

La pauvreté en sites d'initiation de la réplication rend-elle fragile certaines régions du génome ?

Anne Letessier, Daniel Birnbaum, Michelle Debatisse, Max Chaffanet

A. Letessier, D. Birnbaum, M. Chaffanet : Centre de recherche en cancérologie de Marseille,

UMR891 Inserm, Institut Paoli-Calmettes, 27, boulevard Lei Roure, 13009 Marseille, France.

M. Debatisse : Institut Curie, centre de recherche,

26, rue d'Ulm, 75248 Paris, France ; UPMC Université Paris 6, 75005, Paris ; CNRS UMR 3244, 75248 Paris, France.

chaffanetm@marseille.fnclcc.fr



► Les sites fragiles communs (SFC) sont des régions du génome où surviennent des cassures récurrentes lorsque les cellules sont exposées à des agents chimiques ou des conditions de cultures particulières (*Encadré 1*). Ils sont présents chez tous les individus, sont souvent conservés entre les espèces et chevauchent des gènes de grande taille codant pour de petits transcrits. Les SFC sont au nombre d'une centaine dans le génome des lymphocytes humains, mais seul un petit nombre d'entre eux est particulièrement instable et rend compte de plus de 80 % des lésions observées après exposition aux inducteurs [1]. L'intérêt pour les SFC vient de ce qu'ils sont considérés comme des sites préférentiels de

réarrangements chromosomiques dans différents types de cancers [2, 3] et leurs altérations interviendraient à des stades précoces de l'oncogenèse [4].

Trois grandes questions se posent encore à propos de ces régions : (1) quelles sont les causes favorisant les cassures ? (2) Quel est le mécanisme de leur instabilité ? et (3) quelles sont les conséquences de l'instabilité sur la biologie de la cellule ? Les mécanismes de l'instabilité des SFC ont longuement été débattus et sont restés spéculatifs jusqu'à récemment. Une étude du laboratoire du Pr. Michelle Debatisse, publiée en février dans le journal *Nature*, a identifié les bases moléculaires de la fragilité des SFC [5].

Hypothèses expliquant la fragilité des sites fragiles communs

L'instabilité des SFC était jusque là attribuée à la présence de séquences intrinsèquement difficiles à répliquer [1]. En effet, malgré l'absence d'identification de séquence consensus, l'analyse des SFC a montré que ces sites comportent de grandes régions riches en dinucléotides AT, présentant une grande flexibilité de l'ADN, capables de former des structures secondaires. En présence de l'inducteur classique des SFC, l'aphidicoline - un inhibiteur des ADN polymérase -, il a été montré que la réplication des SFC est spécifiquement retardée. Il a aussi été montré qu'en présence de cette drogue, les hélicases ont tendance à progresser plus vite que les polymérase, engen-

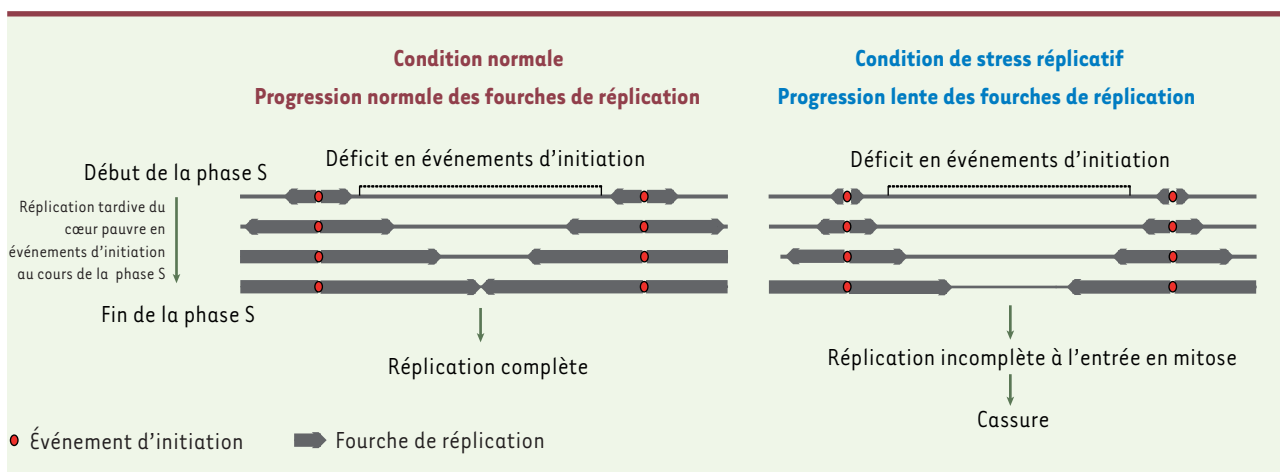


Figure 1. Modèle de l'instabilité des sites fragiles communs (SFC). Dans des conditions de croissance normale (schéma de gauche), les fourches de réplication progressent rapidement, permettant au SFC d'être complètement répliqué en fin de phase S, malgré la taille importante de la région déficiente en événements d'initiation. Dans des conditions où les fourches de réplication ralentissent (schéma de droite), la probabilité que la réplication soit incomplète à l'entrée en mitose augmente dans la région pauvre en événements d'initiation. Ceci pourrait expliquer les fréquences élevées de cassures au niveau des SFC observées sur les chromosomes mitotiques de cellules traitées à l'aphidicoline.

1 INDUCTEURS DES SITES FRAGILES COMMUNS

In vitro :

- inhibition partielle de la réplication : aphidicoline, 5-azacytidine, BrdU, FUDR ;
- condensation prématurée des chromosomes : calyculine A ;
- inhibition partielle de la transcription : camptothécine, actinomycine D.

In vivo :

- facteurs exogènes : caféine, éthanol, fumée de cigarette, pesticides ;
- agents de chimiothérapie : 5-azacytidine, actinomycine D, méthotrexate, camptothécine ;
- facteurs liés au microenvironnement tumoral : pH, hypoxie.

drant l'apparition de longues régions simple brin à la fourche de réplication [1]. Au niveau des SFC, qui contiennent des séquences capables de former des structures secondaires [1, 6, 7], l'ADN simple brin structuré pourrait bloquer la progression des fourches, conduisant à la persistance de séquences non répliquées lors de l'entrée en mitose et à l'apparition de cassures double brin lors de la condensation des chromosomes. Cependant, des études à haut débit n'ont pas confirmé la richesse particulière des SFC en séquences capables de former des structures secondaires [8]. De plus, une étude de la dynamique de réplication du SFC *FRA6E*, situé en 6q26 (Encadré 2), n'a pas montré de ralentissement spécifique de la vitesse de progression des fourches le long de ce site [9]. Les mécanismes impliqués dans l'instabilité des SFC restaient donc mal définis.

Les bases moléculaires de la fragilité des SFC et les mécanismes qui y sont associés viennent d'être identifiés, notamment pour *FRA3B* situé en 3p14 [5], le site le plus fragile du génome des lymphocytes. Letessier et al., ont analysé la dynamique de réplication de la région la plus instable de *FRA3B*, qui contient l'oncosuppresseur *FHIT* (*fragile histidine triad*) [10]. L'approche originale des auteurs a combiné

le peignage moléculaire, l'immunodétection des brins d'ADN néosynthétisés et l'hybridation par FISH (*fluorescence in situ hybridization*) de 29 sondes formant un « code barre » couvrant 1,6 Mb de séquence unique de *FRA3B*. Ces sondes ont permis de repérer et d'orienter sans ambiguïté les molécules d'ADN portant tout ou partie du gène *FHIT*. Ceci a permis de mesurer la vitesse de progression des fourches de réplication, de déterminer s'il existe des zones de ralentissement ou d'arrêt des fourches et de localiser les événements d'initiation et de terminaison de la réplication au sein de *FRA3B*. L'étude a été réalisée sur deux types de cellules, des cellules lymphoblastoïdes B transformées par le virus d'Épstein-Barr (JEF) et des fibroblastes normaux (MRC-5) qui présentent respectivement un taux élevé et faible de cassures dans *FRA3B* en présence d'aphidicoline.

Fragilité des SFC et déficit en événements d'initiation de réplication

L'étude a montré que la fragilité de *FRA3B* n'est pas comme on le croyait liée à un ralentissement ou à un blocage spécifique des fourches de réplication, mais à l'existence d'une région pauvre en événements d'initiation de la réplication. Alors que dans les fibroblastes les événements d'initiation de la réplication sont distribués sur l'ensemble du locus, dans les cellules lymphoblastoïdes, ils sont exclus d'une région d'environ 700 kb centrée sur l'exon 5 du gène *FHIT* qui correspond au cœur du SFC. Ce résultat implique que, dans les cellules lymphoblastoïdes, le cœur du site est répliqué par les fourches venant des régions flanquantes, où les événements d'initiation surviennent à une fréquence normale. Ces fourches doivent donc parcourir de longues distances pour terminer la réplication du cœur. En analysant la cinétique de réplication de *FRA3B* dans ces deux types cellulaires, Letessier et al., ont également montré que la réplication de *FRA3B* s'achève très tardivement au cours de la phase S, voire en G2. Dans

les cellules lymphoblastoïdes où le cœur de *FRA3B* est pauvre en événements d'initiation, la réplication complète du locus est spécialement dépendante de la vitesse de progression des fourches. La fragilité de *FRA3B* est spécifique des cellules présentant ce type de profil de réplication qui conduit, en conditions de stress répliatif, à une entrée en mitose de cellules n'ayant pas complètement répliqué le cœur du site. Ces conclusions ont été étendues au deuxième SFC le plus actif, *FRA16D* situé en 16q23.2 (Encadré 2). Le fait que les programmes de réplication, déterminés par des facteurs épigénétiques, soient modulables et spécifiques d'un type cellulaire donné [11-14], explique les variations des niveaux de fragilité des SFC dans différents types cellulaires. Les auteurs ont donc proposé l'hypothèse selon laquelle les SFC seraient des régions épigénétiquement définies correspondant aux dernières régions pauvres en événements d'initiation à être répliquées dans un type cellulaire donné (Figure 1).

Si notre connaissance du mécanisme des cassures des SFC s'est améliorée, il reste à déterminer si la fragilité de ces sites est une cause ou une conséquence de l'instabilité génétique pré-

2 SITES FRAGILES COMMUNS (SFC)

Les SFC de chaque chromosome sont identifiés par les lettres « FRA » (= fragile) suivies par le numéro du chromosome et une lettre qui indique le site fragile identifié sur ce chromosome. Cette lettre est déterminée par la chronologie des découvertes des sites. Tout nouveau site fragile décrit aura la lettre suivante de l'alphabet pour les distinguer le long d'un même chromosome.

FRA3B : site fragile commun, induit par l'aphidicoline, fra(3)(p14.2)

FRA6E : site fragile commun, induit par l'aphidicoline, fra(6)(q26)

FRA16D : site fragile commun, induit par l'aphidicoline, fra(16)(q23.2)



sente dans les tumeurs, et si les gènes qu'ils contiennent jouent ou non un rôle dans le processus oncogénique. En d'autres termes, il faut déterminer le rôle de ces régions dans l'oncogénèse. Cependant, historiquement, les SFC ont été majoritairement cartographiés dans les lymphocytes [15]. En accord avec ces nouveaux résultats [5], pour déterminer l'implication des SFC dans les remaniements génomiques associés aux différents types de cancers, une carte de ces SFC devra être établie dans le type cellulaire dont le cancer est originaire. ♦

Genome: does a paucity of initiation events lead to fragility?

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet* 2007 ; 41 : 169-92.
2. Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL, Glover TW. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair (Amst)* 2006 ; 5 : 1126-35.
3. Bignell GR, Greenman CD, Davies H, et al. Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature* 2010 ; 463 : 893-8.
4. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability : an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 ; 11 : 220-8.
5. Letessier A, Millot GA, Koundrioukoff S, et al. Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* 2011 ; 470 : 120-3.
6. Le Beau MM, Rassoool FV, Neilly ME, et al. Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction : implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum Mol Genet* 1998 ; 7 : 755-61.
7. Schwartz M, Zlotorynski E, Kerem B. The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Lett* 2006 ; 232 : 13-26.
8. Helmrich A, Stout-Weider K, Hermann K, et al. Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. *Genome Res* 2006 ; 16 : 1222-30.
9. Palumbo E, Matricardi L, Tosoni E, et al. Replication dynamics at common fragile site FRA6E. *Chromosoma* 2010 ; 119 : 575-87.
10. Zanesi N, Fidanza V, Fong LY, et al. The tumor spectrum in FHIT-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 10250-5.
11. Grégoire D, Brodolin K, Méchali M. HoxB domain induction silences DNA replication origins in the locus and specifies a single origin at its boundary. *EMBO Rep* 2006 ; 7 : 812-6.
12. Dazy S, Gandrillon O, Hyrien O, Prioleau MN. Broadening of DNA replication origin usage during metazoan cell differentiation. *EMBO Rep* 2006 ; 7 : 806-11.
13. Hansen RS, Thomas S, Sandstrom R, et al. Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 139-44.
14. Hiratani I, Ryba T, Itoh M, et al. Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Biol* 2008 ; 6 : e245.
15. Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 1977 ; 197 : 265-6.

NOUVELLE

La révolution 3D des cellules souches : fabrication d'une rétine *in vitro*

Muriel Perron

UPR 3294 CNRS neurobiologie et développement,
Université Paris-Sud, Orsay,
France.
muriel.perron@u-psud.fr

► Depuis plus d'un demi-siècle les biologistes ont recours à la culture cellulaire dite conventionnelle pour maintenir, en dehors d'un organisme, des cellules qui ne sont pas organisées en un tissu mais qui sont capables de se diviser et/ou de se différencier *in vitro*. Pour relever le défi de fabriquer *ex vivo* des tissus, voire des organes, des cultures cellulaires tridimensionnelles ont récemment été mises au point. Ce type d'approche vient de permettre à des chercheurs de l'Institut Riken au Japon de fabriquer pour la première fois une rétine en culture. Ces chercheurs ont montré que des cellules souches embryonnaires (CSE) pluripo-

tentes sont capables de s'auto-organiser *in vitro* pour former une structure tridimensionnelle respectant la forme, la polarité, la composition et l'agencement des différents types cellulaires d'une rétine telle qu'observée *in vivo*. Il semblerait donc que la morphogénèse rétinienne soit dictée par un programme intrinsèque au tissu et ne dépende pas, comme nous l'imaginions, d'inductions en cascades entre différents territoires embryonnaires. Cette découverte pourrait trouver des applications dans le domaine de la thérapie cellulaire pour soigner des patients atteints de dégénérescence rétinienne pour lesquels l'ab-

sence actuelle de traitement conduit à une perte de vision. Grâce à une telle avancée technologique, du tissu rétinien pourrait en effet être fabriqué en boîte et à la carte, pour une application de greffe aux malades.

Comment se forme un œil ?

La formation de l'œil des vertébrés a depuis longtemps fasciné les embryologistes et son étude fut à l'origine de la découverte de concepts fondamentaux en biologie du développement, comme les phénomènes d'induction ou de compétence. L'organogénèse de l'œil commence en fin de neurulation par