIM45 Directly Interacts with RACK1 and Negatively Regulates PKC-Mediated Signaling Pathway." *Oncogene* 34 (April 2013). Nature Publishing Group: 1–12. doi:10.1038/onc.2014.68.

Savage, Gorski, Barros, Irwin, Manti, Powell, Pellagatti, et al. 2014. "Identification of a BRCA1-mRNA Splicing Complex Required for Efficient DNA Repair and Maintenance of Genomic Stability." *Molecular Cell* 54 (3). The Authors: 445–59. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.021.

Savage K, and Harkin DP. 2015. "BRCA1, a 'Complex' Protein Involved in the Maintenance of Genomic Stability." *FEBS Journal* 282 (4): 630–46. doi:10.1111/febs.13150.

Schneider R, Agol VI, Andino R, Bayard F, Cavener DR, Chappell SA, Chen JJ, Darlix JL, Dasgupta, and Donze O A. 2001. "New Ways of Initiating Translation in Eukaryotes." *Molecular and Cellular Biology* 21 (6): 1899–1907. doi:10.1128/MCB.21.23.8238-8246.2001.

Schuler, M, Connell S R, Lescoute A, Giesebrecht J, Dabrowski M, Schroeer B, Mielke T, Penczek P A, Westhof E, and Spahn C M. 2006. "Structure of the Ribosome-Bound Cricket Paralysis Virus IRES RNA." *Nat Struct Mol Biol* 13 (12): 1092–96. doi:10.1038/nsmb1177.

Scully, Chen, Ochs, Keegan, Hoekstra, Feunteun, and Livingston. 1997. "Dynamic Changes of BRCA1 Subnuclear Location and Phosphorylation State Are Initiated by DNA Damage." *Cell* 90 (3): 425–35. doi:10.1016/S0092-8674(00)80503-6.

Searfoss M, and Wickner R B. 2000. "3' poly(A) Is Dispensable for Translation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (16): 9133–37. doi:10.1073/pnas.97.16.9133.

Sedic M and Kuperwasser C. 2016. "BRCA1-Hapoinsufficiency: Unraveling the Molecular and Cellular Basis for Tissue-Specific Cancer." *Cell Cycle* 4101 (February): 00–00. doi:10.1080/15384101.2016.1141841.

Sénéchal C, Reyal F, Callet N, This P, Noguès C, X Stoppa-Lyonnet D, and Fourme E. 2016. "Que Penser de L'hormonoprévention Du Cancer Du Sein Chez Les Femmes Porteuses D'une Mutation Délétère BRCA1/BRCA2?" *Bulletin Du Cancer* 103 (3). Société Française du Cancer: 273–81. doi:10.1016/j.bulcan.2016.01.001.

Sharma V, Khurana S, Kubben N, Abdelmohsen K, Oberdoerffer P, Gorospe M, and Misteli T. 2015. "A BRCA1-Interacting lncRNA Regulates Homologous Recombination." *EMBO Reports* 16 (11): 1520–34. doi:10.15252/embr.201540437.

Shen, Shan-Xiang, Zoë Weaver, Xiaoling Xu, Cuiling Li, Michael Weinstein, Lin Chen, Xin-Yuan Guan, Ried, and Chu-Xia Deng. 1998. "A Targeted Disruption of the Murine Brca1 Gene Causes γ-Irradiation Hypersensitivity and Genetic Instability." *Oncogene* 17 (24): 3115–24. doi:10.1038/sj.onc.1202243.

Shen, Yang, and Liang Tong. 2008. "Structural Evidence for Direct Interactions between the BRCT Domains of Human BRCA1 and a Phospho-Peptide from Human ACC1." *Biochemistry* 47 (21): 5767–73. doi:10.1021/bi800314m.

Shi J, Kahle A, Hershey J W B, Honchak B M, Warneke J A, Leong S P L, and Nelson M. 2006. "Decreased Expression of Eukaryotic Initiation Factor 3f Deregulates Translation and Apoptosis in Tumor Cells." *Oncogene* 25 (35): 4923–36. doi:10.1038/sj.onc.1209495.

Shibata, Mio, Tomonobu Sato, Ryota Nukiwa, Tadashi Ariga, and Shigetsugu Hatakeyama. 2012.

"TRIM45 Negatively Regulates NF-KB-Mediated Transcription and Suppresses Cell Proliferation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423 (1). Elsevier Inc.: 104–9. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.090.

Shin, Byung-sik, David Maag, Antonina Roll-mecak, M Shamsul Arefin, Stephen K Burley, Jon R Lorsch, and Thomas E Dever. 2002. "Uncoupling of Initiation Factor eIF5B/IF2 GTPase and Translational Activities by Mutationsthat Lower Ribosome Affinity." *Cell* 111: 1015–25.

Shorrocks J, Tobi S, Latham H, Peacock J, Eeles R, Eccles D, and McMillan TJ. 2004. "Primary Fibroblasts from BRCA1 Heterozygotes Display an Abnormal G 1/S Cell Cycle Checkpoint Following UVA Irradiation but Show Normal Levels of Micronuclei Following Oxidative Stress or Mitomycin C Treatment." *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 58 (2): 470–78. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.042.

Shuda, Masahiro, Nobuo Kondoh, Kenji Tanaka, Akihide Ryo, Toru Wakatsuki, Akiyuki Hada, Narihide Goseki, et al. 2000. "Enhanced Expression of Translation Factor mRNAs in Hepatocellular Carcinoma." *Anticancer Research* 20 (4): 2489–94.

Silver DP, and Livingston DM. 2012. "Mechanisms of BRCA1 Tumor Suppression." *Cancer Discovery*. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0221.

Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. 2010. "Translational Control in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 10 (April). Nature Publishing Group: 254–66. doi:10.1101/cshperspect.a012336.

Silvera D, Rezina Arju, Farbod Darvishian, Levine PH, Zolfaghari L, Goldberg J, Hochman T, Formenti Silvia C, and Schneider RJ. 2009. "Essential Role for eIF4GI Overexpression in the Pathogenesis of Inflammatory Breast Cancer." *Nature Cell Biology* 11 (7). Nature Publishing Group: 903–8. doi:10.1038/ncb1900.

Simon, R, Tassan JP, and Richter JD. 1992. "Translational Control by poly(A) Elongation during Xenopus Development: Differential Repression and Enhancement by a Novel Cytoplasmic Polyadenylation Element." *Genes and Development* 6 (12 B): 2580–91. doi:10.1101/gad.6.12b.2580.

Singletary SE. 2003. "Rating the Risk Factors for Breast Cancer." *Annals of Surgery* 237 (4): 474–82. doi:10.1097/01.SLA.0000059969.64262.87.

Skol, Andrew D, Mark M Sasaki, and Kenan Onel. 2016. "The Genetics of Breast Cancer Risk in the Post-Genome Era: Thoughts on Study Design to Move Past BRCA and towards Clinical Relevance." *Breast Cancer Research : BCR* 18 (1). Breast Cancer Research: 99. doi:10.1186/s13058-016-0759-4.

Smith, Lee, Szabo, Mceuen, Taylor, Hood, and King. 1996. "Complete Genomic Sequence and Analysis of 117 Kb of Human DNA Containing the Gene BRCA1." *Genome Research* 6: 1029–49. doi:10.1101/gr.6.11.1029.

Sobczak, Krzysztof, and Wlodzimierz J. Krzyzosiak. 2002. "Structural Determinants of BRCA1 Translational Regulation." *Journal of Biological Chemistry* 277 (19): 17349–58. doi:10.1074/jbc.M109162200.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T et al. 2001. "Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19): 10869–74. doi:10.1073/pnas.191367098.

Spriggs, Stoneley, Bushell, and Willis. 2008. "Re-Programming of Translation Following Cell Stress Allows IRES-Mediated Translation to Predominate." *Biology of the Cell* 100 (1): 27–38.

doi:10.1042/BC20070098.

Staff, Synnöve, Isola, and Tanner. 2003. “Haplo-Insufficiency of BRCA1 in Sporadic Breast Cancer.” *Cancer Research* 63 (16): 4978–83.

Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor MR, and Elledge SJ. 2003. “MDC1 Is a Mediator of the Mammalian DNA Damage Checkpoint.” *Nature* 421 (2000): 961–66. doi:10.1038/nature01446.

Stoneley M, Subkhankulova T, Le Quesne J P, Coldwell M J, Jopling C L, Belsham G J, and Willis AE. 2000. “Analysis of the c-Myc IRES; a Potential Role for Cell-Type Specific Trans-Acting Factors and the Nuclear Compartment.” *Nucleic Acids Research* 28 (3): 687–94. doi:10.1093/nar/28.3.687.

Stoneley M and Willis AE. 2004. “Cellular Internal Ribosome Entry Segments: Structures, Trans-Acting Factors and Regulation of Gene Expression.” *Oncogene* 23 (18): 3200–3207. doi:10.1038/sj.onc.1207551.

Swords R, Mahalingam D, O’Dwyer M, Santocanale C, Kelly K, Carew J, and Giles F. 2010. “Cdc7 Kinase - A New Target for Drug Development.” *European Journal of Cancer* 46 (1). Elsevier Ltd: 33–40. doi:10.1016/j.ejca.2009.09.020.

Takeuchi N, Vial L, Panvert M, Schmitt E, Watanabe K, Mechulam Y, and Blanquet S. 2001. “Recognition of tRNAs by Methionyl-tRNA Transformylase from Mammalian Mitochondria.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (23): 20064–68. doi:10.1074/jbc.M101007200.

Tarun, S Z, and A B Sachs. 1996. “Association of the Yeast poly(A) Tail Binding Protein with Translation Initiation Factor eIF-4G.” *The EMBO Journal* 15 (24): 7168–77. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Tc, Suen, Tang Ms, and Goss Pe. 2005. “Model of Transcriptional Regulation.” *Biochim Biophys Acta* 1728 (3): 126–34.

Tcherkezian J, J Cargnello M, Romeo Y, Huttlin E L, Lavoie G, Gygi SP, and Roux P. 2014. “Proteomic Analysis of Cap-Dependent Translation Identifies LARP1 as a Key Regulator of 5’TOP mRNA Translation.” *Genes and Development* 28 (4): 357–71. doi:10.1101/gad.231407.113.

Tejada S, M Val T Lobo, García-Villanueva M, Sacristán S, Pérez-Morgado M I, Salinas M, and Martín M E. 2009. “Eukaryotic Initiation Factors (eIF) 2alpha and 4E Expression, Localization, and Phosphorylation in Brain Tumors.” *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 57 (5): 503–12. doi:10.1369/jhc.2009.952929.

Tenca, Brotherton, Montagnoli, Rainoldi, Albanese, and Santocanale. 2007. “Cdc7 Is an Active Kinase in Human Cancer Cells Undergoing Replication Stress.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (1): 208–15. doi:10.1074/jbc.M604457200.

Terenin, Ilya M., Smirnova V, Andreev DE, Dmitriev S, and Shatsky IN. 2016. “A Researcher’s Guide to the Galaxy of IRESs.” *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 1–25. doi:10.1007/s00018-016-2409-5.

Thakur, Sanjay, Hong Bing Zhang, Y Peng, H Le, Bryan Carroll, Theresa Ward, J Yao, et al. 1997. “Localization of BRCA1 and a Splice Variant Identifies the Nuclear Localization Signal.” *Molecular and Cellular Biology* 17 (1): 444–52. doi:10.1128/MCB.17.1.444.

Thomas JE, Smith M, Rubinfeld B, Gutowski M, Beckmann RP, and Polakis P. 1996. “Subcellular Localization and Analysis of Apparent 180-kDa and 220- kDa Proteins of the Breast Cancer Susceptibility Gene , BRCA1” 271 (45): 28630–35.

Thomas, Jeff D, and Gregg J Johannes. 2007. “Identification of mRNAs That Continue to Associate with Polysomes during Hypoxia.” *RNA (New York, N.Y.)* 13 (7): 1116–31. doi:10.1261/rna.534807.

Thompson, Marilyn E, Cheryl L. Robinson-Benion, and Jeffrey T Holt. 2005. “An Amino-Terminal Motif Functions as a Second Nuclear Export Sequence in BRCA1.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (23): 21854–57. doi:10.1074/jbc.M502676200.

Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, and Sabatini DM. 2012. “A Unifying Model for mTORC1-Mediated Regulation of mRNA Translation.” *Nature* 485 (7396): 109–13. doi:10.1038/nature11083.A.

Torres, Adrian Gabriel, Eduard Batlle, and Lluis Ribas de Pouplana. 2014. “Role of tRNA Modifications in Human Diseases.” *Trends in Molecular Medicine* 20 (6). Elsevier Ltd: 306–14. doi:10.1016/j.molmed.2014.01.008.

Toshiya Tsuji, Eric Lau, Gary G. Chiang, and Wei Jiang. 2008. “Damage Checkpoint Control.” *Molecular Carcinogenesis* 32 (6): 862–69. doi:10.1016/j.molcel.2008.12.005.The.

Tritschler, Felix, Eric Huntzinger, and Elisa Izaurralde. 2010. “Role of GW182 Proteins and PABPC1 in the miRNA Pathway: A Sense of Déjà Vu.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (5). Nature Publishing Group: 379–84. doi:10.1038/nrm2885.

Tsutsumi, Satoshi, Reiko Sugiura, Yan Ma, Hideki Tokuoka, Kazuki Ohta, Rieko Ohte, Akiko Noma, Tsutomu Suzuki, and Takayoshi Kuno. 2007. “Wobble Inosine tRNA Modification Is Essential to Cell Cycle Progression in G1/S and G2/M Transitions in Fission Yeast.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (46): 33459–65. doi:10.1074/jbc.M706869200.

Van Berckelaer, C., A. J. Brouwers, D. J E Peeters, W. Tjalma, X. B. Trinh, and P. A. van Dam. 2016. “Current and Future Role of Circulating Tumor Cells in Patients with Epithelial Ovarian Cancer.” *European Journal of Surgical Oncology* 42 (12). Elsevier Ltd: 1772–79. doi:10.1016/j.ejso.2016.05.010.

Venkitaraman Ashok R. 2009. “Linking the Cellular Functions of BRCA Genes to Cancer Pathogenesis and Treatment.” *Annual Review of Pathology* 4: 461–87. doi:10.1146/annurev.pathol.3.121806.151422.

Venkitaraman Ashok R. 2014. “Cancer Suppression by the Chromosome Custodians, BRCA1 and BRCA2.” *Science* 343 (6178): 1470. doi:10.1126/science.1252230.

Veras I, Rosen EM, and Schramm L. 2009. “Inhibition of RNA Polymerase III Transcription by BRCA1.” *Journal of Molecular Biology* 387 (3). Elsevier Ltd: 523–31. doi:10.1016/j.jmb.2009.02.008.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu V E, Zhou S, Diaz L, and Kinzler KW. 2013. “Cancer Genome Lanscapes.” *Science* 339 (6127): 1546–58. doi:10.1126/science.1235122.Cancer.

Wahle. 1991. “Erratum: A Novel poly(A)-Binding Protein Acts as a Specificity Factor in the Second Phase of Messenger RNA Polyadenylation (Cell (1991) 66 (759-768)).” *Cell* 67 (3): 640. doi:10.1016/0092-8674(91)90537-9.

Wang, Bin, Shuhei Matsuoka, Bryan A Ballif, Dong Zhang, Agata Smogorzewska, Steven Giyi, Stephen J Elledge, S P Gygi, and Stephen J Elledge. 2013. “Abraxas and Rap80 Form a Novel BRCA1 Protein Complex Required for the DNA Damage Response.” *Science* 316 (5828): 1194–98. doi:10.1126/science.1139476.Abraxas.

Wang, Hong, Eddy S. Yang, Juhong Jiang, Somaira Nowsheen, and Fen Xia. 2010. “DNA Damage-Induced Cytotoxicity Is Dissociated from BRCA1’s DNA Repair Function but Is Dependent on Its

Cytosolic Accumulation." *Cancer Research* 70 (15): 6258–67. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4713.

Wang, Hui Chun, Wen Cheng Chou, Sheau Yann Shieh, and Chen Yang Shen. 2006. "Ataxia Telangiectasia Mutated and Checkpoint Kinase 2 Regulate BRCA1 to Promote the Fidelity of DNA End-Joining." *Cancer Research* 66 (3): 1391–1400. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3270.

Wang, Qinhong, and Michael Goldstein. 2016. "Small RNAs Recruit Chromatin-Modifying Enzymes MMSET and Tip60 to Reconfigure Damaged DNA upon Double-Strand Break and Facilitate Repair." *Cancer Research* 76 (7): 1904–15. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2334.

Wang S, Rosenwald I B, Hutzler M J, Pihan G , Savas L, Chen J J, and Woda B. 1999. "Expression of the Eukaryotic Translation Initiation Factors 4E and 2alpha in Non-Hodgkin's Lymphomas." *The American Journal of Pathology* 155 (1): 247–55. doi:S0002-9440(10)65118-8 [pii].

Wang, Yuequn, Yongqing Li, Xinzhu Qi, Wuzhou Yuan, Jianping Ai, Chuanbing Zhu, Lei Cao, et al. 2004. "TRIM45, a Novel Human RBCC/TRIM Protein, Inhibits Transcriptional Activities of ElK-1 and AP-1." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323 (1): 9–16. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.048.

Weingarten-Gabbay, S, D Khan, N Liberman, Y Yoffe, S Bialik, S Das, M Oren, and A Kimchi. 2013. "The Translation Initiation Factor DAP5 Promotes IRES-Driven Translation of p53 mRNA." *Oncogene* 33626 (5). Nature Publishing Group: 611–18. doi:10.1038/onc.2012.626.

Weingarten-Gabbay, Shira, Shani Elias-Kirma, Ronit Nir, Alexey A Gritsenko, Noam Stern-Ginossar, Zohar Yakhini, Adina Weinberger, and Eran Segal. 2016. "Systematic Discovery of Cap-Independent Translation Sequences in Human and Viral Genomes." *Science* 351 (6270): 1–24. doi:10.1126/science.aad4939.

Williams, R Scott, Ruth Green, and J N Glover. 2001. "Crystal Structure of the BRCT Repeat Region from the Breast Cancer-Associated Protein BRCA1." *Nature Structural Biology* 8 (10): 838–42. doi:10.1038/nsb1001-838.

Wu, LC, ZW Wang, JT Tsan, MA Spillman, A Phung, XL Xu, MC Yang, LY Hwang, AM Bowcock, and R Baer. 1996. "Identification of a RING Protein That Can Interact in Vitro with the BRCA1 Gene Product." *Nat Genet.* 14 (4): 430–40. doi:10.1038/ng0496-417.

Wu, Qian, Harry Jubb, and Tom L Blundell. 2015. "Phosphopeptide Interactions with BRCA1 BRCT Domains: More than Just a Motif." *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.003.

Xiong, Jingbo, Saijun Fan, Qinghui Meng, Laura Schramm, Chenguang Wang, Boumedienne Bouzahza, Jinnian Zhou, et al. 2003. "BRCA1 Inhibition of Telomerase Activity in Cultured Cells." *Molecular and Cellular Biology* 23 (23): 8668–90. doi:10.1128/MCB.23.23.8668.

Xu, Bo, Seong-tae Kim, Dae-sik Lim, and Michael B Kastan. 2002. "Two Molecularly Distinct G(2)/M Checkpoints Are Induced by Ionizing Irradiation." *Molecular and Cellular Biology* 22 (4): 1049–59. doi:10.1128/MCB.22.4.1049.

Xu, C F, Chambers J, and Ellen Solomon. 1997. "Complex Regulation of the BRCA1 Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (34): 20994–97. doi:10.1074/jbc.272.34.20994.

Xu, Brown, Chambers J, Griffiths, Nicolai, and Solomon E. 1995. "Distinct Transcription Start Sites Generate Two Forms of *BRCA1* mRNA." *Human Molecular Genetics* 4 (12): 2259–64. doi:10.1093/hmg/4.12.2259.

Xu X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, Hennighausen L, Wynshaw-Boris A, and Chu-Xia

Deng. 1999. “Conditional Mutation of Brca1 in Mammary Epithelial Cells Results in Blunted Ductal Morphogenesis and Tumour Formation.” *Nature Genetics* 22 (1): 37–43. doi:10.1038/8743.

Yan Y, Haas JP, Kim M, Sgagias MK, and Cowan KH. 2002. “BRCA1-Induced Apoptosis Involves Inactivation of ERK1/2 Activities.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 33422–30. doi:10.1074/jbc.M201147200.

Yang ES and Xia F. 2010. “BRCA1 16 Years Later: DNA Damage-Induced BRCA1 Shuttling.” *FEBS Journal* 277 (15): 3079–85. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07734.x.

Yang, Lianjun, Nan Li, Chunmei Wang, Yizhi Yu, Liang Yuan, Minghui Zhang, and Xuetao Cao. 2004. “Cyclin L2, a Novel RNA Polymerase II-Associated Cyclin, Is Involved in Pre-mRNA Splicing and Induces Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (12): 11639–48. doi:10.1074/jbc.M312895200.

Yarden, Ronit I, Sherly Pardo-Reoyo, Magda Sgagias, Kenneth H Cowan, and Lawrence C Brody. 2002. “BRCA1 Regulates the G2/M Checkpoint by Activating Chk1 Kinase upon DNA Damage.” *Nature Genetics* 30 (3): 285–89. doi:10.1038/ng837.

Yoshizawa-Sugata, Naoko, Ai Ishii, Chika Taniyama, Etsuko Matsui, Ken Ichi Arai, and Hisao Masai. 2005. “A Second Human Dbf4/ASK-Related Protein, Drf1/ASKL1, Is Required for Efficient Progression of S and M Phases.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (13): 13062–70. doi:10.1074/jbc.M411653200.

Zannini, Delia, and Buscemi. 2014. “CHK2 Kinase in the DNA Damage Response and beyond.” *Journal of Molecular Cell Biology* 6 (6): 442–57. doi:10.1093/jmcb/mju045.

Zebisch, A., and J. Troppmair. 2006. “Back to the Roots: The Remarkable RAF Oncogene Story.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (11): 1314–30. doi:10.1007/s00018-006-6005-y.

Zeidner, Leigh C., Buescher, and Phiel C. 2011. “A Novel Interaction between Glycogen Synthase Kinase-3α (GSK-3α) and the Scaffold Protein Receptor for Activated C-Kinase 1 (RACK1) Regulates the Circadian Clock.” *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2 (4): 318–27. doi:10.1074/jbc.C000881200.

Zhan, Qimin, Shunqian Jin, Bobby Ng, Jordan Plisket, Sanjeev Shangary, Abhilasha Rathi, Kevin D Brown, and Rajasekaran Baskaran. 2002. “Caspase-3 Mediated Cleavage of BRCA1 during UV-Induced Apoptosis.” *Oncogene* 21 (34): 5335–45. doi:10.1038/sj.onc.1205665.

Zheng, Lei, Hongyi Pan, Shang Li, Andrea Flesken-Nikitin, Phang-Lang Chen, Thomas G Boyer, and Wen-Hwa Lee. 2000. “Sequence-Specific Transcriptional Corepressor Function for BRCA1 through a Novel Zinc Finger Protein, ZBRK1.” *Molecular Cell* 6 (4): 757–68. doi:10.1016/S1097-2765(00)00075-7.