

## **Létalité synthétique et étude fonctionnelle de la déficience en ERCC1 dans le cancer bronchique non à petites cellules**

### **Résumé détaillé**

#### **Introduction**

Le cancer bronchique est la première cause de mortalité par cancer, avec 1.5 Millions de décès par an pour 1.7 Millions de nouveaux cas diagnostiqués (Jemal *et al.*, 2011). La survie médiane a récemment augmenté de 9 à 12 mois, grâce à l'avènement des thérapies ciblées (Reck *et al.*, 2013). Cependant, près de 2/3 des patients présentent une maladie métastatique au diagnostic et de nouvelles approches thérapeutiques visant à améliorer le pronostic de ces patients sont urgemment requises. Ces dernières années ont vu naître, à côté de la classification histologique classique distinguant les cancers à petites cellules des cancers non à petites cellules, une nouvelle classification moléculaire des cancers pulmonaires, basée soit sur l'existence de mutations activatrices d'oncogènes (tels *KRAS*, *EGFR*, *ALK*, *HER2*, *BRAF*, *PIK3CA* et *MET*), de mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs (tels *TP53* et *LKB1*), ou de défauts d'expression de protéines de réparation de l'ADN (tels *ERCC1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MSH2* et *RRM1*) (Reck *et al.*, 2013 ; Postel-Vinay *et al.*, 2012).

Excision Repair Cross-Complementation Group 1 (ERCC1) est une protéine de réparation de l'ADN jouant un rôle clé dans la voie Nucleotide Excision Repair (NER) (Fagbemi *et al.*, 2011), ainsi que dans certaines voies de réparation des cassures double-brins, notamment Interstrand Crosslink Repair (ICL-R), Non-Homologous End-Joining (NHEJ) ou Single Strand Annealing (SSA) (Niedernhofer *et al.*, 2004 ; Al Miwani *et al.*, 2011). De façon importante, une faible expression d'ERCC1 a été corrélée, au niveau de l'ARN comme au niveau protéique, à une meilleure réponse aux chimiothérapies à base de sels de platine dans plusieurs types de cancer, dont le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) (Olaussen *et al.*, 2006). Cependant, l'administration de sels de platine est limitée dans le temps en raison de leur toxicité, et certains patients ne sont pas éligibles à une telle chimiothérapie en raison de leur mauvais état général. Environ 50% des CBNPC présentent une

déficience en ERCC1, qui pourrait être exploitée au plan thérapeutique, notamment en utilisant des approches basées sur le concept de létalité synthétique et grâce à des molécules plus ciblées et moins toxiques que les sels de platine.

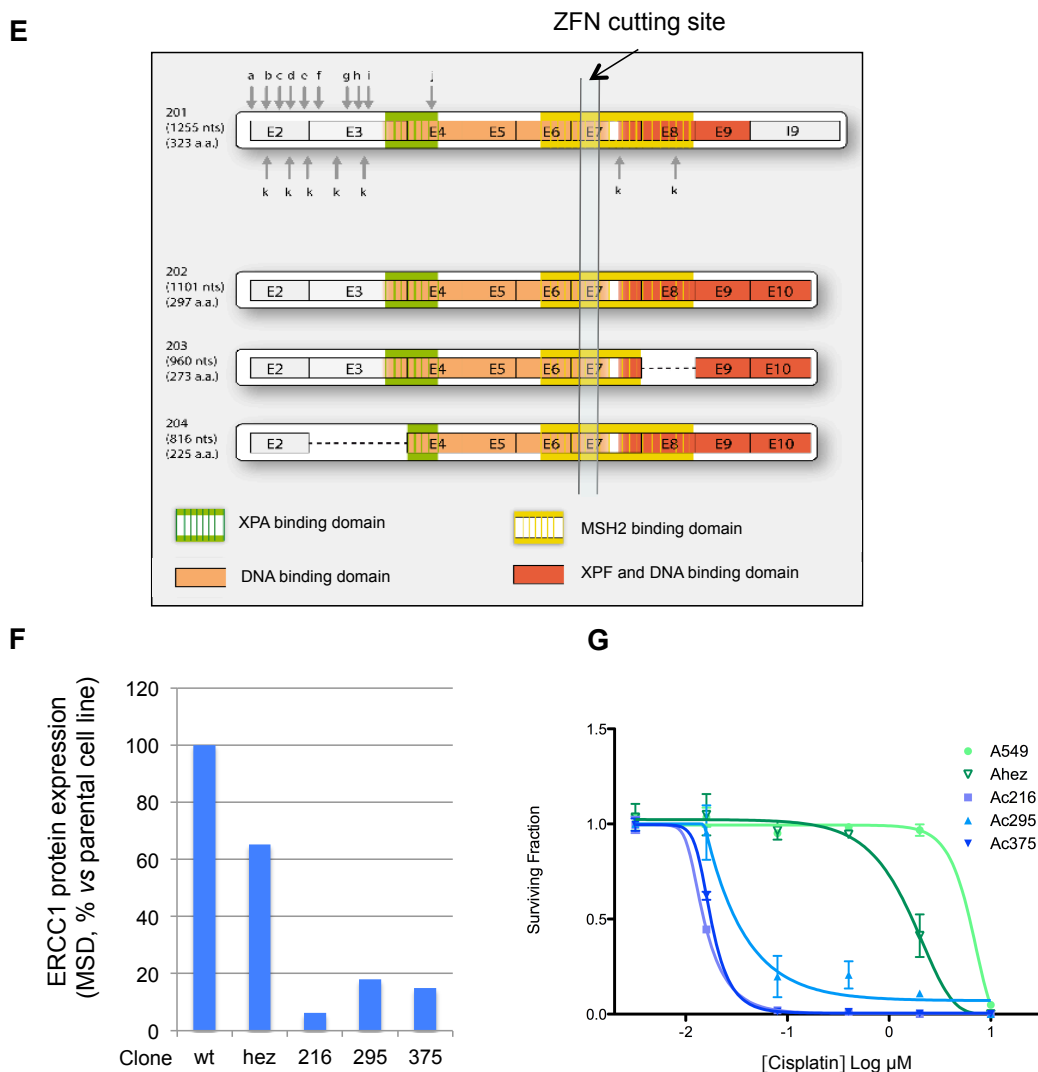
L'objectif principal de cette thèse a ainsi été la recherche de létalité synthétique avec la déficience en ERCC1 dans le CBNPC. L'objectif secondaire a consisté en l'exploration de biomarqueurs d'activité d'ERCC1.

## **1. Recherche de létalité synthétique avec la déficience en ERCC1**

### **1.1. Matériel et méthodes**

Afin de rechercher l'existence de létalité synthétique avec la déficience en ERCC1, deux approches complémentaires ont été envisagées : l'utilisation d'un modèle isogénique et l'utilisation d'un modèle non-isogénique de CBNPC déficient en ERCC1. Un modèle isogénique a d'abord été mis au point à l'Institut Gustave Roussy, dans lequel l'inactivation d'*ERCC1* a été effectuée par Zinc finger targeting. L'extrême sensibilité aux sels de platine des clones ERCC1-déficients (Ac216, Ac295 et Ac375) et la sensibilité intermédiaire du clone hétérozygote (Ahez) par rapport à la lignée parentale (A549 ERCC1-proficiente) ont démontré la pertinence clinique de ce modèle (Figure 1). Un modèle non-isogénique, constitué de 14 lignées cellulaires présentant une expression différente d'ERCC1, a également été évalué ; malheureusement, l'expression relative d'ERCC1 (niveau protéique) dans ce modèle n'a pas été corrélée à la sensibilité aux sels de platine ; ceci était probablement lié à la présence de quatre isoformes non distinguables avec les techniques actuelles, et dont un seul (l'isoforme 202) a été rapporté comme fonctionnel au cours de cette thèse (Friboulet *et al.*, 2013). Le modèle isogénique a ainsi été choisi en priorité pour la suite des travaux.





**Figure 1. Caractérisation des clones ERCC1-déficients** (continuation de la page précédente)

A) Western blot montrant l'absence de détection d'ERCC1 et XPF dans les clones Ac216, Ac295 et Ac375. B) Séquence ADN des clones (obtenue par Topo Cloning®) des 4 copies d'ERCC1 présentes dans chaque clone. C) Conséquences au niveau protéique des mutations décrites en B). D) Prédiction d'un dommage important au niveau de la fonctionnalité de la protéine suite aux deux mutations ayant pour conséquence la substitution d'un acide aminé mais n'introduisant pas de codon stop (Polyphen-2, genetics.bwh.harvard.edu/pph2). E) Représentation des domaines fonctionnels d'ERCC1 et de la localisation exonique des mutations introduites par Zinc Finger targeting. F) Quantification protéique de l'expression d'ERCC1 par MesoScale Discovery (MSD). G) Sensibilité au cisplatine des clones ERCC1-déficients, de la lignée hétérozygote et de la lignée parentale A549 ERCC1-proficiente.

## 1.2. Screens à haut débit par ARN interférence et pharmacologiques sur un modèle isogénique de déficience en ERCC1

Des screens à haut débit, utilisant des composés pharmaceutiques enregistrés ou en développement, ainsi que des siRNA (bibliothèque de plus de 2000 siRNAs ciblant principalement les gènes de réparation de l'ADN, les kinases et phosphatases, les gènes suppresseurs de tumeurs, et les acteurs du métabolisme) ont été effectués sur les cinq lignées du modèle isogénique.

### 1.2.1. Identification d'un effet sélectif des inhibiteurs de PARP dans les cellules ERCC1-déficientes

Parmi les nombreux hits mis en évidence parmi ces screens, les inhibiteurs de poly-ADP(ribose) polymérase 1 (PARP1) sont apparus être une cible très prometteuse, en raison de la reproductibilité et de la cohérence de leur effet au cours des screens avec plusieurs molécules, ainsi que de la présence d'inhibiteurs pharmacologiques très bien tolérés et actuellement à des phases avancées de leur développement (essais phases II et phases III) (Figure 2).

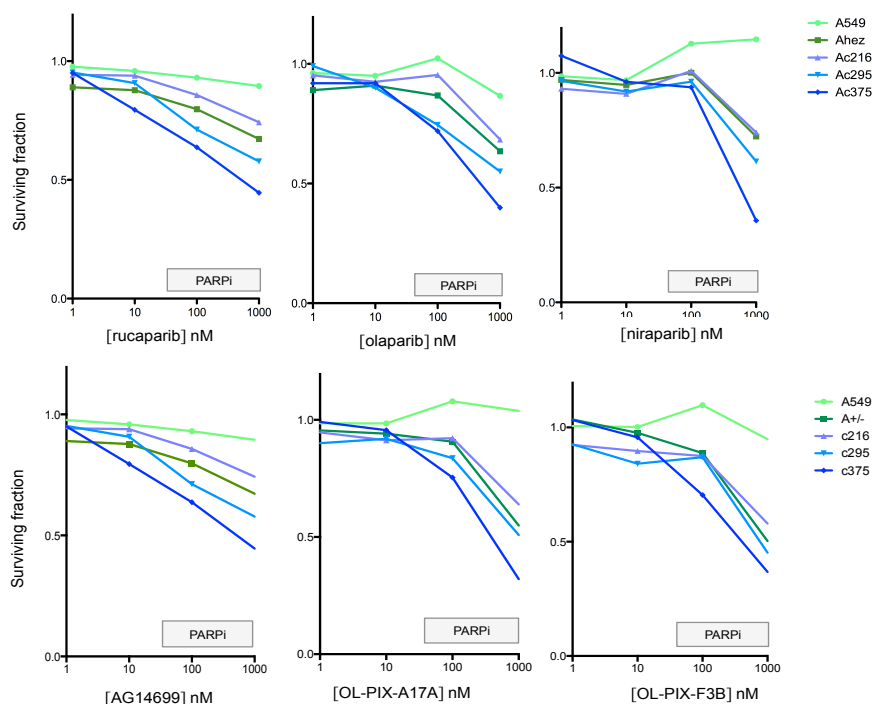


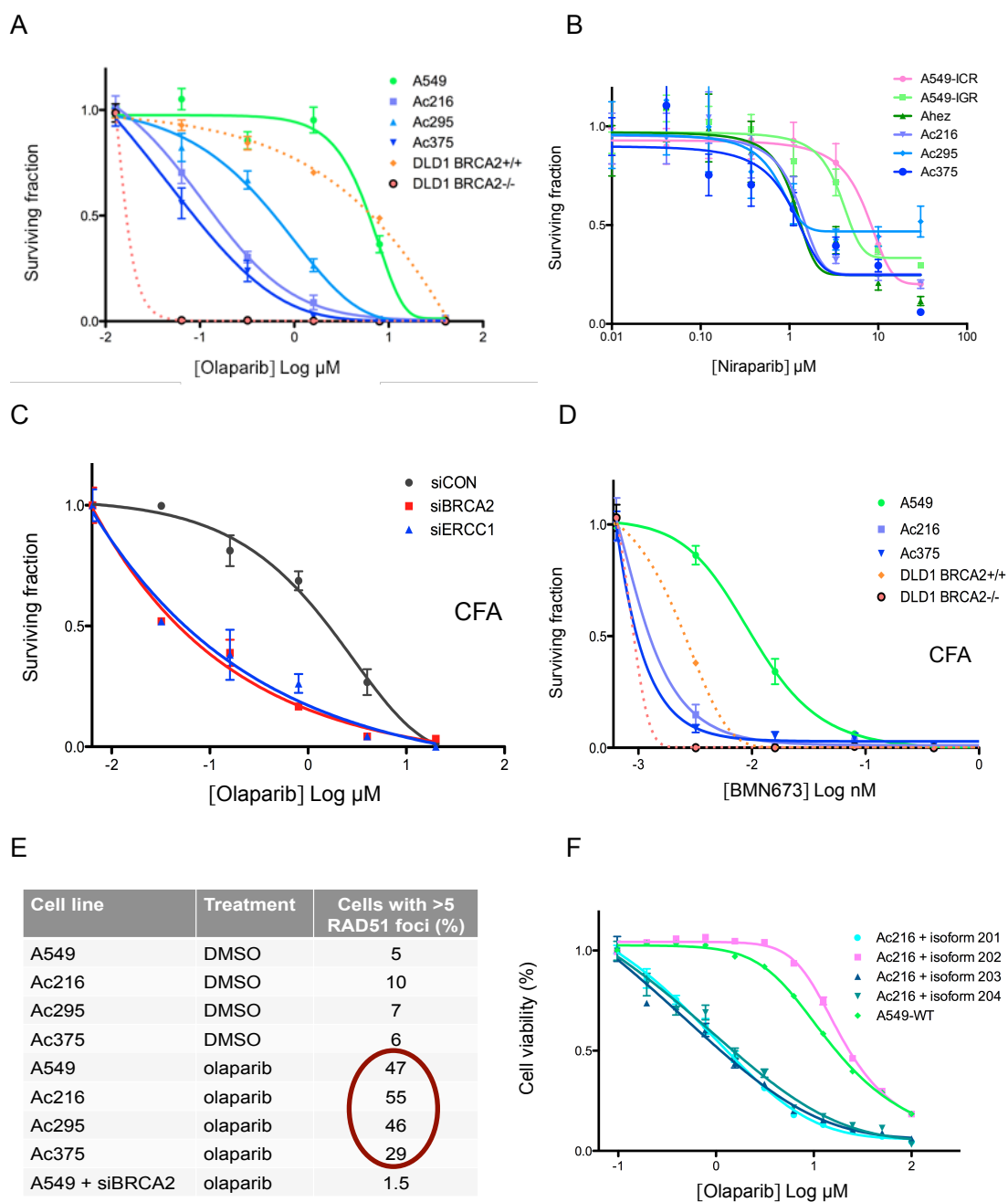
Figure 2. Résultats du drug screen et identification de plusieurs PARP inhibiteurs comme ERCC1-sélectifs

### 1.2.2. Revalidation des inhibiteurs de PARP dans les cellules ERCC1-déficientes

Afin de revalider dans des modèles « bas-débit » l'effet observé lors des screens « haut-débit » avec les inhibiteurs de PARP, plusieurs approches ont été utilisées : (i) la réalisation de tests de clonogénicité sur le modèle isogénique (Figure 3A); (ii) l'utilisation d'une deuxième lignée A549 contrôle « ERCC1-proficiente » (lignée A549 maintenue en culture dans un autre site et croissant dans un milieu de culture différent ; Figure 3B); (iii) l'inactivation d'ERCC1 par siRNA silencing dans une lignée cellulaire différente (Figure 3C) ; (iv) l'utilisation de nouveaux inhibiteurs de PARP hyper-sélectifs (Figure 3D). La vérification que l'effet observé était bien secondaire à la déficience en ERCC1 (et non à un facteur de confusion autre sensibilisant les clones aux inhibiteurs de PARP) a été entreprise en parallèle, avec notamment vérification des points suivants : (i) absence de déficit de formation de foyers RAD51 (déficience de la voie HR ; Figure 3E) ; (ii) mutation des clones dans un gène autre qu'*ERCC1* (séquençage de l'exome des clones ne montrant pas de mutation) ; (iii) rescue de l'effet par la réintroduction de l'isoforme fonctionnel d'*ERCC1* (Figure 3F). L'ensemble des résultats obtenus ayant revalidé de façon cohérente l'effet sélectif des inhibiteurs de PARP sur les lignées cellulaires ERCC1-déficientes et ayant confirmé qu'il s'agissait d'un effet directement lié à la déficience en ERCC1, une dissection du mécanisme sous-tendant cette sensibilité sélective a été entreprise.

### 1.2.3. Dissection du mécanisme de la sensibilité sélective des cellules ERCC1-déficientes aux inhibiteurs de PARP

Afin d'explorer le mécanisme sous-tendant la sensibilité sélective aux inhibiteurs de PARP des cellules ERCC1-déficientes, plusieurs expériences ont été réalisées avec l'olaparib, inhibiteur de PARP actuellement le plus avancé dans son développement clinique. Premièrement, un siRNA screen effectué en présence d'olaparib a été réalisé. De façon surprenante, les résultats de ce screen ont montré un effet épistatique entre la déficience en ERCC1 et la déficience en des gènes clé de la voie HR (*BRCA1*, *BRCA2*, *SHMF1* et *ATR*). Deuxièmement, l'étude de la réparation des cassures double brin dans les cellules parentales et les clones ERCC1-déficients a montré un retard de disparition des foyers  $\gamma$ H2AX suite à une exposition à l'olaparib.



**Figure 3 – Revalidation de la sensibilité sélective aux inhibiteurs de PARP des cellules déficientes en ERCC1**

A) Test de clonogénicité. B) Utilisation de deux lignées A549 «contrôle» cultivées dans deux centres différents et ayant un nombre de passage différents. C) Evaluation du silencing d'ERCC1 par siRNA dans la lignée U2OS vis-à-vis de la sensibilité à l'olaparib. D) Utilisation du composé BMN673, inhibiteur de PARP hyper-puissant et sélectif. E) Evaluation de la capacité des clones ERCC1-déficients à former des foyers RAD51 après exposition à l'olaparib. F) Seule la réintroduction de l'isoforme 202 d'ERCC1 permet de restaurer la résistance à l'olaparib.

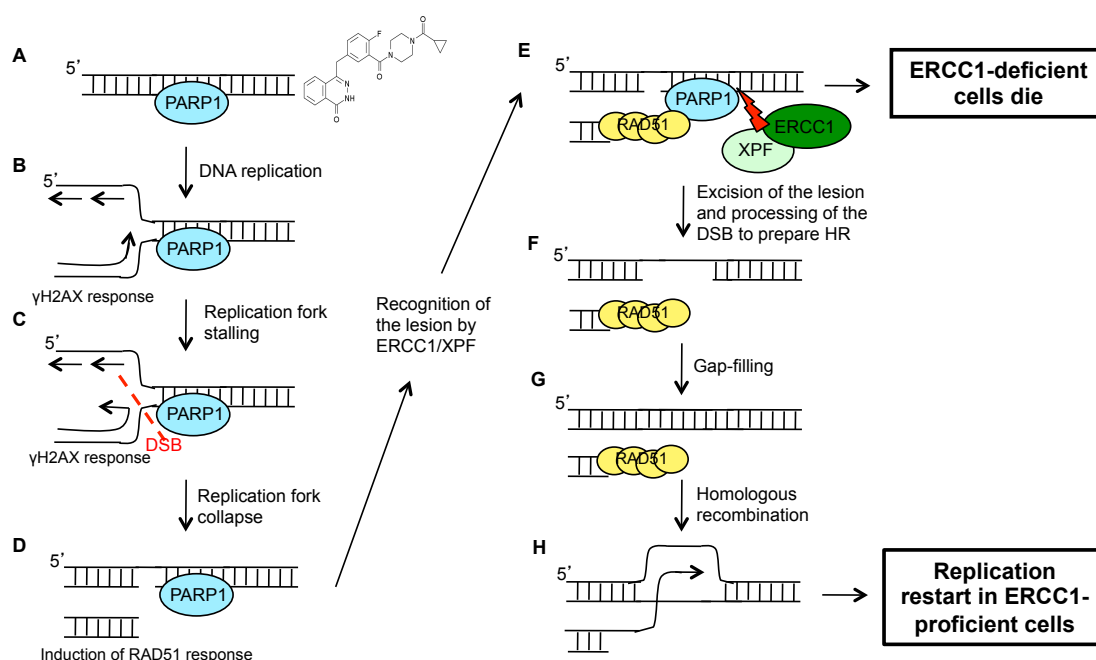
Troisièmement, l'étude du cycle cellulaire par FACS suite à une exposition à l'olaparib a révélé un blocage profond en G2/M des clones ERCC1-déficients avec un retard important à la reprise du cycle cellulaire (5 jours pour les clones ERCC1-déficients vs moins de 24h pour la lignée parentale). Quatrièmement, l'étude d'éclatements en métaphase a suggéré la présence de structures chromosomiques anormales suite à une exposition à l'olaparib dans les clones ERCC1-déficients uniquement, notamment avec l'apparition de chromosomes radiaux. Enfin, l'inhibition de l'expression de *PARP1* par siRNA avant exposition à l'olaparib a permis de restaurer, dans les clones uniquement, une sensibilité à l'olaparib similaire à celle de la lignée parentale, alors que cette même inhibition était sans effet sur la sensibilité de la lignée parentale.

La synthèse de ces résultats a permis de suggérer un modèle du mécanisme de la toxicité de l'olaparib, comme décrit dans la Figure 4.

### **1.3. Applications cliniques de ces résultats**

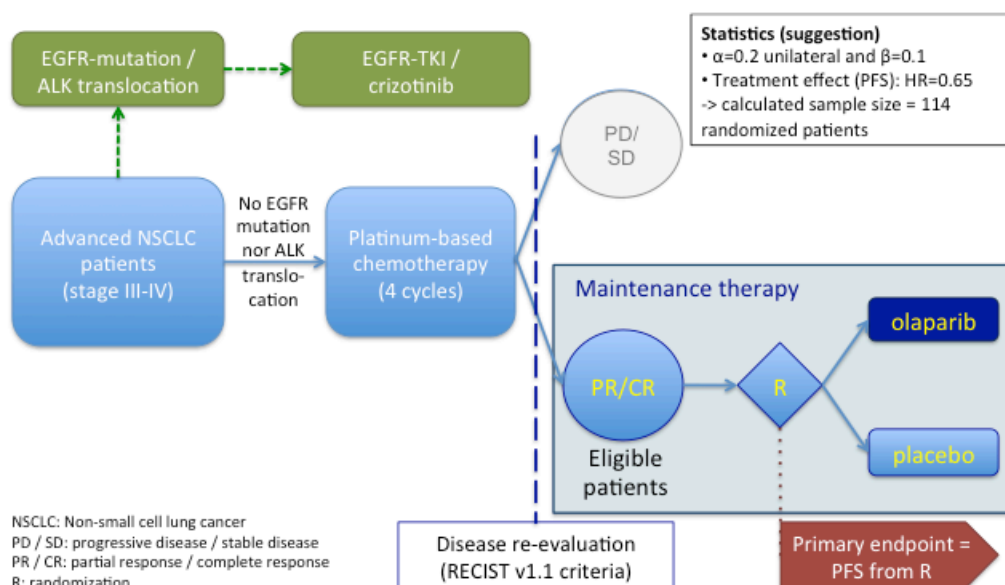
Sur la base de ces résultats, un protocole de phase II (Figure 5) est en train d'être mis en place évaluant l'olaparib vs placebo en traitement de switch maintenance chez les patients présentant un CBNPC de stade avancé, et dont la tumeur est sensible aux sels de platine en première ligne thérapeutique.





**Figure 4. Proposition de modèle mécanistique explicatif de la sensibilité sélective des cellules ERCC1-déficientes aux inhibiteurs de PARP**

A) PARP1 se lie à l'ADN en réponse à un dommage endogène ou exogène, mais l'inhibition de son activité catalytique par l'inhibiteur de PARP empêche sa dissociation. B) Pendant la phase de réplication, PARP1 lié à l'ADN cause un blocage de la fourche de réplication, qui entraîne la formation d'une cassure double-brin (C) et l'affaissement de la fourche de réplication (D). Ceci permet la formation d'une lésion reconnue par ERCC1/XPF, qui, en l'absence d'ERCC1, ne peut être réparée et cause la mort cellulaire (E). Par contre, en présence d'ERCC1, cette lésion est excisée et la réparation peut reprendre (F), avec les phases de recombinaison homologue permettant le redémarrage de la réplication (H).



**Figure 5. Essai de phase II évaluant l'olaparib en maintenance dans le CBNPC sensible aux sels de platine**

## **2. Recherche de biomarqueurs de fonctionnalité d'ERCC1**

Au cours de ce travail de thèse, il a été mis en évidence au sein de l'U981 qu'un seul des quatre isoformes d'ERCC1 était fonctionnel pour la réparation de l'ADN (l'isoforme 202), ce qui a eu des conséquences majeures pour les applications cliniques : en effet, les quatre isoformes d'ERCC1 ne pouvant être distingués par les moyens actuels (FISH, RT-PCR ou PCR digitale), cette découverte a rendu infaisable une évaluation fiable de l'expression d'ERCC1 dans les tumeurs, et par conséquent impossible une classification des patients selon leur statut ERCC1. Un second temps de ce travail de thèse a ainsi cherché à explorer la présence de biomarqueurs indirects de la déficience en ERCC1, par trois approches : (i) l'évaluation de la réparation des dimères de pyrimidine ; (ii) la recherche d'une signature associée au défaut d'ERCC1 ; et (iii) la comparaison du profil transcriptomique et protéomique entre les clones ERCC1-déficients et la lignée parentale.

### **2.1. Evaluation de la réparation des dimère de pyrimidine**

Les dimères de pyrimidine sont des lésions induites par les UVB, dont la réparation est assurée exclusivement par la voie NER. ERCC1 étant le facteur limitant de l'activité de cette voie, un retard ou une absence de réparation de ces lésions pourrait être un biomarqueur indirect de la fonctionnalité d'ERCC1. L'exploration de cette hypothèse a ainsi révélé que : (i) les clones ERCC1-déficients étaient plus sensibles à l'irradiation aux UVB que la lignée parentale ERCC1-proficiente ; (ii) les clones ERCC1-déficients accumulaient les dimères de pyrimidine après irradiation aux UVB de façon plus importante et plus prolongée que la lignée parentale (évaluation par ELISA ou par immunofluorescence sur cellules en microscopie confocale). Des techniques similaires pourraient être employées sur des cellules cancéreuses provenant d'une cytoponction pour évaluer le statut ERCC1 des patients, et des expérimentations pilotes sont en cours.

## **2.2. Recherche d'une signature génomique associée à la déficience en ERCC1**

Afin de rechercher une signature génomique associée à la déficience en ERCC1, le séquençage de l'exome des clones ERCC1-déficients a été effectué et comparé à celui de la lignée parentale. Les résultats ont montré un excès de transversions T:A>A:T, apparaissant dans un contexte particulier de séquences riches en A (transversions T>A) ou en T (transversions A>T). Une revalidation par un séquençage de plus haute couverture et ciblé sur les régions d'intérêt est en cours.

## **2.3. Comparaison du profil transcriptomique et protéomique des lignées isogéniques ERCC1-déficientes et ERCC1-proficientes**

La comparaison du transcriptome des lignées ERCC1-déficientes et ERCC1-proficientes dans le modèle isogénique a permis de mettre en évidence des cibles des voies de guidance axonale et développementales qui nécessitent actuellement d'être revalidées. La comparaison par SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) des lignées ERCC1-déficientes et ERCC1-proficientes a permis de mettre en évidence des cibles des voies du métabolisme des acides aminés (Guanine Deaminase, GDA) et de NAD/NADH (Nicotinamide Phosphoribosyltransferase). Ces cibles ont été revalidées et des études mécanistiques sont en cours.

## **Discussion, Perspectives et Conclusion**

Les travaux réalisés pendant cette thèse ont permis de mettre en évidence une relation de létalité synthétique entre la déficience en ERCC1 de cellules de CBNPC et l'inhibition pharmacologique de PARP1/2. La dissection du mécanisme sous-tendant cette sensibilité sélective a permis de proposer un modèle explicatif, et un essai clinique évaluant l'apport des inhibiteurs de PARP1/2 (olaparib) en switch maintenance chez des patients porteurs d'un CBNPC sensible aux sels de platine est en cours d'élaboration. De nombreux travaux de recherche translationnelle sont prévus en parallèle et à la suite de ce protocole, afin d'étudier chez l'homme et au

sein de tumeurs les biomarqueurs de sensibilité ou résistance aux inhibiteurs de PARP, ainsi que les signatures génomiques associées à la déficience en ERCC1.

La recherche de biomarqueurs de fonctionnalité d'ERCC1 a permis d'obtenir des résultats préliminaires dont deux au moins sont prometteurs : le dosage des dimères de pyrimidine chez des cellules irradiées aux UVB et la présence d'une signature génomique associée à la déficience en ERCC1. Un protocole évaluant la faisabilité du dosage des dimères de pyrimidine sur des échantillons de cytoponction est en cours d'élaboration, mais celui-ci fait face à plusieurs challenges : (i) la définition du seuil différentiel entre NER-proficient et NER-déficient ; (ii) l'absence de pénétration des UVB au sein des tissus tumoraux - justifiant la nécessité d'utiliser des cytoponctions ; et (iii) la possibilité d'une absence de corrélation directe entre la fonctionnalité de la voie NER et la sensibilité aux sels de platine – ces derniers causant également des crosslinks inter-brins réparés par la voie des ICL-R. Par contre, la présence d'une signature ADN associée à la déficience en ERCC1 serait un biomarqueur très prometteur, compte-tenu de l'accessibilité de l'ADN tumoral et constitutionnel, de la possibilité de mettre en place des puces ciblées sur les régions d'intérêt à un coût raisonnable, et de la robustesse du matériel utilisé (ADN).

## Références

Al-Minawi AZ, Lee YF, Hakansson D, Johansson F, Lundin C, Saleh-Gohari N, *et al.* (2009). The ERCC1/XPF endonuclease is required for completion of homologous recombination at DNA replication forks stalled by inter-strand cross-links. *Nucleic acids research* **37**(19): 6400-6413

Fagbemi AF, Orelli B, Scharer OD (2011). Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA repair* **10**(7): 722-729

Friboulet L, Olausson KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S, *et al.* (2013a). ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **368**(12): 1101-1110.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**(2): 69-90.

Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, *et al.* (2004). The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* **24**(13): 5776-5787.

Olausson KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, *et al.* (2006). DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine* **355**(10): 983-991.

Postel-Vinay S, Vanhecke E, Olausson KA, Lord CJ, Ashworth A, Soria JC (2012). The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. *Nature reviews. Clinical oncology* **9**(3): 144-155.

Reck M, Heigener DF, Mok T, Soria JC, Rabe KF (2013). Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. *Lancet* **382**(9893): 709-719.