



HAL
open science

**Des mécanismes moléculaires aux applications cliniques.
L'essentiel du Colloque
Réplication-Réparation-Recombinaison 2019**

Sarah Lambert, Valérie Borde, Jean-Baptiste Charbonnier, Françoise Dantzer,
Olivier Espéli, Josée Guirouilh-Barbat, Bertrand Llorente, Gaëlle Legube,
Marie-Noëlle Prioleau, Pablo Radicella

► **To cite this version:**

Sarah Lambert, Valérie Borde, Jean-Baptiste Charbonnier, Françoise Dantzer, Olivier Espéli, et al.. Des mécanismes moléculaires aux applications cliniques. L'essentiel du Colloque Réplication-Réparation-Recombinaison 2019. Bulletin du Cancer, 2020, 107 (2), pp.283-287. 10.1016/j.bulcan.2020.01.003 . hal-03008947

HAL Id: hal-03008947

<https://hal.science/hal-03008947>

Submitted on 29 Sep 2021

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.

13^e Colloque Réplication-Réparation-Recombinaison :
Des mécanismes moléculaires aux applications cliniques
Presqu'île de Giens, du 21 au 24 mai 2019

Sarah Lambert, Directrice de recherche CNRS, Institut Curie, Orsay, au nom du comité d'organisation (Valérie Borde, Jean-Baptiste Charbonnier, Françoise Dantzer, Olivier Espeli, Josée Guirouilh-Barbat, Bertrand Llorente, Gaëlle Legube, Marie-Noëlle Prioleau, Pablo Radicella)

Contexte thématique du colloque : le métabolisme de l'ADN au cœur des mécanismes de la suppression tumorale

Le 13^{ème} colloque Réplication-Réparation-Recombinaison (communément appelé le meeting des « 3R ») s'est déroulé du 21 au 24 Mai 2019 à la presqu'île de Giens. Ce colloque organisé tous les deux ans depuis 1995 rassemble l'ensemble de la communauté scientifique française dite des 3R. Cette communauté s'intéresse aux mécanismes de la réplication, de la réparation et de la recombinaison de l'ADN, depuis leurs rôles fondamentaux dans le maintien de la stabilité des génomes à leurs dérégulations dans des situations pathologiques telles que le cancer. Le développement tumoral étant causé par une accumulation de modifications génétiques, bon nombre des mécanismes liés au métabolisme de l'ADN agissent comme des suppresseurs de tumeurs. Par exemple, les mutations héréditaires de BRCA1 et de BRCA2 confèrent un risque élevé de cancer du sein et de l'ovaire. Ces deux protéines sont impliquées dans les mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN, une des lésions de l'ADN les plus toxiques. La déficience en BRCA1 ou BRCA2 conduit à une instabilité génomique accrue qui découle d'un défaut de réparation par recombinaison homologue et d'une incapacité à gérer de façon appropriée le stress de réplication. Les cellules tumorales déficientes en BRCA2 et BRCA1 sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs de PARP1, une enzyme impliquée dans la détection des dommages et qui modulent la structure de la chromatine afin de faciliter la réparation de l'ADN. Ainsi l'oloparib est le premier inhibiteur de PARP à avoir reçu une AMM européenne pour traiter des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire et porteuses d'une mutation BRCA constitutionnelle et/ou tumorale. De plus, les mécanismes de la réparation, de la recombinaison et de la réplication sont fréquemment dérégulés dans les cellules tumorales, conduisant à une instabilité accrue du génome, une caractéristique typique de la plupart des cellules cancéreuses.

Dans ce contexte, les grandes questions abordées au cours de ce colloque ont été axées sur: 1) la compréhension des mécanismes de réparation de l'ADN, en intégrant l'organisation nucléaire et la structure de la chromatine, et en particulier le rôle fondamentale de BRCA1 et BRCA2 dans la promotion de la réparation par recombinaison homologue; 2) la compréhension des mécanismes de la réplication de l'ADN et comment la dérégulation de ces mécanismes contribuent à une instabilité génomique favorisant le développement tumoral; 3) la compréhension des mécanismes qui favorisent une instabilité génétique en absence de BRCA1 ou BRCA2 et comment ces mécanismes peuvent être ciblés pour améliorer la prise en charge des patients porteurs de ces mutations. Ces grandes questions ont été abordées à travers l'organisation de 9 sessions thématiques :

- Les mécanismes de la recombinaison
- Réparation et organisation nucléaire
- Les mécanismes de la réplication de l'ADN
- Le stress réplcatif

- Les réarrangements programmés des génomes
- Mutagénèse et maladies humaines
- La contribution de la structure de la chromatine au cours de la réparation et la réplication de l'ADN.
- La biologie structural des 3R
- Instabilité des génomes

Trois « keynote » orateurs étrangers ont accepté de participer à ce colloque :

- Le Pr Steve Charles Kowalczykowski (département de microbiologie et de génétique moléculaire, Université de Californie, Davis, USA)
- Le Dr André Nussenzweig (Center for Cancer Research, NIH, NCI, Betesda, USA)
- Le Dr Anja Groth (BRIC, université de Copenhague, Danemark)

Ce colloque a permis d'aborder des questions fondamentales sur le rôle des mécanismes des 3R dans la prévention de l'instabilité des génomes mais aussi dans la génération des réarrangements génomiques programmés tels que ceux nécessaires à la diversité de la réponse immunitaire ou lors de la recombinaison méiotique. Une des richesses de ce colloque a été d'adresser ces questions à travers une grande diversité d'organismes cellulaires (de la bactérie à l'homme, en passant par le modèle de la paramécie). Neufs conférenciers invités (Mireille Bétermier, Aura Carreira, Laure Crabbé, Marina Elez, Pierre-Henri Gaillard, Karl-Peter Hopfner, Jean-Sébastien Hoffmann, Etienne Schwob et Jean-Pierre de Villartay) ont présenté leurs travaux les plus récents. De nombreuses conférences ont permis d'aborder les liens entre la dérégulation des mécanismes des 3R et des pathologies, notamment dans le contexte de cancers du sein issus d'une déficiente en BRCA1 ou BRCA2. Suite à l'accumulation de stress de réplication, bon nombre de types tumoraux deviennent addictifs à certains mécanismes de réparation/réplication qui sont alors des talons d'Achille potentiels pour ces tumeurs. Ce colloque a fait émerger des acteurs des mécanismes des 3R comme de nouvelles cibles thérapeutiques anti-cancéreuses prometteuses. Les résultats les plus marquants en lien avec la biologie du cancer sont décrits dans ce compte-rendu.

Les mécanismes de la recombinaison homologue et la modulation de la sensibilité tumorale aux inhibiteurs de PARP.

Le colloque débute par la prestigieuse conférence d'ouverture du Pr Steve Charles Kowalczykowski (département de microbiologie et de génétique moléculaire, Université de Californie, Davis, USA), membre de l'académie nationale américaine des sciences. Le Pr Kowalczykowski est reconnu internationalement pour ses découvertes sur les mécanismes moléculaires de la recombinaison homologue qu'il a longtemps consacrés au système bactérien avant de se tourner vers les protéines équivalentes humaines avec notamment l'étude des fonctions biochimiques de BRCA2. Sa présentation s'intitulait « *Functions of BRCA1, BRCA2 and RAD51 in chromosome maintenance by homologous recombination* ». Les recherches menées dans son laboratoire font appel à des techniques de pointe en molécule unique afin de visualiser en temps réel les activités enzymatiques des facteurs de la recombinaison. Ses travaux ont illustré comment BRCA2 agit en tant que chaperon de l'assemblage du filament nucléoprotéique de la recombinase RAD51. BRCA2 contrôle l'assemblage de RAD51 en stimulant les étapes de nucléation sur l'ADN simple-brin, mais de façon surprenante, sans stimuler la croissance du filament. La réparation des cassures double-brin par la recombinaison homologue nécessite les paralogues de RAD51 : RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3. Steve Kowalczykowski a présenté la purification de ces paralogues et montré qu'ils s'organisent en hétéro-dimères et hétéro-tétramères. Les complexes RAD51B-RAD51C et

RAD51D-XRCC2 stimulent tous deux la réaction d'échange de brin médiée par RAD51. Les paralogues de RAD51 fonctionnent via une interaction avec la forme active de RAD51 liée à l'ATP afin de stimuler la croissance du filament nucléoprotéique. Ces travaux révèlent donc des activités enzymatiques distinctes pour BRCA2 et les paralogues de RAD51 dans le mécanisme de la recombinaison homologue, suggérant que des mutations dans ces différents médiateurs de la recombinaison pourraient avoir des conséquences distinctes dans le développement tumoral.

La thématique s'est poursuivie avec l'intervention du Dr Salomé Adam (Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Canada), post-doctorante dans le laboratoire du Dr Daniel Durocher. Adam a présenté les résultats d'un crible génomique fonctionnel afin d'identifier des gènes dont les mutations conduisent à la restauration de la recombinaison homologue, en absence de BRCA1. Ce crible a conduit à l'identification du complexe Shieldin, qui inclut SHLD1 (C20orf196), SHLD2 (FAM35A), SHLD3 (CTC-534A2.2) et REV7/MAD2L2, comme un nouvel effecteur anti-résection des cassures double-brin. La perte de Shieldin conduit à une résistance aux inhibiteurs de PARP, révélant ainsi de nouvelles pistes pour comprendre les mécanismes sous-jacents à l'émergence de résistance aux traitements.

Le point d'orgue de cette session thématique a été l'intervention du Dr André Nussenzweig (Center for Cancer Research, NIH, NCI, Bethesda, USA) portant sur « *BRCA1 haploinsufficiency is masked by RNF168-mediated chromatin ubiquitylation* ». Son laboratoire a élucidé de nombreux mécanismes fondamentaux induits par les dommages de l'ADN et a révélé le rôle critique que les protéines de la réparation jouent dans les états normaux et pathogènes. Son travail a mis en exergue l'importance des voies de réparation de l'ADN en tant que facteurs de certaines hémopathies malignes et en tant que facteurs de chimiorésistance/sensibilité dans les cancers du sein et de l'ovaire. Son exposé a porté sur une nouvelle fonction anti-recombinogénique du facteur 53BP1 (pour *p53 Binding Protein 1*), en aval de sa fonction inhibitrice de la résection des cassures double-brin. BRCA1 fonctionne à deux étapes distinctes au cours de la recombinaison homologue. Initialement, il favorise la résection de l'extrémité des cassures de l'ADN, puis recrute le complexe médiateur PALB2 et BRCA2 pour initier la formation du filament RAD51. L'absence de 53BP1 permet de restaurer la recombinaison homologue dans des cellules déficientes en BRCA1 en augmentant la résection. Ceci suggère que le rôle de BRCA1 dans le chargement de RAD51, en aval de la résection, n'est pas indispensable en l'absence de 53BP1. Les résultats d'A. Nussenzweig révèlent que la E3 ubiquitine ligase RNF168 agit de manière redondante avec BRCA1 pour charger PALB2 sur l'ADN endommagé. La perte de RNF168 prédispose au cancer chez les souris hétérozygotes pour BRCA1. Les cellules déficientes pour BRCA1 et RNF168 sont hypersensibles aux inhibiteurs de PARP. L'inhibition de la voie de l'ubiquitine de la chromatine peut donc constituer une stratégie de létalité synthétique pour les cancers déficients en BRCA1.

Nouveaux mécanismes d'instabilité des génomes en absence de BRCA2.

Deux exposés très intéressants ont mis en lumière de nouveaux mécanismes responsables d'une instabilité génétique accrue en cas de déficience en BRCA2. Les travaux de Xavier Renaudin (MRC Cancer Unit, Cambridge, UK, du laboratoire du Dr Ashok Venkitaram) indiquent un rôle de BRCA2 dans la protection de l'intégrité génomique de l'ADN mitochondrial. En effet, des structures particulières de l'ADN de type « R-loop » (formées d'hybride ADN:ARN) se forment dans l'ADN mitochondrial, bloquant ainsi sa réplication et aboutissant à des remaniements importants du génome mitochondrial. Ces résultats soulèvent la

possibilité que l'instabilité génomique mitochondriale peut accompagner la cancérogenèse associée à des mutations pathogènes inactivant BRCA2.

Un deuxième exemple original d'instabilité génomique engendrée par la déficience en BRCA2 est présenté par la lauréate du prix Ruban Rose avenir 2018, le Dr Aura Carreira (Institut Curie, Orsay). Elle décrit une nouvelle fonction de BRCA2 dans la fidélité de la ségrégation des chromosomes. En phase mitotique, BRCA2 interagit avec la Polo Kinase PLK1 qui phosphoryle BRCA2 en retour. Des variants non classifiés de BRCA2 ont été identifiés pour présenter une perte de l'interaction BRCA2-PLK1, ce qui résulte en une ségrégation fautive des chromosomes et une aneuploïdie plus fréquente. Ces travaux mettent en lumière une nouvelle fonction de BRCA2, indépendante de son rôle canonique dans la réparation de l'ADN, et qui expliquerait les fréquentes aneuploïdies observées dans les tumeurs déficientes en BRCA2.

Stress réplcatif et développement tumoral

De façon générale, le stress réplcatif peut se définir comme tout événement qui altère le processus de réplication de l'ADN. Cela peut concerner aussi bien une sur-activation ou une insuffisance des origines de réplication, un métabolisme déséquilibré qui conduit à des synthèses d'ADN inefficaces, ou encore à la présence excessive de dommages de l'ADN et de divers obstacles à la machinerie de réplication. La caractéristique typique du stress réplcatif est l'altération de la progression des fourches de réplication, altérations rapidement détectées et signalées par la cellule afin d'activer les processus nécessaires à la protection des fourches, aux contournements des dommages, et à la réactivation de la synthèse d'ADN.

Depuis la découverte que certains oncogènes induisent une réplication déséquilibrée et donc un stress réplcatif qui favorise en retour le développement tumoral, des recherches intenses sont menées pour comprendre de façon globale la réponse cellulaire au stress réplcatif, si cette réponse peut être une cible thérapeutique et quelles sont les conséquences délétères en terme de stabilité des génomes. Cette thématique a été animée par plusieurs interventions qui ont adressé les mécanismes fondamentaux de la réplication de l'ADN (les déterminants des origines, l'activation des origines, le chargement des facteurs de réplication sur les origines) et comment la dérégulation de ces mécanismes favorise une instabilité génétique qui alimente la progression tumorale.

Chaque fois qu'une cellule se divise, elle doit relever le défi de reproduire complètement et précisément ses chromosomes avant d'entrer en mitose. Contrairement à une idée reçue, il n'existe pas d'évidence de l'existence d'un mécanisme de surveillance de l'achèvement complet de la synthèse de l'ADN. Au lieu de cela, les cellules s'appuient sur des programmes de réplication efficaces utilisant des milliers d'origines de réplication placées et activées au sein du génome, ainsi que sur des mécanismes de surveillance qui retardent la mitose lorsque la réplication de l'ADN est soit interrompue, soit toujours pleinement active. Inversement, la réplication très tardive de seulement quelques régions chromosomiques, tels que les sites fragiles communs (SFC), expose les cellules au risque de ségréger leurs chromosomes alors que des régions non répliquées persistent. L'intervention du Dr Michelle Debatisse (Institut Gustave Roussy, Villejuif) a clairement illustré ce point. Les SFC sont des régions chromosomiques sujettes aux cassures en cas de stress réplcatif modéré et des points chauds de réarrangements chromosomiques dans de nombreux types de cancer. Les SFC ont tendance à se nicher dans de longs gènes, répliqués tardivement, et appauvris en site d'initiation de la réplication. Lorsque la progression des fourches est ralentie, les SFC restent sous-

répliqués lorsque les cellules entrent en mitose. Les travaux du Dr Debatisse indiquent que la fragilité des SFC peut être contournée en traitant les cellules avec un inhibiteur de CDK1 (RO3306). L'analyse de la dynamique de réplication des SFC montre, que dans ces conditions, des sites d'initiation de la réplication se forment au sein des SFC, permettant ainsi de dupliquer complètement les régions concernées. Ces travaux illustrent donc comment une pauvreté en site d'initiation peut compromettre de façon sélective la réplication de régions particulières du génome et favoriser leurs cassures.

Le Dr Etienne Schowb (Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier) a souligné l'importance de l'insuffisance de la réplication dans les cellules tumorales. En développant une nouvelle approche pour mesurer la durée de la phase S, combinée aux approches classiques d'analyse de la dynamique de réplication, E. Schowb décrit une nouvelle caractéristique cellulaire qu'il nomme Potentialité Réplivative (Replication Potency) pour définir la capacité d'un système biologique à achever la duplication de son patrimoine génétique avant la ségrégation des chromosomes en mitose. Les résultats montrent que bien que la durée de la phase S soit rallongée dans de nombreuses lignées tumorales, la potentialité réplivative est atténuée. Ceci aboutit à l'activation de la synthèse d'ADN en mitose (connue sous le nom de MiDAS pour *Mitotic DNA synthesis*) et à des mitoses catastrophiques, source de réarrangements chromosomiques. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour comprendre des liens de causalité entre stress réplivative et instabilité génétique et exploiter l'atténuation de la potentialité réplivative en tant que talon d'Achille des cellules tumorales.

L'instabilité génétique, induite par le stress réplivative ou des défauts de réparation, est non seulement une cause sous-jacente de l'initiation tumorale mais aussi un moteur de l'évolution tumorale. Ce point a été illustré par la présentation du Dr Jean-Sébastien Hoffmann (CRCT, Toulouse) qui s'est attaché à comprendre comment des mécanismes de réparation alternatifs et peu fidèles s'activent dans des tumeurs déficientes pour des voies canoniques de réparation, tels que BRCA2. Depuis plusieurs années, les travaux de J-S. Hoffmann se sont orientés vers le rôle de l'ADN polymérase Thêta (ou PolQ) dans les risques du cancer. PolQ fonctionne dans une voie de réparation alternative des cassures double-brin qui consiste en la ligature des cassures d'ADN en exploitant la présence de micro-homologie (MMEJ pour *Microhomology-Mediated End-Joining*). Il s'agit d'un mécanisme de réparation à l'origine de délétions et de translocations, en concurrence directe avec la recombinaison homologue. Les travaux indiquent que la surexpression de PolQ est significativement liée à une survie réduite des patients. L'analyse de 31 cancers triple négatif (TNBC) montre une surexpression de PolQ suite aux chimiothérapies. Ces travaux mettent en lumière PolQ comme un nouveau biomarqueur de la réponse aux traitements anti-tumoraux.

L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques aboutit à des essais précliniques. Dans ce contexte, Marit Otterli (Department of Clinical and Molecular Médecine, Trondheim, Norvège) a présenté des résultats précliniques prometteurs de l'effet anti-tumoral d'un peptide qui affecte certaines fonctions de PCNA dans la signalisation et le métabolisme cellulaire. PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) est un facteur de processivité des ADN polymérases réplivatives. PCNA interagit avec de multiples partenaires via deux motifs peptidiques, PIP-box et APIM, présents sur plus de 500 protéines. M. Otterli a développé un peptide, nommé APIM-peptide, capable de pénétrer dans les cellules. Ce peptide augmente la sensibilité des cellules à différents stress, incluant les stress génotoxiques. Le peptide APIM a une activité anti-cancéreuse dans plusieurs modèles animaux précliniques tout en présentant une faible toxicité dans les

cellules normales. Il fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase I chez des patients présentant une tumeur solide avancée.

Télomères et cancer

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques qui protègent les extrémités des chromosomes de la dégradation et de fusions chromosomiques. A chaque division cellulaire, les télomères raccourcissent en l'absence de télomérase dont l'expression est réprimée dans les cellules somatiques. Lorsqu'ils atteignent une longueur critique, les télomères sont reconnus comme étant de l'ADN endommagé et déclenchent la sénescence cellulaire. La sénescence répllicative constitue une puissante voie anti-tumorale pour bloquer le cycle cellulaire lorsque la longueur des télomères est extrêmement courte. Les cellules tumorales échappent à la sénescence répllicative soit en ré-exprimant la télomérase soit en activant des mécanismes alternatifs, dépendants de la recombinaison homologue, permettant de rallonger la taille des télomères. En utilisant le modèle de levure *Saccharomyces cerevisiae*, les Dr Marie-Noelle Simon (CRCM Marseille, de l'équipe du Dr V. Géli) et Zhou Xu (Institut de biologie Paris-Seine, Sorbonne université, Paris) ont exposé leurs travaux sur la sénescence répllicative. Le Dr Simon s'intéresse aux survivants de la sénescence et qui parviennent à maintenir les télomères par un mécanisme de recombinaison dit de type II. Ses travaux montrent l'existence de cercles télomériques dont la formation est concomitante à l'apparition des survivants de type II. Ces cercles télomériques ont été proposés comme instrumentaux dans l'allongement des télomères dans les cellules cancéreuses ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*). Ces résultats suggèrent des voies de maintien de l'allongement des télomères conservées au cours de l'évolution. Enfin, le Dr Xu a présenté une approche de microscopie couplée à de la micro-fluidique pour analyser en temps réel la sénescence répllicative dans des cellules individuelles. Les travaux indiquent que des arrêts de cycle hétérogènes surviennent fréquemment lorsque les télomères raccourcissent mais que des phénomènes d'adaptation permettent des échappements. Cette adaptation s'accompagne de réarrangements chromosomiques, indiquant que la sénescence répllicative est une phase critique à laquelle les cellules échappent au prix d'une instabilité génétique accrue.

Organisation de la chromatine, Réparation et Réplication

Le colloque s'est achevé par la prestigieuse conférence de clôture donnée par le Dr Anja Groth (BRIC, université de Copenhague, Danemark) sur « *Chromatin replication and epigenome maintenance* ». Le Dr Anja Groth est reconnue internationalement pour ses travaux portant sur la mémoire et l'identité cellulaire. La duplication fidèle du génome doit être accompagnée de la reproduction du paysage chromatinien sur de l'ADN nouvellement synthétisé. Son équipe a développé de nombreuses approches pan-génomiques afin d'identifier les mécanismes qui assurent l'établissement et le maintien de l'épigénome au cours de la division cellulaire. Son exposé a porté sur le rôle de la machinerie de réplication et de la transcription dans le recyclage des histones parentales et l'établissement de marques épigénétiques et comment ces marques influencent les voies de réparation de l'ADN. A. Groth a particulièrement insisté sur la marque d'histone H4K20Me0, traduisant l'absence de méthylation sur la lysine 20 de l'histone H4, dont l'abondance marque l'ADN nouvellement synthétisé. Ses travaux indiquent que cette marque d'histone favorise le recrutement de certains facteurs tels que BARD1, un partenaire de BRCA1, afin d'orienter la réparation vers la recombinaison homologue.

Conclusion

Dans l'ensemble, ce colloque a permis d'aborder de façon très large les mécanismes importants nécessaires au maintien de la stabilité des génomes et de mettre en perspective combien l'étude des mécanismes des 3R permet une meilleure compréhension des dysfonctionnements moléculaires pouvant aboutir à l'émergence de cellules tumorales.