



HAL
open science

RAD51 dans les mouvements en miroir congénitaux : une recombinaison de l'autre coté du miroir

Caroline Dubacq

► **To cite this version:**

Caroline Dubacq. RAD51 dans les mouvements en miroir congénitaux : une recombinaison de l'autre coté du miroir. Sciences du Vivant [q-bio]. Sorbonne Université, 2021. tel-04043566

HAL Id: tel-04043566

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-04043566>

Submitted on 27 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License



**Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches de Biologie
Synthèse et Perspective de Travaux**

Dr. Caroline DUBACQ
Sorbonne Université, Paris (France)

Rapporteurs :

Dr. François BOUSSIN, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies
Alternatives, Fontenay-aux-Roses (France)

Dr. Alain JOLIOT, Collège de France, Paris (France)

Pr. Ivan RODRIGUEZ, Université de Genève, Genève (Suisse)

Soutenu le 26 janvier 2021 devant le jury composé de :

Dr. François BOUSSIN, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies
Alternatives, Fontenay-aux-Roses (France)

Dr. Alain JOLIOT, Collège de France, Paris (France)

Pr. Emmanuel ROZE, Institut du Cerveau, Sorbonne Université, Paris (France)

Dr. Sarah LAMBERT, Institut Curie, Orsay (France)

Pr. Ann LOHOF, Institut de Biologie Paris Seine, Sorbonne Université, Paris
(France)

Table des matières

CURRICULUM VITAE	2
SITUATION ACTUELLE	2
CURSUS	2
PARCOURS PROFESSIONNEL	3
AVANT-PROPOS	4
SYNTHESE DES PUBLICATIONS	5
DOCTORAT	5
PROJET 1	5
PROJET 2	5
TRAVAUX EN COLLABORATION	6
ACTIVITES DE RECHERCHE - PROJET 1	7
INTRODUCTION	7
MOYENS MIS EN ŒUVRE	8
RESULTATS	9
DISCUSSION ET CONCLUSION	15
ACTIVITES DE RECHERCHE - PROJET 2	17
INTRODUCTION	17
MOYENS MIS EN ŒUVRE	19
RESULTATS	20
PERSPECTIVES DE RECHERCHE	22
AXE 1 : DISSEQUER LES FONCTIONS BIOCHIMIQUES DE RAD51 IMPACTEES PAR LES MUTATIONS <i>MMC-RAD51</i>	24
AXE 2 : IDENTIFIER LES PARTENAIRES CYTOPLASMIQUES DE RAD51 DANS LES NEURONES CORTICO-SPINAUX	25
AXE 3 : EXPLORER LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE RAD51 DANS LES NEURONES CORTICO-SPINAUX	26
AXE 4 : ANALYSER L'IMPACT CELLULAIRE D'UNE MODIFICATION DE L'EXPRESSION DE RAD51 WT OU MUTEE	27
CONCLUSION GENERALE	29
REFERENCES	30
REMERCIEMENTS	35
ABSTRACT	36

Curriculum vitae

Situation actuelle

DUBACQ Caroline (épouse VALLÉE)

Née le 28 novembre 1976 (43 ans)

Mariée, 2 enfants

Maîtresse de conférences, section 69 (Neurosciences), UFR927 (Sciences de la Vie)

Équipe Développement et Plasticité des Réseaux Neuronaux (DPRN)

Laboratoire Neurosciences Paris Seine UMR CNRS 8246 INSERM U1130 (NPS)

Institut de Biologie Paris Seine FR (IBPS)

Faculté des Sciences et Ingénierie, Sorbonne Université (SU)

Campus Pierre et Marie Curie, 9 quai Saint Bernard, 75 005 PARIS

Cursus

Formation initiale

2000-2003 **Doctorat** de Biologie Moléculaire de la Cellule (Université Paris Sud XI (UPS), Orsay). École Doctorale *Gènes, Génomes, Cellules*. Mention très honorable.

Monitorat (UPS). Enseignement : 64 h/an.

Doctorat (3 ans et 4 mois) sous la direction de C. Mann, équipe Contrôle du Cycle Cellulaire (Dir. d'équipe C. Mann), Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette. *La kinase Snf1 et le facteur de transcription Mig3 sont impliqués dans une nouvelle voie de réponse aux stress génotoxiques chez la Levure Saccharomyces cerevisiae.*

1999-2000 **DEA** de Biologie Moléculaire de la Cellule (UPS).

Stage de DEA (8 mois) sous la direction de C. Mann, même laboratoire. *Implication de SGT1 dans le contrôle du cycle cellulaire et le fonctionnement de la voie de l'AMP cyclique chez la Levure Saccharomyces cerevisiae.*

1998-1999 Préparation et admission au concours de l'**Agrégation externe de Sciences de la Vie et de la Terre**, rang 6 (UPS-École Normale Supérieure (ENS)).

1997-1998 **Maîtrise** de Biologie Cellulaire et Physiologie (ENS-SU), Magistère de Biologie - Biochimie, mention bien.

Stage de Maîtrise (3 mois) sous la direction de C. Mann, encadrement de N. Bouquin, même laboratoire. *Étude du rôle de la protéine Elm1p chez la Levure Saccharomyces cerevisiae.*

1996-1997 **Licence** de Biologie (ENS-SU), mention Biologie Cellulaire et Physiologie, Magistère de Biologie - Biochimie, mention bien.

Stage de Licence (3 mois) sous la direction de C. Jessus, équipe Biologie de l'Ovocyte (Dir. d'équipe : R. Ozon), laboratoire Physiologie de la Reproduction, SU. *Étude de la protéine kinase Myt1, régulateur négatif de cdc2 dans l'ovocyte de Xénope.*

1996 Admission à l'**ENS Paris** (E/S 96), rang 18.

Formation continue (sélection)

2020 MOOC Etudiants dyslexiques dans mon amphi : comprendre et aider (plateforme FUN)
MOOC L'attention, ça s'apprend (plateforme FUN)

2019 Management d'un projet doctoral (Institut de formation doctorale, SU, 2 jours)
DU « Apprendre à apprendre » (Faculté de médecine, SU, 10 jours)

2018 MOOC Se former pour enseigner dans le supérieur (plateforme FUN)

2016 MOOC Parfums : de l'art de sentir au marketing sensoriel (plateforme FUN)
MOOC Enseigner et former dans le supérieur (plateforme FUN)

2015 Traitement statistique des petits échantillons avec le logiciel R (AnaStats-CNRS, 3 jours)

2013 Apprendre à apprendre : favoriser la réussite des étudiants et diminuer l'échec (SU, 2 jours)

2008 Certificat d'autorisation d'expérimenter sur animaux vertébrés

Parcours professionnel

Poste de Maître de Conférences depuis 2008

Équipe DPRN ; Dir. : A. Trembleau et I. Dusart

Enseignement : 192 h/an.

- Primes :
 - Primes d'investissement en licence (PIL) pour 2013-2015 et 2015-2017,
 - Prime d'investissement unique (PIU) pour 2019-2023.
- Responsabilités d'enseignement :
 - Co-responsable des UE Ouverture en neurosciences (MU5BIN16-17) en M2 ; Créatrice et co-responsable du module « Bases neurales de la perception olfactive » ;
 - Créatrice et co-responsable de l'Atelier de Recherche Encadrée bi-disciplinaire « Les sens chimiques : goût et odorat » en L1 (LU1SXARE) ;
 - Jusqu'en 2019, responsable de la Méthodologie du travail universitaire en Sciences de la Vie (1XM01-SCV) en L1 ;
 - Jusqu'en 2015, co-responsable de l'UE Initiation à la recherche en Sciences de la Vie (LS242) en L2 double parcours Sciences et sciences sociales (SU/Sciences Po Paris), avec stage en laboratoire.
- Principaux enseignements :
 - Neurosciences en L2 (Licence de biologie), M1 et M2 (Master Biologie Intégrative et Physiologie) ;
 - Enseignements transversaux en L1 (Méthodologie du travail universitaire, Orientation et insertion professionnelle, Ateliers de recherche encadrée) ;
 - Biologie cellulaire et moléculaire en préparation à l'Agrégation externe de Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Univers (SVTU).
- Innovation pédagogique : collab. avec CAPSULE (service d'appui) et le Département formation et innovation pédagogique des bibliothèques ; introduction d'activités centrées sur l'étudiant, utilisation des plateformes numériques, évaluation des enseignements. Exemples récents :
 - Création d'un parcours hybride pour un cours de Neurosciences (LU2SV341) ;
 - Tournage d'une vidéo pédagogique sur les piliers de l'apprentissage (collab. e-marin'lab) ;
 - Création d'une séance dédiée aux stratégies d'apprentissage en L1 (LU1SXOIP).

Activités d'intérêt collectif :

- Vie des institutions :
 - Comités de suivi de thèse (x2), jury de thèse (x1) ;
 - Comités de sélection professionnelle (x2) ;
 - Évaluation de dossiers doctoraux (x1), d'entrée dans l'enseignement supérieur « Parcoursup » (x1) ;
 - Comité scientifique de congrès (x1), organisation des Journées de l'UFR927 (x2) et des séminaires internes hebdomadaires de NPS (depuis 2019).
- Revue d'articles : journal Nature Communications (x1).
- Appui à la recherche : utilisateur référent de la plateforme de PCR quantitative de l'IBPS.
- Vulgarisation/médiation scientifique : organisation d'événements et animations. Exemples récents :
 - Organisation et animation de l'atelier Voyage au cœur du cerveau, Fête de la Science 2018 (IBPS, SU) ;
 - Chargée de projet et directrice des contenus scientifiques de l'exposition « Neurosciences : matières à penser » en 2019 (SU) ;
 - Co-responsable depuis 2019 de l'action récurrente Vis ma vie de chercheur (IBPS) ; accueil annuel de 1.000 lycéens, financements externes : 24.000 € en 2019-2020.

Poste d'Agrégé-préparateur de 2003 à 2008

Équipe Développement et Neuropharmacologie ; Dir. A. Prochiantz

UMR8542, Département de Biologie, ENS, Paris

Enseignement : 128 h/an.

- Responsabilités d'enseignement : Co-responsable des travaux pratiques de Biochimie en L3.
- Principaux enseignements :
 - Biologie Cellulaire et Neurobiologie en préparation à l'Agrégation externe de SVTU (ENS-UPS) ;
 - Travaux pratiques de Biochimie en L3 (ENS Paris et Cachan).

Activités d'intérêt collectif :

- Jury de concours d'entrée dans les Grandes Écoles : conceptrice et/ou correctrice d'épreuves écrites ou orales du concours BCPST ou du 2nd concours d'entrée aux ENS (activité maintenue jusqu'en 2014).
-

Avant-propos

J'ai suivi une formation de biologie moléculaire et cellulaire motivée par mon intérêt pour la compréhension des liens entre le fonctionnement cellulaire et les mécanismes moléculaires sous-jacents. Pendant mon doctorat, j'ai résolu des questions moléculaires et cellulaires sur un organisme modèle eucaryote unicellulaire, la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure possède des voies de signalisation très conservées chez les Eucaryotes, notamment dans le domaine de la réparation des dommages de l'ADN au sein duquel j'ai réalisé ma thèse, tout en étant facile à cultiver et à manipuler génétiquement, offrant des opportunités inégalables de relier le phénotype au génotype.

Après mon doctorat soutenu en 2003, j'ai souhaité mener des projets de recherche dans le cadre de questions biologiques plus intégrées. J'ai alors développé un premier projet de recherche visant à démontrer et à comprendre l'importance de la traduction locale axonale des ARNm de récepteurs olfactifs dans les neurones sensoriels olfactifs de la Souris. Ce projet s'intégrait dans la thématique plus générale dirigée par A. Trembleau concernant le guidage axonal des neurones sensoriels olfactifs chez la Souris. D'abord accueillis au sein de l'équipe d'A. Prochiantz à l'ENS, nous avons ensuite fondé l'équipe Développement et Plasticité des Réseaux Neuronaux à Sorbonne Université en 2007.

Depuis quelques années, je suis impliquée dans le projet développé conjointement par I. Dusart, (co-directrice de l'équipe) et E. Roze (Institut du Cerveau, Paris) pour comprendre les bases physiologiques et moléculaires du contrôle de la latéralisation du mouvement chez l'Homme et la Souris, en tirant parti du paradigme des mouvements en miroir congénitaux. L'équipe ayant identifié des mutations responsables de cette pathologie dans le gène RAD51, connu jusqu'à présent pour son rôle nucléaire dans la réparation de l'ADN, ma double compétence dans le guidage axonal et la réparation de l'ADN m'a permis de proposer des hypothèses originales et de construire ma propre thématique de recherche. Ainsi, mon second projet vise aujourd'hui à caractériser le rôle cytoplasmique encore inexploré de RAD51 dans les axones des neurones cortico-spinaux au cours du développement du système nerveux.

Je fais dans la suite une brève synthèse chronologique de mes publications, puis la description détaillée des travaux effectués dans le cadre du projet 1. Je présente ensuite les résultats qui ont participé à la genèse du projet 2 et je consacre le dernier chapitre de ce mémoire à la présentation des grands axes de mon projet scientifique pour les 4 prochaines années.

Je finis cet avant-propos en présentant ma vision de ce qu'est la capacité à diriger des recherches. Il s'agit en premier lieu de savoir se saisir d'une question originale, d'en connaître le contexte scientifique et de proposer des hypothèses nouvelles, étayées et testables sur cette question. Tester ces hypothèses demande ensuite de savoir trouver l'environnement propice et les moyens financiers, techniques et humains nécessaires. En particulier, c'est savoir s'entourer de jeunes chercheurs, collègues et collaborateurs, savoir les fédérer autour du projet et les guider dans sa réalisation, dans un esprit d'enrichissement mutuel. C'est aussi savoir persévérer (souvent) devant les obstacles comme savoir renoncer (parfois) dans les impasses et, de manière inhérente au processus de la recherche scientifique, savoir s'adapter (toujours) à l'évolution en continu de nos propres hypothèses et questionnements ainsi qu'aux avancées des connaissances techniques et scientifiques. Enfin, c'est savoir appréhender l'impact de ses travaux, y compris en dehors du champ scientifique, et savoir en défendre les enjeux et les fruits aussi bien auprès des spécialistes que devant des publics moins experts.

En résumé, diriger un projet de recherche est une pratique de la science qui est avant tout pour moi une aventure humaine et collective, sans cesse évolutive et enrichissante.

Synthèse des publications

Sont indiqués **en gras** le nom du candidat et en souligné le nom des étudiants encadrés.

Doctorat

Articles de recherche :

- Dubacq, C.**, Guerois, R., Courbeyrette, R., Kitagawa, K., and Mann, C. (2002). Sgt1p Contributes to Cyclic AMP Pathway Activity and Physically Interacts with the Adenylyl Cyclase Cyr1p/Cdc35p in Budding Yeast. *Eukaryot. Cell* 1, 568–582.
- Dubacq, C.**, Chevalier, A., and Mann, C. (2004). The Protein Kinase Snf1 Is Required for Tolerance to the Ribonucleotide Reductase Inhibitor Hydroxyurea. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2560–2572.
- Dubacq, C.**, Chevalier, A., Courbeyrette, R., Petat, C., Gidrol, X., and Mann, C. (2006). Role of the iron mobilization and oxidative stress regulons in the genomic response of yeast to hydroxyurea. *Mol. Genet. Genomics* 275, 114–124.

Communications orales et affichées :

2 présentations affichées et 1 présentation orale en congrès.

Projet 1

Articles de recherche :

- Dubacq, C.**, Jamet, S., and Trembleau, A. (2009). Evidence for developmentally regulated local translation of odorant receptor mRNAs in the axons of olfactory sensory neurons. *J. Neurosci.* 29, 10184–10190.
- Persuy, M.-A., Baly, C., Monnerie, R., Souquere, S., Bevilacqua, C., **Dubacq, C.**, Pierron, G., Caillol, M., and Remy, J.-J. (2011). A unique transcriptome at the brain–environment interface: Local translation in the rat olfactory epithelium. *Brain Res.* 1405, 1–14.
- Richard, M.¹, Jamet, S.¹, Fouquet, C., **Dubacq, C.**, Boggetto, N., Pincet, F., Gourier, C., and Trembleau, A. (2013). Homotypic and heterotypic adhesion induced by odorant receptors and the Beta2-adrenergic receptor. *PloS One* 8, e80100. ¹ co-premiers auteurs.
- Doulazmi, M., Cros, C., Dusart, I., Trembleau, A.¹, and **Dubacq, C.**^{1,2} (2019). Alternative polyadenylation produces multiple 3' untranslated regions of odorant receptor mRNAs in mouse olfactory sensory neurons. *BMC Genomics* 20. ¹ co-derniers auteurs ; ² auteur correspondant.

Revues :

- Nedelec, S., **Dubacq, C.**, and Trembleau, A. (2005). Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J. Neurocytol.* 34, 49–64.
- Dubacq, C.**, Fouquet, C., and Trembleau, A. (2014). Making scent of the presence and local translation of odorant receptor mRNAs in olfactory axons. *Dev. Neurobiol.* 74, 259–268.

Communications orales et affichées :

11 présentations affichées et 1 présentation orale en congrès ; 1 séminaire invité.

Projet 2

Articles de recherche :

- Trouillard, O.¹, Koht, J.¹, Gerstner, T., Moland, S., Depienne, C., Dusart, I., Méneret, A., Ruiz, M., **Dubacq, C.**, and Roze, E. (2016). Congenital Mirror Movements Due to RAD51: Cosegregation with a Nonsense Mutation in a Norwegian Pedigree and Review of the Literature. *Tremor Hyperkinetic Mov.* 6. ¹ co-premiers auteurs.

Méneret, A., Franz, E.A., Trouillard, O., Oliver, T.C., Zagar, Y., Robertson, S.P., Welniarz, Q., Gardner, R.J.M., Gallea, C., Srour, M., Depienne, C., Jasoni C.L., **Dubacq, C.**, Riant F., Lamy J.-C., Morel M.-P., Guérois R., Andreani, J., Fouquet C., Doulazmi M., Vidailhet M., Rouleau G.A., Brice A., Chédotal A., Dusart I., Roze E. and Markie D. (2017). Mutations in the netrin-1 gene cause congenital mirror movements. *J. Clin. Invest.* *127*, 3923–3936.

Communications affichées :

2 présentations affichées en congrès.

Travaux en collaboration

Collaboration avec Isabelle Caillé (équipe DPRN, laboratoire NPS, IBPS)

Articles de recherche :

Daroles, L., Gribaudo, S., Doulazmi, M., Scotto-Lomassese, S., **Dubacq, C.**, Mandairon, N., Greer, C.A., Didier, A., Trembleau, A., and Caillé, I. (2016). Fragile X Mental Retardation Protein and Dendritic Local Translation of the Alpha Subunit of the Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Messenger RNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning. *Biol. Psychiatry* *80*, 149–159.

Stoufflet, J., Chaulet, M., Doulazmi, M., Fouquet, C., **Dubacq, C.**, Métin, C., Schneider-Maunoury, S., Trembleau, A., Vincent, P., and Caillé, I. (2020). Primary cilium-dependent cAMP/PKA signaling at the centrosome regulates neuronal migration. *Sci. Adv.* *6*, eaba3992.

Collaboration avec Rachel Sherrard (laboratoire B2A, IBPS)

Article de recherche :

Dufor, T., Grehl, S., Tang, A.D., Doulazmi, M., Traoré, M., Debray, N., **Dubacq, C.**, Deng, Z.-D., Mariani, J., Lohof, A.M. and Sherrard R.M. (2019). Neural circuit repair by low-intensity magnetic stimulation requires cellular magnetoreceptors and specific stimulation patterns. *Sci. Adv.* *5*, eaav9847.

Activités de recherche - Projet 1

Traduction locale axonale des ARNm de récepteurs olfactifs dans les axones des neurones sensoriels olfactifs

Au sein du projet « Guidage axonal des neurones sensoriels olfactifs chez la Souris » dirigé par A. Trembleau (équipe DPRN)

Introduction

Les neurones sensoriels olfactifs sont situés, chez les Mammifères, dans la muqueuse nasale et projettent directement au niveau du bulbe olfactif dans des neuropiles appelés glomérules (Shepherd, 1981). Les mécanismes de guidage des axones des neurones olfactifs vers le bon glomérule au cours de la mise en place de la carte olfactive, et de son maintien tout au long de la vie, ont fait l'objet d'intenses recherches depuis la découverte des gènes de récepteurs olfactifs (*Olfir*) au début des années 90 (Buck and Axel, 1991). Le guidage axonal des neurones sensoriels olfactifs est particulièrement intéressant car ces neurones projettent vers des glomérules spécifiques de chaque récepteur olfactif, chaque neurone n'exprimant qu'un seul gène de récepteur olfactif choisi parmi un répertoire de gènes (Chess et al., 1994; Mombaerts et al., 1996; Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994; Figure 1). Ce répertoire, d'un millier de gènes chez la Souris, est majoritairement organisé en clusters de gènes, appartenant à la même sous-famille de récepteurs olfactifs, répartis dans la quasi-totalité des chromosomes (Zhang and Firestein, 2002; Zhang et al., 2004). Cette projection des axones exprimant un même récepteur vers un même glomérule est fondamentale pour le codage des stimuli olfactifs, créant une carte discrète et chimio-topique d'activation des glomérules en réponse à l'exposition à des mélanges de molécules odorantes.

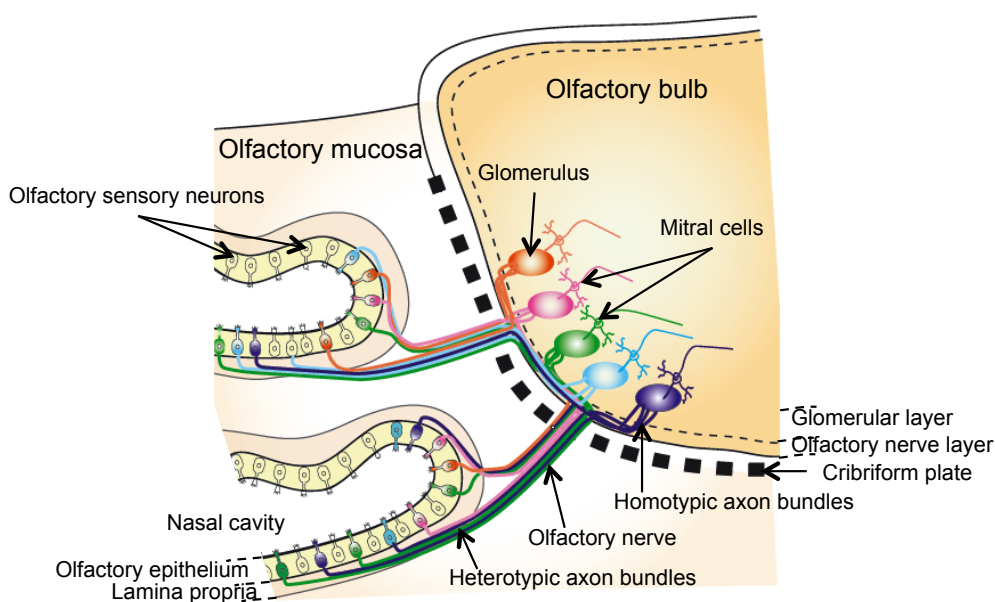


Figure 1 : Organisation schématique de la projection primaire du système olfactif chez la Souris (adapté de Nedelec et al., 2005). Le récepteur exprimé par chaque neurone sensoriel, choisi dans le répertoire, est représenté par la couleur des neurones ; les neurones exprimant un même récepteur sont distribués en mosaïque dans l'épithélium olfactif. Les axones de ces neurones sortent de l'épithélium au sein de faisceaux hétérotypiques, indépendants du récepteur exprimé, qui forment le nerf olfactif, traversant la plaque cribreuse avant d'atteindre le bulbe olfactif. Dans la partie interne de la couche du nerf olfactif, les axones se regroupent de manière homotypique en faisceaux d'axones exprimant le même récepteur olfactif, qui convergent et coalescent ensuite dans un glomérule spécifique de ce récepteur.

Très rapidement, l'idée que les récepteurs olfactifs eux-mêmes pourraient jouer un rôle dans le regroupement homotypique des axones au sein des glomérules est proposée (Mombaerts et al., 1996). Une altération des séquences codantes des récepteurs se traduit par une altération de la carte de projection glomérulaire (Feinstein et al., 2004; Wang et al., 1998). D'un point de vue anatomique, les axones des neurones exprimant différents récepteurs sont d'abord fasciculés de manière hétérotypique à la sortie de l'épithélium avant de défasciculer et de refasciculer de manière homotypique à l'entrée dans le bulbe olfactif (Miller et al., 2010; Treloar et al., 2002; Figure 1). En définitive, les récepteurs olfactifs semblent donc jouer un triple rôle dans les neurones sensoriels olfactifs : (1) réception des odeurs au niveau des cils dendritiques présents en surface de la muqueuse nasale, (2) contrôle de leur propre expression mono-génique et mono-allélique (Monahan and Lomvardas, 2015) et (3) tri axonal permettant l'adressage vers le glomérule approprié (Feinstein and Mombaerts, 2004; Feinstein et al., 2004).

Au sein de l'étude du guidage axonal des neurones sensoriels olfactifs menée par l'équipe chez la Souris sous la direction d'A. Trembleau, j'ai dirigé un projet visant à étudier **le rôle et la régulation des ARNm de récepteurs olfactifs présents dans les axones**. En effet, dès la découverte des récepteurs olfactifs chez les rongeurs, des hybridations *in situ* avaient révélé la présence de ces ARN messagers dans la couche du nerf et les glomérules du bulbe olfactif (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994). A mon arrivée dans l'équipe, la présence des protéines de récepteurs olfactifs venaient d'être montrée dans la partie terminale des axones (Barnea et al., 2004; Feinstein et al., 2004; Strotmann, 2004), soulevant la possibilité d'une synthèse locale axonale des récepteurs olfactifs. De plus, il avait été démontré dans d'autres contextes que le guidage axonal pouvait être dépendant de la synthèse locale de protéines en réponse à des molécules de guidage (Brunet et al., 2005; Campbell and Holt, 2001). En particulier, on commençait à identifier les protéines de liaison de l'ARN (ou *RNA binding proteins*, RBP) contrôlant cette localisation et cette traduction locale axonale (pour revue: Gomes et al., 2014; Sahoo et al., 2018). L'ensemble de ces éléments soulevait donc la possibilité excitante d'une synthèse locale axonale des récepteurs olfactifs jouant éventuellement un rôle d'importance dans la formation de glomérules homotypiques. Dans un premier temps, je me suis concentrée sur la démonstration de la traduction locale des ARNm des récepteurs olfactifs dans les neurones sensoriels olfactifs. Dans le cadre des financements ANR 2010 puis NIH 2013 (portés par A. Trembleau, le 2nd en collaboration avec C. Greer), j'ai ensuite exploré 2 pistes pour analyser la régulation de ces ARNm : séquences cis-régulatrices et protéines RBP trans-régulatrices.

Moyens mis en œuvre

Encadrements réalisés

M2 :

- **JAMET Sophie, 2005-2006.** Part d'encadrement : 40%. *Traduction locale et guidage des axones olfactifs : une étude utilisant un rapporteur de traduction d'un récepteur olfactif.* Devenir : poursuite en doctorat dans notre équipe sous la direction de A. Trembleau ; post-doctorante dans le laboratoire Feinstein (Hunter College, New York, NY, USA).
- **CHAREYRE Judith, 2009-2010.** *Rôle de FMRP dans le transport et la traduction des ARNm de récepteurs olfactifs dans les axones des neurones sensoriels olfactifs chez la Souris.* Devenir : poursuite d'études de médecine.
- **PEREZ ADRIAN Ana, 2010-2011.** *Caractérisation de nouvelles isoformes d'ARN messagers de récepteurs olfactifs exprimées par les neurones sensoriels olfactifs.* Devenir : réorientation en Management des connaissances et innovation.

- **WEBER Leslie, 2012-2013.** *Étude de l'expression et de la compartimentation d'isoformes d'ARNm de récepteurs olfactifs chez la Souris.* Devenir : réorientation en Cinéma, documentaire et communication scientifique.
- **CROS Cyril, 2014-2015.** *Bases moléculaires du transport et de la localisation axonale des ARNm de récepteurs olfactifs dans les neurones sensoriels olfactifs de la Souris.* Devenir : poursuite au sein d'un programme doctoral aux USA ; actuellement en thèse dans le laboratoire Hobert (Columbia University, New York, NY, USA).

Autres encadrements (sélection) :

- Siksou L. (M1, Master BIP, SU ; 4 mois en 2004-2005)
- Di Rosa M. (pré-doctorat, Université de Rome, Programme De Vinci ; 6 mois en 2005-2006)
- Rault S. (L3, SU ; 1 jour par semaine pendant 1 an en 2011-2012)
- Mondoloni M. (L3, Université de Corse ; 1 mois en 2011-2012)
- Rimsky-Robert D. (M1, Médecine/Sciences, Université René Descartes ; 3 mois en 2013-2014)
- Longchamp A. (L3, SU ; 3 semaines en 2015-2016)

Collaborations

- C. Baly, INRAE, Jouy-en-Josas.
- B. Bardoni, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Nice.
- M. Doulazmi, laboratoire B2A, IBPS, Paris.
- S. Firestein, Columbia University, New York, NY, USA.
- C. Greer, Yale University, New Haven, CT, USA.
- D. Logan, Waltham Centre for Pet Nutrition, Leicestershire, UK.

Financements

Projet NIH « The olfactory nerve » (5R01DC012441) 2013-2017 :

150 000 \$ pour l'équipe ; responsabilité d'une des tâches (tâche 2/2 de l'objectif 3/3). C. Greer (Yale University, New Haven, CT, USA) était le porteur principal américain de ce projet et A. Trembleau était le porteur pour notre équipe.

Projet ANR AxonGuidOR (ANR-2010-BLAN-1401-01) 2010 :

306 544 € pour l'équipe ; responsabilité de 2 des 5 tâches du projet. A. Trembleau était porteur principal du projet.

Résultats

Une traduction locale axonale des ARNm de récepteurs olfactifs régulée pendant le développement (Dubacq et al., 2009)

Afin de démontrer la traduction locale des ARNm de récepteurs olfactifs dans les neurones sensoriels olfactifs, j'ai d'abord confirmé la présence de ces ARNm dans les axones des neurones sensoriels par RT-qPCR (plateforme de PCR en temps réel, IBPS ; Dubacq et al., 2009 ; Figure 2A-B). La présence axonale de ces ARNm par rapport à leur expression dans les somas était d'autant plus importante que l'on analysait des souris jeunes (PND4, *Post Natal Day* 4, soit 4 jours après la naissance) vs. adultes (Figure 2B-C). Nous avons pu démontrer par ailleurs que ces ARNm messagers n'étaient pas transportés de manière permissive dans les axones des neurones sensoriels olfactifs, car d'autres ARNm fortement exprimés dans le soma des neurones sensoriels olfactifs ne sont pas retrouvés dans les axones (e.g. *Umodll* ; données non montrées obtenues pendant le M2 de C. Cros). En analysant la présence de ces ARNm dans des fractionnements subcellulaires de tissus olfactifs, j'ai ensuite pu démontrer leur association aux polyribosomes, et donc leur potentielle traduction, dans le soma mais aussi dans les axones des neurones sensoriels olfactifs, renforçant l'hypothèse d'une synthèse locale axonale de ces récepteurs (Figure 2D). Ce travail, auquel S. Jamet a

participé pendant son M2 sous mon encadrement, montrait également que l'association aux polyribosomes des ARNm de récepteurs olfactifs étaient corrélée avec l'immaturation des neurones sensoriels : dans le bulbe olfactif de jeunes souris ou dans un contexte de régénération axonale, après lésion des neurones sensoriels olfactifs chez l'adulte, leur abondance dans la fraction associée aux polyribosomes était supérieure à celle dans le bulbe olfactif de souris adultes contrôles (Figure 2D-E). La corrélation de la localisation axonale et de la traduction locale des ARNm de récepteurs olfactifs avec l'intensité de croissance axonale, plus intense chez le jeune ou après lésion, suggérait une régulation développementale fine de ces phénomènes.

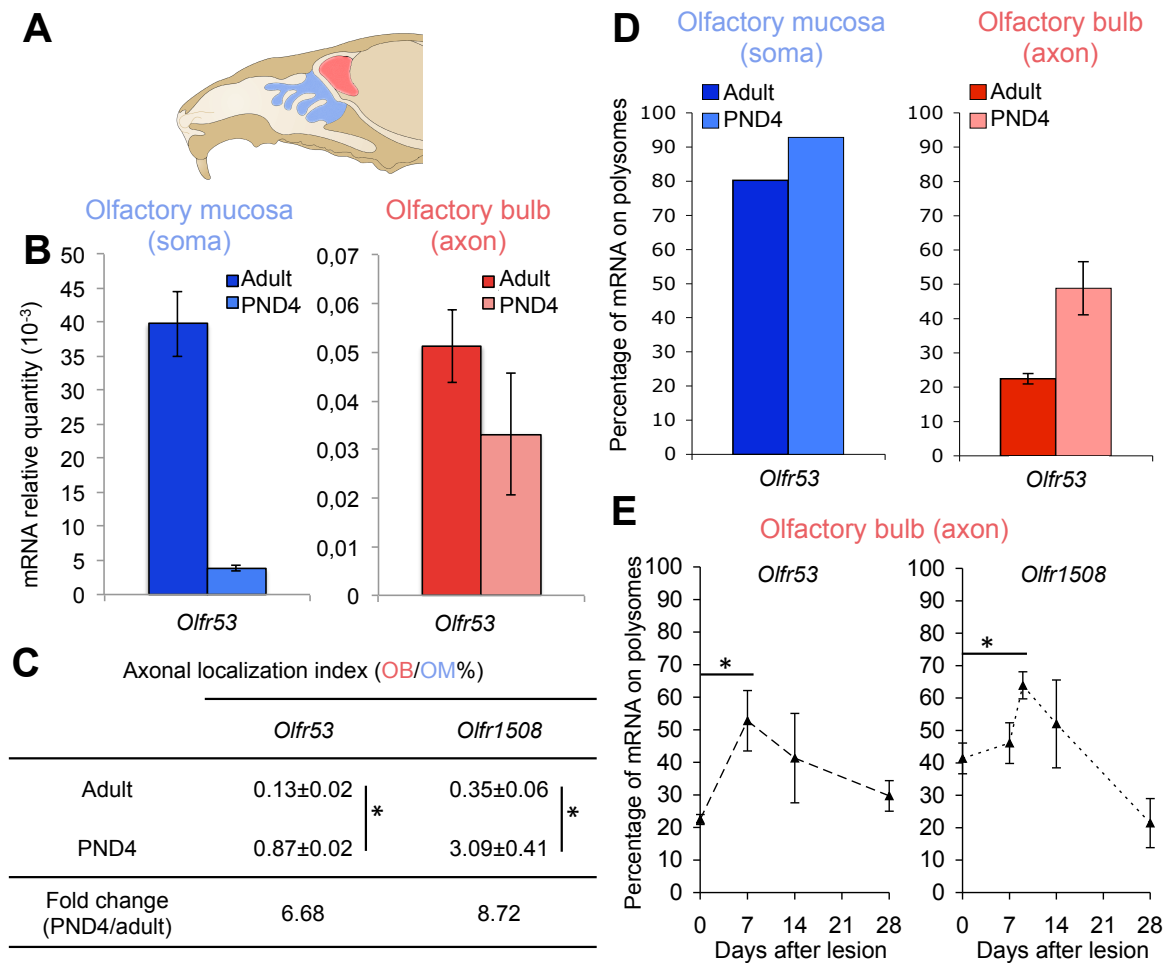


Figure 2 : Présentation synthétique des résultats de l'article Dubacq et al., 2009. A. Organisation schématique du système olfactif principal chez la Souris ; en bleu, la muqueuse olfactive, où se trouve le soma des neurones sensoriels olfactifs ; en rouge, le bulbe olfactif, où projettent les axones des neurones sensoriels olfactifs. B. Quantification relative par RT-qPCR (normalisation par la tubuline) de l'expression d'un récepteur olfactif représentatif, *Olfr53*, dans la muqueuse olfactive (panneau de gauche) et détection des ARNm axonaux dans le bulbe olfactif (panneau de droite) chez l'adulte et à PND4. Moyennes +/- SEM (n = 4-5). C. Indices de localisation axonale (pourcentage d'ARNm détectés dans le bulbe olfactif par rapport à la muqueuse olfactive) calculés à partir des données de RT-qPCR pour deux récepteurs olfactifs, *Olfr53* et *Olfr1508*, chez l'adulte et chez le jeune. Le taux d'augmentation de cet indice entre l'adulte et le jeune est indiqué (*fold change*). Mann-Whitney U test, * : p = 0,029 pour *Olfr53* ; p = 0,016 pour *Olfr1508* (n = 4-5). D. Pourcentage d'ARNm *Olfr53* présents dans la fraction polyribosomale, déterminé par RT-qPCR après fractionnement sur gradient de saccharose d'extraits de muqueuse olfactive (panneau de gauche) ou de bulbes olfactifs (panneau de droite) chez l'adulte et à PND4. E. Pourcentage d'ARNm *Olfr53* ou *Olfr1508* présents dans la fraction polyribosomale dans les bulbes olfactifs chez l'adulte au cours d'un protocole de lésion/régénération des neurones sensoriels olfactifs (injection intra-péritonéale de dichlobénil). Mann-Whitney U test, * : p = 0,057 pour *Olfr53* (n = 3-4) ; p = 0,038 pour *Olfr1508* (n = 4-6).

Des isoformes alternatives d'ARNm de récepteurs olfactifs générées par polyadénylation alternative (Doulazmi et al., 2019)

Pour pouvoir analyser les séquences cis-régulatrices présentes dans les ARNm de récepteurs olfactifs, nous avons dû mettre en place une analyse dédiée de leurs régions 3' non traduites (ou *UnTranslated Regions*, 3'UTR). En effet, jusqu'au travail récent que j'ai dirigé en collaboration avec le bio-informaticien M. Doulazmi (Doulazmi et al., 2019), la description des ARNm entiers des récepteurs olfactifs chez la Souris était incomplète en ce qui concerne les 3'UTR (Figure 3Aa-b), en raison des limitations des outils d'annotation utilisés pour l'analyse des premiers transcriptomes à haut débit de muqueuse olfactive (Ibarra-Soria et al., 2014; Shum et al., 2015). Or, les séquences 3'UTR sont cruciales pour la régulation du métabolisme des ARNm : localisation, stabilité, traduction (pour revue: Mayr, 2017). D'une manière intéressante, dans plusieurs exemples de traduction locale axonale, ce sont des isoformes alternatives à 3'UTR longs qui ont été montrées comme spécifiquement adressées dans les axones (Andreassi et al., 2010; Ben-Yaakov et al., 2012; Harrison et al., 2014; Perry et al., 2012; Yudin et al., 2008). Par ailleurs, mes résultats expérimentaux préliminaires et ceux obtenus par notre collaborateur S. Firestein avec des puces à ADN indiquaient la présence de multiples isoformes des ARNm de récepteurs olfactifs dues à des 3'UTR alternatifs. J'ai donc recruté un étudiant de M2 polytechnicien, C. Cros, qui avait le potentiel pour développer en collaboration avec M. Doulazmi le *workflow* nécessaire à une nouvelle analyse dédiée à l'identification des extrémités 3' alternatives des ARNm des récepteurs olfactifs sur les données haut débit de RNA-Seq publiées par notre collaborateur D. Logan (Figure 3Ab-c).

Grâce à ce nouveau *workflow* d'annotation combinant les outils STAR et IsoSCM, nous avons montré que les ARNm des récepteurs olfactifs sont soumis à une large polyadénylation alternative, générant des 3'UTR de différentes longueurs pour un même gène (Figure 3Ac-B). Ces résultats obtenus *in silico* ont été validés pour l'ensemble des gènes par la présence de sites de polyadénylation canoniques au niveau des extrémités 3' identifiées (Figure 3Ad) et par l'analyse ciblée des ARNm de récepteurs olfactifs pilotes par RT-PCR (M2 de A. Perez Adrian) ou northern blot (M2 de L. Weber ; Figure 3Ae). Nous avons pu également quantifier l'abondance relative des différentes isoformes (Figure 3Ac) puis, par une analyse en composante principale, définir 4 types de profils quantitatifs des isoformes 3' dans lesquels se répartissent les récepteurs olfactifs, dont 3 profils correspondant à des situations de polyadénylation alternative (Figure 3C). En conclusion, nous avons ainsi montré que plus de 70% des gènes de récepteurs olfactifs présentent plus de 2 isoformes en 3' (Figure 3B), et que pour environ 30% des gènes de récepteurs olfactifs l'isoforme majoritaire représente moins de 80% des isoformes 3' alternatives (Figure 3C). Au cours de cette étude, nous n'avons pu déceler aucune isoforme 3' sexe-spécifique dans une comparaison entre mâles et femelles, ni aucune spécificité des profils quantitatifs ou des longueurs des 3'UTR en fonction de la sous-famille de récepteurs olfactifs (Doulazmi et al., 2019), laissant ouverte la question de l'origine de ces différences de profils de 3'UTR au sein de cette famille de gènes. Cependant, l'existence de 3'UTR alternatifs pour la majorité des gènes de récepteurs olfactifs pourrait s'avérer importante pour la régulation du transport et de la traduction axonale de ces ARNm.

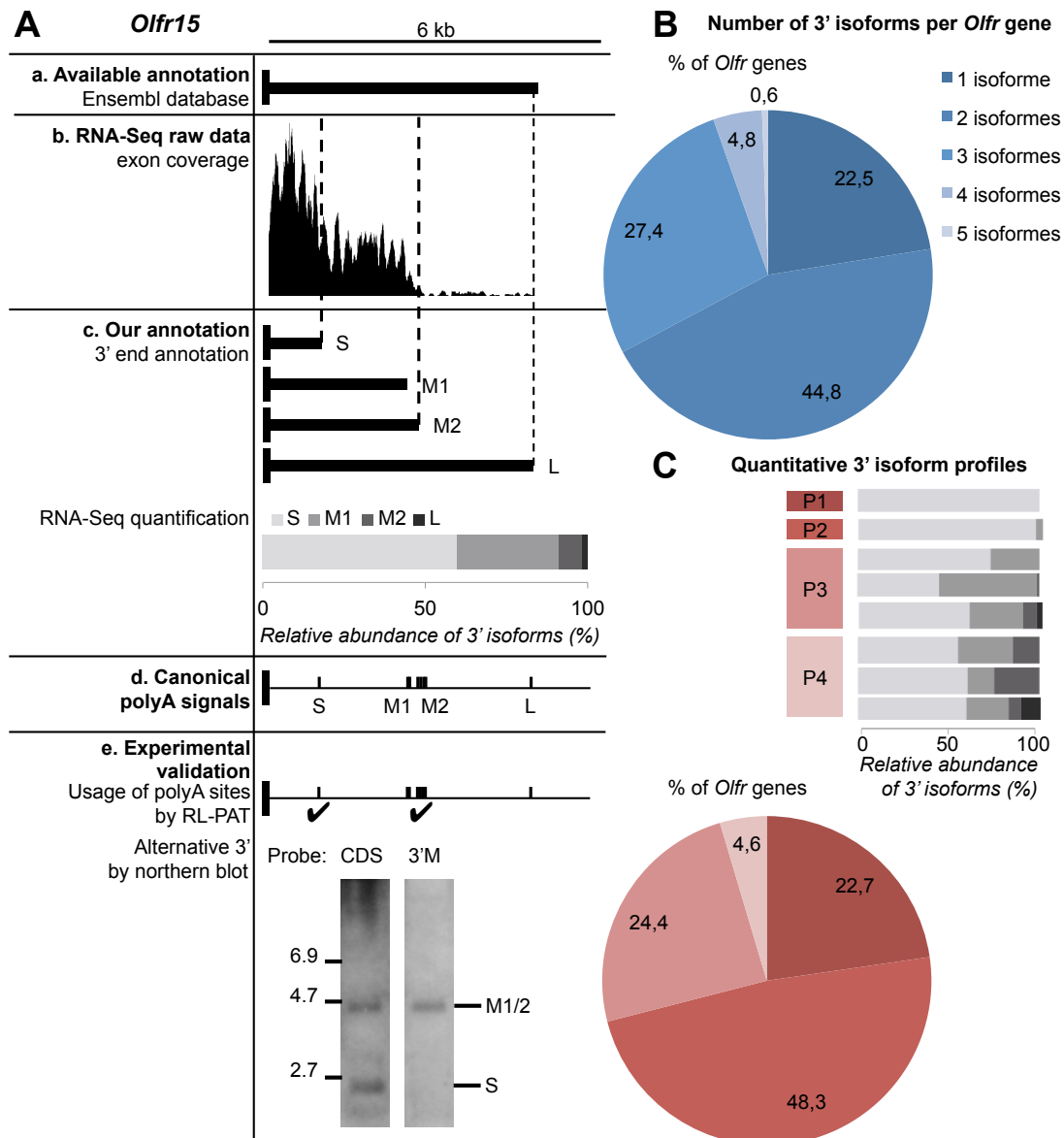


Figure 3 : Présentation synthétique des résultats de l'article Doulazmi et al., 2019. A. Analyse des isoformes 3' pour le récepteur olfactif pilote *Olf15*. Aa. Une seule isoforme est décrite dans la base de données Ensembl (<http://www.ensembl.org>) ; barre verticale : fin de la séquence codante ; barre horizontale : 3'UTR. Ab. Les décrochages de couverture (marqués par les lignes pointillées) dans les données de RNA-Seq (mâles adultes; Ibarra-Soria et al., 2014) en aval de la séquence codante du gène indiquent de probables extrémités 3' de l'ARNm. Ac. Notre workflow identifie 4 3'UTR alternatifs pour ce gène nommés respectivement S (pour l'isoforme la plus courte), M (pour les isoformes de longueur intermédiaire) et L (pour l'isoforme la plus longue). La quantification de l'abondance relative de ces isoformes 3', basée sur la couverture en RNA-Seq, indique que l'isoforme S et l'ensemble des isoformes M sont d'abondance équivalente, alors que l'isoforme L est très peu abondante. Ad. Les extrémités 3' de ces isoformes correspondent avec la présence de sites canoniques de polyadénylation (AAUAAA ou AUUAAA ; barres verticales). Ae. L'utilisation des sites de polyadénylation et l'existence des isoformes 3'S et M ont été confirmées par une technique basée sur la RT-PCR (*RNA-Ligation PolyAdenylation Test*, RL-PAT) et par northern blot soit avec une sonde commune à toutes les isoformes, inverse complémentaire de la séquence codante (*Coding DNA Sequence*, CDS), soit avec une sonde spécifique des 3' intermédiaires et longs (3'M). Cette dernière analyse confirme la présence en abondance égale des isoformes S et M, et ne permet pas de détecter la très rare isoforme L. B. Répartition des gènes de récepteurs olfactifs en fonction du nombre d'isoformes 3' par gène. C. Exemples de profils quantitatifs d'isoformes 3' de récepteurs olfactifs (P1 : isoforme 3' unique ; P2 : isoforme la plus courte représentant plus de 80% de l'ensemble des isoformes alternatives ; P3 : isoforme la plus courte représentant moins de 80% et isoformes les plus longues – sans la 2^e isoforme la plus courte - moins de 10% ; P4 : idem mais les isoformes les plus longues représentant plus de 10%) et répartition des gènes de récepteurs olfactifs en fonction de ces profils.

FMRP, une protéine de liaison aux ARN candidate dans la régulation de la traduction locale axonale dans les neurones sensoriels olfactifs (résultats non publiés)

Dans l'étude des éventuelles protéines RBP trans-régulatrices de la traduction locale axonale des ARNm de récepteurs olfactifs, je me suis intéressée essentiellement à la protéine FMRP (Fragile-X Mental Retardation Protein, produit du gène *Fmr1*), une protéine de liaison aux ARN jouant des rôles clé dans le transport et la traduction locale axonale et dendritique de nombreux ARNm cibles, dans le contexte du développement et de la plasticité des réseaux neuronaux (Suardi and Haddad, 2020). En effet, FMRP est exprimée par les neurones sensoriels olfactifs et détectée dans la couche du nerf et les glomérules (Christie et al., 2009). Pendant son M2, J. Chareyre a montré que FMRP est présente préférentiellement dans les corps cellulaires et les axones des neurones immatures (plateforme Imagerie, IBPS ; Figure 4A-B).

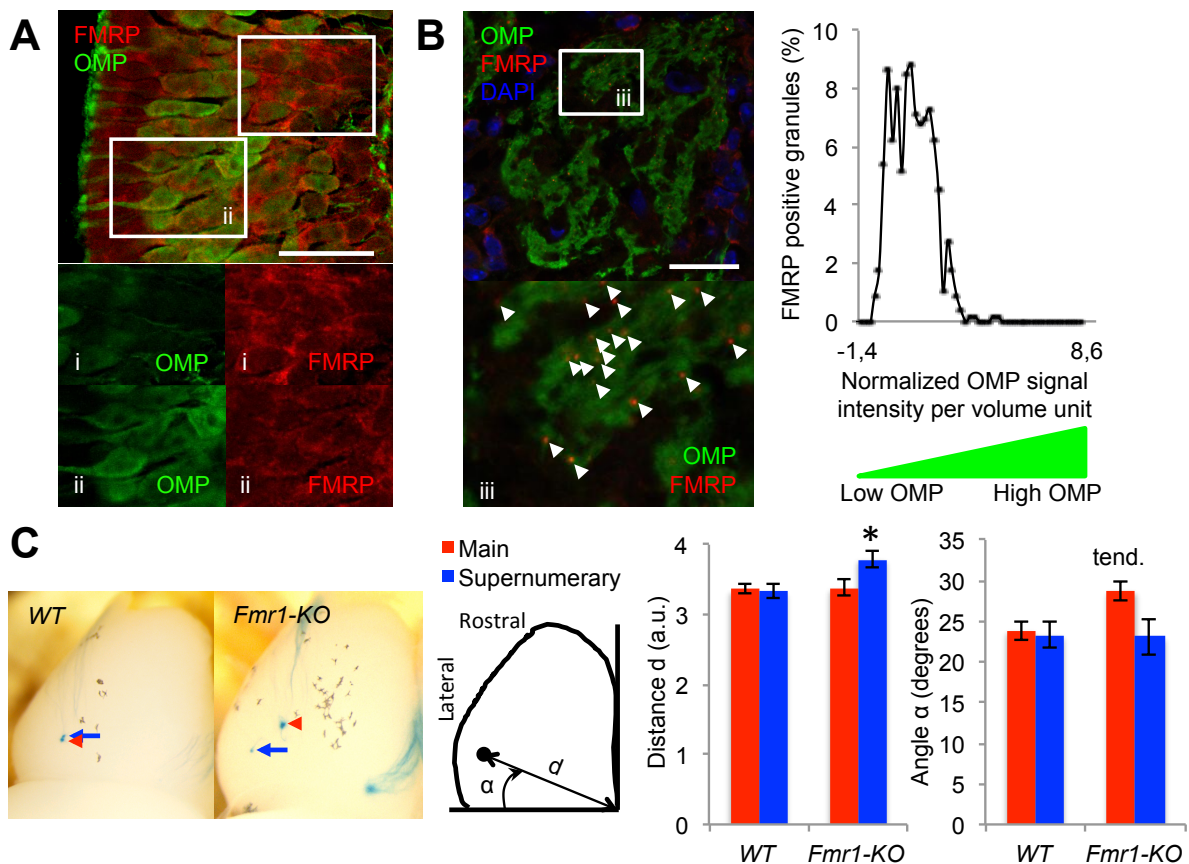


Figure 4 : Expression préférentielle de FMRP dans les neurones sensoriels olfactifs immatures et impact de l'inactivation du gène *Fmr1* sur la carte primaire olfactive. A. Immunohistochimie avec des anticorps anti-FMRP de souris (2F5, 1/200) et anti-OMP de chèvre (don de F. Margolis, 1/2.000) sur coupe d'épithélium olfactif de souris (PND30). L'intensité du signal FMRP est plus importante dans les neurones sensoriels olfactifs immatures, OMP-négatifs et situés à la base de l'épithélium (i) que dans les neurones sensoriels olfactifs matures, OMP-positifs et situés en surface de l'épithélium (ii). Barre d'échelle : 50 μ m. B. Immunofluorescence anti-FMRP et anti-OMP sur coupe de bulbe olfactif de souris (PND60). A partir d'images confocales de glomérules analysées dans le logiciel ImageJ (piles d'images de quelques centaines de nm d'épaisseur obtenues sur un microscope SP5), l'intensité du signal OMP est quantifiée dans les granules FMRP-positifs (têtes de flèche en iii ; création d'un masque puis quantification avec l'outil *3D object counter*), normalisée en centrant sur l'intensité moyenne dans les différents glomérules et séparée en intervalles de 0,2. Les granules sont majoritairement dans les zones faiblement OMP positives des glomérules. Barre d'échelle : 20 μ m (n=4 glomérules). C. Position des glomérules latéraux principaux (têtes de flèche rouge) et surnuméraires (flèches bleues) à PND5. La position de chaque glomérule est analysée en vue dorsale après révélation de l'activité bêta-galactosidase en présence de XGAL (Mombaerts et al., 1996), en définissant le glomérule principal comme celui ayant la taille apparente la plus grande dans l'hémi-bulbe considéré, et en mesurant l'angle α et la distance d à

partir du point de référence créé par l'intersection des lignes de contact entre les bulbes olfactifs et les hémisphères cérébraux (n = 27 glomérules principaux *WT* ; 24 principaux *Fmr1-KO* ; 20 surnuméraires *WT* ; 16 surnuméraires *Fmr1-KO* ; moyenne +/- SEM). Une analyse statistique par ANOVA à 2 facteurs (génotype ; catégorie de glomérules) montre un effet du génotype sur la position d, significativement différente pour les glomérules surnuméraires *Fmr1-KO* par rapport aux autres groupes (génotype $F(1;83)=5,521$ $p=0,021$; interaction génotype/catégorie $F(1;83)=4,525$ $p=0,036$; test post-hoc de Tukey, * $p<0,05$), ainsi qu'un effet de la catégorie sur la position alpha avec une tendance de position alpha différente pour les glomérules principaux *Fmr1-KO* par rapport aux autres groupes (catégorie $F(1;83)=4,251$ $p=0,042$; interaction génotype/catégorie $F(1;83)=4,525$ $p=0,098$; test post-hoc de Tukey, tend. $p<0,066$).

D'autre part, en réalisant des croisements des souris *Fmr1-KO* (Mientjes et al., 2006) avec les souris *M71-ires-tauLacZ* (Feinstein and Mombaerts, 2004), dans lesquelles le trajet des axones des neurones exprimant le récepteur olfactif M71 (produit du gène *Olfir151*) est repérable par l'activité de la bêta-galactosidase, nous avons pu montrer que la projection de ces axones vers le bulbe olfactif est altérée par la mutation *Fmr1-KO* pendant les étapes les plus précoces. Juste après la naissance, un ou plusieurs micro-glomérules surnuméraires sont souvent visibles chez les souris *WT* puis disparaissent dans les premières semaines post-natales (Zou et al., 2004). Chez les *Fmr1-KO*, le nombre de glomérules par héli-bulbe est similaire et évolue au même rythme que chez les souris sauvages de la naissance à l'âge adulte ; la taille des glomérules, principaux comme surnuméraires, est identique pour les deux génotypes (données non montrées). Cependant, en absence de FMRP, les glomérules surnuméraires et principaux semblent dans une position légèrement distincte de celle des glomérules chez les souris *WT* (Figure 4C). La position du glomérule principal n'est toutefois pas altérée chez l'adulte (données non montrées). Les modifications de la carte olfactive primaire en absence de FMRP existent mais restent donc modestes. De plus, ces modifications ne ressemblent pas à celles observées chez des mutants d'adhésion, où le nombre de glomérules à la naissance est très élevé (Hasegawa et al., 2008), ni à d'autres mutants affectant le guidage des axones des neurones sensoriels olfactifs (pour revue: Sakano, 2020).

Par ailleurs, nous avons détecté des motifs de liaison de FMRP putatifs dans le 3'UTR majoritaire de l'ARNm du récepteur olfactif *Olfir1507* (Figure 5A). J'ai alors collaboré avec B. Bardoni, qui maîtrisait les techniques biochimiques nécessaires, pour démontrer une interaction directe entre ces motifs et FMRP (Figure 5B). Cependant, l'analyse de la localisation et de la traduction des ARNm de nos récepteurs pilotes dans les axones des souris *Fmr1-KO* n'a pas permis de mettre en évidence une implication forte de FMRP dans la régulation axonale de ces ARNm (données non montrées ; travaux non publiés, présentés oralement en congrès). Toutefois, cette analyse n'a pas pu être réalisée aux âges les plus précoces en raison de la limitation de la sensibilité des techniques utilisées. Nous ne pouvons donc pas totalement exclure que la localisation et la traduction locale des ARNm de récepteurs olfactifs soient en partie dépendantes de la protéine FMRP dans les axones des neurones sensoriels olfactifs immatures dans les premiers jours après la naissance.

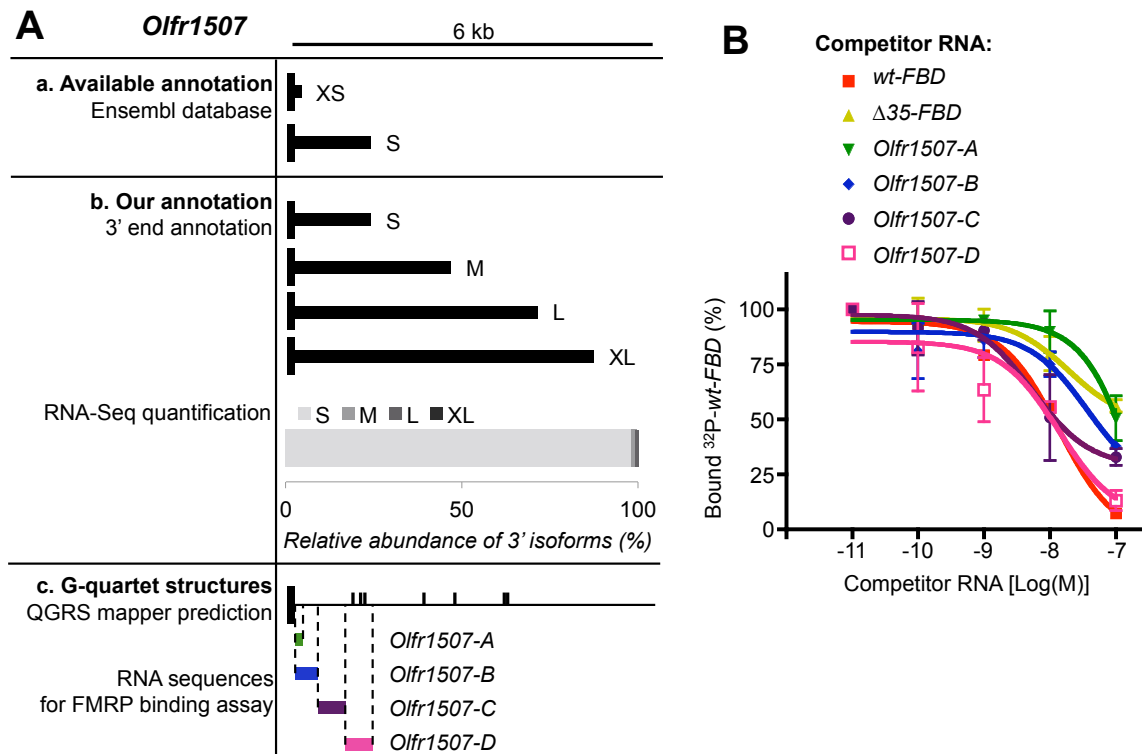


Figure 5 : Interaction de FMRP avec le 3'UTR d'un récepteur olfactif. A. Analyse des isoformes 3' pour le récepteur olfactif *Olfr1507*. Aa. Deux isoformes sont décrites dans la base de données Ensembl (voir Figure 3A pour le détail des légendes). Ab. Notre *workflow* identifie 4 3'UTR alternatifs pour *Olfr1507*. La quantification indique que l'isoforme S est très majoritaire par rapport aux autres isoformes. Des expériences complémentaires (RL-PAT et northern blot) ont montré que l'isoforme XS existe mais est de très faible abondance. Ac. Plusieurs structures G-quartet (barres verticales), potentiels domaines de liaison à FMRP, sont prédites dans le 3'UTR d'*Olfr1507* par QGRS *mapper* (Kikin et al., 2006). Le 3'UTR d'*Olfr1507* a été sous-cloné en 4 sections : 3'XS (*Olfr1507-A*) et plusieurs régions successives du 3'S (*Olfr1507-B,C,D*), dont l'une contient les structures G-quartet putatives (*Olfr1507-D*). B. Test de liaison de FMRP à ces 4 séquences du 3'UTR d'*Olfr1507* par retard sur gel de GST-FMRP, en compétition avec l'ARN du domaine de liaison à *Fmr1* (ou *Fmr1-Binding Domain*, FBD) radio-marqué au ^{32}P (Schaeffer et al., 2001). La région du 3'S d'*Olfr1507* comprenant les structures G-quartet putatives (*Olfr1507-D*) entre en compétition avec la même efficacité que le témoin positif, *wt-FBD* lui-même, alors que les autres régions (*Olfr1507-A,B,C*) ont une efficacité de compétition proche de celle du témoin négatif, *FBD* avec une délétion des 35 nucléotides clés d'interaction avec FMRP ($\Delta 35$ -FBD).

Discussion et conclusion

Dans la première partie de ce projet, j'ai pu démontrer l'association aux polyribosomes et donc la probable traduction locale des ARNm de récepteurs olfactifs dans les axones des neurones sensoriels olfactifs chez la Souris. En raison de certaines propriétés de ces axones et des particularités d'expression des récepteurs olfactifs, nous n'avons pas été en mesure à ce jour d'aller plus loin dans la démonstration d'une synthèse locale des récepteurs olfactifs. Notamment, nous n'avons pas pu générer des souris transgéniques exprimant de manière satisfaisante un rapporteur de traduction du type de ceux utilisés avec succès pour d'autres ARNm traduits localement dans les axones (données non montrées obtenues pendant le M2 de S. Jamet ; Brittis et al., 2002; Wu et al., 2005). De même, les difficultés systémiques à obtenir des anticorps dirigés spécifiquement contre un récepteur olfactif (Low and Mombaerts, 2017) ou à obtenir des récepteurs olfactifs étiquetés pleinement fonctionnels (Feinstein et al., 2004; Fleischmann et al., 2008) ont freiné les possibilités d'étude de la synthèse locale de ces protéines. L'équipe a toutefois réussi à mettre en évidence la présence de la machinerie de traduction et de structures membranaires évoquant le

réticulum endoplasmique dans les axones des neurones sensoriels olfactifs par immunohistochimie et cryotomographie électronique (Fouquet C. et Ibrahim R., données non publiées) rendant pleinement envisageable la synthèse de protéines transmembranaires, comme par exemple les récepteurs olfactifs, par ces axones.

Les autres parties de mon projet visaient à identifier des éléments régulateurs en cis ou en trans de la localisation ou de la traduction axonale des ARNm de récepteurs olfactifs. Là, encore les spécificités du système et notamment la taille de cette famille de gènes, ont limité l'efficacité de certaines des approches envisagées. L'identification des séquences 3'UTR des récepteurs olfactifs devrait maintenant permettre de rechercher des motifs conservés qui pourraient être impliqués dans l'adressage subcellulaire des ARNm et/ou la régulation de leur traduction. Nous envisageons bien sûr l'interaction avec des RBP, dont FMRP n'est qu'un des exemples possibles, mais d'autres pistes non explorées sont à envisager comme une régulation par des miR ou d'autres modifications post-transcriptionnelles de ces ARNm (Bae and Miura, 2020). Il serait donc utile de mener de nouvelles approches haut débit pour trouver de nouveaux miR ou RBP candidats et analyser les isoformes 3' axonales des récepteurs olfactifs. Pour adresser cette dernière question, il serait possible, par exemple, de mener une analyse RNA-Seq sur des microdissections laser des couches du nerf et des glomérules du bulbe olfactif. Une analyse des profils quantitatifs de ces isoformes 3' entre les neurones immatures et matures (après séparation par FACS ou en cellule unique) serait aussi précieuse étant donné la corrélation existante entre taux de croissance axonale et présence/traduction des ARNm axonaux. La découverte d'une protéine régulatrice en trans ou d'une séquence régulatrice en cis permettrait alors d'envisager de modifier son expression ou sa séquence pour perturber le système et regarder l'impact sur la formation et le maintien de la carte glomérulaire comme nous l'avons fait pour FMRP. Une identification des ARNm associés à la RBP FMRP pourrait également révéler l'existence d'autres ARNm axonaux que ceux des récepteurs olfactifs tenant potentiellement un rôle dans la mise en place de la carte olfactive (e.g. OMP). Le développement de techniques toujours plus sensibles pourrait aujourd'hui nous permettre d'aller plus avant sur ces questions, y compris au stade post-natal précoce. Ce stade est en effet particulièrement intéressant puisque nous avons montré que la localisation axonale et la traduction locale des ARNm de récepteurs olfactifs sont quantitativement importantes et en corrélation avec l'intensité de croissance axonale des neurones sensoriels olfactifs.

En parallèle de nos travaux sur la traduction locale, nous avons démontré que l'expression hétérologue de récepteurs olfactifs dans une lignée cellulaire non-adhésive conférait à ces cellules des propriétés d'adhésion compatibles avec l'hypothèse d'un rôle des récepteurs olfactifs dans le tri et la coalescence, dépendants de propriétés d'adhésion, des axones des neurones sensoriels olfactifs (Richard, Jamet et al., 2013). Par ailleurs, il a été démontré que les récepteurs olfactifs axonaux, comme ceux présents dans les dendrites, sont couplés à une signalisation par l'AMPC et le Ca^{2+} (Lodovichi and Belluscio, 2012; Maritan et al., 2009; Pietrobon et al., 2011). Plus récemment, des travaux de l'équipe de C. Greer ont montré que le début d'expression des récepteurs olfactifs est synchrone avec la traversée par les axones de la couche du nerf olfactif, renforçant encore l'hypothèse d'un rôle des récepteurs olfactifs axonaux dans la phase finale de mise en place de la carte glomérulaire (Rodriguez-Gil et al., 2015). Enfin, un premier ligand « axonal » des récepteurs olfactifs a été identifié dans le bulbe olfactif (Zamparo et al., 2019), ouvrant de nouveaux champs d'investigation et renforçant encore l'hypothèse d'un rôle direct des récepteurs olfactifs axonaux dans la formation de la carte olfactive primaire, qui viendrait en complément des mécanismes de guidage envisagés par ailleurs (Lodovichi, 2020; Sakano, 2020).

Activités de recherche - Projet 2

Étude moléculaire et cellulaire de l'implication de RAD51 dans le développement du faisceau cortico-spinal

Au sein du projet « Identifier les gènes et comprendre les mécanismes responsables du syndrome des **M**ouvements en **M**iroir **C**ongénitaux » (MoMiC) dirigé I. Dusart (équipe DPRN) et E. Roze (Institut du Cerveau)

Introduction

Les mouvements en miroir congénitaux (MMC) sont une pathologie génétique rare autosomique dominante se traduisant par des mouvements involontaires d'un côté du corps accompagnant les mouvements volontaires de l'autre côté du corps (OMIM#157600). Cette pathologie est associée à un défaut développemental du croisement de la ligne médiane par le faisceau cortico-spinal, formé par la projection de neurones du cortex moteur vers la moelle épinière (Gallea et al., 2013; Figure 6A). Parmi les gènes responsables identifiés chez les patients MMC, notre équipe a identifié *RAD51* (Demirayak et al., 2018; Depienne et al., 2012; Franz et al., 2015; Meneret et al., 2014; Trouillard et al., 2016). *RAD51* est une protéine connue pour son rôle nucléaire dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Bonilla et al., 2020; Godin et al., 2016). L'équipe a montré que la protéine *RAD51* est détectée dans le cytoplasme des neurones cortico-spinaux ainsi qu'au niveau de leurs axones au moment et à l'endroit où ils croisent la ligne médiane chez le souriceau nouveau-né (Depienne et al., 2012; données non publiées de Q. Welniarz et M.-P. Morel; Figure 6B-E). L'ensemble de ces résultats **suggère l'existence d'un rôle inexploré de *RAD51*, cytoplasmique et autonome cellulaire, dans le développement du faisceau cortico-spinal.**

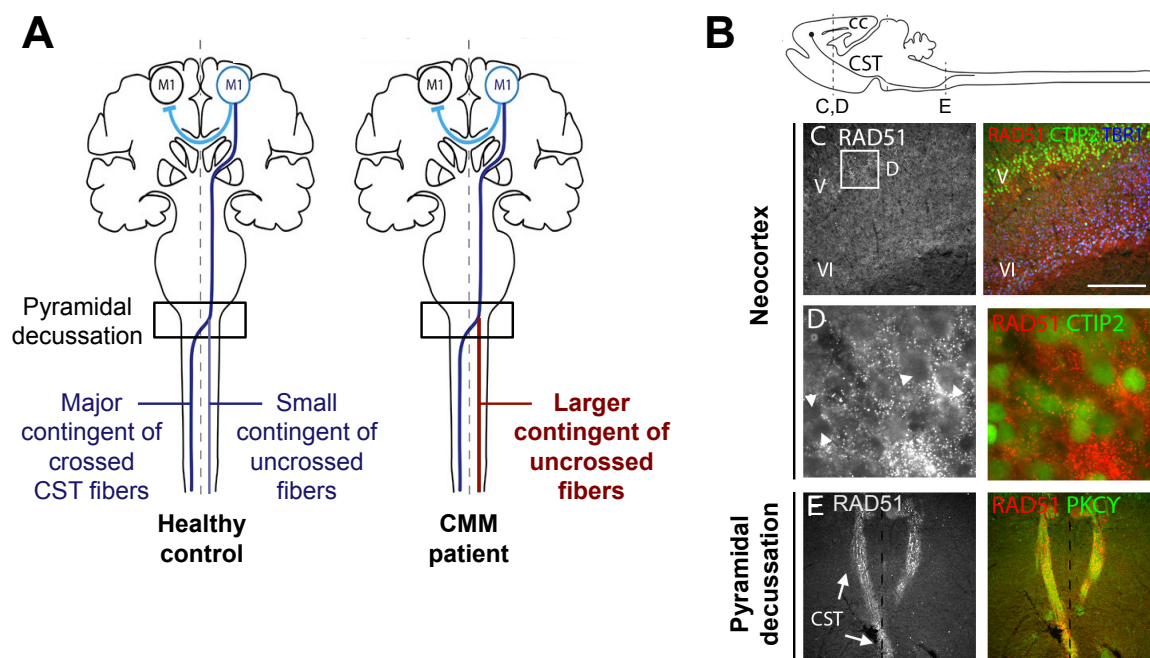


Figure 6 : Données soutenant l'hypothèse de l'implication de RAD51 dans le développement du faisceau cortico-spinal (hors génétique). A. Représentation des projections issues du cortex moteur primaire (M1) gauche : en bleu, projection cortico-spinale (CST, *corticospinal tract*) ; en turquoise, inhibition inter-hémisphérique du M1 controlatéral (adapté de Welniarz et al., 2015). Chez les contrôles sains, le faisceau

cortico-spinal croise la ligne médiane au niveau de la décussation pyramidale dans le tronc cérébral et projette de manière majoritairement controlatérale. Chez des patients MMC porteurs d'une mutation dans le gène *RAD51*, la projection du faisceau cortico-spinal du côté ipsilatéral est plus importante que chez les contrôles (en rouge). B. Présence de RAD51 en immunofluorescence avec un anticorps anti-RAD51 de chèvre (SC6862, 1/50) sur des coupes de néocortex (C,D) ou de décussation pyramidale (E) de souris au stade PND2 (données non publiées de Q. Welniarz et M.-P. Morel). La position des coupes est indiquée sur une coupe sagittale du système nerveux central. A ce stade, les axones des neurones cortico-spinaux atteignent la moelle épinière après avoir formé la décussation pyramidale dans le tronc cérébral. C,D. Les corps cellulaires des neurones cortico-spinaux sont marqués par un anticorps anti-CTIP2 de rat (Abcam, 1/500) et sont situés dans la couche V du néocortex. Ils expriment RAD51 qui montre un marquage ponctué et essentiellement cytoplasmique. E. Le signal RAD51 co-localise avec le faisceau cortico-spinal marqué par un anticorps anti-PKC γ de lapin (Santa Cruz, 1/100), suggérant la présence de RAD51 dans les axones des neurones cortico-spinaux. Barre d'échelle : C = 160 μ m, D = 18,75 μ m ; E = 320 μ m.

A l'heure actuelle, les gènes responsables des MMC identifiés, dont *RAD51*, ne couvrent que 43% des cas diagnostiqués par notre équipe (données d'O. Trouillard). Nous recherchons donc encore de nouvelles causes génétiques ou épigénétiques dans notre cohorte, afin d'améliorer l'accompagnement des patients. Ces études génétiques et nos recherches sur les causes physiopathologiques des MMC qui en découlent, nourrissent la compréhension des facteurs développementaux impliqués dans la mise en place du faisceau cortico-spinal. D'une manière intéressante, le faisceau cortico-spinal est le dernier faisceau moteur à se mettre en place (Martin et al., 2007), et semble particulièrement vulnérable au moment du croisement de la ligne médiane dans le tronc cérébral. Le paradigme des mouvements en miroir permet également d'envisager l'étude de la contribution du faisceau cortico-spinal, et de sa décussation, dans la latéralisation du contrôle moteur, en particulier la motricité volontaire fine des membres.

En rejoignant l'équipe du projet MoMiC dirigé par E. Roze et I. Dusart au milieu des années 2010, je me suis investie tout d'abord dans la compréhension de la pathogénicité des mutations identifiées dans les MMC. Ma collaboration avec E. Roze, responsable des aspects de génétique humaine du projet MoMiC, et notre co-encadrement d'O. Trouillard ont déjà menés à 2 publications communes. La première publication concerne la pathogénicité des mutations *MMC-RAD51*, favorisant l'hypothèse d'une haplo-insuffisance. La deuxième étude démontre l'existence d'un nouveau gène associé aux MMC, *NTN1* codant pour la protéine sécrétée nétrine-1, connue pour son rôle de molécule de guidage axonal. Dans le cadre de cette étude, j'ai initié la collaboration avec des spécialistes de biologie structurale (R. Guérois et J. Andreani) afin de prédire l'impact des mutations identifiées chez les patients MMC sur la structure et donc la fonctionnalité de la protéine nétrine-1. Ceci nous a permis par la suite d'établir les conséquences moléculaires et cellulaires de ces mutations et, au final, de proposer que la quantité de nétrine-1 extracellulaire soit probablement limitante chez les patients *MMC-NTN1*.

Au cours de ces premiers travaux collaboratifs présentés dans la partie Résultats ci-dessous, j'ai construit mon propre projet visant à élucider le nouveau rôle cytoplasmique de RAD51 dans les neurones cortico-spinaux en étudiant cette question à l'échelle moléculaire et cellulaire. J'ai commencé par étudier les modifications structurales et biochimiques entraînées par les mutations *MMC-RAD51*, avec l'éclairage du large corpus de connaissances de la structure et des fonctions de RAD51 mises en jeu dans son rôle nucléaire dans la réparation de l'ADN. J'ai tiré parti de cette approche pour faire des hypothèses totalement nouvelles sur les fonctions moléculaires de RAD51 nécessaires à son rôle cytoplasmique dans les neurones cortico-spinaux. Brièvement, je propose d'étudier la capacité de RAD51 à former des complexes protéiques, comme elle en forme sur l'ADN, dans le cytoplasme des neurones

cortico-spinaux afin d'éclairer *in vitro* son rôle dans ces neurones et, à terme, dans leur projection contralatérale dans la moelle épinière. Ces travaux sont financés par l'ANR MoMiC (porté par E. Roze, I. Dusart, A. Chédotal). Ils sont étroitement liés à la partie du doctorat d'O. Trouillard qui est menée sous ma direction depuis 2019. La compréhension du nouveau rôle, très probablement cytoplasmique et autonome cellulaire, de RAD51 dans le développement du faisceau cortico-spinal, a un double intérêt pour la communauté des neurosciences et pour celle des voies de réparation des dommages de l'ADN, comme le montrent les collaborations que j'ai engagées sur ce projet. Les grands axes de développement de ce projet pour les prochaines années, ainsi que les résultats préliminaires associés, seront détaillés dans le chapitre suivant (Perspectives de recherche).

Moyens mis en œuvre

Encadrements réalisés

Doctorat :

- **TROUILLARD Oriane, doctorat commencé en avril 2019.** Part d'encadrement 40%, en vue d'une co-direction avec E. Roze. Direction actuelle : E. Roze et I. Dusart. *Génétique des mouvements en miroir congénitaux : identification de nouveaux gènes responsables et étude in vitro de l'impact des mutations RAD51.* OT est ingénieure (IE) et travaille sous mon co-encadrement depuis 2015.

M2 :

- **DUNOYER de SEGONZAC Margaux, 2018-2019.** Part d'encadrement : 55%. *Conséquences biochimiques des mutations de RAD51 impliquées dans le syndrome des mouvements en miroir.* Devenir : poursuite d'études de médecine.

Autres encadrements (sélection) :

- Tuffal A. (M1, Master Biologie-Santé, Université de Lille 2, 3 semaines en 2015-2016)
- Devakumaran S. (BTS, AFBB, en 2016-2017 ; L3 Pro-alternance, SU, en 2017-2018 ; en co-encadrement)
- Archimbaud J. et Berkate L. (M1, Master BIP, SU, 2 mois en 2019-2020)

Collaborations

- A. Chédotal, Institut de la Vision, Paris.
- M. Doulazmi, laboratoire B2A, IBPS, Paris.
- P. Dupaigne et E. Le Cam, Institut Gustave Roussy, France.
- R. Guérois et J. Andreani, CEA Paris-Saclay, Gif sur Yvette.
- S. Lambert, Institut Curie, Orsay.
- G. Rodrigues et J. Guirouilh-Barbat, Institut Cochin, Paris.
- E. Roze, Institut du Cerveau, Paris.

Financements

Projet ANR MoMiC 2018 :

184 680 € pour l'équipe ; implication dans la conception, les expériences préliminaires, la rédaction du projet, certaines collaborations ainsi que dans l'encadrement d'étudiants ou de collègues dans 3 des 10 tâches prévues. E. Roze est le porteur de ce projet. I. Dusart est l'investigatrice principale pour notre équipe et A. Chédotal est l'investigateur principal pour la 3^{ème} équipe impliquée dans ce projet.

Résultats

L'haplo-insuffisance, hypothèse pathogénique privilégiée pour les mutations *MMC-RAD51* (Trouillard et al., 2016)

Après la découverte des 2 premières mutations familiales de *RAD51*, mutations tronquantes (Depienne et al., 2012), seuls 2 cas sporadiques de pathogénicité incertaine avaient été publiés par notre équipe, et un autre cas familial par une équipe indépendante (Franz et al., 2015). En 2016, la découverte d'une mutation *MMC-RAD51* dans une nouvelle famille a été l'occasion de faire une revue de la littérature concernant les mutations *MMC-RAD51* (Trouillard et al., 2016). Ces mutations, toutes hétérozygotes dominantes, peuvent être tronquantes, avec un codon stop prématuré (Depienne et al., 2012), ou non tronquantes (Franz et al., 2015; Meneret et al., 2014). De fait, la mutation tronquante de *RAD51* qui ségrège avec les MMC dans deux familles indépendantes entraîne la dégradation par le NMD (*Nonsense-Mediated Decay*) de l'ARNm *RAD51* muté et aucune protéine mutée n'est détectable dans les extraits de lymphocytes de patients en western blot (Depienne et al., 2012; Trouillard et al., 2016). Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse pathogénique d'une haplo-insuffisance de *RAD51*. De plus, la pénétrance incomplète et la variabilité intrafamiliale des phénotypes nous ont amenés à proposer que des variations dans l'expression de l'allèle sauvage, ou d'autres facteurs génétiques, épigénétiques ou environnementaux pourraient influencer sur l'expressivité des mutations *MMC-RAD51*.

Depuis cette publication, de nouvelles mutations *MMC-RAD51* tronquantes ou non ont encore été découvertes (Demirayak et al., 2018; données non publiées d'O. Trouillard). Pour certaines de ces mutations, l'haplo-insuffisance s'explique par la dégradation de l'ARN muté ou par l'instabilité de la protéine mutée (données non montrées d'O. Trouillard). D'autres mutations semblent entraîner la production d'une protéine dont la fonction est donc très probablement altérée. L'ensemble de ces résultats confirme que *RAD51* est un des gènes responsables des MMC, et soutient l'hypothèse que les mutations *MMC-RAD51* entraînent une perte de fonction par haplo-insuffisance.

Des mutations du gène *NTNI* associées aux MMC et entraînant une diminution de la nétrine-1 extracellulaire (Ménéret et al., 2017)

Historiquement, le premier gène identifié dans les MMC est le gène *DCC* (Deleted in Colorectal Cancer), qui code pour un récepteur de molécules de guidage axonal (Depienne et al., 2011; Srour et al., 2010). Notre équipe a découvert chez des patients MMC des mutations dans le gène *NTNI*, codant pour la nétrine-1, une molécule de guidage sécrétée dont un des récepteurs est *DCC* (Ménéret et al., 2017; Figure 7A). Ces mutations étaient les premières mutations du gène *NTNI* à être identifiées en association avec une pathologie humaine. Dans un travail mené en collaboration avec A. Chédotal, nous avons pu montrer que ces mutations *MMC-NTNI*, étaient associées à une diminution de la présence de cette protéine dans l'espace extracellulaire suggérant soit un défaut de sécrétion, soit une instabilité de cette protéine après sécrétion (Figure 7B-C). Son domaine C-terminal, dont la fonction est encore peu explorée (Keino-Masu et al., 1996; Xu et al., 2014), semble donc important pour assurer sa présence extracellulaire. Ces travaux suggèrent donc un rôle prépondérant de la nétrine-1 dans la mise en place du faisceau cortico-spinal.

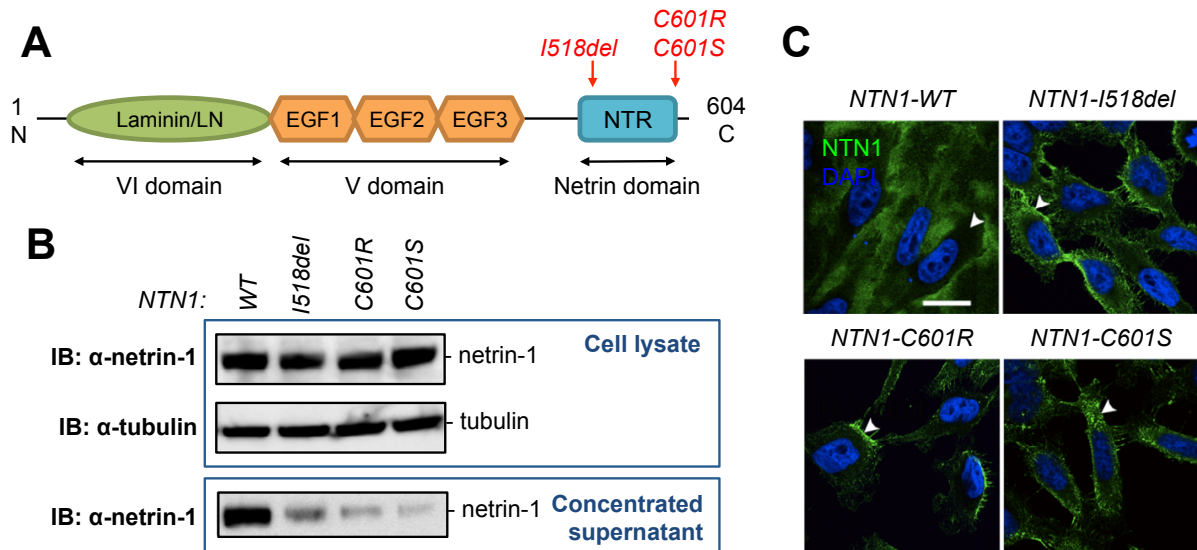


Figure 7 : Présentation synthétique des résultats moléculaires et cellulaires de l'article Méneret et al., 2017. A. Schématisation des domaines de la nétrine-1. Les résidus mutés dans les MMC (indiqués en rouge) sont dans le domaine NTR (*Netrin domain*) et jouent un rôle clé dans son repliement. B,C. Expression en lignées stables inductibles de nétrine-1 WT ou mutées en présence de doxycycline, analysée en western blot (B) ou en immunocytochimie (C). Alors que l'expression des mutants est peu affectée par rapport au WT dans les cellules, la présence des protéines mutées dans le milieu extracellulaire est très limitée par rapport à la protéine WT, qui est largement sécrétée. Barre d'échelle : 9,5 μ m.

Des travaux récents de l'équipe ont montré que l'inactivation de *NTN1* au niveau de la plaque du plancher chez la Souris récapitulait les défauts anatomiques et fonctionnels associés aux MMC (travaux non publiés d'O. Pourchet ; Pourchet et al., BioRxiv, 2020). Il a été proposé que RAD51 puisse jouer un rôle en aval de la nétrine-1 (Glendining et al., 2017). Cependant, des résultats obtenus par notre équipe sur des cultures de neurones corticaux ne viennent pas confirmer la proposition de ces auteurs. A ce jour, le rôle de RAD51 et l'impact des mutations *MMC-RAD51* sur ses fonctions dans la mise en place du faisceau cortico-spinal restent donc élusifs.

Perspectives de recherche

Comme je l'évoquais dans le chapitre des Activités de recherche – Projet 2 ci-dessus, je souhaite développer dans les prochaines années un projet de recherche visant à élucider le rôle original de RAD51 dans la mise en place de la projection cortico-spinale, mis à jour par son implication dans les MMC.

RAD51 est une recombinase très conservée chez les eucaryotes et largement étudiée dans le cadre de son rôle dans la réparation par recombinaison homologue des dommages de l'ADN, au niveau de cassures double brin ou des fourches de réplication endommagées, et des *crosslinks* entre brins d'ADN (Bonilla et al., 2020; Godin et al., 2016). Elle est de ce fait principalement exprimée dans les cellules prolifératives, où elle est incorporée dans des foci nucléaires, compartiments en phase liquide dédiés à la réparation de l'ADN (Haaf et al., 1995; Yamamoto et al., 1996). De par ce rôle, RAD51 limite l'accumulation d'ADN cytosolique et inhibe en conséquence la réponse immune innée médiée par cGAS/STING (Mukherjee et al., 2019). Dans le cytoplasme, RAD51 joue également un rôle dans la maintenance du génome mitochondrial (Sage et al., 2010) et dans la dynamique du centrosome (Daboussi et al., 2005).

Au niveau d'une cassure double brin de l'ADN vont être recrutés successivement différents acteurs de la réparation des dommages de l'ADN. RAD51 vient remplacer la protéine RPA pour couvrir l'ADN simple brin généré par digestion de l'extrémité 5' de l'ADN au site de coupure (Bonilla et al., 2020). De nombreux monomères RAD51 sont donc recrutés pour former un nucléoprotéofilament hélicoïdal par oligomérisation autour de ce brin d'ADN. La formation et la dynamique de contraction/relaxation du nucléoprotéofilament sont sous le contrôle de différents facteurs : partenaires protéiques de RAD51, notamment BRCA2 et les paralogues de RAD51; modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations; activité ATPase de RAD51 (Sullivan and Bernstein, 2018). L'action de RAD51 permet la recherche de séquences d'ADN homologues, notamment via une augmentation de la mobilité chromatiniennne dépendante du nucléosquelette (Miné-Hattab and Rothstein, 2013), et l'échange de brin entre l'ADN endommagé et l'ADN matrice de réparation (Haber, 2018).

RAD51 est une protéine indispensable à la viabilité cellulaire et les embryons de souris *RAD51*^{-/-} meurent à la naissance (Tsuzuki et al., 1996). Malgré le rôle critique de RAD51 dans la réparation des dommages de l'ADN, peu de mutations humaines de RAD51 ont été associées à des pathologies (van der Zon et al., 2018). Une unique mutation germinale a été identifiée dans des cas de cancer du sein (Kato et al., 2000). Trois mutations dominantes-négatives ont été identifiées chez des patients atteints d'Anémies de Fanconi atypiques (Ameziane et al., 2015; Takenaka et al., 2019; Wang et al., 2015). En revanche, l'expression de RAD51 est altérée dans différents types de tumeurs (Klein, 2008). La découverte des mutations dans *RAD51* chez des patients atteints de mouvements miroirs, mais pas plus de cancers ou de problèmes de reproduction que la population générale, est donc très intrigante. Contrairement aux patients *DCC-MMC* (Marsh et al., 2018), aucun cas d'agénésie du corps calleux n'a été observé à ce jour au sein des familles *RAD51-MMC*. Leur phénotype semble donc être très spécifiquement restreint : (1) au défaut développemental de croisement de la ligne médiane par le faisceau cortico-spinal et (2) à une altération des interactions inter-hémisphériques qui pourrait être adaptative (Gallea et al., 2013; travaux non publiés d'O. Pourchet; Pourchet et al., BioRxiv, 2020). L'expression de RAD51 dans les neurones cortico-spinaux (post-mitotiques) et sa présence dans le cytoplasme (à PND0-2), sa détection le long

du faisceau cortico-spinal pendant sa progression vers la moelle épinière, jusqu'à ce que la décussation se forme (à PND2-5), suggèrent encore que ce n'est pas le rôle nucléaire connu de RAD51 qui est mis en jeu dans la mise en place du faisceau cortico-spinal (Depienne et al., 2012; résultats non publiés de M.-P. Morel et Q. Welniarz). De plus, ces résultats suggèrent que ce rôle de RAD51 puisse être autonome cellulaire, alors que le rôle de DCC dans la décussation du faisceau cortico-spinal est clairement non-autonome cellulaire (Welniarz et al., 2017).

Un nouveau champ d'investigation du rôle de RAD51 dans la mise en place de la projection cortico-spinale est accessible grâce à la découverte de mutations *MMC-RAD51* non tronquantes car elles génèrent des protéines RAD51 mutées, dont l'altération de fonction ne permet plus d'assurer ce rôle. Le large faisceau de connaissances sur le rôle nucléaire de RAD51 m'a permis de proposer une hypothèse de travail que je souhaite tester en priorité au cours de ce projet. En effet, pendant la réparation de l'ADN, l'oligomérisation de RAD51 pour former un nucléoprotéofilament avec l'ADN simple brin est permise par le recrutement de plusieurs monomères RAD51 par les domaines BRC de son partenaire BRCA2 (Carreira et al., 2009; Figure 8A). Plusieurs des mutations *MMC-RAD51* touchent des résidus impliqués dans l'interface d'interaction entre monomères RAD51 (collab. avec R. Guérois et J. Andreani ; Figure 8B,D). Certains résidus pourraient également participer à l'interaction avec d'autres protéines comme son partenaire BRCA2, à la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ou aux transitions allostériques du nucléoprotéofilament (Figure 8C-D). L'oligomérisation de RAD51, indispensable à son rôle nucléaire, me semble donc être une des fonctions clé qui pourrait être importante pour son rôle cytoplasmique. Sur cette base, je propose 4 axes de recherche *in vitro* pour explorer ce nouveau rôle singulier de RAD51 dont je présente ici les principales étapes et les premiers résultats.

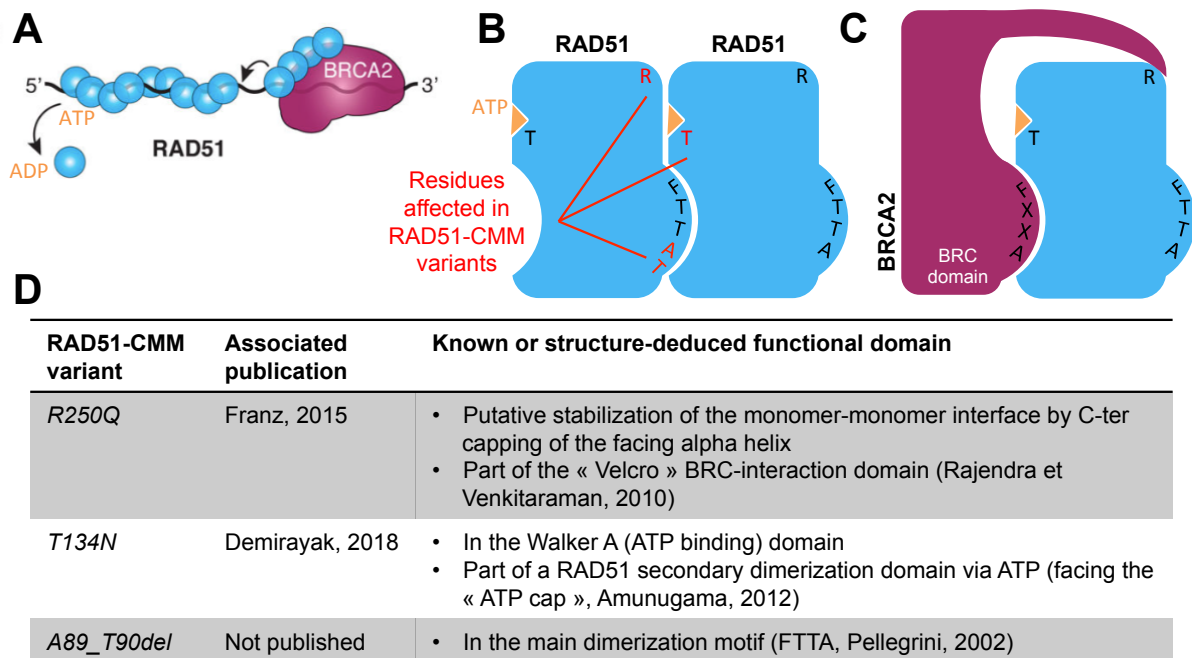


Figure 8 : Prédiction de l'impact des mutations *MMC-RAD51* sur ses fonctions connues. A. RAD51 forme un nucléoprotéofilament sur l'ADN simple brin lors de la recombinaison homologue, grâce à son recruteur BRCA2 (adapté de Bhat and Cortez, 2018). B. Schématisation de l'interaction entre 2 monomères RAD51 ; les résidus mutés dans les MMC sont indiqués en rouge au niveau de l'interface. C. Schématisation de l'interaction entre un monomère RAD51 et un des 8 domaines BRC de la protéine BRCA2. D. Récapitulatif des informations concernant les 3 mutations *MMC-RAD51* non tronquantes étudiées.

Axe 1 : Disséquer les fonctions biochimiques de RAD51 impactées par les mutations *MMC-RAD51*

Notre première étape dans l'examen des fonctions de RAD51 impactées par les mutations *MMC-RAD51* est d'étudier l'effet de ces mutations sur sa capacité à s'oligomériser. Pendant son M2, M. Dunoyer a ainsi pu démontrer que toutes les protéines RAD51 mutées testées montraient un défaut d'interaction avec la protéine RAD51 sauvage en co-immunoprécipitation (Figure 9). Les mêmes expériences menées en présence de nucléases nous permettront de tester la dépendance aux acides nucléiques de ces interactions RAD51-RAD51. Nous souhaitons également tirer parti de la capacité de la technique de *Proximity Ligation Assay* (PLA) à détecter des interactions entre protéines *in situ* pour vérifier que ces interactions entre monomères RAD51 ont bien lieu dans le cytoplasme. Pour aller plus loin dans la dissection des défauts moléculaires des mutants *MMC-RAD51*, nous disposons de protéines RAD51 recombinantes WT ou mutées (plateforme CIGEX, CEA/Fontenay) dont l'activité ATPase et la capacité à former un nucléoprotéofilament seront investiguées par des techniques de biochimie et de microscopie adaptées (So et al., 2019; collab. P. Dupaigne et E. Le Cam). La régulation de l'oligomérisation de RAD51 par des partenaires protéiques, comme BRCA2, sera étudiée. Nous testerons notamment en *pull-down* l'interaction d'un peptide BRC4 biotinylé (plateforme de synthèse peptidique, IBPS) avec les protéines RAD51 recombinantes WT ou mutées (von Nicolai et al., 2018).

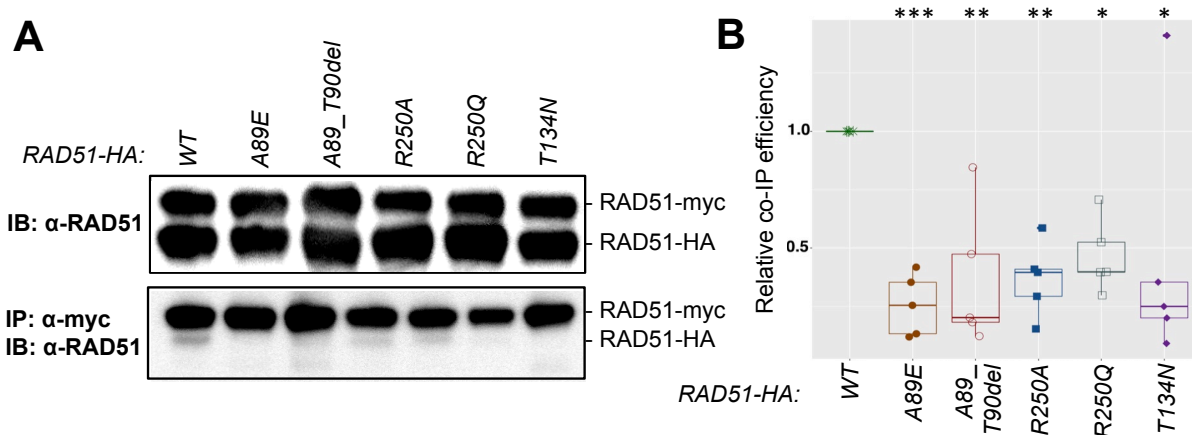


Figure 9 : Impact des mutations *MMC-RAD51* sur sa capacité à s'oligomériser. *A.* Co-immunoprécipitation avec des billes magnétiques anti-myc des protéines RAD51-myc sauvages et RAD51-HA sauvages ou mutantes, exprimées par transfection de cellules HEK293. Les mutants *A89E* et *R250A* sont des mutants expérimentaux de *RAD51* précédemment étudiés, le premier constituant un témoin de perte d'interaction RAD51-RAD51 (Pellegrini et al., 2002; Rajendra and Venkitaraman, 2010). Panneau du haut : protéines totales ; panneau du bas : protéines immunoprécipitées ; révélation avec un anticorps anti-RAD51 de lapin (Cell Signaling 8875S, 1/1000) ; RAD51-myc = 40 kDa ; RAD51-HA = 38 kDa. *B.* Après quantification de l'intensité des bandes dans ImageJ, l'efficacité relative de co-immunoprécipitation $(HA/myc)_{coIP}/(HA/myc)_{IP}$ est calculée puis normalisée par la co-immunoprécipitation des 2 protéines sauvages pour chaque expérience ($n = 6$). Toutes les protéines testées avec des mutations expérimentales ou *MMC-RAD51*, ont une interaction significativement diminuée avec RAD51 WT par rapport à l'interaction des RAD51 WT entre eux ; ANOVA, $F(5,24)=4,64$; $p=0,004$; Test post-hoc de Dunnett * = $p<0,05$. ** = $p<0,01$. *** = $p<0,001$.

Enfin, nous envisageons qu'il existe des isoformes de RAD51 spécifiques des neurones cortico-spinaux ; en effet, plusieurs isoformes de RAD51 sont documentées chez l'Homme comme chez la Souris (Park et al., 2008; base de données Ensembl, <http://www.ensembl.org>), et l'originalité du rôle de RAD51 dans le cytoplasme de cellules

post-mitotiques que nous proposons soulève la question des isoformes concernées. Nous testerons, par des techniques de RT-PCR et par l'exploitation de données haut débit appropriées (RNA-Seq sur cellules uniques par exemple), les isoformes exprimées dans les neurones cortico-spinaux postnataux chez la Souris.

Axe 2 : Identifier les partenaires cytoplasmiques de RAD51 dans les neurones cortico-spinaux

Outre BRCA2, dont l'étude est incontournable en tant que partenaire essentiel de RAD51 dans sa fonction de réparation des dommages de l'ADN, nous recherchons d'autres partenaires de RAD51 dans le cytoplasme. Nous menons en parallèle une approche candidat et une approche sans a priori. Certains des partenaires nucléaires de RAD51 sont connus pour tenir également des rôles cytoplasmiques et sont donc des candidats intéressants. Ainsi, la protéine FIGNL1 qui interagit avec RAD51 via un domaine BRC variant joue à la fois un rôle antagoniste de BRCA2 dans la recombinaison homologue et un rôle cytoplasmique dans le guidage axonal chez le Poisson zèbre (Atkins, 2018; Atkins et al., 2019; Fassier et al., 2018; Kumar et al., 2019; Yuan and Chen, 2013). Nous avons aussi entrepris la recherche de partenaires de RAD51 par co-immunoprécipitation à partir de tissus ou de neurones en culture. A cette fin, S. Devakumaran (BTS puis L3-Pro) a mis au point la microdissection et l'extraction de protéines de décussation pyramidale de souris au stade PND3 (plateforme de spectrométrie de masse, IJM ; Figure 10). Ceci nous a permis de mener une analyse préliminaire en spectrométrie de masse du protéome de décussation pyramidale à ce stade (collab. M. Doulazmi ; Figure 10). A l'instar de l'analyse différentielle spatio-temporelle déjà réalisée chez le Rat (Fuller et al., 2015), une analyse différentielle des protéomes de souris *WT* ou invalidées pour *Rad51* pourrait également nous mettre sur la piste de candidats. Les études préliminaires sont en cours dans l'équipe pour choisir la lignée de souris la plus adaptée à cette analyse.

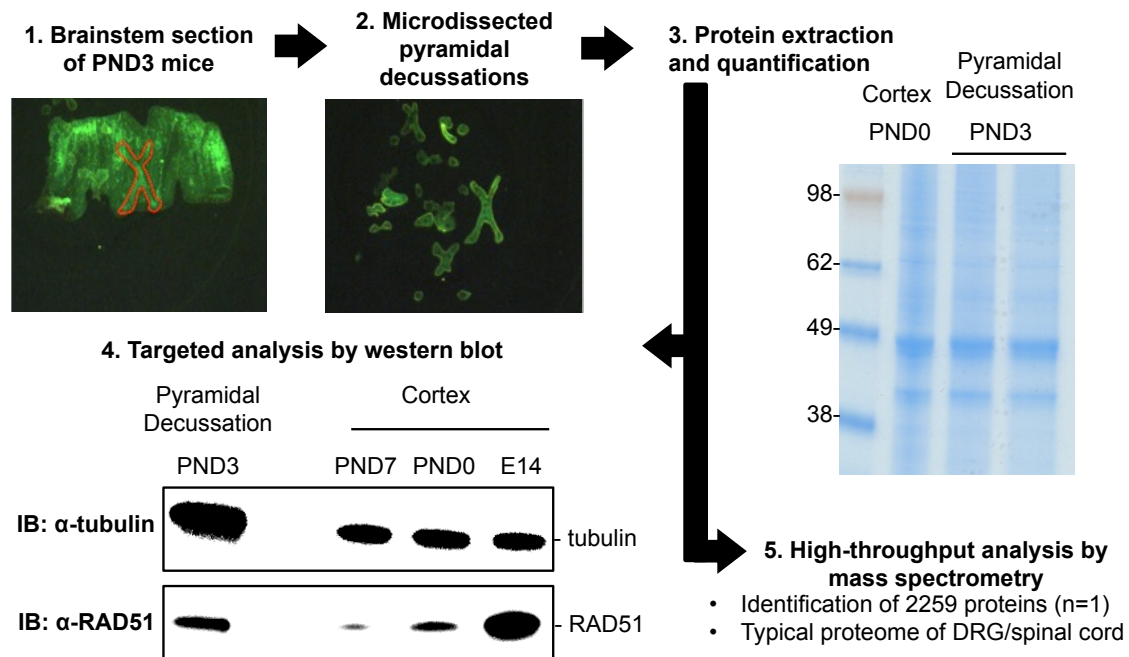


Figure 10 : Démonstration de la faisabilité d'une étude protéique ou protéomique à partir de décussation pyramidale de souris au stade PND3. Étape 1 : le croisement de la ligne médiane par le faisceau cortico-spinal (zone en croix avec un contour rouge) est repéré par le marquage vert fluorescent des axones des neurones

cortico-spinaux sur des coupes de tronc cérébral de souris *Emx1::Cre;loxStoploxTauGfp* (Gorski et al., 2002; Hippenmeyer et al., 2005) et découpé au micro-dissecteur laser. Étape 2 : les décussations de plusieurs souris sont récupérées dans des cupules permettant l'extraction des protéines en tampon RIPA. Étape 3 : la qualité des échantillons de protéines totales est vérifiée par coloration au bleu de Coomassie après migration SDS-PAGE de 10 µg (kit de dosage Micro BCA Pierce). Le profil protéique des décussations à PND3 est similaire en diversité à celui du cortex à PND0. Étape 4 : la présence d'une protéine d'intérêt (ici RAD51) peut alors être vérifiée par western blot (dépôt de 22 µg de protéines totales ; contrôles positifs = protéines totales de cortex à E14 (jour embryonnaire 14), PND0 et PND7, 2,5 µg par puits ; témoin de charge = tubuline, 50 kDa, avec l'anticorps anti-tubuline de souris T6199, 1/4000). Étape 5 : alternativement, le protéome global de l'échantillon peut être analysé après digestion par la trypsine et identification des peptides par un spectromètre de masse (Orbitrap™ Q Exactive™ Plus). Comme attendu, ce protéome montre un enrichissement maximal en gènes surexprimés dans 2 tissus de souris en lien direct avec la moelle épinière (p-ajusté DRG (*Dorsal Root Ganglion*) = 1,95E-16 ; moelle épinière = 4,86E-12 ; bibliothèque « *Mouse gene atlas* » de l'outil Enrichr (Chen et al., 2013)).

Cette technique (étapes 1-3 Figure 10) combinée à l'immunoprécipitation de RAD51 (en cours de mise au point par O. Trouillard) devrait nous permettre de confirmer l'interaction avec les partenaires candidats (par western-blot) ou d'identifier sans a priori de nouveaux partenaires cytoplasmiques de RAD51 (par spectrométrie de masse) dans les axones des neurones cortico-spinaux au moment du croisement de la ligne médiane. Si nécessaire, les mêmes études seront faites sur des fractions cytoplasmiques de neurones corticaux en culture (cultures décrites dans l'axe 3 ; fractionnements mis au point par S. Devakumaran). En outre, cette identification de nouveaux partenaires de RAD51 pourrait nous guider vers la découverte de nouveaux gènes impliqués dans les MMC dans la partie génétique du projet MoMiC.

Axe 3 : Explorer la localisation subcellulaire de RAD51 dans les neurones cortico-spinaux

L'équipe a précédemment démontré par immunohistochimie la présence de RAD51 dans le soma des neurones cortico-spinaux, sous forme de puncta cytoplasmique, ainsi qu'au niveau de la décussation pyramidale au moment de sa formation (Figure 6B). Des tests de surexpression de RAD51 WT dans des neurones corticaux embryonnaires en culture (prélevés à E14,5 pour être enrichis en neurones cortico-spinaux CTIP2⁺; Molyneaux et al., 2007) ont aussi mis en évidence la formation de puncta cytoplasmiques de RAD51 (résultats non publiés d'O. Pourchet ; Figure 11). Ces puncta cytoplasmiques rappellent la formation de foci nucléaires RAD51-positifs par accumulation de nucléoprotéofilaments dans le noyau en réponse aux dommages de l'ADN. Une étude plus fine de la localisation subcellulaire de RAD51 WT s'avère nécessaire pour définir si ces puncta de RAD51 sont associés à des compartiments subcellulaires cytoplasmiques particuliers. Tout d'abord, RAD51, protéine se liant à l'ADN nucléaire, pourrait éventuellement s'associer à des ARNm dans le cytoplasme au sein de granules nucléoprotéiques, ou à de l'ADN mitochondrial. Différentes études, notamment de biologie structurale (Brouwer et al., 2018), suggèrent cependant que RAD51 pourrait former des oligomères (anneaux ou pseudo-filaments) dans le cytoplasme en absence d'ADN. D'un autre côté, une co-localisation avec le cytosquelette pourrait nous mettre sur la piste d'un rôle « mécanique » de RAD51 dans le cytoplasme, en résonance de son implication dans la cohésion du centrosome ou celle auprès du nucléosquelette pour assurer la mobilité de l'ADN nucléaire lors de sa réparation (pour revue: Lambert, 2019). De plus, des données transcriptomiques, obtenues dans des cellules sur-exprimant RAD51 (Orre et al., 2006), suggèrent un lien entre RAD51 et la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine, régulation fondamentale pour la progression du cône de croissance et pour le guidage axonal (pour revue: Miller and Suter, 2018). D'une manière intéressante, les protéines RAD51 mutées présentent majoritairement une répartition subcellulaire diffuse (résultats non publiés

d'O. Pourchet ; Figure 11). La formation des puncta cytoplasmiques pourrait donc être nécessaire au rôle de RAD51 dans les neurones cortico-spinaux.

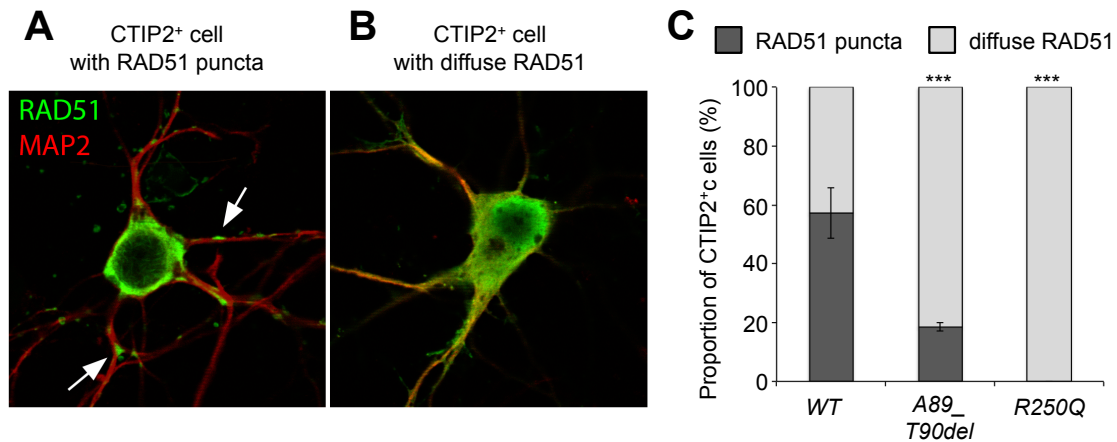


Figure 11 : Répartition subcellulaire des protéines RAD51-WT et mutantes MMC-RAD51 surexprimées par transfection de neurones corticaux en culture (prélèvement à E14,5, transfection à DIV6 (*Day In Vitro*, nombre de jours en culture), fixation à DIV7 ; données préliminaires d'O. Pourchet). A,B. En immunofluorescence, RAD51 présente une localisation majoritairement cytoplasmique soit en puncta (A, flèches) soit diffuse (B) dans les cellules CTIP2⁺ (signal CTIP2⁺ non montré ; marquage des neurites avec un anticorps anti-MAP2 de lapin AB5622, 1/500). C. La quantification de ces 2 types de répartitions subcellulaires montre que les deux mutants testés ont une répartition très majoritairement diffuse alors que RAD51 WT forme des puncta dans plus de la moitié des cellules CTIP2⁺. n = 2 expériences indépendantes, 35 cellules par condition ; test Chi2 *** : p<0,001.

Comme son oligomérisation, la localisation nucléaire de RAD51 dépend entre autres de son interaction avec BRCA2 (Jeyasekharan et al., 2013; Yu et al., 2003). La phosphorylation de certains résidus de RAD51 est associée à une localisation cytoplasmique et inhibe son oligomérisation (Alligand et al., 2017; Slupianek et al., 2011). Nous étudierons les modifications post-traductionnelles de RAD51 par western blot dans les neurones cortico-spinaux de souris grâce à des anticorps spécifiques des formes phosphorylées de RAD51, et le cas échéant nous rechercherons si ces modifications post-traductionnelles correspondent à des localisations subcellulaires particulières de la protéine. A plus long terme, l'impact d'autres modifications post-traductionnelles connues de RAD51 (clivage, ubiquitinylation, sumoylation etc...) sur sa localisation cytoplasmique sera éventuellement étudié.

Axe 4 : Analyser l'impact cellulaire d'une modification de l'expression de RAD51 WT ou mutée

En parallèle des hypothèses moléculaires présentées ci-dessus, je m'interroge *in fine* sur le rôle de RAD51 à l'échelle cellulaire. La dernière partie de la thèse d'O. Trouillard consistera donc à étudier sur des cultures de neurones corticaux de souris les effets d'une surexpression (avec des lentivirus exprimant RAD51 humain sous le contrôle du promoteur synapsine; plateforme VVTG, SFR Necker) ou d'une déplétion de RAD51 (par interférence ARN avec des miR spécifiques de *Rad51*), en analysant la morphologie des neurones et la dynamique des neurites. Les expériences de surexpression seront également menées avec les mutants *MMC-RAD51*. A plus long terme, des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) obtenues à partir de cellules de patients MMC pourraient être développées pour compléter les études fonctionnelles *in vitro* (Motono et al., 2016). Ces travaux en culture se font en complément des travaux menés *in vivo* dans l'équipe par C. Fouquet sous la direction d'I.

Dusart, notamment la surexpression de RAD51 WT ou mutée par électroporation *in utero* du cortex moteur de souris *WT* ou invalidées pour *Rad51*.

En conclusion, les mutations haplo-insuffisantes de *RAD51* associées au syndrome des mouvements en miroir congénitaux ouvrent de nouvelles perspectives concernant le rôle de la protéine RAD51 chez les Vertébrés. L'expression de RAD51 par les neurones cortico-spinaux, au sein de puncta cytoplasmiques, et sa présence au niveau du faisceau cortico-spinal semblent indiquer un rôle très original, non nucléaire, de cette protéine connue pour son rôle dans la réparation de l'ADN. Pour appréhender ce nouveau rôle, apparemment spécifique des neurones cortico-spinaux au moment où leurs axones croisent la ligne médiane, nous pouvons tirer parti de l'étude des protéines RAD51 mutées non fonctionnelles, générées chez les patients porteurs de mutations *MMC-RAD51* non tronquantes. L'abondante littérature concernant la structure et la biochimie de RAD51 m'a permis de proposer de premières hypothèses que nous commençons à tester par des approches biochimiques ou cellulaires, mais aussi *in vivo*. Nous privilégions aujourd'hui l'hypothèse de travail que la capacité de RAD51 à former des oligomères de manière contrôlée est essentielle à son rôle cytoplasmique comme elle l'est pour son rôle nucléaire. D'ailleurs, nous avons montré chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* à l'état haploïde que les mutations *MMC-RAD51* entraînent une perte de la fonction de réparation de l'ADN de RAD51 en réponse à des traitements génotoxiques (données non montrées ; collab. S. Lambert). Nous testerons prochainement la capacité à former des foci nucléaires et l'efficacité de recombinaison homologue des protéines mutées *MMC-RAD51* en cellules humaines (So et al., 2019; collab. G. Rodrigues et J. Guirouilh-Barbat). D'une manière surprenante, les patients *MMC* porteurs d'un allèle *RAD51* muté ne présentent pas plus de symptômes typiques des mutations des acteurs de la réparation des dommages de l'ADN que la population générale. Ceci suggère que l'unique allèle *RAD51 WT* des patients *MMC* suffit à assurer correctement son rôle nucléaire, mais pas son rôle cytoplasmique dans les neurones cortico-spinaux. RAD51 semble effectivement présente en excès dans les cellules par rapport aux besoins de réparation des dommages de l'ADN (Foertsch et al., 2019). Peu de mutations de *RAD51* ont été associées à la prédisposition aux cancers, bien que son expression soit dérégulée dans différents types de tumeurs (Kato et al., 2000; Klein, 2008). Par ailleurs, toutes les mutations de *RAD51* mises en évidence dans des cas d'Anémies de Fanconi atypiques sont dominantes négatives, réduisant potentiellement plus l'activité RAD51 dans les cellules que des mutations haplo-insuffisantes, comme celles identifiées dans les *MMC* (Ameziane et al., 2015; Takenaka et al., 2019; Wang et al., 2015; van der Zon et al., 2018). Avec ce projet, j'espère ainsi participer à l'élucidation de la distinction entre les rôles nucléaires et cytoplasmiques de RAD51, pour lesquels le seuil de protéines RAD51 actives nécessaire semble différent. Enfin, la dissection des fonctions biochimiques impactées par les mutations *MMC-RAD51* est d'un grand intérêt pour la communauté scientifique, dans le camp des neurosciences comme dans celui de la réparation des dommages de l'ADN, et pourrait aider à raffiner les approches thérapeutiques ciblant RAD51 dans le traitement de certains cancers (van der Zon et al., 2018).

Conclusion générale

Après mon travail doctoral dans le domaine de la réparation des dommages de l'ADN chez la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae*, j'ai développé pendant une quinzaine d'années un premier projet de recherche sur une thématique en rupture avec mon sujet de thèse : le guidage axonal des neurones sensoriels olfactifs chez la souris. Ce projet a été l'occasion de développer de nouvelles compétences dans ce domaine et sur ce modèle expérimental. En tant que biologiste moléculaire et cellulaire, j'ai apprécié de pouvoir m'attaquer à une question aussi ardue que passionnante dans le domaine des neurosciences, où j'ai développé un nouveau réseau de collaborateurs. Malgré les challenges liés à l'organisation du système olfactif des mammifères, j'ai pu faire progresser les connaissances en démontrant (1) la traduction locale axonale et (2) l'existence d'isoformes alternatives par leur 3'UTR des ARNm de récepteurs olfactifs chez la souris. Ces résultats apportent de nouveaux éléments dans le cadre de l'hypothèse d'un rôle de ces récepteurs dans le guidage des axones des neurones sensoriels olfactifs, au cœur d'un vif débat dans la communauté scientifique, et viennent compléter ceux obtenus avec d'autres membres de l'équipe sur les propriétés adhésives de ces récepteurs et la machinerie de synthèse protéique axonale. En particulier, ce projet a été pour moi l'occasion de former par la recherche 5 étudiants de master 2, dont l'un est le premier auteur pour notre équipe de notre dernière publication (dont je suis correspondante et co-dernière auteure).

J'ai amorcé depuis quelques années un nouveau changement de thématique très stimulant pour développer un projet à l'interface entre le guidage axonal et la réparation des dommages de l'ADN, deux de mes domaines de spécialité : le rôle de la recombinaison RAD51 dans le développement du faisceau cortico-spinal. Le programme de recherche que je propose pour les prochaines années se base essentiellement sur l'étude fine de la localisation et du rôle de RAD51 dans les neurones cortico-spinaux et l'exploration des fonctions de RAD51 affectées par les mutations associées au syndrome des mouvements en miroir congénitaux, en tirant profit des connaissances très larges sur les rôles cellulaires, la structure et les fonctions biochimiques de RAD51 déjà connus. Ce projet est d'autant plus original qu'il semble que RAD51 joue dans ce contexte un rôle (1) cytoplasmique, s'opposant en cela à son rôle nucléaire bien connu dans la réparation de l'ADN, (2) autonome cellulaire contrairement à celui du récepteur DCC, le principal gène associé aux mouvements miroirs congénitaux, et (3) sensible à une baisse modérée de la quantité de RAD51 fonctionnel (haplo-insuffisance d'un seul allèle sauvage). Pour mener ce nouveau projet, je bénéficie du contexte propice des équipes DPRN et MoMiC, regroupant tout à la fois l'expertise des études *in vitro* et *in vivo* du développement du système nerveux chez la souris, et celle dans la génétique et la physiopathologie des mouvements en miroir chez l'Homme. Je mets pleinement en exercice l'autonomie progressivement gagnée en terme d'encadrement, de collaborations et de financements au service de ce nouveau projet. Notamment, j'ai mis en place plusieurs collaborations personnelles déjà fructueuses et depuis plus d'un an, je co-encadre le travail de doctorat d'une collègue ingénieure sur ce sujet dans le cadre d'un financement ANR. La soutenance de mon habilitation à diriger des recherches s'inscrit donc dans le plein développement de ce projet, aujourd'hui au cœur de mon activité de recherche.

Références

- Alligand, B., Le Breton, M., Marquis, D., Vallette, F., and Fleury, F. (2017). Functional effects of diphosphomimetic mutations at cAbl-mediated phosphorylation sites on Rad51 recombinase activity. *Biochimie* 139, 115–124.
- Ameziane, N., May, P., Haitjema, A., van de Vrugt, H.J., van Rossum-Fikkert, S.E., Ristic, D., Williams, G.J., Balk, J., Rockx, D., Li, H., et al. (2015). A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nat. Commun.* 6, 8829.
- Amunugama, R., He, Y., Willcox, S., Forties, R.A., Shim, K.-S., Bundschuh, R., Luo, Y., Griffith, J., and Fishel, R. (2012). RAD51 Protein ATP Cap Regulates Nucleoprotein Filament Stability. *J. Biol. Chem.* 287, 8724–8736.
- Andreassi, C., Zimmermann, C., Mitter, R., Fusco, S., Vita, S.D., Saiardi, A., and Riccio, A. (2010). An NGF-responsive element targets myo-inositol monophosphatase-1 mRNA to sympathetic neuron axons. *Nat. Neurosci.* 13, 291–301.
- Atkins, M. (2018). Explorer le lien entre microtubules et formation des circuits moteurs par l'analyse de l'interactome de la Fidgetin-like. Thèse de doctorat. Sorbonne Université.
- Atkins, M., Gasmi, L., Bercier, V., Revenu, C., Bene, F.D., Hazan, J., and Fassier, C. (2019). FIGNL1 associates with KIF1B β and BICD1 to restrict dynein transport velocity during axon navigation. *J. Cell Biol.* 218, 3290–3306.
- Bae, B., and Miura, P. (2020). Emerging Roles for 3' UTRs in Neurons. *Int. J. Mol. Sci.* 21.
- Barnea, G., O'Donnell, S., Mancina, F., Sun, X., Nemes, A., Mendelsohn, M., and Axel, R. (2004). Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science* 304, 1468.
- Ben-Yaakov, K., Dagan, S.Y., Segal-Ruder, Y., Shalem, O., Vuppalachchi, D., Willis, D.E., Yudin, D., Rishal, I., Rother, F., Bader, M., et al. (2012). Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J.* 31, 1350–1363.
- Bhat, K.P., and Cortez, D. (2018). RPA and RAD51: fork reversal, fork protection, and genome stability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 446–453.
- Bonilla, B., Hengel, S.R., Grundy, M.K., and Bernstein, K.A. (2020). RAD51 Gene Family Structure and Function. *Annu. Rev. Genet.* 54.
- Brittis, P.A., Lu, Q., and Flanagan, J.G. (2002). Axonal Protein Synthesis Provides a Mechanism for Localized Regulation at an Intermediate Target. *Cell* 110, 223–235.
- Brouwer, I., Moschetti, T., Candelli, A., Garcin, E.B., Modesti, M., Pellegrini, L., Wuite, G.J., and Peterman, E.J. (2018). Two distinct conformational states define the interaction of human RAD51-ATP with single-stranded DNA. *EMBO J.* 37.
- Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A., and Holt, C. (2005). The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438, 94–98.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175–187.
- Campbell, D.S., and Holt, C.E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32, 1013–1026.
- Carreira, A., Hilario, J., Amitani, I., Baskin, R.J., Shivji, M.K.K., Venkitaraman, A.R., and C.Kowalczykowski, S. (2009). The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA Binding Selectivity of RAD51. *Cell* 136, 1032–1043.
- Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G.V., Clark, N.R., and Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14, 128.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H., and Axel, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78, 823–834.
- Christie, S.B., Akins, M.R., Schwob, J.E., and Fallon, J.R. (2009). The FXG: A Presynaptic Fragile X Granule Expressed in a Subset of Developing Brain Circuits. *J. Neurosci.* 29, 1514–1524.
- Daboussi, F., Thacker, J., and Lopez, B.S. (2005). Genetic interactions between RAD51 and its paralogues for centrosome fragmentation and ploidy control, independently of the sensitivity to genotoxic stresses. *Oncogene* 24, 3691–3696.
- Demirayak, P., Onat, O.E., Gevrekci, A.Ö., Gülsüner, S., Uysal, H., Bilgen, R.S., Doerschner, K., Özçelik, T.S., and Boyacı, H. (2018). Abnormal subcortical activity in congenital mirror movement disorder with RAD51 mutation. *Diagn. Interv. Radiol. Ank. Turk.* 24, 392–401.
- Depienne, C., Cincotta, M., Billot, S., Bouteiller, D., Groppa, S., Brochard, V., Flamand, C., Hubsch, C., Meunier, S., Giovannelli, F., et al. (2011). A novel DCC mutation and genetic heterogeneity in congenital

- mirror movements. *Neurology* 76, 260–264.
- Depienne, C., Bouteiller, D., Méneret, A., Billot, S., Groppa, S., Klebe, S., Charbonnier-Beaupel, F., Corvol, J.-C., Saraiva, J.-P., Brueggemann, N., et al. (2012). RAD51 Haploinsufficiency Causes Congenital Mirror Movements in Humans. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 301–307.
- Doulazmi, M., Cros, C., Dusart, I., Trembleau, A., and Dubacq, C. (2019). Alternative polyadenylation produces multiple 3' untranslated regions of odorant receptor mRNAs in mouse olfactory sensory neurons. *BMC Genomics* 20.
- Dubacq, C., Jamet, S., and Trembleau, A. (2009). Evidence for developmentally regulated local translation of odorant receptor mRNAs in the axons of olfactory sensory neurons. *J. Neurosci.* 29, 10184–10190.
- Fassier, C., Fréal, A., Gasmi, L., Delphin, C., Ten Martin, D., De Gois, S., Tambalo, M., Bosc, C., Maily, P., Revenu, C., et al. (2018). Motor axon navigation relies on Fidgetin-like 1-driven microtubule plus end dynamics. *J. Cell Biol.* 217, 1719–1738.
- Feinstein, P., and Mombaerts, P. (2004). A Contextual Model for Axonal Sorting into Glomeruli in the Mouse Olfactory System. *Cell* 117, 817–831.
- Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A., and Mombaerts, P. (2004). Axon Guidance of Mouse Olfactory Sensory Neurons by Odorant Receptors and the β 2 Adrenergic Receptor. *Cell* 117, 833–846.
- Fleischmann, A., Shykind, B.M., Sosulski, D.L., Franks, K.M., Glinka, M.E., Mei, D.F., Sun, Y., Kirkland, J., Mendelsohn, M., Albers, M.W., et al. (2008). Mice with a “monoclonal nose”: perturbations in an olfactory map impair odor discrimination. *Neuron* 60, 1068–1081.
- Foertsch, F., Kache, T., Drube, S., Biskup, C., Nasheuer, H.P., and Melle, C. (2019). Determination of the number of RAD51 molecules in different human cell lines. *Cell Cycle* 18, 3581–3588.
- Franz, E.A., Chiaroni-Clarke, R., Woodrow, S., Glendining, K.A., Jasoni, C.L., Robertson, S.P., Gardner, R.J.M., and Markie, D. (2015). Congenital mirror movements: Phenotypes associated with DCC and RAD51 mutations. *J. Neurol. Sci.* 351, 140–145.
- Fuller, H.R., Slade, R., Jovanov-Milošević, N., Babić, M., Sedmak, G., Šimić, G., Fuszard, M.A., Shirran, S.L., Botting, C.H., and Gates, M.A. (2015). Stathmin is enriched in the developing corticospinal tract. *Mol. Cell. Neurosci.* 69, 12–21.
- Gallea, C., Popa, T., Hubsch, C., Valabregue, R., Brochard, V., Kundu, P., Schmitt, B., Bardinnet, E., Bertasi, E., Flamand-Roze, C., et al. (2013). RAD51 deficiency disrupts the corticospinal lateralization of motor control. *Brain* 136, 3333–3346.
- Glendining, K.A., Markie, D., Gardner, R.J.M., Franz, E.A., Robertson, S.P., and Jasoni, C.L. (2017). A novel role for the DNA repair gene Rad51 in Netrin-1 signalling. *Sci. Rep.* 7.
- Godin, S.K., Sullivan, M.R., and Bernstein, K.A. (2016). Novel insights into RAD51 activity and regulation during homologous recombination and DNA replication. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 94, 407–418.
- Gomes, C., Merianda, T.T., Lee, S.J., Yoo, S., and Twiss, J.L. (2014). Molecular determinants of the axonal mRNA transcriptome. *Dev. Neurobiol.* 74, 218–232.
- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J.L.R., and Jones, K.R. (2002). Cortical Excitatory Neurons and Glia, But Not GABAergic Neurons, Are Produced in the Emx1-Expressing Lineage. *J. Neurosci.* 22, 6309–6314.
- Haaf, T., Golub, E.I., Reddy, G., Radding, C.M., and Ward, D.C. (1995). Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 2298–2302.
- Haber, J.E. (2018). DNA Repair: The Search for Homology. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 40, e1700229.
- Harrison, B.J., Flight, R.M., Gomes, C., Venkat, G., Ellis, S.R., Sankar, U., Twiss, J.L., Rouchka, E.C., and Petruska, J.C. (2014). IB4-binding sensory neurons in the adult rat express a novel 3' UTR-extended isoform of CaMK4 that is associated with its localization to axons. *J. Comp. Neurol.* 522.
- Hasegawa, S., Hamada, S., Kumode, Y., Esumi, S., Katori, S., Fukuda, E., Uchiyama, Y., Hirabayashi, T., Mombaerts, P., and Yagi, T. (2008). The protocadherin- α family is involved in axonal coalescence of olfactory sensory neurons into glomeruli of the olfactory bulb in mouse. *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 66–79.
- Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., and Arber, S. (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol.* 3, e159.
- Ibarra-Soria, X., Levitin, M.O., Saraiva, L.R., and Logan, D.W. (2014). The Olfactory Transcriptomes of Mice. *PLoS Genet.* 10, e1004593.
- Jeyasekharan, A.D., Liu, Y., Hattori, H., Pisupati, V., Jonsdottir, A.B., Rajendra, E., Lee, M., Sundaramoorthy, E., Schlachter, S., Kaminski, C., et al. (2013). A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1191–1198.
- Kato, M., Yano, K., Matsuo, F., Saito, H., Katagiri, T., Kurumizaka, H., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Akiyama,

- F., Sakamoto, G., et al. (2000). Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J. Hum. Genet.* *45*, 133–137.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S.-Y., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor. *Cell* *87*, 175–185.
- Kikin, O., D’Antonio, L., and Bagga, P.S. (2006). QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* *34*, W676–W682.
- Klein, H.L. (2008). The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair* *7*, 686–693.
- Kumar, R., Duhamel, M., Coutant, E., Ben-Nahia, E., and Mercier, R. (2019). Antagonism between BRCA2 and FIGL1 regulates homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* *47*, 5170–5180.
- Lambert, M.W. (2019). The functional importance of lamins, actin, myosin, spectrin and the LINC complex in DNA repair. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ *244*, 1382–1406.
- Lodovichi, C. (2020). Role of Axonal Odorant Receptors in Olfactory Topography. *Neurosci. Insights* *15*, 2633105520923411.
- Lodovichi, C., and Belluscio, L. (2012). Odorant Receptors in the Formation of the Olfactory Bulb Circuitry. *Physiology* *27*, 200–212.
- Low, V.F., and Mombaerts, P. (2017). Odorant receptor proteins in the mouse main olfactory epithelium and olfactory bulb. *Neuroscience* *344*, 167–177.
- Maritan, M., Monaco, G., Zamparo, I., Zaccolo, M., Pozzan, T., and Lodovichi, C. (2009). Odorant receptors at the growth cone are coupled to localized cAMP and Ca²⁺ increases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 3537–3542.
- Marsh, A.P.L., Edwards, T.J., Galea, C., Cooper, H.M., Engle, E.C., Jamuar, S.S., Méneret, A., Moutard, M.-L., Nava, C., Rastetter, A., et al. (2018). DCC mutation update: Congenital mirror movements, isolated agenesis of the corpus callosum, and developmental split brain syndrome. *Hum. Mutat.* *39*, 23–39.
- Martin, J.H., Friel, K.M., Salimi, I., and Chakrabarty, S. (2007). Activity- and use-dependent plasticity of the developing corticospinal system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *31*, 1125–1135.
- Mayr, C. (2017). Regulation by 3’-Untranslated Regions. *Annu. Rev. Genet.* *51*, 171–194.
- Meneret, A., Depienne, C., Riant, F., Trouillard, O., Bouteiller, D., Cincotta, M., Bitoun, P., Wickert, J., Lagroua, I., Westenberger, A., et al. (2014). Congenital mirror movements: Mutational analysis of RAD51 and DCC in 26 cases. *Neurology* *82*, 1999–2002.
- Méneret, A., Franz, E.A., Trouillard, O., Oliver, T.C., Zagar, Y., Robertson, S.P., Welniarz, Q., Gardner, R.J.M., Gallea, C., Srour, M., et al. (2017). Mutations in the netrin-1 gene cause congenital mirror movements. *J. Clin. Invest.* *127*, 3923–3936.
- Mientjes, E.J., Nieuwenhuizen, I., Kirkpatrick, L., Zu, T., Hoogeveen-Westerveld, M., Severijnen, L., Rifé, M., Willemsen, R., Nelson, D.L., and Oostra, B.A. (2006). The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. *Neurobiol. Dis.* *21*, 549–555.
- Miller, K.E., and Suter, D.M. (2018). An Integrated Cytoskeletal Model of Neurite Outgrowth. *Front. Cell. Neurosci.* *12*, 447.
- Miller, A.M., Maurer, L.R., Zou, D.-J., Firestein, S., and Greer, C.A. (2010). Axon fasciculation in the developing olfactory nerve. *Neural Develop.* *5*, 1–17.
- Miné-Hattab, J., and Rothstein, R. (2013). DNA in motion during double-strand break repair. *Trends Cell Biol.* *23*.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 427–437.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* *87*, 675–686.
- Monahan, K., and Lomvardas, S. (2015). Monoallelic Expression of Olfactory Receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *31*, 721–740.
- Motono, M., Ioroi, Y., Ogura, T., and Takahashi, J. (2016). WNT-C59, a Small-Molecule WNT Inhibitor, Efficiently Induces Anterior Cortex That Includes Cortical Motor Neurons From Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* *5*, 552–560.
- Mukherjee, S., Abdisolaam, S., Bhattacharya, S., Srinivasan, K., Sinha, D., and Asaithamby, A. (2019). Mechanistic link between DNA damage sensing, repairing and signaling factors and immune signaling. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* *115*, 297–324.
- Nedelec, S., Dubacq, C., and Trembleau, A. (2005). Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J. Neurocytol.* *34*, 49–64.
- von Nicolai, C., Ehlén, Å., Martinez, J.S., and Carreira, A. (2018). Chapter Nineteen - Dissecting the Recombination Mediator Activity of BRCA2 Using Biochemical Methods. In *Methods in Enzymology*, M. Spies, and A. Malkova, eds. (Academic Press), pp. 479–511.
- Orre, L.M., Fält, S., Szeles, A., Lewensohn, R., Wennborg, A., and Flygare, J. (2006). Rad51-related changes in

- global gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *341*, 334–342.
- Park, J.-Y., Yoo, H.-W., Kim, B.-R., Park, R., Choi, S.-Y., and Kim, Y. (2008). Identification of a novel human Rad51 variant that promotes DNA strand exchange. *Nucleic Acids Res.* *36*, 3226–3234.
- Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., and Venkitaraman, A.R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51–BRCA2 complex. *Nature* *420*, 287–293.
- Perry, R.B.-T., Doron-Mandel, E., Iavnilovitch, E., Rishal, I., Dagan, S.Y., Tsoory, M., Coppola, G., McDonald, M.K., Gomes, C., Geschwind, D.H., et al. (2012). Subcellular Knockout of Importin β 1 Perturbs Axonal Retrograde Signaling. *Neuron* *75*, 294–305.
- Pietrobon, M., Zamparo, I., Maritan, M., Franchi, S.A., Pozzan, T., and Lodovichi, C. (2011). Interplay among cGMP, cAMP, and Ca²⁺ in Living Olfactory Sensory Neurons In Vitro and In Vivo. *J. Neurosci.* *31*, 8395–8405.
- Pourchet, O., Morel, M.-P., Welniarz, Q., Sarrazin, N., Marti, F., Heck, N., Galléa, C., Doulazmi, M., Puiggros, S.R., Moreno-Bravo, J.A., et al. (2020). Loss of floor plate Netrin-1 impairs midline crossing of corticospinal axons and leads to mirror movements. *BioRxiv* 2020.02.20.958595.
- Rajendra, E., and Venkitaraman, A.R. (2010). Two modules in the BRC repeats of BRCA2 mediate structural and functional interactions with the RAD51 recombinase. *Nucleic Acids Res.* *38*, 82–96.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L., and Buck, L.B. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* *79*, 1245–1255.
- Richard, M., Jamet, S., Fouquet, C., Dubacq, C., Boggetto, N., Pincet, F., Gourier, C., and Trembleau, A. (2013). Homotypic and heterotypic adhesion induced by odorant receptors and the Beta2-adrenergic receptor. *PLoS One* *8*, e81000.
- Rodriguez-Gil, D.J., Bartel, D.L., Jaspers, A.W., Mobley, A.S., Imamura, F., and Greer, C.A. (2015). Odorant receptors regulate the final glomerular coalescence of olfactory sensory neuron axons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 5821–5826.
- Sage, J.M., Gildemeister, O.S., and Knight, K.L. (2010). Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* *285*, 18984–18990.
- Sahoo, P.K., Smith, D.S., Perrone-Bizzozero, N., and Twiss, J.L. (2018). Axonal mRNA transport and translation at a glance. *J. Cell Sci.* *131*.
- Sakano, H. (2020). Developmental regulation of olfactory circuit formation in mice. *Dev. Growth Differ.* *62*, 199–213.
- Schaeffer, C., Bardoni, B., Mandel, J.L., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Moine, H. (2001). The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J.* *20*, 4803–4813.
- Shepherd, G.M. (1981). The olfactory glomerulus: its significance for sensory processing. In *Brain Mechanisms of Sensation*, Y. Katsuki, R. Norgren, and M. Sato, eds. (New York: Wiley), pp. 209–223.
- Shum, E.Y., Espinoza, J.L., Ramaiah, M., and Wilkinson, M.F. (2015). Identification of novel post-transcriptional features in olfactory receptor family mRNAs. *Nucleic Acids Res.* gkv324.
- Slupianek, A., Dasgupta, Y., Ren, S., Gurdek, E., Donlin, M., Nieborowska-Skorska, M., Fleury, F., and Skorski, T. (2011). Targeting RAD51 phosphotyrosine-315 to prevent unfaithful recombination repair in BCR-ABL1 leukemia. *Blood* *118*, 1062–1068.
- So, A., Muhammad, A., Chailleux, C., Sanz, L.S., Ragu, S., Cam, E.L., Canitrot, Y., Masson, J.Y., Dupaigne, P., Lopez, B.S., et al. (2019). Mammalian RAD51 prevents non-conservative alternative end-joining and single strand annealing through non-catalytic mechanisms. *BioRxiv* 768887.
- Srour, M., Rivière, J.-B., Pham, J.M.T., Dubé, M.-P., Girard, S., Morin, S., Dion, P.A., Asselin, G., Rochefort, D., Hince, P., et al. (2010). Mutations in DCC Cause Congenital Mirror Movements. *Science* *328*, 592–592.
- Strotmann, J. (2004). Olfactory Receptor Proteins in Axonal Processes of Chemosensory Neurons. *J. Neurosci.* *24*, 7754–7761.
- Suardi, G.A.M., and Haddad, L.A. (2020). Chapter Three - FMRP ribonucleoprotein complexes and RNA homeostasis. In *Advances in Genetics*, D. Kumar, ed. (Academic Press), pp. 95–136.
- Sullivan, M.R., and Bernstein, K.A. (2018). RAD-ical New Insights into RAD51 Regulation. *Genes* *9*.
- Takenaka, S., Kuroda, Y., Ohta, S., Mizuno, Y., Hiwatari, M., Miyatake, S., Matsumoto, N., and Oka, A. (2019). A Japanese patient with RAD51-associated Fanconi anemia. *Am. J. Med. Genet. A.* *179*, 900–902.
- Treloar, H.B., Feinstein, P., Mombaerts, P., and Greer, C.A. (2002). Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J. Neurosci.* *22*, 2469–2477.
- Trouillard, O., Koht, J., Gerstner, T., Moland, S., Depienne, C., Dusart, I., Méneret, A., Ruiz, M., Dubacq, C., and Roze, E. (2016). Congenital Mirror Movements Due to RAD51: Cosegregation with a Nonsense Mutation in a Norwegian Pedigree and Review of the Literature. *Tremor Hyperkinetic Mov.* *6*.
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and Morita, T. (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A. *93*, 6236–6240.
- Vassar, R., Chao, S.K., Sitcheran, R., Nuñez, J.M., Vossahl, L.B., and Axel, R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* *79*, 981–991.
- Wang, A.T., Kim, T., Wagner, J.E., Conti, B.A., Lach, F.P., Huang, A.L., Molina, H., Sanborn, E.M., Zierhut, H., Cornes, B.K., et al. (2015). A dominant mutation in human RAD51 reveals its function in DNA interstrand crosslink repair independent of homologous recombination. *Mol. Cell* *59*, 478–490.
- Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., and Axel, R. (1998). Odorant Receptors Govern the Formation of a Precise Topographic Map. *Cell* *93*, 47–60.
- Welniarz, Q., Dusart, I., Gallea, C., and Roze, E. (2015). One hand clapping: lateralization of motor control. *Front. Neuroanat.* *9*.
- Welniarz, Q., Morel, M.-P., Pourchet, O., Gallea, C., Lamy, J.-C., Cincotta, M., Doulazmi, M., Belle, M., Méneret, A., Trouillard, O., et al. (2017). Non cell-autonomous role of DCC in the guidance of the corticospinal tract at the midline. *Sci. Rep.* *7*, 410.
- Wu, K.Y., Hengst, U., Cox, L.J., Macosko, E.Z., Jeromin, A., Urquhart, E.R., and Jaffrey, S.R. (2005). Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature* *436*, 1020–1024.
- Xu, K., Wu, Z., Renier, N., Antipenko, A., Tzvetkova-Robev, D., Xu, Y., Minchenko, M., Nardi-Dei, V., Rajashankar, K.R., Himanen, J., et al. (2014). Structures of netrin-1 bound to two receptors provide insight into its axon guidance mechanism. *Science* *344*, 1275–1279.
- Yamamoto, A., Yagi, H., Habu, T., Yoshimura, Y., Matsushiro, A., Nishimune, Y., Morita, T., Taki, T., Yoshida, K., Yamamoto, K., et al. (1996). Cell cycle-dependent expression of the mouseRad51 gene in proliferating cells. *Mol. Gen. Genet. MGG* *251*, 1–12.
- Yu, D.S., Sonoda, E., Takeda, S., Huang, C.L.H., Pellegrini, L., Blundell, T.L., and Venkitaraman, A.R. (2003). Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Mol. Cell* *12*, 1029–1041.
- Yuan, J., and Chen, J. (2013). FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 10640–10645.
- Yudin, D., Hanz, S., Yoo, S., Iavnilovitch, E., Willis, D., Gradus, T., Vuppalanchi, D., Segal-Ruder, Y., Ben-Yaakov, K., Hieda, M., et al. (2008). Localized Regulation of Axonal RanGTPase Controls Retrograde Injury Signaling in Peripheral Nerve. *Neuron* *59*, 241–252.
- Zamparo, I., Francia, S., Franchi, S.A., Redolfi, N., Costanzi, E., Kerstens, A., Fukutani, Y., Battistutta, R., Laureto, P.P. de, Munck, S., et al. (2019). Axonal Odorant Receptors Mediate Axon Targeting. *Cell Rep.* *29*, 4334–4348.e7.
- Zhang, X., and Firestein, S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci.* *5*, 124–133.
- Zhang, X., Rodriguez, I., Mombaerts, P., and Firestein, S. (2004). Odorant and vomeronasal receptor genes in two mouse genome assemblies. *Genomics* *83*, 802–811.
- van der Zon, N.L., Kanaar, R., and Wyman, C. (2018). Variation in RAD51 details a hub of functions: opportunities to advance cancer diagnosis and therapy. *F1000Research* *7*.
- Zou, D.-J., Feinstein, P., Rivers, A.L., Mathews, G.A., Kim, A., Greer, C.A., Mombaerts, P., and Firestein, S. (2004). Postnatal Refinement of Peripheral Olfactory Projections. *Science* *304*, 1976–1979.

Remerciements

Mon travail de recherche n'aurait pas été possible sans toutes ces rencontres, ces amitiés et ces discussions scientifiques ou plus personnelles qui construisent le parcours d'un jeune chercheur, et qui continuent à l'accompagner dans sa maturité !

Je remercie tout d'abord mes rapporteurs et les membres de mon jury qui me permettent d'accomplir la démarche de soutenir mon HDR.

Pour en revenir aux premiers émois scientifiques, je remercie le noyau dur de mon labo de thèse, en particulier Carl Mann qui m'a accueillie dans l'univers formidable de la levure pour me former, les membres de l'équipe et l'ensemble du SBGM. Les moments intenses que j'ai vécus au CEA ont participé à forger mon âme de scientifique.

Un immense merci à Alain Trembleau qui m'a accueillie dans ses projets alors que je n'y connaissais rien à rien en neurosciences, et qui m'a accompagnée à toutes les étapes de ma carrière de jeune enseignante-chercheuse. C'était une belle aventure d'être à ses côtés dans la création de l'équipe DPRN. Un clin d'œil à Odile Kellermann, ma tutrice de l'ENS, sans laquelle je n'aurais sans doute pas amorcé ce grand virage postdoctoral, fondateur de mes projets de recherche actuels. Évidemment toutes mes pensées aux membres des équipes de l'ENS qui gravitaient autour d'Alain Prochiantz, qui m'ont fait découvrir de nouveaux champs scientifiques et des projets ambitieux.

Merci à tous les membres de l'équipe DPRN passés et présents, les Isabelle, Caillé et Dusart, mes ami(e)s et collègues Sophie Scotto-Lomassese, Lamia Bouslama (ma coach !), Oriane Trouillard (à toi de jouer maintenant), Coralie Fouquet (ton tour vient ;-), Vidjea Cannaya (reviens !), Marie-Pierre Morel, Maryse Turquet (tu vas nous manquer)... tous les doctorants qui sont passés par le labo toutes ces années, qui sont toujours si jeunes, eux... Remerciements spéciaux supplémentaires à Isabelle Dusart qui, depuis qu'elle m'a fait passer de l'autre côté du miroir MoMiC, me laisse le champ (presque) libre pour développer mon projet, toujours avec bienveillance, ainsi qu'à Oriane Trouillard qui me fait confiance pour diriger une partie de son travail de thèse. J'espère que nous continuerons longtemps à nous tirer mutuellement vers le haut !

Merci aussi à toutes les plateformes et tous les collaborateurs avec lesquels depuis toutes ces années j'ai eu la chance d'interagir pour explorer des pistes, répondre à des questions, résoudre des problèmes... Je pense bien à tous, même si je ne cite que deux d'entre eux parce qu'ils ont une place spéciale dans mes projets récents et ceux à venir : Emmanuel Roze, qui me donne toujours l'impression d'être si fondamentalement à ma place, et Mohamed Doulazmi, l'homme sur qui on peut toujours compter.

Enfin, merci à tous mes stagiaires, des plus petits pioupious de licence présents pour une semaine, à ceux qui sont restés plus longtemps et que j'ai vu grandir scientifiquement ; des scientifiques purs et durs, des futurs médecins, des « qui sont partis faire autre chose après », dans les yeux desquels j'ai vu si souvent briller des étoiles à mes côtés, que je sais que je fais le métier qu'il me faut et que je le fais (au moins à peu près) bien !

Le mot de la fin sera pour mes proches : mes parents, mon mari, mes enfants qui, par leur présence, leur exemple, leur écoute, leurs conseils et leur confiance, m'ont donné tous les moyens de m'épanouir dans mon environnement professionnel.

Abstract

As a student, I was interested in understanding the links between cellular functions and the underlying molecular mechanisms. In accordance with my university training in molecular and cellular biology (ENS Paris), my PhD work in C. Mann's team (CEA/Saclay; 2000-2003) was thus dedicated to the study of signaling pathways in the DNA damage response of the model yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. We first demonstrated a new role for the Sgt1 protein as a co-chaperone of an adenylate cyclase (Dubacq et al., 2002). We then identified new pathways activated in response to the genotoxic drug hydroxyurea, involving the stress response Snf1 kinase (Dubacq et al., 2004) and the redox-responsive Yap1 and iron-mobilization Aft1/2 transcription factors (Dubacq et al., 2006).

For my first postdoctoral position, as an assistant professor (ENS Paris, 2003-2008), I joined A. Trembleau in the A. Prochiantz' team, to develop a new project on more integrative questions. There, I set up the study of local axonal translation of olfactory receptor mRNAs in the olfactory sensory neurons in mice, which was part of a larger project addressing the role of these receptors in axon guidance to form the discrete primary olfactory map (Nedelec et al., 2005). After our move to Sorbonne University, I obtained my present permanent position as a full-time assistant professor (2008) and we continued to address these questions with the financial support of ANR (2010) and NIH (2013-2017; collab. C. Greer). With S. Jamet (M2 student), we demonstrated that the axonal olfactory receptor mRNAs were actually associated with polysomes in a developmentally regulated way (Dubacq et al. 2009). In addition, local translation was evidenced in the olfactory dendrites (Persuy et al., 2011; collab. C. Baly). I then focused on potential regulation factors for olfactory receptor mRNAs. During J. Chareyre M2 internship, we studied the involvement of the RNA binding protein FMRP in olfactory neurons (collab. B. Bardoni). Thanks to C. Cros and with the help of 2 other M2 students, we recently demonstrated that olfactory receptor mRNAs are subject to a massive alternative polyadenylation, opening new avenues to study the cis regulatory sequences in their 3' untranslated regions (Doulazmi et al. 2019; collab. M. Doulazmi, D. Logan, S. Firestein). The team also showed that these receptors may have adhesion properties in line with a putative role in axon sorting (Richard, Jamet et al., 2013, Dubacq et al., 2014).

Since the late 2010ies, I'm interested in the role of the RAD51 DNA repair protein in the axonal guidance of cortico-spinal neurons. This second study is part of the MoMiC project, supported by an ANR grant (2018) and directed by I. Dusart (our team) and E. Roze (Institut du Cerveau), aiming at understanding the physiological and molecular bases of the lateralization of voluntary movements in mice and humans. It overlaps the PhD work of O. Trouillard done under my supervision. Unexpectedly, *RAD51* mutations are found in patients with Congenital Mirror Movements (Trouillard et al., 2016). My objectives are thus to dissect the RAD51 molecular functions necessary for its new cytoplasmic role in the nervous system (collab. R. Guérois & J. Andreani, S. Lambert, G. Rodrigues & J. Guirouilh-Barbat, P. Dupaigne & E. Le Cam). With M. Dunoyer (M2 student), we proved oligomerization defaults of the CMM-RAD51 loss-of-function mutants. We now plan to analyze RAD51 subcellular localization and partners, as well as the morphological changes due to mutated RAD51 expression in mouse neurons. In the same project, we previously showed that the *NTN1* mutations found in CMM patients were associated with a decreased secretion of the netrin-1 guidance cue (Méneret et al., 2017; collab. A. Chedotal).

Aside these 2 projects, I'm part of other studies in the team (Daroles et al. 2016, Stoufflet et al., 2020; collab. I. Caillé) or in the institute (Dufor et al., 2019; collab. R. Sherrard).