

Thèse de Doctorat

---

Régulation du facteur de réplication de l'ADN MCM7  
par poly-ubiquitinylation :  
rôles d'Int6 et de BRCA1

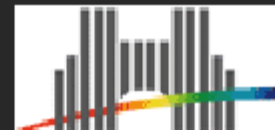
---

Par Samuel BUCHSBAUM

Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule

Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrée et Cognitive



1. Introduction : intégrité du génome et réplication
2. Chapitre 1 : MCM7 et l'oncoprotéine virale TAX
3. Chapitre 2 : régulation de MCM7 par Int6
4. Chapitre 3 : régulation de MCM7 par BRCA1
5. Conclusion

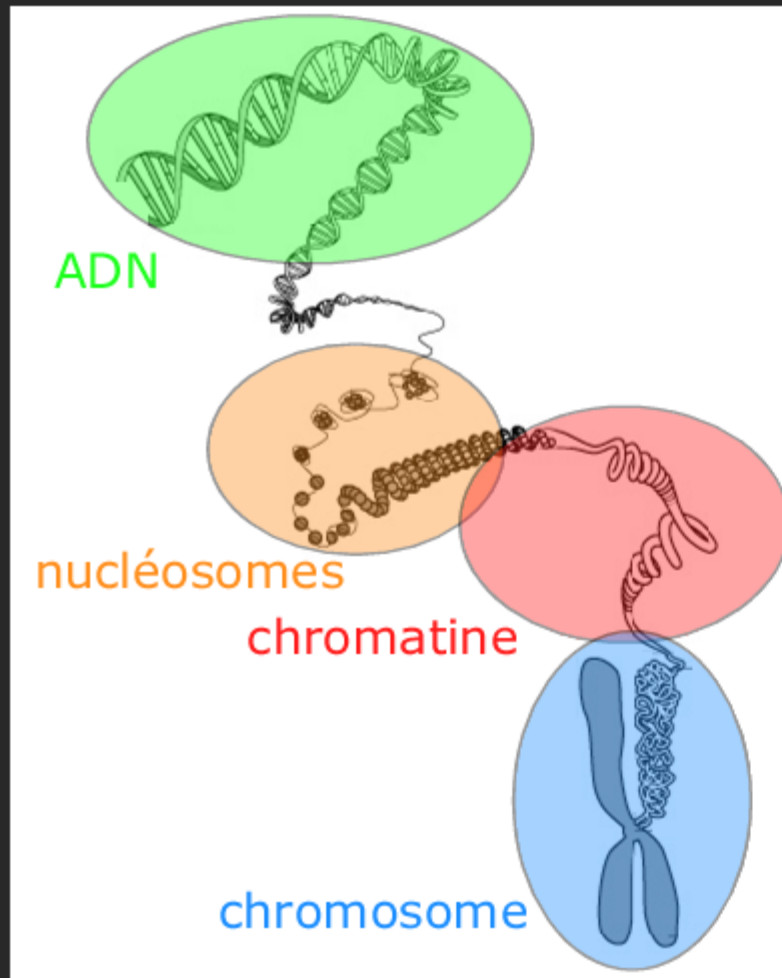
## Diversité du vivant



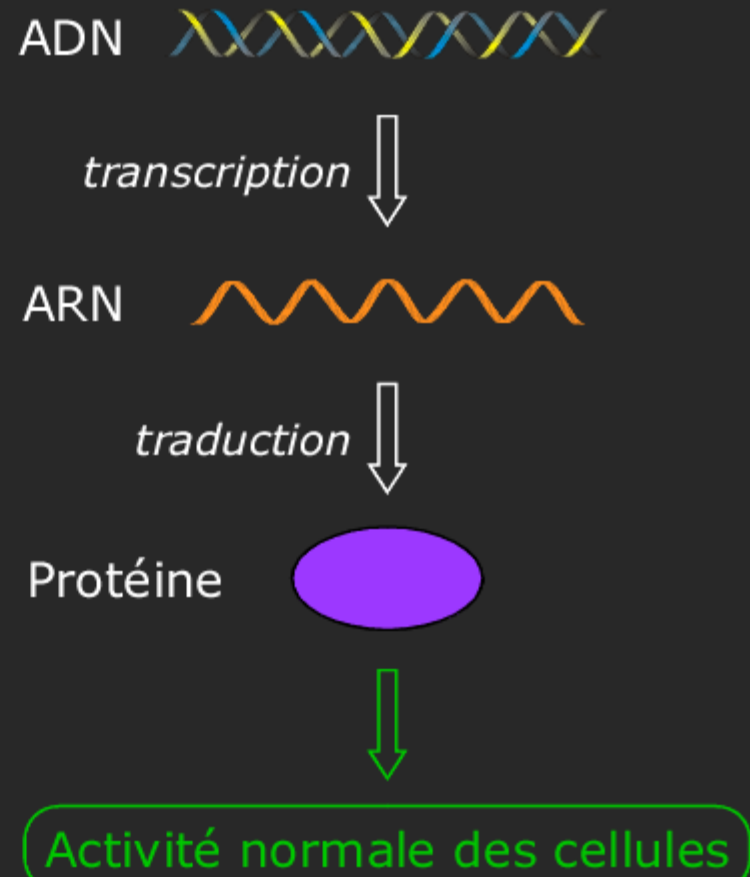
→ A la base de cette diversité : l'**ADN**

## Le génome : structure et fonction

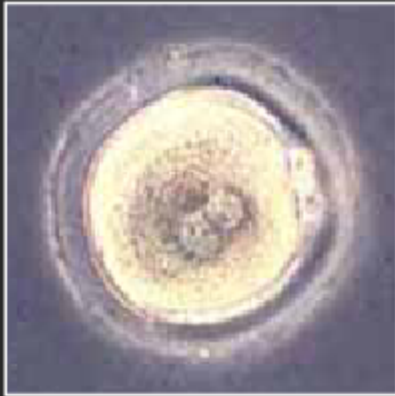
### Structure :



### Fonction :



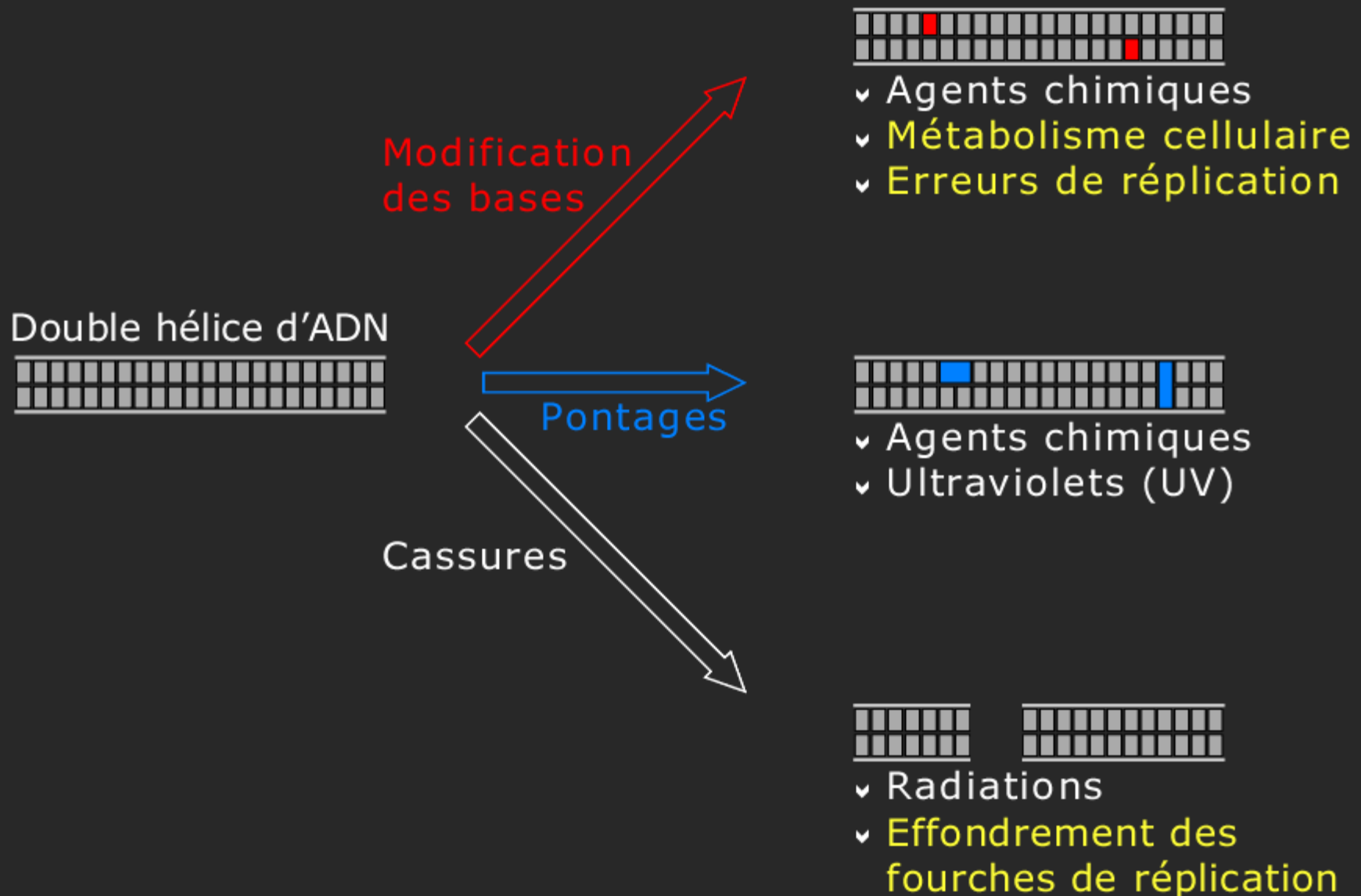
## Le génome : primordial mais fragile



Des milliards de divisions cellulaires  
Des milliards d'attaques génotoxiques

- Développement normal de l'organisme :
  - ✓ Réparation immédiate des lésions de l'ADN
  - ✓ Réplication complète et fidèle du génome avant la mitose
  - ✓ Répartition correcte des chromosomes entre les cellules filles
- Sinon : accumulation d'erreurs, transformation cellulaire, oncogenèse

## Lésions de l'ADN : des causes multiples



## Lésions de l'ADN : prise en charge



Apparition de la lésion

Mort cellulaire (apoptose)



Détection de la lésion

Arrêt du cycle cellulaire  
(points de contrôle)

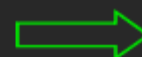


Réparation de la lésion



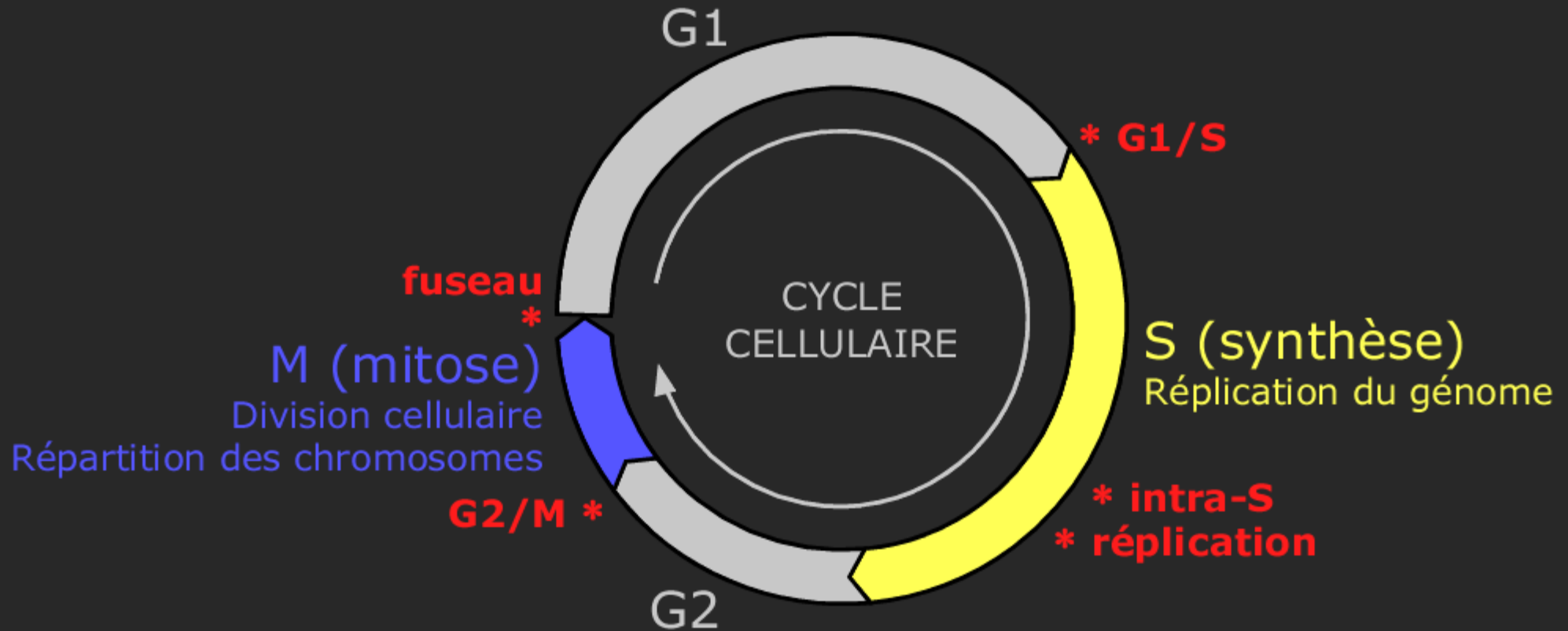
Lésion éliminée

Reprise du cycle cellulaire



Le cycle cellulaire : dupliquer et répartir le génome

- La vie d'une cellule en division : 4 phases



- Erreurs dans le génome

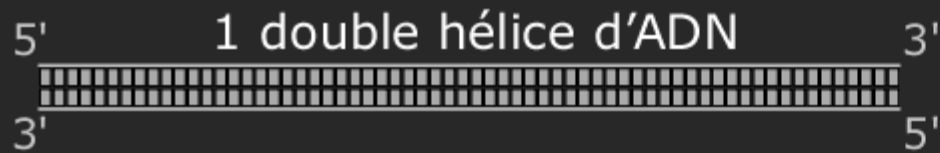
→ Points de contrôle



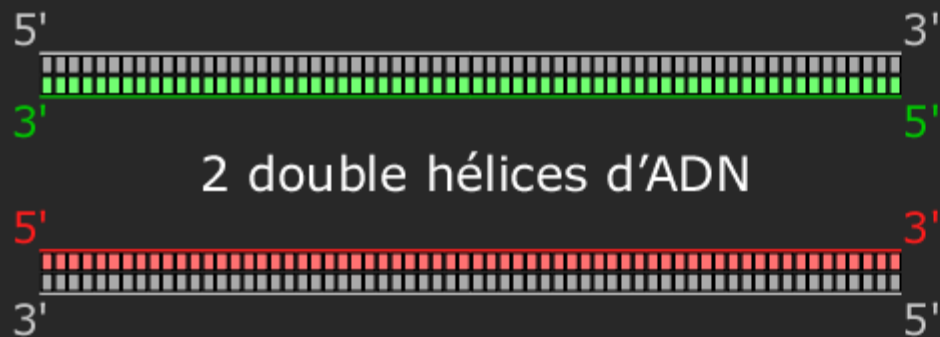
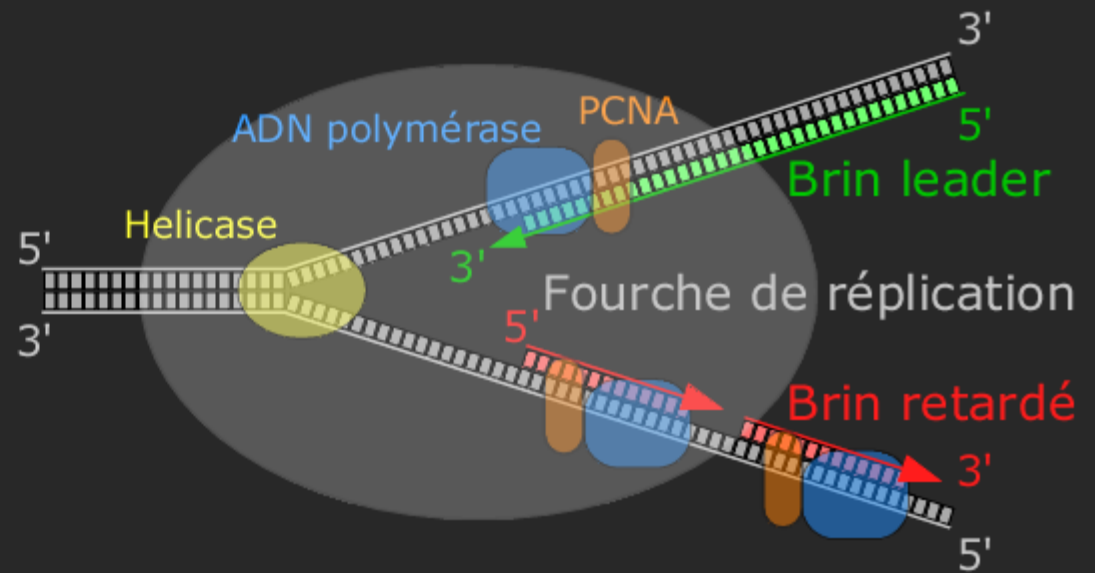
Arrêt du cycle cellulaire



## Réplication de l'ADN



Ouverture de la double hélice puis copie de chaque brin

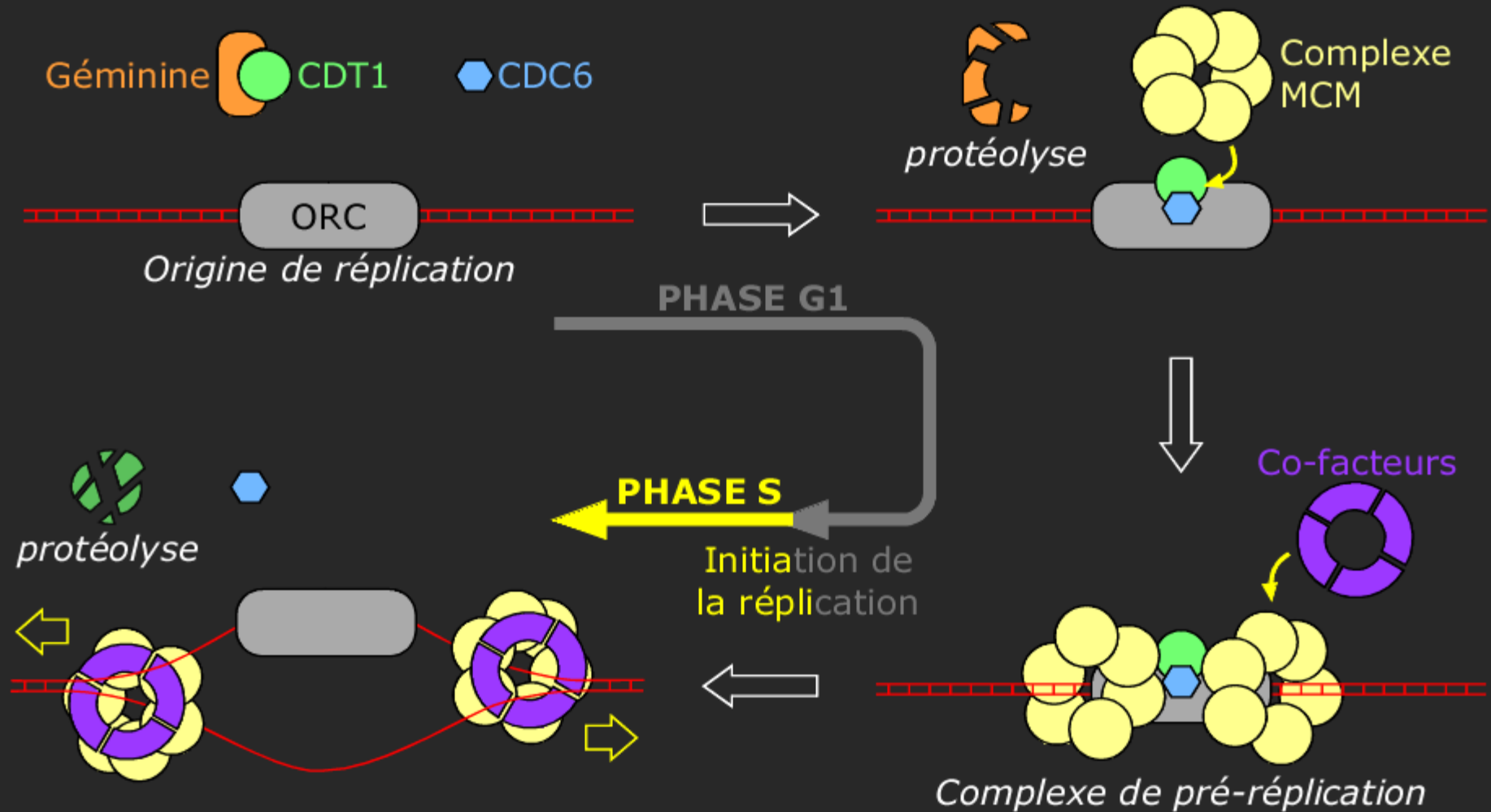




## Importance des fourches de réplication

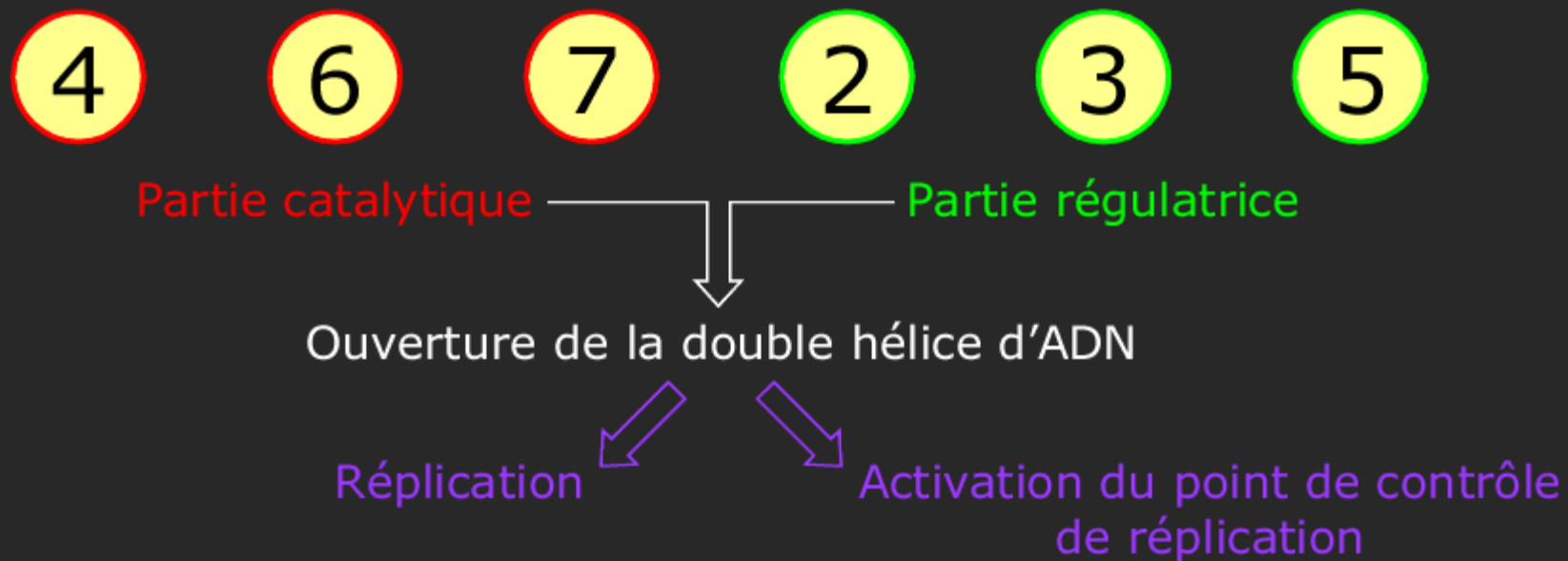
- Réplication complète et fidèle du génome
  - Détection et prise en charge des lésions de l'ADN :
    - ✓ Arrêt du cycle cellulaire
    - ✓ Réparation de la lésion
- Les fourches de réplication maintiennent l'intégrité du génome

## Mise en place des fourches de réplication



## Le complexe MCM

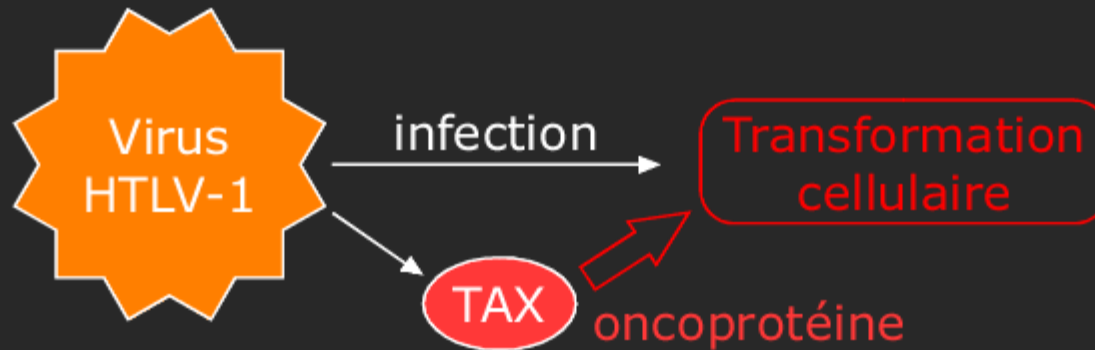
- Constitué de 6 sous unités MCM
- Participe à l'autorisation de la réplication
- Doté d'une activité ADN hélicase :



→ Le complexe MCM contribue au maintien de l'intégrité génomique

## Evolution de la thématique de notre laboratoire

- Thématique initiale de l'équipe : étude du virus HTLV-1



- Identification de partenaires cellulaires de TAX :

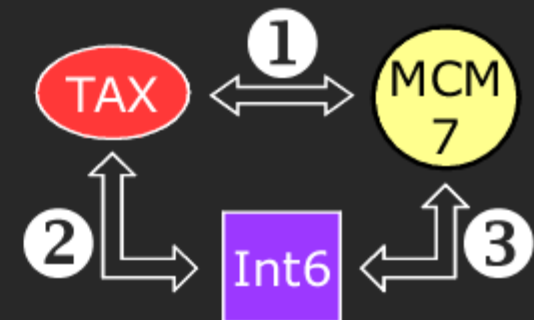
Double hybride dans la levure *S. cerevisiae*

→ ① MCM7 puis ② Int6

- Recherche de partenaires d'Int6 (double hybride)

→ ③ MCM7

→ mon sujet de départ : effets de TAX et d'Int6 sur l'activité de MCM7



## Sujet de thèse



- MCM7 participe à l'activité catalytique du complexe MCM (ADN hélicase)
- MCM7 est impliquée dans l'activation du point de contrôle de réplication :
  - ✓ Activité hélicase → ADN simple brin + RPA
  - ✓ Interaction avec des médiateurs du point de contrôle
- Régulation de MCM7 lors du métabolisme de l'ADN ?
  - ✓ Réplication : TAX (chapitre 1) et Int6 (chapitre 2)
  - ✓ Réparation de l'ADN : BRCA1 (chapitre 3)

1. Introduction : intégrité du génome et réplication
2. Chapitre 1 : MCM7 et l'oncoprotéine virale TAX
3. Chapitre 2 : régulation de MCM7 par Int6
4. Chapitre 3 : régulation de MCM7 par BRCA1
5. Conclusion



## Activités oncogéniques de TAX

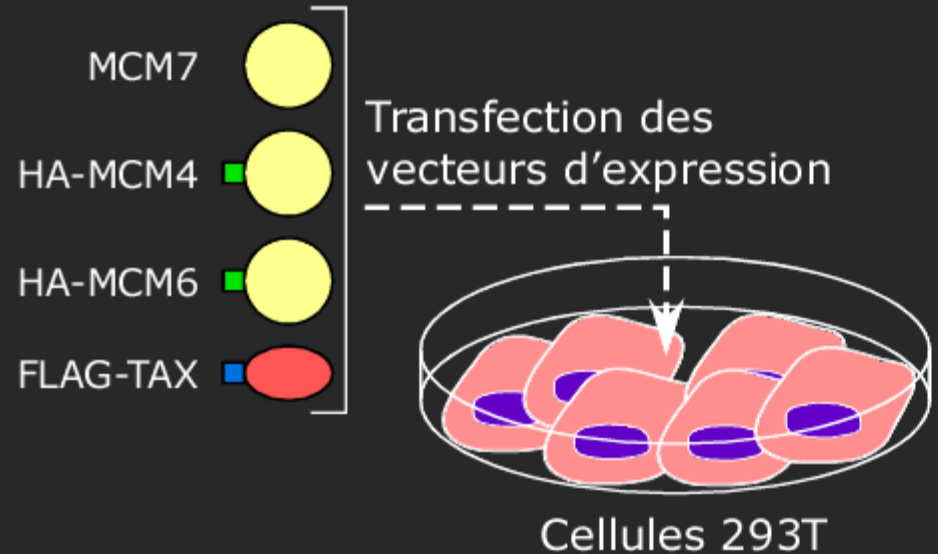
- L'infection des lymphocytes T par HTLV-1 conduit dans 5% des cas à une leucémie
- TAX est responsable de la transformation cellulaire induite par HTLV-1:
  - ✓ Dérégulation de la réparation de l'ADN
  - ✓ Dérégulation des points de contrôle du cycle cellulaire
- TAX interagit avec MCM7 en double hybride
- Confirmation de l'interaction *in vivo* :



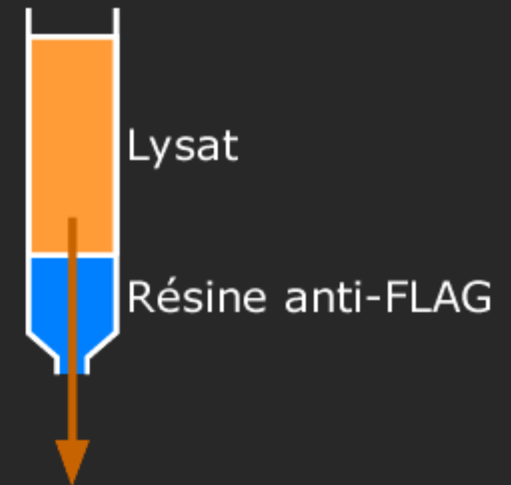
La réplication de l'ADN est-elle dérégulée par TAX lors de la transformation cellulaire ?

TAX interagit avec le sous complexe catalytique MCM4,6,7

Surexpression :



Chromatographie :

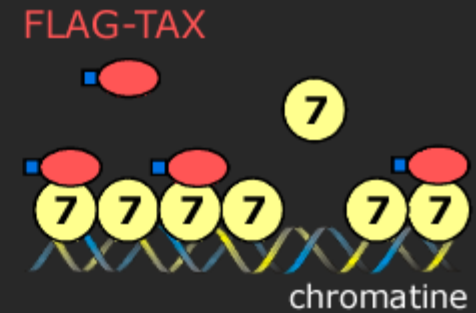
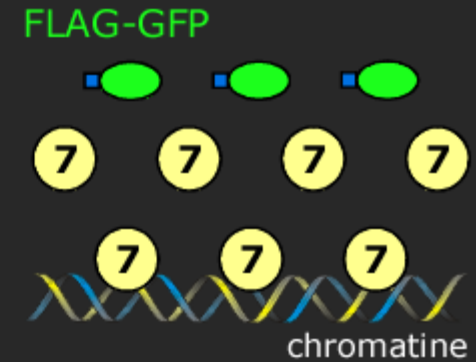
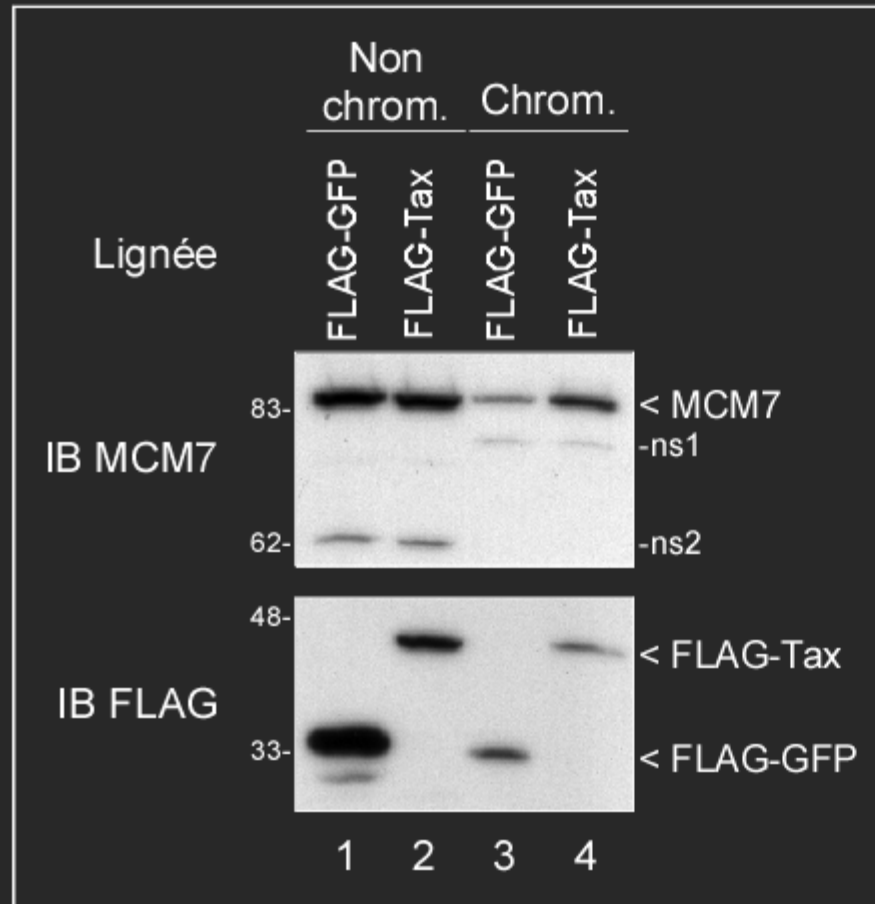


Effet de Tax sur l'activité hélicase du complexe MCM ?



## Caractérisation d'une lignée cellulaire [FLAG-TAX] (1)

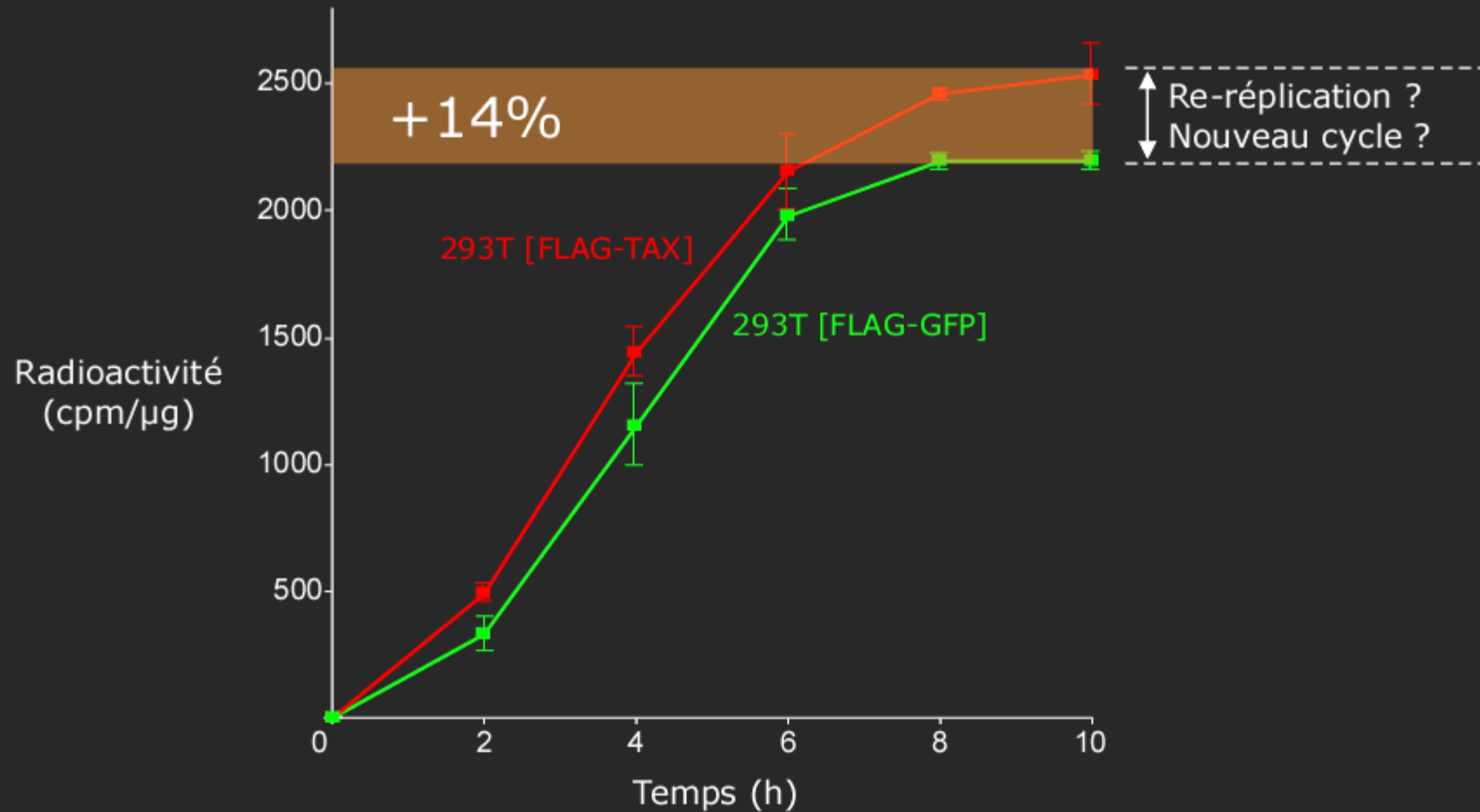
### Fractionnement subcellulaire



→ Tax augmente le niveau chromatinien de MCM7

## Caractérisation d'une lignée cellulaire [FLAG-TAX] (2)

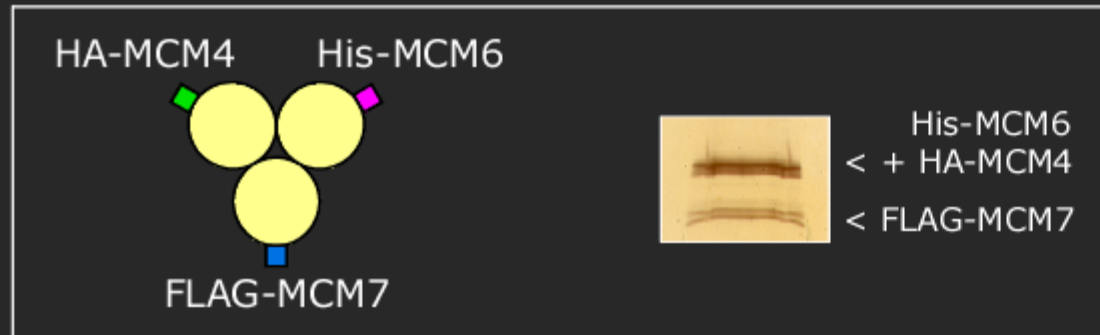
Incorporation de thymidine tritiée (lignées synchronisées à G1/S)



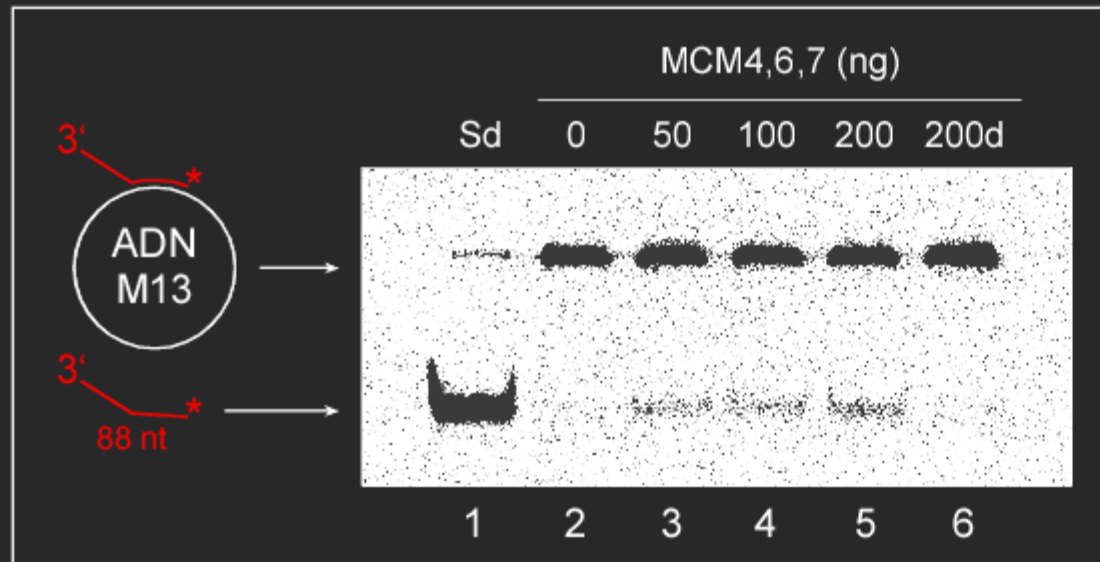
→ Tax stimule la réplication. Via l'activité hélicase du complexe MCM ?

Effet de Tax sur l'activité hélicase des MCM : mise au point d'un test

Production en cellules d'insecte du sous complexe MCM4,6,7



Test d'activité hélicase *in vitro*



→ Activité faible, optimisation requise

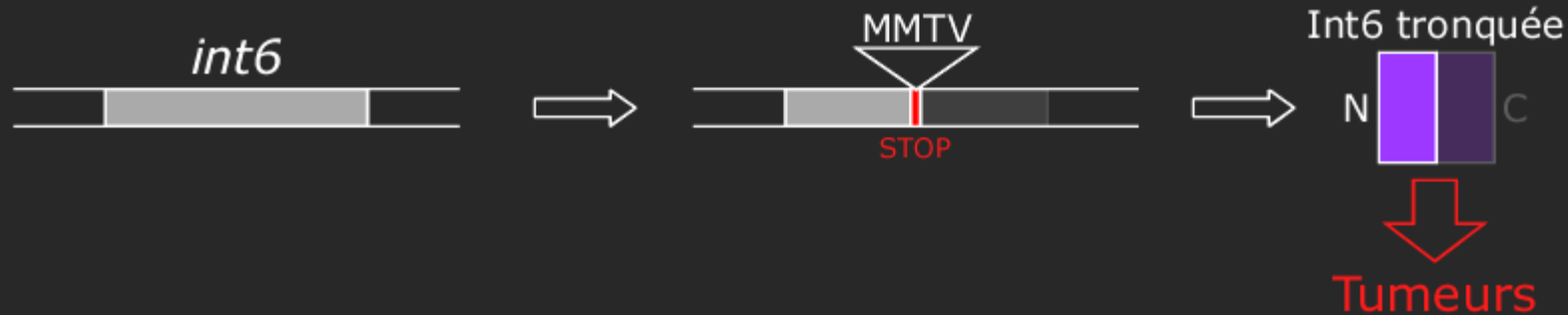
## Conclusion et perspectives

- TAX interagit avec le complexe MCM via MCM7
- TAX stabilise MCM7 sur la chromatine
- TAX stimule l'incorporation de thymidine dans l'ADN
  - Ces résultats évoquent un effet de TAX sur la réplication
- MAIS : Travaux réalisés alors qu'on ne connaissait pas la fonction de MCM7 dans la surveillance du génome
  - TAX est-elle capable de déréguler l'activation du point de contrôle de réplication en interagissant avec MCM7 ?

1. Introduction : intégrité du génome et réplication
2. Chapitre 1 : MCM7 et l'oncoprotéine virale TAX
3. Chapitre 2 : régulation de MCM7 par Int6
4. Chapitre 3 : régulation de MCM7 par BRCA1
5. Conclusion

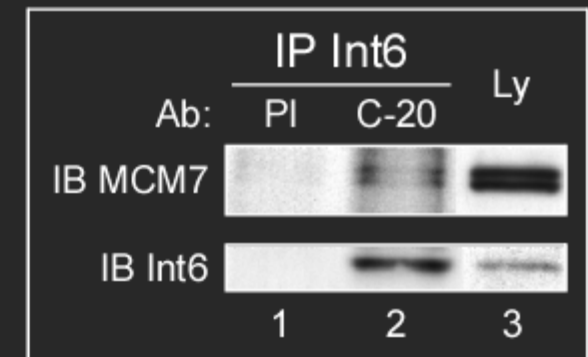
## Présentation d'Int6

- *int6* = " integration site 6", site d'insertion du virus MMTV



- L'expression d'Int6 est diminuée dans 30% des tumeurs mammaires humaines
- La déplétion d'Int6 entraîne des événements de catastrophes mitotiques
- Int6 interagit avec MCM7 en double hybride
- Confirmation de l'interaction Int6 - MCM7 *in vivo* :

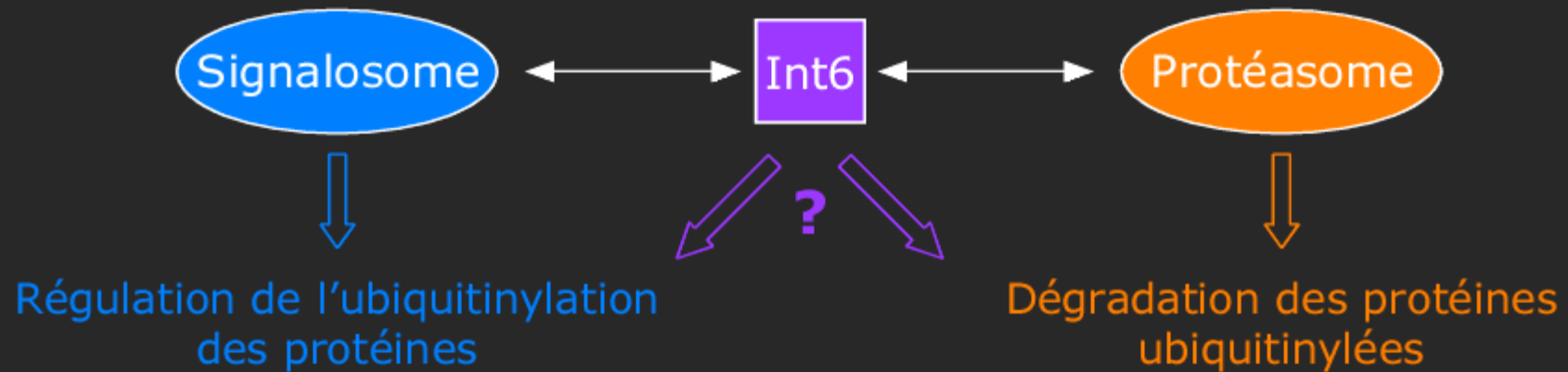
→ Caractérisation de l'interaction Int6 - MCM7





## Int6 et l'ubiquitinylation des protéines

- Int6 interagit avec le signalosome et le protéasome :



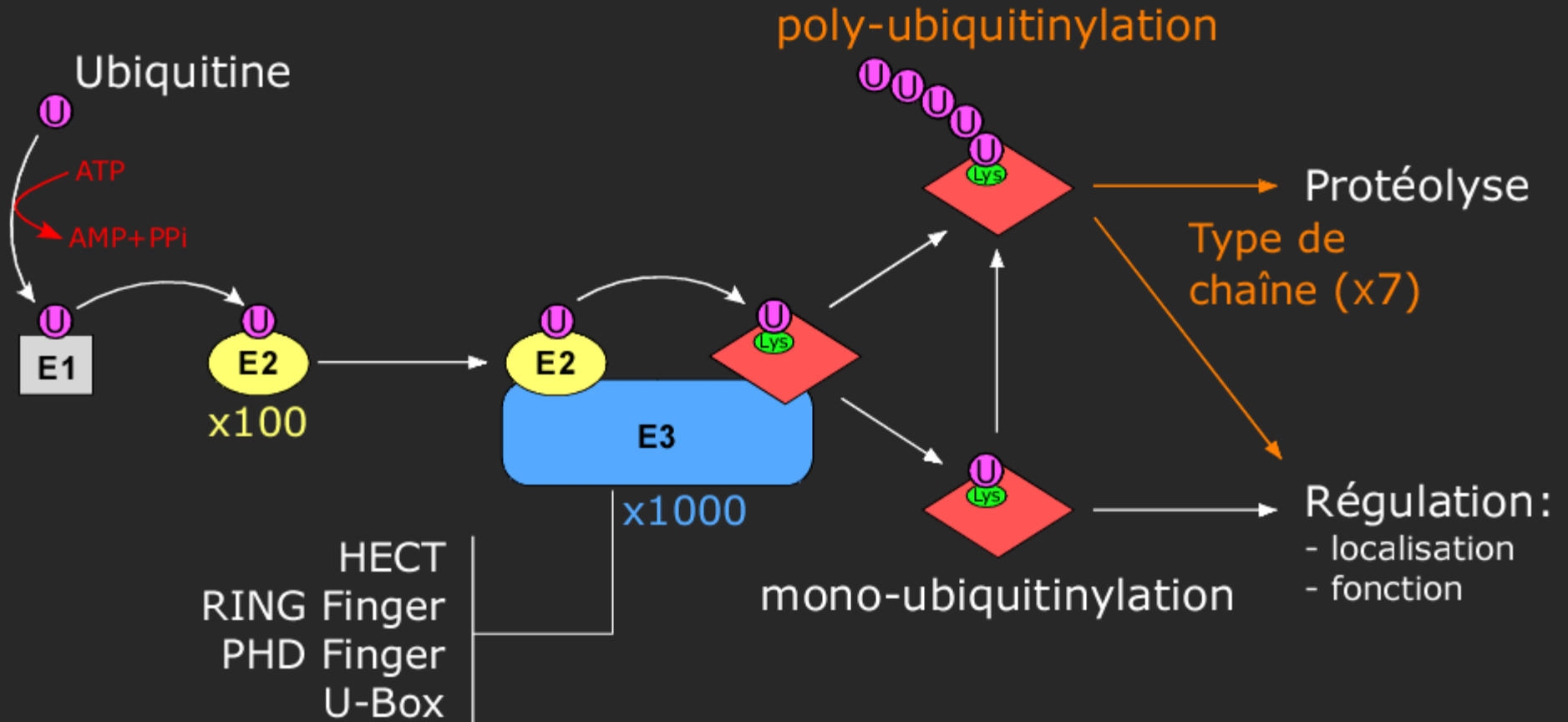
- Nombre de protéines actives aux fourches de réplication sont ubiquitinylées

→ MCM7 est-elle ubiquitinylée ?

→ Int6 régule-t-elle l'ubiquitinylation et/ou la dégradation de MCM7 ?

## Ubiquitinylation des protéines

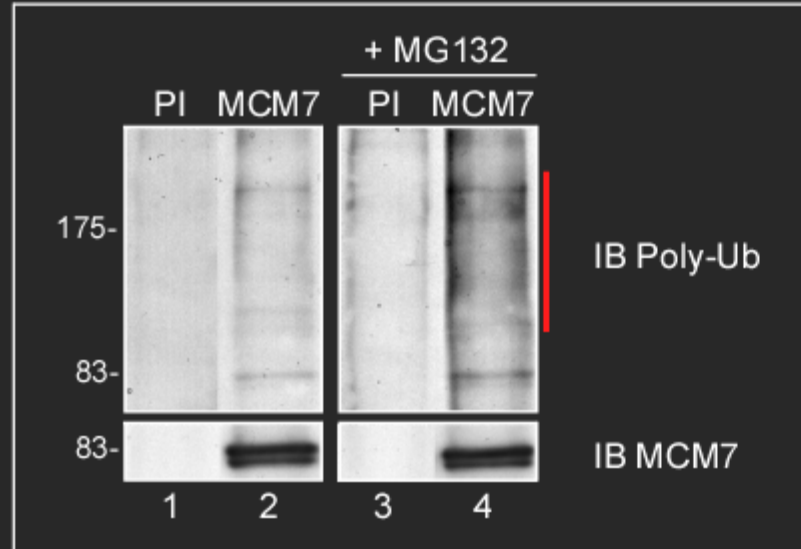
Ubiquitinylation = modification post-traductionnelle



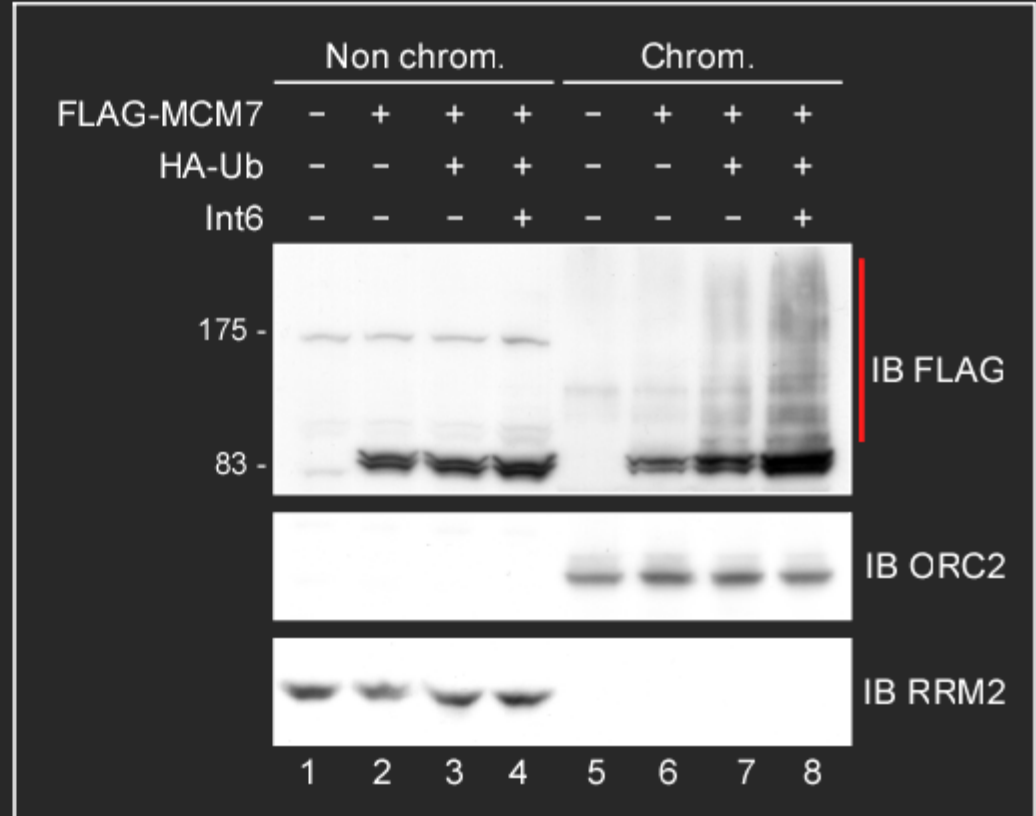
→ L'ubiquitinylation offre des possibilités de régulation quasi-illimitées

## Ubiquitylation de MCM7

### Immunoprécipitations



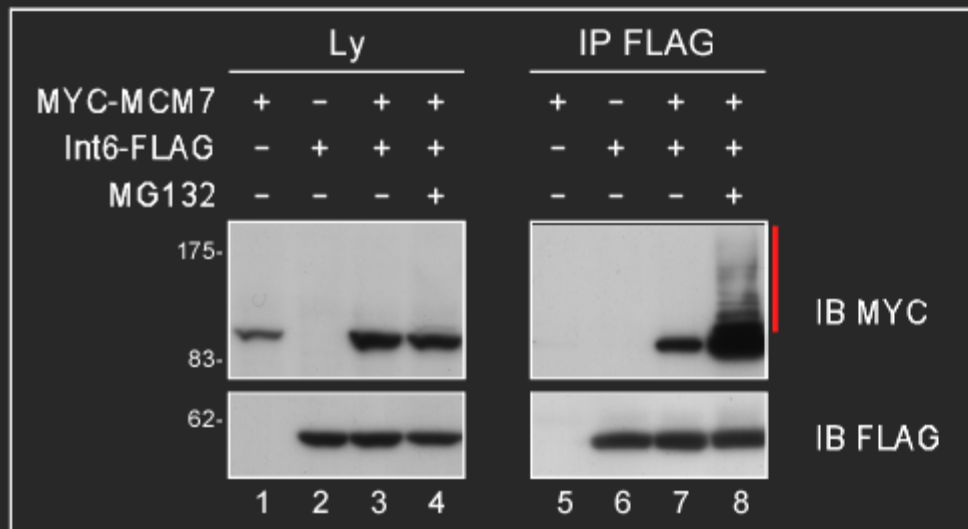
### Fractionnements subcellulaires



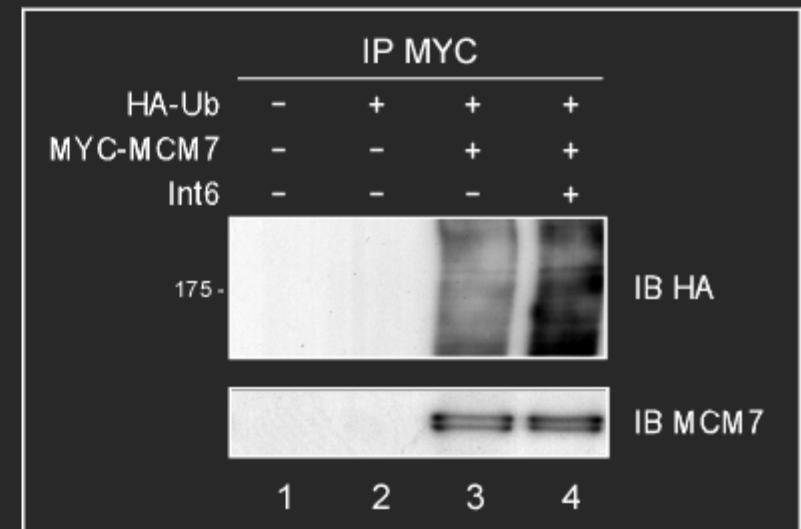
→ L'ubiquitylation pro-dégradative de MCM7 a lieu sur la chromatine

## Fonction d'Int6 dans l'ubiquitinylation de MCM7

### □ Immunoprécipitations :



→ Int6 interagit avec les formes ubiquitinylées de MCM7

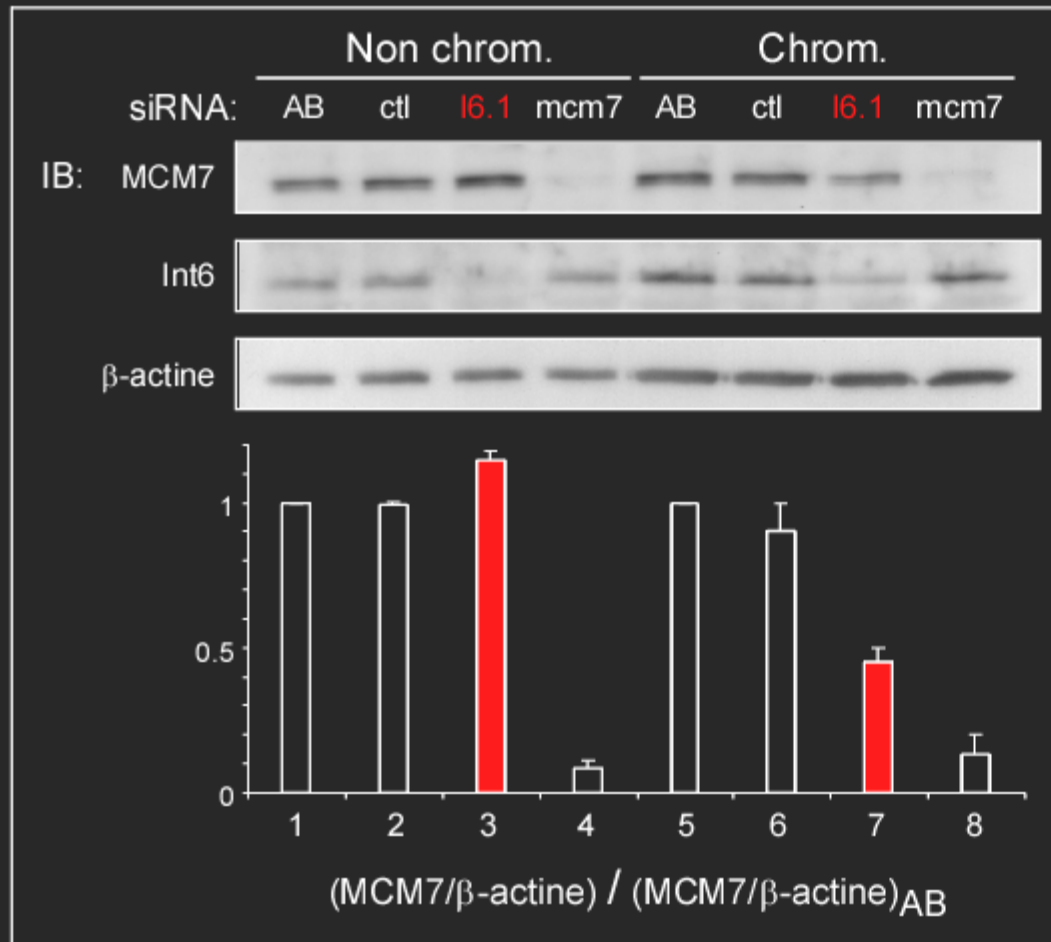


→ Int6 stabilise les formes ubiquitinylées de MCM7

Int6 régule l'abondance de MCM7 (cellules asynchrones)

Etude du niveau cellulaire de MCM7 après déplétion d'Int6 :

Fractionnements subcellulaires

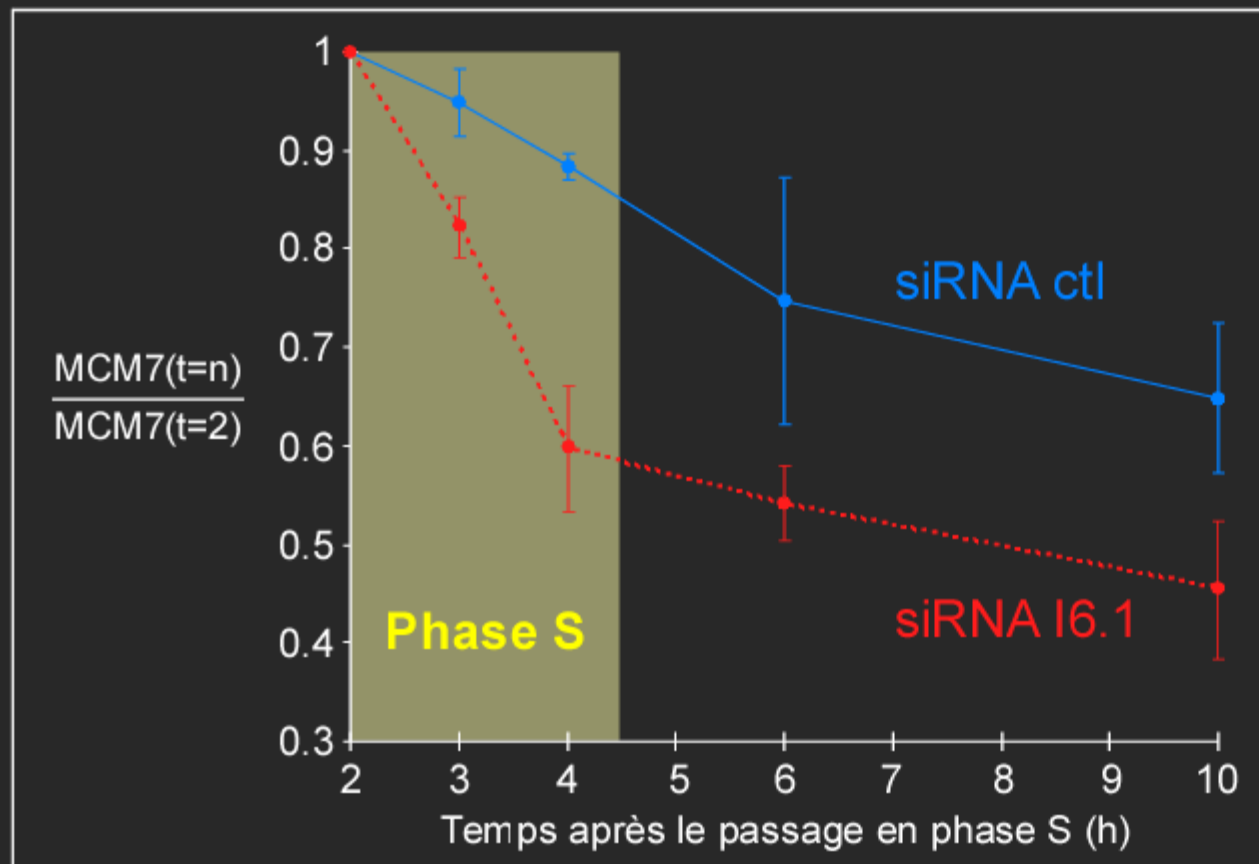


→ La déplétion d'Int6 déstabilise MCM7

→ Int6 contrôle-t-elle la dégradation de MCM7 ?

## Int6 régule la demi-vie de MCM7

- Expérience de "pulse chase" dans des cellules synchronisées à G1/S :



→ Int6 stabilise MCM7 pendant la phase S

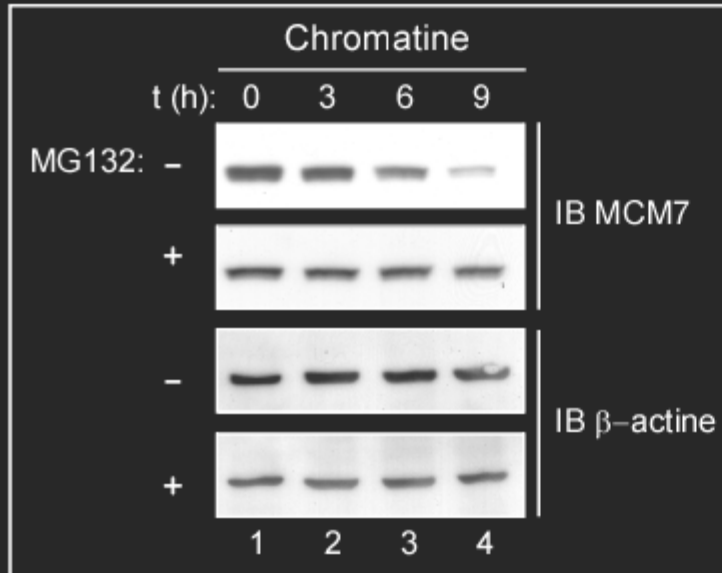
- Int6 n'interfère pas avec l'ubiquitylation pro-dégradative de MCM7

→ Int6 inhibe la dégradation de MCM7 pendant la phase S

## Dégradation de MCM7 en phase S

- Inhibition du protéasome dans des cellules synchronisées à G1/S:

### Fractionnement subcellulaire

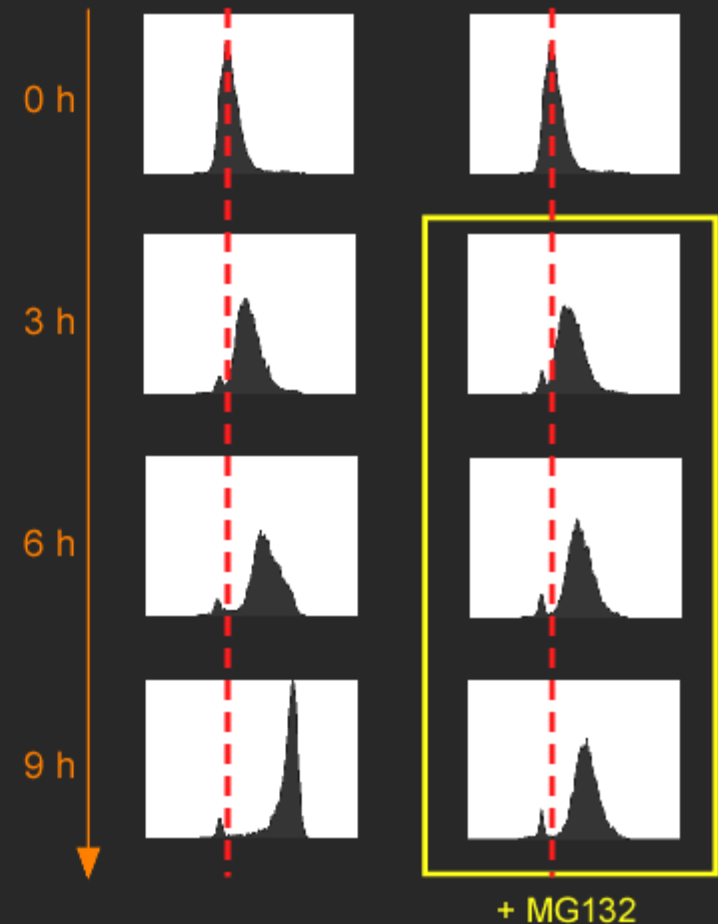


→ Dégradation de MCM7 nécessaire pour son départ de la chromatine au cours de la phase S

→ Int6 empêcherait ce départ ?

### Analyses FACS

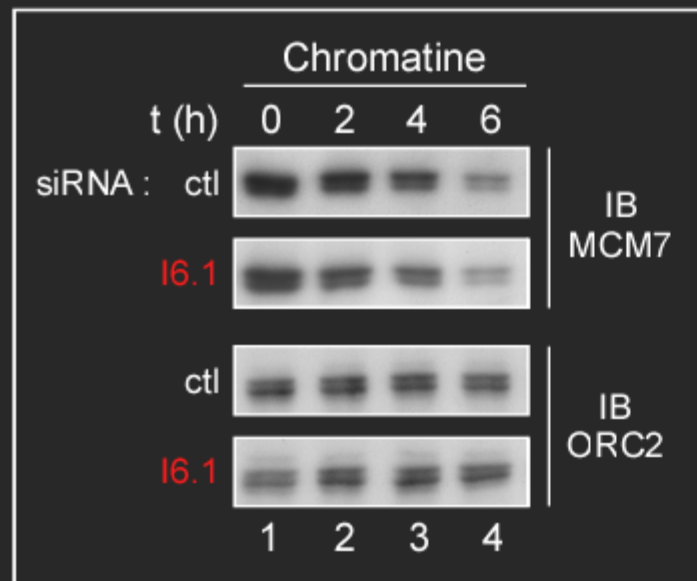
Progression en phase S  
(temps post G1/S)



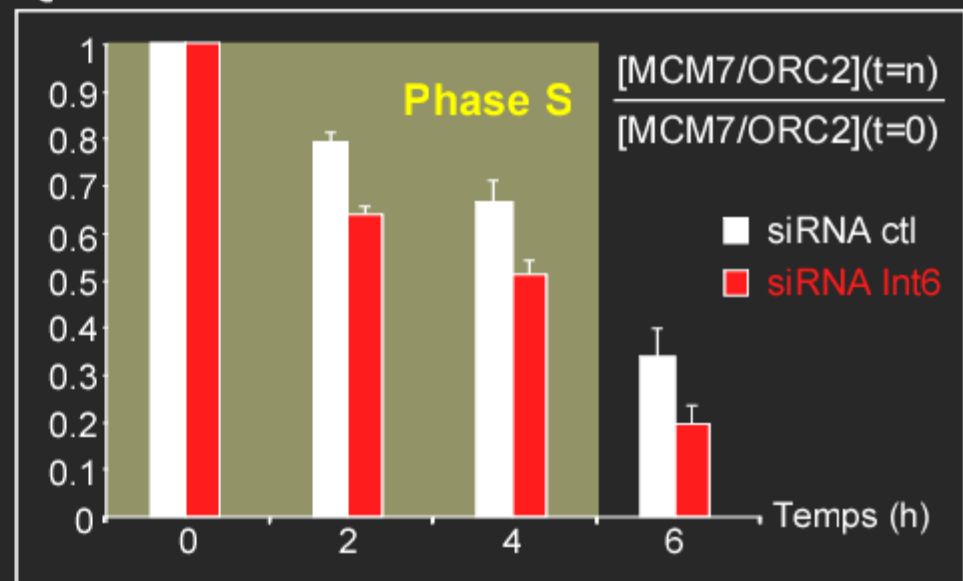
## Déplétion d'Int6 en phase S : conséquences pour MCM7

- Etude de l'abondance de MCM7 sur la chromatine au cours de la phase S :

### Fractionnement subcellulaire



### Quantification



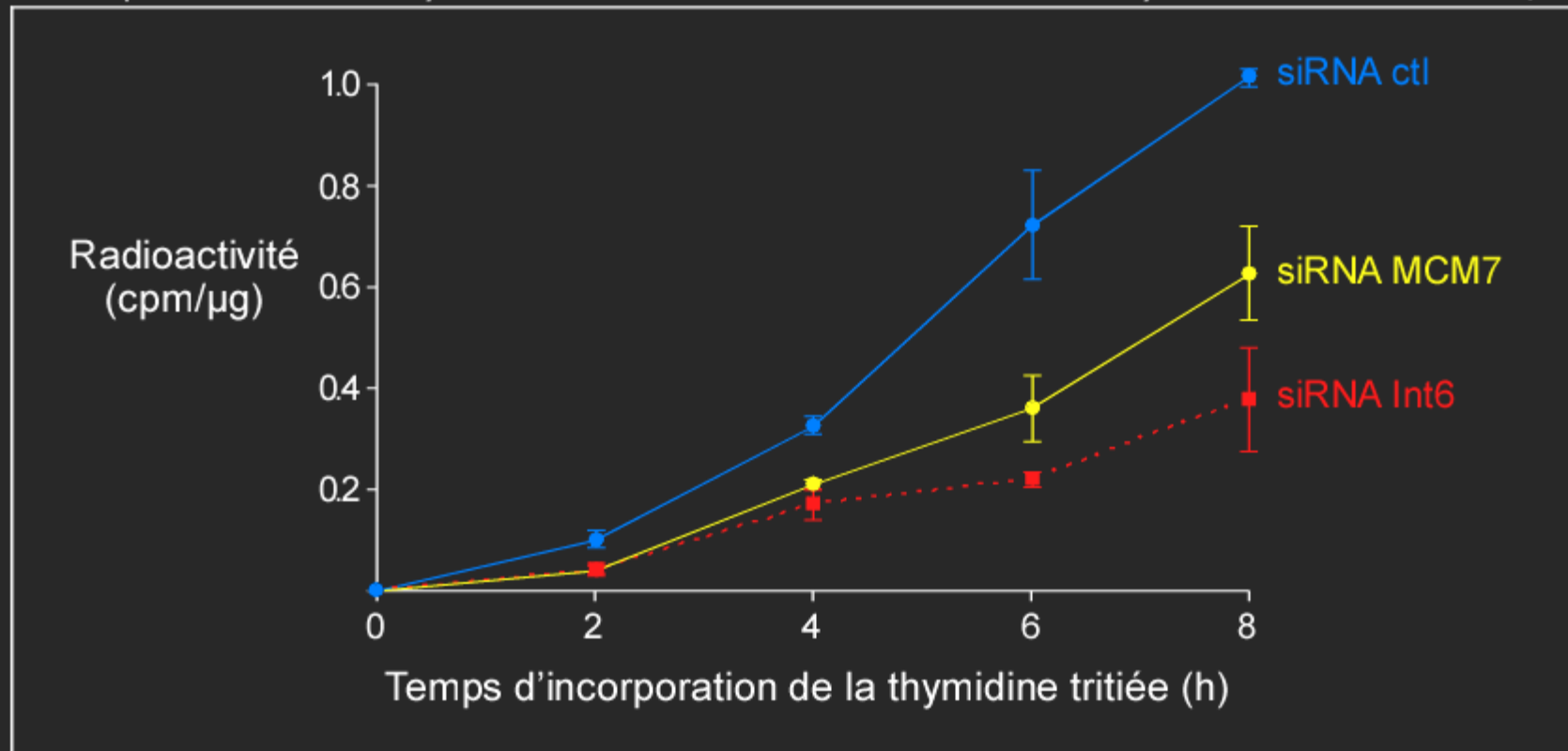
- La baisse d'Int6 accélère le départ de MCM7 de la chromatine au cours de la phase S



## Déplétion d'Int6 en phase S : conséquences pour la réplication

- Evaluation de la réplication de l'ADN en absence d'Int6 :

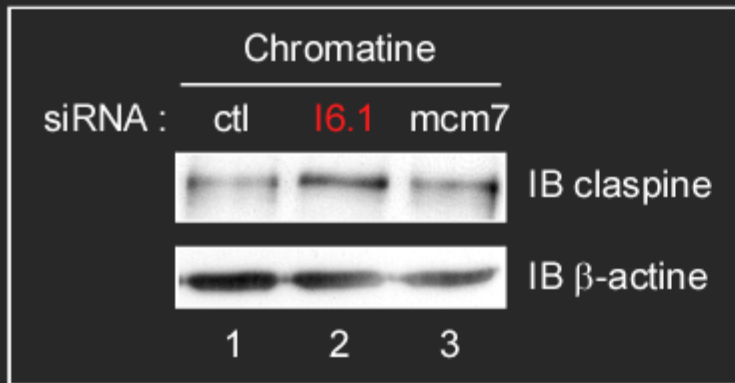
Incorporation de thymidine tritiée dans des cellules synchronisées à G1/S



→ Int6 est nécessaire au déroulement de la réplication de l'ADN

L'absence d'Int6 cause des dommages à l'ADN

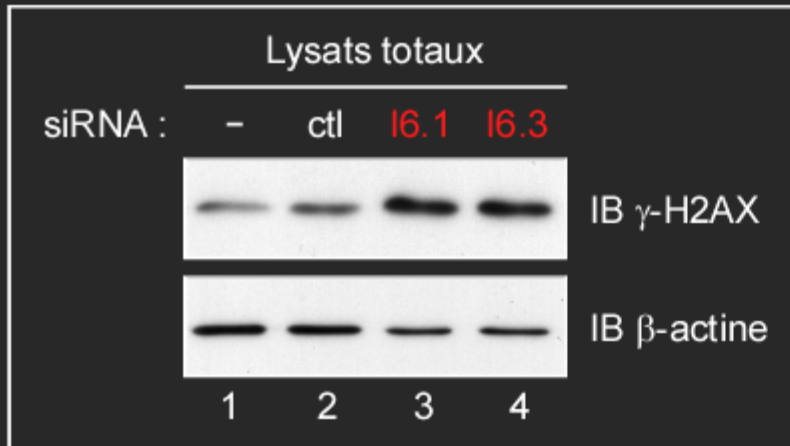
- Etude de la progression des fourches de réplication (claspine) :



Hausse du niveau chromatinien de la claspine

→ Fourches de réplication bloquées

- Etude de l'intégrité génomique ( $\gamma$ -H2AX) :



Hausse du niveau de  $\gamma$ -H2AX

→ Dommages à l'ADN

→ La stabilisation de MCM7 par Int6 est nécessaire à la progression des fourches de réplication

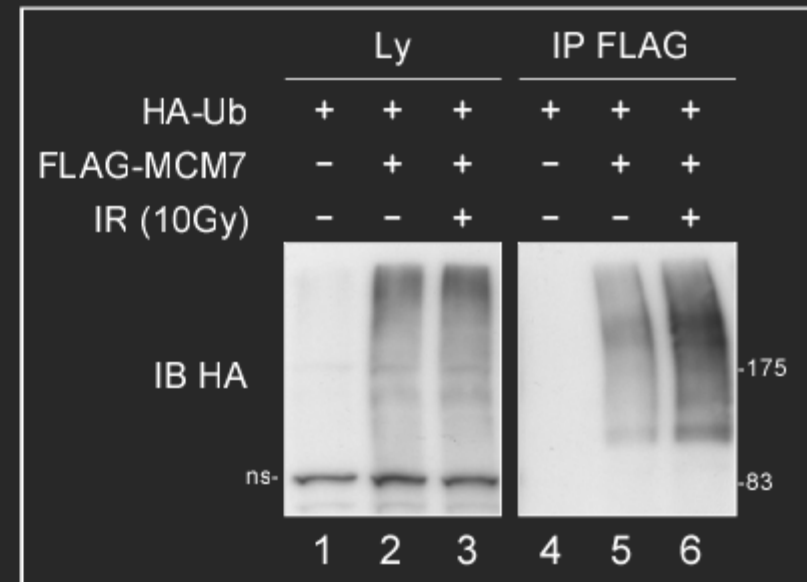
### Points à approfondir

- ❑ quelle E3 ligase pour MCM7 au cours de la réplication ?
- ❑ quelle(s) lysine(s) de MCM7 ?
- ❑ comment Int6 protège les formes ubiquitynlées de MCM7 ? (UBD ?)

## Résultats complémentaires sur l'ubiquitinylation de MCM7

- D'autres lysines de l'ubiquitine que K48 sont-elles utilisées ?
  - Oui : ubiquitinylation de MCM7 possible après mutation de la lysine 48 de l'ubiquitine
  
- L'introduction de cassures dans l'ADN modifie-t-elle l'ubiquitinylation de MCM7 ?

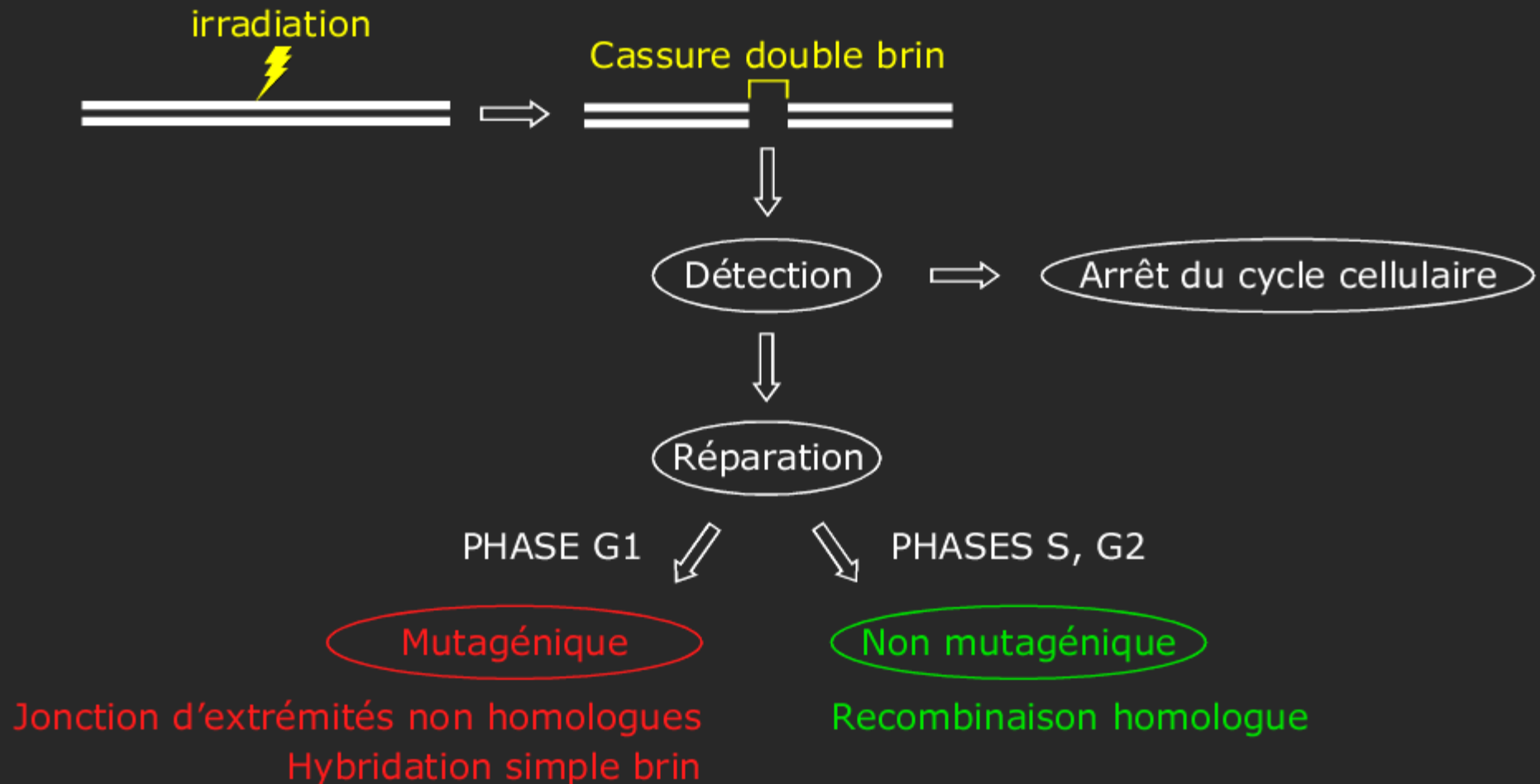
→ Oui :  
une irradiation de 10 Gy multiplie par 2,4 l'ubiquitinylation de MCM7



→ Etude de l'ubiquitinylation de MCM7 suite à une irradiation : chapitre 3

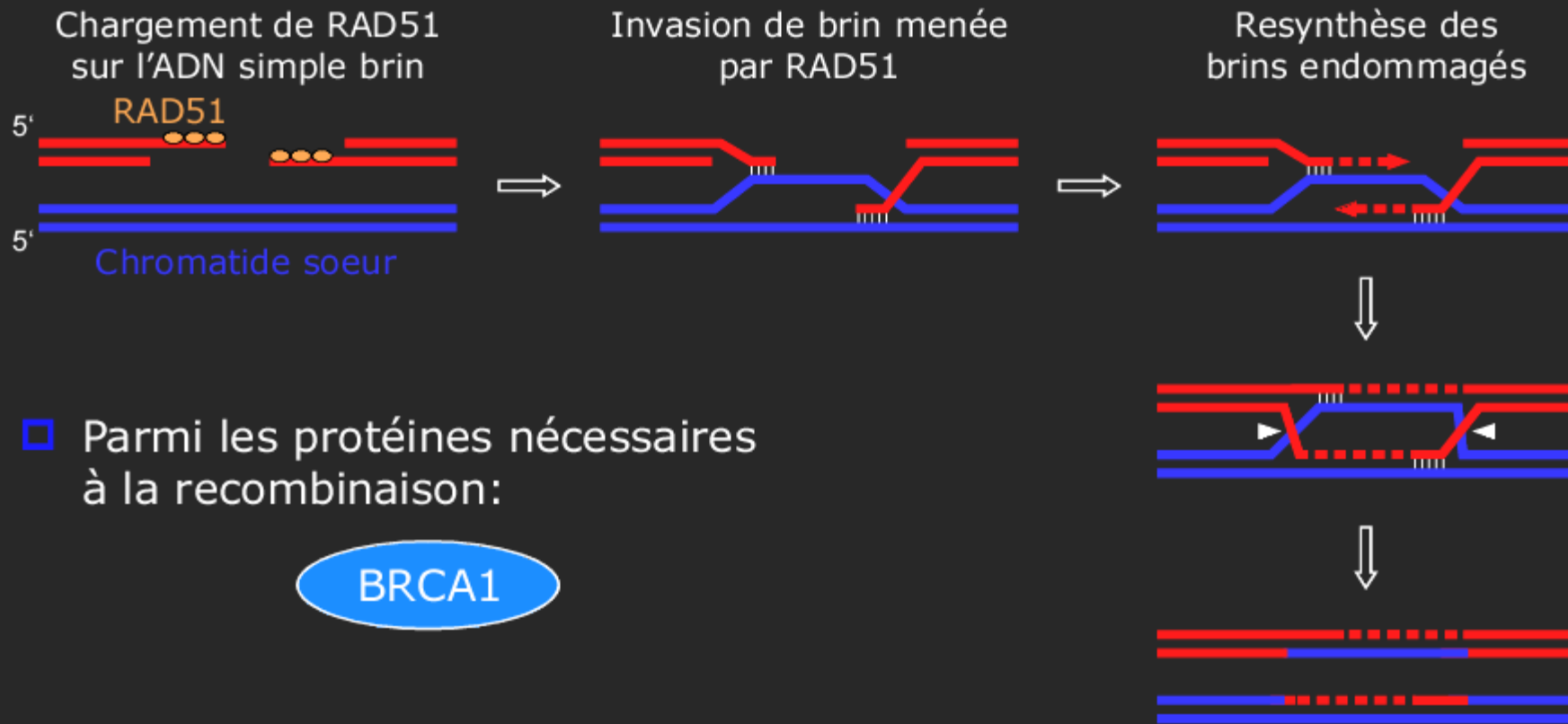
1. Introduction : intégrité du génome et réplication
2. Chapitre 1 : MCM7 et l'oncoprotéine virale TAX
3. Chapitre 2 : régulation de MCM7 par Int6
4. Chapitre 3 : régulation de MCM7 par BRCA1
5. Conclusion

## Conséquences moléculaires d'une irradiation



## La recombinaison homologue

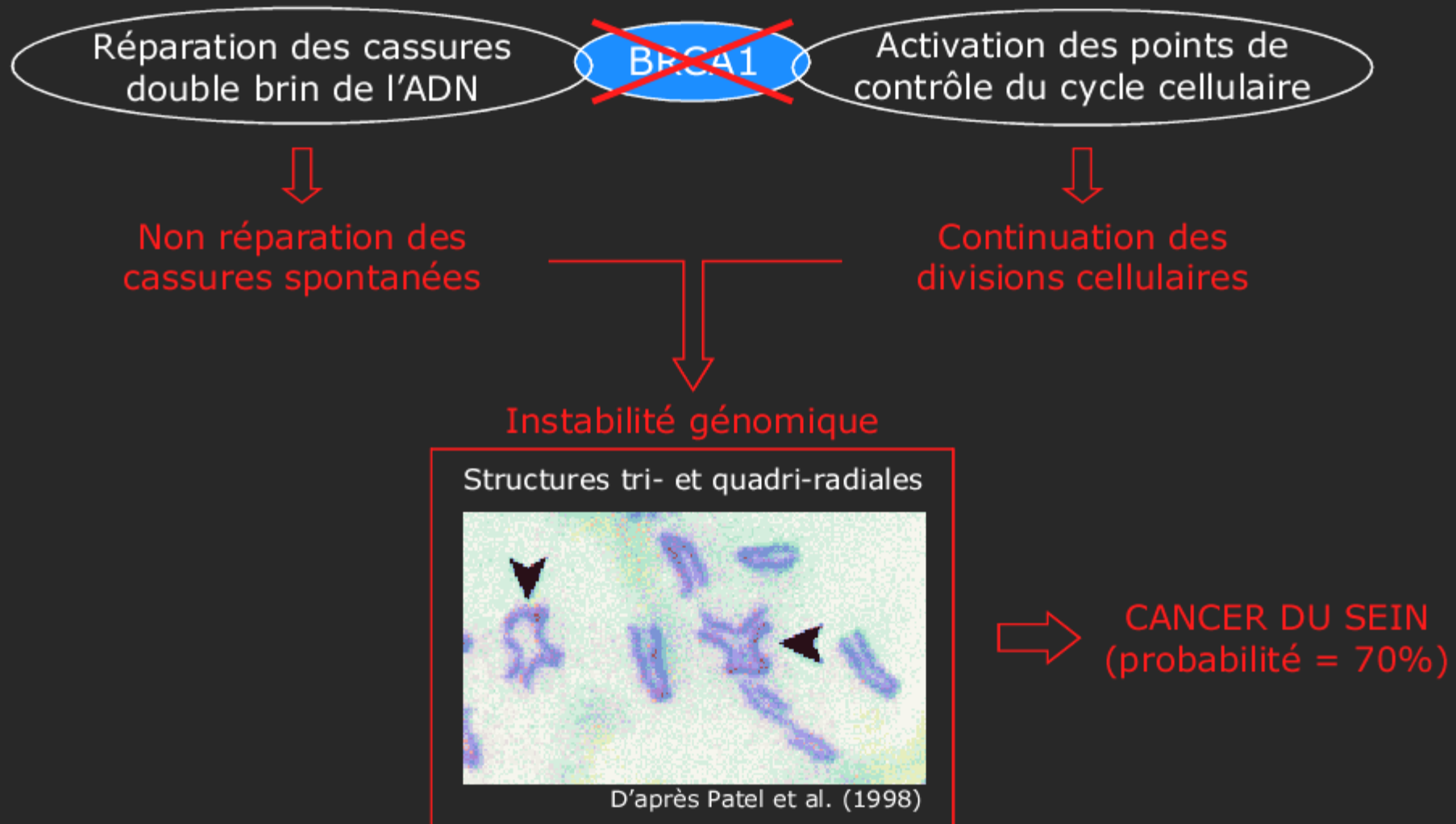
- Réparation non mutagénique des cassures double brin de l'ADN (S et G2)



- Parmi les protéines nécessaires à la recombinaison:

BRCA1

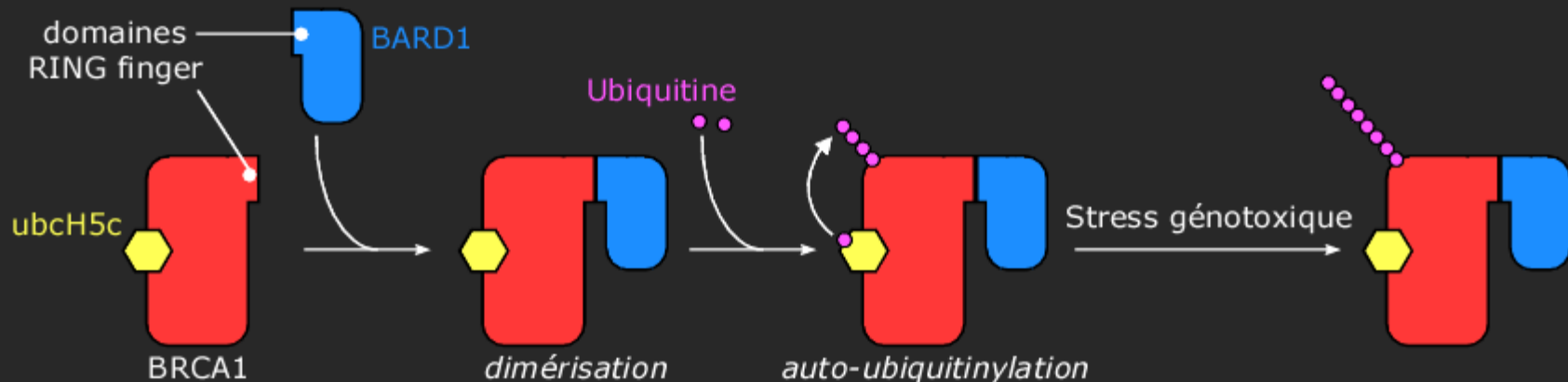
## Présentation de BRCA1 : maintien de l'intégrité génomique





## Présentation de BRCA1 : activité ubiquitine ligase

- BRCA1 = E3 ligase à domaine RING finger
- Partenaire de BRCA1 = BARD1
- Activité de BRCA1 :
  - poly-ubiquitylation via la lysine 6 de l'ubiquitine
  - stimulée au niveau des foyers de réparation de l'ADN post-irradiation



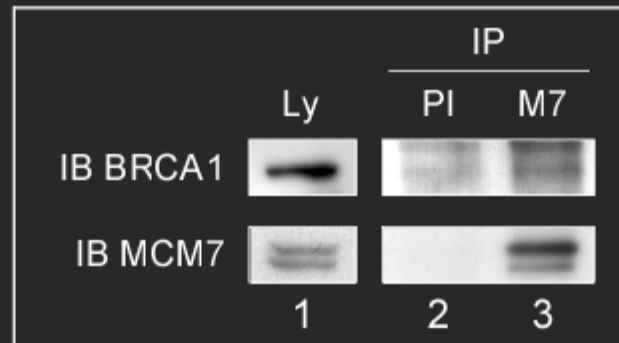
Activité E3 ligase : poly-ubiquitylation via **K6**

## Présentation de BRCA1 : activité ubiquitine ligase

- Nombre de mutations de BRCA1 prédisposant au cancer touchent le domaine RING finger
  - L'activité E3 ligase de BRCA1 est nécessaire pour sa fonction de surveillance du génome
  
- Seuls 2 substrats ont été identifiés *in vivo*
  
- Ubiquitinylation de MCM7 et activité ubiquitine ligase de BRCA1 :
  - ✓ ubiquitinylation augmentée suite à une irradiation
  - ✓ ubiquitinylation via d'autres lysines que K48
  
- MCM7 est-elle un substrat de BRCA1 ?

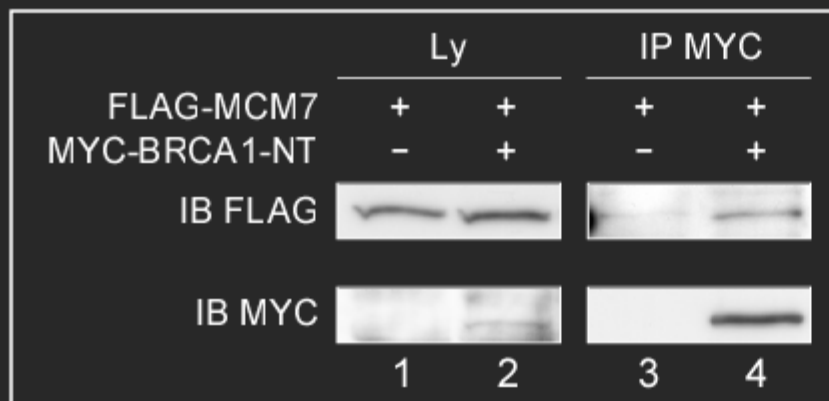
## Interaction BRCA1 - MCM7

- Immunoprécipitation des protéines endogènes :



- Immunoprécipitation des protéines surexprimées :

### Sans BARD1



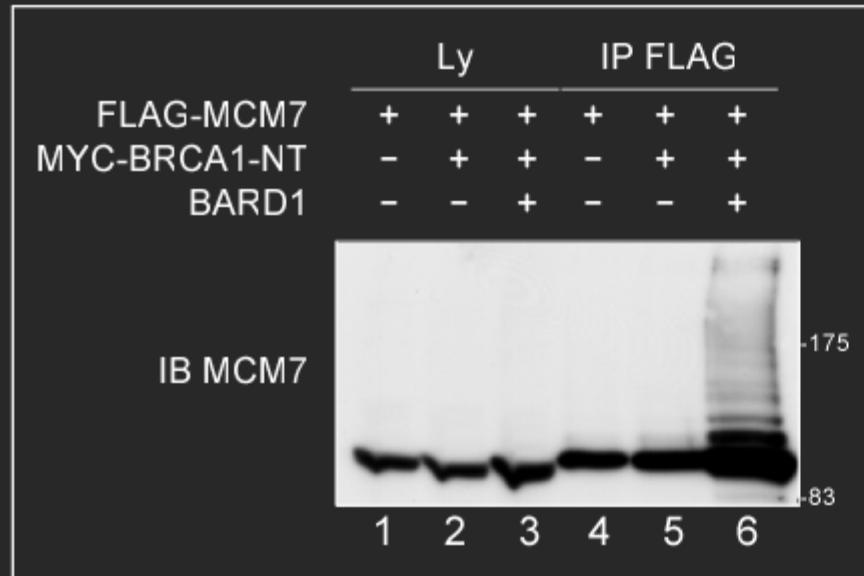
### Avec BARD1



→ L'interaction BRCA1 - MCM7 est renforcée par BARD1

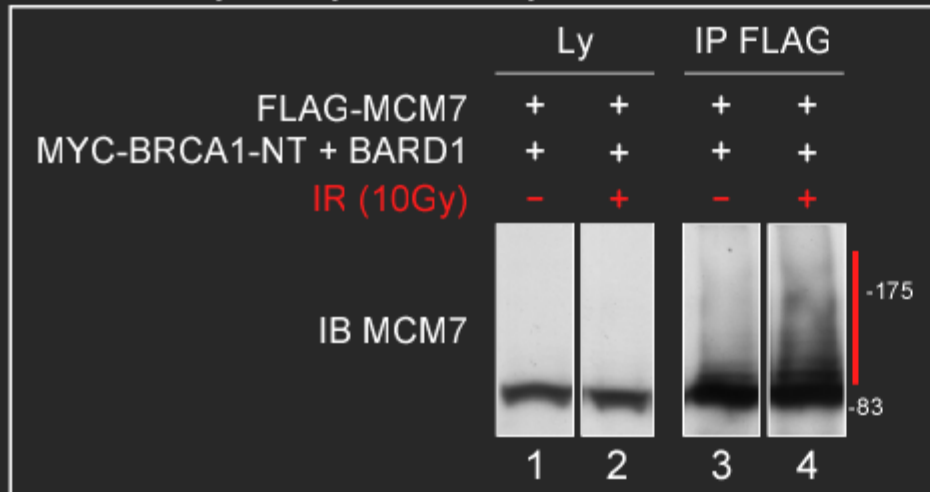
## Effet de BRCA1 - BARD1 sur l'ubiquitinylation de MCM7

### Immunoprécipitation



→ Le dimère BRCA1 - BARD1 stimule l'ubiquitinylation de MCM7 (sur la chromatine)

### Immunoprécipitation post irradiation

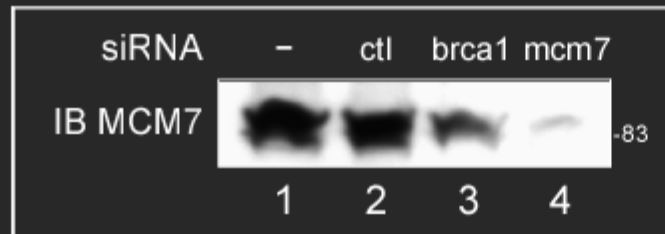


→ L'ubiquitinylation de MCM7 via BRCA1 - BARD1 est multipliée par 3,8 après une irradiation (2,4 sans BRCA1 -BARD1)

## Stabilisation de MCM7 par BRCA1 ?

- BRCA1 pourrait ubiquitinyler MCM7 via K6 de l'ubiquitine
  - Consensus : l'ubiquitylation via K6 stabilise la protéine substrat
- BRCA1 stabilise-t-elle MCM7 ?

OUI :



- MCM7 serait stabilisée par son ubiquitylation via BRCA1 - BARD1 :  
Quand ? Comment ? Pourquoi ?

## Stabilisation de MCM7 par BRCA1 : hypothèses

### □ Quand ?

Ubiquitinylation de MCM7 après irradiation = amplification d'un phénomène se produisant en phase S (suite à l'apparition spontanée de cassures double brin dans l'ADN après effondrement des fourches de réplication) ?

### □ Comment ?

Inhibition de l'ubiquitinylation dégradative de MCM7 ?

### □ Pourquoi ?

Cela dépend de la localisation des molécules de MCM7 ubiquitinylées :

#### □ Aux lésions (fourches effondrées) :

- ✓ maintenir MCM7 en attendant la réparation
- ✓ signaler la présence de la lésion

#### □ Aux origines de réplication :

- ✓ origines tardives : empêcher leur activation
- ✓ origines dormantes : maintenir ces origines en y stabilisant MCM7

### Perspectives

- ❑ Confirmer *in vitro* l'ubiquitylation de MCM7 par BRCA1
- ❑ Tester l'effet d'une irradiation sur l'ubiquitylation de MCM7 dans des cellules déficientes pour BRCA1 (+ complémentation)
- ❑ Déterminer la lysine de MCM7 utilisée pour l'ubiquitylation par BRCA1

1. Introduction : intégrité du génome et réplication
2. Chapitre 1 : MCM7 et l'oncoprotéine virale TAX
3. Chapitre 2 : régulation de MCM7 par Int6
4. Chapitre 3 : régulation de MCM7 par BRCA1
5. Conclusion

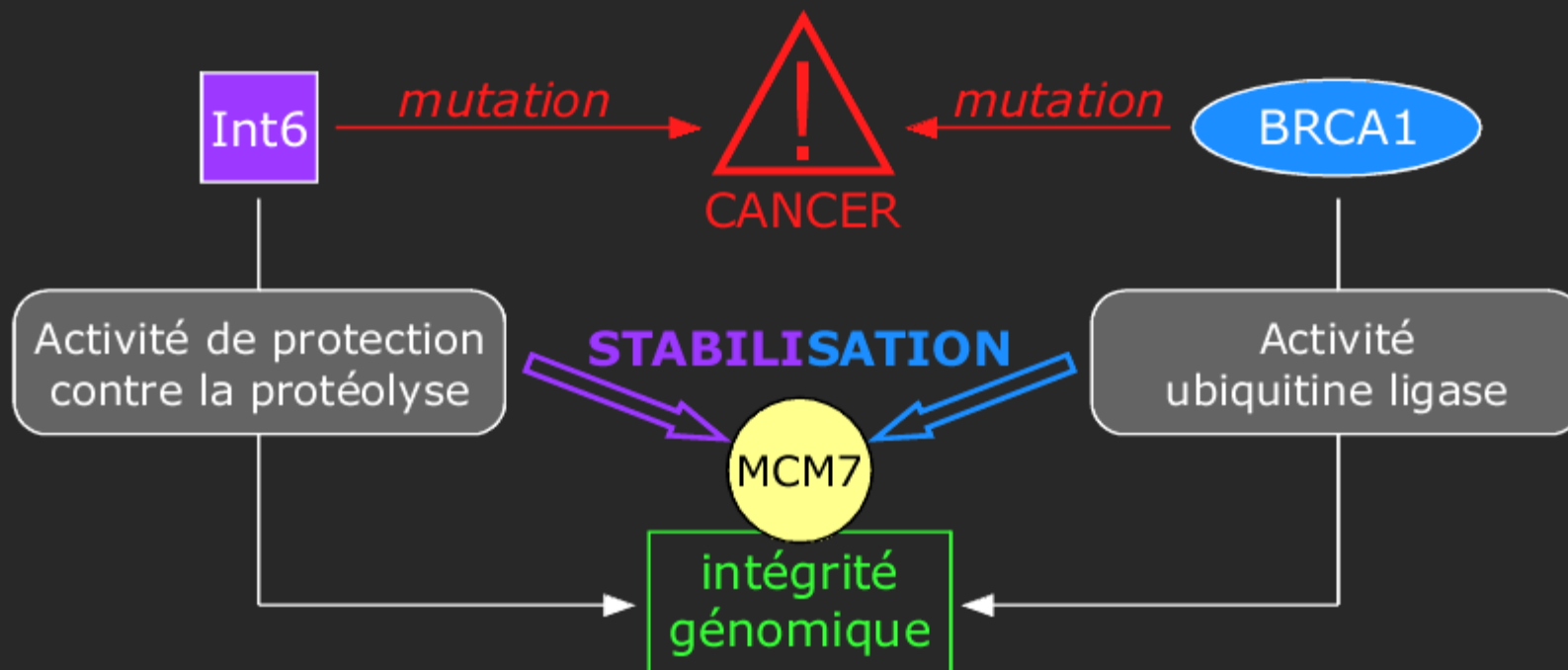


## Ubiquitine et métabolisme de l'ADN

- La chromatine est une zone d'ubiquitylation active :
    - ✓ différents types d'ubiquitylation
    - ✓ dégradation ou stabilisation
- MCM7, ARN polymérase II
- Protéines du réplisome régulées par ubiquitylation :
    - ✓ pendant la phase S, dégradation et départ de la chromatine : MCM7, CDT1
    - ✓ en réponse à des lésions de l'ADN :
      - dégradation : CDT1
      - stabilisation : MCM7
- Grande finesse de régulation que seule l'ubiquitylation peut apporter
- Maintien de l'intégrité génomique

## Oncogenèse

- 2 protéines nécessaires pour éviter l'oncogenèse : Int6 et BRCA1
  - 2 voies de maintien de l'intégrité génomique
- 2 modes d'action différents
- 1 seule et même cible : MCM7 → **le même signal : stabilisation de MCM7**



- Directeur de thèse : Pierre JALINOT
  
- Membres de l'équipe : Olivier LOHEZ  
Christelle MORRIS  
Armelle ROISIN  
Jean-Philippe ROBIN  
Jérémy SCARATO  
Jean-Michel TERME  
Anne-Laure VITTE
  
- Anciens membres : Laurent BALVAY  
Arnaud FAVRE-BONVIN  
Stéphane RETY

- Financements :



(3 ans)



(1 an)