



HAL
open science

Le rôle de la cytidine désaminase dans le contrôle du stress répliatif et de la résistance des cellules cancéreuses pancréatiques aux agents ciblant l'ADN

Audrey Lumeau

► **To cite this version:**

Audrey Lumeau. Le rôle de la cytidine désaminase dans le contrôle du stress répliatif et de la résistance des cellules cancéreuses pancréatiques aux agents ciblant l'ADN. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30166 . tel-03653779

HAL Id: tel-03653779

<https://theses.hal.science/tel-03653779>

Submitted on 28 Apr 2022

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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Audrey LUMEAU

Le 22 novembre 2021

**Le rôle de la cytidine désaminase dans le contrôle du stress
réplicatif et de la résistance des cellules cancéreuses
pancréatiques aux agents ciblant l'ADN**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Pierre CORDELIER et Malik LUTZMANN

Jury

Mme Cindy NEUZILLET, Rapporteur

Mme Bertolotto CORINE, Rapporteur

Mme Valéria NAIM, Rapporteur

M. Philippe PASERO, Examineur

Mme Kerstin BYSTRICKY, Examinatrice

M. Pierre CORDELIER, Directeur de thèse

M. Malik LUTZMANN, Co-directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord je remercie les organismes qui ont financé cette thèse car sans eux ce projet n'aurait pas pu voir le jour. Je remercie donc l'INSERM, la région Occitanie, la fondation totale, la ligue contre le cancer et la fondation Toulouse cancer santé.

Je remercie **Jérôme Cros** et **Mounira Amor-Guéret** d'avoir accepté d'être membres de mon comité de thèse et de m'avoir suivie et conseillée pendant ces années.

Malik, je voulais te remercier car pour commencer je n'aurais jamais eu de thèse sans toi. C'est grâce à ta bienveillance envers une étudiante que tu ne connaissais pas que j'ai pu découvrir ce projet et rencontré Pierre et pour ça je te remercie énormément. Je te remercie pour toutes ces discussions scientifiques corsées que nous avons, ou j'ai dû défendre mon point de vue, tu m'as beaucoup challengé et m'a appris à m'affirmer, argumenter mes idées et prendre du recul sur les résultats. Merci aussi pour tes conseils pour le postdoc, pour le papier, et pour ma préparation pour la soutenance de thèse. Tu nous as récupéré, moi et le projet en cours de route et je sais que ça n'a pas dû être facile pour toi. Je te souhaite tout le meilleur professionnellement à Montpellier mais aussi et surtout avec ta petite famille.

Pierre, merci pour tout. Merci de m'avoir fait confiance pour cette thèse, merci de m'avoir permis d'être indépendante et de m'avoir toujours soutenue. Merci de m'avoir donné les moyens d'aller au bout de mes idées, de m'avoir laissé aller à tous les congrès que je voulais et j'en ai fait des congrès ! Merci de m'avoir valorisé et présenté à des chercheurs ou médecins importants dans notre domaine, merci pour ta bienveillance envers moi. Je suis très fière de ce qu'on a réussi à faire de notre projet mais aussi de la relation que nous avons développé durant ces années, et surtout cette dernière année. Cette thèse n'a pas été un long fleuve tranquille mais on s'en est plutôt bien sorti ! Toi et moi on a plusieurs choses en commun : on s'enflamme tous les deux sur un $N=1$, les séries comme vikings, les conversations en GIFs, anciens basketteurs et maintenant une rupture des ligaments croisés ! Plus sérieusement, je sais que je te laisse entre de bonnes mains dans cette équipe pleine de bonnes personnes, je te souhaite tout le meilleur pour le futur et de toute façon on reste en contact !

Jérôme, je te remercie pour ta bonne humeur au labo, pour ces défis de lancer de boulettes dans les poubelles ou encore des paris pour la coupe du monde qui ont mis du croquant au labo avec souvent un gâteau à la clé (et qui nous ont surtout valu une demi-barbe et demi-moustache pour toi et moi une magnifique crête bleue blanc rouge encore pleine d'alcool de la veille, victoire de la France à la coupe du monde, pour moi). C'est toujours un plaisir de discuter avec toi de sciences ou de choses du quotidien comme t'écouter parler de tes filles. Tu m'as apporté pleins de conseils pendant toute ma thèse et même jusqu'à la fin pour ma soutenance et le papier. Je te remercie aussi énormément pour ce CFP 2021 qui restera un de mes meilleurs souvenirs de thèse et pas uniquement pour les burgers du buffet ! Et comme je le dis depuis le début de ma thèse, mon projet professionnel plus tard c'est d'être Jérôme Torrisani : faire de la bonne recherche, être passionné et surtout apprécié de tous. Ne change pas, continue à nous faire rire, à nous raconter tes histoires et à avoir cette bienveillance envers les étudiants, avec toujours ce petit côté taquin !

Naima, notre petite maman, nous avons partagé nos galères de trains pour venir au labo, nos inquiétudes pour ma sœur et ton fils tous deux lycéens, nos commandes sur showroomprivé... Tu m'as fait les meilleurs samoussas que j'ai jamais goûté ! Tu es d'une grande bienveillance et gentillesse et au labo tu es toujours là pour nous commander des choses au dernier moment et pour nous aider dans nos galères de manip. Tu es la mémoire et les épaules du labo et je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté.

Audrey, Audré, super Franfran, mon double démoniaque, l'autre, l'Audrey du sud, tu as été mon pilier pour la moitié de ma thèse, tu m'as accueillie dans ton bureau chaleureux, de part la température et de part la gentillesse et la sérénité qui régnaient avec toi et Hubert. J'ai encore ce petit post-it que tu m'as laissé mon premier jour car tu n'étais pas là pour m'accueillir, avec des mots qui m'ont touché dès le début. On a partagé la même passion pour la CDA avec des conversations que personne d'autre ne pouvait comprendre. On s'est soutenu, on s'est raconté nos vies et on a beaucoup rigolé. Tu as été un exemple pour moi dès le début avec ton organisation, ta rigueur et ton sérieux. Je suis très contente pour toi que tu te sois épanouie professionnellement, tu le mérites amplement.

Hubert, le sage du bureau et notre papa, je suis tombée dans un cocon de gentillesse avec toi et Audrey, dans un bureau où le ton n'est jamais monté, ou cela a toujours été partage et soutien. Tu es l'une des personnes les plus généreuses que je connaisse, toujours à faire passer le bien des autres avant le tien, toujours l'envie d'aider. Tu es aussi incroyablement passionné et je pense que toute personne qui a été en zootechnie avec toi a pu le ressentir. J'ai adoré écouter toutes les histoires extraordinaires que tu as vécu en temps qu'assistant vétérinaire avec tous ces animaux, j'aurais pu t'écouter des heures. Merci de m'avoir apporté ta sagesse et ton réconfort dans les moments de doute et pour tous les conseils de vie que tu m'as apporté, mais n'oublies pas que pour prendre soin des autres il faut commencer par prendre soin de toi.

Dorian, tu es un rayon de soleil avec ton accent et ton rire, on est toujours en bonne compagnie. Toi et moi on s'est bien entendu dès le début, tu m'as montré que la thèse ce n'était pas la prison et qu'on pouvait continuer à faire la fête ! Tu as aussi ravivé une ancienne addiction à Pokémon Go, les promenades après manger sont devenues fades sans toi ! Tu m'as beaucoup fait rire et tu as toujours été de bons conseils dans des sujets parfois plus sérieux :) Restes comme tu es, tu es notre Dodo et tu ne seras jamais oublié ;).

Delphine, Delphoune, difficile de te décrire en quelques mots. Heureusement que tu étais là pour que, à côté, les gens aient l'impression que je ne parle pas si fort et que je ne m'excite pas tant que ça pour un rien :) Fan de radio nostalgique, des histoires d'amour, des pingouins et l'Auvergne, il n'y en a pas 30 000 et surtout pas deux comme toi. J'ai une profonde amitié pour toi, tu as toujours été là pour m'encourager, me faire prendre confiance, écouter mes histoires et à t'enflammer avec moi ! La seule à comprendre mes références Disney (deshonneur sur toi, deshonneur sur ta famille, deshonneur sur ta vache) et merci aussi de m'avoir fait découvrir Naruto et Kaamelot, je suis faaaaaan. Tout le monde devrait avoir une Delphine dans sa vie :)

Lolo, Lo, notre quiche Lorraine, on a accroché dès notre rencontre, j'ai adoré ton humour, tes expressions pas toujours française et que tu ne sois pas prise de tête. Tu m'as fait redécouvrir l'escalade et on a passé pleins de supers moments ensemble autant à grimper qu'à regarder les gens autour de nous (monsieur moustache, jus de tomate, les jumeaux, le mec relou...). Merci pour les

galettes que tu m'as faites et qui m'ont rappelé la maison, merci pour les couleurs de cheveux que tu m'as faites, preuve de ma confiance parce que je n'étais quand même pas sereine ! Merci d'avoir été la tata de Yugi et d'avoir pris soin de lui ! Ravie aussi d'avoir rencontré Flo, vous êtes aussi fou l'un que l'autre et je vous adore :) Tu vas me manquer copine !

Manon, que de montagnes russes nos thèses à toutes les deux, mais on y est arrivé :) Que d'émotions de te voir partir avant moi, toi la plus débrouillarde qui m'a montré le chemin à suivre ! Je suis super contente que l'on se soit découverte pendant cette deuxième moitié de thèse et qu'on ait pu se lier d'amitié. Tu es une personne géniale, pleine de vie, très intelligente et très généreuse. Tu m'as proposé encore de m'aider deux jours avant ta soutenance de thèse, j'ai failli t'engueuler pour te dire de penser à toi :) Toujours des petites attentions pour tes copines et des bons plans ou astuces à partager qui me font rire à chaque fois. Ton accent chantant va beaucoup me manquer.

Claire, notre petite dernière de notre noyau dur avec Audrey, Dorian, Manon, Lolo et Delphine. On les a vu partir un par un avec émotions et maintenant c'est mon tour. Ma copine de fondamentale, ma copine d'IF, ma voisine de paillasse, nul doute que tout va bien se passer pour toi, même si on est plus là. Tu as une grande force de caractère et tu es très intelligente, continues sur ta lancée et tu vas tout déchirer ! On a partagé des coups de gueule au labo, on s'est raconté nos week-ends fêtards le lundi matin, tu as toujours été une bonne oreille avec un grand cœur et surtout tu es la seule qui apprécie mes chemises à leur juste valeur x) Restes comme tu es petite Claire !

Agathe, toi et moi on a eu une forte connexion dès le début, on est vite devenu copines et confidentes au labo, à se raconter les potins du matin. Je ne pensais pas que quelqu'un dans l'équipe était plus fan de Noël que moi mais avec toi je suis hors-game, tu joues dans une autre catégorie ! Notre manip SDHA restera un de mes meilleurs souvenirs, on a failli tout balancer alors qu'enfaite on a fait THE manip papier ! Haha ! Outre ça on a passé tellement de bons moments ensemble, entre folles, entre passionnées, à rigoler, à papoter et à s'exciter sur tout et n'importe quoi. Avec ces fameux romans qu'on s'envoie par messages pour raconter le truc de ouf qui vient de nous arriver ! Merci pour ton soutien sans faille qui a compté dans tous les moments importants de ma thèse mais aussi dans la vie, je pense notamment à tes compliments pour mes dessins qui m'ont permis de prendre confiance et d'oser plus. Tu as tracé ton chemin comme une chef jusqu'à maintenant et je ne m'en fais pas pour toi pour la suite, avec ta force de caractère et surtout continue à prendre du plaisir dans ton travail et à tout me raconter !

Nico, tu es arrivé quand j'en avais besoin et tu es devenu mon pilier pour la deuxième moitié de ma thèse. Nos caractères ont vite matché avec nos coups de gueule, nos taquineries et notre délicatesse légendaire. Tu es d'une grande rigueur scientifique et je te remercie pour tous les conseils que tu m'as apporté autant au niveau des manips, que de la rédaction, de la recherche du postdoc, de la présentation des figures ... Merci de t'être toujours rendu dispo pour m'aider et d'avoir toujours été honnête avec moi. Tu as toutes les qualités pour être un super chercheur et je me fais aucun souci pour ta carrière. Au-delà du boulot j'ai adoré papoter avec toi au bureau, surtout sur nos chats, et on rigole toujours ensemble. Je te confie mon gros bébé CDA et j'espère que toi et Agne vous viendrez nous voir à Londres !

Marie, les quelques manips qu'on a faites ensemble n'ont pas été d'un grand succès il faut se le dire (PLA, kit CDA) et on n'a pas passé beaucoup de temps ensemble au labo, mais cela a suffi pour que je

m'attache à toi. Tu es pétillante, avec un sourire communicatif et j'adore que tu t'extasies pour un rien, la CDA c'est AMAZING ! Tu me fais rire et tu me fais penser à moi sur plusieurs points. Ne te mets pas la pression pour le début de ta thèse et ne perds pas cette passion et ton sourire. Tu vas tout déchirer !

Adèle, la petite mamie du labo avec tes soupes et tes pulls en laine. Je suis contente que tu sois arrivée au labo avec ta gentillesse, ton humour et ta volonté d'aider tout le monde quitte à faire les tâches ingrates. Je compte sur toi pour continuer d'unir l'équipe dans la bonne humeur. Restes comme tu es, ne te prends pas la tête et n'oublies pas de penser à toi aussi ;) Petite pensée aussi pour Hippo dans sa robe jaune et ses kikis sur la tête, je pense que cette image ne me quittera jamais !

Klara et **Lucie**, vous avez été toutes deux de supers stagiaires, vous m'avez aidé dans mon travail et vous avez été volontaires, impliquées et très gentilles et je vous remercie pour cette expérience super qui m'a donné envie de continuer à encadrer et pourquoi pas un jour d'enseigner.

Charlotte, tes passages furtifs au labo nous font toujours énormément plaisir. J'adore papoter avec toi et j'admire la charge de travail que tu t'imposes. Heureusement que tu as pu te reposer pendant cette année de thèse au labo ;) Merci aussi de ton aide et de tes conseils pour mon papa. J'aurais aimé qu'on passe plus de temps ensemble ! Bon courage à toi pour la suite et si je ne me trompe pas tu es la prochaine de l'équipe à soutenir ;)

Je remercie aussi l'ancienne équipe 2, **Valérie**, **Marie-Jeanne**, **Lilas**. Vous avez toujours été de bons conseils et bienveillantes et je vous remercie pour ça. Vous êtes deux super chercheuses et j'ai aimé votre bonne humeur au labo. J'espère pouvoir à l'avenir intégrer une équipe de recherche avec des personnes comme vous. J'ai eu un petit pincement au cœur de vous voir partir, heureusement Guigui est resté avec moi. Lilas, la force et la rigueur scientifique que tu as montré pendant ta thèse m'ont servi d'exemple. J'ai adoré papoter, discuter sciences, grimper avec toi et aussi tes coups de gueule sur la vie x) j'ai hâte de te retrouver à Londres !

Guigui, tu es un être à part, dans ta bulle de folie et de bonne humeur et je suis très contente d'avoir partagé ces 4 années avec toi. Merci pour ce que tu as fait au labo et pour m'avoir aidé dans mon projet, toujours dans la bonne humeur. Merci de m'avoir fait rire et d'avoir essayé de me détendre quelques minutes avant ma soutenance de thèse avec un petit beatbox improvisé. Avec plus de Guigui le monde serait meilleur :) Toi et Camilla restez comme vous êtes, continuez à répandre de la bonne humeur et de la bière lambda !

Le CRCT crew c'était chouette de tous vous rencontrer : **Guigui Cognet**, **Mathieu**, **Charly**, **Marie**, **Carine**, je vous souhaite le meilleur à tous et toujours dans la bonne humeur !

La team Montmiral, **Julie**, **Marie**, **Hervé** alia Corine, **Torty** et **Gabi**, vous êtes mes plus belles rencontres ici à Toulouse. Vous êtes de supers amis et je n'oublierais jamais les moments et délire que l'on a partagé ensemble et qui m'ont permis de décrocher les week-ends, ce qui n'est pas toujours facile pour moi. Notre week-end à Montmirail est mon meilleur souvenir de ces dernières années, tellement de spontanéité, de délires sortis de nulle part et d'amitié. Chaque week-end et soirée passé ensemble ne sont que des bons moments. Un petit mot en plus pour Gabi et Torty, vous êtes des supers copains, nos retours fastidieux du carré vert et nos padels vont beaucoup me manquer. On ne part pas loin et j'espère qu'on continuera tous à se voir. Et comme on dit loin des yeux mais près du cœur.

Roro et **Baba**, on a encore passé de supers moments ensemble que ce soit à Toulouse, Lyon ou Evian ou encore pendant nos vacances. Que de rigolades, de pétanques, de fontaines, de bouteilles de gin, de POUET et d'escape games ! Je vous souhaite de continuer à se voir ici ou ailleurs et de toujours autant s'amuser ensemble !

Simon le moustachu/pirate, je suis ravie que tu sois arrivé à Toulouse cette dernière année, même si le COVID a un peu beaucoup foutu son bordel. C'était super de passer à nouveau du temps ensemble. Tu m'as bien fait progresser à l'escalade, merci pour tes conseils, et tu as vu je ne suis pas si butée que ça le plus souvent je t'écoute ! Merci de m'avoir permis de m'évader pendant les quelques dernières semaines/derniers mois de thèse. Merci aussi de m'écouter me plaindre et blablater depuis qu'on est ado, tu es un super copain x)

Je remercie **Chantal** et **Bertrand** d'être venus me soutenir pour ma soutenance de thèse et d'avoir toujours été bienveillants envers moi, j'ai de la chance d'avoir des beaux-parents comme vous.

Je remercie mes parents, ma mamie et mes sœurs pour leur soutien toutes ces années. Bien sûr je n'oublie pas gros bb **Milka** ! **Emeline**, je sais que tu n'as pas pu venir pour ma soutenance mais je sais aussi que tu as été de tout cœur avec moi, tu as toujours été mon exemple et je suis très fière de t'avoir comme sœur. **Loulou**, mon bb koala, notre star du basket, on a noué une forte complicité depuis que tu es née, prends confiance en toi et n'oublies pas que tu seras toujours ma petite sœur. **Mamie**, tu es la personne la plus forte, la plus généreuse et la plus aimante que je connaisse. Tu as toujours fait passer notre bonheur avant le tien et je ne pourrais jamais te rendre tout l'amour que tu nous as donné. **Papa, maman**, je ne vous l'ai jamais dit mais je suis très admirative de ce que vous avez réussi à construire malgré ce qui nous est arrivé, vous êtes un exemple de couple et de parents et je vous remercie pour votre amour et votre force. Cette victoire c'est aussi la vôtre.

Pour finir mais pas des moindres, **Simon** je te remercie d'avoir partagé mon quotidien depuis maintenant de nombreuses années, de me faire rire et de me rendre heureuse chaque jour. Je n'y serais pas arrivée sans toi. Je suis très chanceuse de m'être perdue en Mayenne et de m'être retrouvée à côté de toi. Merci de m'avoir toujours suivi depuis et merci de me suivre encore à Londres pour mon postdoc. J'ai hâte de vivre cette nouvelle aventure avec toi et notre petit chat **Yugi** (il est fou, nous aussi on est fou, on va déconner oh on va s'enjailler oh). Je ne sais pas de quoi est fait l'avenir mais je sais que tant qu'on est ensemble, tout ira bien.

Glossaire

A

ADN : acide désoxyribonucléique
AhR : récepteur des hydrocarbures Aryl
AICDA : activated induced CDA
APOBEC : alipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
araC : cytosine arabinoside
ARN : acide ribonucléique
ARNm: acide ribonucléique messenger
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : ATM an Rad3 related protein
ATRIP : ATR-interacting protein

B

BER : réparation par excision de bases
BET : bromodomain et extraterminal
BIR : break-induced replication
BLM : Bloom Syndrome hélicase
BRCA : breast cancer
BS : Syndrome de Bloom

C

CA19-9 : carbohydrate antigène 19-9
CAF : fibroblastes associés au cancer
CCL : cancer cell line encyclopedia
CDA : cytidine désaminase
CDC : cycline de division cellulaire
CDK : kinase dépendante des cyclines
CDKN2A : cycline-dépendante kinase inhibiteur 2A
CFS : sites fragiles communs
Chk1 : checkpoint protein kinase 1
CIN : instabilité chromosomique

CMP : cytidine monophosphate
CMPK : cytidine monophosphate kinase
CNV : variation du nombre de copies
CpG : cytosine phosphate guanine
ctADN : ADN circulant
CTC : cellules tumorales circulantes
CTLA-4 : antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique
C : cytidine

D

dC : désoxycytidine
DCK : désoxycytidine kinase
dCMP : désoxycytidine monophosphate
DDR : DNA damage response
dFdC : 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine
dFdU : 2'-désoxy-2',2'-difluorouridine
DNA2 : DNA replication helicase / nuclease 2
DNA-PK : kinase protéique dépendante de l'ADN
dNTPs : désoxyribonucléotides triphosphates
DPC4 : deleted in pancreatic cancer 4
DR : 1,3-diazépinone riboside
DSB : double strand break
dTMP : 2'-désoxythymidine-5'-monophosphate
dTTP : désoxythymidine triphosphate
dU : désoxyuridine
dUMP : 2'-désoxyuridine-5'-monophosphate
E
ECOG-PS : Eastern Cooperative Oncology Group - Performance Status
EdU : 5-éthynyl-2'-désoxyuridine

EGFR : Epidermal growth factor receptor

EMT : transition épithélio-mésenchymateuse

ERK : extracellular signal-regulated kinases

ETAA1 : Ewing's tumour-associated antigen 1

EXO1 : exonuclease 1

F

FA : réparation anémie de fanconi

FANCD2 : Fanconi anemia groupe D2

FDA : food and drug administration

FEN1 : flap structure-specific endonuclease 1

FF : acide folique, 5-fluorouracile

FOLFIRINOX : acide folique, fluorouracil, irinotecan, oxaliplatine

FPKM : Fragments per kilobase of exon per million.

5-FU : 5-fluoro-2'-désoxyuridine

G

GATA6 : GATA binding protein 6

GEM-CAP : gemcitabine capécitabine

G4 : g-quadruplexe

H

H2AX : Histone H2AX membre X

hCNT : human nucleoside transporter

hENT : transporteurs équilibrateurs de nucléosides

HER-2 : human epidermal growth factor receptor 2

HR : recombinaison homologue

HRD : homologous recombination deficiency

I

IHC : immunohistochimie

INDEL : mutation insertion - délétion

IR : infra-rouges

IRM : Imagerie par résonance magnétique

K

K-RAS : kirsten rat sarcoma virus

L

LOH : loss of heterogeneity

M

MCM : MiniChromosome Maintenance

MDCT : tomodensitomètre multi-détecteur

miARN : microARN

MiDAS : synthèse d'ADN mitotique

MLH1 : mutL homologue 1

MMEJ : réparation par micro-homologies

MMR : réparation de mésappariements

MRCP : cholangiopancreatographie par résonance magnétique

MSH2 : mutS homologue 2

MSI : Instabilité des microsatellites

N

NDPK : nucléoside diphosphate kinase

NER : réparation par excision de nucléotides

NHEJ : réparation par jonction d'extrémités non homologues

NK : natural killer

NLS : signal de localisation nucléaire

NTRK : récepteur kinase de tropomyosine

O

OFF : oxaliplatine, acide folique, 5-fluorouracile

ORC : origin recognition complex

P

53BP1 : p53 binding protein 1

PanIN : néoplasie intraépithéliale pancréatique

PAMG : placental alpha microglobulin 1

PARP-1 : poly(ADP-ribose) polymérase

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PD-1/PD-L1 : programme cell death-1/programme cell death ligand-1

PDA : adénocarcinome pancréatique

PDAC : adénocarcinome pancréatique canalaire

PDCL : patient derived cell line

PICH : Plk1-Interacting Checkpoint Helicase

PMS2 : PMS1 homologue 2

POLO : Pancreas Cancer Olaparib Ongoing

PRIMPOL : primase polymérase

R

RecQ1 : RecQ1-like helicase 1

RFC : Replication factor C

RNR : Ribonucléotide réductase

rNTPs : ribonucléotides triphosphates

ROS : reaction oxygen specied

RPA : protéine de réplication A

RRS : replication stress response

RS : stress réplicatif

S

SCE : échanges entre chromatides sœurs

siRNA : small interferant RNA

SNP : single nucleotide polymorphisme

SNV : variation d'un nucléotide simple

SSB : single strand break

ssDNA : single-stranded DNA

SSTR2 : récepteur de la somatostatine 2 (à revoir)

SV : variant structural

T

TAM : macrophages associés à la tumeur

TBP : TATA-box binding protein

TCGA : The cancer genome atlas

THU : 3,4,5,6-tétrahydrouridine

TIPMP : tumeurs intracanalaires papillaires mucineuses du pancréas

TGF-β : transforming growth factor β

TK : thymidine kinase

TLS : synthèse d'ADN translésionnelle

TNM : tumor, node, metastasis

TOP2A : DNA topoisomerase II α

TOPBP1 : DNA topoisomerase II binding protein 1

TP53 : tumeur protéine 53

TS : thymidylate synthétase

U

U : uridine

UFB : Ultra Fine Bridges

UMK : uridylate monophosphate kinase

UTR : untranslated region

UV : ultra-violets

Table des illustrations et tables

<i>Figure 1 : Prédiction du nombre de morts en 2030 par type de cancer.</i>	5
<i>Figure 2 : Incidence et Mortalité du cancer du pancréas dans le monde.</i>	5
<i>Figure 3 : Pourcentage de cas par stade du cancer du pancréas répertoriés aux Etats-Unis entre 2014 et 2018.</i>	9
<i>Figure 4 : Grades cliniques des tumeurs pancréatiques, selon l'extension de la maladie et l'atteinte vasculaire.</i>	9
<i>Figure 5 : Les biomarqueurs et facteurs de pronostiques dans le PDAC.</i>	11
<i>Figure 6 : Oncogènes et suppresseurs de tumeur les communément altérés dans le cancer du pancréas.</i>	13
<i>Figure 7 : Modèle de progression du cancer du pancréas : de l'épithélium canalaire normal à la tumeur infiltrée.</i>	16
<i>Figure 8 : L'expression des gènes tumoraux permet de classer en deux sous-types de PDAC : les tumeurs classiques et les tumeurs basales.</i>	17
<i>Figure 9 : Métabolisme cellulaire de la Gemcitabine.</i>	20
<i>Figure 10: Principe conventionnel de la léthalité synthétique induite par inhibition de PARP dans un contexte de déficience pour la réparation par recombinaison homologue.</i>	21
<i>Figure 11 : schéma décisionnel thérapeutique pour une tumeur locale résécable et limite résécable.</i>	22
<i>Figure 12 : schéma décisionnel thérapeutique pour une tumeur non-résécable, localement avancée ou métastatique.</i>	22
<i>Figure 13 : Les mécanismes de chimiorésistance associés au métabolisme de la gemcitabine dans le cancer du pancréas.</i>	29
<i>Figure 14 : Les rôles connus de la CDA dans la cellule cancéreuse : le recyclage des pyrimidines pour la synthèse d'ADN et d'ARN puis la détoxification de la gemcitabine et de la cytarabine en molécules inactives ensuite excrétées de la cellule.</i>	30
<i>Figure 15: Expression de la CDA au sein du PDAC.</i>	32
<i>Figure 16 : Implication de la CDA dans la catalyse de la Cytidine en Uridine et catabolisme de l'Uridine en beta-Alanine via le recyclage des pyrimidines.</i>	35
<i>Figure 17 : Schéma de la voie de synthèse des pyrimidines incluant les voies de synthèse de novo et de recyclage des pyrimidines.</i>	35

<i>Figure 18 : Expression normalisée en ARNm de la CDA dans les différents tissus de l'organisme.</i>	39
<i>Figure 19 : Expression ARNm (Log₂) de la CDA dans les tissus normaux et les tissus cancéreux.</i>	40
<i>Figure 20 : Points de contrôles du cycle cellulaire permettant de préserver la stabilité du génome.</i>	43
<i>Figure 21: Représentation schématique d'une fourche de réplication de l'ADN et des principaux facteurs protéiques associés.</i>	44
<i>Figure 22: Schéma des structures non-B de l'ADN communément étudiées.</i>	48
<i>Figure 23: Les conséquences des conflits entre la réplication et la transcription.</i>	49
<i>Figure 24 : L'activation du point de contrôle intra S.</i>	52
<i>Figure 25: Les différents rôles de l'activation d'ATR-Chk1 dans le contrôle de la phase S.</i>	53
<i>Figure 26 : Plasticité de la régulation de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes.</i>	54
<i>Figure 27: Mécanismes d'effondrement des fourches de réplication.</i>	55
<i>Figure 28: Les voies de tolérance des dommages à l'ADN.</i>	56
<i>Figure 29 : Vue d'ensemble des mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN.</i>	59
<i>Figure 30 : Les origines et structures des trois types d'UFB connus.</i>	60
<i>Figure 31 : Mécanisme de synthèse d'ADN en début de mitose pour compléter la réplication des régions non répliquées, conséquences d'un stress réplcatif non résolu.</i>	62
<i>Figure 32 : Les conséquences d'un stress réplcatif non résolu en mitose : induction d'instabilité génétique dans les cellules.</i>	63
<i>Figure 33 : Instabilité chromosomique (CIN) numérique et structurelle. Le schéma montre des gains et pertes de chromosomes entiers (CIN numérique) et des gains, des pertes, des inversions et des translocations chromosomiques (CIN structurelle).</i>	65
<i>Figure 34 : L'instabilité génomique résultante du stress réplcatif.</i>	67
<i>Figure 35 : Les défauts génétiques des gènes de la DDR et leur association aux pathologies humaines.</i>	67
<i>Figure 36 : Les conséquences d'une mutation BLM dans les cellules BS.</i>	69
<i>Figure 37 : Conséquences d'une perte de l'expression de CDA sur le pool de dCTP, la réplication de l'ADN et l'instabilité génétique dans les cellules BS.</i>	70
<i>Figure 38 : Schéma des mécanismes de stress réplcatif induit par l'activation d'un oncogène conduisant à de l'ADN non répliqué et de l'instabilité génomique.</i>	71

Figure 39 : Un modèle des dommages à l'ADN induits par l'activation d'un oncogène dans le développement et la progression du cancer. _____	73
Figure 40 : Vue d'ensemble du pourcentage de cancers avec de la chromothripsie, parmi 30 types de cancer. _____	74
Figure 41 : Aneuploïdie et longueur des télomères dans l'oncogenèse pancréatique. _____	75
Figure 42 : Le rationnel d'augmenter le stress réplicatif pour tuer les cellules cancéreuses. _____	79
Figure 43: sensibilité des PDCL aux inhibiteurs de la DDR et/ou du cycle cellulaire selon le niveau d'enrichissement de la signature transcriptomique de stress réplication (élevé ou faible) et le statut DDR (compétent ou déficient). _____	85
Figure 44 : Expression des ARNms codants pour les gènes impliqués dans le recyclage ou la biosynthèse des pyrimidines. _____	128
Figure 45 : Enzymes des voies de recyclage et de biosynthèse des pyrimidines les plus exprimées dans les données lignées cancéreuses pancréatiques (CCLE). _____	129
Figure 46 : Analyse de la localisation subcellulaire de la CDA dans des cellules PDAC surexprimant la CDA. _____	131
Figure 47 : Conséquences de l'expression de CDA sur la synthèse d'ADN en mitose (MiDAS). _____	135
Figure 48: Corrélation entre le niveau de γ -H2AX et l'expression de CDA dans des modèles de PDAC dérivés de patients. _____	137
Figure 49 : Modèle hypothétique du potentiel thérapeutique du ciblage de la CDA dans un contexte de vide thérapeutique pour une catégorie dominante du PDAC avec un niveau faible de stress réplicatif et une DDR fonctionnelle. _____	139
Figure 50 : Expression des gènes de checkpoint cellulaires dans les tumeurs pancréatiques (TCGA) avec un niveau élevé de CDA ou un niveau faible de CDA. _____	140
Figure 51 : Expression (FPKM) des gènes de la voie de recyclage dans deux lignées murines transgéniques de cancer du pancréas. _____	141
Figure 52 : L'expression de CDA est induite par l'activation K-RAS ^{G12D} et nécessaire à la prolifération cellulaire médiée par l'oncogène dans un modèle cellulaire pancréatiques non cancéreux. _____	143
Figure 53 : Le rôle hypothétique de la CDA dans le maintien d'un seuil de stress réplicatif nécessaire à la tumorigénèse et non létale pour la cellule. _____	144
Figure 54 : Modèle hypothétique final des rôles de la CDA dans le cancer du pancréas basé sur les résultats obtenus pendant ma thèse. _____	145
Figure 55 : Rôles connus de la CDA et nouveaux rôles découverts grâce à mes travaux de thèse. _____	146

<i>Table 1 : Le taux de survie à 5 ans des patients atteints de cancer du pancréas diagnostiqués entre 2010 et 2016 selon le stade d'avancement de la tumeur.....</i>	<i>6</i>
<i>Table 2 : Les principaux facteurs de risque environnementaux de développer un cancer du pancréas..</i>	<i>7</i>
<i>Table 3: Les principaux facteurs de risque génétiques de développer un cancer du pancréas.</i>	<i>7</i>
<i>Table 4 : Caractéristiques des inhibiteurs de PARP les plus étudiés.</i>	<i>80</i>
<i>Table 4 : Sources endogènes des lésions de l'ADN</i>	<i>47</i>
<i>Table 5 : Sources exogènes des lésions de l'ADN.....</i>	<i>47</i>
<i>Table 6 : Différentes voies de réparation selon le type de lésion de l'ADN.</i>	<i>58</i>
<i>Table 7 : Les types d'UFB les plus communs et leurs caractéristiques.</i>	<i>60</i>
<i>Table 8 : classification des tumeurs pancréatiques selon le nombre et le type de variants structuraux.</i>	<i>77</i>

Sommaire

Résumé.....	1
Abstract	2
Introduction bibliographique	3
I. Le cancer du pancréas	4
1. La pathologie	4
1.1. Le cancer du pancréas.....	4
1.2. Epidémiologie	5
1.3. Facteurs de risques	6
2. Diagnostic et prise en charge des patients	8
2.1. Symptômes et imagerie pour le diagnostic	8
2.2. Biomarqueurs et facteurs pronostiques	10
3. Mécanismes et physiopathologies	13
3.1. Les gènes fréquemment altérés	13
3.2. Les lésions pré-néoplasiques	15
3.3. La biologie du PDAC	16
4. Le traitement du cancer du pancréas	19
4.1. Les molécules thérapeutiques utilisées dans le traitement du PDAC	19
4.2. Protocoles de traitement standards	21
4.3. Les échecs thérapeutiques dans le cancer du pancréas	26
II. La cytidine désaminase (CDA).....	34
1. Fonctions	34
2. Structure.....	36
3. Localisation cellulaire	36
4. Régulation de l'expression	36
5. Régulation de l'activité – les polymorphismes	38
6. Autres applications cliniques.....	38
7. Expression dans les tissus sains et cancéreux.....	39
8. CDA et cancers, approches thérapeutiques.....	40
8.1. Les inhibiteurs de la CDA	40
8.2. Autres opportunités thérapeutiques	42

III. Le stress réplicatif et l'instabilité génétique dans les cancers, particularités du cancer du pancréas	42
1. Les mécanismes de stress réplicatif	42
1.1. La réplication de l'ADN.....	42
1.2. La définition du stress réplicatif.....	45
1.3. Les causes et sources du stress réplicatif	45
1.4. La réponse de la cellule au stress réplicatif	51
2. L'instabilité génétique : conséquence d'un stress réplicatif non résolu.....	59
2.1. Les pathologies liées au stress réplicatif.....	67
3. Les connaissances sur le stress réplicatif et l'instabilité génétique dans le PDAC	75
3.1. L'instabilité génétique pendant l'oncogenèse pancréatique	75
3.2. Anomalies chromosomiques dans le PDAC	76
4. Les outils thérapeutiques basés sur le stress réplicatif dans le PDAC	78
4.1. Le rationnel d'induire du stress réplicatif dans les cancers.....	78
4.2. Les traitements déjà validés dans le PDAC (platines, PARPi)	79
4.3. Les traitements en développement dans le PDAC : inhibiteurs des points de contrôle du cycle cellulaire	80
4.4. Stratégies thérapeutiques basées sur le stress réplicatif dans le PDAC.....	84
IV. Contexte du projet de thèse.....	86
Résultats.....	87
Discussion.....	127
1. Mécanismes moléculaires	128
2. Valeur translationnelle	136
3. La CDA dans l'oncogenèse pancréatique	140
Bibliographie.....	147
Annexes	180

Résumé

La cytidine désaminase (CDA) est impliquée dans le recyclage des pyrimidines, en convertissant les cytidines et désoxycytidines en uridines et désoxyuridines, essentielles pour la synthèse d'ADN et d'ARN. La perte de CDA induit de l'instabilité génétique dans le syndrome de Bloom, et sa surexpression est associée à la résistance des tumeurs aux chimiothérapies à base d'analogues de désoxycytidine. Nous avons récemment découvert que la CDA est surexprimée dans les adénocarcinomes pancréatiques (PDAC), une maladie sans traitement curatif aux stades avancés et prédite comme la seconde cause de décès par cancer d'ici 2040. La perte de CDA dans des modèles expérimentaux de PDAC inhibe fortement la prolifération cellulaire et la croissance tumorale, en absence de chimiothérapie, suggérant un nouveau rôle de la CDA dans la progression des tumeurs pancréatiques. Dans ce travail de thèse, nous avons trouvé que l'expression de la CDA est associée à un enrichissement des gènes de la signature de répllication de l'ADN, dans des tumeurs pancréatiques de patients et des modèles expérimentaux. Nous démontrons ensuite que la CDA est localisée aux fourches de répllication, augmente la vitesse et l'efficacité de redémarrage des fourches de répllication. Ces effets sont strictement dépendants de l'activité désaminase de la CDA. Nous avons ensuite découvert que l'expression de CDA corrèle inversement avec le niveau de stress répllicatif des cellules et que sa déplétion est associée à l'activation la voie ATR en réponse au stress répllicatif (données transcriptomiques) et l'activation de la protéine CHK1. De plus, nous montrons que la CDA limite l'instabilité du génome, étant donné que l'expression de CDA corrèle négativement avec la formation de micronoyaux et la transmission des dommages aux cellules filles. Dans l'encyclopédie des lignées cancéreuses (CCLE), l'expression de CDA est associée à la résistance aux agents thérapeutiques ciblant l'ADN. Des études fonctionnelles montrent que la surexpression de la CDA, mais pas la CDA mutante catalytiquement inactive, protège les cellules PDAC contre la camptothécine, un inhibiteur de topoisomérase. Pour montrer le potentiel clinique de ces travaux, nous avons ciblé la CDA dans des cellules primaires de PDAC et avons trouvé que la CDA est nécessaire à la croissance des cellules primaires. Enfin, le ciblage de la CDA sensibilise ces cellules primaires à l'Oxaliplatine, inducteur d'adduits d'ADN, *in vitro* et *in vivo* étant donné que la combinaison diminue la progression tumorale. L'ensemble de nos résultats révèle pour la première fois que la CDA régule le niveau de stress répllicatif à proximité de la fourche de répllication, et qu'elle protège les cellules PDAC des agents induisant du stress répllicatif. Ainsi, ce travail de thèse propose de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses basées sur le ciblage de la CDA pour combattre les résistances aux traitements dans le PDAC et créer de nouvelles opportunités thérapeutiques.

Abstract

Cytidine deaminase (CDA) is involved in the pyrimidine salvage pathway, by converting cytidines and deoxycytidines into uridines and deoxyuridines, for DNA and RNA synthesis. Loss of CDA induces genomic instability in Bloom Syndrome, and CDA overexpression is associated with tumor resistance to chemotherapy with deoxycytidine analogs. We recently found that CDA is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma, a disease with no cure for advanced stages, and that CDA depletion in experimental models strongly inhibits cell proliferation and tumor progression, in the absence of chemotherapy, suggesting a new role of CDA *per se* in pancreatic tumor progression. In the present work, we found that CDA expression is associated with gene set enrichment in DNA replication signature, in both patient PDAC tumors and experimental models. We further demonstrate that CDA localizes at replication forks, increases replication fork speed and restart efficacy. These effects are strictly dependent on CDA deaminase activity. Hence, we found that CDA expression is inversely correlated with the level of replicative cells in PDAC cells, and that CDA targeting is associated with gene set enrichment of ATR pathway activation in response to replication stress signature and CHK1 protein activation. Next, we demonstrate that CDA preserves genomic stability of PDAC cells, as CDA expression is inversely correlated with micronuclei formation and DNA damage transfer to daughter cells. In the Cancer Cell Lines Encyclopedia, CDA expression is associated with resistance to drug targeting DNA synthesis. Functional studies demonstrate that overexpressing CDA, but not CDA catalytically inactive mutant, protects PDAC cell lines from camptothecin, a topoisomerase inhibitor. To gain further insights into the clinical potential of such finding, we targeted CDA expression in primary cells from patient with PDAC and found that CDA is essential to primary cell growth. Last, CDA targeting strongly sensitizes primary cells to treatment by oxaliplatin, that forms platinum-DNA adducts, *in vitro* and *in vivo* as the combination decreases tumor progression. Taken together, our results reveal for the first time that CDA controls the level of DNA replication stress, replication stress level and genomic stability of PDAC cells in proximity with DNA replication fork, and that CDA protects PDAC cells from drugs inducing DNA replication stress. Thus, our work stems for new strategies based on CDA targeting to defeat PDAC resistance to treatment and create new therapeutic opportunities.

Introduction bibliographique

Introduction

L'objectif de ma thèse a été d'étudier le rôle de la cytidine désaminase dans la réplication de l'ADN et le niveau de stress réplicatif des cellules cancéreuses pancréatiques. Dans cette introduction bibliographique je vais d'abord décrire le cancer du pancréas, en détaillant ses caractéristiques, son diagnostic et la prise en charge des patients. Je mettrai en avant l'importance de la CDA dans la chimiorésistance des tumeurs pancréatiques puis décrirai les connaissances concernant cette enzyme. Ensuite je présenterai en détail les bases du stress réplicatif, sa prise en charge et ses conséquences sur la stabilité du génome et le développement de pathologies telles que le cancer. Enfin je décrirai que le cancer du pancréas est une maladie à forte instabilité génétique et comment les recherches d'aujourd'hui utilisent ce trait pour développer de nouvelles thérapies ciblées prometteuses.

I. Le cancer du pancréas

1. La pathologie

1.1. Le cancer du pancréas

Le pancréas est un organe glande du système gastro-intestinal qui produit des hormones régulatrices de la glycémie (glucagon, insuline, somatostatine) et des enzymes de digestion pour la dégradation des nutriments¹. Il est constitué de plusieurs types cellulaires dont les cellules acineuses (sécrétrices d'enzymes digestives), les cellules canalaire, les cellules en transition entre acini et canal, les îlots de Langerhans (sécrétrices d'hormones) et les cellules étoilées du pancréas, peu actives.

La tumeur est localisée dans 62% des cas dans la tête, 15% des cas dans le corps et 5% des cas dans la queue du pancréas et peut rapidement envahir les organes voisins tels que la rate, le côlon ou l'estomac^{2,3}. La forme histologique la plus fréquente est l'adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC) qui représente 90-95% des formes d'adénocarcinomes pancréatiques chez l'homme et un réel problème de santé publique (Institut National du Cancer, France³. Les tumeurs neuroendocriniennes (PanNET) issues des îlots de Langerhans représentent 3% des cancers du pancréas et les carcinomes acinaires seulement 1%, d'autres formes encore moins fréquentes existent. Le PDAC est la 4^{ème} cause de décès par cancer dans les pays développés et la 7^{ème} cause de décès par cancer dans le monde, tous cancers confondus^{3,4}. Les projections placent le cancer du pancréas comme deuxième cause de décès par cancers d'ici 2030-2040, juste derrière le cancer du poumon (Figure 1)⁵. Durant cette thèse, la mention du cancer du pancréas fera référence au PDAC, les autres formes de cancer du pancréas ne seront pas étudiées.

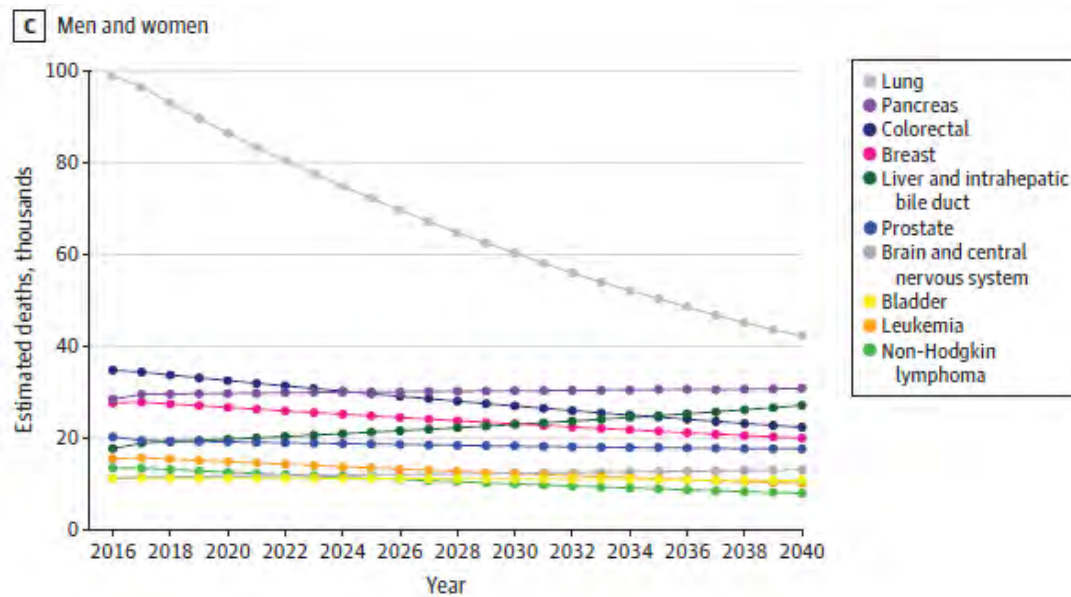


Figure 1 : Prédiction du nombre de morts en 2030 par type de cancer. Image extraite de Rahib et al. 2021.

1.2. Epidémiologie

Les données issues de GLOBOCAN (New Global Cancer Data) permettent d'étudier l'épidémiologie des cancers à l'échelle internationale. A l'heure actuelle, 4,5% des décès tous cancers confondus sont attribués au cancer du pancréas (GLOBOCAN 2020⁴). 495 773 nouveaux cas et 466 003 décès ont été identifiés en 2020 dans le monde, avec une fréquence plus élevée en Asie et en Europe, comme montré sur la Figure 2. La survie à 5 ans est de seulement 11% dans les pays développés (Institut National du Cancer, American Cancer Society). Aux USA, 52,9% des cas sont diagnostiqués chez des hommes 52,4% des décès touchent les hommes (American Cancer Society. Key Statistics for Pancreatic Cancer, accès le 19 août 2021⁶). 80% des cancers sont diagnostiqués à des stades avancés ou métastatiques.

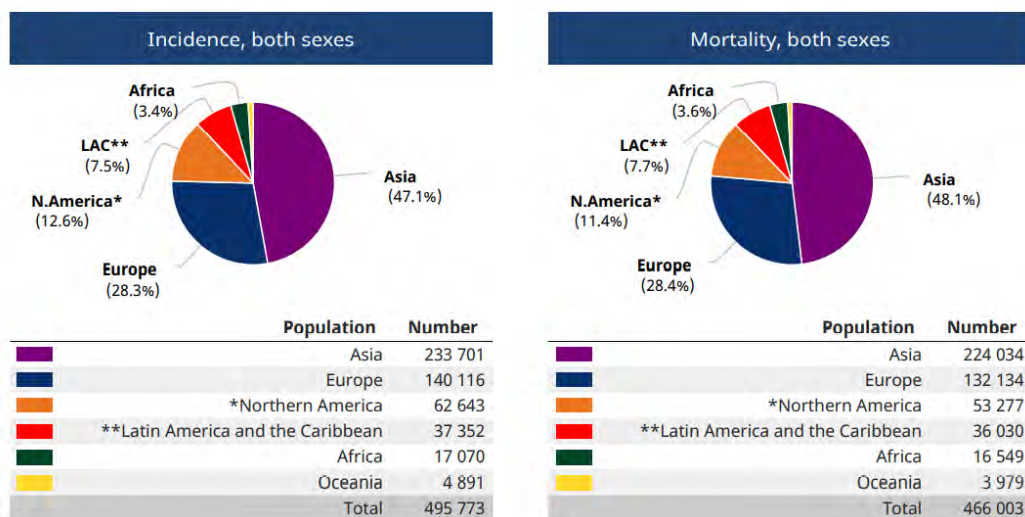


Figure 2 : Incidence et Mortalité du cancer du pancréas dans le monde. Image extraite de GLOBOCAN 2020 (International Agency for Research on Cancer, The Global Cancer Observatory, décembre 2020).

Des données supplémentaires de la société Américaine du cancer montrent la survie à 5 ans selon les stades du cancer du pancréas pour les patients diagnostiqués entre 2010 et 2016, voir Table 1. La tumeur est qualifiée de localisée s’il n’y a pas de signe de dissémination hors du pancréas, de régionale si dissémination aux structures proches et aux ganglions lymphatiques et de métastatique si dissémination à des parties distantes de l’organisme telles que les poumons, le foie ou les os⁷ (American Cancer Society). Les données de la Table 1 montrent que les tumeurs localisées ont une survie à 5 ans de 39% soit 3 fois plus que les tumeurs régionales et 13 fois plus que les tumeurs métastatiques.

Stade de la tumeur	Taux de survie à 5 ans
Localisée	39%
Régionale	13%
Métastatique	3%
Tous stades confondus	10%

Table 1 : Le taux de survie à 5 ans des patients atteints de cancer du pancréas diagnostiqués entre 2010 et 2016 selon le stade d’avancement de la tumeur. Stades de la tumeur définis par le SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) (Pancreas Statistics | American Cancer Society - Cancer Facts & Statistics, accès le 30 août 2021).

Il est important de prendre en compte le stade d’évolution de la tumeur pour déterminer le taux de survie des patients à 5 ans. Seulement les chiffres ne prennent pas en compte l’âge, l’état général, la réponse au traitement et d’autres facteurs importants⁷. Il faut aussi noter qu’entre 2014 et 2021 le taux de survie à 5 ans a augmenté de 6% à 11% montrant une progression encourageante. Cependant, l’incidence continue d’évoluer avec les années et le taux de décès reste très élevé, ainsi le taux de survie à 5 ans du cancer du pancréas est le plus faible parmi les cancers majoritaires⁶. Il est donc urgent d’améliorer encore la survie des patients malgré l’augmentation de la prévalence du cancer du pancréas dans le monde (American Cancer Society)^{5,8}.

1.3. Facteurs de risques

a. Facteurs de risque environnementaux

L’âge est le déterminant majeur et un facteur de risque non modifiable, avec un pic d’incidence de la pathologie entre 60 et 80 ans³ (INCA 2019). Plusieurs facteurs environnementaux augmentent les risques de développer un cancer du pancréas. Parmi les risques pouvant être évités, le tabac est le plus important et le plus étudié. L’obésité, la faible activité physique, un diabète de type 2 et la consommation d’alcool ont aussi été associées au développement d’un cancer du pancréas^{9,10}, comme Table 2.

Facteurs de risque environnementaux	Ratio risque par rapport au groupe contrôle	Groupe contrôle	Référence
Cigarette	1,74	Non-fumeurs	Iodice et al. 2008
Obésité (index de masse corporelle > 35)	1,6	Index corporel entre 19 et 25	Arslan et al. 2010
Diabète type 2	1,8	Non-diabétiques	Chari et al. 2005
Consommation d'alcool (> 6 verres par jour)	1,5	Consommation <1 verre d'alcool par jour	Lucenteforte et al. 2012

Table 2 : Les principaux facteurs de risque environnementaux de développer un cancer du pancréas¹⁰.

Ces résultats ne prennent cependant pas en compte la susceptibilité génétique des patients et les contextes familiaux étant donné le manque d'études dû à la faible prévalence des PDAC sur prédisposition génétique. Il manque aujourd'hui des données sur l'interaction entre facteurs environnementaux et facteurs génétiques¹⁰.

b. Facteurs de risque génétiques

Les facteurs de risque génétiques sont dits non-modifiables comparés aux facteurs environnementaux¹¹. Les cancers du pancréas avec un historique familial représentent environ 10% des patients¹². Les patients atteints de syndromes génétiques héréditaires, tels que présentés dans la Table 3, ont un risque plus élevé de développer un PDAC^{12,13}.

Altération génétique	Pathologie(s)	Ratio risque	Référence
Mutation BRCA1 Mutation BRCA2	Cancers familiaux du sein et/ou des ovaires	5 6	Mocci et al. 2013
Mutation CDKN2A/p16	Mélanomes familiaux	50	De Snoo et al. 2008
Mutation gène de réparation de mésappariements (MMR)	Syndrome de Lynch (cancer colorectal héréditaire sans polyposie)	7-10	Kastrinos et al. 2009 Møller et al. 2017
Mutation STK11	Syndrome Peutz-Jeghers	132	Korsse et al. 2013
Mutations PRSS1 et SPINK1	Pancréatites héréditaires	50-100	Rebours et al. 2008, Raimondi et al. 2010

Table 3: Les principaux facteurs de risque génétiques de développer un cancer du pancréas¹³. Le ratio de risque de développer un PDAC est toujours comparé à la population générale dans les études citées.

Une mutation germinale dans le gène BRCA2 (Breast Cancer-2) est retrouvée dans environ 19% des cas familiaux de cancer du pancréas. Cependant, les études sont contradictoires quant à l'inclusion de mutations BRCA1 dans les facteurs de risque génétiques¹⁰. Le PDAC est le deuxième type de cancer associé à la mutation CDKN2A dans les familles sujettes au développement de mélanomes¹⁴. Les

raisons génétiques à l'origine des clusters familiaux ne sont pas encore claires aujourd'hui même si des mutations de gènes augmentant le risque de cancer du pancréas ont été identifiées^{13,15}. De nombreuses études sont en cours pour étudier les modes de vie, et la génétique des pathologies des patients avec un historique familial⁷.

En dehors des maladies liées au cancer, les pancréatites héréditaires chroniques sont un facteur de risque de développer un cancer du pancréas, même si elles sont rares avec une prévalence annuelle de 50/100 000 personnes aux Etats-Unis. Le risque cumulé jusqu'à 70 ans de développer un cancer du pancréas est de 40%. Une pancréatite héréditaire chronique est un désordre autosomal dominant caractérisé par des attaques répétées de pancréatites aiguës débutant dès le jeune âge^{16,17}. Les mutations germinales PRSS1 et SPINK1 sont responsables d'une grande proportion des cas familiaux héréditaires de pancréatites. En effet, le gène PRSS1, codant pour une trypsine sécrétée par le pancréas, est retrouvé muté dans plus de 80% des patients avec une pancréatite héréditaire. Une mutation dans le gène SPINK1, codant pour un inhibiteur de trypsine, augmente de 23% le risque de développer une pancréatite chronique¹⁶. Enfin, les individus fumeurs avec une pancréatite héréditaire chronique développent un cancer du pancréas 20 ans avant les non-fumeurs¹⁷.

Enfin, il existe aussi des cancers du pancréas familiaux lorsque plusieurs cas sont agrégés dans une même famille sans syndrome génétique associé. Un cancer du pancréas est dit familial s'il y a au moins deux apparentés au premier degré ou trois apparentés quel que soit le degré de parenté¹⁸.

2. Diagnostic et prise en charge des patients

2.1. Symptômes et imagerie pour le diagnostic

Le faible pronostic de la pathologie est dû notamment à un diagnostic tardif à des stades très avancés étant donné l'absence de symptômes spécifiques de la maladie et le potentiel métastatique précoce de ces tumeurs. En effet, plus de 80% des tumeurs sont diagnostiquées à des stades avancés ou métastatiques, plus agressifs, voir Figure 3. Les métastases sont majoritairement dans le foie (62%) et dans les poumons¹⁹.

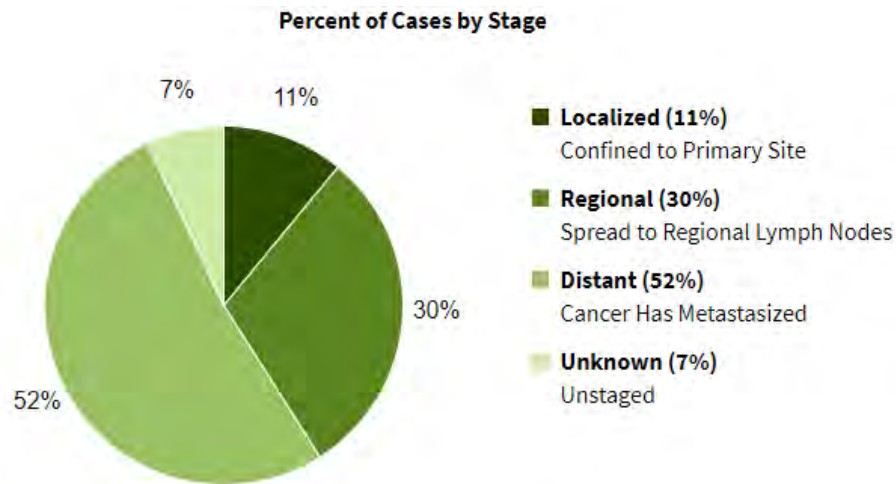


Figure 3 : Pourcentage de cas par stade du cancer du pancréas répertoriés aux Etats-Unis entre 2014 et 2018. Stades de la tumeur définis par le SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) (Pancreas Statistics | American Cancer Society - Cancer Facts & Statistics, accès le 30/08/2021).

Les symptômes cliniques du cancer du pancréas ne sont donc pas spécifiques et incluent des douleurs abdominales et dorsales, une perte de poids non expliquée, un ictère, des nausées, l'apparition nouvelle d'un diabète sucré et plus rarement la thrombophlébite migratrice (lésion de l'endothélium veineux et obstruction de la lumière par un thrombus). A chaque suspicion, une imagerie doit être réalisée. Elle est cruciale pour le diagnostic, le bilan d'extension des patients et le suivi de la progression de la maladie²⁰. L'imagerie permet d'évaluer les lésions pancréatiques et de déterminer l'implication des veines et des artères ainsi qu'une dilatation du canal pancréatique ou du canal biliaire²¹. Le diagnostic du PDAC s'appuie sur plusieurs techniques d'imagerie. La tomodensitométrie multi-détecteurs (MDCT) du pancréas est considérée comme standard dans le diagnostic et le bilan d'extension et peut être secondée par l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et la cholangiopancréatographie par résonance magnétique (MRCP). La preuve histologique peut être obtenue au niveau de la tumeur primaire (sous écho-endoscopie) ou de sites métastatiques lorsqu'ils sont présents, suite à un examen anatomopathologique²².

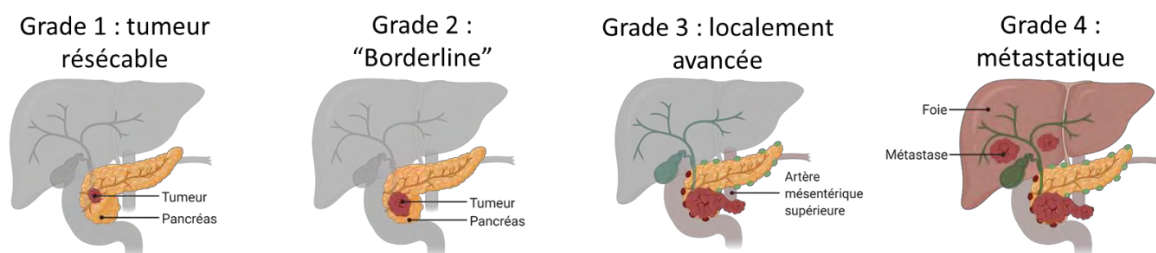


Figure 4 : Grades cliniques des tumeurs pancréatiques, selon l'extension de la maladie et l'atteinte vasculaire.

Selon l'extension de la maladie, quatre grades présentés Figure 4 sont distingués : résecable d'emblée, limite résecable ou « bordeline », localement avancé et métastatique. L'atteinte vasculaire, en particulier artérielle, est déterminante pour classer les tumeurs aux stades non métastatiques. Le grade I regroupe les tumeurs résecables qui restent limitées au pancréas avec une taille inférieure à

4cm. Le grade II correspond aux tumeurs localement avancées ou limite résécables qui restent limitées au pancréas et d'une taille supérieure à 4cm. Ensuite les tumeurs de grade III sont non résécables ou disséminées aux vaisseaux proches mais sans apparition de métastases éloignées. Pour finir le grade IV rassemble les tumeurs métastatiques avec une dissémination aux organes distants. Il est donc important de s'appuyer sur l'imagerie des lésions pour distinguer le stade d'extension (classification TNM : tumor, node, metastasis) de la maladie afin d'optimiser la prise en charge des patients. Ces dernières années, le nombre de patients diagnostiqués avec un PDAC de grade I a augmenté, avec un âge au diagnostic diminué et une survie globale améliorée, et ce sans variation pour les autres grades. Cela pourrait suggérer une amélioration des méthodes de diagnostic et de détection précoce²³. Cependant, les lésions pré-cancéreuses sont difficiles à détecter et à visualiser par imagerie et il est laborieux de différencier les stades précoces des stades avancés, ainsi la prise en charge des patients reste donc un défi. Il y a un besoin important de biomarqueurs de diagnostic précoce afin d'outrepasser ce problème³.

2.2. Biomarqueurs et facteurs pronostiques

Une néoplasie peut mettre jusqu'à plus de 10 ans avant de développer des métastases, ouvrant ainsi un large champ de possibilités pour la détection précoce afin d'empêcher le décès des patients à la suite d'un PDAC métastatique²⁴. L'identification de biomarqueurs est nécessaire pour la détection précoce, l'évaluation de la réponse aux traitements et le suivi post-résection³.

En clinique pour les tumeurs localisées, la taille, le statut ganglionnaire, les marges et la différenciation sont des facteurs pronostiques majeurs de la maladie. Pour les stades avancés, l'extension métastatique ainsi que le statut de performance et l'état nutritionnel du patient sont des facteurs importants pour établir un pronostic. Il est toutefois nécessaire d'identifier de nouveaux biomarqueurs permettant la détection précoce, le suivi de la réponse au traitement et le pronostic.

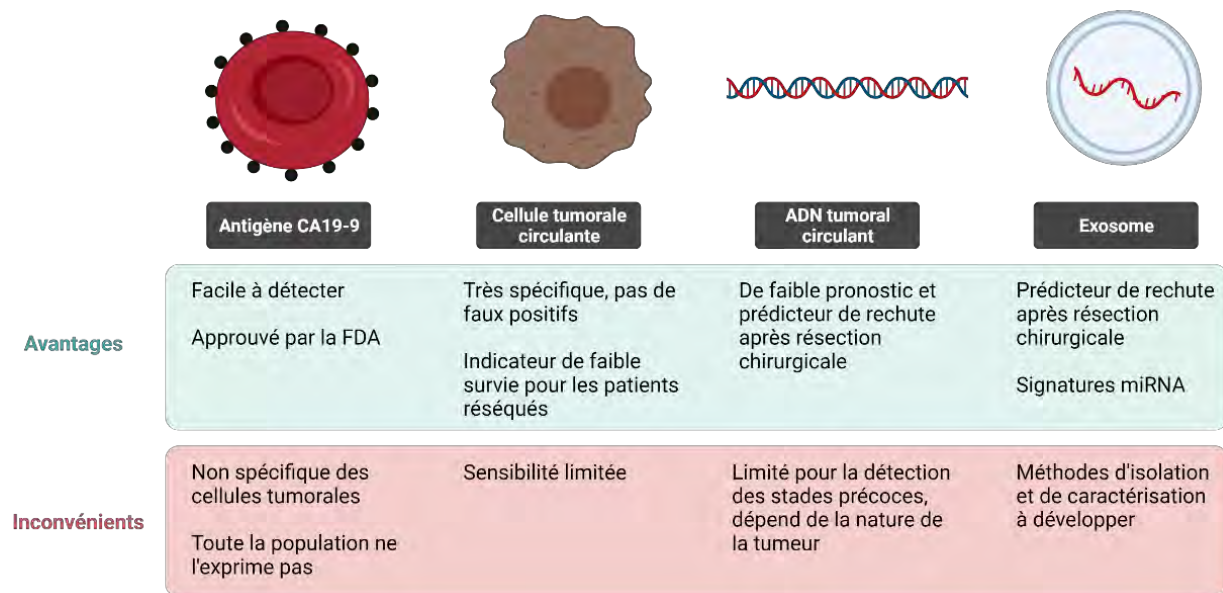


Figure 5 : Les biomarqueurs et facteurs de pronostiques dans le PDAC et leurs inconvénient, aucun d'entre eux n'est utilisé aujourd'hui en routine comme marqueur de diagnostic²⁵.

a. L'antigène CA19-9

Le biomarqueur le plus utilisé pour le diagnostic du PDAC et le suivi des patients est l'antigène sérique du cancer CA19-9 (Carbohydre Antigen 19-9) présent en surface des érythrocytes, Figure 5. En 1981, le CA19-9 est identifié dans le PDAC et est vite devenu le biomarqueur le plus étudié, marqueur d'une aberration de glycosylation des tumeurs pancréatiques et détectable par essai de radio-immunologie^{26,27}. Une augmentation du CA19-9 dans le sérum est observée dans 80% des cas de PDAC avancés. Cependant, environ 6% de la population blanche et 22% de la population noire ne possèdent pas les enzymes Lewis nécessaires à la production de CA 19-9, induisant des risques de faux négatifs pour ces sous-populations^{3,28,29}. Poruk et collègues ont montré, sur une étude incluant un grand nombre de patient, que la sensibilité et la spécificité du CA19-9 pour la détection du PDAC sont toutes deux de 80%²⁹, ce qui n'est pas suffisant pour que ce biomarqueur soient adopté en routine comme biomarqueur de diagnostic. Ensuite, la détection de CA19-9 n'est pas spécifique de la tumeur pancréatique et peut aussi être retrouvée dans des cellules bénignes. Le CA19-9 peut tout de même être utilisé dans le bilan diagnostic pour le suivi de la pathologie, les récurrences et la réponse au traitement. En effet un niveau élevé de CA19-9 suggère par exemple une maladie métastatique alors qu'une diminution post-traitement est un signe de bonne réponse^{29,3,22}.

b. Mutations K-RAS

Dans le cancer du pancréas, K-RAS est retrouvé muté dans 60-95% des cas, il est l'oncogène majoritaire^{3,30,31}. Il a été montré que toutes les mutations de K-RAS sont des SNV (variation nucléotidique simple) et à l'origine d'un déséquilibre allélique de l'allèle K-RAS muté³². En effet, les mutations sont majoritairement sur le codon 12 avec une modification de la forme sauvage GGT (glycine) en GAT (acide aspartique, G12D) et GTT (valine, G12V), le plus fréquemment³³. Une mutation

K-RAS est facteur de faible pronostic dans les cancers et est associée à la résistance aux traitements³. Mon équipe d'accueil (CRCT-Toulouse, CHU de Rangueil) a montré que les patients avec une mutation K-RAS^{G12D} ont une survie globale significativement plus courte comparée aux patients K-RAS^{WT} ou K-RAS^{G12C}^{34,35}. Cela a permis d'identifier K-RAS^{G12D} comme facteur prédictif de réponse au traitement et de plus mauvais pronostic pour les patients avec un PDAC avancé. Le type de mutation devrait donc être prise en compte pour évaluer le pronostic des patients ainsi que dans les essais cliniques^{34,35}. La recherche de mutations K-RAS en clinique est facile et fiable à partir de matériel biologique et aide au diagnostic de cas douteux ou afin d'éliminer des faux-positifs. En effet, l'identification de mutation K-RAS en plus de la cytopathologie guidée par échographie endoscopique permet de mieux différencier les tumeurs bénignes des malignes et diminue le taux de faux-positifs^{34,35,31}. Cependant, la recherche de mutations K-RAS n'est pas encore réalisée en routine clinique.

c. Biopsie liquide sérique

Une biopsie liquide pour la détection d'un cancer du pancréas est majoritairement réalisée sur le sang périphérique total³⁶. Plus de 300 autres biomarqueurs sériques sont en cours d'investigation à l'heure actuelle pour la détection du PDAC, parmi lesquels des glycolipides, des protéines, des facteurs de croissance, des cytokines et chimiokines, des molécules d'adhésion, des ARN non-codants ou les cellules tumorales circulantes, les exosomes et l'ADN tumoral circulant obtenus à partir de biopsie liquide sérique²⁵. La biopsie liquide à partir d'échantillon de sang permet de détecter des cellules cancéreuses circulantes (CTC), des fragments d'ADN tumoraux ou encore des exosomes, des vésicules tumorales circulantes extracellulaires contenant des molécules bioactives (Figure 5). Le diagnostic du PDAC basé sur les CTC est très spécifique car la plupart des études ne montrent que très peu ou pas de faux positifs. Cependant, la sensibilité est limitée car les CTC sont rares et faiblement capturées et/ou enrichies par les méthodes actuelles, Figure 5. Il a toutefois été montré que la présence de CTC indique une faible survie pour les patients avec une tumeur réséquée, localement avancée ou métastatique³⁷. Les biopsies liquides sériques ont aussi permis de révéler que 43% des patients avec une maladie localisée ont de l'ADN tumoral circulant (ctDNA) au moment du diagnostic. L'ADN tumoral circulant est un fragment d'ADN dérivé de celui de la tumeur, sécrété par les cellules dans le sang et porteur des mutations spécifiques des cellules cancéreuses³⁸. La détection de ctDNA après résection chirurgicale prédit la rechute clinique et est de faible pronostic³⁹. D'autres études sont nécessaires pour évaluer clairement la sensibilité et la spécificité du biomarqueur ctDNA pour la détection de PDAC^{38,40,41}. Enfin, les propriétés moléculaires des exosomes reflètent celles des cellules dont ils sont issus. De plus, ils ont la capacité de transmettre des signaux entre cellules. Des approches expérimentales récentes sont basées sur la détection de miRNA, d'ADN et de signatures protéiques des exosomes, mais ne sont pas utilisées en routine pour le diagnostic du PDAC^{37,42}. Les méthodes d'isolement et de caractérisation des exosomes doivent encore être plus développées, l'analyse des exosomes restent cependant prometteuse pour le diagnostic précoce du PDAC^{37,43}. Aujourd'hui, le CA19-9 est le seul biomarqueur approuvé par la FDA dans le cancer du pancréas⁴⁴. De nombreuses études visent aujourd'hui à améliorer la spécificité et la sensibilité et à contrecarrer les inconvénients de ces biomarqueurs dans le but d'améliorer la détection précoce du PDAC²⁵ (Figure 5).

De plus, K-RAS est aussi détecté dans les cellules tumorales circulantes, les exosomes et sur l'ADN circulant. 25% de l'ADN circulant est muté pour K-RAS et donc défini d'ADN tumoral circulant^{38,40,41}. La fréquence de la mutation de K-RAS dans l'ADN circulant influence négativement le pronostic des patients atteints d'un PDAC, après chirurgie ou non. La prévalence des mutations K-RAS semble être un marqueur fiable et non-invasif pour dépister le PDAC à un stade précoce^{38,40,41}. Les méthodes actuelles pour évaluer les mutations K-RAS sont notamment le séquençage direct et la PCR digitale en gouttelettes (digital droplet PCR) en temps réel, reconnues pour leur fiabilité à partir de tissu et biopsie liquide. Cependant les tests de mutation K-RAS ne sont pas assez efficaces aujourd'hui pour prédire la réponse aux traitements^{34,35}. Des études afin d'identifier des marqueurs précoces retrouvés dans les lésions pré-néoplasiques tels que K-RAS muté pourrait être prometteuses afin d'améliorer le dépistage du PDAC et la prise en charge des patients.

3. Mécanismes et physiopathologies

3.1. Les gènes fréquemment altérés

a. Oncogènes et suppresseurs de tumeurs

Le profil mutationnel des tumeurs est informatif pour mieux comprendre leur évolution et identifier de potentiels cibles thérapeutiques. Le PDAC est dominé par la prévalence des mutations de l'oncogène K-RAS, activatrices de la voie des MAPK^{3,30,45}, voir Figure 6. La voie PI3K-AKT, essentielle pour la survie cellulaire, est constitutivement activée dans la plupart des PDAC dû à l'activation de l'oncogène K-RAS ou à l'amplification d'AKT2 qui a lieu dans 10 à 15% des tumeurs. Enfin, un autre oncogène prévalent dans le cancer du pancréas est C-MYC, amplifié dans 20-30% des PDAC⁴⁶. C-MYC est un facteur de transcription impliqué dans divers processus cellulaires tels que la réplication de l'ADN, le métabolisme et l'apoptose, via la modulation de l'expression des gènes. Ainsi C-MYC stimule les voies de prolifération cellulaire si muté ou surexprimé⁴⁷.

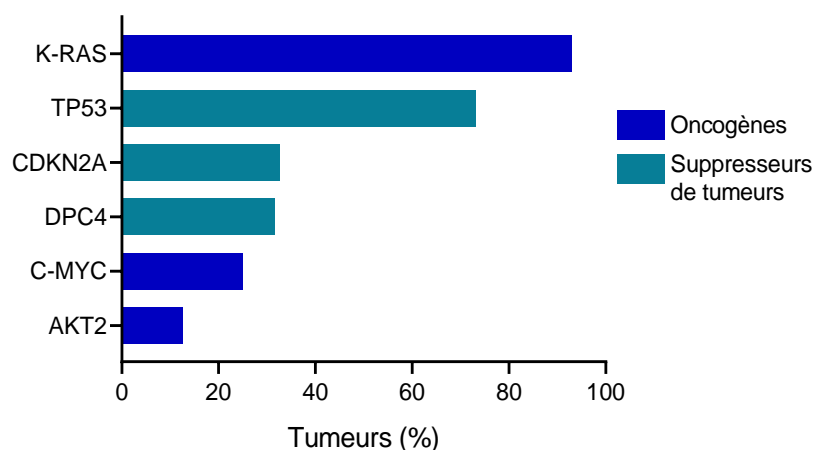


Figure 6 : Oncogènes et suppresseurs de tumeur les communément altérés dans le cancer du pancréas, les chiffres varient selon les études mais les gènes les plus mutés sont toujours les mêmes^{30,45,46}.

Divers gènes suppresseurs de tumeurs sont altérés dans les cancers afin de permettre l'initiation et la progression tumorale. Le gène CDKN2A (inhibiteur de kinase dépendante des cyclines 2A) code pour p16^{INK4a} et p14^{arf}, deux protéines agissant sur le cycle cellulaire. Ce sont des acteurs importants des voies suppressives de tumeur, très souvent désactivés dans les cancers⁴⁸. L'inactivation de CDKN2A est retrouvée dans 30-35% des PDAC (Figure 6) par différents mécanismes : délétion homozygote, mutations couplées à une perte de l'allèle sauvage ou une hyperméthylation^{29,44}. De plus, d'autres mutations existent afin d'inactiver les points de contrôle cellulaire et permettre la prolifération des cellules cancéreuses⁴⁹. TP53 (protéine tumorale 53) code pour la protéine p53 qui est un facteur de transcription impliqué dans diverses fonctions cellulaires telles que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la sénescence. P53 exerce un rôle antiprolifératif en réponse à un stress cellulaire⁵⁰. Ce gène suppresseur de tumeur est le plus fréquemment muté dans les cancers humains. Dans les tumeurs pancréatiques, TP53 est retrouvé muté dans presque 70-80% des cas (Figure 6) avec en majorité des mutations non-sens associées à une perte allélique^{30,45}. La voie de signalisation TGF- β / SMAD4 contrôle les voies de signalisation de la membrane cellulaire vers le noyau et est impliquée dans un grand nombre de processus biologiques tels que la prolifération, l'apoptose ainsi que dans l'initiation et la progression tumorale⁵¹. DPC4, le gène codant pour SMAD4, est retrouvé muté dans 30-35% des tumeurs pancréatiques (Figure 6), le plus fréquemment par délétion homozygote. Les mutations CDKN2A, TP53 et DPC4 sont des événements plus tardifs qui marquent l'agressivité du néoplasme⁵². D'autres gènes tels qu'ARID1A et TGFBR2 sont mutés dans environ 5-10% des tumeurs.

b. Réparation des dommages à l'ADN

Dans le PDAC, 63 mutations génétiques en moyenne par cancer ont été identifiées, couvrant 12 voies de signaux de transduction. Les voies les plus fréquemment altérées par mutations somatiques et germinales sont notamment le point de contrôle G1-S, le cycle cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN^{30,45}. La forme d'altération génétique la plus fréquente dans le cancer du pancréas sont les variants simple-nucléotide (SNV)^{45,53-55}. Parmi les voies les plus fréquemment altérées se trouvent notamment le point de contrôle G1-S, la stabilité génomique et la réparation des dommages à l'ADN^{32,56}.

Les gènes BRCA1 et BRCA2, acteurs majeurs de la recombinaison homologue (HR), sont fréquemment retrouvés mutés dans les cancers, en particulier le cancer du sein, et présentent un réel enjeu thérapeutique. En effet, leur mutation rend la voie HR inactive et oblige des voies secondaires moins conservatrices et génératrices d'erreurs à prendre le relais pour la réparation des cassures de l'ADN. Chez les patients atteints d'un cancer du pancréas, une mutation germinale BRCA est retrouvée dans 5-7% des tumeurs. De plus, environ 19% des cas familiaux de PDAC sont attribués à une mutation germinale, en particulier de BRCA2^{54,57,58}. En effet, une mutation germinale BRCA2 est associée à un risque plus élevé de développer un cancer du pancréas⁵⁸. Les mutations somatiques dans les voies de réparation de l'ADN qui miment le phénotype due à la mutation germinale de BRCA1/2 sont communément appelés les gènes « BRCAness ». Par conséquent, la signature BRCAness désigne les tumeurs qui n'ont pas de mutation germinale BRCA1/2 mais qui partagent une déficience HR et des vulnérabilités similaires⁵⁹. Les mutations BRCA sont beaucoup étudiées à l'heure actuelle mais ne

concernent qu'une faible proportion des patients, les études récentes tendent à rechercher plus largement les mutations dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR). En effet, environ 1/4 des PDAC présentent une altération somatique ou germinale dans les gènes de la DDR^{45,56}. Les pourcentages de mutations varient entre les études selon le type d'approche et le nombre de patients inclus. En ce qui concerne les variants germinaux, les plus caractérisés dans le PDAC sont notamment BRCA1, BRCA2, PALB2, FANC et ATM^{56,60,61}. ATM est retrouvé muté dans environ 8% des PDAC. Enfin, une mutation dans la voie de réparation par mésappariement (MMR) est retrouvée dans 1 à 2% des PDAC.

3.2. Les lésions pré-néoplasiques

Le cancer du pancréas se développe depuis l'épithélium canalaire via un processus de carcinogénèse en multiples étapes, allant de lésions précurseurs non invasives jusqu'au développement d'un carcinome et éventuellement d'une maladie métastatique (voir Figure 7). Ce processus implique l'acquisition graduelle de mutations dans des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur ainsi que des changements de l'environnement pancréatique. En effet, un environnement pro-inflammatoire favorise le développement de lésions précoces alors qu'un microenvironnement très fibrotique et suppresseur d'immunité est favorable à la croissance tumorale⁶². Il existe différents types de lésions pré-néoplasiques dans le pancréas telles que les néoplasies pancréatiques intraépithéliales (PanIN), les tumeurs intracanales papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP) ou encore les cystadénomes mucineux^{33,63}.

Les PanIN sont les lésions précurseurs majoritaires du cancer du pancréas. En effet, des lésions PanIN ont été identifiées dans 82% des cancers invasifs⁶⁴. Elles sont microscopiques et divisées en 3 sous-types selon le stade de développement de la lésion. Les PanIN de type 1 sont formées à partir de cellules canalaire sécrétrices de mucine dans le cytoplasme et avec un petit noyau au niveau de la membrane basale. Les PanIN de type 2 ont un aspect papillaire complexe et possèdent une perte de polarité et une élévation de la taille nucléaires. Enfin, les PanIN de type 3 ont des noyaux proéminents et des mitoses anormales^{33,63}. Le processus de carcinogénèse pancréatique se développe depuis l'épithélium canalaire en multiples étapes, allant de lésions PanINS non-invasives vers le développement du PDAC. La métaplasie acino-canalaire est la première étape de la séquence de carcinogénèse des PanINS⁶⁵. L'initiation et la progression du néoplasme sont contrôlées par divers altérations génétiques et épigénétiques⁶⁶. Les mutations caractéristiques du cancer du pancréas sont déjà présentes dans les lésions pré-néoplasiques. En effet, K-RAS, CDKN2A, TP53 et SMAD4 sont des gènes altérés retrouvés mutés progressivement pendant la carcinogénèse pancréatique, suggérant un développement séquentiel des lésions vers le développement d'une tumeur^{66,67}. La Figure 7 montre que K-RAS et CDKN2A apparaissent mutés à des stades plus précoces et TP53 et SMAD4 (DPC4) à des stades plus tardifs⁶⁸. HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) est un proto-oncogène retrouvé amplifié dans les lésions précoces avec une fréquence d'environ 12%. Les études montrent des résultats variables et aujourd'hui le rôle pronostique de l'amplification de HER-2 et sa prévalence sont encore peu claires⁶⁹.

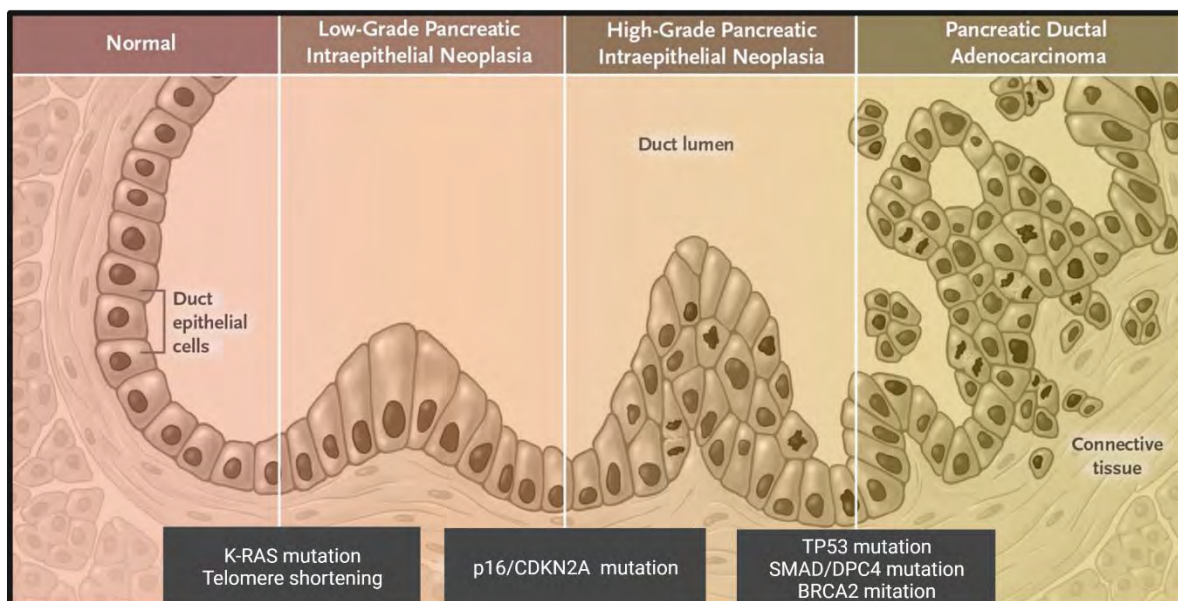


Figure 7 : Modèle de progression du cancer du pancréas : de l'épithélium canalaire normal à la tumeur infiltrée. Image adaptée de Iacobuzio-Donahue et Herman 2014.

Le dosage des mutations K-RAS augmente avec la progression tumorale depuis les lésions PanIN-1 jusqu'au développement du cancer^{68,33}. Dans un modèle murin, des niveaux physiologiques de K-RAS^{G12D} induisent des lésions canalaire de mêmes propriétés que les PanINs humaines. Ces lésions sont très prolifératives, montrent des preuves histologiques de progression et activent des voies de signalisation non sollicitées dans des cellules canalaire épithéliales. Ces PanIN peuvent développer spontanément des adénocarcinomes invasifs et métastatiques, prouvant ainsi que les PanIN sont des précurseurs du cancer du pancréas⁶⁷. Le niveau d'activité de Ras semble décisif dans la progression du PDAC⁷⁰. Le temps estimé pour développer un cancer du pancréas est de plus de 20 ans, mais le manque de moyen de détection des lésions précoces aboutit la plupart du temps à un diagnostic de la maladie à un stade métastatique⁶². Mieux comprendre les mécanismes génétiques au cours de l'initiation et du développement du cancer du pancréas pourrait permettre d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques ou d'envisager des approches de chimio-prévention^{66,67}.

3.3. La biologie du PDAC

a. Classification moléculaire

Le PDAC est constitué de cellules cancéreuses épithéliales et de cellules stromales. Les tumeurs pancréatiques possèdent un microenvironnement et des caractéristiques moléculaires bien particuliers, participant à l'hétérogénéité des tumeurs pancréatiques. De nombreuses études ont essayé de classer les tumeurs pancréatiques selon les caractéristiques moléculaires épithéliales⁷¹. Tout d'abord, Collisson et collègues ont mis en évidence pour la première fois une classification de sous-types de tumeurs pancréatiques basée sur l'analyse globale de l'expression des gènes à partir de cellules primaires, de lignées cellulaires humaines et murines de cancers du pancréas. Les PDAC ont été sous-catégorisés comme classique (expression de gènes associés à l'adhésion et de gènes

épithéliaux), quasi-mésenchymateux (expression de gènes mésenchymateux) ou de type exocrine (expression d'enzymes digestives). Une signature génique a été définie pour chaque sous-groupe afin d'aider à mieux classer les patients. Les gènes de la signature du sous-type classique sont par exemple GATA6, MUC13, PLS1, TFF1 et TFF3, du sous-type quasi-mésenchymateux sont TWIST1, PHLDA1, SLC2A3 et enfin du sous-type exocrine ce sont REG1B, PRSS1/2 et CLPS. Les auteurs ont alors pu montrer que les PDAC de sous-type quasi-mésenchymateux ont une survie largement diminuée et une plus grande sensibilité à la gemcitabine, comparées au groupe classique⁷². Par la suite, un autre groupe a proposé une classification plus spécifique du stroma et de la tumeur basée sur une analyse globale d'expression génique d'échantillons de tumeurs primaires et métastatiques de PDAC. Les tumeurs sont identifiées comme classique si elles expriment des gènes d'adhésion, épithéliaux ou ribosomaux avec une expression élevée de GATA6. Au contraire, la tumeur est dite basale si elle exprime des gènes de laminines et kératines (Figure 8). Les auteurs ont montré une survie de 19 mois pour le sous-groupe classique contre 11 mois seulement pour le groupe basal. Le stroma est qualifié de normal lorsque les gènes associés aux cellules étoilées du pancréas sont exprimés (activine, périostine). A l'inverse, le stroma est activé si des gènes associés aux macrophages promoteurs de tumeur sont exprimés (ITGAM, CCL13, CCL18)⁷³.

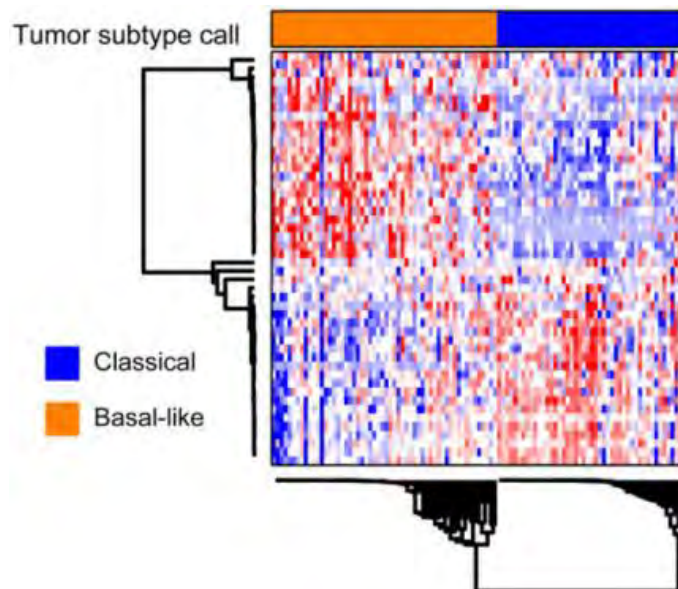


Figure 8 : L'expression des gènes tumoraux permet de classer en deux sous-types de PDAC : les tumeurs classiques et les tumeurs basales. Image extraite de Moffitt et al. 2015.

Peu de temps après, un autre groupe publie ses travaux sur la classification du PDAC basée sur l'analyse d'un grand nombre de tumeurs humaines. Cette classification ressemble à celle de 2011, avec plus de spécificité et un sous-type immunogénique, caractérisé par l'expression de gènes d'infiltration immunitaire, de signalisation des cellules B, de la présentation d'antigène, de la signalisation TLR et d'autres⁷⁴. En 2017, Raphael et collègues proposent d'affiner la classification en sous-types classique et basal grâce à une analyse multi-plateforme incluant de la génomique, de la transcriptomique et de la protéomique, et ce sur 150 tumeurs pancréatiques humaines résequées. Le sous-type basal est caractérisé par les mutations inactivatrices de TP53, un profil spécifique de miARN (enrichissement des

miR-21-5p et miR-221-3p) et de méthylation de l'ADN (perte d'expression de GATA-6 et miR-192-5p). Le ARN longs non codants EVADR, DEANR1, GATA6-AS1 sont enrichis dans le sous-type classique³⁰. Etant donné le potentiel clinique de la classification en sous-types du PDAC, il est important d'uniformiser les différentes approches pour définir une classification universelle utilisable en clinique⁷¹. Plus récemment, Nicolle et collègues ont créé une signature transcriptomique unique de gradient moléculaire de PDAC (PAMG) avec une valeur pronostique et une association à la progression sous traitement FOLFIRINOX. Cette signature permettrait de regrouper les précédentes classifications et de mieux caractériser l'hétérogénéité tumorales pancréatique, en abandonnant la dichotomie habituelle, en faveur d'une répartition plus large des échantillons de patients⁷⁵.

En conclusion, les études transcriptomiques ont identifié un sous-type dit basal de moins bon pronostic dans les cohortes de patients atteints de PDAC. Les nouvelles connaissances de la composition moléculaire du PDAC pourraient être utilisées pour adapter les thérapies ou aider à la prise de décision thérapeutique⁷³. De réels efforts scientifiques et informatiques ont été fait cette dernière décennie afin de s'éloigner des modèles cellulaires et se rapprocher un maximum des tumeurs humaines, et de développer des approches multi-omics permettant de combiner un maximum d'informations moléculaires sur la tumeur. Cependant 85% de tumeurs sont non-résécables, n'offrant ainsi pas de matériel biologique analysable après chirurgie. De plus, l'infiltration de cellules stromales non transformées dans la tumeur rend difficile l'obtention de résultats d'analyses spécifiques de la tumeur pancréatique⁷⁶.

b. Reprogrammation du métabolisme cellulaire : l'apport en nutriments

Les tumeurs pancréatiques possèdent un microenvironnement très dense et hypoxique dépourvu de nutriments et d'oxygène. Les cellules tumorales ont dû s'adapter et développer des moyens alternatifs. Les tumeurs mutées pour K-RAS sont par exemple capable d'absorber des protéines extracellulaires via la macropinocytose et la dégradation lysosomale. Ainsi, piéger les protéines extracellulaires est un moyen important d'absorption de nutriments dans le PDAC⁷⁷. En effet, il a notamment été montré que les cellules étoilées du pancréas sécrètent de l'alanine, un acide aminé non essentiel, pour permettre à la cellule tumorale d'alimenter le cycle de Krebs. Ce changement de source métabolique permet de diminuer la dépendance de la tumeur aux glucose et nutriments du sérum, limités dans le microenvironnement tumoral pancréatique. Ainsi un réseau métabolique se met en place dans lequel diverses sources de carbone sont utilisées pour favoriser la croissance de la tumeur dans un microenvironnement tumoral austère^{78,79}. De plus, il a été montré dans des modèles murins que bloquer l'apport en nutriments des cellules du microenvironnement tumoral diminue la progression de la tumeur. La tumeur est donc capable de s'adapter aux conditions difficiles environnementales via la dégradation et l'import d'éléments de la matrice extracellulaire et la sollicitude des cellules stromales. En conséquence, cibler les adaptations métaboliques est une nouvelle approche thérapeutique prometteuse³.

c. Le microenvironnement tumoral

Le stroma est composé de protéines de la matrice extracellulaire de type collagène, fibronectine, laminine ainsi que des glycoprotéines, protéoglycanes, glycosaminoglycanes. Les éléments cellulaires du stroma tumoral incluent les cellules immunitaires infiltrées, les cellules étoilées pancréatiques, les fibroblastes associés au cancer (CAF), les adipocytes, les cellules endothéliales et les cellules neuronales³. L'interaction entre les cellules stromales et les cellules néoplasiques permet la formation d'un microenvironnement tumoral modulateur de l'agressivité tumorale⁸⁰. La desmoplasie mise en place forme une fibrose dense autour de la tumeur et résulte en un environnement très hypoxique pour la tumeur. Les cellules étoilées peuvent interagir avec les cellules cancéreuses ainsi qu'avec les éléments du stroma et avec les cellules β des îlots de Langerhans dans le but de faciliter la progression tumorale. Elles peuvent augmenter la survie des cellules cancéreuses (inhibition apoptose), se déplacer aux sites de métastases pour aider les cellules métastatiques à proliférer et disséminer et participent à l'évasion immunitaire³. Les cellules immunitaires dans le cancer du pancréas sont les cellules T régulatrices (majorité étant CD4⁺), des cellules myéloïdes suppressives, des macrophages associés aux tumeurs et des mastocytes. Aujourd'hui, les acteurs de la suppression de l'immunité antitumorale font l'objet de nouvelles approches d'immunothérapies dans le PDAC^{3,81}.

4. Le traitement du cancer du pancréas

4.1. Les molécules thérapeutiques utilisées dans le traitement du PDAC

La gemcitabine (Gemzar) ou 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine (dFdC) est un analogue de désoxycytidine (dC) inhibant la synthèse d'ADN via différents mécanismes (Figure 9). En effet les métabolites intracellulaires dérivés de la gemcitabine peuvent notamment inhiber l'action de la ribonucléotide réductase et de la thymidylate synthétase, deux enzymes cruciales dans le métabolisme des pyrimidines pour la synthèse d'ADN. De plus, le dFdCTP métabolisé et le dC sont en compétition pour la synthèse d'ADN et le dFdCTP incorporé bloque la progression des polymérase et l'élongation de la réplication de l'ADN par terminaison de chaîne. Ainsi, la gemcitabine induit l'inhibition de la réplication de l'ADN et du cycle cellulaire et induit l'apoptose des cellules^{82,83}. La gemcitabine a été approuvée par la FDA en 1997 et est considérée depuis comme le traitement standard du cancer du pancréas.

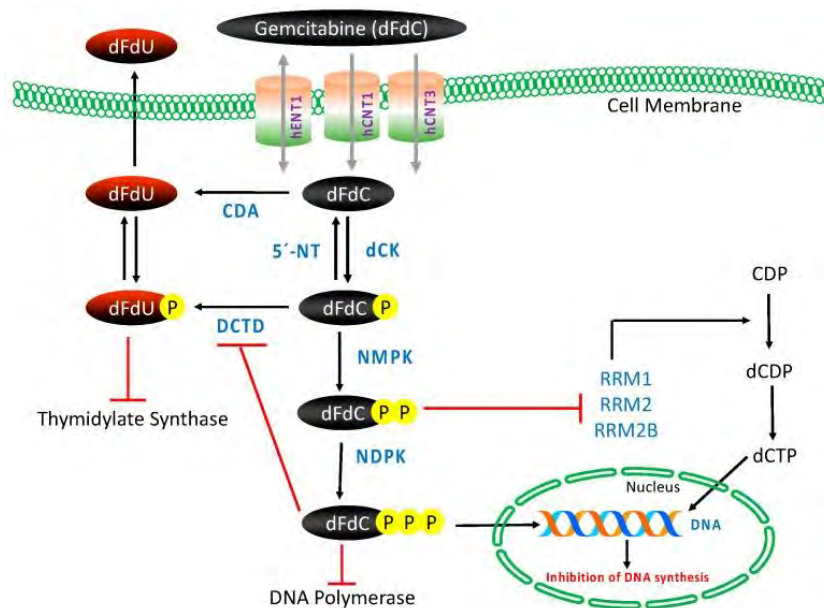


Figure 9 : Métabolisme cellulaire de la Gemcitabine. hNT : human nucleoside transporter. Image extraite de Amrutkar et Gladhaug. 2017.

Le FOLFIRINOX est une polychimiothérapie composée de leucovorine (acide folinique), de Fluorouracile (5-FU), d'Irinotecan hydrochloride et d'Oxaliplatine. Chacune des molécules présente dans cette combinaison a été approuvée par le FDA pour le traitement du cancer. Le FOLFIRINOX a été approuvé par la FDA en 2011 pour le traitement des cancers du pancréas avancés⁸⁴. Le 5-FU ou 5-Fluorouracile est un antimétabolite analogue de thymidine qui bloque l'activité de la thymidylate synthétase (TS), essentielle à la production de dTTP pour la synthèse d'ADN. Le 5-FU perturbe aussi la transcription car il peut se métaboliser en 5-FUTP qui peut s'incorporer dans l'ARN. L'acide folinique permet de potentialiser l'effet du 5-FU. L'Irinotecan lie de façon spécifique le complexe topoisomérase-ADN afin de bloquer la réplication, responsable de l'activité cytotoxique du médicament⁸⁵. L'Oxaliplatine est un dérivé du cisplatine, le premier agent à base de sels de platine découvert. Il lie les purines de façon covalente et forme ainsi des adduits d'ADN provoquant des distorsions de la double hélice. L'objectif de ces thérapies à base de sels de platine est d'induire davantage de dommages à l'ADN dans des tumeurs pour espérer créer une létalité spécifique de la cellule tumorale. L'Oxaliplatine, dérivé du cisplatine, est aujourd'hui activement utilisée en clinique pour les patients atteints de cancers colorectaux et a été approuvée par la FDA en 2002 aux Etats-Unis et 2004 en Europe.

Le nab-paclitaxel est un médicament à base de paclitaxel lié à une nanoparticule stabilisée d'albumine (nab-paclitaxel). Le paclitaxel est un inhibiteur des microtubules favorisant leur dimérisation et bloquant leur dépolymérisation. Ainsi, la réorganisation du réseau de microtubules nécessaire lors de la mitose ne peut avoir lieu. Le nab-paclitaxel a été approuvée en 2013 par la FDA pour le traitement des PDAC avancés en combinaison avec la gemcitabine. Il n'est toutefois pas utilisé en France, n'étant pas remboursé par la sécurité sociale.

Les PARP pour Poly (ADP-ribose) polymérase sont une famille importante de protéines de la voie de réparation BER (réparation par excision de base) impliquée notamment dans la réparation des cassures

simple-brin de l'ADN. Les PARP lient les lésions d'ADN comme les cassures simple-brin pour servir de plateforme au recrutement de divers effecteurs de la réparation. Les inhibiteurs de PARP (PARPi) interagissent avec le site liant le cofacteur β -NAD⁺ dans le domaine catalytique de PARP1 et PARP2, empêchant sa libération du site de dommage. La séquestration de PARP sur l'ADN encombre alors la progression de la machinerie de réplication et engendre un blocage des fourches de réplication. Il a été établi que les PARPi visent à induire la mort cellulaire selon deux principes. Le premier repose sur une stratégie de létalité synthétique dans des cellules tumorales BRCA mutées, par l'augmentation du nombre de cassures double brins de l'ADN qui ne seront pas réparées par recombinaison homologue (Figure 10). Le second consiste à bloquer la réparation des cassures de l'ADN faisant intervenir PARP, cassures engendrées par d'autres agents chimiothérapeutiques^{86,87}.

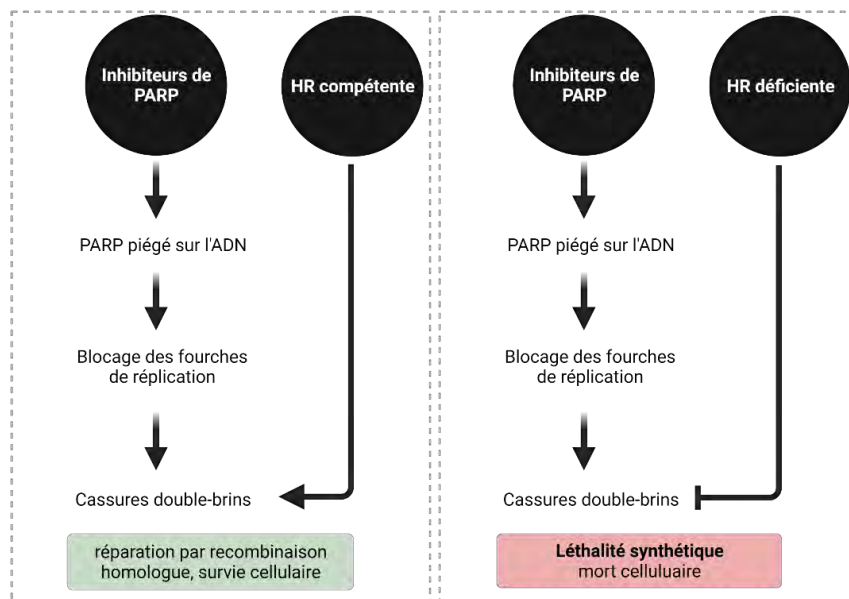


Figure 10: Principe conventionnel de la létalité synthétique induite par inhibition de PARP dans un contexte de déficience pour la réparation par recombinaison homologue. Adaptation de Lord et Ashworth de 2017.

Cependant, des études très récentes révèlent un autre principe de létalité synthétique induite par les inhibiteurs de PARP. En effet, il a été proposé que l'inhibition de PARP induit l'accumulation de trous d'ADN simple brin (voir Introduction de thèse – La régulation des fourches de réplication), létale dans un contexte les cellules mutées pour BRCA, dans lesquelles les trous d'ADN simple brin non répliqué sont déjà accumulés^{88,89}.

4.2. Protocoles de traitement standards

La plupart des patients sont diagnostiqués à un stade avancé et techniquement non-opérable à cause d'un envahissement vasculaire ou d'une dissémination métastatique. En conséquence, moins de 20% des patients sont éligibles pour la résection. Le protocole de traitement est donc adapté selon le stade d'évolution du cancer du pancréas (Figure 11, Figure 12).

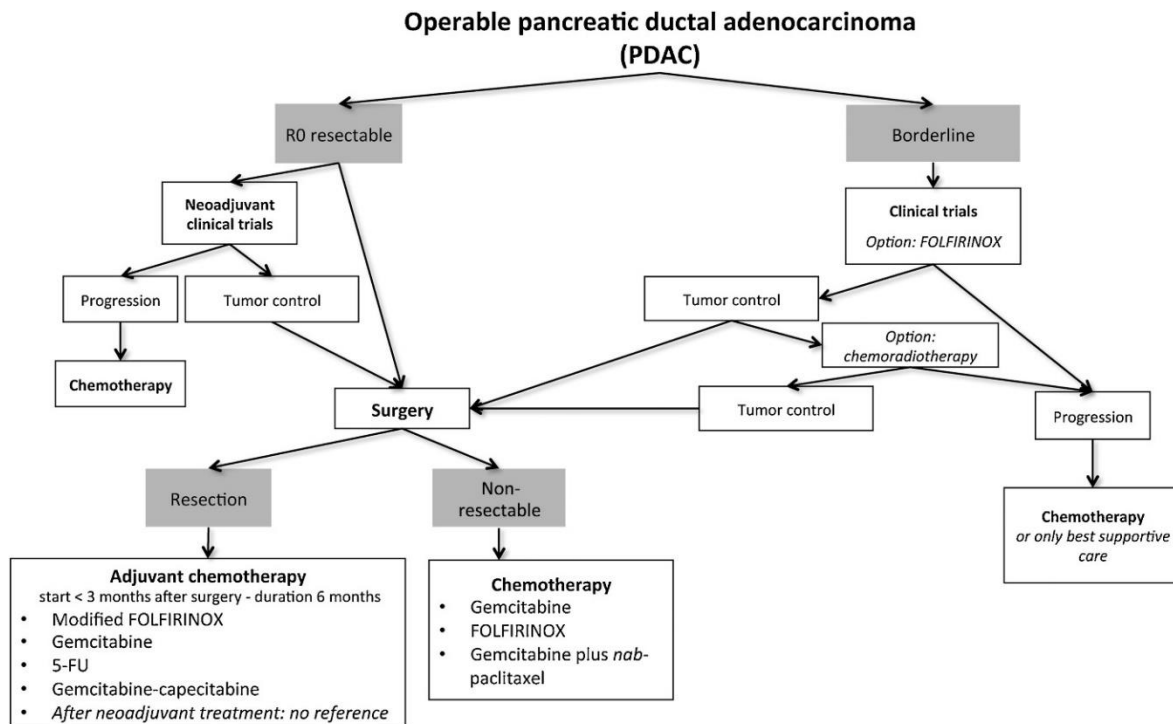


Figure 11 : schéma décisionnel thérapeutique pour une tumeur locale résecable et limite résecable. Image extraite de Neuzillet et al. 2018.

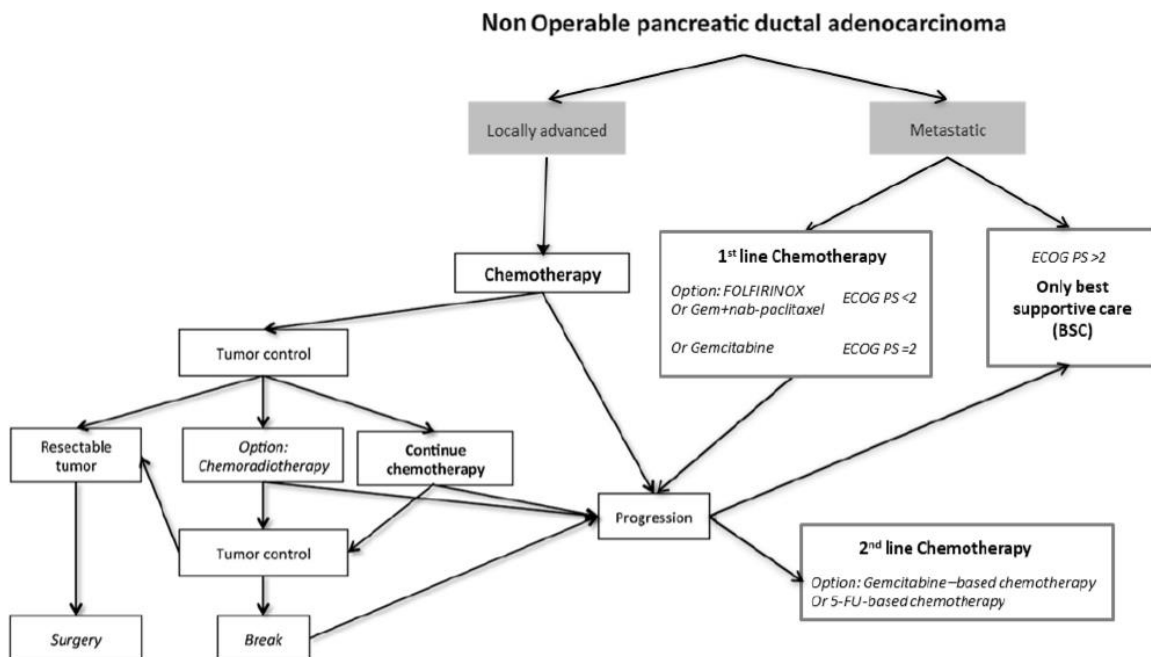


Figure 12 : schéma décisionnel thérapeutique pour une tumeur non-résecable, localement avancée ou métastatique. Image extraite de Neuzillet et al. 2018 (<http://thesesups.ups-tlse.fr/4539/>)

a. Tumeurs résecables

Pour les tumeurs localisées, la résection chirurgicale reste la seule solution curative pour le cancer du pancréas (Figure 11). Après des améliorations cliniques de la prise en charge des patients et des

techniques opératoires, la chirurgie du cancer du pancréas peut être réalisée avec sécurité dans de grands centres avec un taux de morbidité acceptable inférieur à 5%³. La chirurgie a pour but de retirer la tumeur dans son intégralité macro et microscopiquement afin d'être curative. Le type de chirurgie dépend de la localisation de la tumeur et de l'implication des artères et des veines. En effet, pour une tumeur dans la tête du pancréas, la procédure standard est une pancréaticoduodénectomie alors que dans le corps ou dans la tête l'opération chirurgicale consiste en une spléno pancréatectomie⁹⁰. Une étude de 2017 montre que le taux de survie à 5 ans des patients ayant une tumeur de moins de 2cm et retirée par chirurgie est de plus de 40%⁹¹. Toutefois, la chirurgie est liée à un risque élevé de récurrence (>90% des patients) étant donné que les patients opérés ont souvent une maladie micrométastatique.

Ainsi, la chirurgie seule ne suffit pas pour maintenir une survie à long terme. Pour cela, des traitements standards adjuvants sont administrés à la suite de la résection tumorale⁹²⁻⁹⁴ (Figure 11). Ces thérapies adjuvantes ont pour but d'optimiser le potentiel curatif du traitement. Plusieurs études ont examiné l'effet de chimiothérapies en adjuvant après résection chirurgicale. Une étude publiée en 2009 (essais cliniques ESPAC-1 et 3) a révélé une survie médiane de 23,2 mois pour les patients avec une tumeur réséquée et une thérapie adjuvante à base de 5-FU et acide folique (FA), comparée à une survie médiane de 16,8 mois pour les patients réséqués sans thérapie adjuvante. Ces résultats montrent l'intérêt d'une thérapie adjuvante à base de 5-FU et FA pour les patients réséqués⁹⁵. Une autre étude de phase III publiée en 2014 (ISRCTN34802808) montre une survie sans progression de 6,7 mois pour les non-traités contre 13,4 mois pour les patients traités après 6 mois de traitement à base de gemcitabine en adjuvant. De plus les patients ayant reçus une thérapie adjuvante à base de gemcitabine ont une survie globale à 5 ans de 20,7% comparé au groupe contrôle pour lequel elle est de 10,4%⁹⁴. Ensuite, une étude clinique ESPAC-3 de phase III a mis en avant que la médiane de survie globale des patients traités avec la combinaison gemcitabine et capécitabine est de 28 mois comparé à la survie des patients traités avec la gemcitabine seule qui est de 25,5 mois⁹³. Les résultats de l'essai clinique ESPAC-3 ont aussi révélé une médiane de survie de 23 mois pour les patients traités 5-FU et acide folique et de 23,6 mois pour les patients traités avec gemcitabine, ne révélant pas de différence de survie entre les deux traitements appliqués en adjuvant⁹². Une étude clinique PRODIGE 24 (NCT01526135) plus récente et de phase III a relevé une médiane de survie sans progression de 21,6 mois pour le groupe traité avec du FOLFIRINOX en adjuvant et 12,8% pour le groupe traité avec de la gemcitabine. De plus, le taux de survie globale des patients à 3 ans est de 39,7% pour le groupe FOLFIRINOX et de 21,4% pour le groupe gemcitabine⁹⁶. Toutefois le FOLFIRINOX reste accompagné d'une forte toxicité. Aujourd'hui, la procédure standard de traitement de 6 mois à base de FOLFIRINOX ou de gemcitabine est recommandée après résection chirurgicale. Dans une étude récente de phase III ATRACT, les patients traités en adjuvant avec la combinaison nab-paclitaxel et gemcitabine ont une médiane de survie dans progression de la maladie de 16,6 mois contre 13,7 mois pour les patients traités avec la gemcitabine seule. Cette étude propose la combinaison nab-paclitaxel et gemcitabine comme thérapie adjuvante pour les patients non éligibles au FOLFIRINOX. D'autres études de suivi de survie globale des patients sont toutefois nécessaires⁹⁷. Pour conclure, avec une résection macroscopique de la tumeur et les traitements adjuvants, le taux de survie à 5 ans a été augmenté à 15-25%⁹²⁻⁹⁴. Seulement, moins de 20% des patients restent éligibles pour la résection et parmi eux,

après chirurgie et traitement adjuvant, environ 80% des patients présentent une récurrence conduisant au décès³.

Aujourd'hui, les études visent à étudier le bénéfice d'une thérapie néoadjuvante. Dans l'étude clinique Prep-02/JSAP05 de phase II/III (UMIN000009634), la médiane de survie globale est de 36,7 mois pour les patients recevant une thérapie néoadjuvante à base de gemcitabine et S-1 suivie d'une chirurgie, comparée à 26,6 mois avec une chirurgie seule⁹⁸. D'autres études cliniques sont en cours pour montrer le bénéfice d'une thérapie néoadjuvante. C'est le cas de l'essai PANACHE-01-PRODIGE48 de phase II qui vise à évaluer l'efficacité et la toxicité des combinaisons FOLFOX et FOLFIRINOX en néoadjuvant avant résection chirurgicale⁹⁹. Ensuite, l'étude NEONAX de phase II (NCT02047513) vise à déterminer l'efficacité de la thérapie néoadjuvante combinant le nab-paclitaxel et la gemcitabine avant résection chirurgicale¹⁰⁰. Enfin, l'essai PREOPANC-2 (2017-002036-17) a pour objectif de comparer deux thérapies néoadjuvantes : le FOLFIRINOX et une chimioradiothérapie à base de gemcitabine¹⁰¹. Ce type de traitement n'est pas encore la référence mais pourrait apporter des avantages considérables tels que l'induction d'une réponse tumorale afin d'augmenter les possibilités de résection R0, le traitement de façon précoce d'une maladie à potentiel métastatique ou encore le test de la chimiosensibilité des tumeurs et la tolérance du patient⁹⁰ (Figure 11).

b. Tumeurs localement avancées et limite résécables (« bordeline »)

La définition des tumeurs limites résécables dites « bordeline » est anatomique et radiologique et s'appuie sur l'implication vasculaire de la tumeur. Le protocole thérapeutique le plus adapté pour ces tumeurs est l'application de thérapies néoadjuvantes avant une éventuelle chirurgie^{20,90,102}. Les chimiothérapies néoadjuvantes sont à base de FOLFIRINOX ou de la combinaison gemcitabine et nab-paclitaxel, suivies ou non de chimioradiation⁹⁰ (Figure 11).

Pour les tumeurs localement avancés et non résécables, le traitement de référence est la chimiothérapie d'induction, même si, par la suite, la chirurgie ne reste possible que dans peu de cas (Figure 12). La gemcitabine est le traitement le plus appliqué même si son effet reste faible. Environ 1/3 des patients avec une tumeur limite résécable ou localement avancée et non résécable pourrait être opéré après un traitement néoadjuvant ou d'induction à base de FOLFIRINOX, avec des résultats similaires à ceux des patients avec une tumeur résécable à l'origine^{103,104}. En conséquent, une première ligne FOLFIRINOX semble efficace pour ce type de tumeur et ce avec un profil de toxicité gérable. Les patients avec une tumeur locale non résécable devraient être inclus dans des protocoles néoadjuvants et réévalués pour chirurgie par la suite⁸⁶. Des études supplémentaires plus poussées sont requises pour confirmer l'efficacité du FOLFIRINOX contre la gemcitabine seule et évaluer les bénéfices de la chimioradiation après traitement néoadjuvant^{105,106,90}. Dans les cas où la résection chirurgicale après traitement d'induction n'est pas possible, des chimiothérapies à base de gemcitabine ou 5-FU sont administrées, les protocoles sont similaires à ceux appliqués pour les tumeurs métastatiques, toutefois le FOLFIRINOX est dans ce contexte le plus souvent préconisé⁹⁰. Une étude de phase III LAP-07 (NCT00634725) n'a pas montré de différence de survie globale des patients après 4 mois de chimioradiothérapie comparé à la chimiothérapie seule¹⁰⁷.

c. Tumeurs métastatiques

1) Les traitements standards

La chirurgie n'est pas envisageable pour les tumeurs métastatiques. Plusieurs études ont évalué l'efficacité des chimiothérapies standards comme traitement pour les cancers du pancréas métastatiques. Un Essai clinique de phase III (NCT00112658) a révélé une médiane de survie sans progression de la maladie de 11,1 mois pour des patients recevant du FOLFIRINOX et de 6,8 mois pour les patients recevant de la gemcitabine, toutefois le FOLFIRINOX est accompagné d'une forte toxicité⁸⁴. Une autre étude clinique de phase III a montré le bénéfice sur la survie de la combinaison gemcitabine et capécitabine (GEM-CAP) comparé à la gemcitabine seule pour des patients atteints d'un PDAC localement avancé ou métastatique¹⁰⁸. Enfin deux essais cliniques de phase III MPACT et de phase II (NCT03529175) montrent le bénéfice de la combinaison gemcitabine et nab-paclitaxel sur la survie globale, la survie sans progression et le taux de réponse comparé à la gemcitabine seule en 1^{ère} ligne de traitement^{109,110}. En conséquent la procédure standard indique un traitement de première ligne selon l'état de santé général du patient à l'aide d'un score de bon état de performance sur une échelle de 0 à 5 (ECOG-PS) (voir Figure 12). Le 0 correspond à un patient pleinement actif et 4 à un patient grabataire et confiné au lit. Pour un score entre 0 et 2, un traitement à base de FOLFIRINOX ou de la combinaison gemcitabine et nab-paclitaxel est administrée. En France cependant le nab-paclitaxel n'est pas remboursé, le FOLFIRINOX moins cher est donc privilégié. Pour un score de 2, la gemcitabine en monothérapie est choisie. Pour un score supérieur à 2, seuls les meilleurs soins de support sont appliqués⁹⁰. Si la maladie progresse après une première ligne de traitement, une deuxième ligne de traitement peut être appliquée, si le patient est capable de le supporter (ECOG-PS<2). Si ce n'est pas le cas, le patient reçoit alors des soins de support. Les soins de support sont administrés aux patients en parallèle des traitements, afin de les soutenir et d'améliorer leur qualité de vie. Par exemple, les patients atteints d'un cancer du pancréas présentent fréquemment des troubles nutritionnels nécessitant une prise en charge par une équipe de diététiciennes¹¹¹. Après une première ligne de traitement à base de gemcitabine, les chimiothérapies à base de 5-FU en combinaison ou non avec de l'Oxaliplatine ou de l'Irinotecan et de la leucovorine sont choisies. A l'inverse, après une première ligne de FOLFIRINOX, la deuxième ligne de traitement est à base de gemcitabine, en monothérapie ou en combinaison avec le nab-paclitaxel⁹⁰. Etant donné le diagnostic souvent tardif du PDAC, si l'administration de chimiothérapies n'est pas possible la survie moyenne pour des patients avec un cancer métastatique est de seulement 3 mois. Il peut monter jusqu'à 6-12 mois seulement les protocoles et les études de chimiothérapies. Si aucun traitement curatif n'est possible alors l'objectif de la thérapie est de ralentir la progression tumorale et soulager le patient des symptômes. Les thérapies palliatives sont plus adaptées afin de soulager le patient de la douleur, de l'anxiété, de la dépression et des toxicités dues à la chimiothérapies³.

2) L'Olaparib pour les patients avec une mutation germinale BRCA

L'étude internationale POLO (Pancreas Cancer Olaparib Ongoing) de phase III (NCT02184195) révèle le doublement de la survie sans progression de la maladie à la suite d'une thérapie de maintenance d'Olaparib, pour les patients avec un PDAC avancé et porteurs d'une mutation BRCA germinale, dont

la tumeur est sous contrôle après une chimiothérapie à base de sels de platine^{112,113}. Cela sans augmentation significative de la survie globale. Il est important de noter que l'Olaparib en thérapie de maintenance ne diminue pas la qualité de vie des patients¹¹⁴. La FDA a donc approuvé l'utilisation de l'Olaparib pour les PDAC avancés avec mutation germinale BRCA en 2019^{113,114}. L'inconvénient de cette étude est qu'elle ne prend en compte que les mutations germinales BRCA et ne donne pas d'informations sur les patients avec des mutations germinales PALB2 ou ATM, des mutations somatiques ou d'autres mutations de la HR.

En conclusion la thérapie de maintenance par utilisation d'inhibiteurs de PARP (Olaparib) est aujourd'hui la première thérapie ciblée qui montre un bénéfice pour les patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique avec une mutation germinale BRCA. Cette thérapie représente une avancée majeure dans le traitement du cancer du pancréas. Un essai clinique de phase II est en cours en France (étude MAZEPPA, NCT04348045) pour évaluer l'efficacité de l'Olaparib comme thérapie de maintenance pour des patients avec un PDAC métastatique et un profil BRCAness somatique (ClinicalTrials.gov).

4.3. Les échecs thérapeutiques dans le cancer du pancréas

a. Echecs de la plupart des thérapies ciblées et immunothérapies

Le PDAC est une maladie agressive résistante à la plupart des traitements conventionnels, incluant les radiothérapies, les chimiothérapies et les thérapies ciblées. Malgré des progrès notables, la survie des patients reste très faible et encore 80% des patients sont diagnostiqués à un stade non résecable. De plus, 70 et 90% des patients n'ont pas de réponse objective au traitement à base de FOLFIRINOX et de gemcitabine respectivement⁷⁶. Le taux de contrôle de la maladie est au-delà de 10-30% car il inclut les patients avec une maladie stable. De nombreux essais de phase III avec des agents efficaces dans d'autres cancers n'ont pas apporté de bénéfice pour les patients atteints d'un PDAC⁷².

Malgré les efforts les thérapies ciblées prometteuses ne montrent pas de bénéfice de survie globale des patients par rapport aux chimiothérapies standards, outre les inhibiteurs de PARP dans un contexte de mutation germinale BRCA. Les stratégies de médecine de précision sont mises en difficulté par les caractéristiques moléculaires de la pathologie et la compensation des voies de signalisation. De plus, aucun des 4 gènes les plus mutés dans le PDAC (K-RAS, TP53, CDKN2A, SMAD4) n'est actuellement ciblable. Un exemple fort de faillite thérapeutique dans le PDAC est le ciblage de K-RAS. En effet, étant l'oncogène majoritaire du PDAC, K-RAS représente une cible intéressante. Les approches ciblent K-RAS à différents stades de la signalisation intracellulaire, que ce soit au niveau transcriptomique, post-traductionnel, ou le ciblage de la signalisation RAS. Quelques résultats encourageants ont été obtenus dans des études pré-cliniques et de phase I mais aucun bénéfice clinique n'a encore été observé et la toxicité et pharmacocinétique des molécules ne sont pas satisfaisantes^{31,32,34,35}. A l'heure actuelle, 7 essais cliniques sont répertoriés dans le PDAC dans le but de tester des molécules ciblant KRAS (vaccination, siRNA, anti-K-RAS^{G12D}) seules ou en combinaison avec d'autres agents^{34,35} (ClinicalTrials.gov, 31 août 2021). Toutefois, il est important de noter que le ciblage d'une mutation rare K-RAS G12C (2% des tumeurs) avec le sotorasib montre des résultats prometteurs d'activité anti-

tumorale dans des cancers solides avancés en essai de phase I (NCT04185883), poursuivi en essai de phase II (ClinicalTrials.gov)¹¹⁵. De plus, des fusions de gènes NTRK (récepteur kinase de tropomyosine) sont retrouvés dans moins de 1% des PDAC (RAS sauvage), présentent des propriétés oncogéniques dont l'activation de la voie des MAPK, et sont ciblables avec des inhibiteurs spécifiques. Cette approche est actuellement en exploration clinique dans le cancer du pancréas¹¹⁶. En conséquence, les possibilités thérapeutiques fondés sur les mutations génétiques sont plutôt limitées étant donné le manque de succès des études de ciblage de l'oncogène majoritaire K-RAS, la faible prévalence des autres mutations oncogéniques allant de <1 à 9% et le manque d'approches pharmacologiques^{30,32,76}. Les essais cliniques qui visent à tester des thérapies ciblant une altération ne verront pas de succès si elles sont réalisées sur une population entière non sélectionnée^{45,76}.

Les échecs des thérapies actuelles peuvent s'expliquer par de multiples altérations génétiques et épigénétiques, l'hétérogénéité des tumeurs, la redondance et la compensation des voies de signalisation. Notamment, les mécanismes d'adaptation en réponse aux agents thérapeutiques permettent aux cellules tumorales d'échapper au traitement via sélection et amplification de clones résistants aux traitements¹¹⁷. L'étude menée par Seth et collègue a permis de découvrir une multitude de sous-populations clonales, au sein de tumeurs pancréatiques, fonctionnellement hétérogènes et avec différents degrés de sensibilité aux molécules thérapeutiques. La préexistence de cette hétérogénéité fonctionnelle clonale des tumeurs pourrait être à l'origine de la chimiorésistance des tumeurs pancréatiques¹¹⁸. En clinique aujourd'hui les médicaments prennent en compte l'état général du patient et le stade d'avancement de la maladie et ne prennent pas en compte l'hétérogénéité de réponse⁷⁶. De plus, le comportement de la pathologie évolue dans le temps avec différentes sensibilités aux traitements et différentes voies intracellulaires activées⁷⁶.

Aujourd'hui, seule la thérapie ciblée à base d'Olaparib est appliquée en clinique pour les patients atteints d'un PDAC avancé et est utilisé aujourd'hui comme thérapie en clinique. Toutefois, comme pour d'autres thérapies, privilégier l'inhibition d'un seul gène de la DDR peut être contrecarrée par l'apparition de mécanismes de résistance, étant donné que les voies de signalisation peuvent se compenser. Dans le contexte de mutation germinale BRCA, des mutations secondaires de réversion de BRCA1/2 ont été identifiées permettant de restaurer le cadre de lecture et la fonction protéique de BRCA menant ainsi à des résistances aux PARPi et aux chimiothérapies à base de sels de platine^{119,120}. Dans le PDAC, les travaux de Gout et al de 2021 permettent d'atteindre une meilleure compréhension des mécanismes de résistance liés au PARPi. En effet, les cellules résistantes surexpriment des gènes impliqués dans la résistance aux agents thérapeutiques connus dans les cancers, des gènes de la tumorigénèse, de l'EMT, de la DDR ainsi que des gènes codant pour des enzymes de transfert du glutathion, suggérant un mécanisme supplémentaire de détoxification des chimiothérapies. A cela s'ajoutent une augmentation de la détoxification cytoplasmique, de la réparation de l'ADN et une augmentation de la tolérance aux dommages à l'ADN¹²¹⁻¹²³. Il existe donc des causes directes et indirectes de l'apparition de mécanismes de résistance aux PARPi et sels de platine. De plus, il faut aussi prendre en compte que PARP est impliqué dans plusieurs autres fonctions biologiques comme la transcription, la fonction immunitaire ou la signalisation de l'apoptose¹²⁴. Ces informations sont donc

à prendre en considération pour l'administration clinique des thérapies avant et avec les inhibiteurs de PARP et des études supplémentaires sont encore nécessaires.

Ensuite, les immunothérapies à succès dans d'autres cancers solides ne sont pas efficaces dans le PDAC, probablement à cause de la faible immunogénicité des tumeurs pancréatiques et du caractère fortement immunosuppresseur de ces tumeurs³. Un autre point important est le stroma desmoplastique abondant du PDAC qui empêche la délivrance des médicaments aux cellules tumorales, ce qui pourrait expliquer leur faible efficacité¹²⁵. Le faible succès des traitements actuels s'explique aussi par des raisons cliniques tels que le manque d'approches de dépistage et de diagnostic précoce, la position ancrée profondément dans l'abdomen du pancréas et les difficultés de réalisation d'une biopsie¹²⁶.

b. Les principaux mécanismes de résistance à la gemcitabine

La résistance à la chimiothérapie peut être innée ou acquise. La résistance innée correspond à une situation dans laquelle la chimiothérapie n'est pas efficace et peut s'expliquer notamment par un facteur génétique du patient. La résistance acquise est développée après un certain temps d'exposition de la tumeur à l'agent anti-cancéreux, souvent dû à des modifications génétiques ou épigénétiques. Les cellules cancéreuses pancréatiques sont au départ plutôt sensibles à la gemcitabine mais deviennent résistantes après l'exposition persistante au traitement. Certains patients développent des résistances en quelques semaines ce qui induit une faible survie⁸³.

1) Le transport et le métabolisme de la gemcitabine

Les mécanismes de chimiorésistance associées aux voies de métabolisme de la gemcitabine présentés Figure 13 incluent principalement le transport, l'activation et l'inactivation et la compétition des métabolites actifs avec des substrats de la molécule de gemcitabine.

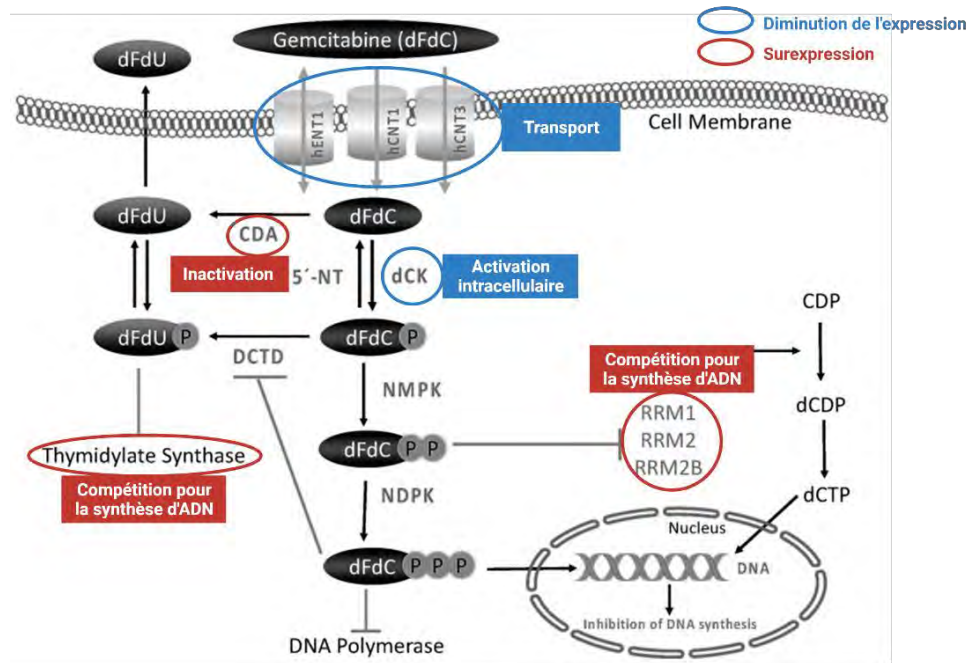


Figure 13 : Les mécanismes de chimiorésistance associés au métabolisme de la gemcitabine dans le cancer du pancréas. Adaptation de Amrutkar et Gladhaug. 2017.

La gemcitabine est une molécule hydrophile de nature et transportée en intracellulaire par des transporteurs nucléosidiques qui sont chez l'homme les transporteurs concentrateurs de nucléoside (hCNTs) et équilibrateurs de nucléosides (hENTs). En particulier, la gemcitabine est acheminée dans la cellule via 5 transporteurs : hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 et hENT2. Les niveaux d'expression de hENT1 et hCNT1 corrént avec la sensibilité à la gemcitabine et la survie globale des patients avec un cancer du pancréas traités avec la gemcitabine. En effet une expression élevée des transporteurs nucléosidiques est associée à une meilleure survie des patients. L'expression des gènes des transporteurs pourrait être un bon marqueur prédictif de survie pour les patients avec un PDAC à la suite d'un traitement à la gemcitabine^{83,127,128}. La désoxycytidine kinase (DCK) est l'enzyme limitante de l'activation intracellulaire et du métabolisme de la gemcitabine (Figure 13). Des niveaux réduits d'expression de DCK sont associés à une résistance acquise à la gemcitabine¹²⁹. Ensuite, la ribonucléotide réductase (RNR) est constituée d'une sous-unité régulatrice M1 et une sous-unité catalytique M2, elle est l'enzyme limitante dans le métabolisme de l'ADN qui permet de convertir les ribonucléotides en désoxyribonucléotides. La ribonucléotide réductase contrôle donc la synthèse et la réparation de l'ADN via la production de dCTPs et est inhibée par le dFdCDP. L'inhibition de la RNR diminue le pool endogène de dNTPs et facilite l'incorporation du métabolite de la gemcitabine pendant la synthèse d'ADN. Chez les patients traités avec la gemcitabine, l'expression élevée de RRM1 et de RRM2 est un facteur indépendant de mauvais pronostic, suggérant un rôle important de la RNR dans la résistance à la gemcitabine¹³⁰⁻¹³². Enfin, la thymidylate synthétase (TS) est une enzyme qui catalyse la conversion du 2'-désoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP) en 2'-désoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP). La TS est essentielle dans les stades précoces de biosynthèse de l'ADN et dans la voie de recyclage. L'expression protéique de la TS dans les tumeurs pancréatiques est

positivement corrélée à la résistance à la gemcitabine. L'expression de TS apporte aussi une source alternative de substrats pour la synthèse d'ADN^{130,133}. Cependant, la majorité de l'inactivation de la gemcitabine est réalisée par la cytidine désaminase (CDA).

La CDA est une enzyme impliquée dans le recyclage des pyrimidines qui catalyse la désamination de la cytidine (C) et de la désoxycytidine (dC) en uridine (U) et désoxyuridine (dU) respectivement. Elle est aussi capable d'induire la désamination de la dFdC (gemcitabine) en dFdU qui n'est alors plus pris en charge par les phosphorylases de nucléoside pyrimidiques conduisant à l'excrétion du dFdU en dehors de la cellule^{134,135} (Figure 13, Figure 14). Le dFdU est ensuite excrété en dehors de la cellule et ne peut pas exercer son activité cytotoxique. En clinique, la gemcitabine augmente la survie des patients avec un PDAC de seulement quelques semaines. Le dFdU est le seul métabolite de la gemcitabine retrouvé dans les urines des patients et ce rapidement après l'injection, montrant une détoxification active de la gemcitabine¹³⁶. Des travaux ont quantifié la gemcitabine intracellulaire et extracellulaire dans des lignées cancéreuses pancréatiques et apporté des preuves directes que la CDA limite la disponibilité de la gemcitabine pour la voie intracellulaire d'activation de la molécule, participant ainsi à son inactivation¹⁰¹.

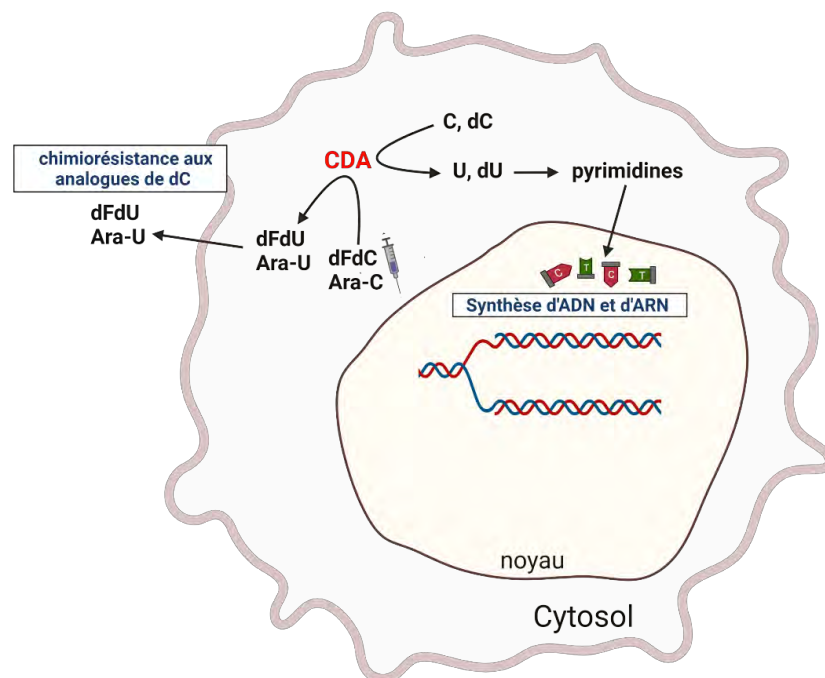


Figure 14 : Les rôles connus de la CDA dans la cellule cancéreuse : le recyclage des pyrimidines pour la synthèse d'ADN et d'ARN puis la détoxification de la gemcitabine et de la cytarabine en molécules inactives ensuite excrétées de la cellule. AraC = cytarabine.

Il est aujourd'hui admis en clinique qu'un niveau élevé de CDA dans un organe s'accompagne de la résistance aux analogues de désoxycytidine^{100,137,138}. La mesure de l'activité de CDA dans le sang a été

mise en place dans plusieurs cancers et corrèle avec la toxicité et la réponse induites par la chimiothérapie^{139,140}. En effet, l'activité résiduelle de la CDA dans le sang est un marqueur prédictif de toxicités précoces et sévères chez les adultes après des chimiothérapies à base de gemcitabine¹³⁹.

2) Les rôles du microenvironnement tumoral

L'environnement fibrotique du stroma est produit en majorité par les fibroblastes associés au cancer (CAFs) et représente une barrière physique à l'adressage des chimiothérapies. En effet, il a été montré que la gemcitabine activée est piégée dans les CAFs et reste donc indisponible pour les cellules cancéreuses pancréatiques. La faible expression d'enzymes inactivatrices de la gemcitabine telle que la CDA dans les CAFs augmente la concentration intracellulaire de gemcitabine en comparaison avec les cellules cancéreuses (Figure 15). De plus, le ciblage des CAF par des molécules augmente la disponibilité de la gemcitabine dans les cancers du pancréas murins. Les auteurs suggèrent donc que le piégeage par les fibroblastes peut contribuer à l'échec clinique de la gemcitabine dans le PDAC. Ces résultats pourraient offrir de nouvelles cibles pour la reprogrammation du stroma^{130,141}.

De façon similaire, les cellules étoilées du pancréas sont aussi capables de piéger une partie des métabolites actifs de la gemcitabine, la rendant d'autant moins disponible pour les cellules cancéreuses. Elles expriment peu les enzymes impliquées dans le métabolisme de la gemcitabine telles que CDA (Figure 15) ou DCK, ce qui les rend résistantes à cette chimiothérapie¹⁴². De plus, les cellules étoilées du pancréas sécrètent des désoxycytidines qui inhibent le métabolisme de la gemcitabine dans les cellules cancéreuses et diminuent l'efficacité des thérapies à base d'analogues de désoxycytidine¹⁴³.

Ensuite, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont abondants dans le PDAC et impliqués dans la progression tumorale et la chimiorésistance notamment en diminuant la cytotoxicité de la gemcitabine¹⁴⁴. Dans des modèles murins de PDAC, une diminution du recrutement et de l'activation des macrophages améliore la réponse à la gemcitabine. Il a été montré que les TAMs surexpriment la CDA (Figure 15) et que la diminution de l'expression de l'enzyme dans les cellules bloque l'effet protecteur des TAMs contre la gemcitabine. Ces travaux montrent pour la première fois l'effet paracrine des TAMs qui induit une résistance acquise des cellules cancéreuses à la gemcitabine.

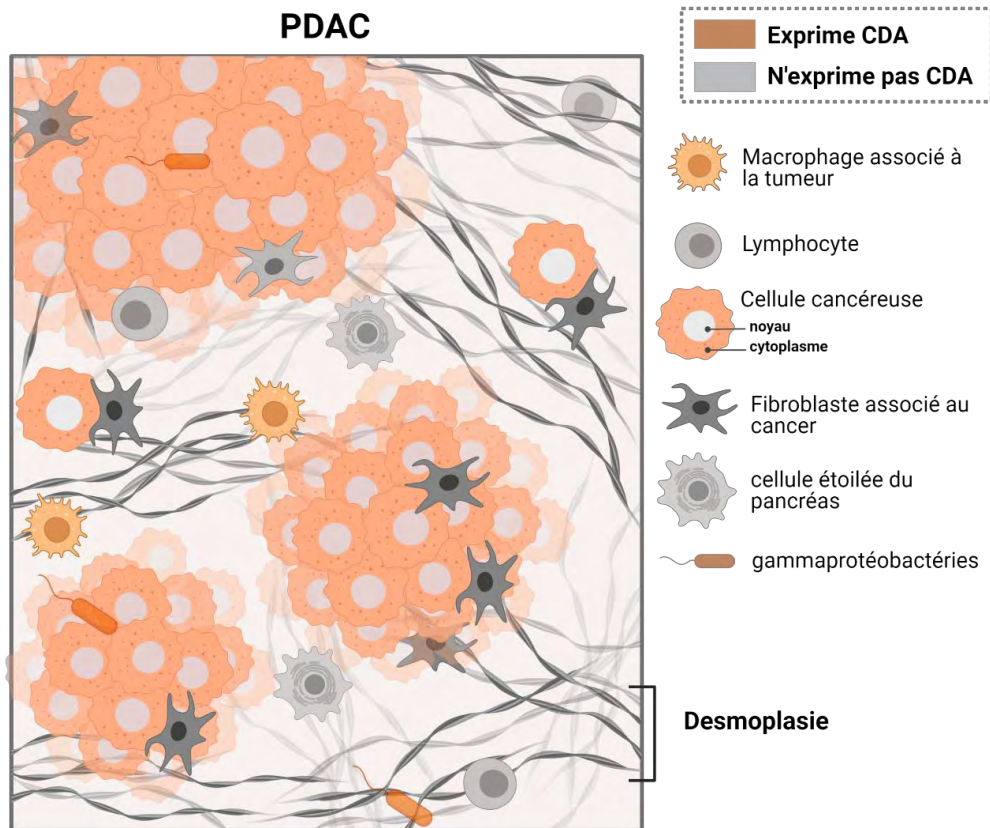


Figure 15: Expression de la CDA au sein du PDAC. La CDA est exprimée dans les macrophages associés à la tumeur et le compartiment cytosolique des cellules cancéreuses pancréatiques. La CDA pourrait aussi être exprimée dans les gammaprotéobactéries infiltrées dans le PDAC, mais cela reste à démontrer.

Enfin, dans des modèles de cancer du côlon, la présence intratumorale de bactéries (gammaprotéobactéries) induit la résistance aux chimiothérapies à base de gemcitabine et ce de façon dépendante de l'enzyme CDA bactérienne. La résistance de modèle murin de cancer du côlon à la gemcitabine peut être contrecarrée par un traitement antibiotique. 76% des PDAC humains sont envahis par des bactéries et ce sont majoritairement des gammaprotéobactéries, suggérant que la CDA pourrait détoxifier la gemcitabine depuis la cellule tumorale et depuis les bactéries présentes au sein du PDAC (Figure 15)¹⁴⁵.

Ainsi, l'expression de CDA est un déterminant majeur de la chimiorésistance à la gemcitabine dans le PDAC et ce au niveau des cellules tumorales et des cellules du microenvironnement (Figure 15: Expression de la CDA au sein du PDAC. La CDA est exprimée dans les macrophages associés à la tumeur et le compartiment cytosolique des cellules cancéreuses pancréatiques. La CDA pourrait aussi être exprimée dans les gammaprotéobactéries infiltrées dans le PDAC, mais cela reste à démontrer.). La modulation des macrophages ou l'inhibition de la CDA dans les cellules du PDAC pourrait offrir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour augmenter la réponse des cellules tumorales aux chimiothérapies à base d'analogues de dC telle que la gemcitabine¹⁴⁴.

c. Les voies d'amélioration

Des progrès thérapeutiques ont été fait avec des combinaisons chimiothérapeutiques plus efficaces, des nouvelles stratégies de traitement post-opération, des meilleurs soins après la chirurgie, des techniques chirurgicales plus sûres. Seulement, cela ne semble pas suffisant pour améliorer la survie des patients. En effet, le PDAC reste une maladie mortelle avec peu de solutions thérapeutiques. Les récents progrès permettent d'envisager de nouvelles avancées prometteuses durant les prochaines années afin d'améliorer les perspectives thérapeutiques pour les patients. Les stratégies émergentes de traitement sont basées sur l'identification de sous-groupes de patients pour l'application plus individualisée des thérapies ciblées, le développement de nouvelles thérapies ciblées contre des molécules et de nouvelles immunothérapies. Par exemple, une étude sur des xénogreffes de PDAC dérivées de patients montre que l'oncogène MYC est retrouvé dans 30% des cas. Les sphéroïdes et xénogreffes avec un niveau fort de MYC sont plus sensibles à JQ1 (inhibiteur de protéines BET à bromodomains) comparé aux cellules avec un faible taux d'expression. Ces résultats révélant ainsi de nouvelles possibilités thérapeutiques pour des sous-groupes de PDAC et apportent de l'espoir pour les thérapies de médecine individualisée¹⁴⁶. D'autres approches innovantes visent à étudier des traitements ciblant l'hypoxie, la reprogrammation du stroma et la modulation des interactions entre cellules tumorales et cellule stromales, l'amélioration de la gemcitabine (dérivation lipidique, conjugaison peptidique) et de nouvelles pistes de ciblage de RAS^{3,81}.

La gemcitabine est la chimiothérapie standard pour le traitement du cancer du pancréas il est donc crucial de pouvoir contrecarrer les mécanismes de résistance pour améliorer son efficacité clinique. Dans des modèles pré-cliniques de PDAC, des modifications de la molécule de gemcitabine et des approches de nanomédecine faisant intervenir notamment des liposomes ou des nanoparticules ont montré des activités antiprolifératives et antitumorales prometteuses. Des études plus poussées sont nécessaires pour valider ces stratégies pour une application clinique¹³⁰. Mon équipe d'accueil a par exemple mis en place un essai clinique de phase I dont l'objectif est de sensibiliser les cellules cancéreuses pancréatiques via une approche de thérapie génique¹⁴⁷. Le produit de thérapie génique (CYL-02) combine l'expression de SSTR2 (récepteur de la somatostatine), DCK et UMK (uridylylate monophosphate kinase), est délivré via un vecteur non viral et est administré en combinaison à la gemcitabine pour des patients avec un PDAC localement avancé ou métastatique. Les résultats de cette étude montrent la bonne faisabilité de l'injection intratumorale pancréatique sous échographie et la très bonne tolérance de la thérapie génique. De plus, l'expression des gènes de la thérapie est efficace et s'accompagne d'un potentiel bénéfique clinique avec 40% des patients qui ont montré une maladie stable à 6 mois post-traitement et 10% une survie à long terme (22 patients). De plus, il n'y a pas eu de progression métastatique pour les patients avec une tumeur localement avancée¹⁴⁷. L'étude multicentrique de phase 2 (THERGAP-2, NCT02806687) avec une inclusion d'un plus grand nombre de patients a été réalisée dans le but de comparer l'efficacité de la combinaison du produit de thérapie génique et de la gemcitabine dans le but de comparer à la gemcitabine seule. Les résultats sont en cours d'analyse.

Une mutation dans un gène de la réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) est retrouvée dans environ 1% des patients atteints d'un PDAC^{32,148,149}. Une déficience MMR est caractérisée par une

accumulation d'instabilité micro satellitaire et une forte charge mutationnelle somatique ou un phénotype d'hypermutations^{148,149}. PD-1 (programmed death-1) est un récepteur exprimé à la surface des cellules T. La liaison par son ligand PD-L1, exprimé en surface des cellules tumorales ou du microenvironnement (tels que les macrophages), régule négativement l'activité antitumorale des cellules T. Un autre régulateur négatif de l'activité des cellules T est CTLA-4. Les immunothérapies visent à inhiber PD-1 et CTLA-4 dans le but de restaurer l'activité antitumorale des cellules T infiltrées dans les tumeurs. Ces immunothérapies sont peu efficaces aujourd'hui dans le PDAC. L'instabilité génomique et le taux de mutation du PDAC dans les tumeurs déficientes pour la MMR pourraient induire des néoantigènes (peptide contenant des gènes altérés et immunogènes) permettant d'augmenter l'efficacité des immunothérapies¹⁵⁰. Par conséquent il existe à l'heure actuelle plusieurs essais cliniques de phase II dont l'objectif est d'évaluer l'efficacité de la combinaison entre les PARPi et les inhibiteurs du point de contrôle immunitaire¹⁵¹. Par exemple l'essai NCT03404960 étudie l'efficacité de la combinaison entre l'Olaparib et soit le Nivolumab (inhibiteur interaction PD1/PD-L1) soit l'Ipilimumab (inhibiteur CTLA-4) dans des PDAC avancés qui n'ont pas progressé sous thérapies à base de sels de platine. Dans les PDAC avancés, un essai clinique (NCT03820921) impliquant le pembrolizumab est en cours pour évaluer le statut MMR et l'expression de PD-L1, après endoscopie, comme potentiels marqueurs pronostiques. Pour le nivolumab, un essai de phase I (NCT04117087) est en cours dans le PDAC en combinaison avec un vaccin peptide KRAS muté et de l'Ipilimumab (anti-CTLA4).

Il est capital aujourd'hui de mieux comprendre les mécanismes d'oncogénèse tumorale et de résistance aux traitements pour permettre de trouver de nouveaux biomarqueurs prédictifs de réponse, de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques. Les thérapies ciblées basées sur des altérations moléculaires dans le PDAC sont prometteuses, apportent de l'espoir et doivent être plus développées. Il est crucial de proposer des solutions thérapeutiques plus adaptées aux patients et d'améliorer leur prise en charge pour espérer augmenter la survie des patients atteints de cette pathologie sévère et incurable.

II. La cytidine désaminase (CDA)

1. Fonctions

Le recyclage des pyrimidines a pour but premier de recycler les pyrimidines pour la synthèse d'ADN et d'ARN et pour second but de dégrader les pyrimidines pour assurer une source de carbone et de nitrogènes pour la cellule (voir Figure 16). La CDA catalyse la désamination des cytidines (C) et désoxycytidines (dC) en uridines (U) et désoxyuridines (dU) en hydrolysant la fraction amine en cétone avec libération d'ammoniaque^{152,153} (voir Figure 17). Dans la voie de recyclage, la dégradation des polymères d'ADN et d'ARN entraîne la libération de nucléosides monophosphates recyclés grâce à l'action de kinases nucléosidiques.

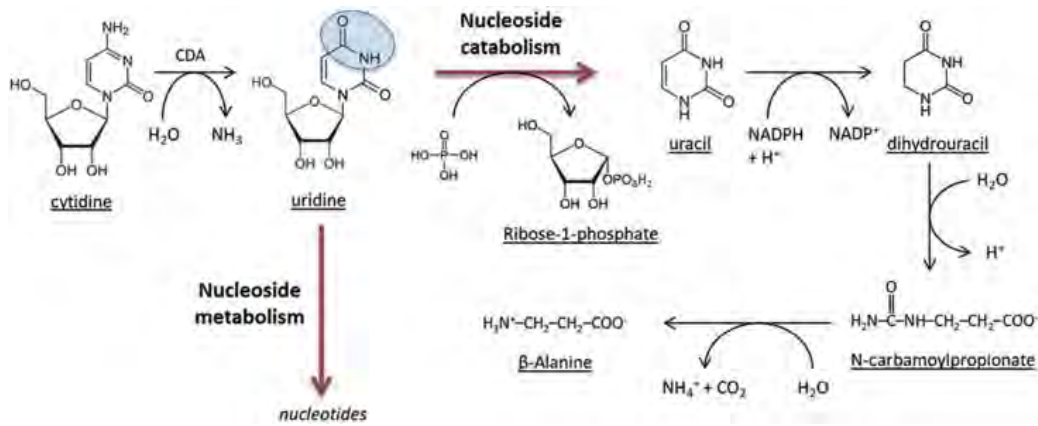


Figure 16 : Implication de la CDA dans la catalyse de la Cytidine en Uridine et catabolisme de l'Uridine en beta-Alanine via le recyclage des pyrimidines. Image extraite de Frances et Cordelier. 2020.

Les voies de recyclage et de synthèse *de novo* (ou de bioynthèse) des pyrimidines agissent conjointement pour maintenir un équilibre dans les pools de CTPs, dCTPs, TTPs et dTTPs nécessaires à la synthèse d'ADN, d'ARN et à la réparation de l'ADN (voir Figure 17). La voie *de novo* nécessite l'apport de carbone et d'azote pour constituer le noyau pyrimidine et le ribose, apportés par le glucose et l'aspartate issus du métabolisme des pentoses phosphate et du cycle de Krebs¹⁵⁴ (voir Figure 17).

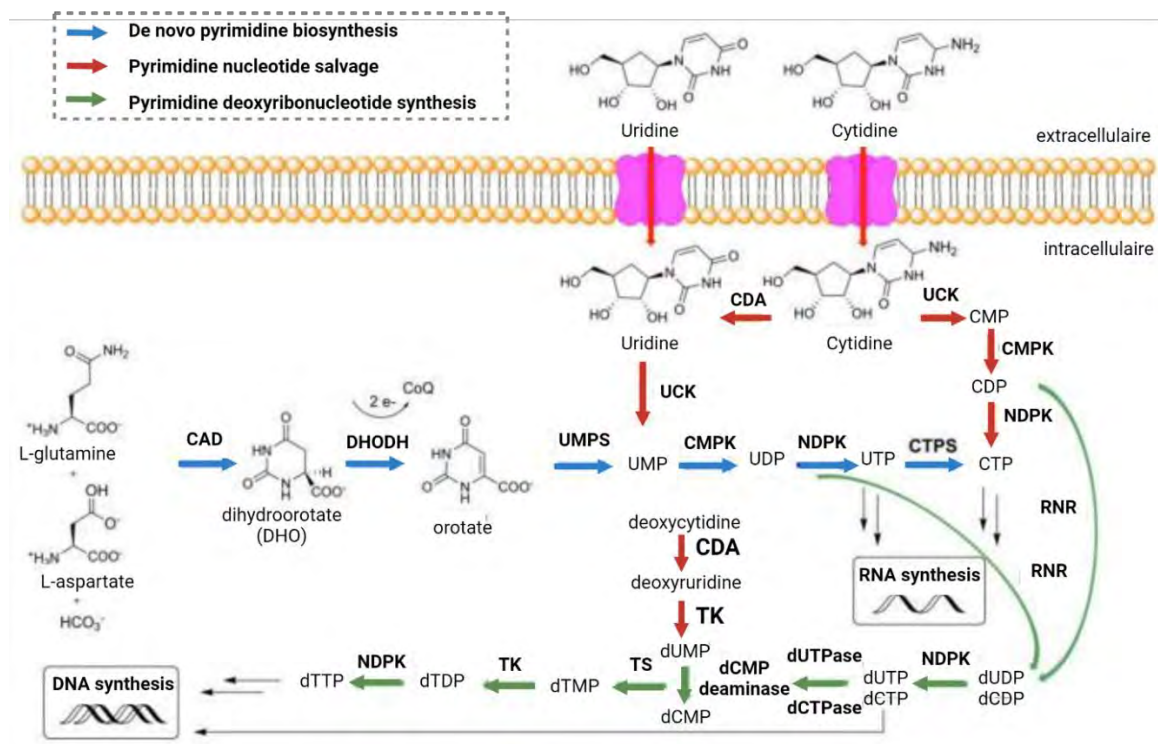


Figure 17 : Schéma de la voie de synthèse des pyrimidines incluant les voies de synthèse *de novo* et de recyclage des pyrimidines. Image adaptée de Okesli et al. 2017.

La voie de recyclage issue de la désamination de la cytidine et la voie *de novo* aboutissent toutes les deux à la formation de l'UMP (uridine monophosphate), intermédiaire de la synthèse des pyrimidines

ensuite métabolisés pour former les nucléotides. La voie de recyclage aboutit à un deuxième intermédiaire en aval dans la synthèse des nucléotides, le dUMP (désoxy-uridine monophosphate). En effet, le dU désaminé par la CDA peut être pris en charge par la thymidine kinase et la thymidylate synthétase (TS) pour permettre la formation de dTTPs¹⁵⁴ (voir Figure 17).

2. Structure

La CDA est formée d'un domaine désaminase de type CMP (cytidine monophosphate) / dCMP constitué d'un feuillet beta associé à une ou plusieurs hélices alpha de chaque côté¹⁵⁵. C'est une caractéristique commune avec les membres de la famille des APOBEC (alipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like). L'AICDA (la CDA induite par activation) appartient à la famille des APOBEC et désamine la base cytosine en uracile, reconnu comme une thymidine, et induit ainsi des mutations de l'ADN. Elle joue un rôle important dans l'immunité adaptative pour générer un répertoire varié d'isotypes d'immunoglobulines¹⁵⁶. Cependant comparée à son homologue AICDA, la CDA ne peut désaminer que des pyrimidines libres et n'appartient pas aux APOBEC. La CDA est une protéine de 146 acides aminés qui s'associe avec un ion Zinc pour former un homotétramère de 52kDa représentant la forme active de la CDA¹⁵⁷. Une étude montre que chaque monomère se lie à un atome de Zinc et que la CDA est formée d'un dimère de dimères. Il a été montré par mutagenèse dirigée que les acides aminés C99 et C102 permettent l'appariement de chaque monomère à un atome de Zinc, le C65 est essentiel à l'orientation correcte du Zinc alors que le E67 est crucial pour l'initiation de l'activité catalytique. En effet, ce dernier permet la déprotonation de la molécule d'eau et la protonation du groupe amine du substrat initiant l'attaque nucléophile de l'hydroxyde du noyau pyrimidique. Un intermédiaire de réaction est formé par l'interaction entre le noyau pyrimidique du substrat, le groupe hydroxyle formé par la molécule d'eau, la fraction glutamate carboxylate et l'ion zinc^{158,159}.

3. Localisation cellulaire

La littérature n'est pas très claire quant à la localisation subcellulaire de la CDA. Il est communément admis que la CDA est cytoplasmique, en accord avec son rôle de recyclage des pyrimidines depuis le cytoplasme. En effet, les pyrimidines sont ensuite passivement transportées dans le noyau ou activement transportées dans la mitochondrie^{153,160}. Une étude de 1999 montre que la CDA est aussi nucléaire grâce à une séquence NLS bipartite (séquence d'adressage au noyau) reconnue par le récepteur nucléaire de l'importine. Les auteurs suggèrent ainsi que la voie de recyclage des pyrimidines pourrait aussi avoir lieu dans le noyau¹⁶¹. Seulement depuis cette étude, aucune autre étude n'a montré une localisation nucléaire par immunofluorescence de la CDA. Cela s'explique probablement par le manque d'anticorps spécifique anti-CDA compétent pour l'immunofluorescence.

4. Régulation de l'expression

Le gène CDA ou cytidine aminohydrolase ou CDD appartient à la famille des cytidines et désoxycytidines désaminases qui dépendent de la liaison d'un Zinc¹⁶². Le gène est localisé sur le chromosome 1 (1p36.12) et possède 4 exons pour une région codante de 441pb^{163,164}. La séquence protéique est conservée entre les espèces avec par exemple 84% d'homologie entre le gène humain

(hCDA) et le gène murin de la CDA¹⁶⁵. Le promoteur de la CDA contient des sites de liaisons à des facteurs de transcription connus ou des régions amplificatrices (SP1, ARP1, GATA1, cEBPs)^{164,166}. De nombreux polymorphismes de nucléotide simple (SNPs) sont naturellement retrouvés dans la population dans la région du promoteur de la CDA, pouvant ainsi modifier le site de liaison des facteurs de transcription et perturber la transcription de la CDA¹⁶⁷.

Dans les cellules cancéreuses, le gène n'est ni perdu, ni amplifié¹⁶⁸. De plus, dans les tumeurs avec un niveau faible de CDA aucune mutation génétique conservée n'a été identifiée et il n'existe pas de corrélation entre le nombre de copies d'ADN et le niveau d'expression ARNm de la CDA. Ces informations suggèrent que la CDA n'est pas inactivée par altération génétique dans les cancers. Mameri et collègues ont mis en évidence une forte corrélation négative entre le taux de transcrite de la CDA et le niveau de méthylation de deux sites CpG du promoteur (TSS200 et 5'UTR). De plus, les agents épigénétiques restaurent son expression et une méthylation du promoteur n'est pas détectée dans les lignées cancéreuses qui la surexpriment. Ainsi, dans les tumeurs l'expression de CDA est négativement régulée par méthylation du promoteur¹⁶⁹.

D'autres études ont montré que des facteurs extérieurs peuvent influencer l'expression de la CDA. En effet, l'injection de vitamine D3 augmente le niveau ARNm de la CDA dans les tumeurs¹⁷⁰. Plusieurs études ont montré l'impact de la chimiothérapie sur l'expression de CDA. Par exemple, un traitement de cytarabine dans les cellules leucémiques myéloïdes aiguës augmente l'expression de CDA dans les cellules stromales de la moelle osseuse, participant ainsi à la résistance des cellules de la moelle à la toxicité induite par la chimiothérapie¹⁷¹. Dans des modèles murins de cancer du pancréas, le nab-paclitaxel induit la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) conduisant à la dégradation de la CDA¹⁷². En effet l'expression de CDA est restaurée après un traitement avec du N-acetylcysteine (bloquant les ROS) et l'utilisation d'un inhibiteur de protéasome (MG132) réverse l'effet du paclitaxel. Etant donné qu'aucun effet du paclitaxel n'a été noté sur le niveau d'ARNm de la CDA, cela suggère une modification post-traductionnelle de l'expression de CDA par le paclitaxel. Le cisplatine diminue aussi les niveaux de CDA, induit des ROS et des niveaux élevés de gemcitabine métabolisée dans les cultures cellulaires cancéreuses pancréatiques¹⁷². En conséquence, la combinaison du traitement nab-paclitaxel et gemcitabine semble permettre l'augmentation de la disponibilité intratumorale de la gemcitabine et montrer des signes de régression tumorale, via la diminution de l'expression de la CDA. Cette étude permet de mieux comprendre le succès de l'essai clinique de phase III visant à évaluer la combinaison thérapeutique du nab-paclitaxel et de la gemcitabine pour les patients atteints d'un cancer du pancréas avancé⁸⁴.

Plusieurs études mettent en avant l'importance des miARNs dans la régulation de l'expression de CDA. En effet, l'expression des miR-484 et miR-608 corrèle négativement avec les niveaux d'expression de la CDA dans des cellules du cancer du sein (miR-484) et du pancréas (miR-608)^{173,174}. Mir-484 inhibe la traduction de CDA par ciblage du 3'UTR de la CDA et diminue ainsi la chimiorésistance des cellules¹⁷³. Dans des cellules cancéreuses pancréatiques chimiorésistantes, l'expression du miR-608 est diminuée, ce qui induit la surexpression de ses cibles RRM1 et CDA et la chimiorésistance des cellules¹⁷³. Enfin, une étude a montré que les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) induisent l'expression de CDA

dans les cellules cancéreuses en réponse à un traitement de gemcitabine et ce notamment via miR-365^{144,175,176}.

5. Régulation de l'activité – les polymorphismes

Les polymorphismes identifiés de la CDA sont à l'origine de deux variants majeurs de la CDA : la CDA1 et la CDA2 qui diffèrent par le codon 27 résultant en une glutamine ou une lysine (SNP 79 A>C). Ainsi, différentes combinaisons sont possibles pour former le tétramère et 5 isoformes de la CDA existent avec les mêmes propriétés enzymatiques, étant donné que l'acide aminé n'est pas localisé dans le site catalytique de l'enzyme¹⁵⁹. Le variant CDA2 est retrouvé en grande majorité au sein de la population caucasienne¹⁷⁷. Le polymorphisme du codon 70 (208 G>A) diminue l'activité de la CDA alors que le polymorphisme 79A>C du codon 27 augmente son activité, ce sont les deux SNPs les plus étudiés^{178,179}. Le SNP 208 G>A est retrouvé plus fréquemment dans les populations asiatiques comparé aux autres populations, notamment chez 4,3% de la population japonaise^{179,180}. En clinique, les polymorphismes 208G>A et 27K>G ont été proposés comme marqueurs prédictifs de la toxicité induite par la gemcitabine en traitement adjuvant après résection d'un cancer du pancréas^{181–183} (NCT00003216). Dans un essai clinique de phase II (NCT01416662), seulement 4,6% des patients traités avec gemcitabine en monothérapie adjuvante présentent une absence d'activité enzymatique de la CDA. Les résultats ne montrent cependant pas d'augmentation de la toxicité de la gemcitabine chez ces patients. L'étude a donc échoué à démontrer que l'activité de la CDA pouvait être utilisée pour prédire la toxicité hématologique d'un traitement gemcitabine et a révélé une forte hétérogénéité inter-patients de l'activité de CDA¹⁸⁴. Cette grande variabilité de l'activité de CDA a déjà été mentionnée par d'autres études, allant des patients déficients aux patients avec une activité désaminase très rapide impactant la réponse aux médicaments^{139,177}. En conséquence, ces informations suggèrent fortement que les polymorphismes n'expliquent pas complètement l'hétérogénéité de l'activité sérique de la CDA entre les patients¹⁵³. Outre l'existence de polymorphismes, peu d'études ont été menées sur la régulation de l'activité de la CDA. Toutefois, il existe deux sites potentiels de phosphorylation sur les résidus Y79 et S76 identifiés par des études à grandes échelles¹⁸⁵ (<https://www.phosphosite.org/>) mais aucune étude fonctionnelle n'a encore été réalisée.

6. Autres applications cliniques

La CDA est retrouvée dans le sang suggérant qu'elle est relarguée de la cellule^{186,187}. La mesure de l'activité de CDA dans le sérum est réalisée pour d'autres applications, outre la prédiction de la réponse à la gemcitabine. En effet, elle est utile pour prédire une grossesse anormale avec des complications¹⁸⁸ ou encore une inflammation d'arthrite rhumatoïde aigue^{186,187}. Il a été montré que la CDA se retrouve dans le sérum quand la membrane des polynucléaire neutrophiles est endommagée, permettant d'évaluer l'évolution de la maladie pour des patients avec un lupus érythémateux disséminé actif (atteinte cutanée dominante)¹⁸⁹. La mesure de l'activité de la CDA dans le sang a donc une utilité pour plusieurs applications, cependant elle n'est pas encore réalisée en routine clinique.

7. Expression dans les tissus sains et cancéreux

La CDA est exprimée de façon hétérogène au sein des tissus de l'organisme. Les études révèlent qu'elle est le plus exprimée dans la moelle osseuse et le foie, plus faiblement exprimée dans certains organes tels que le poumon et le côlon, et est indétectable dans d'autres, comme le pancréas. Dans les cellules hématopoïétiques, la CDA est plus exprimée dans les cellules matures que les cellules immatures^{137,153,170}. L'expression en ARN messager de la CDA dans les différents tissus, de l'organisme est disponible dans la base de données de Human Protein Atlas. Ainsi la CDA est le plus fortement exprimée dans les granulocytes, la moelle osseuse, le foie, le placenta et l'utérus, voir Figure 18. La CDA est cependant très faiblement exprimée dans les cellules B, les cellules T, les cellules NK et les cellules du pancréas. De façon étonnante, pour les cellules du sang, le placenta et l'utérus, la quantité de protéines, détectée par IHC sur tissu avec un anticorps anti-CDA, ne corrèle pas avec la quantité élevée d'ARNm, suggérant des régulations post-transcriptionnelles de l'expression de CDA.

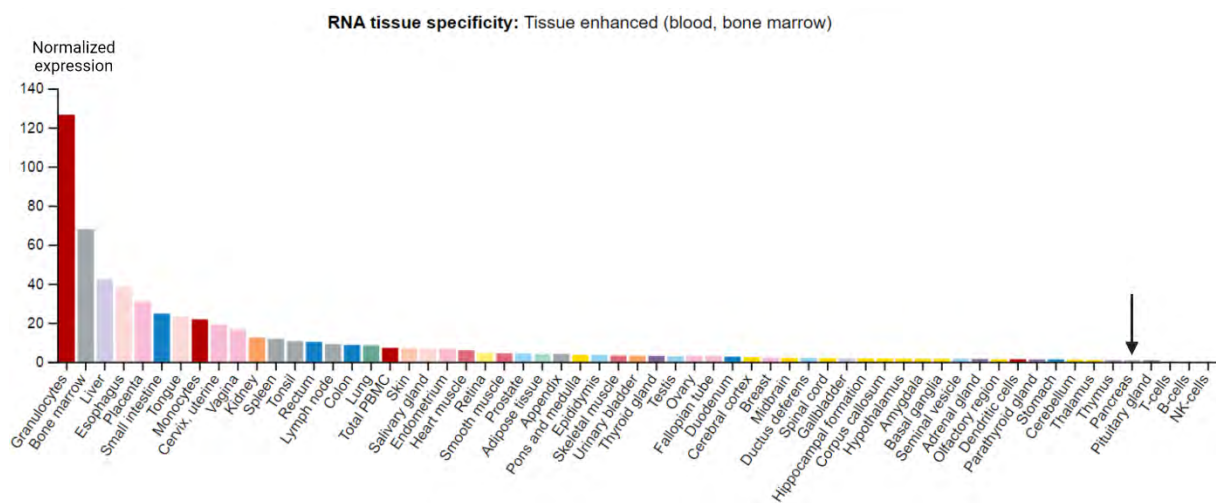


Figure 18 : Expression normalisée en ARNm de la CDA dans les différents tissus de l'organisme (normalisation du nombre de transcrits par million, par échantillon et par tissu à l'aide d'un algorithme mathématique de compensation et de mise à l'échelle permettant de comparer les échantillons entre eux). La flèche noire pointe le pancréas qui a un niveau très faible d'ARN et aucun signal protéique détectable en IHC (The Human Protein Atlas <https://www.proteinatlas.org/ENS00000158825-CDA>).

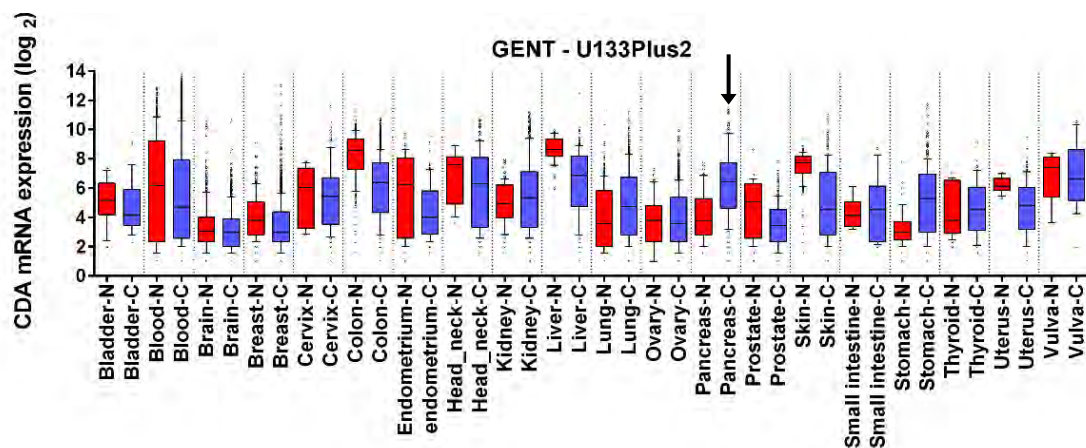


Figure 19 : Expression ARNm (\log_2) de la CDA dans les tissus normaux et les tissus cancéreux. La flèche noire pointe le cancer du pancréas. GENT = Gene Expression database of Normal and Tumor tissue. Image extraite de Mameri et al. 2015.

Les données CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) regroupant plus de 1000 lignées cancéreuses révèlent que 60% des lignées n'expriment pas ou très peu la CDA. Elle est sous-exprimée comparé au tissu sain dans les cancers du sein, du colon, du foie, de la peau, de l'utérus, de la prostate, du sang, du cerveau et de l'endomètre. A l'opposé, la CDA est statistiquement surexprimée par rapport au tissu normal dans les cancers du pancréas, du poumon, de l'estomac, de la thyroïde et plus légèrement du rein (Figure 19). Ces résultats montrent que l'expression de CDA est hétérogène entre les différents types de cancer et suggèrent qu'elle pourrait être acquise ou perdue pendant la carcinogénèse^{169,190}.

8. CDA et cancers, approches thérapeutiques

8.1. Les inhibiteurs de la CDA

Le rôle physiologique de la CDA au cours du développement n'est pas connu, étant donné le manque de modèle murin d'inactivation de la CDA dans la littérature. La CDA semble être une cible moléculaire attrayante, en particulier chez les patients atteints d'un cancer et traités par chimiothérapie¹⁵³. En effet, les tumeurs exprimant fortement la CDA sont plus résistantes aux chimiothérapies à base d'analogues de désoxycytidine. Des études combinant ce type de chimiothérapies avec des inhibiteurs pharmacologiques de la CDA ont été réalisées^{191,192}.

Les inhibiteurs de la CDA agissent par compétition avec le substrat pour lier la poche catalytique de l'enzyme. Le zébularine a une structure similaire à la cytidine à la différence d'un proton remplaçant un groupe NH_3 qui bloque l'intermédiaire de la réaction catalytique. Le 3,4,5,6-tétrahydrouridine (THU) ou le 1,3-diazépinone riboside (DR) ont des structures différentes. Le mécanisme d'action du THU est basé sur sa fraction hydroxyle du noyau pyrimidique qui lie le zinc au lieu de la molécule d'eau, bloquant ainsi la réaction catalytique¹⁹³. Le THU a une faible biodisponibilité (20%), il a donc été modifié en une version fluorée avec une meilleure biodisponibilité orale censée améliorer l'efficacité de l'araC¹⁹⁴. Le DR a un mécanisme d'action différent, il n'interagit pas avec la CDA via le complexe eau/zinc comme les deux autres inhibiteurs. Il agit par interactions électrostatiques entre le double

pont du noyau du DR et le noyau aromatique d'une phénylalanine (Phe137) du site catalytique de l'enzyme¹⁹⁵. Cependant à l'heure actuelle le DR reste peu connu et n'a pas été testé sur des cultures cellulaires.

L'altération de l'activité catalytique de la CDA dans les tumeurs pancréatiques pourrait augmenter la sensibilité à la gemcitabine, cependant des preuves cliniques sont requises pour le confirmer¹³⁰. *In vitro* le THU inhibe l'activité de la CDA et diminue la résistance acquise à la cytarabine (araC) dans des lignées cellulaires¹³⁴. Il a été montré dans un modèle murin que le THU permet de diminuer les doses administrées de décitabine (5-aza-2'-désoxycytidine), étant donné l'activité plus faible de CDA et donc la meilleure efficacité de la décitabine. Ainsi, le THU permet de réduire la charge tumorale hépatique sans induire de myélotoxicité et améliore la survie des patients¹³⁷. Cependant, il est aussi révélé que le THU est capable d'induire une inhibition de la croissance cellulaire dans des lignées cellulaires de façon indépendante de la CDA. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'intérêt d'utiliser le THU est d'autant plus grand étant donné son rôle d'inhibition sur la CDA et sur la croissance cellulaire¹⁹⁶. Néanmoins, ces résultats révèlent des effets non spécifiques de la CDA du THU. Un autre inhibiteur, le Zébularine, en combinaison avec la gemcitabine induit l'apoptose des cellules cancéreuses pancréatiques et la diminution de la taille des sphéroïdes. Une approche de co-administration de Zébularine après utilisation de liposomes et de gemcitabine montre un bénéfice pour le traitement du PDAC chez le rat¹⁹⁷. Cependant, le Zébularine interagit avec une cytosine DNA méthyltransférase pour réguler la méthylation de l'ADN et n'est pas non plus un inhibiteur spécifique de la CDA¹⁹⁸. En effet, dans une étude clinique, le THU ne potentialise pas la décitabine chez des patients avec un cancer du pancréas métastatique. En effet, l'activité de CDA dans le plasma est 10 fois supérieure chez les patients avec un cancer métastatique comparée à des patients avec un PDAC réséqué. Les auteurs de l'étude concluent que la CDA n'est pas seulement surexprimée localement dans la tumeur mais aussi dans les métastases du PDAC et que des doses plus fortes d'inhibiteurs (oral >10mg/kg/jour) sont nécessaires pour voir un effet bénéfique de la décitabine¹⁹⁹. Des études cliniques de phase I ont visé à évaluer l'effet du 5-fluoro-2'-deoxycytidine (précurseur du 5-fluoro-2'-deoxyuridine ou 5-FU) et du THU dans des tumeurs solides métastatiques (NCT00359606) et des leucémies myéloïdes aiguës ou des syndromes myélodysplasiques (NCT01041443). Un essai clinique de phase II a étudié l'effet de cette même combinaison sur des patients avec un néoplasme qui a progressé après au moins une première ligne de thérapie standard (NCT00978250). Enfin, un dernier essai a eu pour objectif de déterminer l'efficacité de la combinaison entre le THU, la décitabine et le Nivolumab, un inhibiteur du point de contrôle immunitaire, dans des cancers du poumon en seconde ligne de traitement (NCT02664181). Toutes ces études sont terminées et pourtant aucune d'entre elles n'a encore partagé de résultats. Un essai clinique de phase I est le seul en cours (NCT03875287) pour évaluer la toxicité de la combinaison entre le cédazuridine (E7727), un nouvel inhibiteur oral de CDA dérivé du THU, et la décitabine chez des patients avec une tumeur solide (ClinicalTrials.gov, accès le 5 septembre 2021).

Le développement de stratégies ciblant la CDA en combinaison avec des analogues de dC est donc une piste qui mérite plus d'investigations et de preuves cliniques, toutefois limitée par le manque d'inhibiteurs spécifiques²⁰⁰. Plusieurs groupes ont travaillé sur le développement d'inhibiteurs de la

CDA tels que la pseudoisocytidine formant un pont nucléosidique carbone-carbone beaucoup plus stable que les agents dérivés de cytidines et ouvrant ainsi la voie vers de nouvelles molécules²⁰¹.

8.2. Autres opportunités thérapeutiques

Il est admis que les tumeurs qui surexpriment la CDA résistent mieux à la chimiothérapie à base d'analogues de désoxycytidine. Les travaux de Zauri et collègues ont visé à étudier une approche thérapeutique différente dans les tumeurs avec une forte expression de CDA, incluant le cancer du pancréas. Les auteurs ont utilisé une stratégie à base de molécules synthétiques dérivées de désoxycytidine que sont le 5hmdC (5-Hydrométhyl-2'-désoxycytidine) et le 5fdC (5-formy-2'-désoxycytidine) métabolisées respectivement par la CDA en 5hmdU (5-Hydrométhyl-2'-désoxycytidine) et 5fdU (5-formy-2'-désoxyuridine), ensuite phosphorylées par la DCK, la CMPK1 et la NDPK et utilisées pour la synthèse d'ADN. L'incorporation de ces analogues de désoxyuridine entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules induits par le système de surveillance de l'ADN qui reconnaît la mauvaise incorporation de nucléotides. Les cellules normales n'incorporent pas ces nucléotides synthétiques dans l'ADN car elles n'expriment pas ou peu la CDA pour les métaboliser, ce qui montre clairement une opportunité thérapeutique pour traiter les cancers surexprimant la CDA¹⁹⁰. Une autre approche pour ces cancers pourrait être l'utilisation de capécitabine, qui doit être désaminée pour être active. *In vitro* l'expression forcée de CDA sensibilise à la capécitabine dans des modèles cellulaires, méritant des études plus poussées²⁰². La toxicité de l'araC est rapidement observée dans les tissus prolifératifs de l'organisme. La surexpression de la CDA par transfert de gènes dans des leucémies myéloïdes aiguës traitées avec de l'araC protège la moelle osseuse saine des effets toxiques du traitement^{203,204}. La plupart des cancers cependant sous-expriment la CDA comparé au tissu sain^{169,190}. Mameri et collègues ont montré que les tumeurs du sein exprimant faiblement la CDA sont plus sensibles à l'aminoflavone (dérivé AFP464) et que les tissus exprimant fortement la CDA sont eux résistants¹⁶⁹. L'aminoflavone est un nouvel agent anticancer et un ligand du récepteur d'hydrocarbures aryle (AhR), un facteur de transcription qui active la transcription de gènes cibles tels que le cytochrome P450²⁰⁵. Ainsi, l'expression de CDA est un marqueur prédictif de la réponse à l'aminoflavone dans les tumeurs¹⁶⁹. En conclusion, mieux comprendre les rôles et fonctions de la CDA pendant l'oncogenèse pourrait aider à dépasser les problèmes de chimiorésistance, améliorer la prise en charge des patients et identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques¹⁵³.

III. Le stress répliatif et l'instabilité génétique dans les cancers, particularités du cancer du pancréas

1. Les mécanismes de stress répliatif

1.1. La réplication de l'ADN

Le cycle cellulaire est constitué de deux phases majoritaires, la phase S de synthèse de l'ADN et la phase M de division cellulaire, ou mitose, ainsi que deux phases de préparation de la cellule à ces phases majoritaires, les phases G1 et G2 (Figure 20). La phase S est la phase cruciale du cycle cellulaire pendant laquelle l'ADN est répliqué fidèlement. La mitose est le processus biologique complexe durant

lequel le matériel génétique doit être méticuleusement divisé pour former deux cellules filles identiques et au cours duquel plusieurs phases s'enchainent : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La stabilité génomique est basée sur une duplication du génome fidèle et complète et une ségrégation parfaite des chromosomes pendant la division cellulaire. Le déroulement de ces deux phases est régulé par des points de contrôles visant à vérifier la qualité de l'ADN et la quantité suffisante des facteurs nécessaires pour permettre à la cellule de progresser au cours du cycle cellulaire (Figure 20). Le point de contrôle G1/S permet de s'assurer de l'absence de dommages à l'ADN ainsi que de la quantité suffisante des facteurs de réplication avant l'entrée en phase S, tels que les protéines impliquées dans le processus de réplication ou encore la quantité de nucléotides disponibles, Figure 20. Le point de contrôle de G2 permet de vérifier que les chromosomes ont bien été dupliqués, que l'ADN n'est pas endommagé et que les facteurs nécessaires à la mitose sont en quantité suffisante²⁰⁶, Figure 20.

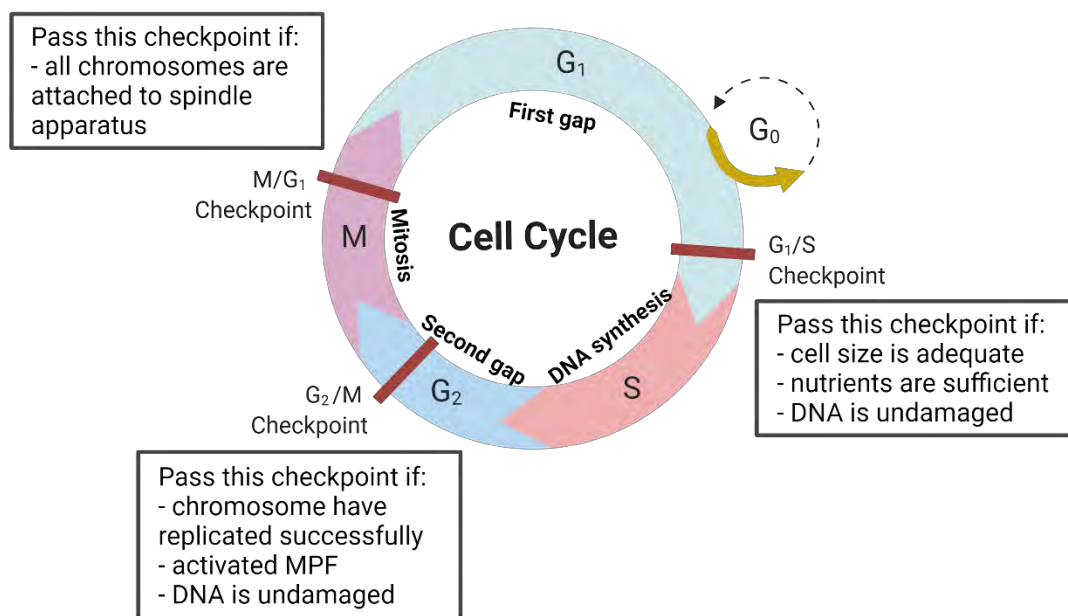


Figure 20 : Points de contrôles du cycle cellulaire permettant de préserver la stabilité du génome.

La réplication de l'ADN durant la phase S est un processus très conservé. La réplication démarre à des milliers d'origines de réplication formant chacune une fourche de réplication bidirectionnelle (Figure 21). Des facteurs de réplication sont recrutés au niveau de ces origines de réplication en phase G₁ pour les initier afin de préparer la chromatine à la réplication en phase S, lors de cette dernière d'autres facteurs sont ensuite recrutés pour permettre l'activation des origines et le démarrage de la réplication²⁰⁷⁻²⁰⁹.

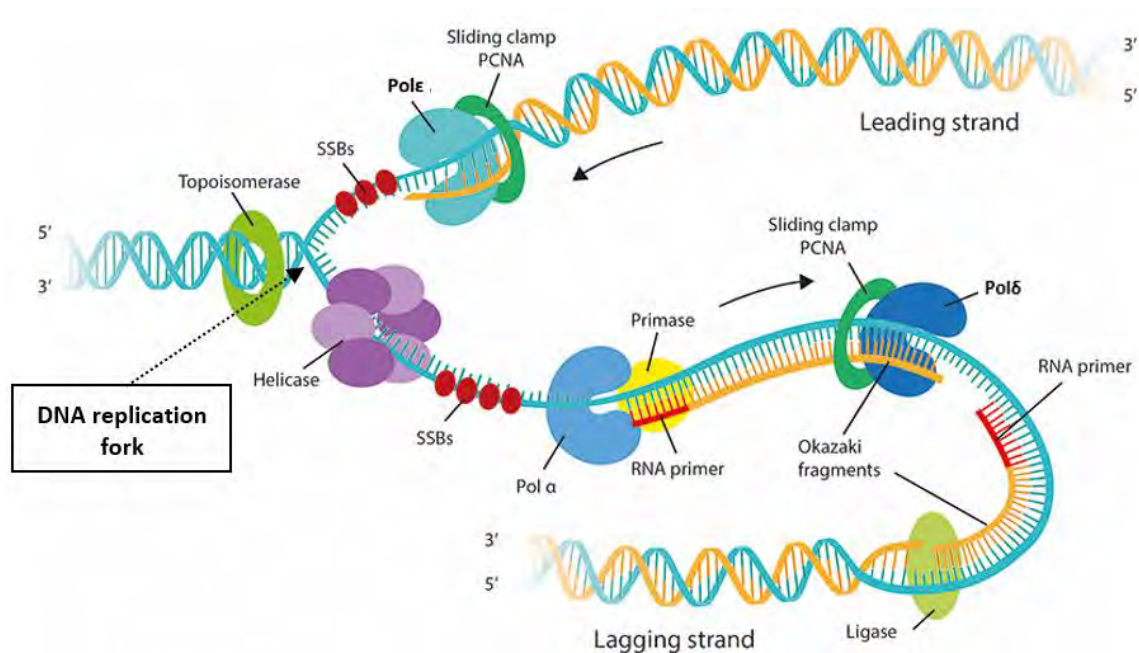


Figure 21: Représentation schématique d'une fourche de réplication de l'ADN et des principaux facteurs protéiques associés. Adapté de <https://www.mechanobio.info/genome-regulation/how-is-dna-replicated/>.

Le brin synthétisé dans le même sens que la progression de la fourche de réplication, est répliqué de façon continue, il est appelé le brin continu, direct ou précoce (leading strand), alors que le brin opposé est répliqué de façon discontinue et repose sur la formation de fragments d'Okazaki, il est appelé le brin discontinu, indirect ou retardé (lagging strand), Figure 21. Le réplisome, ou machinerie de réplication, regroupe les facteurs protéiques impliqués dans la réplication de l'ADN et constitue la fourche de réplication. Deux acteurs essentiels de la fourche de réplication sont la topoisomérase et l'hélicase qui permettent de défaire les surenroulements de l'ADN puis de séparer les deux brins d'ADN, respectivement. Leur rôle est de faciliter le déroulement et l'ouverture de la double hélice d'ADN, indispensable aux processus biologiques de réplication de l'ADN, transcription de l'ARN, recombinaison homologue et autres mécanismes de réparation de l'ADN. L'hélicase permet de séparer les brins de la double hélice d'ADN en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP qui permet la rupture des liaisons hydrogènes entre les bases nucléotidiques²¹⁰. Le complexe hélicase est composé des protéines MCM2-7 (MiniChromosome Maintenance) et est recruté au niveau des origines de réplication préparées en phase G1 et marquées par les protéines ORC (origin recognition complex), impliquant divers facteurs. La réplication des deux brins d'ADN est initiée par le complexe Polα – primase ARN qui synthétise des amorces d'ARN ensuite élonguées en ADN par les polymérases Polε, pour le brin direct, et Polδ, pour le brin indirect (Figure 21). Sur le brin discontinu, la réplication se fait de manière indirecte par petits fragments ensuite liés les uns aux autres, ce sont les fragments d'Okazaki. Un autre acteur important des fourches de réplication est PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), c'est une pince d'ADN catalyseur de la processivité des Polε et Polδ, rassemblant les dNTPs dans l'environnement des polymérases et interagissant avec un grand nombre de protéines (Figure 21). Les facteurs de réplication sont nombreux et agissent conjointement pour permettre le démarrage

et la progression des fourches de réplication ainsi qu'une réplication la plus fidèle possible de l'ADN afin de maintenir l'intégrité génétique des cellules²⁰⁷⁻²⁰⁹.

1.2. La définition du stress réplicatif

La cellule doit gérer la vitesse des fourches, la fidélité de réplication et la consommation des différents facteurs essentiels. Si l'un des facteurs limitants devient insuffisant lors de la réplication, du stress réplicatif peut alors être induit mettant en péril la stabilité du génome et la survie de la cellule. Même si de plus en plus de travaux portent aujourd'hui sur la compréhension des mécanismes de stress réplicatif et sur des marqueurs spécifiques, la notion de stress réplicatif reste encore confuse et sa définition en constante évolution. Le stress réplicatif a été défini par Zeman et Cimprich comme le terme qui désigne un ralentissement ou un blocage de la progression des fourches de réplication et/ou de la synthèse d'ADN²¹¹.

1.3. Les causes et sources du stress réplicatif

La perturbation de la progression des fourches de réplication peut être causée par divers facteurs et peut avoir de graves conséquences sur la stabilité du génome. En effet, certaines régions du génome sont, de nature, particulièrement difficiles à répliquer et/ou sensibles au stress réplicatif, d'autres représentent un obstacle à la progression des fourches de réplication²¹¹. Les principales causes de stress réplicatif sont décrites ci-dessous.

a. Les régions difficiles à répliquer

Les sites fragiles communs (CFS) sont des régions difficiles à répliquer, ce sont des loci de chromosomes caractérisés par des séquences riches en AT, susceptibles de former des structures secondaires de l'ADN, et pauvres en origines de réplication. Ce sont des domaines avec des gènes longs sensibles aux cassures et à l'accumulation d'ADN dans des situations de stress réplicatif^{212,213}. De plus, le manque d'origines dans ces régions force les fourches de réplication lointaines à parcourir de longues distances pour les répliquer, augmentant ainsi les risques de réplication incomplète de l'ADN dans ces régions et les risques de conflits avec les machineries de transcription^{214,215}. En conséquence, de l'ADN peut ne pas être complètement répliqué à la fin de la phase S, persister en mitose et perturber la division cellulaire²¹⁶. D'autres régions du génome sont aussi difficiles à répliquer, il s'agit des télomères et des centromères qui sont aussi vulnérables au stress réplicatif. Ce sont des régions d'hétérochromatine enrichies en séquences répétées sujettes à la formation de structures secondaires qui interfèrent avec la progression de la fourche de réplication et conduisent à des défauts mitotiques^{217,218}.

b. Défauts d'activation des origines de réplication et facteurs limitants de la réplication

Le programme de réplication de l'ADN est un processus finement régulé qui assure que les origines de réplication soient activées de façon séquentielle et unique au cours de la phase S. En effet, suffisamment d'origines doivent être activées pour pouvoir répliquer l'intégralité du génome. La transition entre les phases G1 et S permet à la cellule de contrôler la quantité suffisante des facteurs nécessaires à la réplication avant l'entrée en phase S, cela inclue les nucléotides (dNTPs) et les

composants de la machinerie de réplication^{219–221} ainsi que les histones chaperonnes qui compactent l'ADN²²². En effet, chez la levure, le pool de dNTPs est 3 fois plus important à l'entrée en phase S, comparé à la phase G1 et le dGTP est le nucléotide le plus limitant²²⁰. Un niveau bas de dNTPs induit une diminution de la vitesse de réplication et augmente l'activation d'autres origines pour essayer de compenser et compléter au mieux la réplication de l'ADN. Il est aussi important de contrôler les facteurs d'initiation de la réplication. Dans le cas où les facteurs d'initiation sont en trop grande quantité, davantage d'origines sont activées et le pool de nucléotides s'épuise alors plus rapidement, pouvant ralentir ou arrêter les fourches de réplifications²¹². En effet, chez la levure, une surexpression des facteurs limitants entraîne l'activation de la majorité des origines de réplication de façon précoce et simultanée. Ceci engendre un appauvrissement rapide du pool de nucléotides et de d'autres facteurs et met en péril la viabilité cellulaire^{220,223}. Une suractivation des origines, augmentant notamment le recrutement massif sur le simple brin du facteur RPA (Replication Protein A). En effet, l'ADN simple brin n'est pas nu dans la cellule, il est lié par RPA qui s'y fixe spécifiquement pour le protéger contre la dégradation par les nucléases. Ainsi, en cas de suractivation des origines, RPA devient limitant et l'ADN simple-brin non protégé par RPA est plus sensible aux cassures de l'ADN^{224–226}. Enfin, une altération du pool de nucléotides pendant la réplication est associée à niveau élevé d'instabilité du génome et le développement de pathologies, notamment de cancers^{227,228}. A l'opposé, trop peu d'origines activées peut mener à de l'ADN non répliqué et la perte d'information génétique²¹². Pour toutes ces raisons, une dérégulation de l'activation des origines de réplication et des facteurs limitants peut avoir de lourdes conséquences sur le programme de réplication de l'ADN, la stabilité du génome et le développement de pathologies.

c. Obstacles à la progression de la machinerie de réplication

De nombreux obstacles physiques peuvent perturber la progression de la machinerie de réplication. Les barrières de progression des fourches peuvent être endogènes, résultats de processus cellulaires pendant la phase S, ou exogènes, notamment dus aux agents génotoxiques. Il peut s'agir de lésions de l'ADN, de complexes protéiques, de structures secondaires de l'ADN ou encore de régions contenant des gènes hautement transcrits. Ces barrières ont été très étudiées chez la levure mais leur importance a été encore peu évaluée chez les mammifères^{221,229}.

Lésions de l'ADN

L'intégrité de l'ADN doit être protégée des dommages induits par des facteurs endogènes (spontanés, déchets du métabolisme cellulaire) ou exogènes (environnementaux, physiques ou chimiques) pour garantir sa duplication fidèle. L'ADN est altéré de différentes façons telles qu'une mauvaise incorporation de désoxynucléotides, une interconversion entre les bases de l'ADN, une perte de bases de l'ADN, ou des modifications de bases par alkylation (liaison covalente du groupement alkyl avec l'ADN). Il est estimé à environ 10^5 lésions spontanées de l'ADN par cellule et par jour chez la levure²³⁰. Les lésions de l'ADN peuvent engendrer des cassures de l'ADN représentant une barrière physique à la progression des fourches de réplication. Les lésions de l'ADN sont contrecarrées par des mécanismes de réparation et le système de tolérance des dommages à l'ADN pour permettre la survie de la cellule²³¹.

Il existe diverses sources de lésions à l'ADN qui peuvent être soit endogènes comme la dépurination, la désamination de cytosines ou les ROS, dérivés du métabolisme cellulaire, soit exogènes comme l'exposition aux UVs et aux IRs, la cigarette, les rayons X ou encore les chimiothérapies²³² (Table 4, Table 5).

Sources endogènes	Dépurination	Désamination de cytosines	ROS (métabolisme cellulaire)	Alkylations	Aldéhydes réactif (métabolisme alcool)
Lésions induites	Perte de bases	Interconversion de bases	Oxydation de bases, cassures double-brins	Modification de bases	Pontages d'ADN

Table 4 : Sources endogènes des lésions de l'ADN, extrait de Ciccia et Elledge. 2010.

Sources exogènes	Rayons UV	Rayons IR	Cigarette	Rayons X	Chimiothérapies
Lésions induites	Dimères de pyrimidines	Cassures double-brins	Adduits d'ADN, dommages oxydatifs	Cassures double-brins	Selon le type de chimiothérapie appliquée

Table 5 : Sources exogènes des lésions de l'ADN, extrait de Ciccia et Elledge. 2010.

Les chimiothérapies sont par exemple des agents alkylants (ajout de groupements alkyles sur les bases de l'ADN, capables de former de ponts caténaux entre deux guanines, ex : le Telozolomide), des agents qui introduisent des liaisons covalentes entre les bases (liaisons croisées intra brins ou inter brins, ex : Mitomycine C, Cisplatine), ou encore des agents inhibiteurs de topoisomérases (ex : Camptothécine et Etoposide qui inhibent les topoisomérases I et II respectivement) induisant la formation de cassures simple et double brins de l'ADN (SSBs et DSBs) et piégeant le complexe topoisomérase/ADN^{232,233}.

Mauvaise incorporation de ribonucléotides

Les polymérases répliquatives (Pol α , Pol δ et Pol ϵ) sont très stringentes concernant la complémentarité des bases mais le sont moins sur le choix entre les désoxynucléotides (dNTPs) et les ribonucléotides (rNTPs). Pendant l'élongation de la synthèse d'ADN, ces polymérases doivent donc différencier les substrats « corrects » (dNTPs) de ceux « incorrects » (rNTPs). En cas de mauvaise incorporation, les polymérases Pol ϵ et Pol δ possèdent une activité exonucléase 3' – 5' permettant une correction, ce qui n'est pas le cas de Pol α qui reste donc la moins fidèle des polymérases répliquatives²³⁴. La concentration en nucléotides et désoxynucléotides a aussi son importance car pendant la phase S, les rNTPs sont plus abondants que les dNTPs, ce qui explique les mauvaises incorporations de rNTPs fréquemment retrouvées dans l'ADN. *In vitro*, ces mauvaises incorporations de ribonucléotides perturbent la progression de la fourche de répliquon dû au fait qu'un seul rNTP incorporé dans le brin matrice est capable de bloquer l'activité des polymérases répliquatives²³⁵. Ces erreurs d'incorporation dans l'ADN sont retirées de façon efficace par plusieurs voies de réparation enzymatique pour assurer la survie de

la cellule, c'est le rôle notamment de la RNaseH2, de FEN1 et de EXOI qui reconnaissent et retirent par excision les ribonucléotides^{234,235}. Les ribonucléotides incorporés sont le type de lésions le plus fréquemment corrigé dans la cellule¹⁹⁴.

Les structures secondaires inhabituelles de l'ADN

Il existe différentes conformations alternatives de l'ADN, autre que la forme classique B de la double-hélice d'ADN, basées sur des motifs de séquence particuliers et l'interaction avec de nombreux partenaires protéiques.

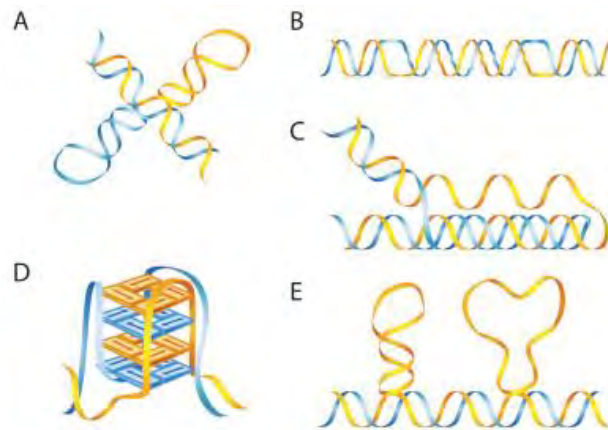


Figure 22: Schéma des structures non-B de l'ADN communément étudiées. A) Cruciforme, B) Z-DNA côté gauche, C) triplex intramoléculaire H-DNA, D) G-quadruplexe/tétraplexe, E) Tige-boucle (gauche) ou bulle (droite) formés après glissement de l'ADN. Image extraite de Wang et Vasquez. 2017.

Les conformations les plus étudiées sont l'hélice Z, les structures cruciformes, les triplexes d'ADN et les G-quadruplexes (G4)²³⁶, voir Figure 22. Les structures secondaires inhabituelles de l'ADN, une fois formées et stables, représentent une barrière physique à la progression des polymérases, ce qui engendre une réplication incomplète et à terme des cassures de l'ADN et la fragilité des chromosomes^{213,237-239}. Ceci explique que les régions génomiques avec la capacité de former des structures secondaires stables de l'ADN sont enrichies en DSBs endogènes dans les cellules humaines²³⁹.

Ces conformations alternatives de l'ADN sont généralement formées dans des régions de séquences nucléotidiques répétées. Par exemple, les G4 sont formés dans les régions riches en GC de l'ADN simple brin ou de l'ARN et augmentent les torsions de l'ADN induisant le blocage de la progression des fourches de réplication. Pendant la réplication de l'ADN, les G4 peuvent se former inopinément, surtout sur le brin matrice retardé, et ce encore plus si la réplication de l'ADN est lente^{236,240}. La stabilisation chimique ou la perte de l'hélicase qui déroule les G4 mène à la diminution de l'avancée des fourches de réplication et à l'augmentation des cassures de l'ADN. De plus, les centromères et les télomères caractérisés comme des régions difficiles à répliquer sont enrichis en G4 qui interfèrent avec la réplication de ces régions chromosomique^{217,218}. Ces conformations de structure de l'ADN existent en conditions physiologiques représentent un défi physique majeur pour la progression de la

machinerie de réplication. De plus, la séquence d'ADN comprise dans la structure secondaire ne peut pas servir de matrice lors de la réplication qui devient alors incomplète, il est donc crucial de résoudre ces structures secondaires inhabituelles de l'ADN²⁴⁰.

d. Les conflits réplication-transcription

Les processus biologiques de transcription et de réplication ont tous deux pour substrat l'ADN. Même si la transcription est majoritaire en G1, elle peut aussi avoir lieu en phase S et est généralement exclue des domaines nucléaires de réplication^{241,242}. De plus, les deux machineries progressent à des vitesses similaires, elles ne sont donc pas censées se rencontrer, cependant cela peut arriver dans des conditions spécifiques^{241,243}. En effet, si certains facteurs de transcription sont manquants alors la vitesse de transcription est diminuée et la machinerie reste bloquée sur l'ADN, augmentant ainsi les risques de collisions avec le réplisome. Également, les gènes humains les plus longs, souvent contenus dans des sites fragiles communs, nécessitent plus d'un cycle cellulaire pour être entièrement transcrits²¹⁵. Ainsi, la concomitance spatiale et temporelle de la transcription et de la réplication dans ces gènes particulièrement longs induit l'instabilité des sites fragiles communs. Aussi, dans des régions répliquées de façon précoce, un nombre élevé d'origines activées à proximité de gènes hautement transcrits induit des conflits entre les machineries et l'arrêt des fourches de réplication^{244,245}. Selon le sens d'orientation de la transcription, la progression des deux machineries peut être co-directionnelle ou frontale, les collisions seraient plus drastiques et susceptibles d'induire des dommages à l'ADN à la suite d'une convergence frontale²⁴². Il existe deux causes directes de la fragilité de l'ADN due aux conflits entre réplication et transcription, il s'agit de la formation de R-Loops et la génération de stress topologique.

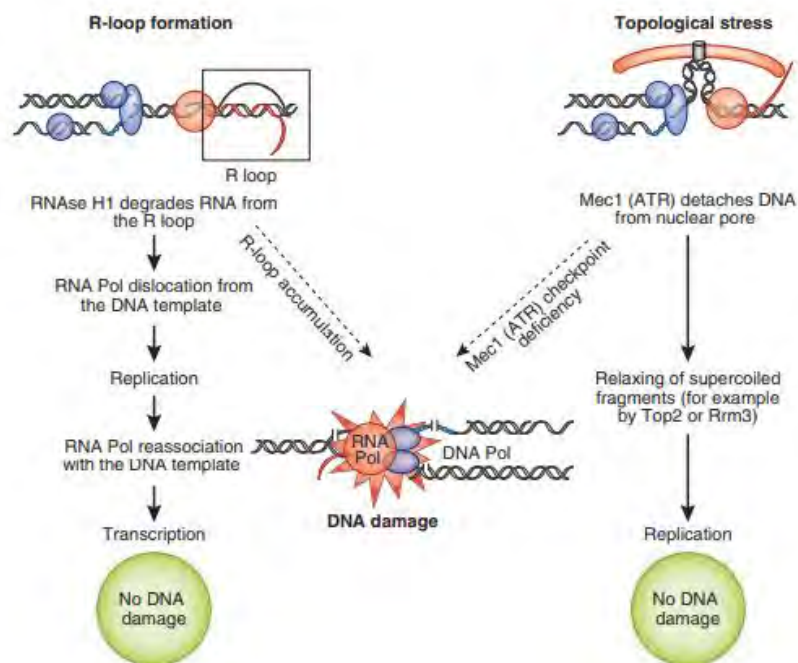


Figure 23: Les conséquences des conflits entre la réplication et la transcription. Image extraite de Helmrich et al. 2013.

Les R-Loops sont des structures à 3 brins contenant un hybride ARN : ADN et un simple brin d'ADN déplacé (Figure 23). En effet, le nouveau transcrit s'hybride à l'ADN double-brin derrière le complexe de transcription. La structure ainsi formée représente une barrière physique de progression des fourches de réplication et augmente le risque de dommages à l'ADN. La formation de R-Loops est favorisée par des séquences d'ADN riches en GC^{222,246}. Elles sont produites à une faible prévalence dans les cellules normales et assurent aussi des rôles physiologiques. En effet, ce sont des intermédiaires impliqués dans différents processus cellulaires tels que la commutation des isotypiques des immunoglobulines ou l'initiation de la réplication de l'ADN mitochondrial²⁴⁶. Les R-loops sont cependant largement plus fréquentes si la transcription ou la réplication est perturbée^{222,246}. L'action des RNase H est indispensable pour prendre en charge les R-Loops, en dégradant la partie ARN, afin de maintenir la stabilité des fourches de réplication^{215,247}.

Les deux processus de transcription et de réplication requièrent le déroulement de la molécule d'ADN. Or, lors de la transcription, le déroulement de l'ADN mène à des surenroulements positifs et négatifs devant et derrière la progression de la polymérase respectivement, induisant du stress topologique. La convergence des deux machineries augmente ce stress topologique et impacte ainsi la progression des polymérases de réplication et de transcription. Celui-ci apparaît notamment quand la machinerie de réplication rencontre une région chromosomique qui ne peut pas se dérouler librement, généralement si elle reste attachée à la matrice nucléaire. Une accumulation de surenroulements positifs se produit quand la réplication et la transcription convergent²⁴⁷, engendrant des effondrements des fourches et mettant en péril la viabilité cellulaire^{242,248}. Il est donc indispensable pour la cellule de résoudre le stress topologique engendré, et ce grâce à des enzymes qui relaxent les fragments d'ADN surenroulés²⁴² (Figure 23). Les topoisomérases sont des enzymes capables de résoudre les problèmes de topologie induits lors des processus de réplication, de transcription ou de réorganisation de la chromatine. Elles sont dites de type I ou de type II selon leur capacité à catalyser la cassure d'un ou deux des brins d'ADN. La cassure permet de relaxer les superenroulements de l'ADN, les ruptures sont ensuite refermées et l'enzyme libérée de l'ADN²⁴⁹. Les mécanismes de conflits entre transcription et réplication et leur résolution ne sont pas encore clairement élucidés mais sont très étudiés, notamment dans le contexte oncogénique qui est décrit plus tard.

e. Dynamique de la chromatine

L'empaquetage de l'ADN sur la chromatine est un processus hiérarchique très régulé. L'accessibilité de l'ADN et l'état de compaction de la chromatine peuvent influencer la réplication de l'ADN. En effet, la progression du réplisome nécessite le désassemblage des nucléosomes devant la fourche et l'assemblage à nouveau des nucléosomes sur l'ADN double brin naissant, derrière la fourche²⁵⁰. Cet assemblage derrière la fourche de réplication est très rapide et implique le recrutement d'un dimère H3-H4 puis d'un dimère H2A-H2B²⁵¹. Un défaut dans le stock d'histones ou dans l'assemblage de la chromatine peut donc affecter la dynamique de réplication et déstabiliser les fourches de réplication. La synthèse d'ADN et la synthèse des histones sont orchestrées à la transition G1/S par l'activité du complexe cycline/CDK2 et sont mutuellement dépendantes l'une de l'autre. Les deux processus restent couplés pendant la phase S avec des taux contrôlés. Cela permet d'assurer la quantité

d'histones nécessaire au niveau des fourches et l'organisation précise de l'ADN nouvellement répliqué au sein de la chromatine^{252,253}. Dans les cellules humaines, la répression des gènes codant pour les histones inhibe la synthèse d'ADN²⁵². Ainsi l'assemblage correct des nucléosomes est requis pour maintenir la stabilité des fourches de réplication et assurer une réplication complète.

1.4. La réponse de la cellule au stress réplicatif

Lorsqu'une cellule présente des défauts de réplication, alors des voies de réponse au stress réplicatif (RRS) sont activées, et ce notamment grâce à des longueurs d'ADN simple-brin (ssDNA) générées aux fourches bloquées servant de plateforme de recrutement à des protéines de signalisation pour induire l'arrêt du cycle cellulaire, la stabilisation et le redémarrage des fourches de réplication²¹¹. Contrecarrer le stress réplicatif requiert l'activation du point de contrôle de phase S, des facteurs supplémentaires comme des hélicases spécifiques des structures secondaires particulières de l'ADN ou encore des polymérases spécialisées telles que les polymérases translésionnelles (TLS) ou post-réplicatives prenant en charge les lésions de l'ADN^{221,229,254}. Les processus de réponse au stress réplicatif induits par l'activation du point de contrôle intra-S afin de préserver l'intégrité des fourches de réplication et du génome sont présentés ci-dessous.

a. Le point de contrôle de phase S, voie ATR-Chk1

Le point de contrôle, une fois activé, ralentit la progression dans le cycle cellulaire en présence de dommages à l'ADN ou de blocage des fourches de réplication pour permettre la mise en place des processus de réparation et de redémarrage des fourches²⁵⁵. Deux kinases sont des composantes centrales des points de contrôles du cycle cellulaire activés en réponse aux dommages à l'ADN, ce sont ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM an Rad3 related protein) qui activent respectivement Chk2 et Chk1 (Checkpoint Kinase 2 and 1). ATM est majoritairement activée en réponse à des cassures double-brins de l'ADN alors qu'ATR est la principale kinase activée en réponse au stress réplicatif²⁵², et permet le contrôle de l'activation des origines de réplication en conditions non perturbées^{256,257}.

Les effecteurs du point de contrôle de phase S

Lors de la phase S, l'ADN simple-brin (ssDNA) est fréquemment exposé quand l'hélicase répliquative continue de dérouler le double-brin parental après ralentissement ou blocage de la polymérase de réplication²⁰⁸. L'ADN simple brin est lié par RPA qui s'y fixe spécifiquement pour le protéger contre la dégradation par les nucléases. La persistance d'ADN simple-brin lié par RPA à proximité d'ADN double-brin nouvellement synthétisé sert de plateforme pour le recrutement de protéines impliquées dans la réponse au stress réplicatif telles qu'ATR. Cette dernière est une protéine centrale dans la réponse au stress réplicatif, qui une fois activée, phosphoryle via son activité kinase les sérines et thréonines d'un large panel de protéines telles que BRCA, p53, Chk1, Rad17 favorisant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la terminaison de la réplication ou l'apoptose^{208,256}. L'ADN simple brin est un intermédiaire commun entre les voies de réponse aux différents types de lésions de l'ADN pour l'activation du senseur de stress réplicatif ATR et du checkpoint intra-S^{258,259}.

Dans les cellules humaines, de multiples acteurs protéiques interagissent et sont recrutés successivement pour permettre l'activation du point de contrôle de phase S. Tout d'abord, ATRIP (ATR-interacting protein), partenaire protéique et régulateur d'ATR, reconnaît et interagit directement avec le complexe RPA-ssDNA afin de localiser le complexe ATR-ATRIP au site de dommage, voir Figure 24^{259,260}. A ce stade le complexe ATR-ATRIP est recruté mais n'est pas actif, des facteurs régulateurs de l'activité d'ATR sont requis tels que Rad17, Rad9, Rad1, TOPBP1 (DNA topoisomerase II binding protein 1) et Hus1. Pour cela, les complexes RFC-Rad17 et 9-1-1 sont recrutés^{258,259} (Figure 24). Par la suite, TopBP1 peut être phosphorylé par ATR (Ser 1131) pour augmenter d'avantage l'interaction entre TopBP1 et ATR et amplifié les signaux transduits par ATR. Les mécanismes par lesquels Rad9 et TopBP1 stimulent l'activité d'ATR sont encore peu connus²⁶¹. De plus, ETAA1 (Ewing's tumour-associated antigen 1) interagit avec RPA pour être localisé au niveau des fourches de réplication bloquées²⁶²⁻²⁶⁴. ETAA1 interagit aussi avec le complexe ATR/ATRIP afin d'agir comme un second activateur direct de l'activité d'ATR, en parallèle et indépendamment de TOPBP1. La perte simultanée de ETAA1 et TOPBP1 provoque une diminution drastique de la signalisation dépendante d'ATR et une augmentation massive d'instabilité génomique conduisant à une létalité synthétique²⁶²⁻²⁶⁴.

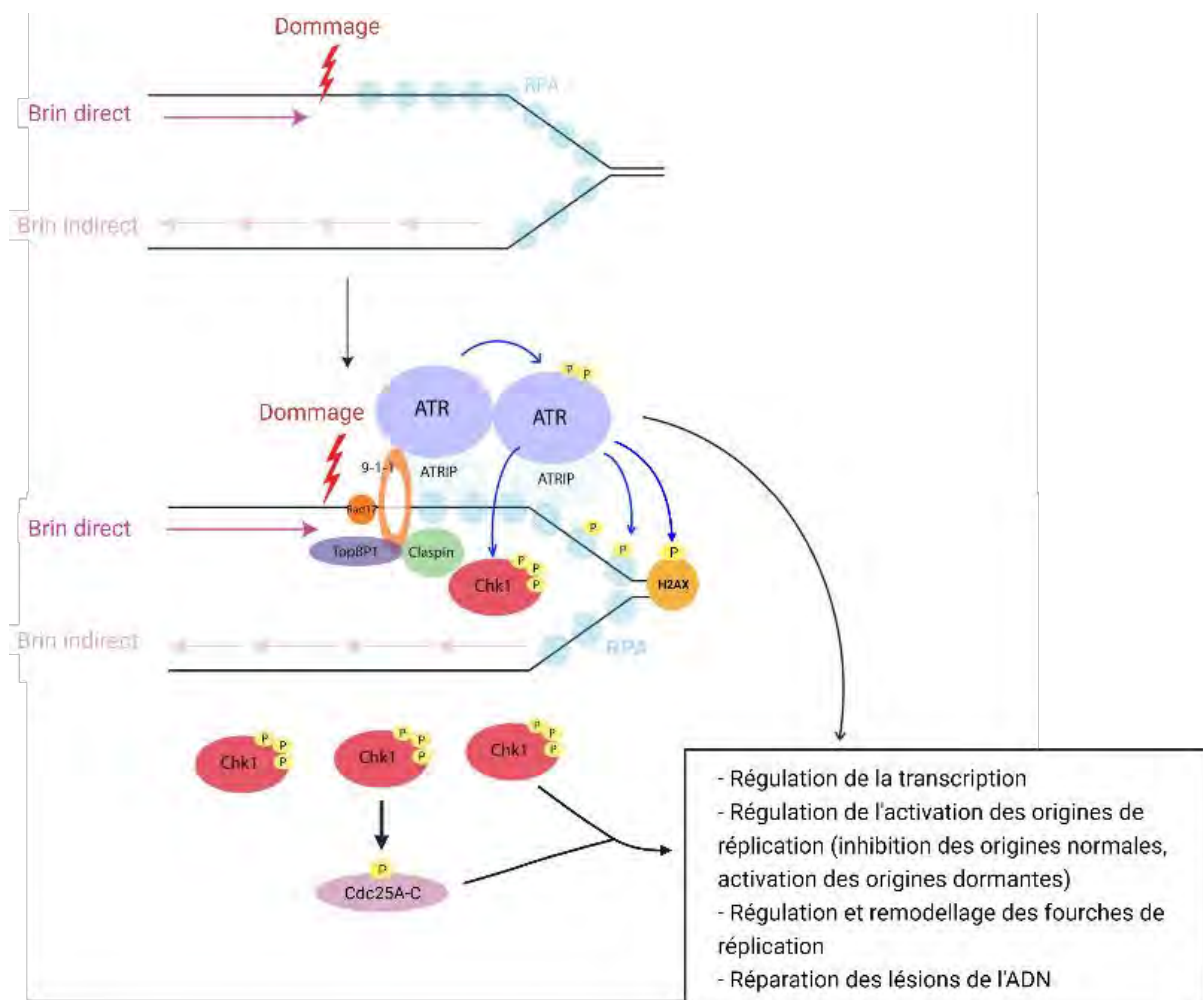


Figure 24 : L'activation du point de contrôle intra S. Image extraite et adaptée de Iyer et Rhind. 2017.

Une fois la kinase ATR pleinement active, elle phosphoryle Chk1 (sérines 345) en réponse au stress répliatif pour relayer le signal du point de contrôle de façon diffuse sur des substrats distants, contrairement à ATR qui reste proche de la chromatine. Chk1 est activé dans le but de réguler le déroulement de la réplication et les mécanismes de réponse au stress répliatif^{259,265} (Figure 24, Figure 25). Enfin, une autre protéine effectrice phosphorylée par ATR est H2AX. Ce variant d'histone est impliqué dans la signalisation des cassures double brins et phosphorylé lors du ralentissement ou blocage des fourches de réplication en absence de dommages à l'ADN. La phosphorylation de H2AX en position γ aux sites de cassures permet le recrutement de protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) comme 53BP1 ou BRCA1^{266,267}. De plus, la phosphorylation de H2AX colocalise avec PCNA et BRCA1 aux fourches bloquées suggérant un rôle de γ -H2AX dans le recrutement de protéines impliquées dans la réponse au stress répliatif au niveau des fourches bloquées^{267,268}. En conclusion, Chk1 est la kinase effectrice d'ATR impliquée dans la réponse au stress répliatif via différents mécanismes cellulaires présentés Figure 25, et développés ci-dessous.

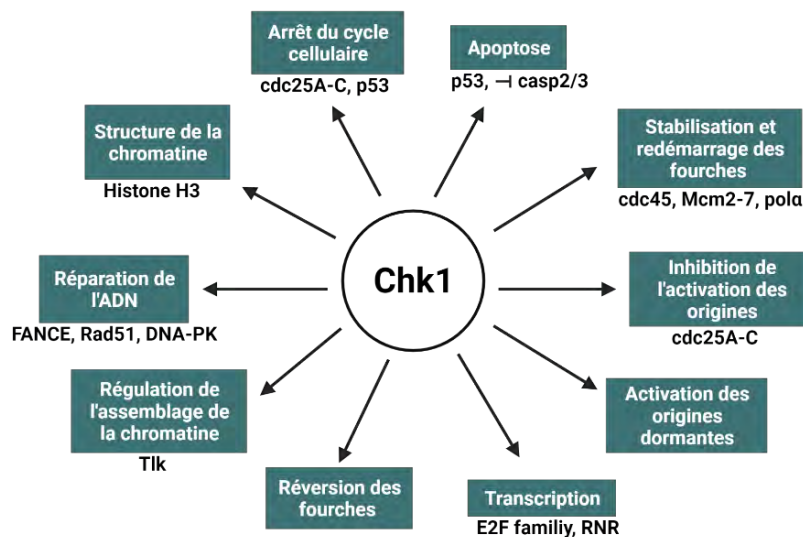


Figure 25: Les différents rôles de l'activation d'ATR-Chk1 dans le contrôle de la phase S.

La régulation transcriptionnelle par ATR/Chk1

Dans les cellules de mammifères Chk1 régule les facteurs de transcription de la famille E2F impliqués dans le métabolisme et la réparation de l'ADN. En réponse au stress répliatif, Chk1 phosphoryle et inactive E2F6, le répresseur de la transition G1/S dépendante des E2F, afin de maintenir la survie cellulaire induite par les membres de la famille E2F^{269,270} (Figure 25). Chk1 contrôle indirectement aussi la transcription de RRM2 (sous unité catalytique de la RNR, Ribonucléotide Réductase) via les E2F, cruciale pour la synthèse des dNTPs²⁷¹. Chez la levure les niveaux de dNTPs sont augmentés de 6 à 8 fois en réponse aux dommages à l'ADN, améliorant ainsi grandement la survie cellulaire²⁷². Si l'expression de RRM1 et RRM2 est diminuée, alors le taux de γ -H2AX cellulaire et la sensibilité à la camptothécine (inhibiteur de topoisomérase) sont augmentés. De plus, Chk1 est surexprimée et activée après un traitement à la camptothécine, et induit l'expression et la translocation de RRM2 via E2F1, suggérant un rôle actif mais indirect de RNR en réponse à la camptothécine²⁷¹.

La régulation des origines de réplication

La réplication du génome est ordonnée temporellement et séquentiellement au cours de la phase S²⁷³. L'activation des origines de réplication est étroitement liée à la vitesse des fourches de réplication et la réponse au stress répliatif. En présence de dommages, les origines répliquées précocement sont activées de façon normale, étant donné que ce sont les régions qui détectent les lésions. Cette détection permet ensuite l'activation du point de contrôle puis l'inhibition de l'activation des origines plus tardives via le ciblage de différents substrats par Chk1^{273,274}. L'inhibition de l'activation de nouvelles origines de réplication empêche que de nouvelles fourches soient endommagées et soient décrochées et visent ainsi à limiter les conséquences du stress répliatif^{275,276}.

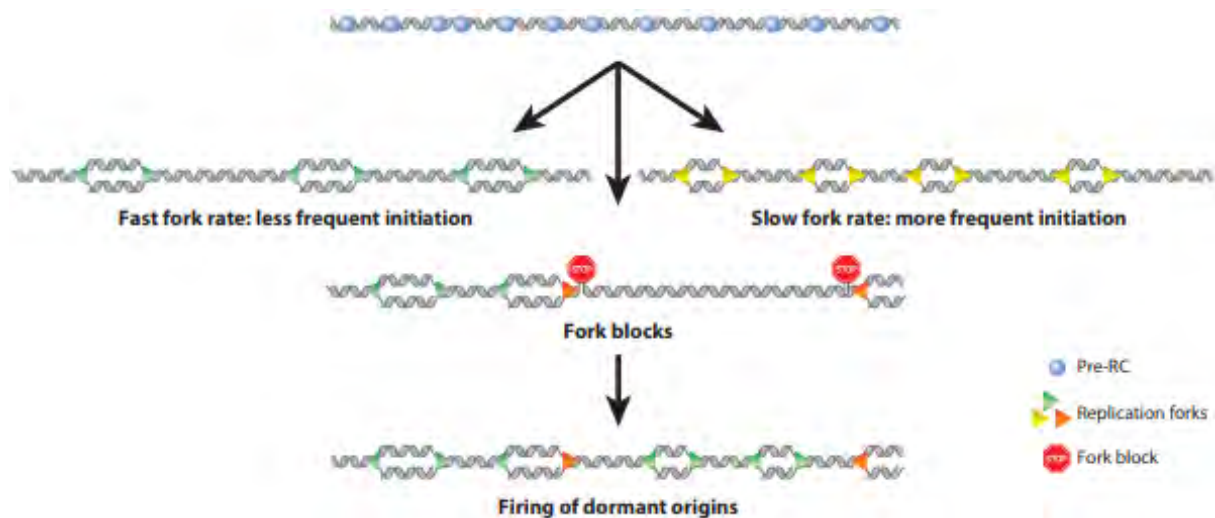


Figure 26 : Plasticité de la régulation de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes. Quand la vélocité des fourches de réplication est élevée, l'activation est moins fréquente (gauche), alors que l'initiation est plus fréquente quand la vélocité est plus faible (droite). Quand les fourches sont bloquées, les origines dormantes sont activées (centre). Image extraite de Masai et al. 2010.

Des origines dites « dormantes » sont néanmoins localement activées en réponse au stress répliatif. Ce sont des origines qui ne devaient pas être activées dans le programme de réplication initial, voir Figure 26. En effet, lors d'une réplication non perturbée, une cellule active seulement environ 10% des origines préparées seulement (fixation du complexe de pré-réplication), le reste correspond aux origines dormantes préparées pendant la phase G1 mais non activées pendant la phase S²⁷⁷. Les origines dormantes sont déclenchées pour terminer la réplication à proximité des fourches bloquées et ainsi diminuer les conséquences du décrochage des fourches en condition de stress répliatif. Chk1 promeut la progression des fourches de réplication en contrôlant l'initiation de la réplication. En effet, les cellules dans lesquelles Chk1 est inactif présentent une activation élevée des origines de réplication et une diminution de la progression des fourches de réplication²⁵⁷. Pour ce faire, en réponse aux dommages à l'ADN, Chk1 activé phosphoryle et inhibe les phosphatases Cdc25 activatrices des complexes cyclines – kinases dépendantes des cyclines. L'inhibition de cdc25A par Chk1 induit sa dégradation, et celle de Cdc25B et Cdc25C diminue leur activité phosphatase. Par conséquent, les complexes cyclines/CDK sont inhibés, stoppant la progression du cycle cellulaire^{267,275,278}. En conclusion

l'activation des origines dormantes permet à la cellule de continuer à répliquer l'ADN au-delà des fourches bloquées par le stress répliatif. Ce n'est pas connu aujourd'hui comment le point de contrôle ATR/Chk1 supprime globalement l'activation des origines en réponse au stress répliatif mais permet l'activation spécifiques des origines de répliation dormantes^{277,279}.

b. La régulation des fourches de répliation

Lors d'un stress répliatif persistant, si les fourches de répliation ne sont pas stabilisées elles peuvent s'effondrer, et ce par des mécanismes qui ne sont pas encore clairs aujourd'hui. Zeman et Cimprich ont proposé différents mécanismes d'effondrement des fourches de répliation incluant la dissociation ou la migration du réplisome, la digestion par des nucléases et la poursuite de la répliation générant de larges étendues d'ADN simple-brin, comme présenté Figure 27.

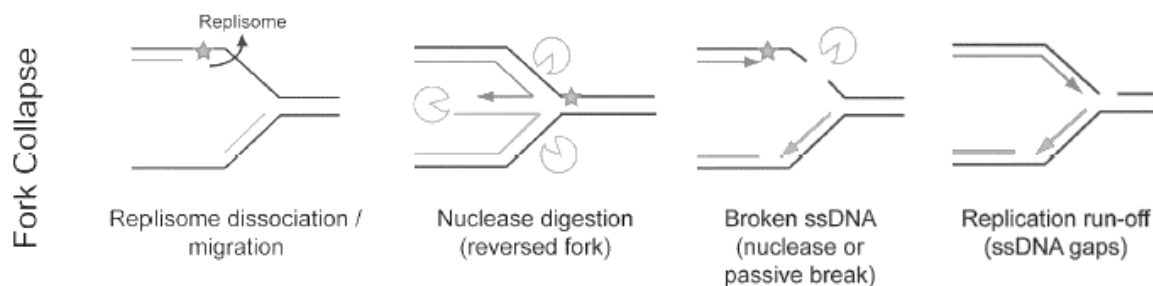


Figure 27: Mécanismes d'effondrement des fourches de répliation. Image extraite de Zeman et Cimprich. 2014.

Une caractéristique importante de la cellule est la capacité à tolérer des lésions de l'ADN et des obstacles structurels pendant la répliation de l'ADN. Il existe quatre voies distinctes de tolérance des dommages à l'ADN, ce sont la synthèse d'ADN translésionnelle (TLS), la réversion des fourches de répliation, l'échanges de brins matrices et enfin le réamorçage de la répliation^{259,280}, présentés Figure 28. Ces voies permettent de contourner l'obstacle ou la lésion bloquant les fourches, ou de réamorcer la synthèse d'ADN un peu plus loin tout en résolvant les trous d'ADN simple brin générés. Ainsi, les voies de tolérance permettent de remodeler les fourches de répliation afin d'éviter les cassures doubles brins dangereuses pour la stabilité du génome. L'objectif de ces mécanismes est donc finalement de terminer la répliation, d'éviter la prolongation des fourches bloquées et d'éviter les conséquences de l'effondrement de fourches.

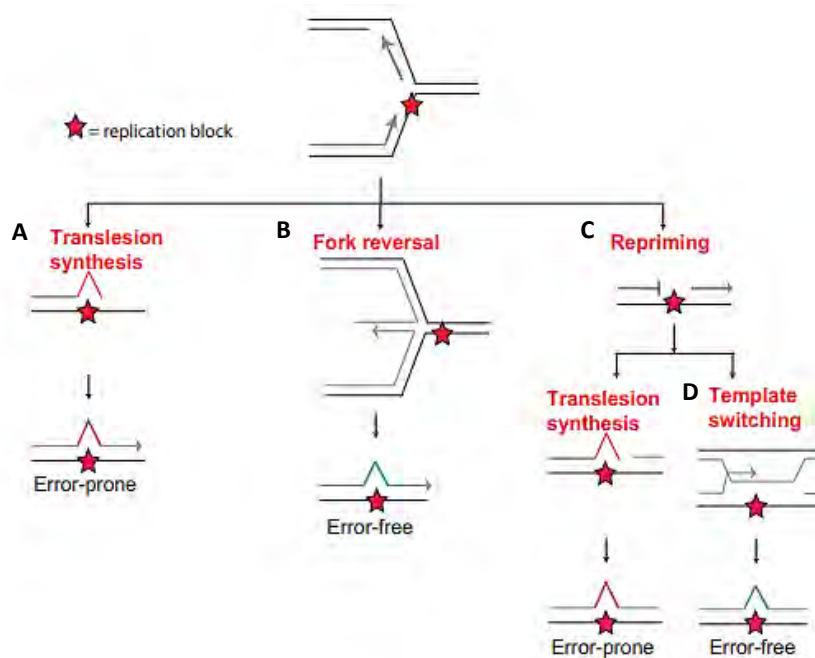


Figure 28: Les voies de tolérance des dommages à l'ADN. Image extraite de Pilzecker et al. 2019.

Une des voies possibles pour prendre en charge et redémarrer une fourche de réplication arrêtée par un obstacle ou une lésion est la réversion des fourches de réplication. La fourche de réplication bloquée est déroulée et les deux brins d'ADN directs et indirects sont liés de façon à former une structure « pied de poulet ». Cette structure de type jonction de Holliday (jonction mobile entre 4 brins d'ADN), correspond à la régression des fourches (Figure 28B, fork reversal). Cette régression peut se faire uniquement quand la machinerie de réplication est retirée de la fourche bloquée et implique de nombreux partenaires protéiques^{281,282}.

Le point de contrôle intra-S préserve la stabilité du génome en protégeant les fourches de réplication défectueuses. La stabilisation des fourches est essentielle pour éviter l'effondrement et permettre leur redémarrage. Les fourches peuvent être considérées comme stables lorsque les facteurs du réplisome sont physiquement associés à la fourche de réplication arrêtée. Les mécanismes de stabilisation de fourches dans les cellules mammifères sont très peu connus²⁵⁹. Une fois une fourche de réplication arrêtée, elle peut soit être remodelée et redémarrée soit être dégradée. Sans réversion des fourches, le redémarrage ou la restauration des fourches peut se faire via i) le réamorçage de la synthèse d'ADN, ii) la synthèse d'ADN translésionnelle (TLS) ou iii) par recombinaison par échange de brins matrice (Figure 28). Ces mécanismes peuvent aussi s'entrecroiser selon le type de blocage^{283,284}.

La première possibilité de redémarrage des fourches de réplication est le réamorçage de la réplication (Figure 28 C, repriming). Pendant la réplication normale, l'amorçage de la synthèse d'ADN discontinue sur le brin retardé est assuré par Pol α , avec la formation des fragments d'Okazaki. Le réamorçage peut aussi avoir lieu sur le brin direct en réponse à une lésion. En effet, PRIMPOL possède une activité translésionnelle et une activité primase, lui permettant de synthétiser de courtes amorces pour permettre ensuite à l'ADN polymérase répliquative Pol ϵ de poursuivre son activité. PRIMPOL lie le

complexe ssDNA/RPA et réamorçait rapidement la synthèse d'ADN après la lésion. Une fois la lésion passée, le trou d'ADN simple brin est comblé par un échange de brins ou par synthèse d'ADN translésionnelle afin de préserver la stabilité du génome^{280,285}. La deuxième possibilité pour outrepasser une lésion est la recombinaison par échange de brin qui permet de remplir et de fermer le trou d'ADN simple-brin contenant la lésion et ce sans induire d'erreurs²⁸³ (Figure 28 D, template switching). La structure induite ressemble à une double jonction de Holliday.

Enfin le troisième mécanisme de redémarrage est la synthèse d'ADN translésionnelle (TLS), réalisée par des polymérases spécialisées de la famille des polymérases Y qui permettent d'insérer de l'ADN en face d'une matrice d'ADN endommagée ou d'un obstacle de réplication (Figure 28 A). Les principales polymérases TLS appartenant à la famille Y des polymérases sont REV1, POLH, POLI et POLK. Ces polymérases n'ont pas d'activité de relecture, elles sont donc moins fidèles et peuvent tolérer les lésions qui ont stoppé les polymérases répliquatives (Pol δ et Pol ϵ)^{286,287}. L'action de ces polymérases est ensuite suivie par celle du complexe Pol ζ de la famille B permettant l'extension de la synthèse d'ADN et la coordination entre les activités TLS se fait grâce à REV1^{249,288}. Le recrutement et l'exclusion des polymérases translésionnelles sont des processus finement régulés par de nombreuses interactions entre protéines et des modifications post-traductionnelles. En conséquence, si les obstacles persistent et si les voies de tolérance des dommages à l'ADN sont défectueuses alors les fourches restent bloquées de façon prolongée et s'effondrent, conduisant à la formation de cassures double-brins de l'ADN, toxiques pour la cellule²⁸⁰. Des études récentes ont révélé que les trous d'ADN simple brin générés par PRIMPOL afin de réamorcer la réplication de l'ADN au-delà de la lésion sont réparés via les polymérases translésionnelles REV1 et POL ζ soit en S soit en G2 avec différents partenaires protéiques²⁵². De plus, BRCA1 et BRCA2 stimulent cette réparation en limitant l'activité de MRE11, révélant un autre rôle de BRCA dans la réponse au stress répliquatif. Les cellules tumorales BRCA mutées sont plus dépendantes de la TLS pour réparer les trous d'ADN simple brin et l'inhibition de la TLS est très toxique dans ces cellules. Il semble donc rationnel d'inhiber l'action de REV1- POL ζ pour traiter les tumeurs mutées pour BRCA^{88,289}.

c. La réparation des lésions de l'ADN pendant la phase S

Comme discuté précédemment, de nombreuses lésions de l'ADN se produisent pendant la phase S, causées par des agents exogènes ou endogènes. Ces lésions peuvent être outrepassées par les systèmes de tolérance des dommages à l'ADN ou réparées par des voies spécifiques des lésions. De plus, si le stress répliquatif persiste, la prise en charge des fourches de réplication arrêtées peut mener à la formation de cassures de l'ADN, réparées par divers mécanismes. La table ci-dessous récapitule les différents types de lésions et leur mode de réparation par la cellule (Table 6).

Type de lésion de l'ADN	Cassures double-brin (DSB)	Cassures simple-brin (SSB)	Modification de bases (oxydation, désamination)	Liaisons croisées d'ADN	Dimères de pyrimidines	Adduits d'ADN	Mauvais appariements de bases
Réparation	HR, NHEJ, MMEJ	BER (PARP)	BER	NER, HR, TLS et FA	NER	NER, TLS	MMR

Table 6 : Différentes voies de réparation selon le type de lésion de l'ADN. HR : recombinaison homologue, NHEJ : réparation par jonction d'extrémités non homologues, MMEJ ou Alt-EJ : réparation par micro-homologies, BER : réparation par excision de bases, NER : réparation par excision de nucléotides, TLS : synthèse d'ADN translésionnelle, FA : réparation fanconi anemia, MMR : réparation de mésappariements (Ciccio et Elledge. 2010).

Il existe au moins 6 voies de réparation spécifiques de dommages à l'ADN^{232,290,291}. La réparation des bases modifiées (sites abasiques ou bases altérées) et des SSBs se font grâce à la voie BER (réparation par excision de bases) via l'activation des membres de la famille PARP²⁹², alors que la voie NER (réparation par excision de nucléotides) permet la réparation des modifications plus complexes de l'ADN telles que des dimères de pyrimidines et les adduits d'ADN. Les liaisons croisées entre-brins de l'ADN sont réparées par combinaison entre les voies NER, HR, TLS et FA (Anémie de Fanconi). Les pontages inter-brins sont particuliers car ce sont les seules lésions ne générant pas directement de complexes ssDNA/RPA activateurs d'ATR. Les protéines de la voie FANC (Fanconi Anemia) prennent en charge les lésions croisées et génèrent des intermédiaires de ssDNA pour permettre l'activation du point de contrôle intra-S^{259,293}. Enfin, la réparation MMR (réparation de mésappariements) répare les insertions, délétions et inversions de nucléotides (INDELS) menant à un mésappariement des bases^{232,290,291}. Les voies de réparation HR, NHEJ et MMEJ (AltEJ ou réparation alternative par jonction d'extrémités) quant à elles réparent spécifiquement les cassures double-brins de l'ADN (Figure 29). La recombinaison homologue est la plus fidèle car elle permet de reconstituer la séquence des deux brins lésés par homologie avec le chromosome homologue. En revanche la NHEJ joint les extrémités de la cassure et les lie pour reformer le double brin, avec perte de quelques nucléotides dans la séquence d'origine de l'ADN (Figure 29). Pour cela, la voie HR est la majoritaire en phase S pour la réparation des dommages car l'intégrité de la réplication doit être préservée autant que possible^{284,294}.

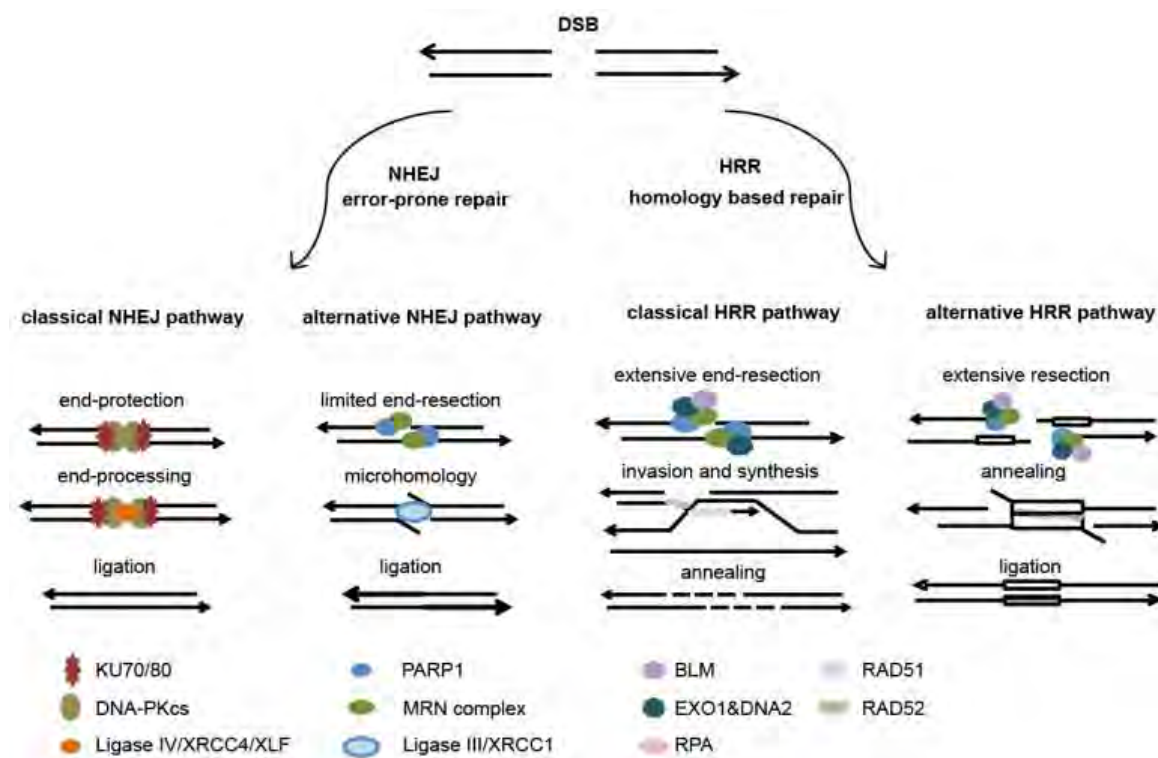


Figure 29 : Vue d'ensemble des mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN (DSB). Image extraite de Dok et Nuyts. 2016.

2. L'instabilité génétique : conséquence d'un stress réplicatif non résolu

L'instabilité génétique correspond à l'incapacité de la cellule à maintenir son intégrité génétique et son génome stable. L'instabilité génomique regroupe des petites variations structurales comme une augmentation de la fréquence des mutations de paires de bases ou l'instabilité des microsatellites (MSI) ainsi que des variations structurales plus importantes comme la variation du nombre et de la structure des chromosomes²⁹⁵. Des défauts dans le déroulement de la mitose peuvent conduire à une mauvaise ségrégation des chromosomes et des changements de ploïdie. Ces défauts peuvent être causés par un dysfonctionnement des facteurs régulant l'assemblage et la dynamique de la mitose, de la cohésion des chromatides sœurs, de l'attachement bipolaire des kinétochores au fuseau mitotique et du point de contrôle du fuseau mitotique²⁹⁶. De plus, la division parfaite des chromosomes et l'intégrité génomique dépendent aussi de la coordination entre la réplication de l'ADN, les points de contrôle du cycle cellulaire et la progression en mitose. En effet, si de l'ADN non répliqué ou des structures d'ADN non résolues consécutives au stress réplicatif persistent en mitose la ségrégation des chromosomes peut être perturbée^{297,298}. Ces défauts peuvent être évités par des mécanismes mis en place par la cellule^{216,299}.

a. Les conséquences du stress réplicatif en mitose

Les mitoses multipolaires

Le stress réplicatif peut affecter le bon déroulement de la mitose en altérant la duplication des centrosomes. En effet, si les centrosomes sont redupliqués, alors l'assemblage des fuseaux mitotiques est anormal avec la formation de multiples pôles mitotiques, mettant ainsi en péril la bonne ségrégation des chromosomes et la diploïdie³⁰⁰.

Les ponts anaphasiques

Les ponts d'ADN anaphasiques représentent un lien physique entre les deux chromatides pendant la ségrégation des chromosomes en anaphase et sont détectables avec des agents intercalants classiques de l'ADN et possèdent des histones. A l'inverse, les ponts ultrafins d'ADN (Ultra Fine Bridges, UFBs) sont des ponts anaphasiques qui ne peuvent pas être marqués avec des intercalants classiques et sont dépourvus d'histones³⁰¹. La terminaison de la réplication de certaines régions peut être retardée jusqu'à la phase G2 et même jusqu'à la mitose, menant à la persistance d'ADN non répliqué dans les cellules en mitose, en particulier dans un contexte de stress réplicatif^{302,303}. Les UFBs correspondent donc à des ponts d'ADN non répliqué formés entre les deux chromatides sœurs, représentant une barrière à la ségrégation des chromosomes. Ils peuvent être visualisés par immunofluorescence avec un marquage protéique de BLM (Bloom Syndrome hélicase), de PICH (Plk1-Interacting Checkpoint Helicase) ou de RPA qui se lie spécifiquement sur ces ponts ultrafins d'ADN^{301,304,305}. Il existe différents types d'UFBs dont les plus communs sont les UFBs centromériques, les UFBs télomériques et les UFBs aux sites fragiles communs^{297,306,307}, voir Figure 30 et Table 7. Il existe aussi les UFBs au

niveau de l'ADN ribosomal (R-UFBs) et ceux induit au niveau des intermédiaires de recombinaison homologue persistants (HR-UFBs)^{298,308}. Les UFBs au niveau des sites fragiles communs peuvent être induits après des traitements par Aphidicoline (inhibiteur de la polymérase α) ou Mitomycine C (agent alkylant), inducteurs de stress rélicatif. De plus, ils sont caractérisés par la liaison de FANCD2 et FANCI aux extrémités de ces ponts^{305,306,309} (Figure 30, Table 7).

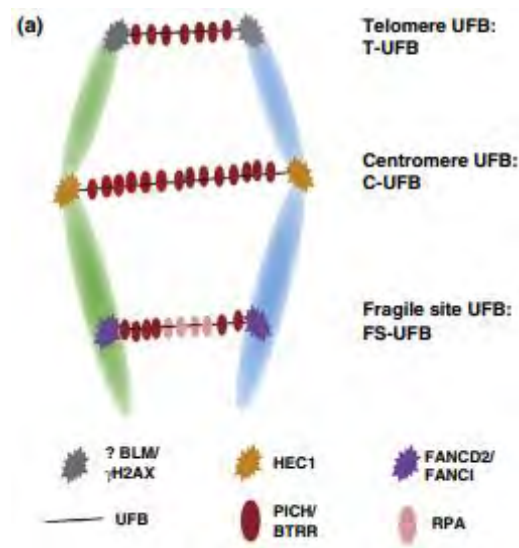


Figure 30 : Les origines et structures des trois types d'UFB connus. a) Un schéma montrant que un UFB est formé entre les deux chromatides sœurs lors de la ségrégation des chromosomes en anaphase. Les UFBs émergent de différents loci comme les UFBs télomériques (T-UFBs), les UFBs centromériques (C-UFBs) et les UFBs aux sites fragiles communs (FS-UFBs). Image extraite de Liu et al. 2014.

Centromériques	Télomériques	Sites fragiles communs
Séparation incomplète des chromatides sœurs	Défauts chromosomiques au niveau de loci télomériques	Réplication incomplète des régions d'ADN ou intermédiaires tardifs de réplication non résolus
Prévalence élevée, même en conditions non perturbées	Rarement observés en conditions non perturbées	Rarement observés en conditions non perturbées
Induits par la complexité des séquences d'ADN ou l'augmentation de la cohésion des chromatides au niveau centromérique	Induits par un défaut dans la réplication et la maintenance des télomères	Induits par du stress rélicatif

Table 7 : Les types d'UFB les plus communs et leurs caractéristiques (Fragkos et Naim. 2017).

En conditions normales, la plupart des ponts anaphasiques sont résolus. La persistance d'UFBs peut cependant induire une forme de dommages à l'ADN non résolu et/ou entraîner des cassures induites soit par stress mécanique, soit par action d'endonucléases³¹⁰. Lorsque les ponts anaphasiques et les UFBs ne sont pas résolus dans le temps et se retrouvent en excès, ils peuvent entraîner des conséquences délétères pour la stabilité du génome et l'homéostasie tissulaire²⁹⁷.

b. Résolution de l'ADN non répliqué ou des intermédiaires de réplication pendant la mitose

Réparation par les protéines de la voie l'anémie de Fanconi (FA)

Les protéines FA sont impliquées dans plusieurs mécanismes en réponse au stress réplicatif pour permettre la stabilisation, la régulation des origines de réplication, la réparation et le redémarrage des fourches de réplication notamment au niveau des sites fragiles communs. Si le stress réplicatif persiste au-delà de la phase S alors les protéines FANCD2 et FANCI persistent au niveau des CFS sur les chromosomes mitotiques^{305,309}. C'est pour cela que ce dimère protéique peut être retrouvé au niveau des UFB potentiellement pour stabiliser la structure d'ADN ou réguler la chromatine environnante et permettre la résolution de UFBs²⁹⁷.

Les endonucléases structures spécifiques et leurs rôles aux sites fragiles

XPF/MUS81 est une famille d'endonucléases ciblant spécifiquement des structures d'ADN plutôt que des séquences nucléotidiques³¹¹. MUS81 est une sous-unité catalytique d'une endonucléase régulée au cours du cycle cellulaire et sélective de structures particulières, impliquée dans la recombinaison homologe, la réparation des pontages d'ADN et le redémarrage des fourches de réplication. Les complexes enzymatiques MUS81-EME1 et XPF-ERCC1 sont nécessaires à la résolution de l'ADN non-répliqué ou des intermédiaires de réplication non résolus au niveau des CFS et persistants en mitose, et ce afin d'empêcher la formation des ponts anaphasiques³¹². Les endonucléases spécifiques sont cruciales pour limiter les conséquences du stress réplicatif non-résolu et persistant en mitose et empêcher les catastrophes mitotiques.

La synthèse d'ADN tardive

La synthèse d'ADN tardive aussi appelée synthèse d'ADN mitotique (ou MiDAS) est le dernier mécanisme de sauvetage de la cellule pour compléter la réplication de l'ADN avant la division cellulaire. Ce mécanisme découvert récemment permet de résoudre les intermédiaires de réplication tardifs et de compléter la réplication afin de poursuivre la prolifération cellulaire en condition de stress réplicatif³¹³. La MiDAS est un mécanisme de recombinaison homologe similaire au BIR (break-induced replication), un processus conservé qui utilise l'extrémité simple brin de cassures double brins pour redémarrer la réplication aux fourches bloquées ou effondrées. Seulement, à l'inverse de la HR, cette recombinaison génère des erreurs²⁹⁷. Minocherhomji et ses collègues proposent que les régions des CFS dont l'ADN n'est pas totalement dupliqué restent semi-condensées en début de mitose déclenchant ainsi la réplication d'ADN tardive, dans les cellules humaines³⁰³.

Le modèle actuel propose que Mus81 soit recruté aux sites fragiles quand la cellule entre en prophase et que son activité nucléase promeut ensuite la synthèse d'ADN via POLD3, la sous-unité non catalytique de Pol δ , au niveau des sites fragiles pour éviter la mauvaise ségrégation des chromosomes^{303,314,315} (voir Figure 31). Rad52 est un acteur clé de la MiDAS car il permet de recruter Mus81 et d'initier la recombinaison homologe³¹⁴. Rad52 n'est pas nécessaire dans une cellule normale, très dépendante alors de FANCD2. Cependant dans les cellules cancéreuses Rad52 est requis

comme régulateur secondaire avec FANCD2 pour faciliter la synthèse d'ADN mitotique³¹⁴. Ensuite, la synthèse d'ADN mitotique dépendante de POLD3 est augmentée dans les cellules cancéreuses avec un fort taux de stress répliatif et de changements chromosomiques. Ainsi, la MiDAS mise en place par la cellule pour limiter les conséquences du stress répliatif est augmentée dans les cellules les plus stressées. Bien que relativement récentes, les études sur la compréhension des mécanismes de synthèse d'ADN mitotique suscitent un intérêt thérapeutique croissant étant donné la dépendance des cellules cancéreuses pour ce mécanisme d'adaptation.

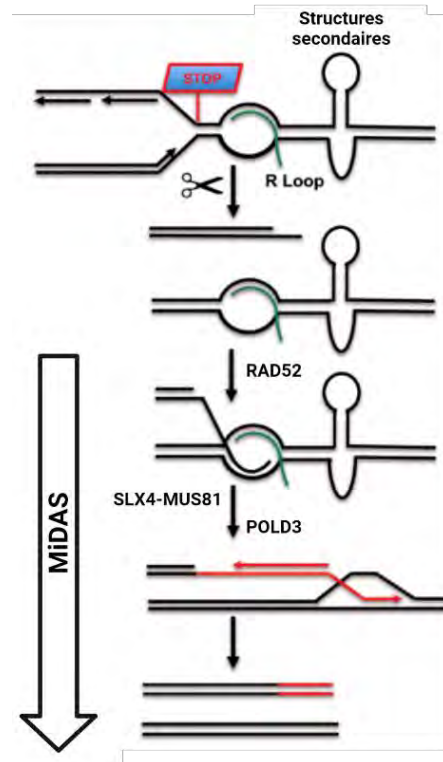


Figure 31 : Mécanisme de synthèse d'ADN en début de mitose pour compléter la répliation des régions non répliquées, conséquences d'un stress répliatif non résolu. Adapté de Bhowmick et al. 2016 et Bhowmick et Hickson. 2017.

c. Conséquences d'un échec de sauvetage du stress répliatif en mitose

L'ADN sous répliqué persistant peut finalement être résolu en mitose pour permettre une ségrégation normale des chromosomes en télophase. Cependant, dans les cas où cette résolution ne peut avoir lieu, la stabilité génomique est mise en péril (Figure 32).

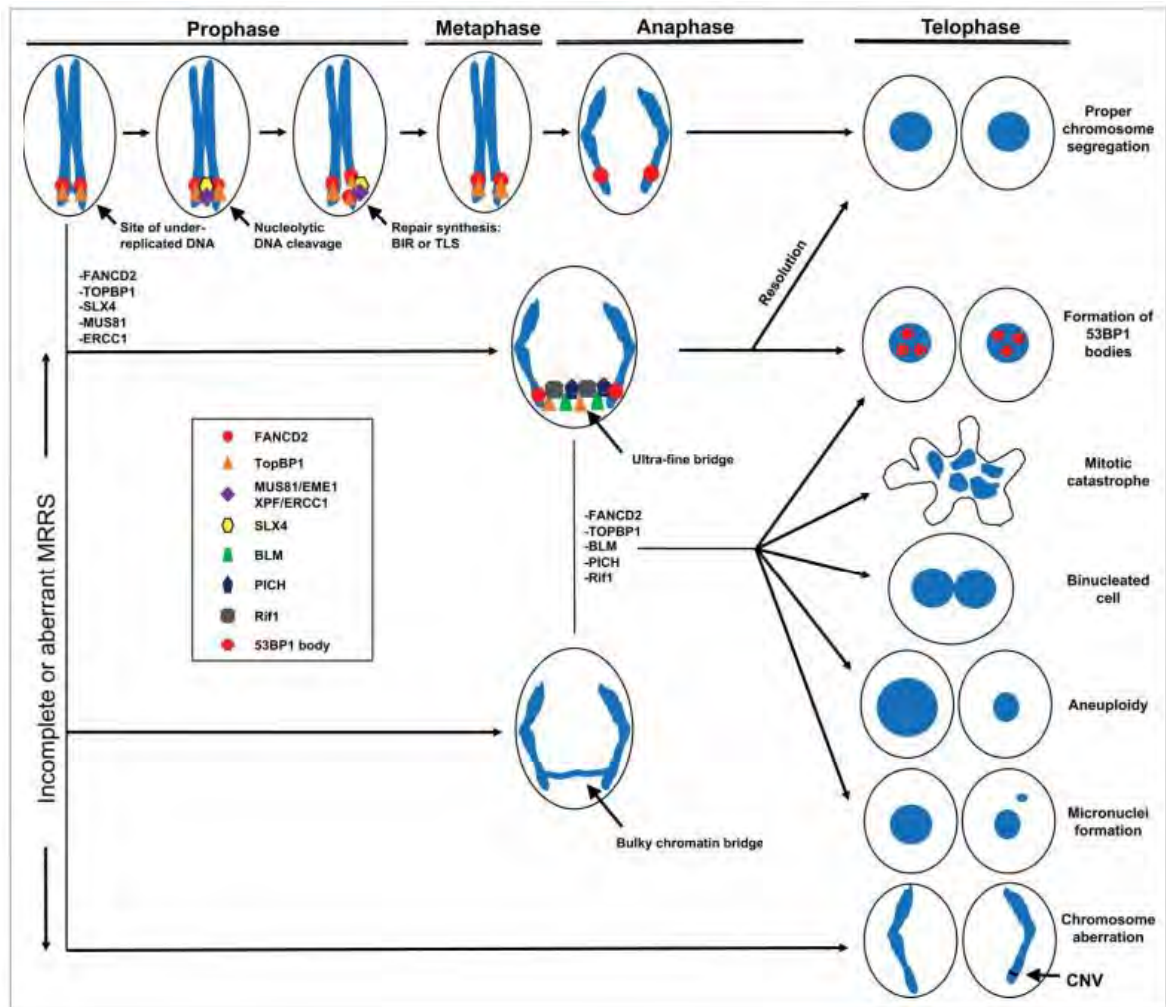


Figure 32 : Les conséquences d'un stress réplcatif non résolu en mitose : induction d'instabilité génétique dans les cellules. Image extraite de Fragkos et Naim. 2017.

Les échecs de la cytokinèse

La cytokinèse est l'étape finale de la mitose qui permet une séparation physique du cytoplasme de la cellule mère en deux cellules filles. La régulation de la cytokinèse doit être fine et coordonnée avec la ségrégation des chromosomes. Un échec de la cytokinèse peut mener à une cellule tétraploïde binucléée (4N) pouvant induire la génération de cellules aneuploïdiques et la diversité génétique^{316,317}. La duplication des centrosomes doit être synchronisée avec la réplication pour entrer en mitose avec 2 centrosomes, chacun contenant 2 centrioles³¹⁸. En effet, le stress réplcatif affecte la fidélité de la mitose et un retard dans les phases S et G2 peut mener à la duplication continue des centrosomes, majoritairement dans un contexte muté pour p53³¹⁹. Un défaut dans la cytokinèse génère la formation d'une cellule tétraploïde en G1 contenant 2 noyaux et 4 centrosomes³¹⁶ (Figure 32). En conséquent, la division cellulaire de la cellule tétraploïde génère des erreurs amplificatrices de l'hétérogénéité génétique³²⁰. Un échec dans la cytokinèse peut venir d'une mutation ou de l'expression altérée d'un facteur de régulation de la cytokinèse ou d'une obstruction physique à la scission comme la persistance de ponts anaphasiques ou d'UFB générant un retard de la scission³¹⁶. Ainsi, une coordination efficace

entre la prise en charge de l'ADN non répliqué pour sa réplication et la cytokinèse semble cruciale pour la mise en place et le bon déroulement de la scission, préservant la diploïdie^{297,316}.

Les catastrophes mitotiques

Les catastrophes mitotiques correspondent à la mort des cellules induite par un échec dans le déroulement de la mitose (Figure 32). Ces catastrophes peuvent être vues comme un éclatement de la cellule en mitose afin d'éliminer de l'organisme une cellule contenant des dommages à l'ADN persistants pour ainsi préserver l'intégrité du génome. Ce sont souvent des conséquences de non-séparation des chromosomes ou après une sur-duplication des centrosomes et donc une entrée en mitose avec de multiples pôles mitotiques. De plus, un fort stress réplcatif induit par de l'hydroxyurée (HU, inhibiteur de la RNR) ou de l'aphidicoline, engendre des catastrophes mitotiques si les cellules parviennent jusqu'en mitose. Les mécanismes moléculaires ne sont pas encore très connus mais les catastrophes mitotiques sont proposées par Vitale et collègues comme un mécanisme oncosuppresseur précédant l'apoptose, la nécrose et la sénescence, dérégulées dans les cancers³²¹.

Les micronoyaux

Le stress réplcatif non résolu en mitose peut être à l'origine de la formation de micronoyaux. Ce sont de petites masses de chromatines constituées de fragments chromosomiques ou des chromosomes retardés qui n'ont pas été capables de ségréger correctement et qui ont été enfermés dans un compartiment nucléaire à la fin de la mitose, voir Figure 32³²². La réplication de ces micronoyaux pendant la phase S suivante risque d'être compromise, engendrant un large panel d'altérations génomiques. L'une d'entre elles est la chromothripsie, un processus durant lequel des centaines de réarrangements sont acquis au sein d'un seul évènement catastrophique³²³⁻³²⁵. En effet, la membrane nucléaire entourant le micronoyau est fragile et lorsque le chromosome contenu dans le micronoyau entre en contact avec le cytoplasme il explose. Les fragments produits sont ensuite aléatoirement réassemblés favorisant ainsi les réarrangements génomiques^{316,323-325}. Le micronoyau peut fusionner avec le noyau et ainsi créer des anomalies chromosomiques induisant de l'instabilité chromosomique irréversible telles que des duplications, des amplifications, des inversions et des translocations de chromosomes, générant des variations du nombre de copies (CNV)^{297,322}. La formation de micronoyaux est facilement visualisable avec un intercalant de l'ADN et sert de marqueur robuste de l'instabilité génomique³²⁶. Une large portion des micronoyaux sont positifs pour γ -H2AX, marqueur des cassures double-brins de l'ADN. Ces micronoyaux sont induits par des traitements connus pour induire du stress réplcatif. Les auteurs de ces travaux proposent une catégorie de micronoyaux positifs pour γ -H2AX et probablement issus du stress réplcatif du cycle cellulaire précédant. Ainsi, il serait possible de discerner les micronoyaux issus du stress réplcatif et ceux issus de défauts mitotiques³²⁶.

Les corps 53BP1

Le stress réplcatif induit des lésions chromosomiques qui peuvent être transmises aux cellules filles si non résolues pendant les phases du cycle cellulaire de la cellule mère. Pendant la phase G1 des cellules filles, les lésions sont séquestrées dans des compartiments nucléaires marqués par 53BP1 et d'autres

protéines associées à la chromatine impliquées dans la stabilité du génome (Figure 32). Ces corps nucléaires 53BP1 pourraient représenter un bouclier protecteur des régions chromosomiques fragiles séquestrées pour éviter leur dégradation, permettant ainsi leur réparation au cours du cycle cellulaire des cellules filles³²⁷. De plus, les corps 53BP1 en G1 contiennent de l'ADN simple brin marqué par RPA et sont augmentés en réponse à l'aphidicoline, prouvant que la formation de ces corps est bien une conséquence d'une sous-réplication de l'ADN non résolue au cycle cellulaire précédant et que ces corps sont enrichis au niveau des sites fragiles communs en conséquence d'un stress réplicatif^{328,329}.

L'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique (CIN)

L'instabilité chromosomique peut être numérique avec un défaut de gain ou de perte de chromosome entier, ou structurale avec seulement des segments chromosomiques concernés par les gains et pertes, voir Figure 33. De façon plus générale l'aneuploïdie est définie par un nombre anormal de chromosomes. L'origine de l'instabilité chromosomique numérique (CIN) est présumée mitotique et l'origine de CIN structurale est plutôt présumée pré-mitotique vu que les aberrations structurales sont majoritairement issues de défauts de processus cellulaires tels que la réplication et la réparation²⁹⁸.

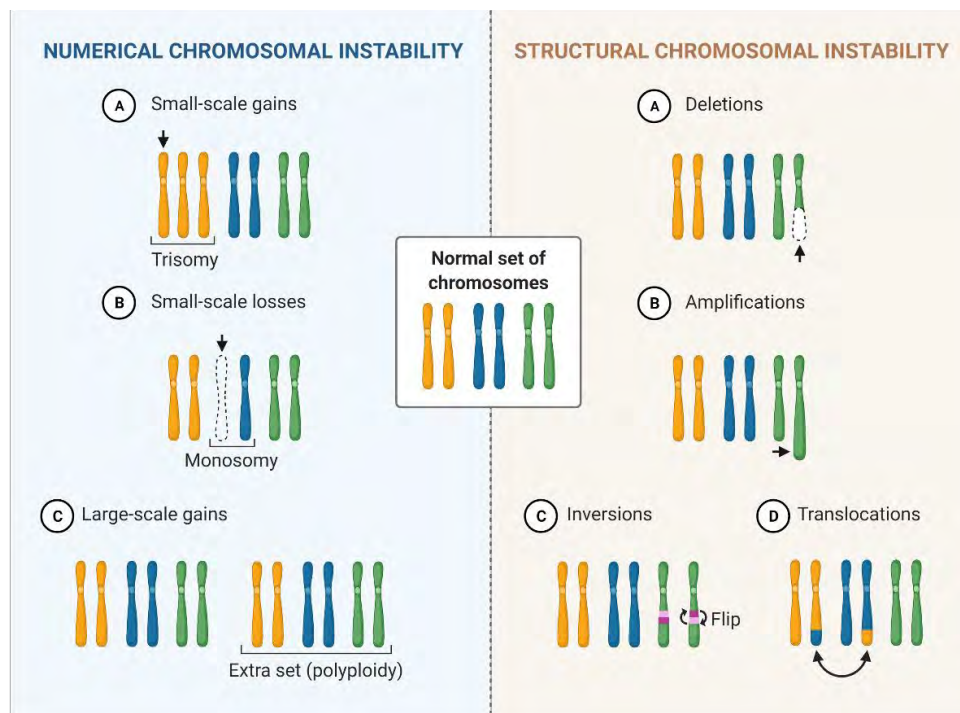


Figure 33 : Instabilité chromosomique (CIN) numérique et structurale. Le schéma montre des gains et pertes de chromosomes entiers (CIN numérique) et des gains, des pertes, des inversions et des translocations chromosomiques (CIN structurale). Image extraite de BioRender.

Le gain ou la perte d'un chromosome entier correspond au gain ou à la perte de milliers de copies géniques mettant en péril l'intégrité de la cellule³³⁰. Un stress réplicatif non résolu peut induire des erreurs de ségrégation des chromosomes menant à de l'instabilité chromosomique CIN ou à de

l'aneuploïdie si un chromosome entier est gagné ou perdu³³¹. Les cellules trisomiques et tétrasomiques sont enrichies en dommages à l'ADN et sont plus sensibles au stress réplicatif³³². Enfin, il a été montré que l'instabilité génomique induite par l'aneuploïdie peut s'expliquer par la diminution de l'expression de l'hélicase réplicative MCM2-7. De façon intéressante, restaurer les niveaux des MCM diminue partiellement le phénotype d'instabilité génomique³³². Ces résultats mettent en avant le lien entre la réplication de l'ADN et l'instabilité génomique. Ensuite, l'instabilité chromosomique induite par du stress réplicatif conduit à des stress associés à l'aneuploïdie tels que des stress métaboliques, oxydatifs ou encore l'altération du niveau des facteurs de réplication. Ces stress associés induisent à leur tour du stress réplicatif pendant la phase S suivante, nourrissant ainsi un cercle vicieux^{298,333}. Ces informations suggèrent que l'aneuploïdie peut renforcer l'instabilité génomique des cellules³³⁰. Pour stopper ce cercle, l'instabilité génomique accumulée doit activer des voies d'élimination telles que l'apoptose, la sénescence ou une réponse immunitaire spécifique, souvent altérées dans les cancers²⁹⁸. Les conséquences de l'aneuploïdie dans une cellule normale dépendent de plusieurs paramètres tels que le type cellulaire, de la région chromosomique concernée, ou du microenvironnement cellulaire. Ces paramètres sont importants pour déterminer si l'aneuploïdie représente un bénéfice ou un désavantage prolifératif pour la cellule. L'instabilité chromosomique peut aussi modifier le nombre de copies (CNV), souvent retrouvés dans les régions CFS et associés à des pathologies comme le cancer.

Conclusion : échec de la fidélité mitotique

Le stress réplicatif dans des cellules normales favorise la formation de fuseaux mitotiques multipolaires à l'origine de chromosomes retardés et de micronoyaux, voir Figure 32. La dissociation prématurée des centrioles est dépendante l'activité de CDK, Plk1 et ATR en G2, montrant l'implication du point de contrôle des dommages à l'ADN dans la dérégulation du cycle des centrosomes. Wilhelm et collègues suggèrent qu'un faible taux de stress réplicatif est la menace la plus importante pour l'intégrité génomique, étant donné que le point de contrôle de mitose soit ne le détecte pas (pas d'induction de catastrophe chromosomique), soit est outrepassé menant à une sortie de mitose accompagnée d'aberrations chromosomiques de nombre et de structures^{298,299,334}. En conclusion, le stress réplicatif non résolu favorise un génome désorganisé et instable par la perte d'informations génétiques, des mutations, des altérations du nombre de copies et des réarrangements chromosomiques participant au développement de pathologies²¹¹, Figure 34.

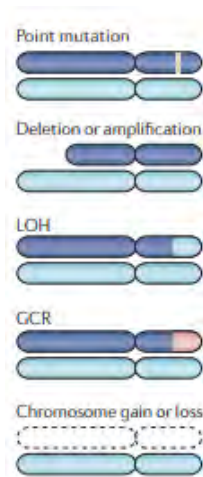


Figure 34 : L'instabilité génomique résultante du stress réplicatif. L'instabilité génétique peut être visualisée par un niveau élevé de mutations ponctuelles, des délétions et amplifications de segments chromosomiques, la perte d'hétérozygotie (LOH), des réarrangements chromosomiques grossiers (GCR) et des gains et pertes de chromosomes entiers. Image extraite de Gaillard et al. 2015.

2.1. Les pathologies liées au stress réplicatif

a. Généralités

Le stress réplicatif peut induire des dommages à l'ADN et des mutations qui vont fatalement, dans certains contextes, être à l'origine de maladies chez l'homme²³⁰. Les pathologies associées à un défaut dans la signalisation du stress réplicatif sont très nombreuses et hétérogènes. Elles sont souvent associées à des retards de développement (microcéphalie), à des retards mentaux, au vieillissement prématuré, à l'ataxie, à des malformations et la prédisposition aux cancers. C'est le cas par exemple du syndrome de Seckel (mutation d'ATR)³³⁵ et du syndrome de Bloom (perte de l'hélicase BLM)³³⁶. La pathologie associée au stress réplicatif la plus commune chez l'homme étant le cancer (Figure 35).

Gene	Disease
<i>ATAD5</i>	Ovarian cancer
<i>ATR</i>	Cutaneous telangiectasia and cancer syndrome, familial, Seckel syndrome
<i>BRCA1/FANCS</i>	Familial breast-ovarian cancer susceptibility, Fanconi anemia (complementation Group S) and prostate cancer
<i>BRCA2/FANCD1</i>	Familial breast-ovarian cancer, Fanconi anemia (complementation group D1), Wilms tumour and other cancers
<i>DNA2</i>	Seckel syndrome and progressive external ophthalmoplegia
<i>HUWE1</i>	X-linked syndromic mental retardation turner type and colon cancer
<i>PRIMPOL/CCDC111</i>	Myopia
<i>RAD51/FANCR</i>	Fanconi anemia, complementation group R, mirror movements and breast cancer
<i>REV3</i>	Möbius syndrome
<i>REV7/MAD2L2/FANCV</i>	Fanconi anemia
<i>SMARCAL1</i>	Schimke immunosseous dysplasia
<i>SPRTN</i>	Ruijs-Aalf syndrome, hepatocellular carcinoma
<i>POLH</i>	Xeroderma Pigmentosum Variant
<i>UBE2A/RAD6A</i>	X-linked syndromic mental retardation, Nascimento type
<i>UBE2B/RAD6B</i>	Male infertility
<i>WRN</i>	Werner syndrome

Figure 35 : Les défauts génétiques des gènes de la DDR et leur association aux pathologies humaines. Table extraite de Pilzecker et al. 2018.

La mutation hypomorphe d'ATR (ATR fonctionnel mais moins exprimé ou moins actif) cause le syndrome de Seckel, un désordre autosomale récessif caractérisé par de sévères défauts de développement. Dans des modèles murins, la perte totale d'ATR est létale chez les souris à l'état embryonnaire, montrant l'importance d'ATR au cours du développement^{255,337}. L'anémie de Fanconi (FA) est une maladie génétique humaine rare causée par des mutations dans un des gènes FA et caractérisée par un vieillissement précoce, une dysmorphie faciale, des anomalies hématologiques (anémie macrocytaire, aplasies, myélodysplasies, leucémies aiguë myéloblastiques), une prédisposition élevée aux cancers et avec des changements cytogénétiques complexes^{338,339} (<https://www.orphanet.net>). Mieux comprendre les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN de ces pathologies pourrait aider à trouver de nouvelles solutions thérapeutiques plus adaptées afin d'améliorer la survie et les conditions de vie des patients.

b. Le Syndrome de Bloom

La pathologie

Le syndrome de Bloom (BS) est une maladie héréditaire rare, autosomale et récessive, et caractérisée par un important désordre génétique. Cette pathologie est associée à divers symptômes comme un retard de croissance, une déficience immunitaire, un risque élevé de diabète et d'infertilité et une prédisposition accrue à divers cancers^{336,340}. Le diagnostic clinique peut être confirmé par l'identification d'une mutation bi-allélique de BLM après séquençage. Une analyse cytogénétique (analyse des chromosomes de l'individu) permet d'identifier une augmentation du nombre d'échanges entre chromatides sœurs (SCE) caractéristique de la pathologie (environ 10 fois supérieure à la normale)³⁴⁰⁻³⁴². Les complications les plus sévères pour les patients sont le développement de maladies pulmonaires chroniques, de myélodysplasie, de diabète et de cancers, avec un âge moyen au moment du diagnostic de 25 ans. Les cancers les plus fréquents sont les carcinomes (peau, colon et sein étant les majoritaires), le lymphome Non-Hodgkinien et la leucémie aiguë. Dans presque un tiers des cas, les patients développent plusieurs tumeurs primaires issues de différents cancers, une conséquence dramatique du syndrome de Bloom³⁴⁰⁻³⁴². Pour toutes ces raisons, l'espérance de vie des patients atteints de cette pathologie ne dépasse pas les 50ans (www.orpha.net, 2014).

Mutation BLM et instabilité génétique

Le gène BLM code pour une hélicase de l'ADN de la famille des hélicases RecQ²⁸¹. Les hélicases utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour dérouler les duplexes d'ADN. Comme les autres membres de la famille des RecQ hélicases, BLM déroulent des structures particulières de l'ADN telles que les G4, les boucles d'ADN et les jonctions Holliday²⁸¹. BLM possède aussi des domaines d'interaction avec diverses protéines importantes pour la réplication de l'ADN et la signalisation des dommages telles que RPA, TOP1, ATM ou encore RAD51³⁴³. Ainsi, le gène BLM joue plusieurs rôles : stabilisation et réversion des fourches de réplication, réparation des cassures de l'ADN et synthèse d'ADN mitotique dans le but de protéger l'intégrité du génome^{281,341}. Les mutations du gène BLM causent une diminution drastique du niveau d'ARNm de BLM et une terminaison de traduction prémature. La mutation BLM^{Ash} est la plus

récurrente, elle aboutit à une protéine tronquée non fonctionnelle qui entraîne plusieurs conséquences moléculaires pour les cellules³⁴¹, voir Figure 36.

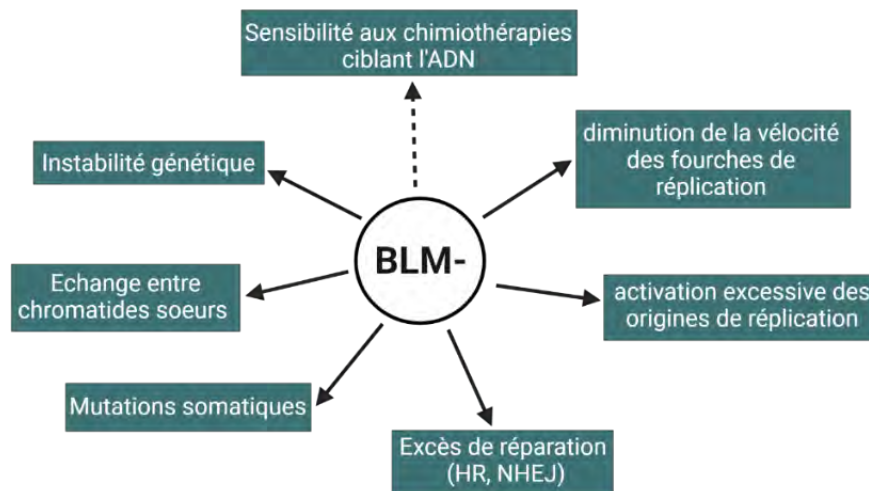


Figure 36 : Les conséquences d'une mutation BLM dans les cellules BS.

En effet, les cellules de Bloom (BS) sont caractérisées par un fort stress réplicatif à l'origine de l'augmentation des sites de dommage à l'ADN^{344,345}. De plus, les cellules de patients atteints du syndrome de Bloom présentent un nombre élevé de cassures de chromatides, de réarrangements structurels chromosomiques, de ponts anaphasiques, des défauts de ségrégation chromosomique et un niveau accru de mutations somatiques^{340,346}. Ces mutations somatiques sont responsables de l'augmentation du risque de cancers précoces, notamment du cancer colorectal^{341,343,347}.

Perte de l'expression de CDA et instabilité génétique dans les cellules BS

L'équipe de Mounira Amor-Guéret a mis en évidence la sous-expression du gène CDA dans les cellules BS^{228,348}. L'expression de CDA est restaurée dans le modèle des cellules BS par réintroduction de l'expression de BLM (BS-BLM) à l'aide d'un vecteur viral. La CDA est impliquée dans le maintien du pool de pyrimidine nécessaire à la synthèse d'ADN et d'ARN. Or, dans les cellules BS, le pool de pyrimidines est retrouvé déséquilibré avec le double de la concentration en dCTP comparé aux cellules BS exprimant BLM. Au contraire, Le pool de purines, lui, n'est pas retrouvé altéré dans ces cellules. En conclusion, la perte d'expression de CDA dans les cellules BS, altère le pool de pyrimidines en créant un excès de cytidine, substrat de la CDA. Le pool de dCTP est restauré après expression stable du gène de la CDA dans les cellules BS²²⁸.

De façon intéressante, l'expression stable de la CDA dans les cellules BS (BS-CDA) induit la diminution de la fréquence des échanges entre chromatides sœurs (SCE) et augmente la vitesse des fourches de réplication dans les cellules BS. L'extinction de la CDA (par ARN interférant) dans les cellules BS-BLM, réexprimant BLM et la CDA, induit l'effet inverse accompagné de défauts de réplication et de la voie de réponse au stress réplicatif^{228,349}. D'après le groupe de Mounira Amor-Guéret, l'accumulation intracellulaire de dCTP (induit par la perte de CDA) inhibe l'activité de PARP-1, entraînant une entrée

en mitose avec un ADN non répliqué et donc la formation d'UFB au niveau des sites difficiles à répliquer. L'augmentation de l'activité de PARP-1 dans les cellules déficientes pour la CDA suffit à restaurer l'intégrité de la réplication et la ségrégation normale des chromosomes³⁴⁹. De plus, la diminution de l'activité de PARP-1 empêche l'activation optimale de Chk1 en phase S, expliquant que la cellule s'échappe de phase S avec un ADN non-répliqué³⁵⁰ (Figure 37). L'équipe de Mounira Amor-Guéret propose l'hypothèse d'une voie commune d'action CDA/PARP-1/ATR/Chk1 afin d'empêcher l'accumulation d'ADN sous répliqué en mitose^{349,350}.

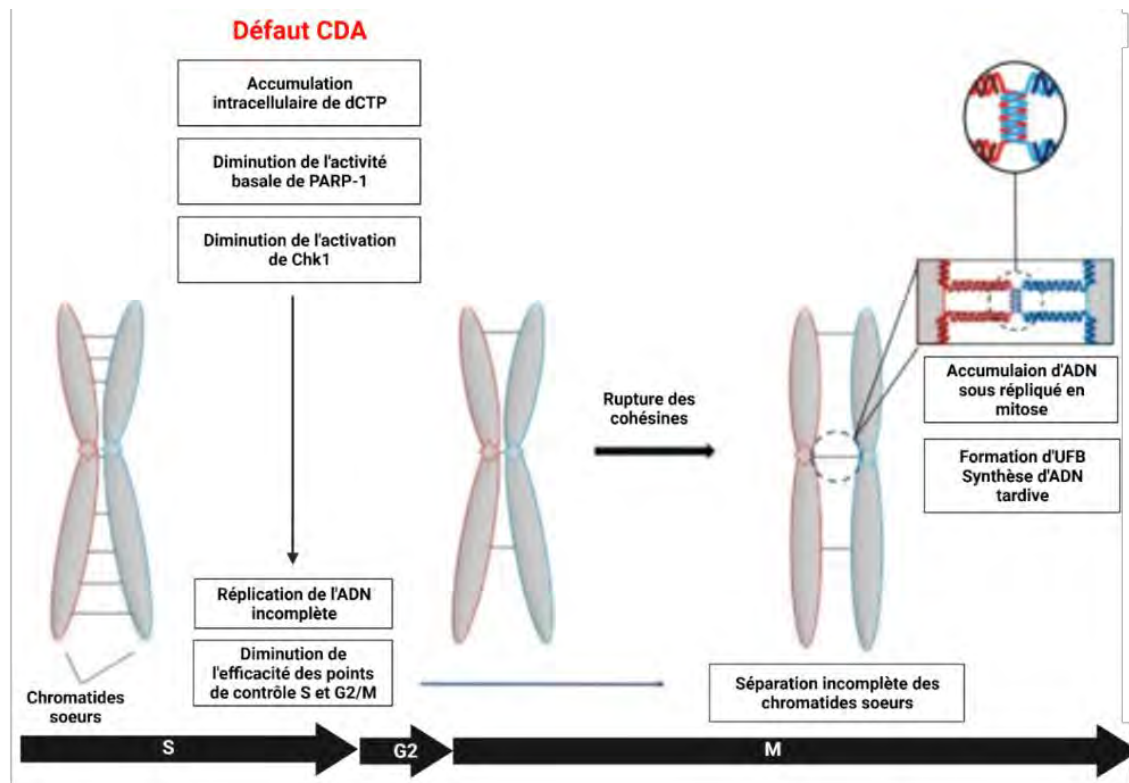


Figure 37 : Conséquences d'une perte de l'expression de CDA sur le pool de dCTP, la réplication de l'ADN et l'instabilité génétique dans les cellules BS. Image adaptée de Gemble et al. 2017.

c. Le cancer

1) Le stress réplcatif induit par un oncogène

Un oncogène est un gène qui, lorsque muté, contribue à l'initiation, au développement ou à la progression du cancer. L'activation d'un oncogène dérègle les processus cellulaires de réplication et de transcription de l'ADN dans le but d'augmenter la croissance cellulaire. MYC par exemple régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire et la progression du cycle cellulaire et est retrouvé surexprimé et oncogénique dans de nombreux cancers où ses fonctions sont exacerbées³⁵¹. L'activation oncogénique active constitutivement les voies de prolifération cellulaire et de survie et représente une source importante de stress réplcatif dont les différents mécanismes sont présentés Figure 38 ci-dessous^{352,353}.

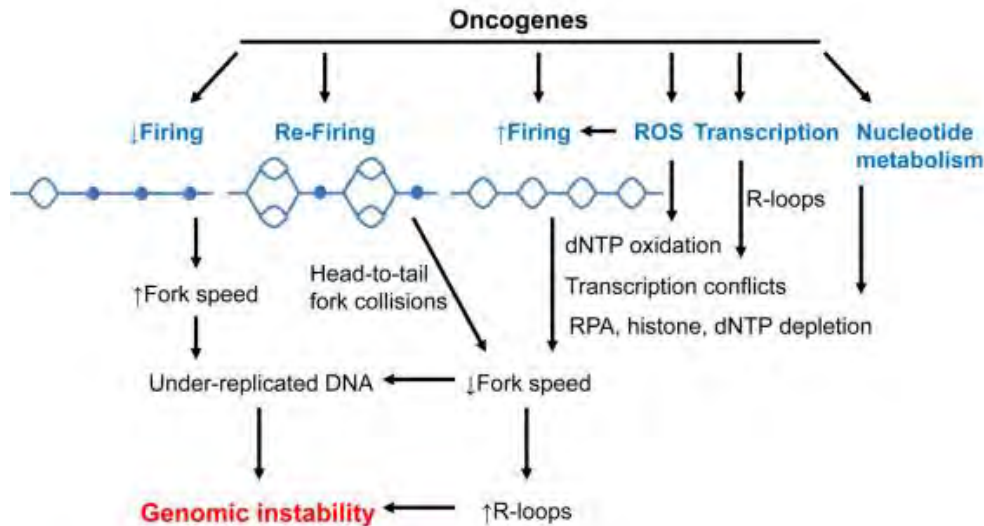


Figure 38 : Schéma des mécanismes de stress réplcatif induit par l'activation d'un oncogène conduisant à de l'ADN non répliqué et de l'instabilité génomique. Image extraite de Kotsantis et al. 2018.

Lors d'une activation oncogénique, le stress réplcatif est induit soit via une altération de l'initiation et de l'activation des origines de réplication, une déplétion du pool de nucléotides, des collisions entre les machineries de réplication et de transcription ou encore par des structures inhabituelles de l'ADN^{352,353}. La surexpression de c-MYC par exemple, induit une altération de l'organisation spatio-temporelle de l'initiation de la réplication et augmente la densité des origines répliquées précocement, provoquant l'arrêt et l'effondrement des fourches de réplication³⁵⁴.

Ensuite, l'activation constitutive d'un oncogène induit du stress réplcatif via l'augmentation globale de la transcription qui provoque des conflits entre les machineries de transcription et de réplication. En effet, l'oncogène HRASV12 par exemple augmente la prolifération cellulaire via TBP (TATA-box binding protein) qui stimule la transcription et favorise la formation de R-loops (hybrides ADN : ARN). Si ces derniers ne sont pas résolus, ils encombrant la progression des fourches de réplication et induisent des dommages à l'ADN. De plus, il a été montré que dans le cas où la Cycline E est surexprimée, les dommages à l'ADN sont partiellement supprimés par un inhibiteur de l'élongation de la transcription (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole)³⁵⁵. Par la suite, la surexpression d'oncogènes tels que Cycline E, RAS et c-MYC augmente l'activation d'origines dormantes dans des régions contenant des gènes longs transcriptionnellement actifs en phase S. De ce fait, les risques de collisions entre les machineries et l'effondrement des fourches sont augmentés^{215,242,355}. Par conséquent, les collisions entre les deux machineries sont un promoteur de stress-réplcatif induit par l'activation oncogénique^{249,356-358}.

La biosynthèse des nucléotides doit être finement régulée pour assurer un apport suffisant tout au long du processus de réplication de l'ADN. Un oncogène actif peut interférer directement avec la production des nucléotides pour causer une déplétion du pool et une terminaison prématurée des fourches de réplication³⁵⁷ (Figure 38 E). Certains oncogènes sont capables d'induire une prolifération

cellulaire accrue avec une expansion du pool de nucléotides²²⁷. C'est le cas de c-MYC qui induit l'expression de gènes du métabolisme dont la thymidylate synthétase (TS) afin d'augmenter le pool de dNTPs, diminuer les dommages à l'ADN induits par l'oncogène et accélérer la prolifération cellulaire³⁵⁹. A l'opposé la surexpression de la cycline E augmente la prolifération cellulaire sans impacter la biosynthèse des nucléotides et mène à une déplétion du pool de nucléotides par épuisement. De façon intéressante, l'ajout exogène de dNTPs suffit à supprimer le stress répliatif et les dommages à l'ADN et diminue dramatiquement la transformation induite par l'oncogène²²⁷. Bestor et ses collègues suggèrent un modèle précoce d'oncogenèse dans lequel une mauvaise coordination de la régulation des facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire mène à un niveau de désoxynucléotides insuffisants pour supporter la réplication normale et la stabilité du génome²²⁷. En conclusion, la surexpression d'un oncogène dérégule l'activation des origines, déplete le pool de nucléotides (de façon directe ou indirecte) et augmente les collisions transcription/réplication.

2) La réponse aux dommages à l'ADN : une barrière anticancer

Le modèle de la barrière anticancer

La formation continue de cassures double-brins de l'ADN (DSBs) causées par le stress répliatif induit par l'oncogène peut contribuer au développement d'instabilité génétique caractéristique de nombreux cancers chez l'homme. Dans les lésions pré-cancéreuses, ces DSBs activent la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) pour induire l'activation des points de contrôle cellulaires et la réparation, l'apoptose ou la sénescence^{352,360}. Il semble que seules les cellules dont le stress répliatif et les dommages à l'ADN dépassent un certain seuil activent la sénescence cellulaire et les voies de mort induites par la mise en place de la DDR³⁶¹⁻³⁶⁴. Dans les lésions pré-cancéreuses humaines, les marqueurs de sénescence co-ségrègent avec les dommages à l'ADN. Cela suggère que dans ces lésions, la sénescence est une conséquence du stress répliatif induit par l'oncogène, formant une barrière contre la progression du cancer, cruciale pour préserver l'intégrité génomique^{352,360,362}. Enfin, l'inactivation expérimentale de la DDR supprime la sénescence et soutient la transformation cellulaire.

Outrepasser la barrière anticancer

La barrière anticancéreuse formée par la sénescence et l'apoptose est outrepassée par plusieurs mécanismes. Ces mécanismes incluent des mutations qui perturbent la réponse aux dommages à l'ADN et permettent le développement du cancer par pression de sélection (Figure 39).

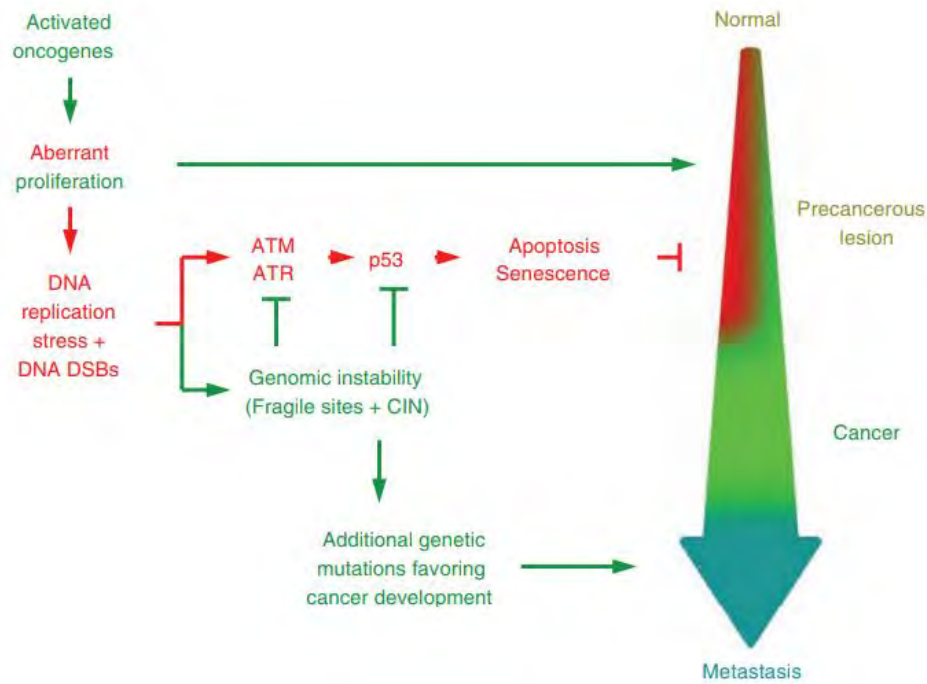


Figure 39 : Un modèle des dommages à l'ADN induits par l'activation d'un oncogène dans le développement et la progression du cancer. Image extraite de Halazonetis et al. 2008.

Une déficience de la DDR est associée avec une dérégulation des point de contrôles cellulaires, l'accumulation de dommages à l'ADN, l'instabilité génomique et la susceptibilité aux cancers³⁵². La mutation la plus fréquemment retrouvée dans le cancer est celle de TP53, crucial dans la réponse aux dommages à l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. La progression vers le développement du cancer est associée à l'inactivation de p53 et une diminution de l'apoptose. En conséquent, dès les stades précoces le cancer est associé au stress répliatif de l'ADN qui mène finalement à la formation de DSB et d'instabilité génomique³⁶³. De plus, les personnes porteuses d'un défaut de la DDR (mutation héréditaire ATM, BRCA) pourraient développer une malignité due à l'altération de la barrière anticancer. Ensuite, il a été montré que la déficience d'ATR induit des échanges entre chromatides sœurs, des cassures chromosomiques et une inhibition de la croissance des cellules oncogéniques. La perte d'ATR crée donc une létalité synthétique avec l'activation des voies oncogéniques, ce qui explique l'intérêt d'ATR comme cible thérapeutique dans le contexte du cancer^{365,366}. Par conséquent, les cellules pré-tumorales peuvent contourner la barrière de réponse aux dommages à l'ADN via l'inactivation de gènes impliqués dans la DDR et la surexpression de facteurs cellulaires tels que CDK1 et CDK2, leur conférant un avantage prolifératif pour le développement tumoral³⁶⁷, voir Figure 39. Le stress répliatif et les dommages induits par l'oncogène peuvent expliquer deux caractéristiques particulières du cancer, la première étant l'instabilité génomique et la seconde la forte prévalence des mutations TP53³⁶⁰. Les études sur le stress répliatif dans le cancer sont de plus en plus nombreuses et permettent de prendre du recul quant à la complexité des voies de réponse au stress répliatif. L'application de ces connaissances pourrait permettre de développer de nouvelles thérapies dans le but d'exploiter la balance entre le niveau de stress répliatif et le développement du cancer²¹¹.

3) Instabilité génétique et cancers

Les mécanismes principaux d'induction d'instabilité génomique dans le cancer sont un stress réplicatif accru, un défaut dans la réparation de l'ADN et un dysfonctionnement télomériques³⁵³. L'instabilité chromosomique est caractéristique de la plupart des cancers chez l'homme et à l'origine de l'hétérogénéité intratumorale³⁶⁸⁻³⁷⁰. En effet, une majorité des cancers sont aneuploïdes (80% des tumeurs solides) et chromosomiquement instables avec des gains et pertes de chromosomes à chaque division cellulaire^{316,371} (NCI cancer genome anatomy project). Dans les données du TCGA (The Cancer Genome Atlas), l'aneuploïdie des tumeurs est associée aux mutations p53, au taux de mutations somatiques et à l'expression de gènes de prolifération³⁷². L'instabilité chromosomique est requise pour l'initiation des erreurs dans un premier temps, puis pour la tolérance des altérations génomiques résultantes dans les cellules filles dans un second temps^{373,374}. Shoshani et al ont proposé les évènements de comme un mécanisme précoce accélérateur de l'amplification génomique de l'ADN dans le but d'acquérir rapidement une tolérance aux conditions stressantes de croissance³⁷⁵. De plus, les évènements de chromothripsie sont omniprésents dans les cancers avec une fréquence dépassant les 50% dans plusieurs types de cancer incluant notamment le sarcome (100%), le mélanome et les cancer du poumon, du sein, du pancréas et des ovaires (voir Figure 40).

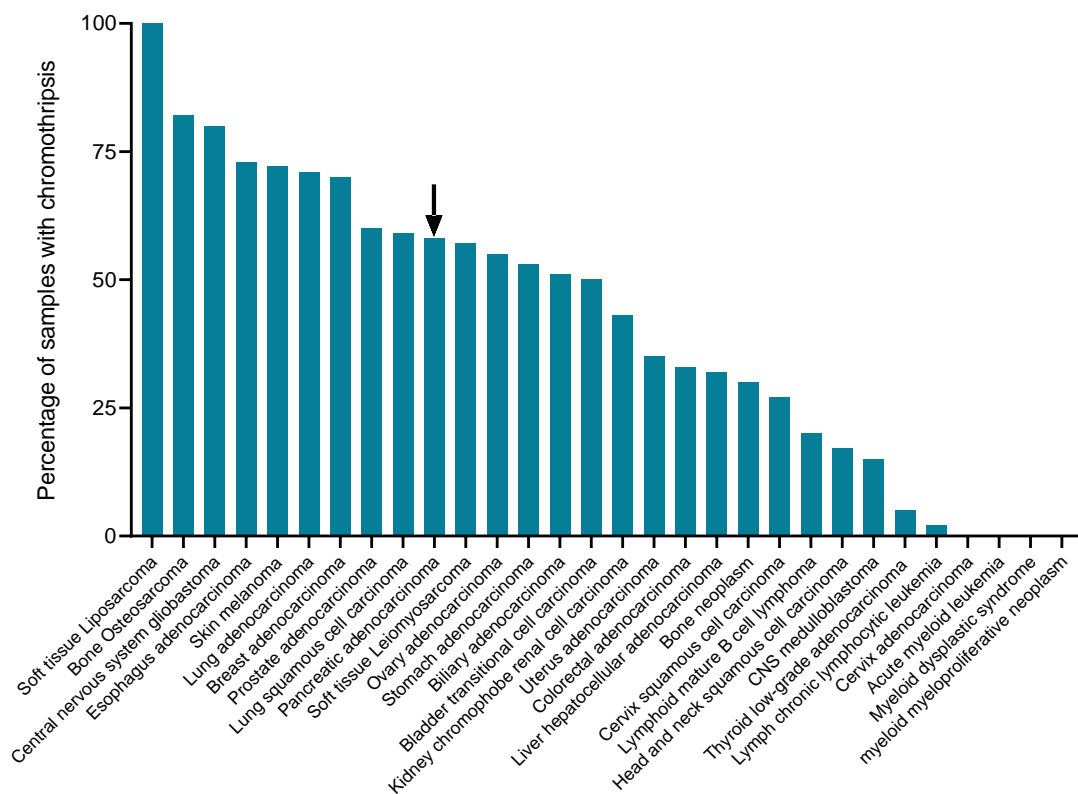


Figure 40 : Vue d'ensemble du pourcentage de cancers avec de la chromothripsie, parmi 30 types de cancer. La flèche noire pointe l'adénocarcinome pancréatique. Image adaptée de Cortés-Ciriano et al. 2020.

La chromothripsie participe à l'amplification d'oncogènes et l'inactivation d'autres gènes tels que ceux impliqués dans la réparation de l'ADN. L'instabilité chromosomique et l'aneuploïdie sont toutes deux

associées à un plus faible pronostic pour les patients, la multirésistance aux molécules thérapeutiques et l'agressivité de la maladie^{368,370,376}. Cela s'explique notamment par le fait que les cellules tétraploïdes sont plus résistantes aux agents thérapeutiques que la population parentale diploïde^{374,376}. Cette relation montre l'importance de caractériser le statut CIN des tumeurs en clinique et de classer les tumeurs selon les niveaux de CIN pour faciliter l'évaluation clinique des risques^{368,376}. En conclusion, comprendre les causes de la tolérance au CIN pourrait avoir une importance thérapeutique pour limiter la diversité, l'évolution et l'adaptation de la tumeur³⁷⁴. Cependant, l'exploitation clinique de CIN est limitée par nos connaissances insuffisantes des mécanismes inducteurs de CIN, pour cela d'autres études sont requises³⁶⁸.

3. Les connaissances sur le stress réplicatif et l'instabilité génétique dans le PDAC

3.1. L'instabilité génétique pendant l'oncogenèse pancréatique

Les pancréatites chroniques prédisposent à la formation d'un cancer du pancréas. Cependant, les mécanismes moléculaires de développement du cancer ne sont pas encore clairement définis. Les mutations de TP53 et CDKN2A et l'instabilité chromosomique existent dans les lésions précoces et sont amplifiées de façon clonale. En effet, l'aneuploïdie évolue depuis les stades précoces PanIN-1A jusqu'au développement du cancer chez les patients³⁷⁷, voir Figure 41. De plus, en comparaison avec le tissu normal des patients, la longueur des télomères est diminuée de façon progressive dans les stades PanIN-1, 2 et 3 et le cancer (Figure 41). Cette diminution s'accompagne de mitoses atypiques et de ponts anaphasiques, caractéristiques morphologiques de l'instabilité génétique³⁷⁸. Ces informations révèlent que la diminution de la longueur des télomères et l'instabilité chromosomique apparaissent à des stades précoces de l'oncogenèse pancréatique et progresse au cours du développement des lésions précancéreuses. Ces marqueurs pourraient avoir une valeur clinique dans le diagnostic précoce et correct du PDAC, mais semble difficilement réalisable^{377,378}.



Figure 41 : Aneuploïdie et longueur des télomères dans l'oncogenèse pancréatique. PDAC : adénocarcinome pancréatique canalaire, PanIn : lésion pré-néoplasique pancréatique.

Dans un modèle murin, le ciblage concomitant de TP53 et K-RAS^{G12D} dans le pancréas mène au développement d'un carcinome invasif et métastatique ressemblant à la pathologie humaine, sans induire de mutation dans un autre gène suppresseur de tumeurs. Les tumeurs primaires et les métastases induites présentent un degré élevé d'instabilité génomique manifestée par des translocations non réciproques, des amplifications de centrosomes, des ponts anaphasiques et des

mitoses anormales³⁷⁹. Cependant, des études moléculaires supplémentaires sont requises car trop peu est connu sur l'origine de l'instabilité génétique pendant l'oncogénèse pancréatique.

3.2. Anomalies chromosomiques dans le PDAC

Le caryotype anormal des tumeurs pancréatiques est révélé pour la première fois en 1995. Un tiers des carcinomes pancréatiques ont l'intégralité de leurs chromosomes impliquée dans un phénomène de gain, de perte ou de gain et de perte du chromosome entier³⁸⁰. De plus, 60-65% des cancers du pancréas ont au moins un évènement de chromothripsie (voir Figure 40). Ces évènements impactent notamment les chromosomes 18 et 12 menant à une perte du gène suppresseur de tumeur SMAD4 et une amplification focale de la région contenant le gène K-RAS, respectivement⁵³. La chromothripsie est à l'origine d'amplification génique et de la polypléïde des tumeurs^{53,380,381}. En effet, 45% des tumeurs pancréatiques étudiées ont un changement dans le nombre de copie compatible avec une polypléïdie et toutes les métastases sont polypléïdes⁵³. En conséquence, la duplication du génome entier est très fréquemment retrouvée dans le PDAC et associé à une plus faible survie des patients^{53,382}. Ce phénomène est plus fréquent dans les métastases que dans les tumeurs primaires. En conclusion, les tumeurs pancréatiques possèdent un niveau élevé d'anomalies chromosomiques qui évolue au cours de l'oncogénèse. Ces évènements chromosomiques particuliers peuvent participer à l'augmentation de l'hétérogénéité intratumorale et de la diversité du génome³².

Les tumeurs pancréatiques possèdent un nombre important de réarrangements génomiques tels que les délétions, duplications, inversions ou translocations. Il existe une grande hétérogénéité inter-patient avec des différences entre le nombre et les types de réarrangement chromosomiques. Au sein d'un même cancer, des réarrangements communs sont retrouvés entre la tumeur primaire et les métastases et sont caractérisés d'évènements précoces. D'autres sont présents dans les cellules métastatiques uniquement et sont considérés comme des évènements acquis tardivement. Dans le PDAC, une majorité des réarrangements sont acquis pendant le développement tumoral³⁸³. Dans les tumeurs pancréatiques, plus de 80% des réarrangements sont intrachromosomiques⁴⁵. Le séquençage du génome sur un grand nombre d'échantillons en 2015 a permis à Waddell et collègues de mettre au point une nouvelle classification des PDAC en 4 sous-types selon le type et le nombre de variants de structures chromosomiques (SV) : les tumeurs au génome stable, localement réarrangé, dispersé ou instable (Table 8).

Stable	Localement réarrangé	Dispersé	Instable
20% des échantillons	30% des échantillons	36% des échantillons	14% des échantillons
<50 évènements SV	Evènement focal sur un ou deux chromosomes	<200 évènements SV	>200 évènements SV
Aneuploïdie fréquente, probable défaut dans le cycle cellulaire et/ou la mitose	1/3 contiennent des gains de nombre de copie dans des régions contenant des oncogènes	Niveau modéré de dommages chromosomiques non aléatoires	Probable défaut dans la maintenance de l'ADN (mutation), potentielle sensibilité aux agents ciblant l'ADN

Table 8 : classification des tumeurs pancréatiques selon le nombre et le type de variants structuraux (Waddell et al. 2015).

80% des tumeurs possèdent un génome classé dans des catégories considérées comme génome non-stable avec des profils de réarrangements plus ou moins complexes. Les génomes les plus instables corréleront fortement avec une inactivation dans la voie de réparation des cassures double-brins et une sensibilité accrue aux agents à base de sels de platine notamment⁴⁵. Cette instabilité est d'autant plus exacerbée dans les métastases³⁸³. Cette classification de Waddell et collègues permet de mieux comprendre l'hétérogénéité inter-patient pour mieux appréhender les sensibilités et résistance aux traitements. L'objectif final d'une telle classification est d'améliorer la prise en charge des patients et les orienter vers des traitements plus adaptées, comme une thérapie ciblée à base d'Olaparib ou chimiothérapie à base de sels de platine pour le groupe instable⁴⁵.

Les tumeurs pancréatiques avec une mutation BRCA ou un génotype BRCAness ont été associées à un nombre très élevé de réarrangements intrachromosomiques³⁸⁴. De façon intéressante, une mutation dans la DDR est corrélée à une augmentation générale de la charge mutationnelle, de l'instabilité génomique et est associée à un plus faible pronostic pour les patients. Récemment, Dreyer et ses collègues ont proposé une nouvelle approche pour définir le statut DDR d'une tumeur, au-delà des mutations BRCA connues. Ce système est basé sur la présence d'au moins un des 4 biomarqueurs suivants : i) Le nombre de variants structuraux (>200 SV, génome instable), ii) une signature mutationnelle BRCA (COSMIC, catalogue des mutations somatiques dans le cancer), iii) un test commercial de déficience de la recombinaison homologue positif (HRD score) et iv) une mutation dans un des gènes clé de la DDR (BRCA, ATM, RAD51...), germinale ou somatique³⁸⁵. Il est important de noter qu'il existe aujourd'hui de multiples tests commerciaux approuvés par la FDA permettant de définir un HRD score à partir de tissu tumoral. Le score HRD est basé sur trois mesures de l'ADN : la somme de la perte d'hétérozygotie (LOH), le déséquilibre allélique des télomères et l'instabilité génomique à grande échelle (modification de ploïdie). En effet, tous ces marqueurs ont été associés à une déficience de la voie HR³⁸⁶. De façon importante, les mutations somatiques et germinales sont toutes prises en compte dans cette approche. Pour conclure, une déficience dans un gène impliqué dans la réparation des cassures de l'ADN est aujourd'hui considérée comme un des biomarqueurs d'instabilité génomique

dans les tumeurs pancréatiques. La signature BRCAness est d'ailleurs utilisée aujourd'hui en clinique afin de déterminer le comportement de la pathologie et les dispositifs cliniques à mettre en place pour cette pathologie. Prendre en compte le statut DDR, mieux défini par Dreyer et collègues, permettrait d'inclure une plus grande proportion de patients éligibles pour les sels de platine ou les thérapies ciblées^{45,384,385}.

4. Les outils thérapeutiques basés sur le stress réplicatif dans le PDAC

4.1. Le rationnel d'induire du stress réplicatif dans les cancers

Les thérapies ciblées dans les cancers font aujourd'hui l'objet de nombreuses études cliniques. Dans le mélanome par exemple, BRAF est constitutivement activé par mutation dans un pourcentage élevé de mélanomes et son inhibition (vémurafénib) augmente la survie des patients. Ainsi l'exploitation de cette hétérogénéité a permis le développement d'un traitement adapté, améliorant pour la première fois la survie globale des patients avec un mélanome métastatique³⁸⁷. Cette étude se base sur un principe d'addiction oncogénique. D'autres stratégies s'appuient sur des mécanismes de létalité synthétique, c'est le cas par exemple des inhibiteurs de PARP dans un contexte de mutation BRCA.

Le stress réplicatif chronique et la capacité à outrepasser les points de contrôles du cycle cellulaire sont des caractéristiques uniques des cellules cancéreuses due à leur prolifération exacerbée et la présence de mutations dans la signalisation des dommages à l'ADN. De plus, le stress réplicatif induit de l'instabilité génomique et est précurseur de la tumorigénèse. Dans ce contexte, il est donc pertinent d'utiliser des agents inducteurs de stress réplicatif afin d'augmenter les catastrophes mitotiques et induire la létalité des cellules cancéreuses³⁸⁸, voir Figure 42. L'augmentation de ce stress peut se faire en utilisant des radiations ou des chimiothérapies conventionnelles et des approches plus récentes de ciblage de la signalisation des dommages à l'ADN.

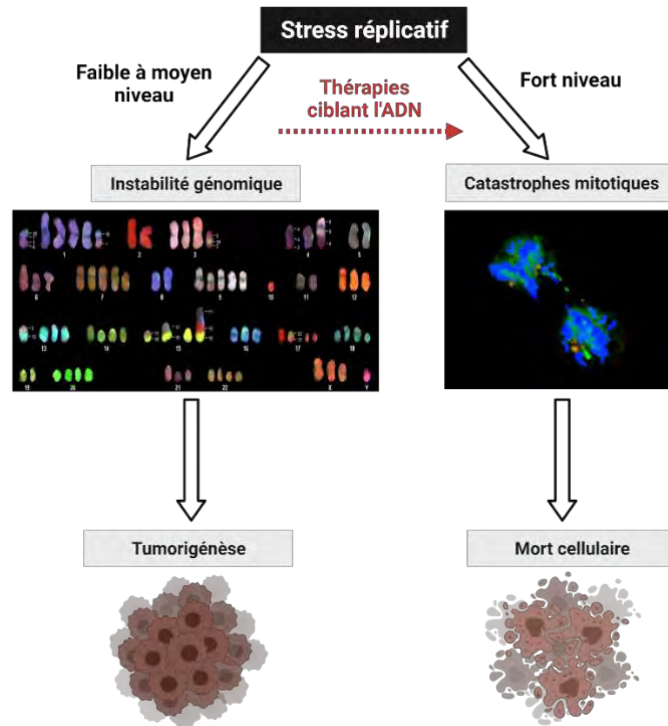


Figure 42 : Le rationnel d'augmenter le stress réplicatif pour tuer les cellules cancéreuses (Zhang et al. 2016).

4.2. Les traitements déjà validés dans le PDAC (platines, PARPi)

Les tumeurs avec un profil génomique distinct (instables) sont souvent associées à une recombinaison homologue déficiente (déficience HR) et corrélient à une meilleure réponse aux thérapies à base de sels de platine^{45,56}. De façon intéressante, les patients HR déficients ont une meilleure survie sans progression de la maladie par rapport aux patients non HRD après traitement avec une première ligne à base de sels de platine uniquement³⁸⁹. La nouvelle signature DDR déficiente est associée avec une réponse positive aux sels de platine montrant ainsi que le statut DDR déficient défini par Dreyer et collègues peut présenter un intérêt clinique dans la prédiction de la réponse aux sels de platine. Ces auteurs ont aussi montré que parmi les 4 biomarqueurs décrits, la signature COSMIC semble être le pire indicateur pronostique de réponse aux thérapies à base de sels de platine³⁸⁵. De façon surprenante, 2 patients du groupe HR mutés ont présenté une réponse exceptionnelle au traitement FOLFIRINOX avec une survie sans progression de plus de 2 ans³⁹⁰. La combinaison Capécitabine et Oxaliplatine a aussi révélé des bénéfices dans une étude de phase II, en seconde-ligne de traitement pour des patients avec un PDAC avancé traités par une première ligne de gemcitabine³⁹¹. Une étude rétrospective supplémentaire d'une cohorte de patients atteints de PDAC avancés traités avec des chimiothérapies à base de sels de platine montre une médiane de survie globale de 10,1 mois pour les patients avec une mutation germinale BRCA contre 6,9 pour les patients présentant un gène BRCA intact. Les patients mutés pour BRCA ou PALB2 peuvent tirer un meilleur bénéfice des chimiothérapies à base de sels de platine comme première ligne de traitement³⁹².

Les inhibiteurs de PARP sont étudiés en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques tels que notamment les sels de platine, la gemcitabine, les inhibiteurs de topoisomérase, les inhibiteurs de points de contrôles cellulaires³⁹³. Ces agents induisent une accumulation de dommages à l'ADN qui induisent une réparation de l'ADN dépendante de PARP. Les modèles PDX de tumeurs pancréatiques avec un génome instable ou une signature mutationnelle BRCA répondent positivement au cisplatine en combinaison avec l'Olaparib³⁸⁵. Une étude de phase II a échoué à montrer le bénéfice du véliparib (inhibiteur de PARP) pour améliorer l'effet d'une combinaison gemcitabine et cisplatine pour des patients avec un PDAC avancé et avec une mutation germinale BRCA2 ou PALB2³⁹⁴. Le véliparib en seconde ligne de traitement est plutôt bien toléré par les patients mais n'apporte pas de réponse particulière des tumeurs mutées pour BRCA1/2 ou PALB2³⁹⁵. Cela suggère que le traitement séquentiel permet de mieux sélectionner les patients et que les mécanismes de résistance aux platines et aux anti-PARP sont possiblement croisés. L'essai en cours NCT01585805, mentionné précédemment, a aussi pour but d'évaluer l'efficacité de la combinaison gemcitabine hydrochloride et cisplatine avec ou sans véliparib dans un contexte PDAC muté pour BRCA/PALB2. Le nombre et l'avancée des études cliniques, présentées dans la Table 9, démontrent l'engouement des recherches actuelles pour l'utilisation des inhibiteurs de PARP en clinique afin de traiter le cancer du pancréas. Une grande majorité des essais cliniques sont en cours et 46% des essais répertoriés sont au moins en étude de phase II, l'Olaparib étant le seul inhibiteur de PARP actuellement en essai clinique de phase III dans le cancer du pancréas.

Inhibiteur de PARP	Nombre d'essais cliniques répertoriés	% des essais encore en cours	≥ Etude phase 2	Monothérapie	Combinaisons
Talazoparib	3	33%	33%	66%	33%
Niraparib	7	100%	57%	29%	71%
Rucaparib	5	60%	60%	60%	40%
Olaparib	14	86%	57%	36%	64%
Veliparib	9	44%	22%	11%	88%

Table 9 : Caractéristiques des inhibiteurs de PARP les plus étudiés. *ClinicalTrials.gov*, Juillet 2021.

L'inclusion des mutations somatiques et de d'autres mutations germinales de la réparation homologue pourrait être envisagée après des études prospectives¹⁵¹.

4.3. Les traitements en développement dans le PDAC : inhibiteurs des points de contrôle du cycle cellulaire

Le programme américain « Know Your Tumor » révèle que 25% des patients atteints d'un PDAC ont une altération moléculaire qui pourrait faire l'objet d'une thérapie ciblée^{396,397}. Seulement, pour des raisons cliniques et administratives (agressivité de la pathologie et problèmes logistiques et

économiques), seuls 5% des cas peuvent recevoir ce type de thérapie adaptée. La survie globale des patients semble plus longue pour les patients traités avec une thérapie ciblée comparée aux patients traités avec chimiothérapies classiques et encouragent de futures études cliniques basées sur le profilage moléculaire des tumeurs et l'utilisation de thérapies ciblées^{396,397}.

ATM est retrouvé muté dans environ 8% des PDAC, c'est un des gènes de la DDR retrouvé le plus fréquemment muté^{45,398}. ATM est une kinase essentielle au point de contrôle du cycle cellulaire capable d'activer un grand nombre de protéines en réponse aux dommages à l'ADN, et ce afin de prendre en charge les DSB, réguler la progression du cycle cellulaire et préserver la stabilité du génome. Les PDAC mutés pour ATM sont donc plus susceptibles d'être sensibles aux agents induisant des dommages à l'ADN comme les thérapies à base de sels de platine ou les inhibiteurs de PARP. De plus, lors de l'altération de la voie de signalisation ATM, les cellules reposent plus sur la voie ATR/Chk1 pour répondre aux dommages à l'ADN, ouvrant ainsi une opportunité de létalité synthétique par ciblage d'ATR et de Chk1 dans les PDAC mutés pour ATM^{256,398}. Les patients porteurs d'une mutation ATM, ATR ou Chk2 répondent partiellement aux chimiothérapies à base d'Oxaliplatine³⁹⁹, cependant, les études cliniques sur les PDAC porteurs de ces mutations sont encore très limitées³⁹⁸. Des études précliniques sont dédiées à une meilleure compréhension des conséquences de la mutation d'ATM dans les cellules de PDAC et des bénéfices thérapeutiques éventuels. En effet, la perte d'ATM *in vitro* s'accompagne d'une dérégulation des points de contrôles cellulaires, de défauts de mitose et de réarrangements génomiques récurrents, pouvant mener à des nouvelles options de thérapie ciblée⁴⁰⁰.

Dans la même ligne que les inhibiteurs de PARP, des inhibiteurs ciblant des protéines des points de contrôles cellulaires comme ATR, ATM, Chk1, Chk2, CDK4/CDK6 sont étudiées pour essayer de trouver de nouvelles approches de thérapies ciblées dans le cancer du pancréas. L'objectif de ces approches est soit i) de créer des létalités synthétiques ou des vulnérabilités dans un contexte de mutation dans la DDR (déficience) et ii) d'améliorer l'efficacité et diminuer la toxicité des thérapies actuelles (PARPi, sels de platine).

a. Les inhibiteurs d'ATR

ATR est la kinase senseur du checkpoint intra-S de réponse aux dommages à l'ADN et joue un rôle de protection contre le stress réplicatif via ses différents rôles dans le point de contrôle de phase S (voir Introduction III.1.4.a. p51). ATR pourrait de ce fait limiter l'efficacité des antimétabolites^{256,401}. VE-821 est le premier inhibiteur hautement spécifique et efficace d'ATR. De façon intéressante, il augmente la sensibilité aux radiations et à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques⁴⁰². L'inhibiteur d'ATR AZD6738 a ensuite été développé et inhibe l'activation de Chk1 induite par la gemcitabine *in vitro*, empêchant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en réponse au stress réplicatif induit⁴⁰¹. *In vivo*, la combinaison du Ceralasertib (AZD6738) avec la gemcitabine est bien tolérée et induit une régression tumorale dans un modèle de KPC avec tumeur sous-cutanée. Ces résultats prometteurs méritent d'être investigués au cours d'un essai clinique⁴⁰¹. Les tumeurs portant cette mutation dépendent éventuellement plus de la voie de signalisation ATR pour la prise en charge des dommages à l'ADN, offrant ainsi des vulnérabilités potentielles aux inhibiteurs de cette protéine^{45,55}. Une mutation ATM

dans un modèle murin de PDAC diminue la viabilité tumorale après traitement Olaparib ou inhibiteur d'ATR VE-822. Les tumeurs pancréatiques murines semblent donc dépendantes d'ATR et sensibles à la stratégie de létalité synthétique par utilisation d'inhibiteur ATR⁴⁰⁰. De plus, dans des xéno greffes de PDAC avec mutation ATM, l'AZD6738 en monothérapie induit un retard de croissance et une combinaison supplémentaire avec la gemcitabine induit une régression tumorale⁴⁰³. Toutefois, il n'existe pas d'essai clinique à l'heure actuelle visant à étudier l'effet des inhibiteurs d'ATR dans un contexte de mutation ATM. L'Elimusertin (BAY 1895344) est un nouvel inhibiteur d'ATR administrable par voie orale, bien toléré par les patients et avec un bénéfice clinique dans d'autres cancers⁴⁰⁴. 3 essais cliniques sur les inhibiteurs d'ATR sont répertoriés : un essai de phase II débuté en 2019 visant à évaluer l'efficacité du Ceralasertib seul ou en combinaison avec l'Olaparib dans les cancers avancés, puis 2 essais de phase I sur le traitement de l'Elimusertib (BAY 1895344) en combinaison avec la gemcitabine (NCT04616534), ou l'irinotecan et le topotecan hydrochloride (NCT04514497) dans le cancer du pancréas (ClinicalTrial.gov, accès septembre 2021).

b. Les inhibiteurs de Chk1

Chk1 est la kinase effectrice d'ATR, centrale pour les points de contrôle intra-S et G2/M. Chk1 est impliqué dans diverses fonctions afin de maintenir l'intégrité de la réplication et la stabilité du génome (voir Introduction III.1.4.a. p51). MK8776 est un inhibiteur de deuxième génération, publié en 2011, et développé pour être plus spécifique de Chk1 et moins toxique. L'inhibiteur LY2603618 ou Rabusertif, développé peu après, est le premier inhibiteur spécifique de Chk1 utilisé en clinique⁴⁰⁵. Dans le cancer du pancréas, une étude de phase II n'a malheureusement montré aucun bénéfice clinique de la combinaison de LY2603618 avec la gemcitabine comparé à la gemcitabine seule⁴⁰⁶. Pourtant, dans une étude pré-clinique de PDAC, la combinaison des inhibiteurs de Chk1 et des chimiothérapies à base de gemcitabine induit un effet synergique via l'augmentation des dommages à l'ADN et de l'apoptose⁴⁰⁷. Ces études restent préliminaires et aucune étude à l'heure actuelle n'apporte de preuves cliniques solides sur l'efficacité des inhibiteurs de Chk1 dans le cancer du pancréas, il n'y a d'ailleurs pas d'essai clinique en cours répertorié (ClinicalTrial.gov, accès septembre 2021).

c. Autres inhibiteurs du cycle cellulaire

D'autres inhibiteurs impliqués dans la régulation des points de contrôles cellulaires sont étudiés dans des contextes de thérapie ciblée. L'Adavosertib (MK1775) est un inhibiteur spécifique de la sérine/tyrosine kinase Wee-1, impliquée dans la division cellulaire et le point de contrôle G2/M en régulant négativement l'entrée en mitose. A l'heure actuelle 2 essais cliniques sont en cours dans le cancer du pancréas (clinicalTrial.gov). Le premier de phase I/II (NCT02194829) étudie l'efficacité d'une combinaison de molécules (nab-paclitaxel, gemcitabine hydrochloride et adavosertib) en première ligne de traitement dans des PDAC avancés. Le second de phase II (NCT02465060) appelé essai « MATCH » est un criblage de 34 molécules de thérapies ciblées dirigées contre des anomalies génétiques (mutations, amplifications) sur un large panel de cancers solides avancés. Aujourd'hui aucun inhibiteur de Wee1 n'a encore été approuvé par la FDA. Le Palbociclib (PD0332991), inhibiteur des CDK4 et CDK6, a aussi été intégré dans l'essai clinique de phase II MATCH. CDK4 et CDK6 sont des

kinases dépendantes des cyclines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Dans le cancer du pancréas, outre l'essai MATCH, le Palbociclib est impliqué dans 5 essais cliniques de phase I, en combinaison avec différents agents tels que des inhibiteurs de ERK, des sels de platine ou en criblage sur un large panel de molécules. Le Palbociclib a été approuvé par la FDA depuis 2015 dans le cancer du sein avancé HER2 négatif. Enfin, dans une étude pré-clinique l'inhibiteur de Chk2, NSC109555, en combinaison avec la gemcitabine, induit l'apoptose des cellules pancréatiques cancéreuses⁴⁰⁸. Chk2 est la kinase effectrice d'ATM, cruciale pour les points de contrôles de dommages à l'ADN²⁵⁶.

d. Combinaisons thérapeutiques

L'étude de Gout et al de 2021 consiste en un criblage de combinaisons pour essayer d'identifier un traitement ciblé contre les anomalies génomiques, contrecarrer d'éventuelles résistances et améliorer l'efficacité et la tolérance du traitement¹²³. Dans leurs travaux, au contraire de la déficience BRCA, la déficience d'ATM n'a pas augmenté la sensibilité des cellules pour les chimiothérapies à base de sels de platine. Cependant, une létalité synthétique est induite lors de la combinaison des inhibitions de PARP, d'ATR et de la DNA-PK dans des souris déficiente pour ATM et des PDAC humains. En effet, à des faibles doses, dans les modèles PDAC murins mutés pour ATM, l'Olaparib, le VE-822 et l'inhibiteur de la DNA-PK permettent un blocage de la progression tumorale accompagné d'une augmentation des dommages à l'ADN (γ H2AX) et d'apoptose (comparé aux tumeurs témoin). *In vitro*, cette combinaison augmente les dommages à l'ADN et l'aneuploïdie dans les cellules PDAC déficientes pour ATM¹²³. Une autre étude de criblage a montré que la combinaison de l'inhibition de Chk1 et de Wee1 avec un traitement gemcitabine suffi à contrôler la progression de la maladie dans les modèles de xénogreffes de PDAC étudiés. Ces résultats prouvent ainsi qu'une combinaison entre des inhibiteurs des points de contrôle du cycle cellulaire et des chimiothérapies pourrait être efficace⁴⁰⁹.

e. Conclusion

Les inhibiteurs d'ATR semblent aujourd'hui les plus prometteurs avec plusieurs essais cliniques à leur actif et plusieurs études montrant une létalité synthétique dans les tumeurs déficientes pour ATM. Cependant même si les approches évoquées précédemment sont encourageantes, aucune d'entre elle n'est approuvée par la FDA pour le traitement du cancer du pancréas outre l'Olaparib pour les tumeurs avec une mutation germinale BRCA. Il est crucial de poursuivre les études pré-cliniques et cliniques et afin d'optimiser les combinaisons thérapeutiques et contrecarrer les résistances pour pouvoir espérer un jour traiter les patients atteints d'un cancer du pancréas avec une thérapie de précision adaptée.

La présence de mutations dans les voies de réparation de l'ADN a suscité de nombreux travaux pour adopter de nouvelles stratégies de thérapies ciblées. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste difficile, et ce à cause de la faible prévalence de ces mutations dans les tumeurs pancréatiques et le manque d'approches pharmacologiques. Il est nécessaire de trouver de meilleurs biomarqueurs de réponse à ces molécules⁵⁶. De plus, les essais cliniques en cours, mentionnés précédemment, et visant à étudier l'efficacité des inhibiteurs des points de contrôle du cycle cellulaire (ATR, Chk1, Wee1) sont mises en place sans critères moléculaires de sélection des patients (tel que les inhibiteurs de PARP pour des patients porteurs d'une mutation BRCA).

4.4. Stratégies thérapeutiques basées sur le stress répliatif dans le PDAC

Dans des lignées cellulaires cancéreuses, l'oncogène K-RAS a associé à un ralentissement des fourches de réplication, une augmentation des fréquences de fourches asymétriques et de blocage des fourches de réplication et d'ADN double-brin dans le cytosol. Le stress répliatif induit par la mutation K-RAS ne permet cependant pas de létalité en réponse aux agents induisant des défauts de réplication car les cellules seraient protégées par Chk1. Cette analyse ouvre ainsi de nouvelles possibilités thérapeutiques quant à l'utilisation d'inhibiteurs de Chk1 dans des tumeurs K-RAS mutées⁴¹⁰. Toutefois, les premiers essais de traitement des tumeurs pancréatiques avec un inhibiteur de Chk1 ont échoué à montré un bénéfice pour les patients⁴⁰⁶. Etant donné que le cancer du pancréas est le cancer avec la plus grande prévalence de mutation K-RAS (60-95%), il serait prometteur d'étudier des stratégies thérapeutiques basées sur le stress répliatif induit par l'oncogène K-RAS⁴¹⁰.

Les travaux de Dreyer et al de 2021 ont mis en évidence une nouvelle signature de stress répliatif, issue des gènes impliqués dans les voies de réponses aux dommages à l'ADN de Gene Ontology. Le niveau de stress répliatif corrèle avec le sous-type basal/squameux du cancer du pancréas. Cependant, la signature de stress répliatif est indépendante d'une déficience de DDR dans le PDAC. Ceci indique que les tumeurs enrichies pour la signature de stress répliatif (RS) ne sont pas forcément déficientes pour la DDR. Grâce à l'enrichissement des gènes impliqués dans cette signature, Dreyer et ses collaborateurs ont pu classer les lignées primaires dérivées de patients (PDCL) selon un niveau de stress répliatif (RS) qualifié d'élevé ou de faible à partir de données transcriptomiques. De façon remarquable, les PDCL et modèles organoïdes 3D avec un score de stress répliatif élevé sont plus sensibles aux inhibiteurs d'ATR et de Wee1 (AZD6738 et AZD1775 respectivement), indépendamment du statut DDR. Cela suggère que l'enrichissement de la signature de stress répliatif est un meilleur biomarqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs d'ATR et de Wee1 qu'une mutation DDR ou que le sous-type basal. Ainsi, selon le niveau d'enrichissement de la signature de stress répliatif (RS élevé ou RS faible) et la capacité des cellules à utiliser la DDR (DDR déficiente ou compétente) il est possible de classer les PDCL et d'adapter la stratégie thérapeutique. Dans ce modèle, les inhibiteurs de la DDR sont utilisés pour créer une létalité synthétique lorsqu'un gène clé de la DDR est muté au sein de la tumeur, alors que les inhibiteurs du cycle cellulaire sont utilisés pour augmenter le niveau de dommages à l'ADN via le blocage de leur détection et de leur prise en charge³⁸⁵, comme présenté Figure 43.

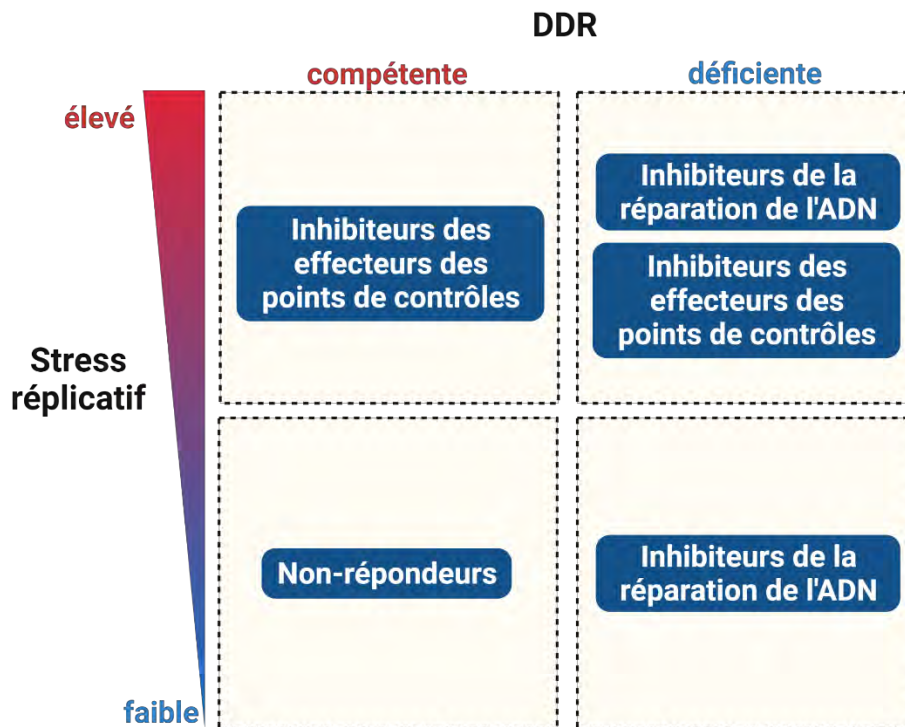


Figure 43: sensibilité des PDCL aux inhibiteurs de la DDR et/ou du cycle cellulaire selon le niveau d'enrichissement de la signature transcriptomique de stress réplicatif (élevé ou faible) et le statut DDR (compétent ou déficient), adapté de Dreyer et al. 2021.

Les PDCL avec un taux de stress réplicatif élevé et/ou une déficience dans la DDR sont donc plus sensibles soit aux inhibiteurs du cycle cellulaire soit aux inhibiteurs de PARP, respectivement³⁸⁵. Une catégorie de cas non-répondeurs à ces thérapies subsiste, les lignées avec un faible RS et une DDR compétente, représentant un vide thérapeutique dans cette stratégie. Ces travaux offrent toutefois de nouvelles possibilités pour les patients avec un niveau élevé de stress réplicatif, outre la présence d'une mutation dans la DDR³⁸⁵. Le niveau de stress réplicatif semble donc être un biomarqueur prometteur permettant d'inclure plus de patients que les mutations DDR, basé sur une analyse transcriptomique facilement réalisable et prédicteur de la réponse aux inhibiteurs du cycle cellulaire, de la DDR et des sels de platine. Cette stratégie devrait être évaluée au cours d'études rétrospectives. Un essai clinique PRIMUS-004 (ISRCTN16004234) de phase II vise actuellement à évaluer de nouveaux traitements de deuxième ligne dirigés par des biomarqueurs de réponse tels que le stress réplicatif, dans des PDAC métastatiques.

Il est donc important de mieux comprendre comment exploiter le stress réplicatif des cellules de PDAC pour identifier des stratégies thérapeutiques plus efficaces. Pour cela il est nécessaire d'augmenter les connaissances sur les mécanismes et l'origines du stress réplicatif dans les tumeurs pancréatiques.

IV. Contexte du projet de thèse

Dans le cancer, la prolifération cellulaire et le cycle cellulaire sont dérégulés, notamment à la suite de l'activation oncogénique. Le stress réplicatif qui en résulte représente un facteur clé de la diversification clonale, nécessaire pour favoriser des génomes cellulaires et initier le développement tumoral. Par conséquent les cellules cancéreuses doivent développer des contremesures efficaces pour survivre au stress réplicatif qui leur est imposé, nourrissant l'agressivité et la résistance aux traitements des cellules tumorales. Cette dépendance des cellules cancéreuses pour le stress réplicatif pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante. Un sous-type de tumeurs pancréatiques montre un niveau intrinsèque élevé d'instabilité génétique, associé la plupart du temps à une mutation dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN. Les patients avec un PDAC métastatique et une mutation germinale dans le gène BRCA2 bénéficient d'une thérapie de maintenance à base d'inhibiteurs de PARP (Olaparib), si la tumeur est sous contrôle après à une thérapie à base de sels de platine. Le stress réplicatif commence à être exploité thérapeutiquement et pourrait permettre de stratifier les patients et de révéler des chimiosensibilités. Paradoxalement, les mécanismes moléculaires impliqués dans la tolérance des cellules cancéreuses pancréatiques au stress réplicatif restent méconnus.

Mon équipe a publié les travaux de l'essai clinique de phase I TherGAP dont l'objectif est d'utiliser une approche de thérapie génique pour diminuer la résistance à la chimiothérapie par gemcitabine par la surexpression de gènes impliqués dans son métabolisme intracellulaire. Cette étude a démontré la faisabilité et la sécurité de l'approche. Cette approche « première chez l'homme » est actuellement poursuivie dans le cadre d'un essai clinique de phase II qui doit déterminer son efficacité. Mon équipe d'accueil a poursuivi son travail de recherche en explorant d'autres stratégies pour chimiosensibiliser les tumeurs du pancréas à la gemcitabine. Nous avons ainsi identifié, à travers deux thèses qui ont précédées la mienne, la surexpression de la CDA dans le PDAC au moment du diagnostic dans des tumeurs naïves de traitement et sa corrélation avec un plus faible pronostic. Ces études ont notamment démontré pour la première fois l'importance de la CDA *per se* dans le développement de tumeurs expérimentales pancréatiques, en présence ou non de chimiothérapie.

Dans le syndrome de Bloom, la perte de l'expression de CDA induirait un déséquilibre du pool de pyrimidines, via une accumulation du substrat de la CDA, à l'origine de stress réplicatif et défaut de ségrégation en mitose. Compte tenu de ces données de la bibliographie, et de la part prédominante que prend le stress réplicatif dans le PDAC, je me suis donc plus particulièrement intéressée au cours de ma thèse au rôle de la CDA dans le contrôle du stress réplicatif dans les cellules cancéreuses pancréatiques. Pour cela j'ai étudié le rôle de cette enzyme sur la réplication de l'ADN et les mécanismes moléculaires mis en jeu. Par la suite, j'ai recherché si la CDA régule le stress réplicatif et l'instabilité génétique dans ces cellules. Enfin, j'ai valorisé ce travail fondamental par la recherche de nouvelles opportunités thérapeutiques basées sur ce nouveau rôle de la CDA dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

Résultats

L'équipe de Pierre Cordelier a commencé à travailler sur la chimiosensibilisation à la gemcitabine dans le cancer du pancréas en 2014. Ils ont pu montrer *in vitro* et *in vivo* que le ciblage génétique ou pharmacologique de la CDA chimiosensibilise les cellules cancéreuses à la gemcitabine (collaboration avec Jérôme Cros, manuscrit en cours de préparation).

De façon intéressante, l'équipe a observé une inhibition robuste de la prolifération cellulaire et de la progression tumorale lors de la déplétion seule de l'expression de CDA, en absence de chimiothérapie (résultats Figure 1 du papier présenté ci-dessous). Cette révélation a soulevé de nombreuses questions dont la principale étant quel est le rôle de la CDA dans les cellules cancéreuses pancréatiques outre son activité de chimiorésistance aux analogues de désoxycytidine telle que la gemcitabine ? Deux projets de thèse ont découlé de cette question. Le premier projet mené par Audrey Frances (2016-2019) a visé à montrer le rôle de la CDA dans la biogénèse mitochondriale et l'agressivité des cellules cancéreuses pancréatiques (manuscrit en cours de préparation, Frances, Lumeau et al.). Elle a réalisé les études de mutagenèse dirigée qui nous ont permis de surexprimer la CDA mutée et catalytiquement inactive E67Q. Le deuxième est mon projet de thèse dont l'objectif a été de déterminer le rôle de la CDA dans la régulation du stress répliatif des cellules cancéreuses pancréatiques. Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'écrire un article scientifique actuellement disponible sur BioRxiv (<https://doi.org/10.1101/2021.10.23.465566>) et bientôt soumis, présenté ci-dessous. Les expériences d'IPOND ont été réalisées en collaboration avec Cyril Ribeyre et les analyses bioinformatiques ont été faites en collaboration avec Vera Pancaldi, Miguel Madrid-Mencia et Samad Elkaoutari.



Cytidine deaminase protects pancreatic cancer cells from replicative stress and drives resistance to DNA-targeting drugs

A. Lumeau¹, N. Bery¹, A. Francès¹, M. Gayral¹, C. Ribeyre², C. Lopez¹, A. Névo¹, S. Elkaoutari³, G. Labrousse¹, M. Madrid-Mencia¹, M. Pillaire¹, V. Pancaldi¹, V. Bergoglio¹, N. Dusetti³, J. Hoffmann⁵, L. Buscail^{1,4}, M. Lutzmann², P. Cordelier^{1,#}.

1 : Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, Inserm, CNRS, Toulouse, France,

2 : Institut de Génétique Humaine, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France.

3 : Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM U1068, CNRS UMR 7258, Aix- Marseille Université and Institut Paoli-Calmettes, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, Marseille, France.

4 : Department of Gastroenterology and Pancreatology, CHU Rangueil, University of Toulouse III, Toulouse, France.

5: Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN), Laboratoire de pathologie, Institut Universitaire du Cancer-Toulouse, Toulouse, France.

#: corresponding author.

Pierre Cordelier, Cancer Research Centre of Toulouse (CRCT)

Team 10: "therapeutic innovation in pancreatic cancer"

2, avenue Hubert Curien, 31100 Toulouse,
France. Email: pierre.cordelier@inserm.fr

ABSTRACT

Chronic DNA replication stress and genome instability are two hallmarks of cancer that fuel oncogenesis and tumor diversity. Therapeutic approaches aimed to leverage tumor-specific replication stress to intolerable levels or to expose vulnerabilities for synthetic lethality purposes have recently gained momentum, especially for pancreatic cancer, a disease with no cure. However, the current knowledge regarding the molecular mechanisms involved in the replication stress response in pancreatic tumors is limited. Cytidine deaminase (CDA) is involved in the pyrimidine salvage pathway for DNA and RNA synthesis. A loss of CDA induces genomic instability in Bloom Syndrome, and CDA protects tumor cells from chemotherapy with pyrimidine analogs. Here, we show that CDA is overexpressed in genetically unstable pancreatic tumors, associates with a DNA replication signature, and is instrumental for experimental tumor growth. In cancer cells, CDA promotes DNA replication, increases replication fork speed, controls replication stress and genomic stability levels. CDA expression is predictive of DNA-damaging drug efficacy and targeting CDA relieves resistance to chemotherapy in patients-derived models, both *in vitro* and *in vivo*. Our findings shed new light on the mechanisms by which pancreatic cancer cells control replication stress, and highlight targeting of CDA as a potential therapeutic strategy to defeat tumor resistance to treatment.

All authors have seen and approved the manuscript, and that it hasn't been accepted or published elsewhere.

There is no conflict of interest.

INTRODUCTION

At each cell division, billions of nucleotides must be accurately polymerized, and ensuring that this process occurs prior to the next cell cycle is essential for cellular homeostasis¹. The DNA replication machinery successfully carries out accurate genome duplication in the face of numerous obstacles, many of which cause DNA replication stress. Replication stress is defined as any hindrance to DNA replication that either stalls, blocks or terminates DNA polymerization. Due to high levels of proliferation and a deregulated cell cycle, DNA replication stress represents one of the main drivers of clonal diversification, creating the multi-layered genomic instability often seen in cancer². Consequently, cancer cells have evolved to fine-tune DNA replication stress, notably following oncogene activation³, for the acquisition of genetic heterogeneity while preserving favorable genotypes that are compatible with tumor growth. This dependence can be exploited for a therapeutic benefit as cancer cells can be pushed towards cell death by increasing DNA damage, without necessarily killing normal cells that have an intrinsically lower DNA damage level and efficient DNA damage repair pathways.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a disease with no cure that will soon be the second cause of death by cancer worldwide⁴. PDAC is dominated by mutations in *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, and *SMAD4* with a handful of genes infrequently mutated in most PDAC patients^{5,6}. So-called unstable genotypes with numerous chromosomal structural variations are present in a significant proportion of PDAC patients (10-15%), characterized by an inactivation of DNA maintenance genes and somatic mutations in genes involved in DNA repair (*BRCA2*, *BRCA1*, *PALB2*, *ATM*, and *RAD51*)^{5,6}. This genetic diversity may explain why PDAC has been historically highly recalcitrant to chemotherapies and targeted therapies. However, recent studies have shown that patients with germline mutations in *BRCA2* demonstrate therapeutic response following a first line platinum containing FOLFIRINOX regimen, followed by PARP inhibitor (Olaparib) treatment⁷. In a recent work, Dreyer *et al* further classified PDAC experimental models using a DNA repair deficiency (DDR) signature and found that a subset of PDAC samples with squamous transcriptomic profile harbor a high replication stress, that predicts response to ATR and WEE1 inhibitors⁸. Collectively, these works demonstrate that a significant fraction of PDAC tumours show intrinsic evidence of genetic instability, and that replication stress is beginning to be explored as an attractive target in the clinic^{9,10}. However, the molecular mechanisms that govern replication stress in PDAC remain largely unknown.

Cytidine deaminase (CDA) catalyzes the irreversible hydrolytic deamination of cytidine and deoxycytidine to uridine and deoxyuridine, respectively, within the pyrimidine salvage pathway for DNA and RNA synthesis (for review¹¹). In Bloom syndrome, a genetic disease with one of the strongest known correlations between chromosomal instability and increased risk of malignancy¹², loss of CDA expression results in a pyrimidine pool imbalance, which in turn generates replication stress leading to segregation defects¹⁸. In oncology, CDA expression is historically recognized as a key chemoresistance factor to cytidine and deoxycytidine analogs such as cytarabine (ara-C), gemcitabine (dFdC), or decitabine (5-Aza-dC) since it catalyzes their transformation into inactive metabolites that are excreted by cancer cells. As an example, 80% of the intravenous Ara-C bolus is eliminated in the urine, 90% of

which is in its uracil form, thus strongly suggesting direct and active “detoxification” by CDA¹³. In PDAC, patients with high CDA activity are 5-fold more likely to progress following gemcitabine-based therapy¹⁴, and CDA from the tumor microbiome participates in tumor resistance to treatment¹⁵. However, the role of CDA per se in PDAC oncogenesis has never been investigated so far.

For this study, we aimed to consider the role of CDA on DNA replication in the context of PDAC, independently of its role in resistance to gemcitabine treatment. We report here that CDA is overexpressed in PDAC at diagnosis, and that CDA expression in tumors naives of treatment correlates with a worse prognosis. Hence, CDA depletion strongly impairs PDAC experimental proliferation and tumor growth, in the absence of gemcitabine. Gene signature analysis demonstrates that CDA expression positively correlates with DNA replication signature in PDAC and is enriched in genetically unstable tumors. In PDAC cells, CDA promotes DNA synthesis by increasing replication fork stability, CDA is nuclear and locates at the DNA replication fork. In addition, we show that CDA activity is essential to dampens replication stress and genomic instability in these cells. Finally, we show that CDA expression drives resistance to DNA targeting drugs in PDAC experimental models, and that targeting CDA both *in vitro* and *in vivo* sensitizes PDAC tumors to genotoxic treatment. Collectively, we demonstrate here that CDA is involved in the regulation of replicative stress level in PDAC, a novel dependence that can be exploited for a therapeutic benefit.

RESULTS

CDA is overexpressed in PDAC, essential to cell proliferation and tumor growth

CDA expression in tumors has been scarcely investigated to date¹¹. Previous reports indicate that CDA is upregulated in human PDAC samples¹⁶ and in animal models¹⁷. To further characterize the expression of CDA in PDAC, we first analyzed surgical specimens from patients with pancreatic cancer. Matching, normal adjacent parenchyma was obtained for each patient. Using RT-qPCR, we found that CDA mRNA is significantly overexpressed in PDAC tissue (Fig. 1A, 5.1+/-1.5-fold increase, $p < 0.001$). This finding was confirmed by *in silico* investigation with the curated TCGA_PAAD dataset¹⁸ (Extended Figure 1A). In recent years, several studies have demonstrated that molecular data can define subgroups in PDAC with distinct biology¹⁹. Analysis of PDAC transcriptomes have revealed two main molecular subtypes, with classical tumors on one side showing the highest expression of epithelial and adhesion associated genes, as well as high levels of GATA binding protein 6 (GATA6) mRNA, and basal-like tumors on the other side that are predominantly composed of poorly differentiated tumors, more often CDKN2A or TP53 mutated, and that exhibit the worst outcome²⁰. We applied the Purity Independent Subtyping of Tumors (PuriST) classifier²¹ to PDAC tumors from TCGA with known CDA mRNA levels and found that CDA expression is significantly enriched in PDAC primary cells with basal phenotype (Fig. 1B 2.3+/-0.1-fold increase, $p < 0.001$). We extended this analysis to a recently published primary cell lines collection⁸ and found that CDA mRNA is significantly overexpressed in PDAC primary cells with the squamous phenotype, that largely corresponds to the basal-like molecular phenotype (Extended Fig.1B, 1.2+/-0.04-fold increase, $p < 0.05$). PDAC patient tumors from TCGA were next classified as CDA high-expressing (top 25% quartile) or CDA low-expressing (bottom 25% quartile); we found that CDA expression is positively associated with shorter survival (Fig. 1C, $p < 0.03$, hazard ratio =

2.021,). These results indicate that PDAC tumors with the most aggressive molecular phenotype and the shortest survival overexpress CDA.

We next addressed the functional importance of CDA in PDAC. We inhibited CDA expression in PDAC cell line using shRNA delivered by lentiviral vectors (Extended Fig. 1C-D) and found that CDA targeting provokes a profound and long-term inhibition of cell proliferation, ($-86\% \pm 3\%$, $p < 0.01$, Fig. 1D). We extended this finding to BxPC-3 and Capan-1 PDAC cells (Extended Fig. 1E) or using siRNA pools targeting CDA in MIA PaCa-2 cells (Extended Fig. 1F). In addition, MIA PaCa-2 PDAC cells expressing CDA hairpins showed a reduced ability to form colonies, as compared to control cells (Fig. 1E, $-65\% \pm 3\%$, $p < 0.05$). In these cells, CDA invalidation increases cell death by apoptosis 10 folds monitored by FACS for Annexin-V and Western blotting for caspase-3 and PARP cleavage (Fig. 1F-G). We next engrafted human PDAC cell expressing CDA hairpins in the pancreas of athymic mice. Mice receiving PDAC cells expressing control hairpins were used as control. We found that silencing CDA in PDAC cells results in 50% mice not developing experimental tumors (Fig. 1H). When tumors developed, CDA silencing significantly decreased tumor growth, as compared to control tumors ($-97\% \pm 17\%$, $p < 0.01$, Fig. 1H and Extended Figure 1G). Collectively, these data indicate that PDAC cell proliferation and tumor growth strongly rely on CDA expression.

CDA increases replication fork speed and restart efficiency in PDAC cells.

To gain further insights into the role of CDA in PDAC growth, we performed gene signature enrichment analysis in the quartile of PDAC tumors from TCGA overexpressing this enzyme. As shown in Fig. 2A and Table 1, CDA expression positively correlates with the transcriptomic signature of DNA replication (normalized enrichment score = 2.28, $p < 0.01$). We next performed lentiviral transduction of CDA in MIA PaCa-2 PDAC cells and verified efficient mRNA (Extended Fig. 2A) and protein (Extended Fig. 2B) expression and activity (Extended Fig. 2C). Cells expressing luciferase were used as control. We found that CDA expression induces the DNA replication signature in these cells (Fig. 2B, normalized enrichment score = 1.98, $p < 0.01$ and Table 2). We next addressed whether CDA could act on DNA replication in PDAC cells. We performed DNA spreading analysis to visualize and follow the spatial and temporal progress of individual DNA replication forks. The method relies on the detection of incorporated thymidine analogues during DNA synthesis in the S phase of the cell cycle by indirect immunofluorescence following cell lysis and DNA fibers spread (Fig. 2C). Thus, PDAC cells expressing CDA were incubated with IdU and CldU thymidine analogues. Cells expressing luciferase were used as control. Figure 2D demonstrates that DNA tracks are significantly longer in cells overexpressing CDA as compared to control cells ($12.5\mu\text{m} \pm 0.37\mu\text{m}$ vs $9.4\mu\text{m} \pm 0.34\mu\text{m}$, $p < 0.001$), indicating that replication forks speed is increased in CDA-expressing PDAC cells.

We next investigated DNA replication fork restart in PDAC cells expressing CDA. To induce fork stalling, we used hydroxyurea (HU) that inhibits riboside nucleotide reductase (RNR) and causes the depletion of deoxynucleotide triphosphates (dNTPs). PDAC cells were incubated with thymidine analog IdU, to measure initial fork speed, followed by treatment with HU and pulse with CldU. Here, the length of the CldU tract after HU treatment served as a measure of fork restart efficiency. We found that cells

expressing CDA show significantly more CldU positive DNA fibers, as compared to control cells, indicative of increased replication fork restart following HU treatment (Fig. 2F, Extended Fig. 2D, $91.7\% \pm 1.7\%$ vs $78.7\% \pm 1.3\%$, respectively, $p < 0.001$). In addition, the increase in CldU/IdU ratio indicates that CDA increases replication fork speed following stalling (Fig. 2F-G, $43.3\% \pm 2.5\%$ vs $28.2\% \pm 1.9\%$, respectively, $p < 0.001$).

We next addressed whether CDA could physically interact with the DNA replication machinery to increase DNA synthesis. Following cell fractionation of cells expressing FLAG-tagged CDA, we demonstrate that CDA locates both in the cytoplasm, but also in the nucleus of cells overexpressing the enzyme (Extended Fig. 2E). Then, we performed Isolation of Proteins On Nascent DNA (iPOND) analysis. Briefly, cells are incubated with the thymidine analogue EdU to label newly replicated DNA. After cross-linking of proteins and DNA with formaldehyde, the click-it[®] reaction is performed to link biotin to EdU. After cell lysis and sonication to shear chromatin, proteins in proximity to biotin and EdU-labeled DNA are purified with streptavidin-coated agarose beads and resolved by Western blotting (Extended Fig. 2F). Results presented in Fig. 2H show that MCM7 and PCNA, two major components of the fork replisome, are detected within the EdU positive fraction, indicating interaction with newly synthesized DNA. Remarkably, we also located CDA at the DNA replication fork (Fig. 2F, bottom panel). We confirmed this finding in HeLa cells that express relatively high levels of CDA (Extended Fig. 2G). We explored another setting in the iPOND experiment and replaced EdU pulse with a chase of thymidine to track how proteins assemble and disassemble from a nascent DNA segment (Fig. 2F, right). In this condition, both MCM7, PCNA and CDA signal disappears, indicating that these proteins progress with the DNA replication machinery. The latter result indicates that CDA is progressing with the replisome rather than just being a protein constitutively bound on chromatin. Collectively, we provide herein the first demonstration that CDA stimulates DNA synthesis, increases replication fork restart efficiency and is located at the DNA replication fork in PDAC cells.

CDA controls replication stress levels in PDAC cells.

CDA loss in Bloom Syndrome cells participates in the formation of replication defects and sister chromatid exchange²². Considering the newly described role of CDA in DNA replication, we investigated whether CDA may participate in DNA replication stress control in PDAC cells. We measured DNA replication of cells expressing or not shRNA against CDA. Internal control consisted in cells expressing control hairpins and treated with the DNA polymerase inhibitor aphidicolin. As shown in Fig. 3A, both CDA targeting and aphidicolin treatment significantly decrease the length of DNA tracks (Fig. 3A-B, -39% and -62% , $p < 0.001$, respectively), highlighting a reduction of replication fork speed. Transcriptomic analysis indicates that the ATR response to replicative stress signature is enriched in response to CDA targeting in PDAC cells, when compared to control cells (Fig. 3B, normalized enrichment score = 1.76, $p < 0.01$, Table 3). This finding is further supported by the strong activation of the Chk1 effector kinase in MIA PaCa-2 cells (Fig. 3C), Capan-1 (Extended Fig. 3A) and BxPC-3 (Extended Fig. 3B) cells expressing hairpins against CDA, as compared to control cells. We next measured γ -H2AX foci in S-phase cells as a canonical marker of DNA breaks and indicative of replication stress. As indicated in Fig. 3E and 3F, CDA expression in MIA PaCa-2 cells significantly

decreases γ -H2AX foci in EdU-positive PDAC cells, as compared to control cells (Fig. 3F, $-48\% \pm 7$, $p < 0.001$). This effect is entirely dependent on CDA deaminase activity, as the expression of a catalytically inactive mutant of CDA has no impact on γ -H2AX staining (Fig. 3E-F). On the contrary, silencing CDA in BxPC-3 cells results in γ -H2AX accumulation in S-phase cells (Fig. 3G, 2 ± 0.02 -fold increase, $p < 0.001$). We extended this finding to Capan-1 cells expressing hairpins against CDA (Extended Fig. 3C), and to MIA PaCa-2 cells treated with pharmacological inhibitors of CDA (Extended Fig. 3D) or incubated with cytidine and/or deoxycytidine to phenocopy pyrimidine pool imbalance following CDA deficiency (Extended Fig. 3E). RPA (replication protein A) protects exposed single-stranded DNA during DNA replication, accumulates in response to replicative stress, and is phosphorylated at single-strand breaks. Remarkably, we found that CDA expression decreases the number of RPA foci and p-RPA intensity in PDAC cells (Extended Fig. 3F, $-67\% \pm 8\%$, $p < 0.001$).

The p53-binding protein 1 (53BP1) is a well-known DNA damage response (DDR) factor, which is recruited to nuclear structures at the site of DNA damage notably following DNA replication stress. In MIA PaCa-2 cells overexpressing CDA, we found that phospho-53BP1 (P-53BP1) foci are reduced as compared to control cells (Fig. 3H-I, $-56\% \pm 5\%$, $p < 0.001$). On the contrary, BxPC-3 cells that express CDA hairpins demonstrate higher levels of P-53BP1 foci in S-phase than control cells (Fig. 3J $+30\% \pm 1\%$, $p < 0.001$). The latter finding not only confirms that CDA depletion provokes DNA replication stress, but also indicates that the DDR pathway is unaltered in these cells. Collectively, these results indicate that replication stress level in PDAC cells depends on CDA expression level.

CDA controls of genomic instability in PDAC cells.

Residual and unsolved replication stress can lead to genetic instability, including in Bloom syndrome cells depleted for CDA²². Common fragile sites (CFSs) are large chromosomal regions that exhibit breakage on mitotic chromosomes upon replication stress. They become preferentially unstable at the early stage of cancer development and are hotspots for chromosomal rearrangements in cancers²³. Recent studies have shown that FANCD2 facilitates replication across CFSs and can be used as a marker of the presence of unstable CFSs in cells subjected to replication stress²⁴. Hence, if under-replicated DNA at CFSs persists into late mitosis, it will lead to the formation of ultrafine anaphase bridges (UFBs), causing chromosome non-disjunction and mitotic catastrophes²⁵. FANCD2 forms symmetric foci at each end of UFBs and has a role in the resolution of UFBs in mitosis. As shown in Figure 4A-B, MIA PaCa-2 cells highly expressing CDA show significantly less FANCD2 foci in early mitosis ($-56\% \pm 14\%$, $p < 0.001$), while CDA targeting strongly increases the number of leased CFSs in these cells (Fig. 4A-B, $+76\% \pm 7\%$, $p < 0.001$). These results strongly suggest that CDA limits the number of UFBs in PDAC cells because of reduced replication stress. Micronuclei are the small sized nuclei that form from one or a few chromosomes or chromatin fragments that are not incorporated into the daughter nuclei during cell division²⁶. Micronuclei formation usually serves as an index of genotoxic effects and chromosomal instability. By microscopy, we found that CDA expression significantly limits the number of DAPI-positive micronuclei in MIA PaCa-2 cells (Fig. 4C-D, $-60\% \pm 13\%$, $p < 0.05$), whereas the catalytically inactive CDA mutant was ineffective. Moreover, that targeting CDA increases FANCD2 genomic instability markers in PDAC cells (Fig. 4C-D, $+111\% \pm 7\%$, $p < 0.05$). The latter was further validated in BxPC-3 (Extended Fig. 4A) and Capan-1 (Extended Fig. 4B) cells. Interestingly, markers of

genomic stress such as remnants of incomplete replication can be inherited by daughter G₁ cells and are sequestered to specific nuclear bodies that are colocalized with 53BP1. We found that CDA targeting in MIA PaCa-2 cells using shRNA significantly increases the number of G₁ cells with 53BP1 bodies (Fig. 4E-F, +236%±14%, p<0.001). Collectively, these results strongly suggest that CDA participates to limit genomic instability in PDAC cells.

Intrigued by these results, we extended our investigations to PDAC tumors. As shown in Fig. 5A, tumors with high levels of CDA expression demonstrate significant enrichment in activation of the ATR in response to replicative stress (Fig. 5A, normalized enrichment score = 1.72, p=0.01) and in the Cinsarc²⁷ signatures of chromosome instability (Fig. 5B, normalized enrichment score =2.83 p<0.01). We next explored the aneuploidy score and the number of non-silent mutation per megabase of genomic DNA in PDAC tumors from TCGA that were classified as low or high for the expression of genes involved in genomic stability. As expected, POLQ, which is a low fidelity DNA polymerase that introduces various kinds of mutations during DNA repair, is enriched in PDAC tumors with high genomic instability (Fig. 5C-D, p<0.01). On the other hand, BRCA2 and DHODH expression levels were found to be unrelated with such markers of genomic instability of PDAC tumors (Fig. 5C-D). Remarkably, PDAC tumors with high levels of CDA demonstrate significantly higher aneuploidy scores (Fig. 5C, +69%±10%, p<0.01) and non-silent mutations per megabase (Fig. 5D, +43%±7%, p<0.005) as compared to tumors with lower CDA expression. Thus, we show that CDA levels are associated with genetically unstable PDAC tumours and could control genomic instability.

CDA drives resistance to DNA-damaging drugs in PDAC cells.

Replication stress is starting to be rationally leveraged in cancer therapies, including for PDAC⁸, especially to better position traditional anticancer drugs, such as oxaliplatin, that act by increasing the replication stress within the tumor cell to induce cell death. Considering the new role of CDA we describe herein, we aimed to investigate whether CDA levels can predict DNA-damaging drug efficacy. We first explored the cancer cell line encyclopedia (CCLE) database and found that CDA expression significantly correlates with resistance to oxaliplatin (Fig. 6A, p=0.014) and to Topoisomerase I inhibitor irinotecan (Extended Fig. 6A, p=0.039) in a panel of 26 PDAC cell lines. We selected 4 cell lines with low (DAN-G, MIA PaCa-2, CAPAN-1, KP-4) or high (CAPAN-2, AsPC-1, BxPC-3, SU8686) CDA expression. As shown in Figure 6B, PDAC cells with high levels of CDA are 67-fold±0.3 (p<0.01) more resistant to oxaliplatin as compared to cells expressing low levels of the enzyme. We extended this observation to SN38, the active metabolite of CPT-11, a derivative of camptothecin²⁸ that inhibits DNA topoisomerase I, Cisplatin, that forms DNA adducts, temozolomide, that deposits methyl groups on DNA guanine bases, and mitoxantrone, that causes single- and double-stranded disruptions after intercalating with the DNA molecule. PDAC cells with high CDA expression are 19-fold±0.2 (p<0.05), 9-fold±0.3 (p<0.05), 5.9-fold±0.3 (p<0.05) and 39-fold±0.15 (p<0.05) more resistant to SN38, cisplatin, temozolomide and mitoxantrone, as compared to cells expressing low levels of the enzyme, respectively (Fig. 6B). To obtain direct evidence of the role of CDA in the resistance to DNA-damaging drugs in PDAC cells, we treated MIA PaCa-2 cells expressing CDA or the catalytically inactive mutant of CDA (CDAE67Q) with 5µM camptothecin. Cells expressing luciferase were used as a control. As shown in Figure 6C,

camptothecin shows similar antiproliferative activity in control cells and cells expressing a catalytically inactive mutant of CDA (Fig. 6C, $-57\% \pm 5\%$, $p < 0.005$). On the other hand, CDA expression significantly antagonizes the antiproliferative activity of the drug (Fig. 6C, $-29\% \pm 2.5\%$, $p < 0.01$), corresponding to a two-fold decrease in camptothecin efficacy.

We next investigated whether CDA silencing could sensitize PDAC cells to DNA-damaging drugs. Thus, we used PDAC051T primary cells²⁹, derived from a PDAC patient with known CDA expression, that were treated with siRNA targeting CDA for 72-hours. Control cells were transfected with a pool of control siRNA. We found that CDA silencing inhibits PDAC051T proliferation by 2-fold (Fig. 6D, $p < 0.0001$), thus confirming our findings that CDA is important for PDAC cell proliferation. We extended this finding to PDAC015T, described from another PDAC patient sample that also expressed high levels of CDA (Extended Fig. 6B, $p < 0.001$). Next, PDAC051T cells were then treated by $10\mu\text{M}$ of the clinically relevant drug oxaliplatin. As shown in Fig. 6E and extended Fig. 6C, a combination of CDA silencing followed by oxaliplatin treatment significantly sensitized PDAC cells to therapy and inhibited cell proliferation, as compared to primary cells transfected with control siRNA ($-61\% \pm 5\%$, $p < 0.0001$).

Further, we asked whether targeting CDA may represent a novel interventional strategy to improve drug response in PDAC preclinical models, *in vivo*. Thus, PDAC051T were implanted in nude mice and transfected with siRNA targeting CDA. Mice with PDAC051T and transfected with control siRNA were used as control. Forty-eight hours later, mice were treated with oxaliplatin as previously described²⁹. The combination of siRNA transfection and oxaliplatin treatment was repeated three days later. Ten days later, mice were sacrificed and tumors were measured and sampled. We found that tumors receiving siRNA targeting CDA and treated by oxaliplatin showed a robust reduction in tumor growth as compared to control tumors ($-29\% \pm 2\%$, $p < 0.005$, Fig. 6F and extended Fig. 6D). Taken together, our results demonstrate for the first time that CDA expression is predictive of the therapeutic efficacy of DNA-damaging drugs in PDAC, and that CDA targeting sensitizes PDAC tumors to drugs inducing replication stress.

DISCUSSION

Exploiting DNA replication stress has recently emerged as a promising strategy for cancer therapy³⁰ and is beginning to be explored as an attractive target for PDAC management, a disease with no cure^{7,9,10}. Still, the identification of the molecular mechanisms involved in the dependency of tumor cells on the replication stress response is key to devise future and selective therapies centered on enhancing both endogenous and drug-induced replication stress.

In this work, we identify that CDA, a key protein from the pyrimidine salvage pathway, is overexpressed in the most lethal PDAC tumors, that CDA silencing provokes tumor cell death by apoptosis, and it strongly inhibits experimental tumor growth. To our knowledge, this is the first description that CDA is essential to PDAC tumor growth, independently of its role in tumor resistance to pyrimidine-based therapies¹¹. Others have identified that PDAC cells are dependent on *de novo* pyrimidine production driven by dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)^{31,32}. However, targeting DHODH would not be

selective of PDAC cells, as we found that DHODH is equally expressed at low levels in normal and tumoral pancreatic tissues (personal data and TCGA analysis).

In silico exploration of PDAC patient samples indicates that CDA expression is strongly associated with DNA replication signature. In PDAC cell lines, we show that CDA promotes DNA replication and reduces endogenous replication stress. Interestingly, these effects are independent of cell proliferation (data not shown). Importantly, we report here that the reduction of CDA levels in PDAC cell lines slows fork progression and increases γ -H2AX levels in cells that are checkpoint and DNA damage repair proficient. Considering that replication nucleotide shortage is one of the main promoters of replication stress and that catalytically dead CDA mutants fail to reduce the level of DNA breaks in PDAC cells, our results strongly suggests that CDA controls PDAC cells replication stress by recycling pyrimidines from nucleotide degradation through the salvage pathway. This occurs upstream of the reduction of ribonucleoside diphosphates to deoxyribonucleoside diphosphates by the ribonucleotide reductase (RNR). Thus, our results may help revisit the central position of RNR in controlling DNA replication in PDAC cells. Notably, we show in this study that CDA, generally considered a cytoplasmic enzyme¹¹, is nuclear and locates at the replication fork, but the mechanism involved is currently unclear. In proteomic databases, CDA is documented to co-eluate with Minichromosome Maintenance Complex Component 2 (MCM2)¹¹, but we could not see this association in PDAC cells (data not shown). Hence, our findings may revive the “dNTP channeling hypothesis” based on the existence of a functional complex, known as 'replitase'³³, that concentrates dNTP in the environment of replication forks for maximal efficacy. Replitase is thought to contain enzymes that are involved in nucleotide precursors synthesis and DNA replication, such as RNR³⁴, NDP-kinase (NDPK) and DNA polymerase α (Pol α)³⁵. Interestingly, as deoxyribonucleotides are detected in newly synthesized DNA much faster than in the dNTP pool³⁶, this strongly suggests that the salvage pathway may also actively participate to channel dNTPs to the fork environment. Further studies are underway to characterize the interactome of CDA in these cells, and to determine whether CDA belongs to the replitase complex.

Although replication stress contributes to cancer development by promoting genomic instability, it slows down cell proliferation and activates anticancer barriers leading to apoptosis or senescence³⁷. To proliferate, cancer cells must therefore bypass these barriers, while avoiding severe replicative defects that are incompatible with cell survival. It is generally believed that cells adapt to replication stress by modulating the intensity of the ATR-CHK1 checkpoint response. Here, we found that CDA dampens endogenous replication stress in PDAC cells and is overexpressed in genetically unstable tumors. In addition, we found that CDA expression is specifically elevated in primary cells from the squamous molecular subtype, which is strongly associated with replication stress⁸. Therefore, it is likely that the adaptation to replication stress mediated by increased CDA expression occurs at the expense of genome integrity and would therefore promote cancer progression. Another important question raised by our study concerns the mechanism by which cancer cells overexpress CDA. Oncogene activation drives replication stress, particularly through RAS and MYC signalling, both of which are prevalent molecular features of PDAC³⁸. While this field is currently unexplored in PDAC, considering the new role of CDA we describe here, it is tempting to speculate that CDA is expressed as a result of oncogene-induced replication stress to sustain PDAC tumors' growth.

Our work may have important implications for the treatment of patients, as it could influence future studies. With a handful of mechanism-based therapies, the future of PDAC treatment lies in rational therapy combinations for durable tumor control in patients. Our study provides a strong scientific rationale for using CDA expression as a marker of resistance to DNA-damaging drugs used in routine clinical practice such as SN38 and oxaliplatin. In addition, we show that targeting CDA strongly increases tumor replicative stress and sensitizes to oxaliplatin treatment, both *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, Dreyer *et al* have recently proposed an elegant matrix for therapeutic decision using DDR agents and/or cell cycle checkpoint inhibitors based on the DDR proficiency and the level of replication stress of PDAC cells⁸. Unfortunately, DDR-proficient PDAC cells with low replication stress that account for half of samples, respond to neither class of agent. Thus, interventional studies aimed at targeting CDA have the potential to raise the level of replication stress in PDAC tumors in combination with ATR or WEE1 inhibitors, which can be further combined with PARP inhibitors in the context of DDR deficiency.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture conditions

MIA PaCa-2, BxPC-3, Capan-1, Hela S3 human cancer cells were obtained from ATCC and cultured in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) 4.5g/L glucose (for MIA PaCa-2) or Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) (BxPC-3 and Capan-1) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 IU/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin, and 250ng/mL fungizone (AB). Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂. Pancreatic cancer patient-derived cell lines (PDCL) PDAC015T and PDAC051T were cultured as described before²⁹. Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂.

Mouse models

Experimental procedures performed on mice were approved by the ethical committee of INSERM CREFRE US006 animal facility and authorized by the French Ministry of Research: APAFIS#3600-2015121608386111v3. MIA PaCa-2 (2x10⁶) stably expressing luciferase and shRNA targeting CDA following lentiviral delivery were engrafted into the pancreas of SCID CB17 mice as previously described³⁹. MIA PaCa-2 cells expressing random hairpins were used as control. Tumor progression was monitored once per week by luminescence after intra peritoneal injection of Rediject D-Luciferin (Perkin Elmer). Measurement of luminescence was assessed with IVIS Spectrum (Perkin Elmer). For interventional studies, 1x10⁶ PDAC015T cells resuspended in matrigel were injected subcutaneously in atymic mice. Tumors were measured with a caliper and tumor volume was calculated using the formula $V = (\text{Width}^2 \times \text{Length})/2$. Two weeks later, tumors ranging from 150 to 350 mm³ were randomized in two groups (day 0). Tumors were injected intratumorally at days 0 and 5 with 4µg of siRNA pool targeting CDA (Dharmacon) using *in vivo* JetPEI (N/P=6) according to the manufacturer's recommendation (Polyplus). Tumors receiving control siRNA pool (Dharmacon) were used as control. At days 2 and 7, mice received 5mg/kg oxaliplatin I.V. Mice were sacrificed at day 10.

Patient cohorts and clinical sample processing

We used two patient cohorts for CDA expression analysis in PDAC and normal adjacent tissues. The first one includes pancreatic tissue samples obtained from patients receiving pancreatic surgery following the policies and the practices of the facility's ethical committee at the Centre Hospitalo-Universitaires (CHU) of Toulouse and Bordeaux, and the Cancéropole Grand Sud-Ouest (France), as stated before⁴⁰. All patients gave their informed written consent. Histopathology faculty selected cancerous pancreatic tissue with matched adjacent tissue. RNA was extracted and processed as stated before⁴⁰. The second cohort was established from pancreatic carcinoma tissues and normal adjacent pancreatic parenchyma collected from 48 patients who had undergone surgical resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas between 2003 and 2011 at the Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain⁴¹. The study was approved by the Ethical Committee of University Hospital of Bellvitge CEIC 02/04 and written informed consent was obtained from all patients for the use of their tissues.

Plasmid cloning

For silencing studies, lentiviral vectors encoding for shRNAs sequences targeting CDA (CCGGCATGAGAGAGTTTGGCACCAACTCGAGTTGGTGCCTCTCTCATGTTTTTG) were cloned into pLKO.1 puromycin vector and obtained from Sigma. Vectors encoding for random shRNA (Sigma) were used as a control. For overexpression studies, we generated an open reading frame (ORF) for CDA by PCR that was subcloned in pDonor221 (Invitrogen). CDA E67Q catalytically inactive mutant⁴² was generated by site directed mutagenesis according to the manufacturer instructions (New England Biolabs). Lentiviral expression constructs were obtained by cloning CDA and CDAE67Q ORF into pCMV blasticidin DEST 706-1 vectors (Addgene) using the Gateway[®] strategy (Invitrogen). Luciferase was used as a control. All constructs were sequence verified. Lentiviral particles were produced in HEK 293FT cells as previously described³⁵ and quantified for p24 presence using INNOTEST HIV Antigen mAb (Fujirebio). For lentiviral transduction of shRNAs and ORF-expressing constructs, 250ng p24/50.000cells were used in Opti-MEM medium (ThermoFisher Scientific) containing 4µg/mL protamin sulfate, as previously described³⁵. Transductions were performed overnight, the medium was changed the next day and transduced cells were selected with 5µg/mL 2 days later. Cell cultures were maintained as pools and certified mycoplasma-free (Lonza).

Proliferation assay

For proliferation studies, 6x10³ cells were seeded in 96-well plates in 100µl of complete medium. Medium was changed and cells were treated 24h after seeding. Confluence was quantified non-invasively using the Incucyte Zoom (Sartorius). For silencing studies, siRNA smartpools were purchased from Dharmacon. Cells were transfected with 20nM siRNA targeting CDA using JetPrime (Polyplus) as per the manufacturer recommendation. Control cells were transfected with control siRNA (Dharmacon). Three days later, cells were treated or not with 10uM oxaliplatin and cell confluence was monitored as previously described.

Colony formation assays were performed in 6-well plates, with 250 cells initially seeded. Colony presence was revealed at day 10 by cold methanol staining and Crystal violet coloration. Density was measured with Image lab software (BioRAD).

RNA isolation and gene expression analysis

Total RNA was extracted with RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions; quality and quantity were measured on a Nanodrop (Thermo Scientific). cDNA synthesis was performed with Revertaid H minus kit (Thermo Scientific). cDNA expression analysis was performed using Sybr Green (Bio-RAD) quantitative real time PCR on a StepOne (ThermoFisher Scientific). CDA forward: GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAT GGC TAT GGC CCA GAA GCG T. CDA reverse: GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CAC TGA GTC TTC TG.

Western Blot

Total cell lysate protein extraction for immunoblot analysis was performed using RIPA buffer (Biotech) (Tris-HCl 50mM pH=8, NaCl 150mM, NP40 0,5%, sodium deoxycholate 0,5%, SDS 0,1%) in the presence of protease inhibitors (Sigma). Extracts were separated by SDS-PAGE under reducing conditions, transferred to a nitrocellulose membrane and analysed by immunoblotting for cleaved PARP (bethyl 9541), Cleaved caspase-3 (Cell signalling #9664, 1:1000), P-Chk1 S345 (Cell signaling #2348, 1:1000), Chk1 (Cell signaling #2360, 1:1000), CDA (abclonal A13959, 1:1000), FLAG, (Sigma Aldrich F1804, 1:5000), GAPDH (Cell signaling #5174, 1:5000), actin β (santa cruz sc-47778, 1:2000), HSP90 (Cell signaling #4874, 1:2000), SP1 (Santa cruz sc-59 1:5000), 4EBP1 (Cell signalling #9644 1:5000), PCNA (Sigma Aldrich P8825), MCM7 (Abcam ab2360). Appropriate HRP conjugate secondary antibodies were from Promega. Signal was detected using the ECL system (BioRAD) according to the manufacturer's instructions. Densitometry of the blots was done using Chemidoc (BioRAD) and image Lab software.

Cytoplasmic/nuclear extract isolation was performed as following: cell pellet was resuspended in 10mM TRIS, pH 7.4 containing 1.5mM MgCl₂, 5mM KCl, 0.5mM dithiothreitol, 0.5%NP40 and 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride complemented with protease inhibitors and incubated on ice for 10min. The mixture was centrifuged for 15min at 4°C at 2000 rpm. Supernatant was collected (cytoplasmic fraction) and the pellet was washed and centrifuged twice with the same buffer as previously. The pellet was then resuspended in 20mM TRIS, 0.025% glycerol, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.2mM EDTA, 0.5mM dithiothreitol and 0.4M NaCl complemented with protease inhibitors and incubated on ice for 15min. The mixture was centrifuged 20min at 4°C at 12000rpm and supernatant was collected (nuclear fraction).

Indirect immunofluorescence protocol

Cells were seeded in 6-well or 12-well plates, containing coverslips, in 1-3mL of complete medium. Medium was changed and cells were treated 24h after seeding. For the study of cells in S-phase, EdU 10 μ M (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, ThermoFisher Scientific) diluted in fresh medium was added in the well for 10 minutes (MIA PaCa-2), 15 minutes (Capan-1) or 20 minutes (BxPC-3). Then, cells were pre-extracted with 0.2% triton 3 minutes, fixed in 4% PFA 15 minutes and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 20 minutes. For revealing EdU, the Click-iT EdU Imaging kits protocol (ThermoFisher Scientific) was followed. Samples were blocked with PBS 5% BSA. Primary antibodies were mouse anti-phospho-Histone (Ser139) (JBW301, Milipore 05-636, 1:1000), rabbit anti-phospho-53BP1 (S1778)

(Cell Signaling #2675, 1:1000), rabbit anti-phospho-RPA2 (S4-S8) (Bethyl A300-245A, 1:500), rabbit anti-RPA70 (Cell Signaling #2267, 1:500), rabbit anti-FANCD2 (NOVUSBIO NB100-182, 1:1000) and rabbit anti-53BP1 (Bethyl A300-272A, 1:2500). DNA was stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and images acquired as followed. Images acquires on Nikon DS-Qi2 fluorescence microscope and ImageJ and CellProfiler were used to quantify the number of foci and staining intensity per nucleus. For each condition, at least 500 cells were measured. For quantification in early mitotic cells, at least 50 prophase and pro-metaphase cells were counted.

DNA fibre assay

Cells were seeded in Ø6cm petri dishes in 3mL of complete medium. Cells were incubated with 50µM IdU and 100µM CldU for 30 minutes at 37°C, with washing between the two pulses. Cells were harvested, resuspended (0.5×10^6 – cells/mL in PBS) and 2µL were spotted onto microscope slides after what were added 7µL of lysis buffer (200mM TriHCl pH7.4, 50mM EDTA 0.5M, 0.5% SDS). Glass slides were tilted and dried overnight, DNA spreads were then fixed in ethanol/acetic acid (3:1) 20 minutes at -20°C. Samples were incubated in Pepsin Buffer (0.5mg/mL Pepsin, 30mM HCl) at 37°C for 20 minutes, denaturated in HCl 2.5M at 37°C for 45 minutes and blocked in PBS 1% BSA 0.1% tween-20. DNA fibers were incubated with mouse-FITC-anti-bromodeoxyuridine (detects IdU, B44, Becton Dickinson, 1:50) and rat-anti-bromodeoxyuridine (detects CldU, abcam ab6326, 1:100), at 37°C for 1 hour and then with anti-mouse IgG AlexaFluor 488 (Invitrogen A11029, 1:200) and anti-rat IgG AlexaFluor 555 (Invitrogen A21094, 1:200), at 37°C for 1 hour. Images were acquired on Nikon DS-Qi2 fluorescence microscope and Axio Observer Z1 Zeiss and ImageJ was used to quantify the length of DNA tracks in µm. In each condition, at least 100 fibres were measured.

iPOND assay

EdU-labeled sample preparation. MIA PaCa-2 cells overexpressing CDA-FLAG (~ 2×10^8 cells per condition) were incubated with 10µM of EdU for 15 minutes. For pulse-chase experiments with thymidine, EdU-labeled cells were washed once with warm media to remove the EdU and then incubated with 10µM thymidine for 2 hours. Next, cells were cross-linked in 2% PFA for 15 minutes, quenched using 0.125M glycine and washed with three times with PBS. Collected cell pellets were frozen at -80°C. Cells were permeabilized with 0.5% triton for 30 min and click chemistry was used to conjugate biotin-TEG-azide (Eurogentec) to EdU-labelled DNA in PBS containing 10 mM sodium Ascorbate, 10 µM biotin-TEG-azide, 2 mM CuSO₄. Cells were re-suspended in lysis buffer (10 mM Hepes-NaOH; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA PH8; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF; 0.2% SDS; 0.1% Sarkozyl) and sonication was performed using a Qsonica sonicator with the following settings: 30% power, 20 sec constant pulse and 50 sec pauses for a total sonication time of 5 min on ice with water. Lysates were centrifuged at 13,200 rpm for 10 mins at RT. Supernatants were normalized by DNA quantification using a nanodrop device. Biotin conjugated DNA-protein complexes were captured using overnight incubation with magnetic beads coated with streptavidin (Ademtech). Captured complexes were washed with lysis buffer and 500 mM NaCl. Proteins associated with nascent DNA were eluted under reducing conditions by boiling into SDS sample buffer for 30 min at 95°C and analyzed by Western blot.

RNAseq data analysis

RNA-seq data was first converted from Illumina format to fastq using `bcl2fastq` (https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/bcl2fastq-conversion-software.html). Quality control was performed with `fastqc` and adaptor sequences were trimmed using `Trimmomatic`. Quality control with `fastqc` was run again after adaptor removal. Gene expression was quantified at the transcript level by `Salmon`. Import of Transcript-level abundances and counts from `Salmon` and name conversion to `HUGO` gene symbols was performed with the `tximport` R package. Differential expression analysis was performed with `DeSeq2` using CTRL samples as the reference for the sign of the `log2FoldChange`.

Functional enrichment

Enrichment analyses were performed using GSEA `Hallmarks` and Reactome and most other pathways were extracted from `MSigDB`. No genes were removed during the analysis.

TCGA

HTSeq counts for pancreas were downloaded from the `gdc portal`. Curated pancreas samples were filtered based on information from¹⁸. Samples were classified according to low (less than second quartile), normal (between second and third quartile) and high (higher than third quartile) values of CDA expression. Differential expression analysis comparing low CDA vs high CDA samples was performed with `DeSeq` using low samples as the reference for the sign of the `log2FoldChange`. A similar procedure was used to define the low/high `DHODH/BRCA/POLQ` sample sets.

Instability signatures and metrics

The CINSARC signature gene list was obtained from²⁷. Aneuploidy score and Mutational Load score (number of mutations per Mb) data was downloaded from the `gdc portal`.

Statistical analysis

Unpaired Student's *t*- or Wilcoxon-Mann-Whitney tests were used to determine the statistical significance of differences between two groups using GraphPad Prism 9 software with the default settings. Methods of statistical analysis are indicated in the figure captions. Values are presented as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.005$ and **** $P < 0.001$. Error bars are s.e.m. unless otherwise stated. The experiments were performed with a sample size n greater than or equal to three replicates and the results from representative experiments were confirmed in at least two independent experiment repeats and multiple cell lines. For the animal studies, female mice were used in an age-matched manner. Sample sizes ($n \geq 5$ mice) were calculated using a *t*-test for two-group independent samples (ensuring that a power of 0.8 was reached) and a significance level of 0.05. $P < 0.05$ was considered statistically significant. When monitoring tumor growth, the investigators were blinded to the group allocation during bioluminescence imaging but were aware of group allocation when

assessing the outcome. For the other experiments, sample size was determined empirically based on our preliminary or previous studies; experiments were not randomized; and the investigators were not blinded to allocation during the experiments or outcome assessment. No data were excluded from the analyses.

Acknowledgements

The authors would like to thank the financial support of Fondation Toulouse Cancer Santé, Inserm, Région Occitanie, Université Paul Sabatier UT3 and Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors thank Ms Emilie Martin for technical assistance and Mr Jacobo Solorzano for data analysis. The authors thank Pr Jérôme Cros and Dr Jérôme Torrisani for helpful discussions.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. CDA is overexpressed in PDAC tumors and essential to cell proliferation and tumor growth.

A. Expression of CDA mRNA in pancreatic tumors and matched normal tissue (n=37) from CHU Toulouse and Idibell cohorts. ***p<0.001 (Wilcoxon-Mann-Whitney test). **B.** CDA mRNA expression in PDAC tumors from TCGA with basal (n=37) or classic (n=40) molecular subtype. p<0.005. **C.** Kaplan Meyer survival plot for CDA expression in PDAC patients (n=41). **D.** Proliferation of CDA-depleted and control MIA PaCa-2 cells measured with the IncuCyte Zoom. Representative of at least three independent experiments performed in triplicate. ***p<0.001 (unpaired t-test) **E.** Colony formation assay of CDA-depleted vs MIA PaCa-2 control cells. Representative of four independent experiments performed from four different transductions and mean quantification of colony areas. *: p-value < 0.05 respectively (unpaired t-test). **F.** Annexin V staining of MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells, stably expressing or not CDA hairpins. Mean of four independent experiments from three different transductions. *: p-value < 0.05 (unpaired t-test). **G.** Western blotting of key apoptotic proteins: cleaved PARP, cleaved caspase 3 in CDA-depleted vs MIA PaCa-2 control cells. Representative of seven and five independent experiments respectively. **H.** Representative tumor formation and growth monitoring in mice with CDA-depleted or control MIA PaCa-2 experimental tumors.

Figure 2. CDA increases replication fork speed and restart efficiency in PDAC cells. Enrichment plots for DNA replication pathway (GSEA-Reactome) of **(A)** CDA high expressing TCGA PDAC samples (high CDA n=39, low CDA n=38) and **(B)** MIA PaCa-2 cells overexpressing CDA. Such enrichment was not found in cells overexpressing the catalytic mutant of CDA. Representative of 5 independent transduction pools. **C.** Schematic procedure of DNA stretching experiment. IdU = 5-Iodo-2'-deoxyuridine, CldU = 5-chloro-2'-deoxyuridine. **D.** Immunofluorescence detection of IdU (green) and CldU (red) DNA tracks after DNA stretching of MIA PaCa-2 overexpressing or not CDA, white arrows show the measured red tracks. **E.** Quantification of the length of DNA tracks (μm), at least 100 DNA fibres were measured per condition. ***: p<0.001 (Wilcoxon-Mann-Whitney test). **F.** Immunofluorescence detection of IdU (green) and CldU (red) DNA tracks after DNA stretching of control MIA PaCa-2 cells, or cells overexpressing CDA,

white arrows show the measured CldU tracks. HU: Hydroxyurea, treatment at 4mM for 1h. **G.** Quantification of the length of CldU tracks after HU treatment (μm), at least 70 DNA fibres were measured per condition. Results are representative of 3 independent transduction pools. ****: $p < 0.0001$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test). **H.** IPOND experiment in MIA PaCa-2 cells overexpressing CDA-FLAG. PCNA and MCM7 were used as control. Cells were treated with EdU and revealed or not with Click-it EdU (EdU- and EdU+, respectively). After EdU incorporation, cells were treated with Thymidine to chase EdU and to address whether candidate proteins progress with replication fork. Results are representative of four independent experiments.

Figure 3. CDA controls replication stress levels in PDAC cells. **A.** Immunofluorescence detection of IdU (green) and CldU (red) DNA tracks after DNA stretching of MIA PaCa-2 cells expressing or not CDA hairpins, white arrows show the measured red tracks, Aphidicoline treatment 24h at $0,2\mu\text{M}$ was used as a positive control of DNA elongation inhibition, IdU: iodo deoxyuridine, CldU: chloro-deoxyuridine. **B.** Quantification of the length of DNA tracks (μm), at least 150 fibres were measured per condition. Results representative of three independent experiments. ****: $p < 0.0001$ (Mann & Whitney test). **C.** Enrichment plot for Reactome activation of ATR in response to replication stress pathway in MIA PaCa-2 cells depleted for CDA (CDA hairpins), NES = 1,76, $p < 0.01$. Results are representative of three independent transduction pools. **D.** Western Blotting for P-Chk1 (S345), and Chk1 in MIA PaCa-2 cells depleted for CDA or expressing control hairpins. β -actin is used as loading control. Results are representative of three independent pools of transduction. **E.** Immunofluorescence detection of P-H2AX foci (S139) (green), DAPI (blue) and EdU (red). **F.** Quantification of γ H2AX foci in S-phase cells (EdU+), in at least 500 control cells of cells overexpressing CDA (MIA PaCa-2) and CDAE67Q (MIA PaCa-2) or depleted for CDA (CDA hairpins, BxPC-3, **G**). Results are representative of three independent transduction pools. ***: $p < 0.001$ (Mann & Whitney test). **H.** Immunofluorescence detection of P-53BP1 (green) and EdU (red). Quantification of the number of p-53BP1 foci and intensity per cell in S-phase (EdU+, red) in at least 500 cells control cells, in MIA PaCa-2 overexpressing CDA (CDA, **I**) or BxPC-3 depleted for CDA (CDA hairpins, **J**). Results are representative of three independent transduction pools of MIA PaCa-2 and two independent transduction pools of BxPC-3. ****: $p < 0.0001$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

Figure 4. CDA controls genomic instability of PDAC cells. **A.** Immunofluorescence detection of FANCD2 foci (green), DAPI (blue). **B.** Quantification of the number of FANCD2 foci in early mitotic cells (*prophase, metaphase*) in at least 100 control cells, or cells overexpressing CDA (MIA PaCa-2) or depleted for CDA (CDA hairpins, Capan-1). ****: $p < 0.0001$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test). **C.** Fluorescence detection of micronuclei using DAPI staining, white arrows show micronuclei. **D.** quantification of the percentage of MIA PaCa-2 and BxPC-3 cells with at least one micronucleus. Results are representative of three independent transduction pools. *: $p < 0.05$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test). **E.** Immunofluorescence detection of 53BP1 bodies (green) and DAPI (blue). **F.** Quantification of the number of 53BP1 bodies in G_1 cells in at least 1000 control cells and cells expressing CDA hairpins. Results are representative of three independent transduction pools. ***: $p < 0.001$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

Figure 5. CDA expression is associated with genetic instability in PDAC tumors. Enrichment plots for **A**) Activation of ATR in response to replicative stress (Reactome – GSEA) and **B**) CINSARC signatures in TCGA PDAC samples expressing high or low CDA mRNA levels. **C.** Quantification of Aneuploidy score in TCGA PDAC samples with high and low levels of CDA, DHODH, BRCA and POLQ expression. Aneuploidy score is the total number of chromosome arms containing at least one variation of copy number in an arm, per sample (Taylor et al. 2018). **: $p < 0.01$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test). **D.** Quantification of the number of non-silent mutations per Mb in TCGA PDAC samples with high and low levels of CDA, DHODH, BRCA and POLQ expression. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test) (TCGA PDAC samples: $n=39$ high CDA, $n=38$ low CDA, $n=34$ DHODH high, $n=33$ DHODH low, $n=33$ BRCA high, $n=34$ BRCA low, $n=34$ POLQ high and $n=34$ POLQ low).

Figure 6. CDA drives resistance to replication stress-inducing drugs in PDAC cells. **A.** Correlation plot of CDA expression and $\log_{10}IC_{50}$ for irinotecan in PDAC cell lines from CCLE. **B.** IC_{50} of irinotecan, SN38, cisplatin, temozolomide and mitoxantrone in PDAC cell lines with high and low CDA expression ($n=4$ for each). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (unpaired t-test). **C.** Cell confluence (%) of MIA PaCa-2 control cells or overexpressing CDA and CDAE67Q catalytically inactive mutant and treated for 72h by $10\mu M$ camptothecin. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$ (unpaired t-test). **D.** Cell confluence (%) of PDAC051T cells depleted for CDA using siRNA 72 hours after transfection. **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.001$ (unpaired t-test). **E.** Long term confluence follow-up of PDAC051T cells transfected with control or CDA siRNA, then treated by $10\mu M$ oxaliplatin ****: $p < 0.001$ (unpaired t-test). **F.** Tumor growth (fold increase) of PDAC051T cells treated by siRNA targeting CDA and receiving oxaliplatin ($n=7$). Control tumors received control siRNA and oxaliplatin ($n=6$) ***: $p < 0.005$ (unpaired t-test).

Extended Figure 1. CDA is overexpressed in PDAC tumors and essential for cell proliferation and tumor growth. **A.** CDA expression (mRNA) in pancreatic tumors (red, $n=179$) and normal pancreas (grey, $n=171$) of TCGA PDAC samples. *: $p < 0.05$ (unpaired t-test). **B.** CDA mRNA expression in primary cells from squamous and pancreatic molecular subtype. *: $p < 0.05$. **C.** CDA mRNA expression in MIA PaCa-2 receiving CDA hairpins vs control cells (control hairpins). Mean of nine independent pools of transduction. ***: $p < 0.001$ (unpaired t-test). **D.** Western Blotting of CDA in MIA PaCa-2 cells receiving CDA hairpins vs control cells (control hairpins). Representative of at least nine independent pools of transduction. Long term follow-up of cell confluence (%) of Capan-1 cells **(E)** transduced with CDA hairpins and control hairpins and **(F)** of BxPC-3 transfected with CTRL siRNA or CDA siRNA. **G.** Mean quantification of the tumor growth of MIA PaCa-2 cells expressing CDA hairpins as compared to control cells and assessed by luminescence ($n=6$ per group). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (unpaired t-test).

Extended Figure 2. CDA increases replication fork speed and restart efficiency in PDAC cells. **A.** CDA expression (mRNA) in cells overexpressing control, CDA or CDAE67Q. Representative of five transduction pools. ***: $p < 0.001$ (paired t-test). **B.** Western Blotting for CDA and FLAG in cells overexpressing control, CDA –FLAG or CDAE67Q-FLAG cells. HSP90 is used as a loading control. Representative of five transduction pools. **C.** CDA activity (relative fluorescence units) measured by CDA activity assay (fluorometric assay) in MIA PaCa-2 cells overexpressing luciferase (control), CDA

or CDAE67Q. Representative of three transduction pools. *: $p < 0.05$ (unpaired t-test). **D.** Percentage of CldU positive fibers following HU treatment, in cells overexpressing CDA versus cells overexpressing luciferase (control). Representative of three independent transduction pools. ***: $p < 0.001$ (unpaired t-test). **E.** Western Blotting of CDA-FLAG, 4EBP1 and SP1 in cytosolic and nuclear fractions of MIA PaCa-2 cells overexpression FLAG-CDA cells. Representative of three independent experiments. **F.** Schematic procedure of iPOND experiment. **G.** iPOND experiment in HeLa S3 cells. PCNA is used as control. Results are representative of 3 independent experiments.

Extended Figure 3. CDA controls replication stress levels of PDAC cells. Western Blotting for P-Chk1 (S345) and Chk1, HSP90 and GAPDH were used as loading control, in **(A)** control Capan-1 cells and Capan-1 cells expressing CDA hairpins and in **(B)** control BxPC-3 cells and BxPC-3 cells expressing CDA hairpins **C.** Quantification of the number of γ -H2AX foci per cell in S-phase in Capan-1 cells depleted of not for CDA (CDA hairpins, control hairpins). Results are representative of three independent transduction pools. ****: $p < 0.0001$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test). Quantification of the number of γ -H2AX foci in S-phase cells in MIA PaCa-2 treated with **(D)** 100 μ M of CDA inhibitors THU and DR for 72 hours or **(E)** 1mM Cytidine (C), Deoxycytidine (dC) or both for 72 hours. Results are representative of two independent experiments. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test). **F.** Quantification of RPA foci per S-phase cells (EdU+) (at least 500 cells) in MIA PaCa-2 cells overexpressing CDA versus control cells. Results are representative of three independent transduction pools. ***: $p < 0.001$ (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

Extended Figure 4. CDA controls genomic instability of PDAC cells. Quantification of the percentage of Capan-1 **(A)** or MIA PaCa-2 cells **(B)** depleted for CDA with at least one micronucleus as compared to control and. Representative of five independent experiments for Capan-1 and two independent experiments for MIA PaCa-2. **: $p < 0.01$ (paired t-test).

Extended Figure 6. CDA drives resistance to replication stress-inducing drugs in PDAC cells. **A.** Correlation plot of CDA expression and $\log_{10}IC_{50}$ Irinotecan in PDAC cell lines from CCLE. **B.** Cell confluence (%) of PDAC015T transfected with control siRNA or CDA siRNA, 72 hours after transfection. **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$, unpaired t-test. **C.** Representative captions of PDAC051T cells treated by siRNA targeting CDA and 10 μ M oxaliplatin. **D.** Individual tumor growth of tumors, 10 days following treatment by CDA siRNA and oxaliplatin (n=7) or receiving control siRNA and oxaliplatin (n=6).

REFERENCES

1. Marchal, C., Sima, J. & Gilbert, D. M. Control of DNA replication timing in the 3D genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 721–737 (2019).
2. Gaillard, H., García-Muse, T. & Aguilera, A. Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 276–289 (2015).
3. Kotsantis, P., Petermann, E. & Boulton, S. J. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *Cancer Discov.* 8, 537–555 (2018).
4. Rahib, L. et al. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res.* 74, 2913–2921 (2014).
5. Bailey, P. et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 531, 47–52 (2016).
6. Waddell, N. et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518, 495–501 (2015).
7. Golan, T. et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* 381, 317–327 (2019).
8. Dreyer, S. B. et al. Targeting DNA Damage Response and Replication Stress in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 160, 362-377.e13 (2021).
9. Hammel, P. et al. Maintenance therapies in metastatic pancreatic cancer: present and future with a focus on PARP inhibitors. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 12, 1758835920937949 (2020).
10. Hammel, P. et al. PARP inhibition in treatment of pancreatic cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 20, 939–945 (2020).
11. Frances, A. & Cordelier, P. The Emerging Role of Cytidine Deaminase in Human Diseases: A New Opportunity for Therapy? *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 28, 357–366 (2020).
12. Flanagan, M. & Cunniff, C. M. Bloom Syndrome. in *GeneReviews*[®] (eds. Adam, M. P. et al.) (University of Washington, Seattle, 1993).
13. Crooke, S. T. & Prestayko, A. W. *Antineoplastic Agents*. (Elsevier, 2013).
14. Serdjebi, C. et al. Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. *Pharmacogenomics* 14, 1047–1051 (2013).
15. Geller, L. T. et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* 357, 1156–1160 (2017).

16. Zauri, M. et al. CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer. *Nature* 524, 114–118 (2015).
17. Hessmann, E. et al. Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* 67, 497–507 (2018).
18. Nicolle, R. et al. Prognostic Biomarkers in Pancreatic Cancer: Avoiding Errata When Using the TCGA Dataset. *Cancers* 11, (2019).
19. Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K. & Biankin, A. V. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 207–220 (2019).
20. Puleo, F. et al. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* 155, 1999–2013.e3 (2018).
21. Rashid, N. U. et al. Purity Independent Subtyping of Tumors (PurIST), A Clinically Robust, Single-sample Classifier for Tumor Subtyping in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 26, 82–92 (2020).
22. Gemble, S. et al. Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA. *PLoS Genet.* 11, e1005384 (2015).
23. Simpson, B. S., Pye, H. & Whitaker, H. C. The oncological relevance of fragile sites in cancer. *Commun. Biol.* 4, 1–4 (2021).
24. Madireddy, A. et al. FANCD2 Facilitates Replication through Common Fragile Sites. *Mol. Cell* 64, 388–404 (2016).
25. Chan, K. L., Palmai-Pallag, T., Ying, S. & Hickson, I. D. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat. Cell Biol.* 11, 753–760 (2009).
26. Ye, C. J. et al. Micronuclei and Genome Chaos: Changing the System Inheritance. *Genes* 10, 366 (2019).
27. Lagarde, P. et al. Mitotic checkpoints and chromosome instability are strong predictors of clinical outcome in gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 826–838 (2012).
28. Masuda, N. et al. CPT-11: a new derivative of camptothecin for the treatment of refractory or relapsed small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 10, 1225–1229 (1992).
29. Fraunhofer, N. A. et al. Evidencing a Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Subpopulation Sensitive to the Proteasome Inhibitor Carfilzomib. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 26, 5506–5519 (2020).

30. Ubhi, T. & Brown, G. W. Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment. *Cancer Res.* 79, 1730–1739 (2019).
31. Buettner, R. et al. Leflunomide Synergizes with Gemcitabine in Growth Inhibition of PC Cells and Impairs c-Myc Signaling through PIM Kinase Targeting. *Mol. Ther. Oncolytics* 14, 149–158 (2019).
32. Koundinya, M. et al. Dependence on the Pyrimidine Biosynthetic Enzyme DHODH Is a Synthetic Lethal Vulnerability in Mutant KRAS-Driven Cancers. *Cell Chem. Biol.* 25, 705–717.e11 (2018).
33. Técher, H., Koundrioukoff, S., Nicolas, A. & Debatisse, M. The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat. Rev. Genet.* 18, 535–550 (2017).
34. Alabert, C. et al. Nascent chromatin capture proteomics determines chromatin dynamics during DNA replication and identifies unknown fork components. *Nat. Cell Biol.* 16, 281–293 (2014).
35. Prem veer Reddy, G. & Pardee, A. B. Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 3312–3316 (1980).
36. veer Reddy, G. P. & Pardee, A. B. Coupled ribonucleoside diphosphate reduction, channeling, and incorporation into DNA of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 257, 12526–12531 (1982).
37. Bartkova, J. et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633–637 (2006).
38. Buscail, L., Bournet, B. & Cordelier, P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 153–168 (2020).
39. Sicard, F., Gayral, M., Lulka, H., Buscail, L. & Cordelier, P. Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 986–994 (2013).
40. du Rieu, M. C. et al. MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin. Chem.* 56, 603–612 (2010).
41. Diaz-Riascos, Z. V. et al. Expression and Role of MicroRNAs from the miR-200 Family in the Tumor Formation and Metastatic Propensity of Pancreatic Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 17, 491–503 (2019).
42. Cambi, A. et al. Identification of four amino acid residues essential for catalysis in human cytidine deaminase by site-directed mutagenesis and chemical modifications. *Protein Eng.* 11, 59–63 (1998).

Figure 1

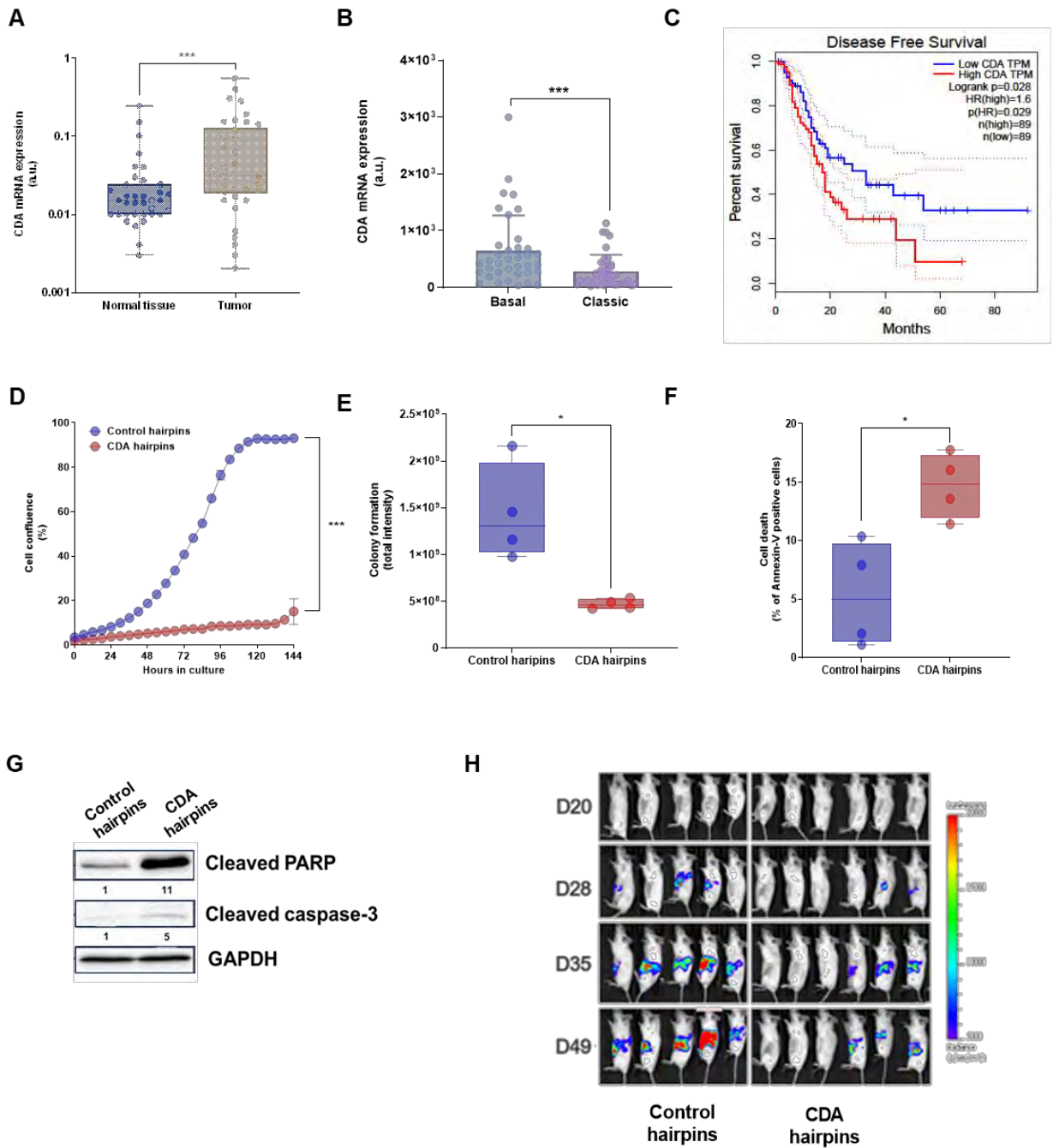


Figure 2

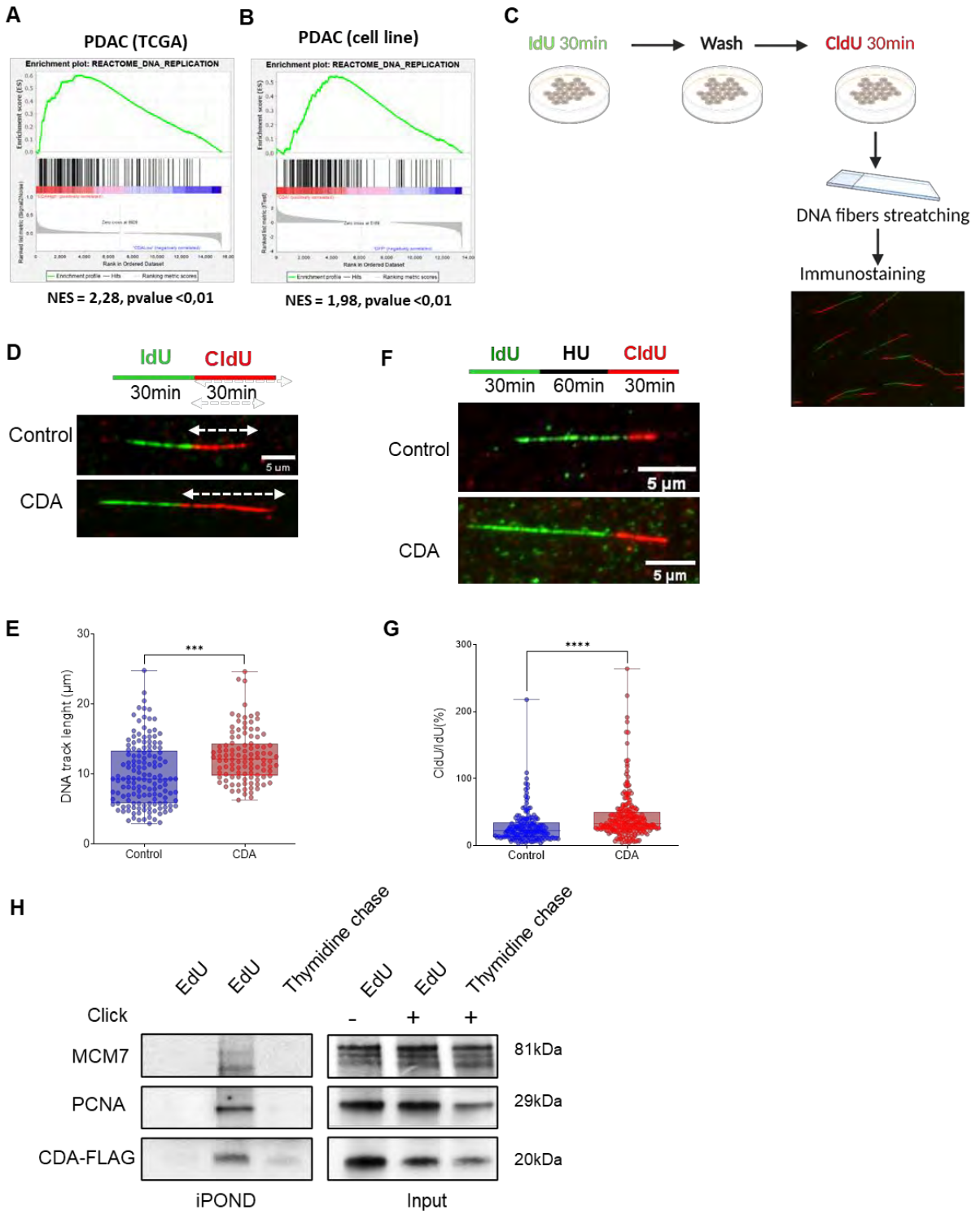


Figure 3

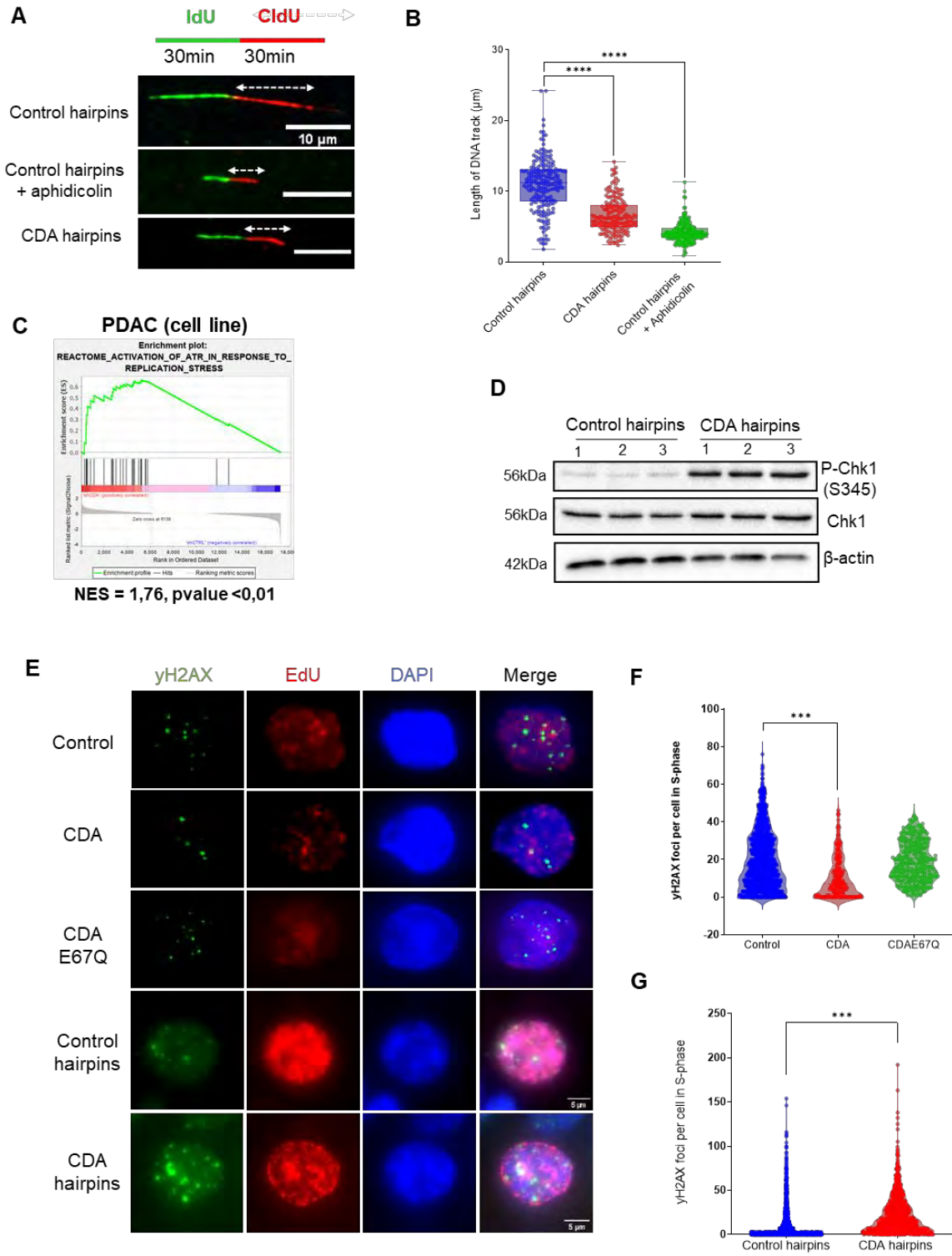
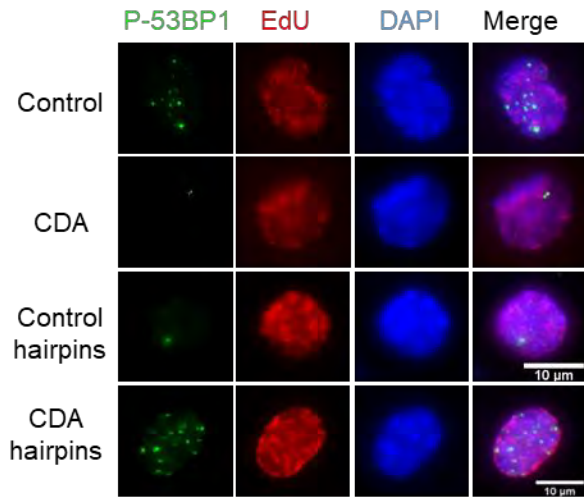
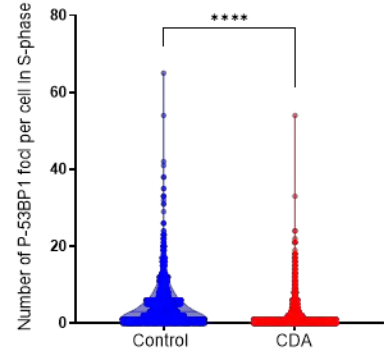


Figure 3 (continued)

H



I



J

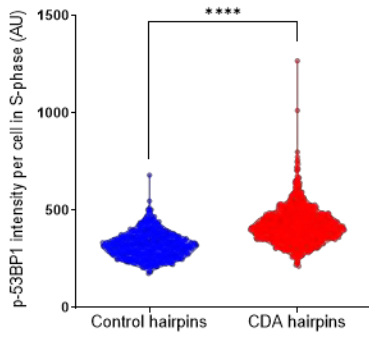


Figure 4

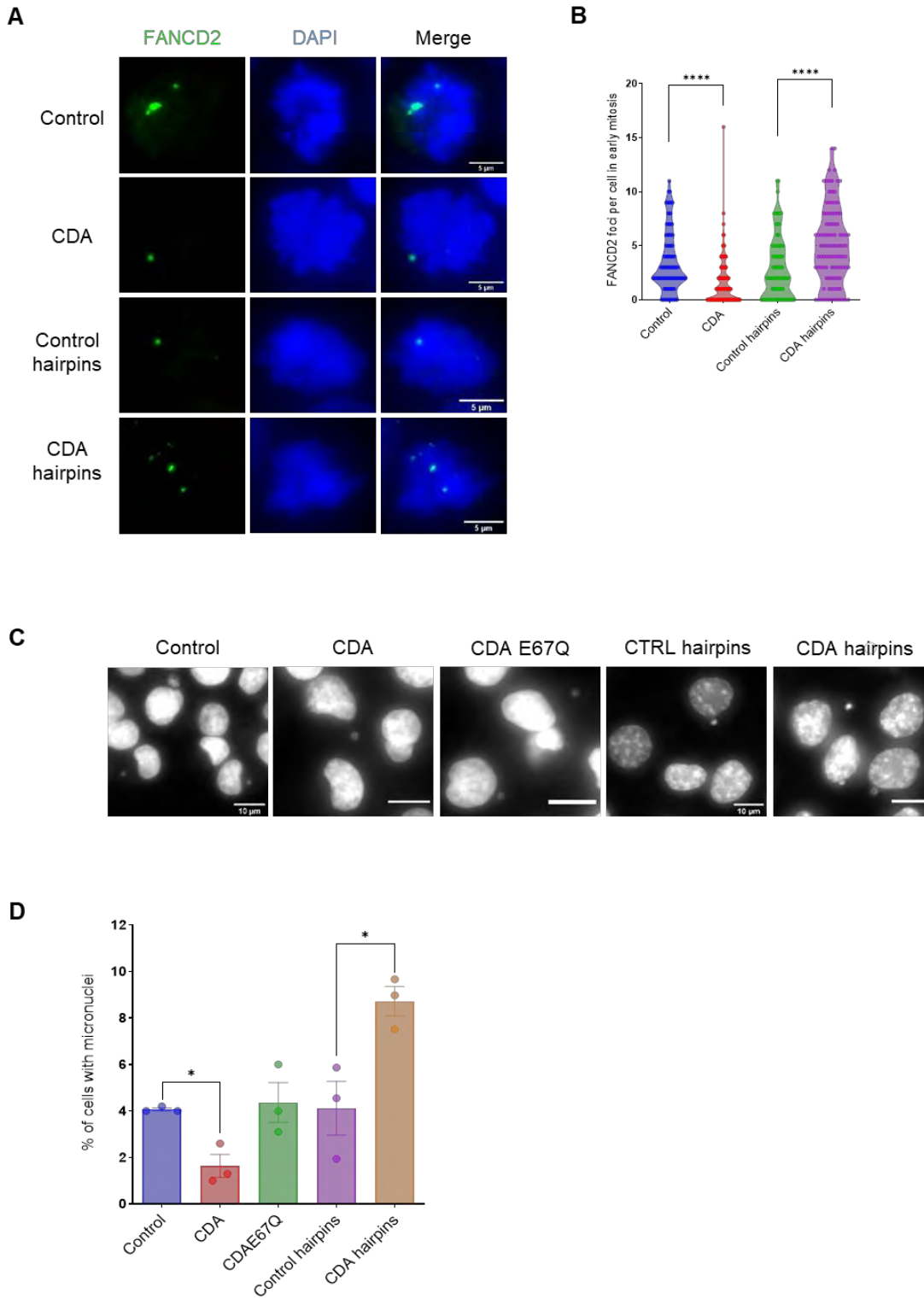
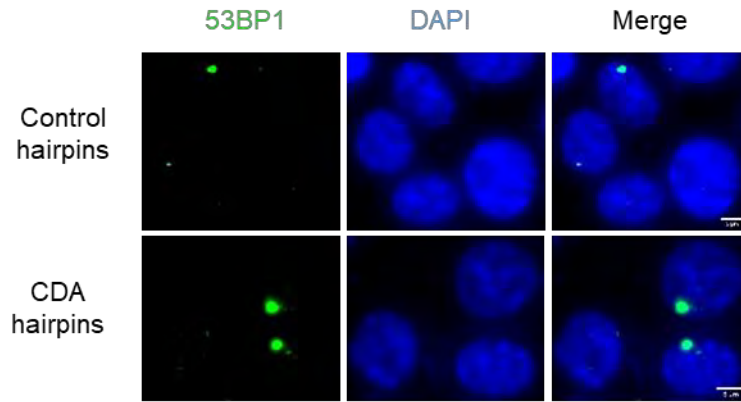


Figure 4 (continued)

E



F

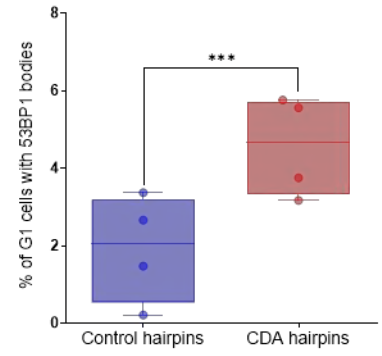
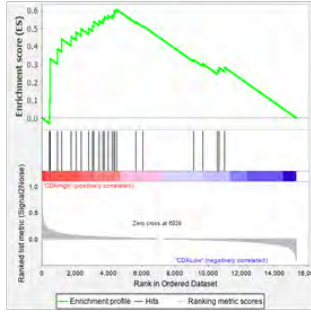


Figure 5

A

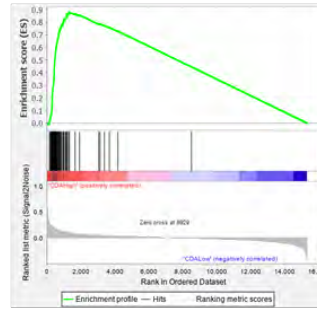
Enrichment plot: Reactome – Activation of ATR in response to replicative stress



NES = 1,72, p = 0,01

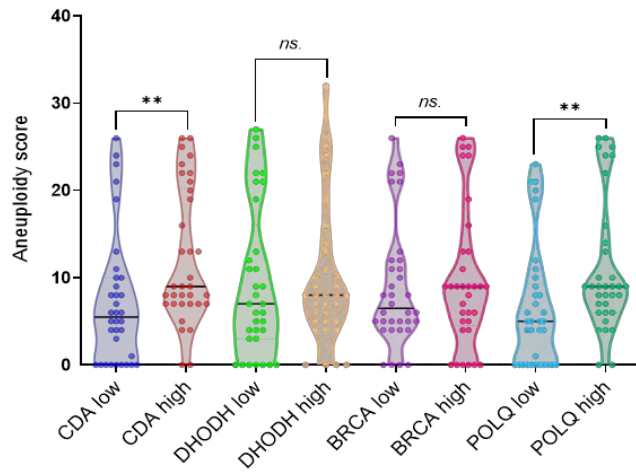
B

Enrichment plot: CINSARC



NES = 2,83, p < 0,01

C



D

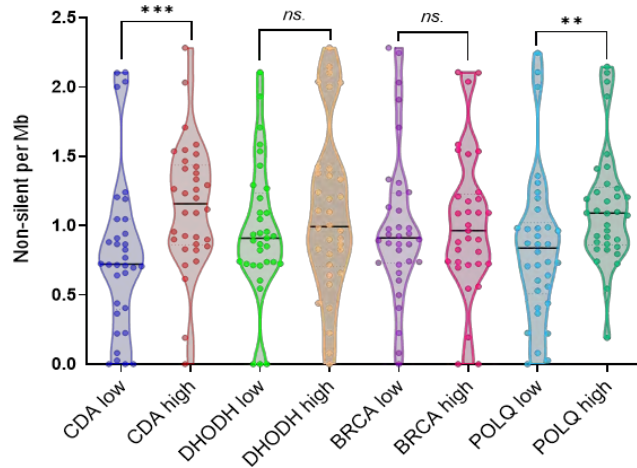


Figure 6

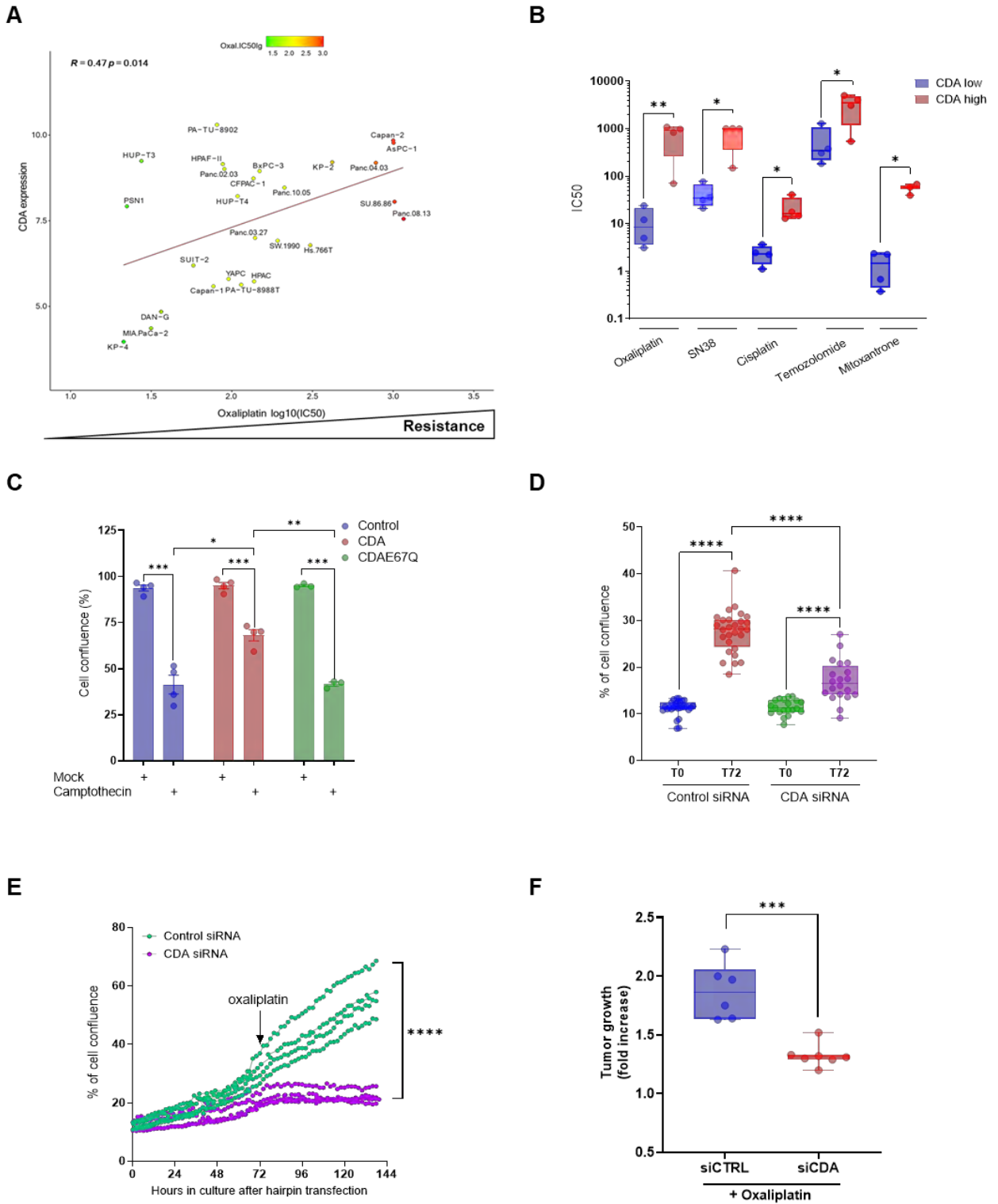


Figure 1 - extended

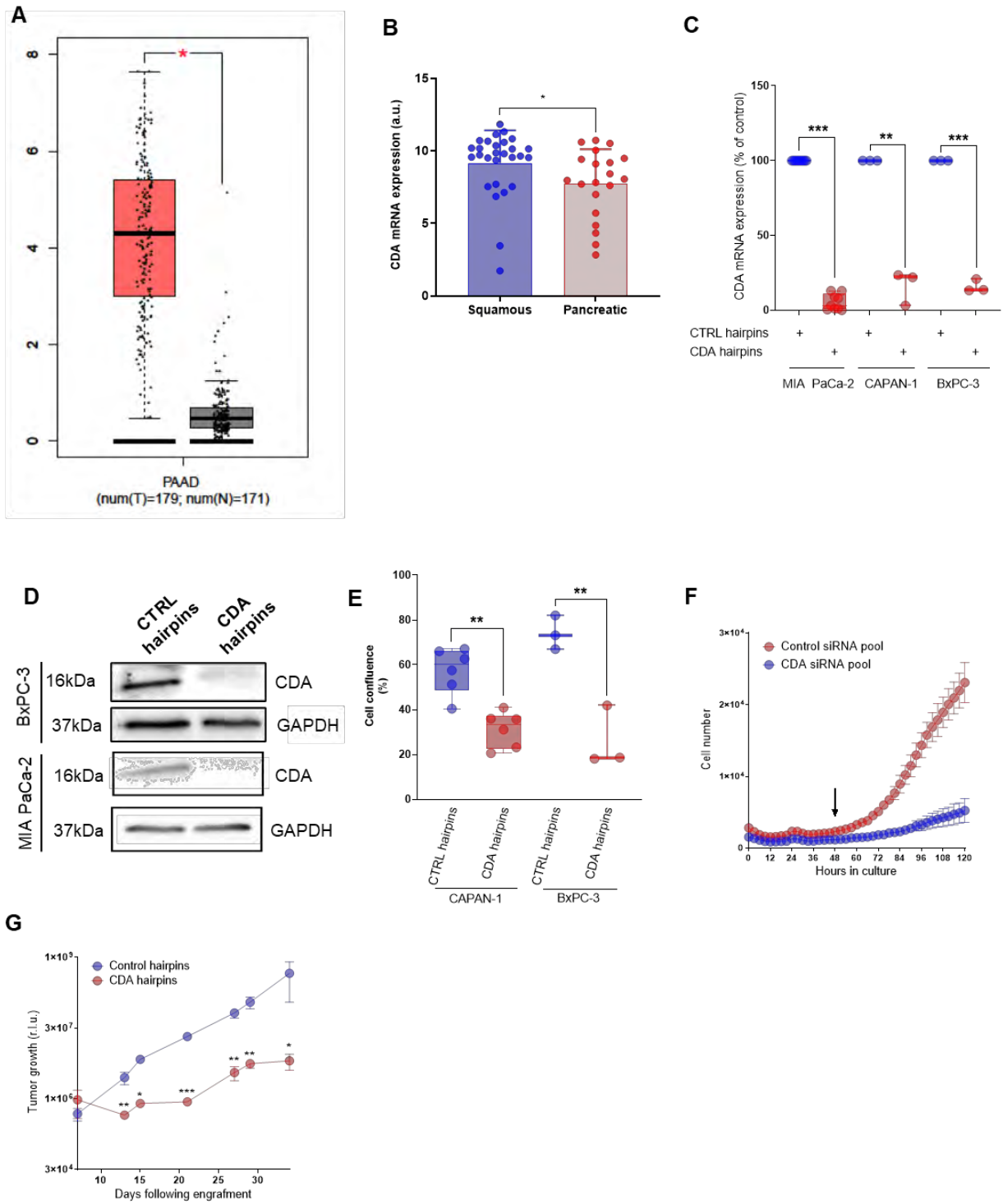


Figure 2 - extended

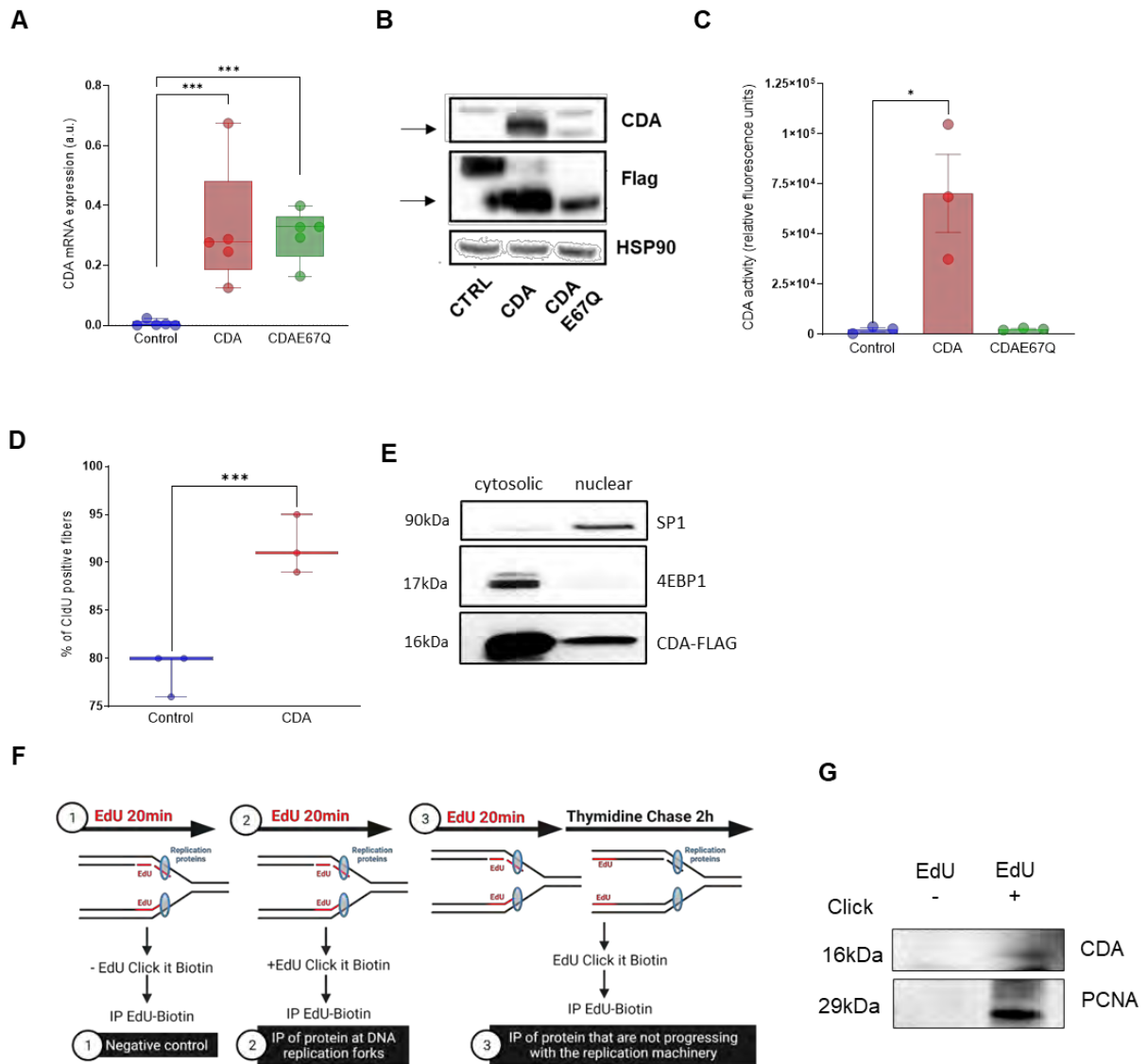


Figure 3 - extended

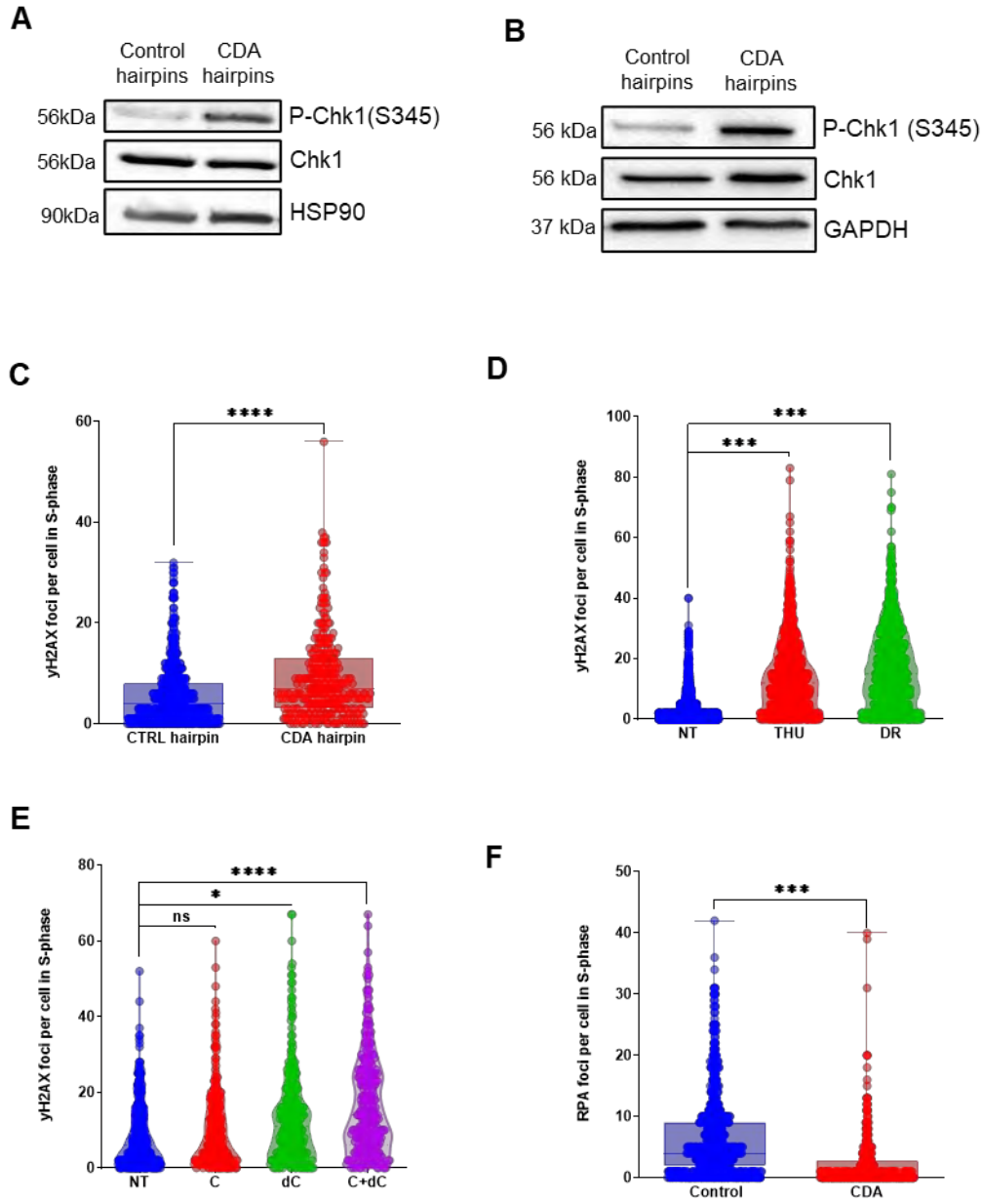
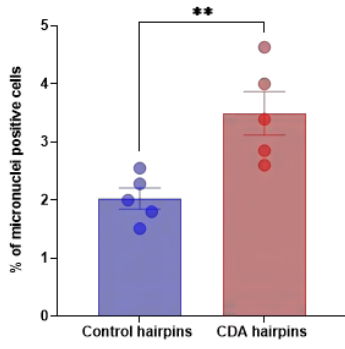


Figure 4 - extended

A



B

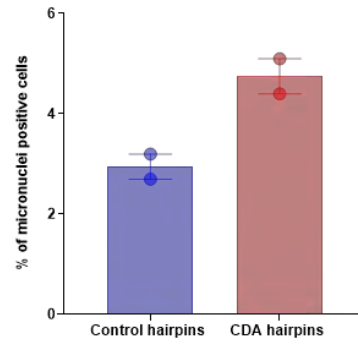
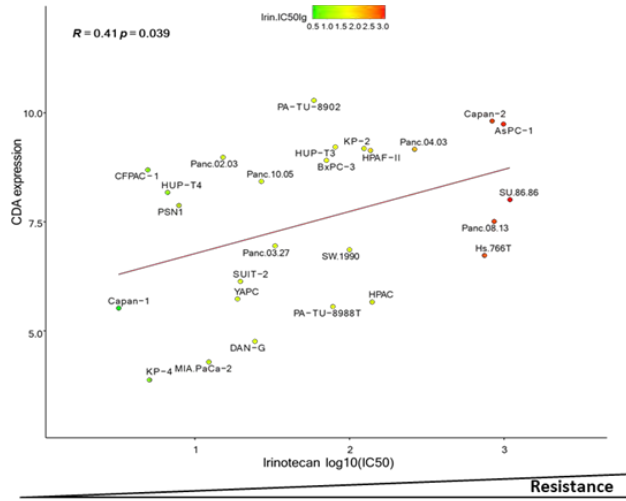
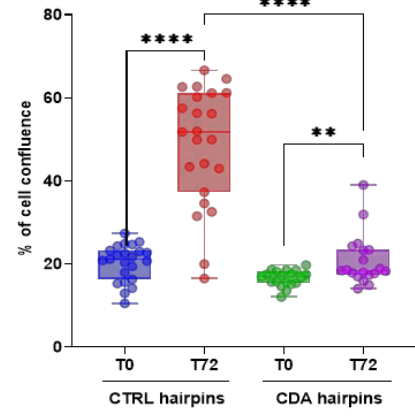


Figure 6 - extended

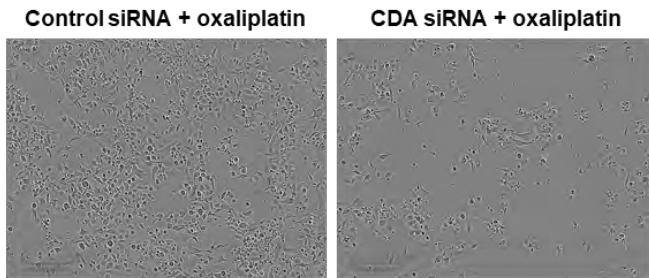
A



B



C



D

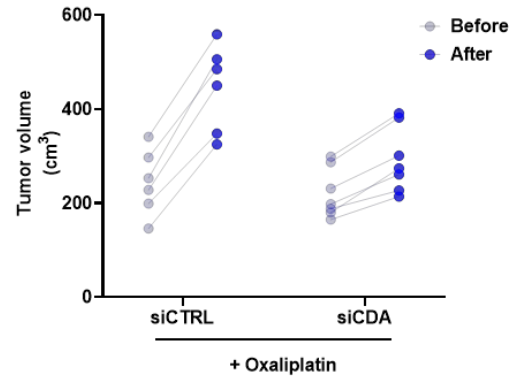


Table 1

NAME	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	SIZE
REACTOME_DEPOSITION_OF_NEW_CENPA_CONTAINING_NUCLEOSOMES_AT_THE_CENTROMERE	0,7848	2,3021	0	0	36
REACTOME_DNA_REPLICATION	0,6038	2,2845	0	0	157
REACTOME_CELL_CYCLE	0,5649	2,2644	0	0	319
REACTOME_MITOTIC_M_M_G1_PHASES	0,6025	2,2103	0	3,08E-04	142
REACTOME_RNA_POL_I_PROMOTER_OPENING	0,7806	2,1812	0	2,47E-04	29
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC	0,5591	2,1782	0	2,05E-04	260
REACTOME_PACKAGING_OF_TELOMERE_ENDS	0,7957	2,1750	0	1,76E-04	26
REACTOME_MITOTIC_G1_G1_S_PHASES	0,6025	2,1483	0	3,04E-04	112
REACTOME_G1_S_TRANSITION	0,6199	2,1140	0	4,09E-04	92
REACTOME_MITOTIC_PROMETAPHASE	0,6241	2,0892	0	6,20E-04	69
REACTOME_S_PHASE	0,6146	2,0736	0	6,81E-04	90
REACTOME_CHROMOSOME_MAINTENANCE	0,6096	2,0627	0	6,24E-04	81
REACTOME_RNA_POL_I_TRANSCRIPTION	0,6463	2,0334	0	9,58E-04	52
REACTOME_TELOMERE_MAINTENANCE	0,6617	2,0177	0	0,0012	46
REACTOME_SYNTHESIS_OF_DNA	0,6040	2,0176	0	0,0011	76
REACTOME_CYCLIN_E_ASSOCIATED_EVENTS_DURING_G1_S_TRANSITION_	0,6380	2,0032	0	0,0013	58
REACTOME_SCF5K2_MEDIATED_DEGRADATION_OF_P27_P21	0,6575	1,9924	0	0,0016	49
REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS	0,5721	1,9921	0	0,0015	101
REACTOME_MEIOTIC_RECOMBINATION	0,6379	1,9761	0	0,0018	51
REACTOME_REGULATION_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	0,5947	1,9720	0	0,0018	72
REACTOME_ORC1_REMOVAL_FROM_CHROMATIN	0,6226	1,9647	0	0,0020	57
REACTOME_GAP_JUNCTION_TRAFFICKING	0,7490	1,9558	0	0,0022	22
REACTOME_INTERFERON_ALPHA_BETA_SIGNALING	0,6106	1,9433	0	0,0026	57
REACTOME_MEIOTIC_SYNOPSIS	0,6343	1,9271	0	0,0031	45

Table 2

NAME	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	SIZE
REACTOME_PD1_SIGNALING	0,8315	1,9941	0	0,0240	18
REACTOME_INTERFERON_SIGNALING	0,5695	1,9797	0	0,0167	144
REACTOME_DNA_REPLICATION	0,5610	1,9787	0	0,0111	158
REACTOME_G1_S_TRANSITION	0,5836	1,9270	0	0,0183	96
REACTOME_MITOTIC_M_M_G1_PHASES	0,5584	1,9256	0	0,0148	139
REACTOME_ORC1_REMOVAL_FROM_CHROMATIN	0,6198	1,8950	0	0,0200	59
REACTOME_METABOLISM_OF_NUCLEOTIDES	0,6164	1,8950	0	0,0171	64
REACTOME_M_G1_TRANSITION	0,6013	1,8905	0	0,0153	70
REACTOME_ASSEMBLY_OF_THE_PRE_REPLICATIVE_COMPLEX	0,6245	1,8836	0	0,0145	57
REACTOME_CYTOKINE_SIGNALING_IN_IMMUNE_SYSTEM	0,5075	1,8828	0	0,0135	246
REACTOME_INTERFERON_ALPHA_BETA_SIGNALING	0,6130	1,8768	0	0,0137	59
REACTOME_SYNTHESIS_OF_DNA	0,5833	1,8587	0	0,0175	81
REACTOME_PYRIMIDINE_METABOLISM	0,7429	1,8552	0,0036	0,0169	22
REACTOME_PURINE_METABOLISM	0,6899	1,8265	0,0036	0,0241	30
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC	0,4919	1,8186	0	0,0254	263
REACTOME_S_PHASE	0,5482	1,8122	0	0,0253	96
REACTOME_SIGNALING_BY_FGFR1_MUTANTS	0,7015	1,8100	0	0,0245	26
REACTOME_P53_INDEPENDENT_G1_S_DNA_DAMAGE_CHECKPOINT	0,6086	1,8030	0	0,0248	48
REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS	0,5517	1,8007	0	0,0240	101
REACTOME_CDT1_ASSOCIATION_WITH_THE_CDC6_ORC_ORIGIN_COMPLEX	0,6076	1,7951	0	0,0245	48
REACTOME_MITOTIC_G1_G1_S_PHASES	0,5302	1,7593	0	0,0378	116
REACTOME_REGULATION_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	0,5443	1,7516	0,0032	0,0396	75
REACTOME_CDK_MEDIATED_PHOSPHORYLATION_AND_REMOVAL_OF_CDC6	0,5946	1,7431	0,0050	0,0424	46
REACTOME_PHOSPHORYLATION_OF_CD3_AND_TCR_ZETA_CHAINS	0,7450	1,7382	0,0019	0,0429	16

Table 3

NAME	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	SIZE
REACTOME_BETA_DEFENSINS	0,7506	2,1023	0,0000	0,0012	35
REACTOME_HOMOLOGOUS_DNA_PAIRING_AND_STRAND_EXCHANGE	0,6858	1,9156	0,0000	0,0345	34
REACTOME_ACTIVATION_OF_ATR_IN_RESPONSE_TO_REPLICATION_STRESS	0,6609	1,7577	0,0000	0,2422	29
REACTOME_G2_M_DNA_DAMAGE_CHECKPOINT	0,5754	1,7292	0,0000	0,2450	49
REACTOME_ACTIVATION_OF_THE_PRE_REPLICATIVE_COMPLEX	0,6516	1,6981	0,0102	0,2891	25
REACTOME_HDR_THROUGH_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION_HRR_	0,5503	1,6852	0,0085	0,2800	54
REACTOME_HDR_THROUGH_SINGLE_STRAND_ANNEALING_SSA_	0,6035	1,6719	0,0027	0,2787	31
REACTOME_G2_M_CHECKPOINTS	0,4825	1,6363	0,0000	0,3443	113
REACTOME_TP53_REGULATES_TRANSCRIPTION_OF_ADDITIONAL_CELL_CYCLE_GENES_ WHOSE EXACT ROLE IN THE P53 PATHWAY REMAIN UNCERTAIN	0,6613	1,5787	0,0332	0,5097	18
REACTOME_DIGESTION	0,6116	1,5698	0,0196	0,4975	23
REACTOME_REPRODUCTION	0,4868	1,5602	0,0033	0,4909	73
REACTOME_INTRINSIC_PATHWAY_FOR_APOPTOSIS	0,5212	1,5458	0,0112	0,5084	50
REACTOME_DNA_DOUBLE_STRAND_BREAK_REPAIR	0,4445	1,5454	0,0000	0,4707	111
REACTOME_DNA_REPLICATION_PRE_INITIATION	0,4764	1,5437	0,0000	0,4439	75
REACTOME_MEIOSIS	0,5073	1,5405	0,0151	0,4257	53
REACTOME_DEADENYLATION_OF_MRNA	0,6215	1,5332	0,0352	0,4225	19
REACTOME_ESTROGEN_DEPENDENT_NUCLEAR_EVENTS_DOWNSTREAM_OF_ESR_ MEMBRANE_SIGNALING	0,6132	1,5292	0,0230	0,4106	22
REACTOME_HOMOLOGY_DIRECTED_REPAIR	0,4639	1,5225	0,0076	0,4098	86
REACTOME_FANCONI_ANEMIA_PATHWAY	0,5616	1,5041	0,0230	0,4504	29
REACTOME_PROCESSING_OF_DNA_DOUBLE_STRAND_BREAK_ENDS	0,4915	1,5002	0,0058	0,4399	53
REACTOME_TRANSCRIPTIONAL_REGULATION_BY_E2F6	0,5435	1,4780	0,0320	0,4907	34
REACTOME_MEIOTIC_RECOMBINATION	0,5697	1,4653	0,0455	0,5140	25
REACTOME_DIGESTION_AND_ABSORPTION	0,5603	1,4616	0,0260	0,5058	28
REACTOME_GAP_FILLING_DNA_REPAIR_SYNTHESIS_AND_LIGATION_IN_GG_NER	0,5556	1,4491	0,0469	0,5290	25

Discussion

1. Mécanismes moléculaires

Cette étude révèle une nouvelle fonction de la CDA dans la régulation des niveaux de stress réplicatif et son influence sur la réponse au traitement des cellules cancéreuses pancréatiques. Tout d'abord nos résultats montrent la surexpression de la CDA dans les tumeurs pancréatiques ainsi que son importance pour le développement de tumeurs expérimentales et la prolifération cellulaire. Il aurait été intéressant de réaliser des coupes histologiques afin de marquer la CDA dans les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement (cellules stromales et bactéries). Ainsi il aurait été possible de confirmer que la surexpression de CDA, mise en évidence via l'étude l'ARN, est bien visible dans les cellules tumorales. Il est toutefois intéressant de relever que la CDA n'est pas la seule enzyme de synthèse des pyrimidines fortement exprimée dans le PDAC. En effet, d'après les données RNA-seq des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques (CCLE, cancer cell line encyclopedia), les gènes des voies de recyclage et biosynthèse des pyrimidines les plus exprimés sont CDA, DCK, UPP1 et TK1, toutes issues de la voie de recyclage des pyrimidines (voir Figure 44).

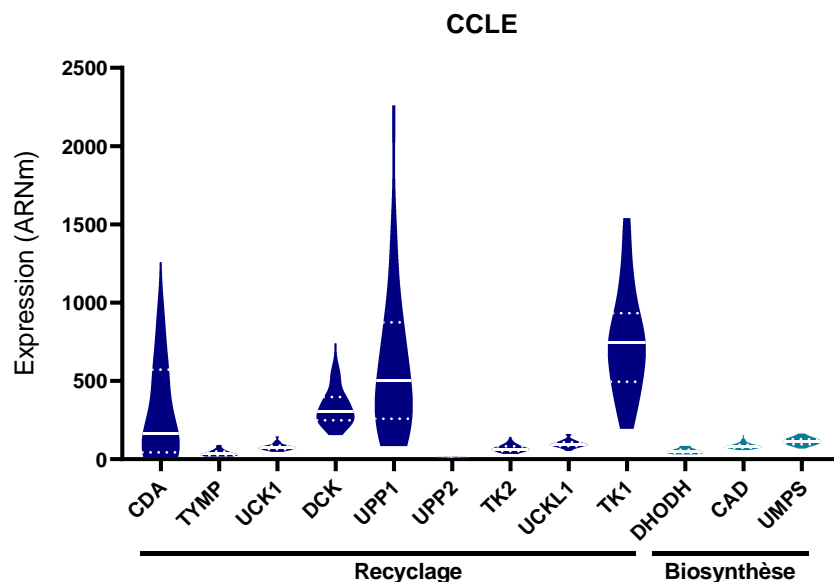


Figure 44 : Expression des ARNms ($exp(x \ln(2))$) codants pour les gènes impliqués dans le recyclage ou la biosynthèse des pyrimidines. Données extraites de la base de données CCLE (cancer cell lines atlas).

De plus, la thymidylate synthétase (TS) et la nucléoside diphosphate kinase (NDPK), qui sont nécessaires pour métaboliser l'UMP (uridine monophosphate), sont aussi fortement exprimées (résultats non montrés). En conséquent toutes les enzymes impliquées dans le métabolisme du dC/dU vers la formation du dTTP final sont très exprimées dans les lignées pancréatiques cancéreuses alors que les enzymes de biosynthèse (DHODH, CAD et UMPS) sont beaucoup plus faiblement exprimées (voir Figure 44 et Figure 45). Nous avons confirmé ces différences d'expressions de CDA et de DHODH au niveau protéique dans plusieurs lignées cancéreuses pancréatiques (non montrées). Ces résultats suggèrent que les gènes de la voie de recyclage des pyrimidines sont plus exprimés que les gènes de la voie de synthèse de novo dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

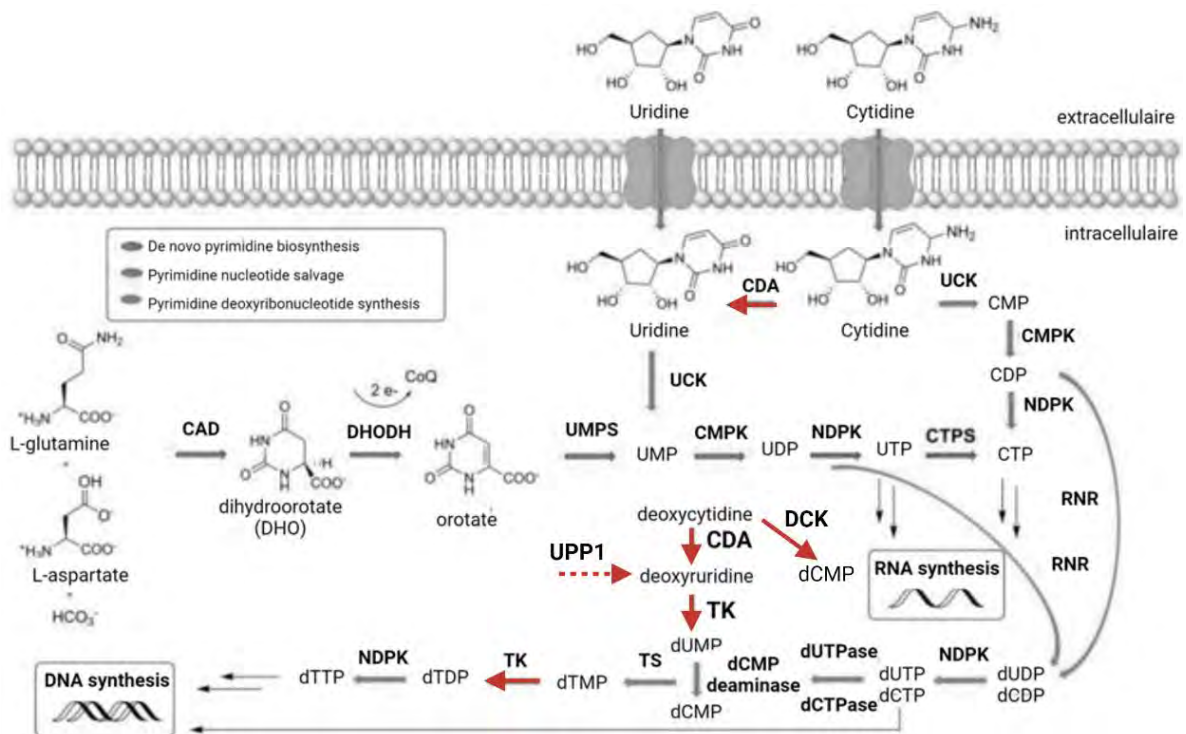


Figure 45 : Enzymes des voies de recyclage et de biosynthèse des pyrimidines les plus exprimées dans les données lignées cancéreuses pancréatiques (CCL). L'action de ces enzymes est pointée avec une flèche rouge.

Dans les données RNA-Seq de lignées cellulaires de PDAC dérivées de patients (PDCL), CAD et UMPS sont exprimés plus fortement que dans les lignées cellulaires du CCL (résultats non montrés). Cependant la DHODH, nécessaire pour la voie de biosynthèse, reste faiblement exprimée. Chaque type de cancer a sa propre dépendance pour la voie de biosynthèse ou pour la voie de recyclage des nucléotides. En effet, la contribution de chacune de ces deux voies dépend du type cellulaire et du stade de développement⁴¹¹⁻⁴¹³. Etant donné la capacité des cellules cancéreuses pancréatiques à survivre dans des conditions extrêmes de privation métabolique, jusqu'à dégrader leur matrice extracellulaire pour se fournir en nutriments⁷⁷, combinée aux données transcriptomiques présentées ci-dessus, nous suggérons que les tumeurs pancréatiques seraient dépendantes de la voie de recyclage des pyrimidines dont la CDA est essentielle. D'après nos résultats, le ciblage de la CDA est létal pour les cellules de PDAC, alors que la voie de novo toujours fonctionnelle permet de métaboliser des nucléotides, argumentant pour une dépendance des cellules cancéreuses pancréatiques pour la CDA. D'autres études fonctionnelles sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Il serait par exemple intéressant d'étudier les conséquences moléculaires de l'inhibition d'enzymes des voies de recyclage et de biosynthèse afin de mieux comprendre la dépendance des cellules cancéreuses pancréatiques pour ces deux voies.

D'autre part, nos études transcriptomiques, basées sur les tumeurs pancréatiques du TCGA et sur un modèle cellulaire de surexpression de l'enzyme, démontrent une forte corrélation entre l'expression de CDA et l'enrichissement des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (REACTOME). La

surexpression de la forme mutante de la CDA n'est pas associée à cet enrichissement. De plus, nous montrons par étalement des fibres d'ADN que la CDA augmente la vitesse des fourches de réplication. Ensuite, après un blocage des fourches de réplication par un traitement fort de HU (Hydroxy-Urée, inhibiteur de RNR), la synthèse d'ADN est aussi plus rapide dans les cellules surexprimant la CDA. Ces résultats suggèrent que la CDA aide les fourches de réplication à redémarrer plus rapidement et plus efficacement après le blocage. Sachant que l'inhibition de RNR induit une déplétion du pool de nucléotides, provenant de la voie de synthèse de novo et du recyclage des cytidines, nous pouvons imaginer que la CDA restaure le taux de pyrimidines via le recyclage des désoxycytidines en désoxyuridines, indépendamment de la RNR, via la thymidine kinase (TK) et la thymidylate synthétase (TS) (voir Figure 45). Pour confirmer cette hypothèse, il serait possible de mesurer l'efficacité de redémarrage des fourches de réplication après un blocage par le HU en co-traitement avec du 5-FU (inhibiteur de TS) afin de déterminer si l'effet protecteur de la CDA est levé ou maintenu. De plus, il serait aussi intéressant d'utiliser d'autres agents pour bloquer les fourches qui n'inhibent pas le pool de nucléotides, comme la camptothécine, afin de voir si la CDA confère aussi un avantage aux cellules ou si cet effet n'a lieu qu'en réponse au HU, probablement via une compensation du pool de nucléotides.

Aussi, nous révélons pour la première fois des preuves que la CDA serait présente aux fourches de réplication et progresserait avec le réplisome, de façon similaire à PCNA dans des cellules cancéreuses pancréatiques. Ces expériences d'IPOND (immunoprécipitation des protéines présentes à la fourche de réplication) ont été difficiles à réaliser étant donné la mauvaise qualité des anticorps commerciaux anti-CDA actuellement disponibles. Nous avons tout d'abord effectué des expériences d'IPOND sur des Hela S3. Les expériences ont été réalisées 3 fois et ont montré à chaque fois un marquage CDA dans la fraction EdU+, cependant accompagné de bandes non spécifiques autour de la taille de la CDA. Nous avons donc poursuivi en utilisant un modèle de cellules cancéreuses pancréatiques surexprimant la construction FLAG-CDA afin de révéler la CDA via un anticorps anti-FLAG beaucoup plus spécifique et fiable. Seulement à cause de la difficulté à cultiver les cellules cancéreuses pancréatiques, nous n'avons pas pu correctement détecter la CDA et PCNA dans deux expériences. Dans deux autres expériences la CDA est bien marquée dans la fraction EdU+ comparé à la fraction EdU- mais ne semble pas disparaître dans la fraction de chasse avec la thymidine. Finalement après un gros effort pour rassembler un nombre beaucoup plus important de cellules, nous avons réalisé une dernière fois l'expérience d'IPOND et révélé de façon claire la CDA dans la fraction EdU+ qui disparaît dans la fraction de chasse avec la thymidine. Même si nous avons confiance en ce dernier résultat, ces expériences sont réalisées dans un modèle de surexpression de la CDA. Nous avons produit par technologie CrispR des cellules cancéreuses pancréatiques et des Hela S3 dans lesquelles la séquence codante de la CDA est étiquetée par 3-FLAG. Ces cellules sont en cours de validation et nous permettraient de pouvoir réaliser l'expérience d'IPOND à nouveau en révélant la CDA endogène avec un anticorps anti-FLAG fiable. De plus, la mauvaise qualité des anticorps anti-CDA n'est pas compatible avec des approches d'immunofluorescence pour la détection de la CDA (marquage CDA non diminué après un ciblage génétique, résultats non montrés). Nos analyses de fractionnement cellulaire sur les cellules surexprimant la construction FLAG-CDA montrent un marquage majoritairement cytosolique, de façon plus minoritaire nucléaire de la CDA, confirmé par immunofluorescence (Figure 46). 4EBP1 (facteur de

traduction, cytosolique) et SP1 (facteur de transcription, nucléaire) sont utilisés comme contrôles du bon fractionnement cellulaire. Ces résultats ont été confirmés dans plusieurs lignées PDAC sur la CDA endogène, avec toujours la présence de bandes non-spécifiques autour de la taille de la CDA. De plus par transfection transitoire de FLAG-CDA ou GFP-CDA dans des HeLa S3 et MIA PaCa-2, nous révélons aussi un marquage nucléaire de la CDA. Le modèle de tag de la CDA endogène via la technologie CRISPR nous permettra de faire des études de localisation subcellulaire de la CDA plus approfondies et de confirmer la localisation nucléaire de la CDA endogène. De plus ce modèle nous permettra aussi de réaliser des études de colocalisation, des essais de proximité de ligation (PLA) (PLA EdU et FLAG-CDA par exemple) ou des immunoprécipitations pour obtenir des preuves supplémentaires de la CDA à la fourche de réplication, en interaction avec d'autres membres du réplisome.

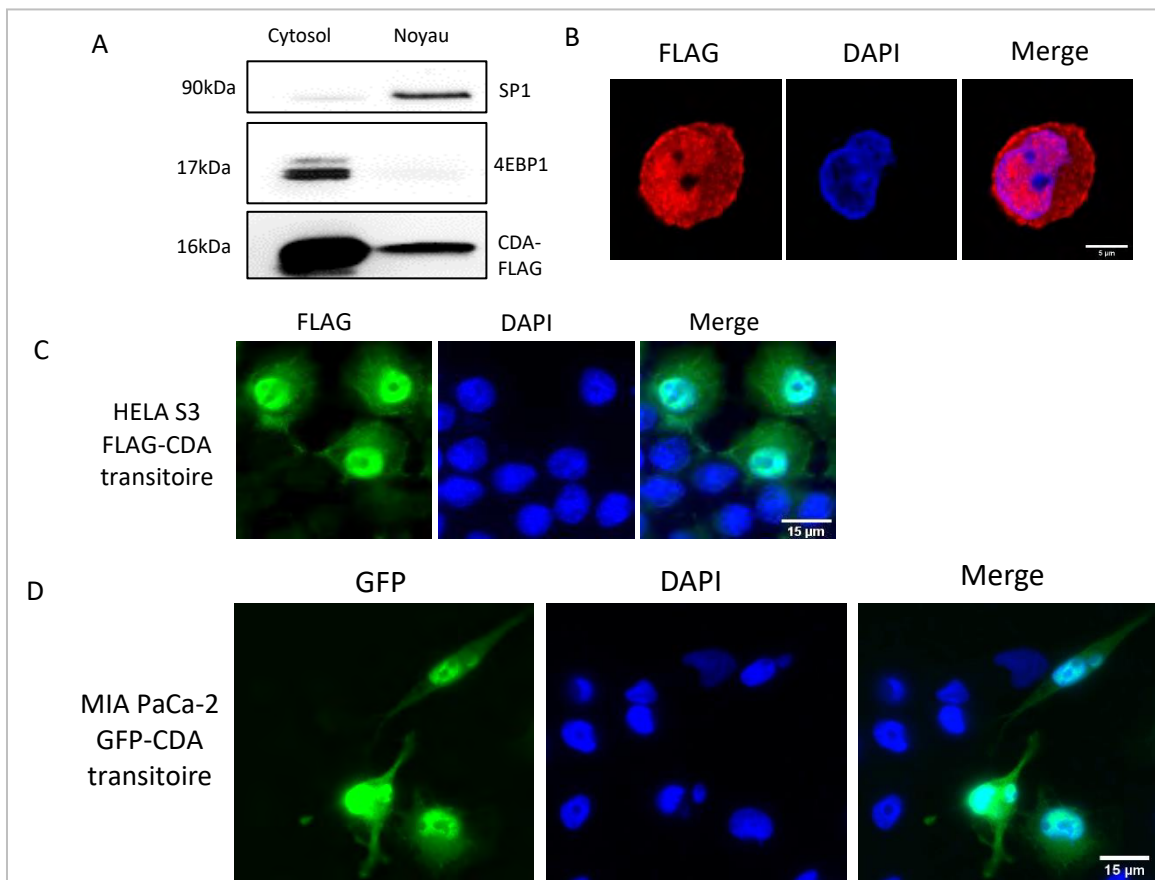


Figure 46 : Analyse de la localisation subcellulaire de la CDA dans des cellules PDAC surexprimant la CDA. A) Fractionnements cellulaire et B) Immunofluorescence révélés par un anti-FLAG dans les lignées surexprimant FLAG-CDA. L'image FLAG-CDA représente une coupe z à laquelle il est possible de distinguer le signal nucléaire, elle ne reflète pas l'expression de CDA dans une cellule. Images prises au microscope confocal Zeiss LSM 880, objectif x60. Représentatifs de 3 expériences indépendantes. C) Immunofluorescence FLAG (vert) dans des HeLa S3 après transfection transitoire d'un plasmide FLAG-CDA (même construction que pour les transductions A et B). D) Immunofluorescence GFP (vert) dans des MIA PaCa-2 après transfection transitoire d'un plasmide GFP-CDA.

Dans les bases de données, la CDA est présentée comme une protéine cytoplasmique, qui est retrouvée aussi dans le milieu extra cellulaire. La localisation nucléaire de la CDA que nous décrivons

ici pourrait s'expliquer par la présence d'une séquence NLS permettant à la CDA d'être reconnue par le récepteur nucléaire de l'importine et adressée dans le noyau¹⁶¹. En théorie, muter cette séquence devrait concentrer la CDA dans le cytoplasme et ainsi limiter son action au niveau de la fourche de réplication. Cependant, au-delà de sa localisation nucléaire, les mécanismes permettant le potentiel recrutement de la CDA à la fourche de réplication restent inconnus. Dans la base de données BioGRID regroupant les potentiels interacteurs de la CDA, à la suite d'une étude de spectrométrie de masse, nous avons relevé que la CDA est co-ségrégée avec la protéine MCM2, un des principaux facteurs de réplication de l'ADN dans les cellules eucaryotes^{115,406} (thebiogrid.org). De plus, nous avons mesuré que l'expression de MCM2 est induite dans les cellules surexprimant la CDA. Cela peut aussi s'expliquer par une faible augmentation globale de la prolifération cellulaire, et une augmentation globale de la signature transcriptomique de réplication de l'ADN. Toutefois nos résultats préliminaires de co-immunoprécipitation de CDA et MCM dans des MIA PaCa-2 surexprimant FLAG-CDA ne nous ont pas permis de confirmer cette interaction. Il faudrait réaliser d'autres expériences et préférentiellement à partir d'extraits nucléaires afin d'enrichir la potentielle interaction et augmenter les chances de la visualiser par Western Blot. Une fois le modèle CRISPR de CDA-FLAG endogène, il sera aussi possible de confirmer cette interaction par essai de liaison de proximité (PLA) en utilisant l'anticorps anti-FLAG.

Cependant, la question demeure du rôle exact de la CDA à la fourche de réplication, et notamment si l'enzyme agit seule ou au sein d'un complexe avec d'autres enzymes impliquées aussi dans la synthèse des pyrimidines. En théorie, la synthèse de novo et le recyclage des pyrimidines se déroulent dans le cytoplasme, car c'est un processus essentiel à la réplication de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial. De plus, la fonction de la CDA dans la résistance aux chimiothérapies à base d'analogues de désoxycytidine est décrite dans le cytoplasme^{152,154}. Cependant, de plus en plus d'études rapportent des preuves d'enzymes relocalisées à la mitochondrie ou dans le noyau notamment en réponse aux dommages à l'ADN en phase S⁴¹⁵⁻⁴¹⁷. Nous avons donc cherché à savoir si d'autres enzymes du métabolisme des pyrimidines peuvent être nucléaires. Il a été montré que, dans des cellules de mammifères, la RNR interagit avec Chk1 et localise la distribution des dNTPs entre les fourches de réplication et les foyers de réparation⁴¹⁸. Ainsi, en phase S non perturbée, la RNR localise dans le cytosol et participe au maintien du pool global de nucléotides pour la synthèse d'ADN mitochondrial et nucléaire. L'enzyme est également retrouvée dans le noyau au niveau des fourches de réplication, pour stimuler leur progression. En réponse aux dommages à l'ADN, RRM2 (sous-unité catalytique de la RNR) serait relocalisée aux foyers de réparation pour augmenter la disponibilité locale des dNTPs au détriment de la progression des fourches de réplication⁴¹⁹. Une autre étude a montré que CAD, impliquée dans la voie de biosynthèse des pyrimidines, est majoritairement cytosolique et à une moindre mesure nucléaire, mais son rôle n'est pas connu⁴¹³. Ces résultats sont un premier argument en faveur d'une synthèse pyrimidique de novo nucléaire. A l'inverse, la DHODH, qui est une protéine majeure dans cette voie de synthèse de novo est exclusivement mitochondriale⁴¹³, démontrant qu'il n'existe pas de règle exacte dans ce domaine. Dans l'hypothèse que la CDA soit présente à la fourche de réplication, nous pouvons imaginer que cette enzyme agisse dans un complexe enzymatique, par exemple en présence de TS et de TK, pour recycler les dTTP près de la fourche de réplication. En effet, il a été montré notamment que TS1 et TK1 sont nucléaires^{420,421}. TK1, qui est la forme cytosolique de TK, est surexprimée et relocalisée dans le noyau en réponses aux dommages à l'ADN pour participer à

la réparation dans un contexte de déficience de p53. TK1 apparait dispensable pour la prolifération cellulaire mais est crucial pour fournir le surplus de dTTPs nécessaire à la réparation des dommages à l'ADN⁴²¹. De plus, l'analyse des données TCGA des tumeurs du pancréas indique que les niveaux d'expression de CDA et de TK1 sont positivement corrélés (résultats non montrés), ce qui pourrait suggérer une codépendance fonctionnelle. L'ensemble de ces considérations est en droite ligne de la théorie datant des années 80 concernant l'existence d'un cluster physique d'enzymes nucléaires pouvant favoriser l'apport des précurseurs au plus près des polymérases répliquatives et des enzymes de réparation⁴²². Ce travail de thèse, des études de localisation, et la réalisation de l'interactome de la CDA dans les cellules cancéreuses pancréatiques pourraient apporter un nouvel éclairage à cette théorie.

Ensuite, nos résultats démontrent que la perte de CDA se traduit par une augmentation des marqueurs de stress répliquatif, de catastrophes mitotiques et la transmission des dommages à l'ADN aux générations suivantes dans les cellules de PDAC. Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui indiquent que dans les cellules de Bloom³⁴⁹, la perte d'expression de la CDA augmente le pool de dCTP qui est à l'origine de stress répliquatif. D'autres études ont associé la perturbation du pool des nucléotides avec l'induction de ce type de stress. En effet, la perte de TK1 et de DCK (désoxycytidine kinase) provoque l'induction de stress répliquatif dans des lignées lymphoïdes via une déplétion en dTTP et dCTP respectivement⁴²³. De plus, l'inhibition de la dihydropyrimidase (DHP) dans des cellules cancéreuses induit l'accumulation de dihydropyrimidines à l'origine de stress répliquatif et transcriptionnel via la formation de liaisons croisées d'ADN⁴²⁴. L'ensemble de ces données révèlent l'importance des enzymes impliquées dans le métabolisme des pyrimidines afin de préserver l'intégrité de la répliquatif de l'ADN. Inversement, la surexpression de la CDA protège les cellules cancéreuses contre les cassures de l'ADN dans les cellules en phase S, l'exposition d'ADN simple-brin et l'expression des sites fragiles communs et cet effet protecteur est dépendant de désamination de la CDA. Chez la levure, un allèle supplémentaire de RRM2 permet des niveaux supra-physiologiques de l'activité de RNR et diminue les cassures chromosomiques au niveau des sites fragiles communs. Le dosage élevé de RRM2 devient protecteur dans un contexte d'insuffisance en dNTPs⁴²⁵. De façon similaire, notre étude révèle le rôle protecteur du dosage élevé de l'activité de CDA, dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines. Cette nouvelle similitude entre CDA et RNR pourrait renforcer le concept de complexe supra protéique impliqué dans la synthèse de nucléotides, au plus près de la fourche de répliquatif.

Nos travaux démontrent pour la première fois que la CDA stimule la synthèse d'ADN des cellules en phase S. Récemment, un nouveau concept de synthèse d'ADN tardive a été mis en avant dans les cellules soumises à un stress de répliquatif. En effet, la MiDAS est un processus de dernier recours pour la cellule afin de résoudre l'ADN non-répliqué ou les intermédiaires de répliquatif persistant en mitose³¹³, comme décrit en Introduction de cette thèse, page 61. La synthèse d'ADN en mitose peut être visualisée après incorporation de l'EdU (5-ethynyl-2'désoxyuridine) dans l'ADN sous forme de foyers sur les chromosomes condensés (voir protocole Figure 47A)³⁰³. Cette synthèse d'ADN s'exerce au niveau de l'ADN non répliqué, notamment au niveau des UFBs qui émergent des intermédiaires de répliquatif d'ADN non résolus en anaphase. Les UFB auxquels nous nous intéressons plus

particulièrement sont ceux induits par le stress réplicatif, majoritairement au niveau des sites fragiles communs (CFS) et marqués par FANCD2³⁰³. Nous avons réalisé un marquage des foyers FANCD2 pour révéler les extrémités de l'ADN sous répliqué au niveau des CFS, combiné à l'Edu pour identifier les foyers de synthèse d'ADN tardive, dans les cellules en début de mitose (prophase, métaphase) afin d'augmenter le nombre d'évènements.

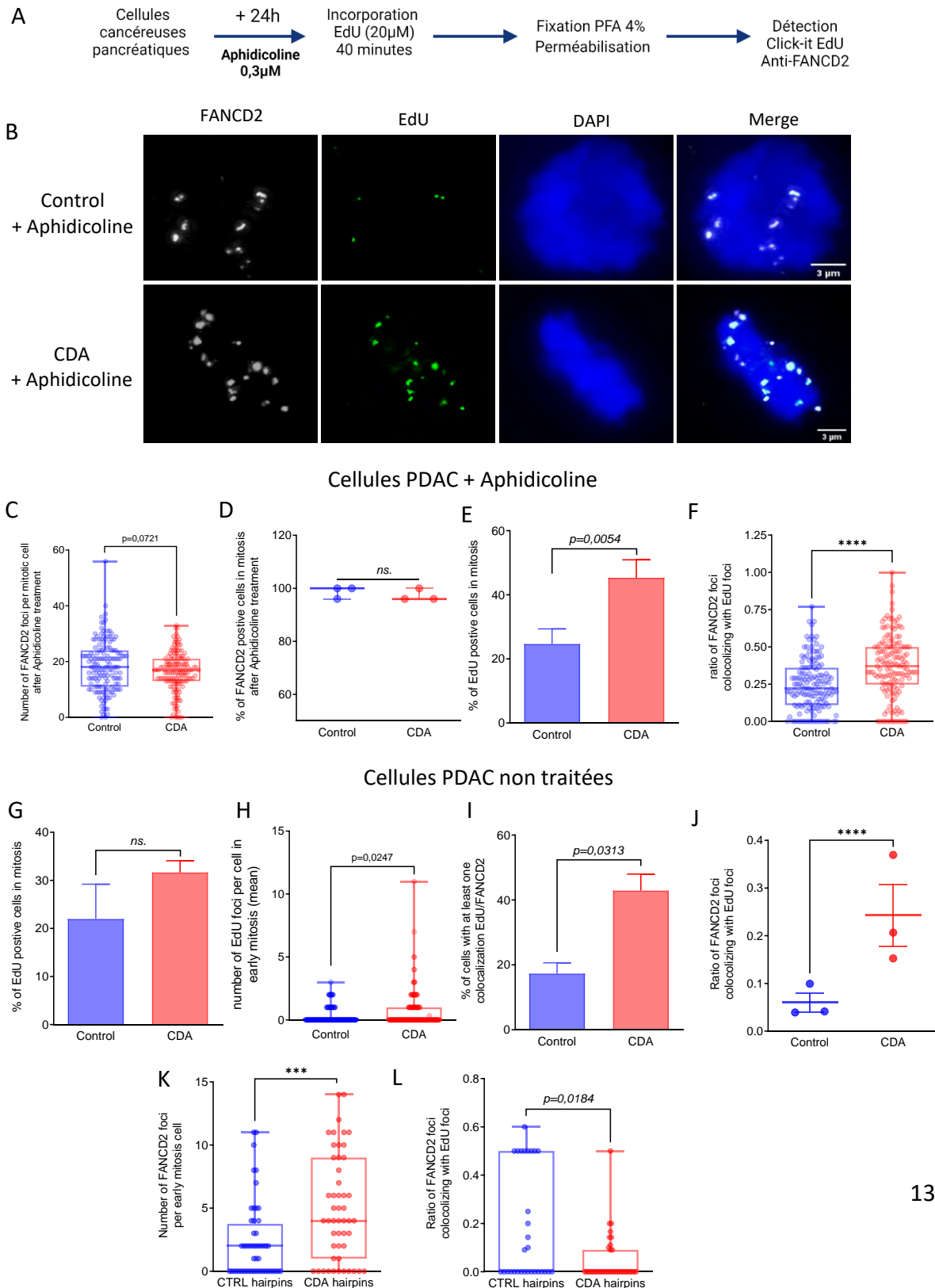


Figure 47 : Conséquences de l'expression de CDA sur la synthèse d'ADN en mitose (MiDAS). A) Schéma du protocole appliqué pour visualiser la MiDAS) Image représentative des foyers EdU (vert) et foyers FANCD2 (orange) dans les cellules en prophase et métaphase. C) et D) montrent le nombre et le pourcentage de foyers FANCD2 dans les cellules après traitement de 24h d'Aphidicoline. E) Quantification du pourcentage de cellules avec au moins un foyer EdU par cellule après traitement aphidicoline. F) Quantification du pourcentage de foyers FANCD2 colocalisant avec un foyer EdU après traitement aphidicoline. G) et H) montrent le pourcentage de cellules avec au moins un foyer EdU par cellule et le nombre moyen de foyers EdU par cellule, en absence de traitement. I) et J) sont les quantifications du pourcentage de cellule avec au moins une colocalisation FANCD2/EdU par cellule et du pourcentage de foyers FANCD2 colocalisant avec un foyer EdU. Les résultats comparent les cellules cancéreuses pancréatiques surexprimant la CDA aux cellules témoins, résultats représentatifs de 3 pools de transduction indépendants. K) et L) sont les quantifications du nombre de foyers FANCD2 par cellule et le pourcentage de foyers FANCD2 colocalisant avec un foyer EdU dans les cellules déplétées ou non pour la CDA, résultats préliminaires issus de 2 expériences indépendantes.

Dans la littérature, l'Aphidicoline est utilisée comme inducteur de synthèse d'ADN tardive au niveau des CFS compte tenu de son rôle inhibiteur des polymérase répliquatives³⁰³. Nous avons donc traité ou non les cellules cancéreuses pancréatiques avec cette molécule, puis co-déTECTÉ les foyers FANCD2 et EdU dans les cellules en prophase et métaphase. Nous avons tout d'abord quantifié le nombre de foyers FANCD2 par cellule (déjà déterminé pour la condition non traitée), puis le pourcentage de cellules présentant au moins un foyer EdU, synonyme de synthèse d'ADN mitotique. Enfin, nous avons quantifié le pourcentage de foyers FANCD2 colocalisant avec un foyer EdU afin de déterminer la proportion d'ADN non répliqué des CFS en cours de réplication. Les résultats Figure 47C indiquent que le traitement de longue durée par l'Aphidicoline induit le même nombre de foyers FANCD2 en moyenne (18) indépendamment de l'expression de CDA, qui ne protège donc pas de ce traitement drastique (Figure 47D). Cependant, les résultats présentés Figure 47E-F révèlent une augmentation du pourcentage de cellules présentant des foyers EdU et du ratio de foyers FANCD2 colocalisant avec un foyer EdU dans les cellules surexprimant la CDA. Ainsi, il semble que même si le nombre de foyers FANCD2 induits par le traitement de longue durée d'Aphidicoline est similaire entre les deux conditions, plus de foyers de colocalisation EdU/FANCD2 sont détectables dans les cellules surexprimant la CDA. En condition basale, nous mesurons une augmentation du pourcentage de cellules avec des foyers EdU, du nombre de foyers EdU par cellule, ainsi qu'une augmentation du pourcentage de foyers FANCD2 colocalisant avec un foyer EdU dans les cellules surexprimant la CDA (Figure 47G-J), et ce alors que les foyers FANCD2 sont moins nombreux. Enfin, les cellules invalidées génétiquement pour la CDA présentent un nombre de foyers FANCD2 plus élevés que les cellules témoins, et moins d'évidences de synthèse d'ADN tardive (colocalisation foyers EdU / foyers FANCD2) (résultats préliminaires, Figure 47K-L). Ces résultats pourraient aussi expliquer la diminution du nombre de micronoyaux et de corps 53BP1 observés dans les cellules en G1 lorsque les cellules surexpriment la CDA. Ainsi, la CDA pourrait permettre de stimuler la synthèse d'ADN en phase S et durant des stades plus tardifs pour limiter les conséquences du stress répliquatif et les catastrophes mitotiques. Etant donné la diminution drastique du pool de nucléotides après la phase S, il est concevable que l'expression de la CDA et d'autres enzymes du métabolisme pourraient être maintenues pendant la phase G2 et en début de mitose afin d'apporter le supplément de nucléotides nécessaires. De façon intéressante, nos résultats préliminaires dans des cellules cancéreuses pancréatiques (BxPC-3) montrent une augmentation de la quantité protéique de CDA entre les phases

G1 et S puis un maintien entre les phases S et G2 (résultats non montrés). Ainsi, la CDA ne serait pas dégradée après la phase S quand le niveau du pool de pyrimidines est très faible⁴²⁶, argumentant pour un rôle au-delà de la phase S. Ces résultats sont d'importance car à ce jour peu de protéines ont été démontrées associées au processus de synthèse d'ADN tardive^{314,427}. Cependant, nos données restent faibles et nécessitent des expériences supplémentaires, notamment pour confirmer la diminution de la MiDAS après ciblage génétique de la CDA. De plus, ces résultats ne sont pas purement quantitatifs car il est difficile de mesurer le nombre exact de foyers FANCD2 et EdU dans les cellules, comme observé Figure 47B. Enfin, afin de renforcer ces résultats, un co-marquage P-H3 pourrait être réalisé pour mieux visualiser l'état de compaction des chromosomes et valider que les cellules étudiées sont bien en mitose.

2. Valeur translationnelle

Nous avons par la suite exploré la valeur translationnelle de nos résultats de recherche. Tout d'abord, nous avons observé une forte hétérogénéité d'expression de la CDA au sein des tumeurs pancréatiques. Puis, nous avons découvert que les tumeurs pancréatiques (TCGA) avec les plus hauts niveaux de CDA étaient les plus sujettes au stress réplicatif, et très instables génétiquement (niveaux d'aneuploïdie et de mutations plus élevés). De plus, dans des modèles cellulaires dérivés de patients (PDCL), en collaboration avec le Dr. Nelson Dusseti (CRCM), j'ai observé une corrélation positive entre le niveau de CDA et le niveau de γ -H2AX dans les cellules en phase S (EdU+) par immunofluorescence, voir Figure 48. Le niveau de γ -H2AX est confirmé par IHC sur des coupes histologiques à partir des PDX, réalisées par nos collaborateurs (CRCM). Ces résultats paraissent contre-intuitifs au premier rapport étant donné le rôle de la CDA dans la régulation du stress réplicatif que nous décrivons précédemment. En effet, l'expression de CDA diminue le taux de stress réplicatif des cellules PDAC et toutefois les tumeurs et PDCL avec un niveau élevé de CDA sont celles qui expriment le plus de marques de stress réplicatif. Il est possible alors d'imaginer que les cellules avec un fort stress réplicatif endogène expriment plus de CDA pour le tolérer et continuer à proliférer. Nos résultats montrent que les PDAC avec un niveau faible de stress réplicatif et d'instabilité génétique expriment plus faiblement la CDA. D'après nos données, nous suggérons que l'hétérogénéité d'expression de la CDA dans le PDAC s'explique par l'hétérogénéité des niveaux des stress réplicatif et d'instabilité génétique des tumeurs pancréatiques. Des études sur d'autres cohortes de patients avec d'autres marqueurs d'instabilité génétique que l'aneuploïdie et le taux de mutations pourraient permettre de mieux renforcer et comprendre la corrélation entre le niveau de CDA et l'instabilité génétique des tumeurs pancréatiques. De façon intéressante, des niveaux d'expression élevés de TK1 et d'UCK2 dans les tumeurs pancréatiques corrélaient aussi avec l'aneuploïdie et le score de mutations (résultats non montrés), ce qui n'est pas le cas pour la DHODH de la voie de biosynthèse des pyrimidines. Ces résultats révèlent que l'expression de plusieurs enzymes de la voie de recyclage des pyrimidines corréle avec l'instabilité génétique des tumeurs.

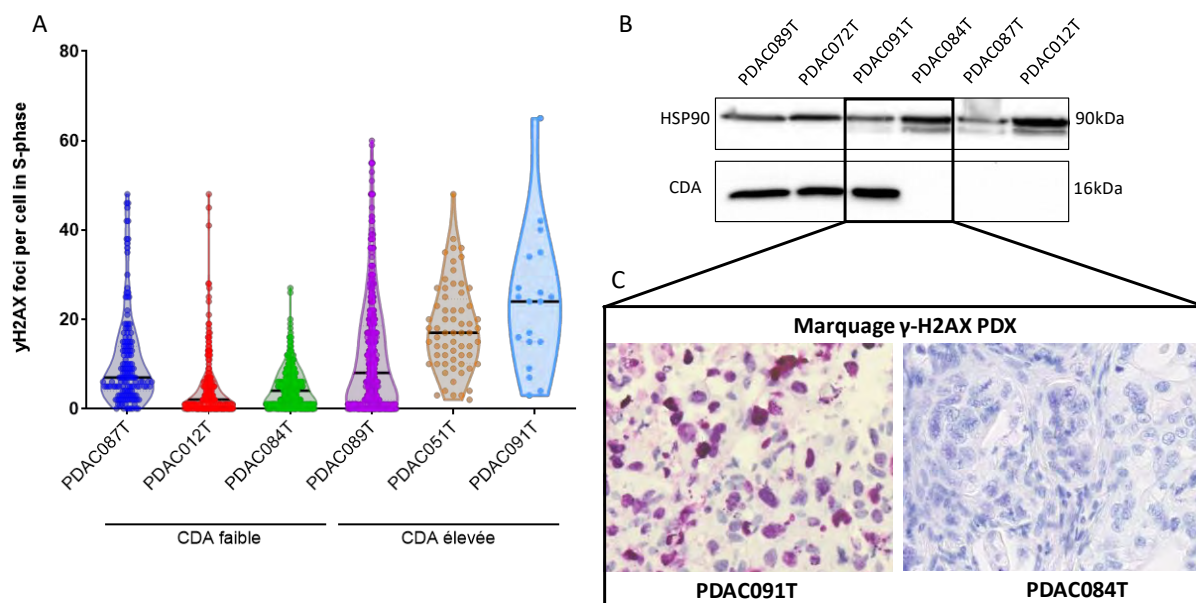


Figure 48: Corrélation entre le niveau de γ -H2AX et l'expression de CDA dans des modèles de PDAC dérivés de patients. A) Quantification du nombre de foyers γ -H2AX dans les cellules en phase S (EdU+) dans des lignées PDCL avec un niveau faible ou élevé de CDA. B) Western-Blot pour l'expression de CDA dans les lignées PDCL, HSP90 étant utilisé comme contrôle. C) Image du marquage γ -H2AX sur des coupes histologiques de modèles PDX (4 PDX), réalisées par nos collaborateurs du CRCM.

Il est aussi possible d'envisager que la CDA joue un rôle plus direct dans l'instabilité génétique de ces tumeurs. D'une part, une étude très intéressante de 2018, met en évidence qu'une augmentation de la vitesse des fourches de réplication au-dessus d'un certain seuil (+40%) induit des dommages à l'ADN et active la voie de réponse aux dommages à l'ADN⁴²⁸. Ainsi, accélérer les fourches de réplication peut être source de stress réplcatif et d'instabilité génétique. Seulement dans notre modèle cellulaire, l'expression de CDA augmente la vitesse des fourches (+25%) et diminue les dommages à l'ADN et les catastrophes chromosomiques, suggérant que la vitesse des fourches reste en dessous du seuil de tolérance. D'autre part, la CDA pourrait induire des mutations en provoquant au plus près des fourches de réplication une surreprésentation de (désoxy)uridine, un déséquilibre entre les dTTP/TTP et dCTP/CTP ou même l'incorporation d'UTP ou de dUTP à fort pouvoir mutagène dans l'ADN nouvellement synthétisé, comme cela a été montré dans la levure en cas de transcription exacerbée⁴²⁹⁻⁴³¹. Afin de déterminer si l'expression de la CDA pourrait induire des mutations dans le génome, nous avons réalisé des expériences de séquençage du génome entier (WGS) à partir des cellules surexprimant la CDA ou son mutant catalytiquement inactif. Nous avons réalisé cette analyse 3 jours jusqu'à 55 jours après expression de la protéine. Les données de prolifération obtenues par incucyte nous permettent de dire que les cellules surexprimant la CDA prolifèrent légèrement plus rapidement que les cellules témoins. Les analyses de FACS n'ont pas révélé de différences significatives du nombre de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire lorsque la CDA est surexprimée. Les cellules ont été passées aux mêmes moments pendant 55 jours, ainsi nous admettons que les conditions permettent de comparer ces lignées. Les résultats sont en cours d'analyses afin de déterminer si l'expression de la

CDA peut aider à la diversité génomique (expérience à court terme) et à la stabilisation de génomes instables favorisant la croissance tumorale (expérience à long terme).

Nos travaux laissent également entrevoir de nouvelles possibilités thérapeutiques pour les patients atteints de PDAC, notamment soumis au stress réplicatif exogène induit par les chimiothérapies qui ciblent le métabolisme de l'ADN. La CDA joue un rôle direct dans la chimiorésistance à la gemcitabine via son activité de désamination, depuis le cytosol des cellules cancéreuses^{152,154}. Dans le PDAC, nos collaborateurs révèlent pour la première fois, dans une étude clinique de recherche de biomarqueurs à grande échelle, que l'expression de CDA à elle seule permet de prédire l'action antiproliférative et antitumorale de la gemcitabine (Coll. Pr. J. Cros et C. Neuzillet, manuscrit en cours de préparation). Grâce à cette étude, nous décrivons une nouvelle fonction originale de la CDA dans la chimiorésistance aux agents ciblant l'ADN dans le noyau, proche de la fourche de réplication. Cette fonction est dépendante de l'activité catalytique de la CDA et est probablement indirect, via l'action de la CDA sur les niveaux des pools de pyrimidines. En effet, nous avons démontré à partir de bases de données cellulaires que l'expression de CDA corrèle avec la résistance des cellules aux traitements à base d'oxaliplatine, de cisplatine et d'irinotecan. Nous avons validé dans nos modèles cellulaires que l'expression de CDA protège contre la camptothécine, il manque toutefois des données similaires en réponse à un traitement à base d'oxaliplatine. Nous pouvons imaginer que cette résistance aux agents ciblant l'ADN s'explique par une augmentation et une relocalisation de la disponibilité du pool de pyrimidines dans le noyau en présence de CDA, probablement en collaboration avec d'autres partenaires enzymatiques. Il serait intéressant de voir si la surexpression d'autres enzymes de la voie de recyclage telles que TK1, TS, UPP1 a aussi un effet chimioprotecteur comme il a pu être montré pour la RNR chez la levure⁴²⁵. Nous avons par la suite étudié cette corrélation dans les PDCL à notre disposition. Nous avons retrouvé une corrélation négative significative entre le niveau d'expression de la CDA et l'effet antiprolifératif de la gemcitabine. Cependant, dans ces échantillons, l'expression de la CDA à elle seule n'est pas prédictive de l'activité des chimiothérapies dérivées de la camptothécine (SN38, irinotecan) et de l'oxaliplatine, même si pour cette dernière la tendance est presque significative. En effet, les PDCL présentées Figure 48, sont presque toutes résistantes à ces molécules. Ceci indique que la CDA pourrait faire partie d'un ensemble plus grand au sein de ces échantillons primaires de patients qui récapitulent l'hétérogénéité du PDAC, qui pourrait associer signatures de stress réplicatif, réponse des dommages à l'ADN, statut BRCaness et enzymes du métabolisme des nucléotides pour permettre de prédire l'efficacité de molécules ciblant la réplication de l'ADN.

Toutefois, nos travaux démontrent que la CDA est une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt pour améliorer l'efficacité de ces chimiothérapies qui ciblent le métabolisme de l'ADN. En effet, nous avons montré que, au contraire, cibler la CDA par interférence à ARN sensibilise les cellules cancéreuses pancréatiques et les PDCL à ces chimiothérapies. Il serait intéressant de confirmer ces résultats dans un modèle murin, non seulement pour valider l'intérêt de la CDA en tant que cible thérapeutique dans ce contexte, et également afin d'étudier de possibles résistances. Cette expérimentation est actuellement en phase de test au sein de l'équipe. Dans les cellules de mammifères, la déficience de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des pyrimidines (dTMP synthase, dCTP kinase, CTP synthase, dCMP désaminase) sensibilise aux agents induisant des dommages de l'ADN, augmente la

capacité de recombinaison homologue et les anomalies chromosomiques^{429,430}. Nos travaux sur l'importance de la CDA dans les cellules cancéreuses pancréatiques s'inscrivent dans une nouvelle stratégie de traitement de ces tumeurs basé sur les niveaux de stress réplicatif et d'instabilité génétique. En effet, les travaux de Dreyer et collègues permettent la classification des PDCL selon le niveau de stress réplicatif (RS) et de capacité de réponse aux dommages à l'ADN (DDR déficient ou compétent). Sur cette base, ces auteurs proposent un nouveau modèle de décision thérapeutique basé sur le statut RS et DDR des tumeurs. En effet, les PDCL avec une signature élevée de stress réplicatif sont plus sensibles aux inhibiteurs de Wee1 et d'ATR comparé aux PDCL avec un faible RS, indépendamment du statut DDR. Ensuite, les PDCL avec une déficience de la DDR sont plus sensibles aux inhibiteurs de PARP via mécanisme de létalité synthétique. Cependant, ce modèle n'est pas décisionnel concernant les tumeurs « non stressées » génétiquement (faible RS), dans lesquelles la DDR est intacte et qui représentent environ un tiers des échantillons³⁸⁵. Nos travaux apportent un nouvel éclairage pour combler ce vide thérapeutique. En effet, nous démontrons qu'il est tout à fait possible d'augmenter le niveau de stress réplicatif endogène en ciblant la CDA dans les cellules cancéreuses pancréatiques. Ce passage des tumeurs d'un statut RS « faible » vers RS « élevé » devrait en conséquence renforcer l'activité thérapeutique des inhibiteurs du cycle cellulaire et des agents ciblant l'ADN tels que des platines (Figure 49). Ce modèle encourage la poursuite de travaux basé sur la combinaison du ciblage de la CDA et d'agents inhibiteurs du cycle cellulaire tels que les inhibiteurs de Chk1, ATR, ou Wee1. (Figure 49).

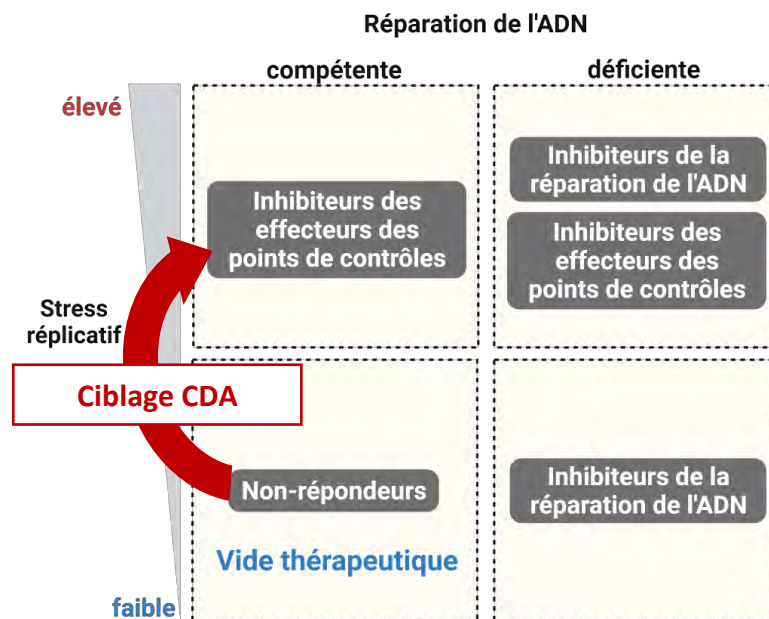


Figure 49 : Modèle hypothétique du potentiel thérapeutique du ciblage de la CDA dans un contexte de vide thérapeutique pour une catégorie dominante du PDAC avec un niveau faible de stress réplicatif et une DDR fonctionnelle.

Cette stratégie est d'autant plus prometteuse que dans les tumeurs pancréatiques, l'expression de CDA corrèle avec celle de Chk1, au contraire d'ATR et de Chk2, et que l'inactivation de la CDA conduit

à une activation massive de Chk1. Ces résultats renforcent l'intérêt d'une combinaison thérapeutique basée sur le ciblage de CDA et de Chk1, plutôt qu'ATR, voir Figure 50.

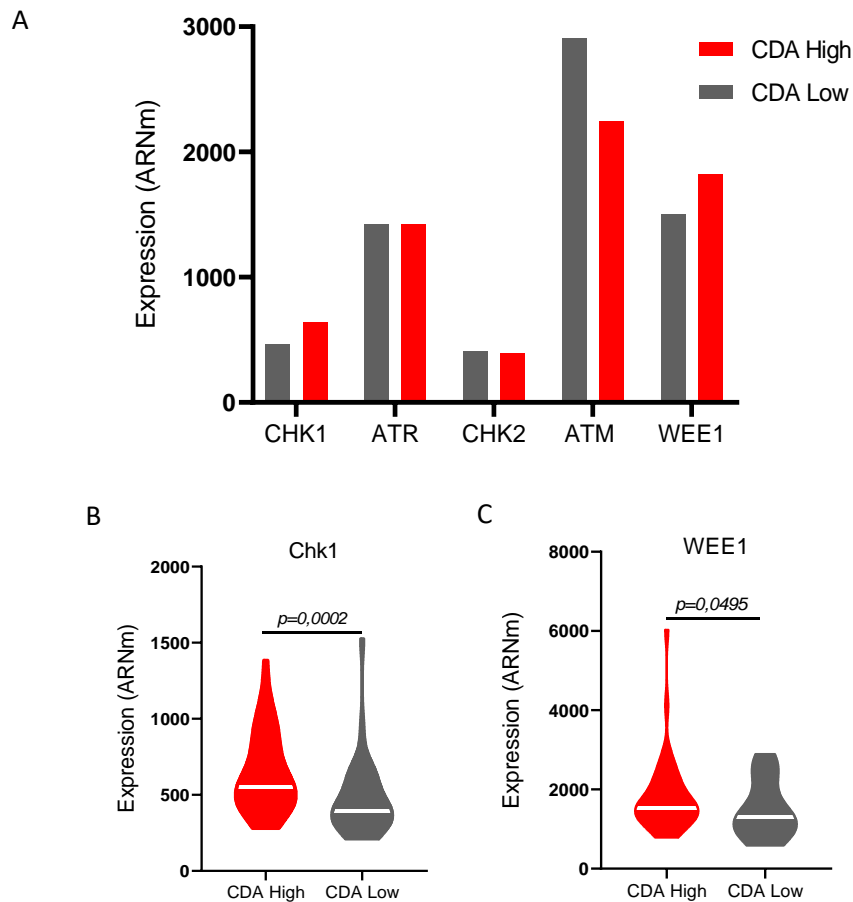


Figure 50 : Expression des gènes de checkpoint cellulaires dans les tumeurs pancréatiques (TCGA) avec un niveau élevé de CDA ou un niveau faible de CDA. A) Expression de CHK1, ATR, CHK2, ATM et WEE1 dans les tumeurs High et Low CDA. Quantifications statistiques de B) CHK1 et C) WEE1. Les groupes High CDA et Low CDA comptent chacun 40 échantillons de patients.

Enfin, ce travail repose sur le développement de nouvelles stratégies de ciblage de l'enzyme, compte tenu de l'efficacité modeste et de la mauvaise biodisponibilité des inhibiteurs pharmacologiques disponibles à l'heure actuelle^{194,198}. Par conséquent, notre groupe de recherche a récemment mis en évidence de nouveaux anticorps intracellulaires capables de fixer la CDA et d'inhiber son activité catalytique et son effet prolifératif (résultats non publiés). Nous envisageons dans un futur proche de proposer de nouvelles modalités de vectorisation pour transférer ces anticorps dans les tumeurs du pancréas, notamment selon des approches de thérapie génique pour lesquelles l'équipe est experte.

3. La CDA dans l'oncogénèse pancréatique

Enfin, il reste aussi à déterminer pourquoi et comment la CDA est exprimée dans les tumeurs pancréatiques. Dans la littérature, l'expression de la CDA est contrôlée de façon épigénétique

(méthylation du promoteur, microARNs). Nos données ne montrent pas d'amplification du nombre de copies de la CDA dans les PDCL avec fort ou faible niveau protéique (hybridation génomique comparative, résultats non montrés, n=10 PDCL) (voir Figure 48B pour les niveaux protéiques de CDA). Dans le cancer du pancréas, nous retrouvons l'expression de la CDA non seulement dans les tumeurs humaines, mais également dans les cellules tumorales murines issues de modèles transgéniques après analyses transcriptomiques par RNA-seq (KPC : Pdx1-Cre; LSL-KrasG12D; LSL-p53R172H). Il s'agit même de l'enzyme la plus exprimée de la voie de recyclage dans ces lignées transgéniques, alors qu'elle n'est pas exprimée dans le pancréas normal (voir Figure 51, Figure 18). Ces résultats suggèrent que la CDA est acquise lors de la carcinogénèse pancréatique.

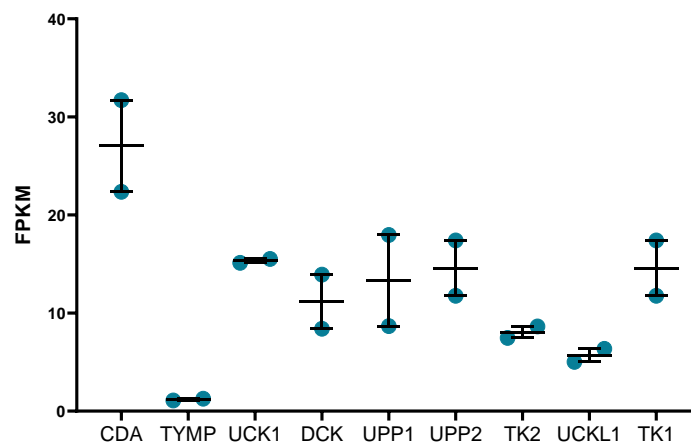


Figure 51 : Expression (FPKM) des gènes de la voie de recyclage dans deux lignées murines transgéniques de cancer du pancréas (Souris génétiquement modifiées, modèles KPC). FPKM : Fragments per kilobase of exon per million.

Il faut encore déterminer si la CDA est exprimée de façon précoce ou tardive dans ce cancer. Une idée pourrait être de réaliser des marquages immunohistochimiques de la CDA sur des coupes de tissus des stades pré-néoplasiques (PanIN 1-2-3) et cancéreux du pancréas, afin de déterminer à quelle étape de la carcinogénèse pancréatique l'expression de CDA est acquise. Il serait d'autant plus intéressant si l'analyse du niveau protéique de CDA pouvait être réalisée en co-marquage avec γ -H2AX afin de déterminer une potentielle corrélation entre les niveaux de CDA et de dommages à l'ADN pendant l'évolution des lésions pancréatiques vers le cancer. Nous pourrions aussi rechercher si la CDA est indispensable à la croissance tumorale pancréatique, en croisant les souris KPC et/ou KIC avec les animaux KO pour la CDA développés par notre collaboratrice Mounia Amor-Guéret. Étant donné que certaines tumeurs pancréatiques expriment plus faiblement la CDA il est tout à fait possible que des souris KO CDA puissent développer des tumeurs pancréatiques. Il serait alors intéressant d'étudier le niveau de stress répliatif et d'instabilité génétique de ces tumeurs, la vitesse de progression tumorale, l'agressivité et la réponse aux traitements. Ces informations nous permettraient de mieux comprendre et placer le rôle de la CDA dans l'oncogénèse pancréatique.

Une des hypothèses les plus vraisemblables serait que la CDA soit induite en réponse au stress de réplication imposé par les oncogènes au cours de l'oncogénèse pancréatique. Afin d'explorer cette

possibilité, nous avons utilisé des cellules pancréatiques non cancéreuses immortalisées (HPNE hTERT) inactivée ou non pour p53 et exprimant ou non une forme mutée constitutivement active de K-RAS (K-RAS^{G12D}, voir Figure 52A). Nous avons identifié que ces cellules HPNE hTERT / Δ P53 / K-RAS^{G12D} (HPNE-KRAS) sont transformées car elles forment des tumeurs lorsqu'implantées chez la souris (résultats non montrés). L'activation de l'oncogène K-RAS dans des lignées cancéreuses induit du stress réplicatif via un ralentissement de la vitesse des fourches, et des fréquences plus élevées de fourches asymétriques et de blocage des fourches de réplication. Toutefois le pourcentage de cellules positives pour des foyers γ -H2AX n'est pas différent entre les cellules K-RAS WT et K-RAS mutées, protégées par Chk1⁴¹⁰. Dans les cellules cancéreuses pancréatiques il n'a jamais été montré que l'oncogène K-RAS induit du stress réplicatif. Dans les cellules HPNE-KRAS, la voie des MAPK est fortement activée (P-ERK1/2) et la kinase Chk1 est très fortement exprimée et activée voir Figure 52B-C, suggérant que des voies de prolifération cellulaire sont stimulées et que le point de contrôle de phase S est sollicité. De plus, nous avons mesuré un niveau de cassures de l'ADN (foyers γ -H2AX) plus élevé dans les cellules en phase S exprimant l'oncogène K-RAS activé par rapport aux cellules témoins ne l'exprimant pas (Figure 52D). Ces résultats suggèrent que l'oncogène K-RAS provoque un fort stress réplicatif dans les cellules cancéreuses pancréatiques. Toutefois ces cellules sont capables de proliférer plus rapidement (résultats non montrés). De façon surprenante, nous avons identifié que les cellules HPNE-KRAS surexpriment la CDA, au niveau transcriptomique et protéique, par rapport aux cellules témoins non transformées, voir Figure 52E-F. Cette augmentation est aussi mesurée après la seule expression de l'oncogène KRAS^{G12D} dans les cellules HPNE hTERT, et ce même si p53 est fonctionnel (résultats non montrés). Cette induction semble spécifique de la CDA, car l'expression de la DHODH ne varie pas dans les lignées exprimant l'oncogène K-RAS. Cependant, les mécanismes mis en jeu ne sont pas connus. Nous n'avons pas regardé l'expression des autres enzymes de la voie de recyclage des pyrimidines. Il est possible que les cellules mutées pour K-RAS soient plus dépendantes de la voie de recyclage pour pouvoir augmenter la production et la distribution des pools de pyrimidines pour ainsi supporter le stress de réplication et la prolifération cellulaire exacerbée induits par l'oncogène. Le rôle de l'oncogène K-RAS sur le métabolisme cellulaire est bien connu. En effet l'oncogène K-RAS induit la surexpression de myc via activation de la voie des MAPK, ce qui se traduit par l'augmentation de la biosynthèse des nucléotides pour soutenir la prolifération cellulaire⁴³². Ces informations suggèrent que l'expression de CDA pourrait être induite via l'activation de la voie des MAPK dans les HPNE surexprimant l'oncogène K-RAS. Étant donné que K-RAS est l'oncogène majoritaire du cancer du pancréas (60-90%), ces résultats pourraient expliquer tout ou en partie pourquoi la CDA est surexprimée particulièrement dans les tumeurs pancréatiques.

De façon exceptionnelle, nous avons identifié après utilisation d'ARNi spécifiques de la CDA que l'expression de cette enzyme est essentielle à la prolifération cellulaire induite par l'oncogène KRAS, (voir Figure 52G). Ces résultats restent préliminaires et doivent être reproduits. Nous émettons l'hypothèse que la CDA est indispensable à la prolifération cellulaire car elle protège les cellules cancéreuses pancréatiques d'un stress réplicatif oncogénique trop exacerbé. D'autres expériences sont requises pour confirmer cette hypothèse, sur le modèle de celles réalisées lors de cette thèse. Il serait intéressant de voir si l'activation d'un autre oncogène dans des cellules pancréatiques induit aussi l'expression de CDA, ou si l'enzyme est exprimée spécifiquement en réponse à l'activation

oncogénique de K-RAS. De plus, cette nouvelle relation entre la CDA et l'oncogène K-RAS peut aussi être retrouvée dans les bases de patients. En effet, une première étude bio-informatique à partir des données du TCGA nous a permis d'identifier que le pourcentage de mutation de KRAS dans les tumeurs pancréatiques augmente avec l'expression de la CDA (70% dans les cellules présentant un taux faible de CDA, jusqu'à 95% dans les tumeurs exprimant un taux élevé de l'enzyme, Figure 52H). Ces résultats confortent notre théorie décrivant la nouvelle fonction de CDA comme un rhéostat moléculaire permettant de contenir le stress réplicatif oncogénique essentiel à la diversité et à la croissance tumorale, tout en limitant les catastrophes mitotiques.

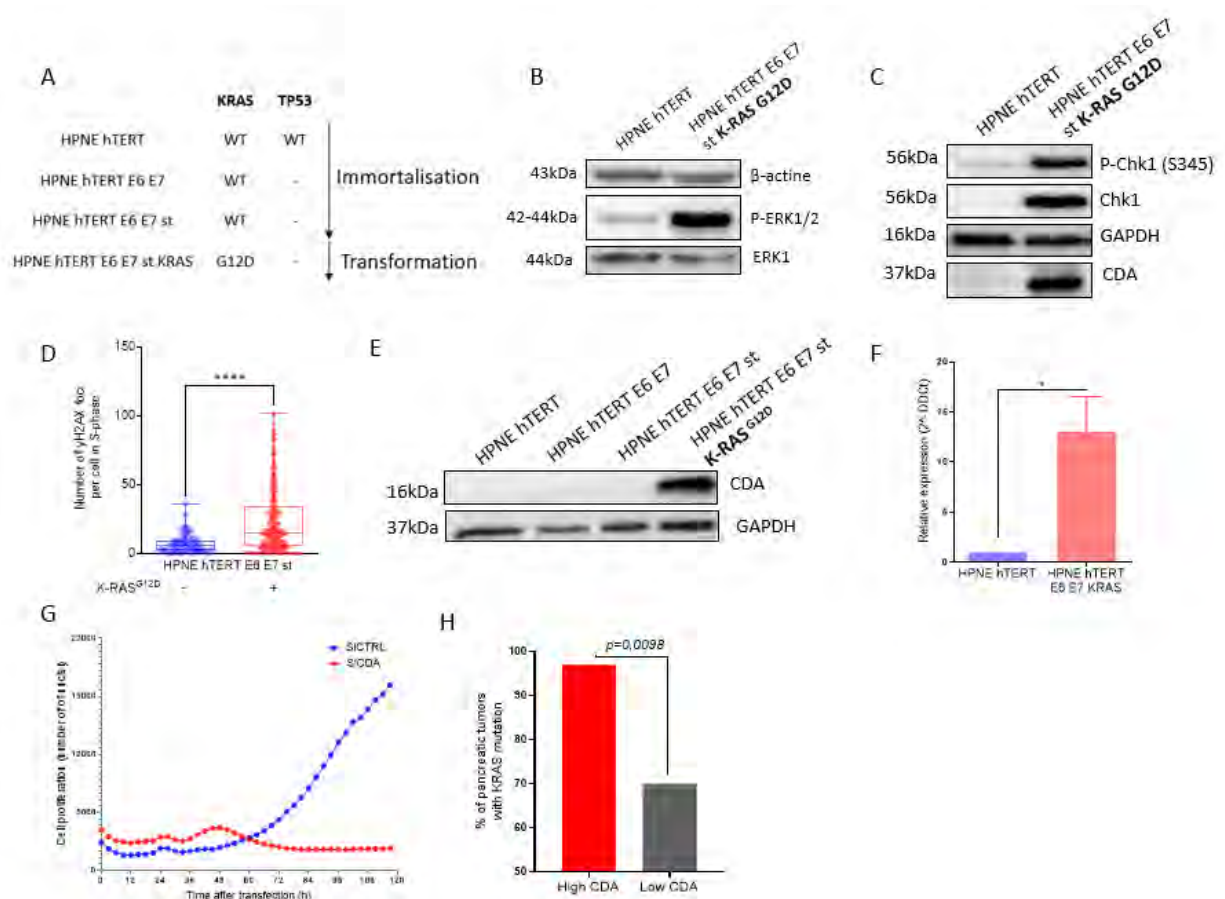


Figure 52 : L'expression de CDA est induite par l'activation K-RAS^{G12D} et nécessaire à la prolifération cellulaire médiée par l'oncogène dans un modèle cellulaire pancréatiques non cancéreux. A) Génotype des différentes lignées HPNE, B) Niveaux protéiques des p-ERK1 et 2 et de ERK1 et C) Niveaux protéiques de Chk1 et P-Chk1 (S345) dans les HPNE hTERT et les HPNE mutées p53 et K-RAS, β-actine et GAPDH étant utilisés comme contrôle de dépôt. D) quantification du nombre de foyers γ-H2AX par cellule en phase S (EdU+) dans les cellules HPNE hTERT E6 E7 st avec ou sans mutation K-RAS^{G12D}.

Il a été montré que Claspin et Timeless sont surexprimés dans le cancer (ovaire, colon, poumon), associés à un plus faible pronostic et augmentent la tolérance des cellules cancéreuses au stress réplicatif en protégeant les fourches de réplication⁴³³. De plus, une autre étude a révélé qu'une copie supplémentaire de Chk1 suffit à protéger les cellules des agents inducteurs de RS, à prolonger la survie des souris avec un syndrome de Seckel (mutation d'ATR), et à favoriser la transformation en contenant

le stress réplicatif induit par l'oncogène⁴³⁴. De la même manière, nous montrons que la CDA est surexprimée dans les tumeurs pancréatiques, associée à un plus faible pronostic et protège les cellules PDAC du stress réplicatif. La CDA pourrait donc jouer un rôle crucial au cours de l'oncogenèse pancréatique, en collaboration avec d'autres facteurs tels que Chk1, Claspin Timeless. La diversité génétique « autorisée » par cette enzyme pourrait favoriser la croissance tumorale et métastatique en réponse au stress réplicatif et génétique endogène imposé par l'oncogène KRAS. Dans ce sens, des études récentes démontrent que le métabolisme des pyrimidines induit la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules cancéreuses, indépendamment de la prolifération²⁰⁷. De façon complémentaire, nous avons obtenu des résultats montrant que l'expression de CDA est augmentée dans les tumeurs avancées des patients (localement avancées et métastatiques), comparé aux tumeurs réséquées, et que la CDA augmente l'index métastatique de tumeurs expérimentales (article Frances et al. 2021, en cours de préparation). Plus tard, cette même CDA pourrait représenter une barrière contre des molécules thérapeutiques dont le mode d'action est d'induire un stress réplicatif létal. Ainsi, la CDA pourrait être perçue comme un nouvel acteur de l'oncogenèse pancréatique, mais également aussi comme une composante essentielle dans la progression tumorale, la résistance et l'échappement thérapeutique des tumeurs pancréatiques (Figure 53).

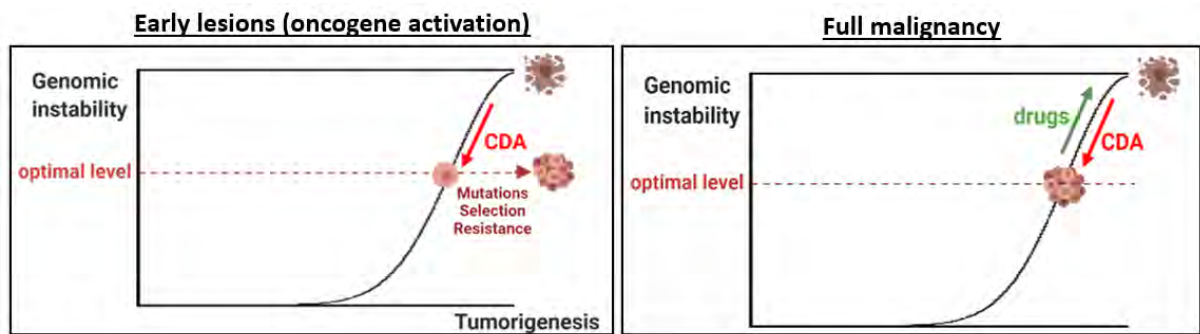


Figure 53 : **Le rôle hypothétique** de la CDA dans le maintien d'un seuil de stress réplicatif nécessaire à la tumorigénèse et non létale pour la cellule. Dans les lésions pré-cancéreuses (gauche), le niveau d'instabilité génomique augmente pendant la tumorigénèse depuis l'activation oncogénique. S'il est exacerbé, il entraîne la létalité des cellules qui ne peuvent pas gérer ce stress. Les cellules expriment la CDA et d'autres facteurs (Chk1) pour diminuer ce niveau d'instabilité génomique à un seuil optimal compatible avec le développement de mutations et de résistances. Ainsi après sélection naturelle, les cellules ayant réussi à maintenir un niveau élevé d'instabilité génomique seraient celles qui se seraient adaptées en exprimant notamment la CDA. Ainsi dans la tumeur pancréatique (droite), les cellules possèdent toujours un niveau élevé d'instabilité génomique et sont dépendantes de la CDA pour le tolérer. En conséquent, là où les chimiothérapies visent à augmenter le niveau d'instabilité génétique à un niveau létale pour la cellule, la CDA diminue les niveaux de stress réplicatif et d'instabilité génétique et induit la chimiorésistance.

Enfin, il pourrait être utile de considérer un modèle élaboré par Kaur et collègues concernant BLM pour mieux comprendre le rôle de la CDA dans le PDAC. Dans ce modèle, le taux de BLM doit être finement régulé pour maintenir l'intégrité du génome. La mutation BLM induit la pathologie du Syndrome de Bloom associée à l'instabilité génétique et un risque élevé de prédisposition aux cancers de cancer^{341,343,347}. En cas de surexpression de BLM, les mécanismes de réparation de l'ADN et de recombinaison sont exacerbés. En effet, dans les cellules de leucémie myéloïde chronique l'expression de BLM est induite et stimule la HR via l'interaction BLM-RAD51 en réponse aux chimiothérapies. Ainsi

la surexpression de BLM dans les cancers est associée à la prolifération tumorale, la chimiorésistance et une faible survie des patients³⁴³. Nous pouvons imaginer un modèle similaire concernant la CDA, pour laquelle des forts taux, probablement dus au contexte oncogénique, et plus particulièrement au stress réplcatif induit par K-RAS, favoriseraient la tumorigénèse et plus tard la résistance au traitement (Figure 54).

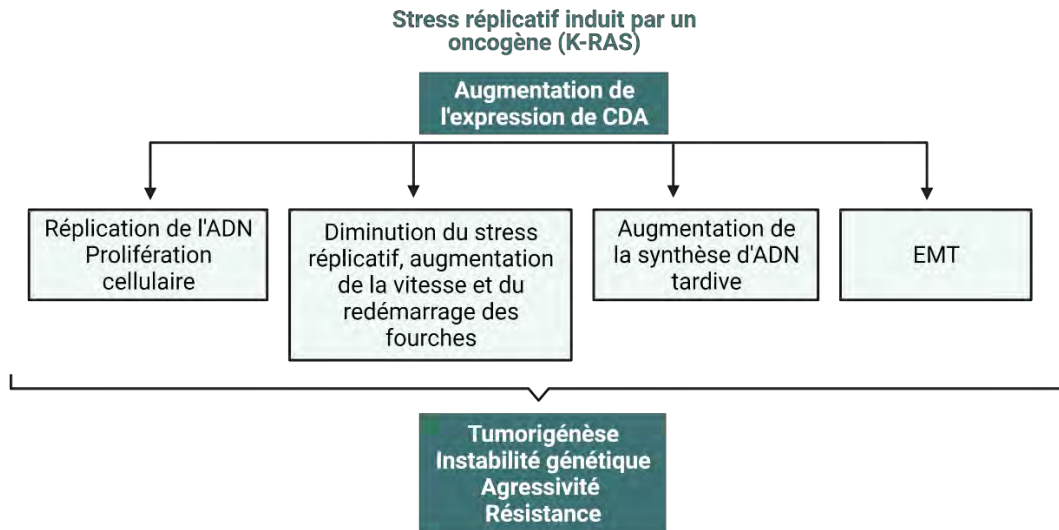


Figure 54 : **Modèle hypothétique** final des rôles de la CDA dans le cancer du pancréas basé sur les résultats obtenus pendant ma thèse.

Ma thèse apporte de nouvelles connaissances fondamentales sur le rôle de la CDA dans la régulation des niveaux de stress réplcatif et la synthèse d'ADN qui peuvent se traduire non seulement par de nouvelles avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'oncogénèse pancréatique, mais aussi par de nouvelles opportunités thérapeutiques (Figure 55). Et ce notamment pour lever les résistances aux molécules qui ciblent le métabolisme de l'ADN, selon une approche de médecine de précision, afin d'améliorer le pronostic sombre des patients atteints de ce cancer.

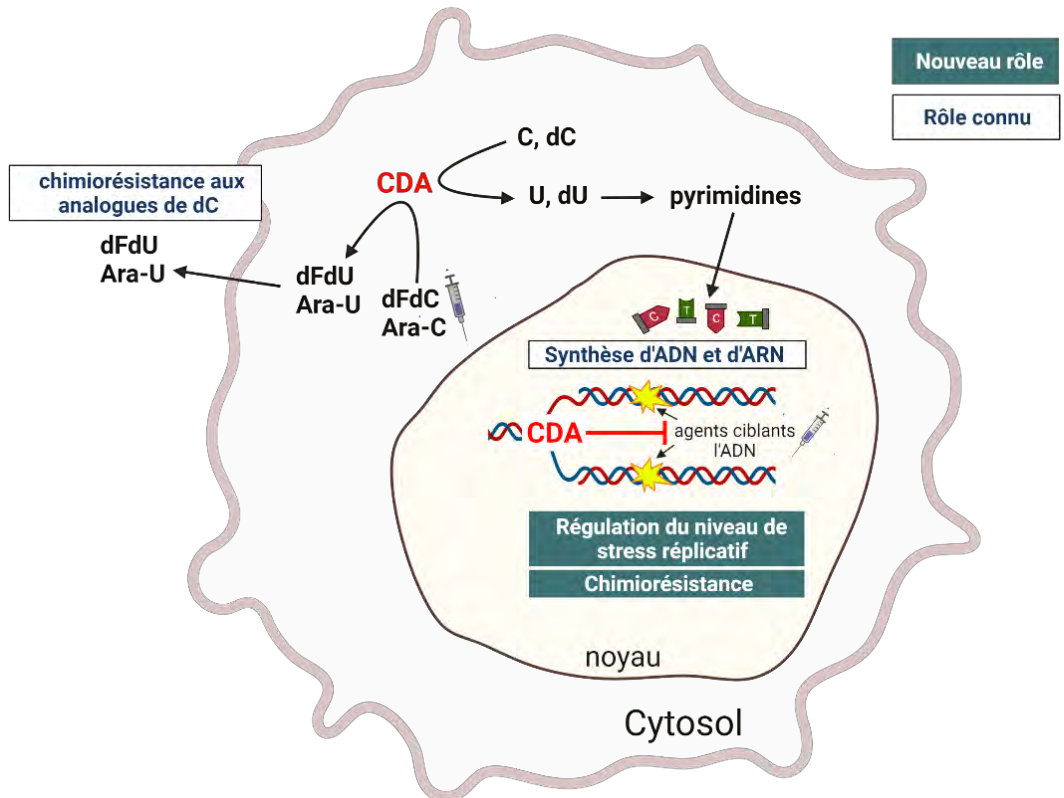


Figure 55 : Rôles connus de la CDA et nouveaux rôles découverts grâce à mes travaux de thèse : le recrutement potentiel de la CDA aux fourches de réplication, son rôle dans la régulation du stress répliatif et enfin son rôle chimioprotecteur des cellules PDAC contre les agents ciblant l'ADN. Ainsi, la CDA protège les cellules cancéreuses pancréatiques contre le stress répliatif endogène et exogène. Ces rôles sont dépendants de l'activité catalytique de la CDA.

Bibliographie

1. Bardeesy, N. & DePinho, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 897–909 (2002).
2. Rhim, A. D. *et al.* EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* **148**, 349–361 (2012).
3. Kleeff, J. *et al.* Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16022 (2016).
4. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
5. Rahib, L., Wehner, M. R., Matrisian, L. M. & Nead, K. T. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw. Open* **4**, e214708 (2021).
6. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 7–33 (2021).
7. Huang, J. *et al.* Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **160**, 744–754 (2021).
8. Rahib, L. *et al.* Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res.* **74**, 2913–2921 (2014).
9. Genkinger, J. M. *et al.* Central adiposity, obesity during early adulthood, and pancreatic cancer mortality in a pooled analysis of cohort studies. *Ann. Oncol.* **26**, 2257–2266 (2015).
10. Klein, A. P. Identifying people at a high risk of developing pancreatic cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 66–74 (2013).
11. Midha, S., Chawla, S. & Garg, P. K. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett.* **381**, 269–277 (2016).
12. Turati, F. *et al.* Family history of cancer and the risk of cancer: a network of case–control studies. *Ann. Oncol.* **24**, 2651–2656 (2013).
13. Chen, F., Roberts, N. J. & Klein, A. P. Inherited Pancreatic Cancer. *Chin. Clin. Oncol.* **6**, 58 (2017).
14. de Snoo, F. A. *et al.* Increased risk of cancer other than melanoma in CDKN2A founder mutation (p16-Leiden)-positive melanoma families. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 7151–7157 (2008).
15. Thompson, E. D. *et al.* The genetics of ductal adenocarcinoma of the pancreas in the year 2020: dramatic progress, but far to go. *Mod. Pathol.* **33**, 2544–2563 (2020).

16. Raphael, K. L. & Willingham, F. F. Hereditary pancreatitis: current perspectives. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **9**, 197–207 (2016).
17. Lowenfels, A. B. *et al.* Hereditary Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 442–446 (1997).
18. Matsubayashi, H. *et al.* Familial pancreatic cancer: Concept, management and issues. *World J. Gastroenterol.* **23**, 935–948 (2017).
19. Kamisawa, T., Isawa, T., Koike, M., Tsuruta, K. & Okamoto, A. Hematogenous Metastases of Pancreatic Ductal Carcinoma. *Pancreas* **11**, 345–349 (1995).
20. Wolfgang, C. L. *et al.* Recent Progress in Pancreatic Cancer. *CA. Cancer J. Clin.* **63**, 318–348 (2013).
21. Lee, E. S. & Lee, J. M. Imaging diagnosis of pancreatic cancer: A state-of-the-art review. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 7864–7877 (2014).
22. De La Cruz, M. S. D., Young, A. P. & Ruffin, M. T. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Am. Fam. Physician* **89**, 626–632 (2014).
23. Blackford, A. L., Canto, M. I., Klein, A. P., Hruban, R. H. & Goggins, M. Recent Trends in the Incidence and Survival of Stage 1A Pancreatic Cancer: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Analysis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **112**, 1162–1169 (2020).
24. Yachida, S. *et al.* Distant Metastasis Occurs Late during the Genetic Evolution of Pancreatic Cancer. *Nature* **467**, 1114–1117 (2010).
25. O’Neill, R. S. & Stoita, A. Biomarkers in the diagnosis of pancreatic cancer: Are we closer to finding the golden ticket? *World J. Gastroenterol.* **27**, 4045–4087 (2021).
26. Koprowski, H., Herlyn, M., Steplewski, Z. & Sears, H. F. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* **212**, 53–55 (1981).
27. Del Villano, B. C. *et al.* Radioimmunometric assay for a monoclonal antibody-defined tumor marker, CA 19-9. *Clin. Chem.* **29**, 549–552 (1983).
28. Luo, G. *et al.* CA19-9-Low&Lewis (+) pancreatic cancer: A unique subtype. *Cancer Lett.* **385**, 46–50 (2017).
29. Poruk, K. E. *et al.* The Clinical Utility of CA 19-9 in Pancreatic Adenocarcinoma: Diagnostic and Prognostic Updates. *Curr. Mol. Med.* **13**, 340–351 (2013).
30. Raphael, B. J., Aguirre, A. J. & Hruban, R. H. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **32**, 185-203.e13 (2017).

31. Buscail, L., Bournet, B. & Cordelier, P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 153–168 (2020).
32. Hayashi, A., Hong, J. & Iacobuzio-Donahue, C. A. The pancreatic cancer genome revisited. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 1–13 (2021) doi:10.1038/s41575-021-00463-z.
33. Bournet, B. *et al.* Oncogène Kras et cancer du pancréas - Trente ans plus tard. *médecine/sciences* **29**, 991–997 (2013).
34. Bournet, B. *et al.* KRAS G12D Mutation Subtype Is A Prognostic Factor for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **7**, e157 (2016).
35. Bournet, B., Buscail, C., Muscari, F., Cordelier, P. & Buscail, L. Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **54**, 75–83 (2016).
36. Samandari, M., Julia, M. G., Rice, A., Chronopoulos, A. & Del Rio Hernandez, A. E. Liquid biopsies for management of pancreatic cancer. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **201**, 98–127 (2018).
37. Buscail, E. *et al.* Liquid Biopsy Approach for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* **11**, 852 (2019).
38. Imamura, T. *et al.* Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J. Gastroenterol.* **22**, 5627–5641 (2016).
39. Sausen, M. *et al.* Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat. Commun.* **6**, 7686 (2015).
40. Castells, A. *et al.* K-ras Mutations in DNA Extracted From the Plasma of Patients With Pancreatic Carcinoma: Diagnostic Utility and Prognostic Significance. *J. Clin. Oncol.* **17**, 578–578 (1999).
41. Lewis, A. R., Valle, J. W. & McNamara, M. G. Pancreatic cancer: Are ‘liquid biopsies’ ready for prime-time? *World J. Gastroenterol.* **22**, 7175–7185 (2016).
42. Que, R., Ding, G., Chen, J. & Cao, L. Analysis of serum exosomal microRNAs and clinicopathologic features of patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J. Surg. Oncol.* **11**, 219 (2013).
43. Melo, S. A. *et al.* Glypican1 identifies cancer exosomes and facilitates early detection of cancer. *Nature* **523**, 177–182 (2015).
44. Fong, Z. V. & Winter, J. M. Biomarkers in Pancreatic Cancer: Diagnostic, Prognostic, and Predictive. *Cancer J.* **18**, 530–538 (2012).
45. Waddell, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495–501 (2015).

46. Maitra, A. & Hruban, R. H. Pancreatic Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 157–188 (2008).
47. Cole, M. D. & McMahon, S. B. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* **18**, 2916–2924 (1999).
48. Gil, J. & Peters, G. Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 667–677 (2006).
49. Witkiewicz, A. K. *et al.* Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
50. Wang, X., Simpson, E. R. & Brown, K. A. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Res.* **75**, 5001–5007 (2015).
51. Zhao, M., Mishra, L. & Deng, C.-X. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 111–123 (2018).
52. Hosoda, W. *et al.* Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4. *J. Pathol.* **242**, 16–23 (2017).
53. Notta, F. *et al.* A RENEWED MODEL OF PANCREAS CANCER EVOLUTION BASED ON GENOMIC REARRANGEMENT PATTERNS. *Nature* **538**, 378–382 (2016).
54. Jones, S. *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**, 1801–1806 (2008).
55. Biankin, A. V. *et al.* Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* **491**, 399–405 (2012).
56. Dreyer, S. B., Chang, D. K., Bailey, P. & Biankin, A. V. Pancreatic Cancer Genomes: Implications for Clinical Management and Therapeutic Development. *Clin. Cancer Res.* **23**, 1638–1646 (2017).
57. Mocci, E. *et al.* Risk of pancreatic cancer in breast cancer families from the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **22**, 803–811 (2013).
58. Wong, W., Raufi, A. G., Safyan, R. A., Bates, S. E. & Manji, G. A. BRCA Mutations in Pancreas Cancer: Spectrum, Current Management, Challenges and Future Prospects. *Cancer Manag. Res.* **12**, 2731–2742 (2020).
59. Lord, C. J. & Ashworth, A. BRCAness revisited. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 110–120 (2016).
60. Roberts, N. J. *et al.* ATM mutations in hereditary pancreatic cancer patients. *Cancer Discov.* **2**, 41–46 (2012).

61. Lowery, M. A. *et al.* An emerging entity: pancreatic adenocarcinoma associated with a known BRCA mutation: clinical descriptors, treatment implications, and future directions. *The Oncologist* **16**, 1397–1402 (2011).
62. Storz, P. & Crawford, H. C. Carcinogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* **158**, 2072–2081 (2020).
63. Hruban, R. H., Maitra, A., Kern, S. E. & Goggins, M. Precursors to Pancreatic Cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **36**, 831–vi (2007).
64. Andea, A., Sarkar, F. & Adsay, V. N. Clinicopathological Correlates of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A Comparative Analysis of 82 Cases With and 152 Cases Without Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mod. Pathol.* **16**, 996–1006 (2003).
65. Storz, P. & Crawford, H. C. Carcinogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* **158**, 2072–2081 (2020).
66. Delpu, Y. *et al.* Genetic and Epigenetic Alterations in Pancreatic Carcinogenesis. *Curr. Genomics* **12**, 15–24 (2011).
67. Hingorani, S. R. *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450 (2003).
68. Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J. & Kern, S. E. Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2969–2972 (2000).
69. Fusco, N. & Bosari, S. HER2 aberrations and heterogeneity in cancers of the digestive system: Implications for pathologists and gastroenterologists. *World J. Gastroenterol.* **22**, 7926–7937 (2016).
70. Ji, B. *et al.* Ras Activity Levels Control the Development of Pancreatic Diseases. *Gastroenterology* **137**, 1072-1082.e6 (2009).
71. Torres, C. & Grippo, P. J. Pancreatic Cancer Subtypes: A Roadmap for Precision Medicine. *Ann. Med.* **50**, 277–287 (2018).
72. Collisson, E. A. *et al.* Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy. *Nat. Med.* **17**, 500–503 (2011).
73. Moffitt, R. A. *et al.* Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **47**, 1168–1178 (2015).
74. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47–52 (2016).

75. Nicolle, R. *et al.* Establishment of a pancreatic adenocarcinoma molecular gradient (PAMG) that predicts the clinical outcome of pancreatic cancer. *EBioMedicine* **57**, 102858 (2020).
76. Nicolle, R., Blum, Y., Marisa, L., Dusetti, N. & Iovanna, J. Des approches multi-omiques dévoilent de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du cancer du pancréas. *médecine/sciences* **34**, 379–382 (2018).
77. Kamphorst, J. J. *et al.* Human Pancreatic Cancer Tumors Are Nutrient Poor and Tumor Cells Actively Scavenge Extracellular Protein. *Cancer Res.* **75**, 544–553 (2015).
78. Sousa, C. M. *et al.* Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* **536**, 479–483 (2016).
79. Lyssiotis, C. A. & Kimmelman, A. C. Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends Cell Biol.* **27**, 863–875 (2017).
80. Zhan, H. *et al.* Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology. *Cancer Lett.* **392**, 83–93 (2017).
81. Parrasia, S., Zoratti, M., Szabo, I. & Biasutto, L. Targeting Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) | Cell Physiol Biochem. *Cell. Physiol. Biochem.* **55**, 61–90 (2021).
82. de Sousa Cavalcante, L. & Monteiro, G. Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **741**, 8–16 (2014).
83. Amrutkar, M. & Gladhaug, I. P. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers* **9**, 157 (2017).
84. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMoa1011923> https://www.nejm.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa1011923?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov (2011) doi:10.1056/NEJMoa1011923.
85. Hajatdoost, L., Sedaghat, K., Walker, E. J., Thomas, J. & Kosari, S. Chemotherapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review. *Medicina (Mex.)* **54**, (2018).
86. Chen, A. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chin. J. Cancer* **30**, 463–471 (2011).
87. Lord, C. J. & Ashworth, A. PARP Inhibitors: The First Synthetic Lethal Targeted Therapy. *Science* **355**, 1152–1158 (2017).
88. Tirman, S. *et al.* Temporally distinct post-replicative repair mechanisms fill PRIMPOL-dependent ssDNA gaps in human cells. *Mol. Cell* **81**, 4026-4040.e8 (2021).

89. Cong, K. *et al.* Replication gaps are a key determinant of PARP inhibitor synthetic lethality with BRCA deficiency. *Mol. Cell* **81**, 3128-3144.e7 (2021).
90. Neuzillet, C. *et al.* Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Dig. Liver Dis.* **50**, 1257–1271 (2018).
91. Adamska, A., Domenichini, A. & Falasca, M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1338 (2017).
92. Neoptolemos, J. P. *et al.* Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* **304**, 1073–1081 (2010).
93. Neoptolemos, J. P. *et al.* Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet* **389**, 1011–1024 (2017).
94. Oettle, H. *et al.* Second-line oxaliplatin, folinic acid, and fluorouracil versus folinic acid and fluorouracil alone for gemcitabine-refractory pancreatic cancer: outcomes from the CONKO-003 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 2423–2429 (2014).
95. Neoptolemos, J. P. *et al.* Adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid vs observation for pancreatic cancer: composite data from the ESPAC-1 and -3(v1) trials. *Br. J. Cancer* **100**, 246–250 (2009).
96. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* (2018) doi:10.1056/NEJMoa1809775.
97. Tempero, M. A. *et al.* APACT: phase III, multicenter, international, open-label, randomized trial of adjuvant nab-paclitaxel plus gemcitabine (nab-P/G) vs gemcitabine (G) for surgically resected pancreatic adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* **37**, 4000–4000 (2019).
98. Unno, M. *et al.* Randomized phase II/III trial of neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine and S-1 versus upfront surgery for resectable pancreatic cancer (Prep-02/JSAP-05). *J. Clin. Oncol.* **37**, 189–189 (2019).
99. Schwarz, L. *et al.* Resectable pancreatic adenocarcinoma neo-adjuvant FOLF(IRIN)OX-based chemotherapy - a multicenter, non-comparative, randomized, phase II trial (PANACHE01-PRODIGE48 study). *BMC Cancer* **18**, 762 (2018).
100. Ettrich, T. J. *et al.* Neoadjuvant plus adjuvant or only adjuvant nab-paclitaxel plus gemcitabine for resectable pancreatic cancer - the NEONAX trial (AIO-PAK-0313), a prospective, randomized, controlled, phase II study of the AIO pancreatic cancer group. *BMC Cancer* **18**, 1298 (2018).

101. Janssen, Q. P. *et al.* Total neoadjuvant FOLFIRINOX versus neoadjuvant gemcitabine-based chemoradiotherapy and adjuvant gemcitabine for resectable and borderline resectable pancreatic cancer (PREOPANC-2 trial): study protocol for a nationwide multicenter randomized controlled trial. *BMC Cancer* **21**, 300 (2021).
102. Rawla, P., Sunkara, T. & Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* **10**, 10–27 (2019).
103. Gillen, S., Schuster, T., Meyer zum Büschenfelde, C., Friess, H. & Kleeff, J. Preoperative/Neoadjuvant Therapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Response and Resection Percentages. *PLoS Med.* **7**, e1000267 (2010).
104. Ferrone, C. R. *et al.* Radiological and Surgical Implications of Neoadjuvant Treatment With FOLFIRINOX for Locally Advanced and Borderline Resectable Pancreatic Cancer. *Ann. Surg.* **261**, 12–17 (2015).
105. Marthey, L. *et al.* FOLFIRINOX for Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma: Results of an AGEO Multicenter Prospective Observational Cohort. *Ann. Surg. Oncol.* **22**, 295–301 (2015).
106. Suker, M. *et al.* FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Oncol.* **17**, 801–810 (2016).
107. Hammel, P. *et al.* Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *JAMA* **315**, 1844–1853 (2016).
108. Cunningham, D. *et al.* Phase III Randomized Comparison of Gemcitabine Versus Gemcitabine Plus Capecitabine in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5513–5518 (2009).
109. Young, R. *et al.* nab-Paclitaxel plus gemcitabine in metastatic pancreatic adenocarcinoma: Australian subset analyses of the phase III MPACT trial. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* **14**, e325–e331 (2018).
110. Corrie, P. G. *et al.* Scheduling nab-paclitaxel combined with gemcitabine as first-line treatment for metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **122**, 1760–1768 (2020).
111. Védie, A.-L. & Neuzillet, C. Pancreatic cancer: Best supportive care. *Presse Médicale* **48**, e175–e185 (2019).
112. Kaufman, B. *et al.* Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 244–250 (2015).

113. Golan, T. *et al.* Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 317–327 (2019).
114. Hammel, P. [POLO study]. *Bull. Cancer (Paris)* **106**, 717–718 (2019).
115. Hong, D. S. *et al.* KRASG12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1207–1217 (2020).
116. O’Reilly, E. M. & Hechtman, J. F. Tumour response to TRK inhibition in a patient with pancreatic adenocarcinoma harbouring an NTRK gene fusion. *Ann. Oncol.* **30**, viii36–viii40 (2019).
117. Andor, N. *et al.* Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intra-tumor heterogeneity. *Nat. Med.* **22**, 105–113 (2016).
118. Seth, S. *et al.* Pre-existing Functional Heterogeneity of Tumorigenic Compartment as the Origin of Chemoresistance in Pancreatic Tumors. *Cell Rep.* **26**, 1518-1532.e9 (2019).
119. Barber, L. J. *et al.* Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. *J. Pathol.* **229**, 422–429 (2013).
120. Bouwman, P. & Jonkers, J. Molecular Pathways: How Can BRCA-Mutated Tumors Become Resistant to PARP Inhibitors? *Clin. Cancer Res.* **20**, 540–547 (2014).
121. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 573–584 (2007).
122. Rottenberg, S., Disler, C. & Perego, P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **21**, 37–50 (2021).
123. Gout, J. *et al.* Synergistic targeting and resistance to PARP inhibition in DNA damage repair-deficient pancreatic cancer. *Gut* **70**, 743–760 (2021).
124. Krishnakumar, R. & Kraus, W. L. The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Mol. Cell* **39**, 8–24 (2010).
125. Olive, K. P. *et al.* Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* **324**, 1457–1461 (2009).
126. Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Epidemiology of Pancreatic Cancer: An Update. *Dig. Dis.* **28**, 645–656 (2010).
127. Giovannetti, E. *et al.* Transcription Analysis of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 Predicts Survival in Pancreas Cancer Patients Treated with Gemcitabine. *Cancer Res.* **66**, 3928–3935 (2006).

128. Maréchal, R. *et al.* Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 and Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 Predict Survival after Adjuvant Gemcitabine Therapy in Resected Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2913–2919 (2009).
129. Ohhashi, S. *et al.* Down-regulation of Deoxycytidine Kinase Enhances Acquired Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.* **28**, 2205–2212 (2008).
130. Amrutkar, M. & Gladhaug, I. P. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers* **9**, (2017).
131. Nakahira, S. *et al.* Involvement of ribonucleotide reductase M1 subunit overexpression in gemcitabine resistance of human pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **120**, 1355–1363 (2007).
132. Itoj, T. *et al.* Ribonucleotide reductase subunit M2 mRNA expression in pretreatment biopsies obtained from unresectable pancreatic carcinomas. *J. Gastroenterol.* **42**, 389 (2007).
133. Komori, S. *et al.* Contribution of thymidylate synthase to gemcitabine therapy for advanced pancreatic cancer. *Pancreas* **39**, 1284–1292 (2010).
134. Neff, T. & Blau, C. A. Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp. Hematol.* **24**, 1340–1346 (1996).
135. Bjånes, T. K. *et al.* Intracellular Cytidine Deaminase Regulates Gemcitabine Metabolism in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **48**, 153–158 (2020).
136. Abbruzzese, J. L. *et al.* A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **9**, 491–498 (1991).
137. Ebrahim, Q., Mahfouz, R., Ng, K. P. & Sauntharajah, Y. High cytidine deaminase expression in the liver provides sanctuary for cancer cells from decitabine treatment effects. *Oncotarget* **3**, 1137–1145 (2012).
138. Camiener, G. W. & Smith, C. G. Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside—I: Enzyme distribution and species specificity. *Biochem. Pharmacol.* **14**, 1405–1416 (1965).
139. Ciccolini, J. *et al.* Cytidine Deaminase Residual Activity in Serum Is a Predictive Marker of Early Severe Toxicities in Adults After Gemcitabine-Based Chemotherapies. *J. Clin. Oncol.* **28**, 160–165 (2010).
140. Peters, G. J. *et al.* Selection of the best blood compartment to measure cytidine deaminase activity to stratify for optimal gemcitabine or cytarabine treatment. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **33**, 403–412 (2014).

141. Hessmann, E. *et al.* Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* **67**, 497–507 (2018).
142. Amrutkar, M. *et al.* Differential Gemcitabine Sensitivity in Primary Human Pancreatic Cancer Cells and Paired Stellate Cells Is Driven by Heterogenous Drug Uptake and Processing. *Cancers* **12**, 3628 (2020).
143. Dalin, S. *et al.* *Pancreatic Stellate Cells Secrete Deoxycytidine Conferring Resistance to Gemcitabine in PDAC*. 558627 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/558627v1> (2019) doi:10.1101/558627.
144. Weizman, N. *et al.* Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene* **33**, 3812–3819 (2014).
145. Geller, L. T. *et al.* Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* **357**, 1156–1160 (2017).
146. Bian, B. *et al.* Gene expression profiling of patient-derived pancreatic cancer xenografts predicts sensitivity to the BET bromodomain inhibitor JQ1: implications for individualized medicine efforts. *EMBO Mol. Med.* **9**, 482–497 (2017).
147. Buscail, L. *et al.* First-in-man Phase 1 Clinical Trial of Gene Therapy for Advanced Pancreatic Cancer: Safety, Biodistribution, and Preliminary Clinical Findings. *Mol. Ther.* **23**, 779–789 (2015).
148. Humphris, J. L. *et al.* Hypermutation In Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **152**, 68-74.e2 (2017).
149. Grant, R. C. *et al.* Clinical and genomic characterisation of mismatch repair deficient pancreatic adenocarcinoma. *Gut* (2020) doi:10.1136/gutjnl-2020-320730.
150. Hu, Z. I. *et al.* Evaluating Mismatch Repair Deficiency in Pancreatic Adenocarcinoma: Challenges and Recommendations. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **24**, 1326–1336 (2018).
151. Rosen, M. N., Goodwin, R. A. & Vickers, M. M. BRCA mutated pancreatic cancer: A change is coming. *World J. Gastroenterol.* **27**, 1943–1958 (2021).
152. Nygaard, P. On the role of cytidine deaminase in cellular metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **195 Pt B**, 415–420 (1986).
153. Frances, A. & Cordelier, P. The Emerging Role of Cytidine Deaminase in Human Diseases: A New Opportunity for Therapy? *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **28**, 357–366 (2020).

154. Okesli, A., Khosla, C. & Bassik, M. Human Pyrimidine Nucleotide Biosynthesis as a Target for Antiviral Chemotherapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **48**, 127–134 (2017).
155. Johansson, E., Mejlhede, N., Neuhard, J. & Larsen, S. Crystal structure of the tetrameric cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* **41**, 2563–2570 (2002).
156. Kumar, R., DiMenna, L. J., Chaudhuri, J. & Evans, T. Biological function of activation-induced cytidine deaminase (AID). *Biomed. J.* **37**, 269–283 (2014).
157. Cacciamani, T. *et al.* Purification of human cytidine deaminase: Molecular and enzymatic characterization and inhibition by synthetic pyrimidine analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 285–292 (1991).
158. Costanzi, S. *et al.* Human cytidine deaminase: understanding the catalytic mechanism. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **22**, 1539–1543 (2003).
159. Vincenzetti, S. *et al.* Isoenzymatic forms of human cytidine deaminase. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 871–877 (2004).
160. Binder, J. X. *et al.* COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. *Database J. Biol. Databases Curation* **2014**, bau012 (2014).
161. Somasekaram, A., Jarmuz, A., How, A., Scott, J. & Navaratnam, N. Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* **274**, 28405–28412 (1999).
162. Reizer, J., Buskirk, S., Bairoch, A., Reizer, A. & Saier, M. H. A novel zinc-binding motif found in two ubiquitous deaminase families. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **3**, 853–856 (1994).
163. Saito, Y. CDA (cytidine deaminase). Atlas on Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CDA.html (2009).
164. Demontis, S. *et al.* Isolation and characterization of the gene coding for human cytidine deaminase1The sequence of human CD gene exons and 5'-flanking region have been deposited in the EMBL nucleotide data bank and given accession Nos. AF061655–AF061658.1. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* **1443**, 323–333 (1998).
165. Stelzer, G. *et al.* The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **54**, 1.30.1-1.30.33 (2016).
166. Ge, Y. *et al.* The Role of Cytidine Deaminase and GATA1 Mutations in the Increased Cytosine Arabinoside Sensitivity of Down Syndrome Myeloblasts and Leukemia Cell Lines. *Cancer Res.* **64**, 728–735 (2004).

167. Fitzgerald, S. M. *et al.* Identification of functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the cytidine deaminase promoter. *Hum. Genet.* **119**, 276 (2006).
168. Schröder, J. K., Kirch, C., Seeber, S. & Schütte, J. Structural and functional analysis of the cytidine deaminase gene in patients with acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **103**, 1096–1103 (1998).
169. Mameri, H. *et al.* Cytidine Deaminase Deficiency Reveals New Therapeutic Opportunities against Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 2116–2126 (2017).
170. Watanabe, S.-I. & Uchida, T. Expression of cytidine deaminase in human solid tumors and its regulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1312**, 99–104 (1996).
171. Su, M., Chang, Y., Hernandez, D., Jones, R. J. & Ghiaur, G. Regulation of drug metabolizing enzymes in the leukaemic bone marrow microenvironment. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 4111–4117 (2019).
172. Frese, K. K. *et al.* nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov.* **2**, 260–269 (2012).
173. Ye, F.-G. *et al.* Cytidine Deaminase Axis Modulated by miR-484 Differentially Regulates Cell Proliferation and Chemoresistance in Breast Cancer. *Cancer Res.* **75**, 1504–1515 (2015).
174. Rajabpour, A. *et al.* MiR-608 regulating the expression of ribonucleotide reductase M1 and cytidine deaminase is repressed through induced gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **80**, 765–775 (2017).
175. Amit, M. & Gil, Z. Macrophages increase the resistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine by upregulating cytidine deaminase. *Oncoimmunology* **2**, e27231 (2013).
176. Binenbaum, Y. *et al.* Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **78**, 5287–5299 (2018).
177. Serdjebi, C., Milano, G. & Ciccolini, J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**, 665–672 (2015).
178. Micozzi, D. *et al.* Human cytidine deaminase: A biochemical characterization of its naturally occurring variants. *Int. J. Biol. Macromol.* **63**, 64–74 (2014).
179. Yue, L. *et al.* A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. *Pharmacogenet. Genomics* **13**, 29–38 (2003).

180. Sugiyama, E. *et al.* Ethnic Differences of two Non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms in *CDA* Gene. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **24**, 553–556 (2009).
181. Farrell, J. J. *et al.* Cytidine deaminase single-nucleotide polymorphism is predictive of toxicity from gemcitabine in patients with pancreatic cancer: RTOG 9704. *Pharmacogenomics J.* **12**, 395–403 (2012).
182. Yonemori, K. *et al.* Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patient treated with gemcitabine plus cisplatin. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 2620–2624 (2005).
183. Ueno, H., Kiyosawa, K. & Kaniwa, N. Pharmacogenomics of gemcitabine: can genetic studies lead to tailor-made therapy? *Br. J. Cancer* **97**, 145–151 (2007).
184. Serdjebi, C. *et al.* FFCD-1004 Clinical Trial: Impact of Cytidine Deaminase Activity on Clinical Outcome in Gemcitabine-Monotherapy Treated Patients. *PLoS ONE* **10**, e0135907 (2015).
185. Hornbeck, P. V. *et al.* PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **43**, D512–D520 (2015).
186. Chalmers, I. M., Thomson, G. T. & Desjardins, P. Serum cytidine deaminase as a laboratory test for acute inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **47**, 173–174 (1988).
187. Thompson, P. W., Jones, D. D. & Currey, H. L. Cytidine deaminase activity as a measure of acute inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **45**, 9–14 (1986).
188. Jones, D. D., Bahijri, S., Roberts, E. L. & Williams, G. F. Activity of serum cytidine deaminase during pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **89**, 314–317 (1982).
189. Taysi, S., Polat, M. F., Sari, R. A. & Bakan, E. Serum Adenosine Deaminase and Cytidine Deaminase Activities in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **40**, 493–495 (2002).
190. Zauri, M. *et al.* CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer. *Nature* **524**, 114–118 (2015).
191. Laliberté, J., Marquez, V. E. & Momparler, R. L. Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **30**, 7–11 (1992).
192. Wong, P. P. *et al.* Phase I evaluation of tetrahydrouridine combined with cytosine arabinoside. *Cancer Treat. Rep.* **63**, 1245–1249 (1979).
193. Teh, A.-H. *et al.* The 1.48 Å Resolution Crystal Structure of the Homotetrameric Cytidine Deaminase from Mouse. *Biochemistry* **45**, 7825–7833 (2006).

194. Beumer, J. H. *et al.* Plasma pharmacokinetics and oral bioavailability of the 3,4,5,6-tetrahydrouridine (THU) prodrug, triacetyl-THU (taTHU), in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **67**, 421–430 (2011).
195. Chung, S. J., Fromme, J. C. & Verdine, G. L. Structure of Human Cytidine Deaminase Bound to a Potent Inhibitor. *J. Med. Chem.* **48**, 658–660 (2005).
196. Funamizu, N. *et al.* Tetrahydrouridine inhibits cell proliferation through cell cycle regulation regardless of cytidine deaminase expression levels. *PLoS One* **7**, e37424 (2012).
197. Tang, M. *et al.* Zebularine suppressed gemcitabine-induced senescence and improved the cellular and plasma pharmacokinetics of gemcitabine, augmented by liposomal co-delivery. *Int. J. Pharm.* **602**, 120659 (2021).
198. Zhou, L. *et al.* Zebularine: A Novel DNA Methylation Inhibitor that Forms a Covalent Complex with DNA Methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **321**, 591–599 (2002).
199. Sohal, D. *et al.* A pilot clinical trial of the cytidine deaminase inhibitor tetrahydrouridine combined with decitabine to target DNMT1 in advanced, chemorefractory pancreatic cancer. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 3047–3060 (2020).
200. Patki, M., Saraswat, A., Bhutkar, S., Dukhande, V. & Patel, K. In vitro assessment of a synergistic combination of gemcitabine and zebularine in pancreatic cancer cells. *Exp. Cell Res.* **405**, 112660 (2021).
201. Costanzi, S. *et al.* Delineation of the molecular mechanisms of nucleoside recognition by cytidine deaminase through virtual screening. *ChemMedChem* **6**, 1452–1458 (2011).
202. Morita, T., Matsuzaki, A., Kurokawa, S. & Tokue, A. Forced Expression of Cytidine Deaminase Confers Sensitivity to Capecitabine. *Oncology* **65**, 267–274 (2003).
203. Lachmann, N. *et al.* Myeloprotection by Cytidine Deaminase Gene Transfer in Antileukemic Therapy. *Neoplasia N. Y. N* **15**, 239–248 (2013).
204. Lachmann, N. *et al.* Efficient in vivo regulation of cytidine deaminase expression in the haematopoietic system using a doxycycline-inducible lentiviral vector system. *Gene Ther.* **20**, 298–307 (2013).
205. Terzuoli, E. *et al.* Aminoflavone, a ligand of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR), inhibits HIF-1 α expression in an AhR-independent fashion. *Cancer Res.* **70**, 6837–6848 (2010).
206. Barnum, K. J. & O'Connell, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1170**, 29–40 (2014).

207. Siddiqui, K., On, K. F. & Diffley, J. F. X. Regulating DNA Replication in Eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012930 (2013).
208. Burgers, P. M. J. & Kunkel, T. A. Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 417–438 (2017).
209. Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N. & Oda, M. Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 89–130 (2010).
210. Brosh, R. M. & Matson, S. W. History of DNA Helicases. *Genes* **11**, 255 (2020).
211. Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. Causes and Consequences of Replication Stress. *Nat. Cell Biol.* **16**, 2–9 (2014).
212. Debatisse, M., Le Tallec, B., Letessier, A., Dutrillaux, B. & Brison, O. Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends Genet.* **28**, 22–32 (2012).
213. Ozeri-Galai, E. *et al.* Failure of Origin Activation in Response to Fork Stalling Leads to Chromosomal Instability at Fragile Sites. *Mol. Cell* **43**, 122–131 (2011).
214. Letessier, A. *et al.* Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* **470**, 120–123 (2011).
215. Helmrich, A., Ballarino, M. & Tora, L. Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes. *Mol. Cell* **44**, 966–977 (2011).
216. Mankouri, H. W., Huttner, D. & Hickson, I. D. How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *EMBO J.* **32**, 2661–2671 (2013).
217. Martínez, P. & Blasco, M. A. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *J. Cell Biol.* **216**, 875–887 (2017).
218. Bloom, K. & Costanzo, V. Centromere Structure and Function. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **56**, 515–539 (2017).
219. Sørensen, C. S. & Syljuåsen, R. G. Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **40**, 477–486 (2012).
220. Poli, J. *et al.* dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress: S-phase progression under replication stress. *EMBO J.* **31**, 883–894 (2012).
221. Lambert, S. & Carr, A. M. Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma* **122**, 33–45 (2013).

222. Aguilera, A. & García-Muse, T. Causes of Genome Instability. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 1–32 (2013).
223. Mantiero, D., Mackenzie, A., Donaldson, A. & Zegerman, P. Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO J.* **30**, 4805–4814 (2011).
224. Couch, F. B. *et al.* ATR phosphorylates SMARCAL1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev.* **27**, 1610–1623 (2013).
225. Toledo, L. I. *et al.* ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA. *Cell* **155**, 1088–1103 (2013).
226. Neelsen, K. J., Zanini, I. M. Y., Herrador, R. & Lopes, M. Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. *J. Cell Biol.* **200**, 699–708 (2013).
227. Bester, A. C. *et al.* Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development. *Cell* **145**, 435–446 (2011).
228. Chabosseau, P. *et al.* Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat. Commun.* **2**, ncomms1363 (2011).
229. Magdalou, I., Lopez, B. S., Pasero, P. & Lambert, S. A. E. The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin. Cell Dev. Biol.* **30**, 154–164 (2014).
230. Hoeijmakers, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMra0804615> <https://www-nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJMra0804615> (2009) doi:10.1056/NEJMra0804615.
231. Mailand, N., Gibbs-Seymour, I. & Bekker-Jensen, S. Regulation of PCNA–protein interactions for genome stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 269–282 (2013).
232. Ciccio, A. & Elledge, S. J. The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Mol. Cell* **40**, 179–204 (2010).
233. Woods, D. & Turchi, J. J. Chemotherapy induced DNA damage response. *Cancer Biol. Ther.* **14**, 379–389 (2013).
234. Dalgaard, J. Z. Causes and consequences of ribonucleotide incorporation into nuclear DNA. *Trends Genet. TIG* **28**, 592–597 (2012).
235. Nick McElhinny, S. A. *et al.* Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4949–4954 (2010).

236. Wang, G. & Vasquez, K. M. Effects of Replication and Transcription on DNA Structure-Related Genetic Instability. *Genes* **8**, 17 (2017).
237. Chambers, V. S. *et al.* High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat. Biotechnol.* **33**, 877–881 (2015).
238. Durkin, S. G. & Glover, T. W. Chromosome Fragile Sites. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 169–192 (2007).
239. Szlachta, K. *et al.* Topoisomerase II contributes to DNA secondary structure-mediated double-stranded breaks. *Nucleic Acids Res.* **48**, 6654–6671 (2020).
240. Bochman, M. L., Paeschke, K. & Zakian, V. A. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 770–780 (2012).
241. Wansink, D. G. *et al.* RNA polymerase II transcription is concentrated outside replication domains throughout S-phase. *J. Cell Sci.* **107 (Pt 6)**, 1449–1456 (1994).
242. Helmrich, A., Ballarino, M., Nudler, E. & Tora, L. Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 412–418 (2013).
243. Singh, J. & Padgett, R. A. Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1128–1133 (2009).
244. Barlow, J. *et al.* A novel class of early replicating fragile sites that contribute to genome instability in B cell lymphomas. *Cell* **152**, 620–632 (2013).
245. Mortusewicz, O., Herr, P. & Helleday, T. Early replication fragile sites: where replication–transcription collisions cause genetic instability. *EMBO J.* **32**, 493–495 (2013).
246. García-Muse, T. & Aguilera, A. R Loops: From Physiological to Pathological Roles. *Cell* **179**, 604–618 (2019).
247. Tuduri, S. *et al.* Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1315–1324 (2009).
248. Bermejo, R. *et al.* The Replication Checkpoint Protects Fork Stability by Releasing Transcribed Genes from Nuclear Pores. *Cell* **146**, 233–246 (2011).
249. García-Muse, T. & Aguilera, A. Transcription–replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 553–563 (2016).
250. Clemente-Ruiz, M. & Prado, F. Chromatin assembly controls replication fork stability. *EMBO Rep.* **10**, 790–796 (2009).

251. Polo, S. E. & Almouzni, G. Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 104–111 (2006).
252. Nelson, D. M. *et al.* Coupling of DNA Synthesis and Histone Synthesis in S Phase Independent of Cyclin/cdk2 Activity. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7459–7472 (2002).
253. Franco, A. A., Lam, W. M., Burgers, P. M. & Kaufman, P. D. Histone deposition protein Asf1 maintains DNA replisome integrity and interacts with replication factor C. *Genes Dev.* **19**, 1365–1375 (2005).
254. Sale, J. E. Competition, collaboration and coordination – determining how cells bypass DNA damage. *J. Cell Sci.* **125**, 1633–1643 (2012).
255. Petermann, E. & Caldecott, K. W. Evidence That the ATR/Chk1 Pathway Maintains Normal Replication Fork Progression during Unperturbed S Phase. *Cell Cycle* **5**, 2203–2209 (2006).
256. Maréchal, A. & Zou, L. DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012716 (2013).
257. Petermann, E., Woodcock, M. & Helleday, T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16090–16095 (2010).
258. Zou, L. & Elledge, S. J. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* **300**, 1542–1548 (2003).
259. Iyer, D. R. & Rhind, N. The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage. *Genes* **8**, (2017).
260. Namiki, Y. & Zou, L. ATRIP associates with replication protein A-coated ssDNA through multiple interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 580–585 (2006).
261. Shiotani, B. & Zou, L. ATR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 301–304 (2009).
262. Bass, T. E. *et al.* ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nat. Cell Biol.* **18**, 1185–1195 (2016).
263. Haahr, P. *et al.* Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. *Nat. Cell Biol.* **18**, 1196–1207 (2016).
264. Lee, Y.-C., Zhou, Q., Chen, J. & Yuan, J. RPA-binding protein ETAA1 is an ATR activator involved in DNA replication stress response. *Curr. Biol. CB* **26**, 3257–3268 (2016).
265. Dai, Y. & Grant, S. New Insights into Checkpoint Kinase 1 (Chk1) in the DNA Damage Response (DDR) Signaling Network: Rationale for Employing Chk1 Inhibitors in Cancer Therapeutics. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 376–383 (2010).

266. Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**, 905–916 (1999).
267. Karlsson-Rosenthal, C. & Millar, J. B. A. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.* **16**, 285–292 (2006).
268. Ward, I. M. & Chen, J. Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress *. *J. Biol. Chem.* **276**, 47759–47762 (2001).
269. Bertoli, C., Klier, S., McGowan, C., Wittenberg, C. & de Bruin, R. A. M. Chk1 keeps cell cycle transcription active in response to replication stress by interfering with E2F6-dependent repression. *Curr. Biol. CB* **23**, 1629–1637 (2013).
270. Herlihy, A. E. & de Bruin, R. A. M. The Role of the Transcriptional Response to DNA Replication Stress. *Genes* **8**, (2017).
271. Zhang, Y.-W., Jones, T. L., Martin, S. E., Caplen, N. J. & Pommier, Y. Implication of Checkpoint Kinase-dependent Up-regulation of Ribonucleotide Reductase R2 in DNA Damage Response. *J. Biol. Chem.* **284**, 18085–18095 (2009).
272. Chabes, A. *et al.* Survival of DNA Damage in Yeast Directly Depends on Increased dNTP Levels Allowed by Relaxed Feedback Inhibition of Ribonucleotide Reductase. *Cell* **112**, 391–401 (2003).
273. Rhind, N. & Gilbert, D. M. DNA Replication Timing. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a010132 (2013).
274. Seiler, J. A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M. I. & Pommier, Y. The Intra-S-Phase Checkpoint Affects both DNA Replication Initiation and Elongation: Single-Cell and -DNA Fiber Analyses. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5806–5818 (2007).
275. Sørensen, C. S. *et al.* Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **3**, 247–258 (2003).
276. Guo, C. *et al.* Interaction of Chk1 with Treslin Negatively Regulates the Initiation of Chromosomal DNA Replication. *Mol. Cell* **57**, 492–505 (2015).
277. Ge, X. Q. & Blow, J. J. Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J. Cell Biol.* **191**, 1285–1297 (2010).
278. Zhao, H., Watkins, J. L. & Piwnicka-Worms, H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14795–14800 (2002).

279. McIntosh, D. & Blow, J. J. Dormant Origins, the Licensing Checkpoint, and the Response to Replicative Stresses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a012955 (2012).
280. Pilzecker, B., Buoninfante, O. A. & Jacobs, H. DNA damage tolerance in stem cells, ageing, mutagenesis, disease and cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* **47**, 7163–7181 (2019).
281. Chu, W. K. & Hickson, I. D. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 644–654 (2009).
282. Atkinson, J. & McGlynn, P. Replication fork reversal and the maintenance of genome stability. *Nucleic Acids Res.* **37**, 3475–3492 (2009).
283. Branzei, D. & Szakal, B. DNA damage tolerance by recombination: Molecular pathways and DNA structures. *DNA Repair* **44**, 68–75 (2016).
284. Branzei, D. & Foiani, M. Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair* **6**, 994–1003 (2007).
285. Mourón, S. *et al.* Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1383–1389 (2013).
286. Sale, J. E. Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012708 (2013).
287. Sale, J. E., Lehmann, A. R. & Woodgate, R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 141–152 (2012).
288. Yang, W. & Gao, Y. Translesion and repair DNA polymerases: diverse structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 239–261 (2018).
289. Tagliatela, A. *et al.* REV1-Pol ζ maintains the viability of homologous recombination-deficient cancer cells through mutagenic repair of PRIMPOL-dependent ssDNA gaps. *Mol. Cell* **81**, 4008-4025.e7 (2021).
290. Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J. & Lindahl, T. Human DNA Repair Genes. *Science* **291**, 1284–1289 (2001).
291. Giglia-Mari, G., Zotter, A. & Vermeulen, W. DNA Damage Response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a000745 (2011).
292. Caldecott, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 619–631 (2008).
293. Bogliolo, M. & Surrallés, J. Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **33**, 32–40 (2015).

294. Khanna, K. K. & Jackson, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* **27**, 247–254 (2001).
295. Roschke, A. V. & Kirsch, I. R. Targeting Karyotypic Complexity and Chromosomal Instability of Cancer Cells. *Curr. Drug Targets* **11**, 1341–1350 (2010).
296. Bakhoun, S. F. *et al.* The mitotic origin of chromosomal instability. *Curr. Biol. CB* **24**, R148–R149 (2014).
297. Fragkos, M. & Naim, V. Rescue from replication stress during mitosis. *Cell Cycle* **16**, 613–633 (2017).
298. Wilhelm, T., Said, M. & Naim, V. DNA Replication Stress and Chromosomal Instability: Dangerous Liaisons. *Genes* **11**, E642 (2020).
299. Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. & Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* **501**, 338–345 (2013).
300. Hossain, M. & Stillman, B. Meier-Gorlin syndrome mutations disrupt an Orc1 CDK inhibitory domain and cause centrosome reduplication. *Genes Dev.* **26**, 1797–1810 (2012).
301. Chan, K.-L., North, P. S. & Hickson, I. D. BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J.* **26**, 3397–3409 (2007).
302. Bergoglio, V. *et al.* DNA synthesis by Pol η promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *J. Cell Biol.* **201**, 395–408 (2013).
303. Minocherhomji, S. *et al.* Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature* **528**, 286–290 (2015).
304. Baumann, C., Körner, R., Hofmann, K. & Nigg, E. A. PICH, a Centromere-Associated SNF2 Family ATPase, Is Regulated by Plk1 and Required for the Spindle Checkpoint. *Cell* **128**, 101–114 (2007).
305. Chan, K. L., Palmari-Pallag, T., Ying, S. & Hickson, I. D. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 753–760 (2009).
306. Liu, Y., Nielsen, C. F., Yao, Q. & Hickson, I. D. The origins and processing of ultra fine anaphase DNA bridges. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **26**, 1–5 (2014).
307. Stok, C., Kok, Y. P., van den Tempel, N. & van Vugt, M. A. T. M. Shaping the BRCAness mutational landscape by alternative double-strand break repair, replication stress and mitotic aberrancies. *Nucleic Acids Res.* **49**, 4239–4257 (2021).

308. Sarlós, K., Biebricher, A., Petermann, E. J. G., Wuite, G. J. L. & Hickson, I. D. Knotty Problems during Mitosis: Mechanistic Insight into the Processing of Ultrafine DNA Bridges in Anaphase. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **82**, 187–195 (2017).
309. Naim, V. & Rosselli, F. The FANCD1 pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micronucleation and chromosome abnormalities. *Nat. Cell Biol.* **11**, 761–768 (2009).
310. Rodrigue, A. *et al.* The RAD51 paralogs ensure cellular protection against mitotic defects and aneuploidy. *J. Cell Sci.* **126**, 348–359 (2013).
311. Ciccía, A., McDonald, N. & West, S. C. Structural and Functional Relationships of the XPF/MUS81 Family of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 259–287 (2008).
312. Naim, V., Wilhelm, T., Debatisse, M. & Rosselli, F. ERCC1 and MUS81–EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1008–1015 (2013).
313. Graber-Feesl, C. L., Pederson, K. D., Aney, K. J. & Shima, N. Mitotic DNA Synthesis Is Differentially Regulated between Cancer and Noncancerous Cells. *Mol. Cancer Res.* **17**, 1687–1698 (2019).
314. Bhowmick, R., Minocherhomji, S. & Hickson, I. D. RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress. *Mol. Cell* **64**, 1117–1126 (2016).
315. Bhowmick, R. & Hickson, I. D. The ‘enemies within’: regions of the genome that are inherently difficult to replicate. *F1000Research* **6**, 666 (2017).
316. Lens, S. M. A. & Medema, R. H. Cytokinesis defects and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 32–45 (2019).
317. Wang, L. H.-C., Mayer, B., Stemmann, O. & Nigg, E. A. Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. *J. Cell Sci.* **123**, 806–813 (2010).
318. Nigg, E. A. & Stearns, T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1154–1160 (2011).
319. Douthwright, S. & Sluder, G. Link between DNA damage and centriole disengagement/reduplication in untransformed human cells. *J. Cell. Physiol.* **229**, 1427–1436 (2014).
320. Kuznetsova, A. Y. *et al.* Chromosomal instability, tolerance of mitotic errors and multidrug resistance are promoted by tetraploidization in human cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **14**, 2810–2820 (2015).

321. Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M. & Kroemer, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 385–392 (2011).
322. Kalsbeek, D. & Golsteyn, R. M. G2/M-Phase Checkpoint Adaptation and Micronuclei Formation as Mechanisms That Contribute to Genomic Instability in Human Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
323. Crasta, K. *et al.* DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* **482**, 53–58 (2012).
324. Zhang, C.-Z. *et al.* CHROMOTHRIPSIS FROM DNA DAMAGE IN MICRONUCLEI. *Nature* **522**, 179–184 (2015).
325. Koltsova, A. S. *et al.* On the Complexity of Mechanisms and Consequences of Chromothripsis: An Update. *Front. Genet.* **10**, (2019).
326. Xu, B. *et al.* Replication Stress Induces Micronuclei Comprising of Aggregated DNA Double-Strand Breaks. *PLoS ONE* **6**, (2011).
327. Lukas, C. *et al.* 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* **13**, 243–253 (2011).
328. Moreno, A. *et al.* Unreplicated DNA remaining from unperturbed S phases passes through mitosis for resolution in daughter cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E5757–E5764 (2016).
329. Bertolin, A. P., Hoffmann, J.-S. & Gottifredi, V. Under-Replicated DNA: The Byproduct of Large Genomes? *Cancers* **12**, 2764 (2020).
330. Nicholson, J. M. & Cimini, D. Chapter Seven - Link between Aneuploidy and Chromosome Instability. in *International Review of Cell and Molecular Biology* (ed. Jeon, K. W.) vol. 315 299–317 (Academic Press, 2015).
331. Ben-David, U. & Amon, A. Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **21**, 44–62 (2020).
332. Passerini, V. *et al.* The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. *Nat. Commun.* **7**, 10754 (2016).
333. Zhu, J., Tsai, H.-J., Gordon, M. R. & Li, R. Cellular Stress Associated with Aneuploidy. *Dev. Cell* **44**, 420–431 (2018).
334. Wilhelm, T. *et al.* Mild replication stress causes chromosome mis-segregation via premature centriole disengagement. *Nat. Commun.* **10**, 3585 (2019).
335. Murga, M. *et al.* A mouse model of the ATR-Seckel Syndrome reveals that replicative stress during embryogenesis limits mammalian lifespan. *Nat. Genet.* **41**, 891–898 (2009).

336. Bloom, D. Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs; probably a syndrome entity. *AMA Am. J. Dis. Child.* **88**, 754–758 (1954).
337. Brown, E. J. & Baltimore, D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* **14**, 397–402 (2000).
338. Nepal, M., Che, R., Zhang, J., Ma, C. & Fei, P. Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends Cancer* **3**, 840–856 (2017).
339. Taylor, A. M. R. *et al.* Chromosome instability syndromes. *Nat. Rev. Dis. Primer* **5**, 64 (2019).
340. German, J. Bloom's syndrome. *Dermatol. Clin.* **13**, 7–18 (1995).
341. Cunniff, C., Bassetti, J. A. & Ellis, N. A. Bloom's Syndrome: Clinical Spectrum, Molecular Pathogenesis, and Cancer Predisposition. *Mol. Syndromol.* **8**, 4–23 (2017).
342. Flanagan, M. & Cunniff, C. M. Bloom Syndrome. in *GeneReviews*[®] (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).
343. Kaur, E., Agrawal, R. & Sengupta, S. Functions of BLM Helicase in Cells: Is It Acting Like a Double-Edged Sword? *Front. Genet.* **12**, 634789 (2021).
344. Rassool, F. V., North, P. S., Mufti, G. J. & Hickson, I. D. Constitutive DNA damage is linked to DNA replication abnormalities in Bloom's syndrome cells. *Oncogene* **22**, 8749–8757 (2003).
345. Rao, V. A. *et al.* Endogenous gamma-H2AX-ATM-Chk2 checkpoint activation in Bloom's syndrome helicase deficient cells is related to DNA replication arrested forks. *Mol. Cancer Res. MCR* **5**, 713–724 (2007).
346. German, J., Archibald, R. & Bloom, D. CHROMOSOMAL BREAKAGE IN A RARE AND PROBABLY GENETICALLY DETERMINED SYNDROME OF MAN. *Science* **148**, 506–507 (1965).
347. Gaymes, T. J. *et al.* Increased error-prone non homologous DNA end-joining--a proposed mechanism of chromosomal instability in Bloom's syndrome. *Oncogene* **21**, 2525–2533 (2002).
348. Nguyen, G. H. *et al.* Regulation of gene expression by the BLM helicase correlates with the presence of G-quadruplex DNA motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9905–9910 (2014).
349. Gemble, S. *et al.* Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA. *PLoS Genet.* **11**, e1005384 (2015).
350. Gemble, S., Buhagiar-Labarchède, G., Onclercq-Delic, R., Jaulin, C. & Amor-Guéret, M. Cytidine deaminase deficiency impairs sister chromatid disjunction by decreasing PARP-1 activity. *Cell Cycle Georget. Tex* **16**, 1128–1135 (2017).

351. Gaillard, H., García-Muse, T. & Aguilera, A. Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 276–289 (2015).
352. Primo, L. M. F. & Teixeira, L. K. DNA replication stress: oncogenes in the spotlight. *Genet. Mol. Biol.* **43**, e20190138 (2019).
353. Kotsantis, P., Petermann, E. & Boulton, S. J. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *Cancer Discov.* **8**, 537–555 (2018).
354. Srinivasan, S. V., Dominguez-Sola, D., Wang, L. C., Hyrien, O. & Gautier, J. Cdc45 Is a Critical Effector of Myc-Dependent DNA Replication Stress. *Cell Rep.* **3**, 10.1016/j.celrep.2013.04.002 (2013).
355. Macheret, M. & Halazonetis, T. D. Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress. *Nature* **555**, 112–116 (2018).
356. Kotsantis, P. *et al.* Increased global transcription activity as a mechanism of replication stress in cancer. *Nat. Commun.* **7**, 13087 (2016).
357. Xie, M. *et al.* Bcl2 induces DNA replication stress by inhibiting ribonucleotide reductase. *Cancer Res.* **74**, 212–223 (2014).
358. Jones, R. M. *et al.* Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. *Oncogene* **32**, 3744–3753 (2013).
359. Mannava, S. *et al.* Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **7**, 2392–2400 (2008).
360. Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. & Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **319**, 1352–1355 (2008).
361. Bartek, J., Lukas, J. & Bartkova, J. DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of ‘conditional haploinsufficiency’. *Cell Cycle Georget. Tex* **6**, 2344–2347 (2007).
362. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).
363. Gorgoulis, V. G. *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907–913 (2005).
364. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642 (2006).

365. Gilad, O. *et al.* Combining ATR suppression with oncogenic Ras synergistically increases genomic instability, causing synthetic lethality or tumorigenesis in a dosage-dependent manner. *Cancer Res.* **70**, 9693–9702 (2010).
366. Schoppa, D. W. *et al.* Oncogenic stress sensitizes murine cancers to hypomorphic suppression of ATR. *J. Clin. Invest.* **122**, 241–252 (2012).
367. Liberal, V. *et al.* Cyclin-dependent kinase subunit (Cks) 1 or Cks2 overexpression overrides the DNA damage response barrier triggered by activated oncoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2754–2759 (2012).
368. McGranahan, N., Burrell, R. A., Endesfelder, D., Novelli, M. R. & Swanton, C. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Rep.* **13**, 528–538 (2012).
369. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
370. Gordon, D. J., Resio, B. & Pellman, D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 189–203 (2012).
371. Cimini, D. Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1786**, 32–40 (2008).
372. Taylor, A. M. *et al.* Genomic and Functional Approaches to Understanding Cancer Aneuploidy. *Cancer Cell* **33**, 676-689.e3 (2018).
373. Thompson, S. L. & Compton, D. A. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J. Cell Biol.* **180**, 665–672 (2008).
374. Dewhurst, S. M. *et al.* Tolerance whole of genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution. *Cancer Discov.* **4**, 175–185 (2014).
375. Shoshani, O. *et al.* Chromothripsis drives the evolution of gene amplification in cancer. *Nature* **591**, 137–141 (2021).
376. Lee, A. J. X. *et al.* Chromosomal Instability Confers Intrinsic Multi-Drug Resistance. *Cancer Res.* **71**, 1858–1870 (2011).
377. Baumgart, M. *et al.* Genomic instability at both the base pair level and the chromosomal level is detectable in earliest PanIN lesions in tissues of chronic pancreatitis. *Pancreas* **39**, 1093–1103 (2010).

378. Matsuda, Y. *et al.* Gradual telomere shortening and increasing chromosomal instability among PanIN grades and normal ductal epithelia with and without cancer in the pancreas. *PLoS One* **10**, e0117575 (2015).
379. Hingorani, S. R. *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469–483 (2005).
380. Kowalski, J. *et al.* Chromosomal abnormalities of adenocarcinoma of the pancreas: identifying early and late changes. *Cancer Genet. Cytogenet.* **178**, 26–35 (2007).
381. Cortés-Ciriano, I. *et al.* Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nat. Genet.* **52**, 331–341 (2020).
382. Bielski, C. M. *et al.* Genome doubling shapes the evolution and prognosis of advanced cancers. *Nat. Genet.* **50**, 1189–1195 (2018).
383. Campbell, P. J. *et al.* The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1109–1113 (2010).
384. Sahin, I. H. *et al.* Genomic instability in pancreatic adenocarcinoma: a new step towards precision medicine and novel therapeutic approaches. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 893–905 (2016).
385. Dreyer, S. B. *et al.* Targeting DNA Damage Response and Replication Stress in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **160**, 362-377.e13 (2021).
386. Telli, M. L. *et al.* Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 3764–3773 (2016).
387. Bertolotto, C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica* **2013**, 635203 (2013).
388. Zhang, J., Dai, Q., Park, D. & Deng, X. Targeting DNA Replication Stress for Cancer Therapy. *Genes* **7**, (2016).
389. Park, W. *et al.* Genomic Methods Identify Homologous Recombination Deficiency in Pancreas Adenocarcinoma and Optimize Treatment Selection. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **26**, 3239–3247 (2020).
390. Kondo, T. *et al.* Association between homologous recombination repair gene mutations and response to oxaliplatin in pancreatic cancer. *Oncotarget* **9**, 19817–19825 (2018).

391. Xiong, H. Q. *et al.* Phase 2 trial of oxaliplatin plus capecitabine (XELOX) as second-line therapy for patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer* **113**, 2046–2052 (2008).
392. Wattenberg, M. M. *et al.* Platinum response characteristics of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and a germline BRCA1, BRCA2 or PALB2 mutation. *Br. J. Cancer* **122**, 333–339 (2020).
393. Dréan, A., Lord, C. J. & Ashworth, A. PARP inhibitor combination therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **108**, 73–85 (2016).
394. O'Reilly, E. M. *et al.* Randomized, Multicenter, Phase II Trial of Gemcitabine and Cisplatin With or Without Veliparib in Patients With Pancreas Adenocarcinoma and a Germline BRCA/PALB2 Mutation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **38**, 1378–1388 (2020).
395. Lowery, M. A. *et al.* Phase II trial of veliparib in patients with previously treated BRCA-mutated pancreas ductal adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **89**, 19–26 (2018).
396. Pishvaian, M. J. *et al.* Molecular Profiling of Patients with Pancreatic Cancer: Initial Results from the Know Your Tumor Initiative. *Clin. Cancer Res.* **24**, 5018–5027 (2018).
397. Pishvaian, M. J. *et al.* Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol.* **21**, 508–518 (2020).
398. Armstrong, S. A., Schultz, C. W., Azimi-Sadjadi, A., Brody, J. R. & Pishvaian, M. J. ATM Dysfunction in Pancreatic Adenocarcinoma and Associated Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* **18**, 1899–1908 (2019).
399. Aguirre, A. J. *et al.* Real-time genomic characterization of advanced pancreatic cancer to enable precision medicine. *Cancer Discov.* **8**, 1096–1111 (2018).
400. Perkhofer, L. *et al.* ATM Deficiency Generating Genomic Instability Sensitizes Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells to Therapy-Induced DNA Damage. *Cancer Res.* **77**, 5576–5590 (2017).
401. Wallez, Y. *et al.* The ATR inhibitor AZD6738 synergizes with gemcitabine in vitro and in vivo to induce pancreatic ductal adenocarcinoma regression. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 1670–1682 (2018).
402. Prevo, R. *et al.* The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 1072–1081 (2012).
403. Dunlop, C. R. *et al.* Complete loss of ATM function augments replication catastrophe induced by ATR inhibition and gemcitabine in pancreatic cancer models. *Br. J. Cancer* **123**, 1424–1436 (2020).

404. Yap, T. A. *et al.* First-in-Human Trial of the Oral Ataxia Telangiectasia and RAD3-Related (ATR) Inhibitor BAY 1895344 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Discov.* **11**, 80–91 (2021).
405. King, C. *et al.* Characterization and preclinical development of LY2603618: a selective and potent Chk1 inhibitor. *Invest. New Drugs* **32**, 213–226 (2014).
406. Laquente, B. *et al.* A phase II study to evaluate LY2603618 in combination with gemcitabine in pancreatic cancer patients. *BMC Cancer* **17**, 137 (2017).
407. Liang, M., Zhao, T., Ma, L. & Guo, Y. CHK1 inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine via promoting CDK-dependent DNA damage and ribonucleotide reductase downregulation. *Oncol. Rep.* **39**, 1322–1330 (2018).
408. Duong, H.-Q. *et al.* Inhibition of checkpoint kinase 2 (CHK2) enhances sensitivity of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 1261–1270 (2013).
409. Chung, S., Vail, P., Witkiewicz, A. K. & Knudsen, E. S. Coordinately Targeting Cell-Cycle Checkpoint Functions in Integrated Models of Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 2290–2304 (2019).
410. Al Zubaidi, T. *et al.* Targeting the DNA replication stress phenotype of KRAS mutant cancer cells. *Sci. Rep.* **11**, (2021).
411. Qi, Z. & Voit, E. O. Identification of cancer mechanisms through computational systems modeling. *Transl. Cancer Res.* **3**, 233–242 (2014).
412. Fairbanks, L. D., Bofill, M., Ruckemann, K. & Simmonds, H. A. Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans. Disproportionate expansion of pyrimidine pools and contrasting effects of de novo synthesis inhibitors. *J. Biol. Chem.* **270**, 29682–29689 (1995).
413. Evans, D. R. & Guy, H. I. Mammalian Pyrimidine Biosynthesis: Fresh Insights into an Ancient Pathway*. *J. Biol. Chem.* **279**, 33035–33038 (2004).
414. Drissi, R., Dubois, M.-L., Douziech, M. & Boisvert, F.-M. Quantitative Proteomics Reveals Dynamic Interactions of the Minichromosome Maintenance Complex (MCM) in the Cellular Response to Etoposide Induced DNA Damage. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 2002–2013 (2015).
415. Anderson, D. D., Quintero, C. M. & Stover, P. J. Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 15163–15168 (2011).
416. Anderson, D. D. & Stover, P. J. SHMT1 and SHMT2 Are Functionally Redundant in Nuclear De novo Thymidylate Biosynthesis. *PLoS ONE* **4**, e5839 (2009).

417. Fox, J. T., Shin, W. K., Caudill, M. A. & Stover, P. J. A UV-responsive internal ribosome entry site enhances serine hydroxymethyltransferase 1 expression for DNA damage repair. *J. Biol. Chem.* **284**, 31097–31108 (2009).
418. Taricani, L., Shanahan, F., Malinao, M.-C., Beaumont, M. & Parry, D. A Functional Approach Reveals a Genetic and Physical Interaction between Ribonucleotide Reductase and CHK1 in Mammalian Cells. *PLoS ONE* **9**, e111714 (2014).
419. Técher, H., Koundrioukoff, S., Nicolas, A. & Debatisse, M. The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 535–550 (2017).
420. Bui, M. M., Zheng, Z., Antonia, S. & Bepler, G. Thymidylate Synthase 1 (TS1) in Situ Protein Expression Predicts the Survival of Ewing/PNET. *Fetal Pediatr. Pathol.* **29**, 385–392 (2010).
421. Chen, Y.-L., Eriksson, S. & Chang, Z.-F. Regulation and Functional Contribution of Thymidine Kinase 1 in Repair of DNA Damage. *J. Biol. Chem.* **285**, 27327–27335 (2010).
422. veer Reddy, G. P. & Pardee, A. B. Coupled ribonucleoside diphosphate reduction, channeling, and incorporation into DNA of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **257**, 12526–12531 (1982).
423. Austin, W. R. *et al.* Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *J. Exp. Med.* **209**, 2215–2228 (2012).
424. Basbous, J. *et al.* Dihydropyrimidinase protects from DNA replication stress caused by cytotoxic metabolites. *Nucleic Acids Res.* **48**, 1886–1904 (2020).
425. Lopez-Contreras, A. J. *et al.* Increased Rrm2 gene dosage reduces fragile site breakage and prolongs survival of ATR mutant mice. *Genes Dev.* **29**, 690–695 (2015).
426. Sigoillot, F. D., Berkowski, J. A., Sigoillot, S. M., Kotsis, D. H. & Guy, H. I. Cell Cycle-dependent Regulation of Pyrimidine Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 3403–3409 (2003).
427. Lezaja, A. *et al.* RPA shields inherited DNA lesions for post-mitotic DNA synthesis. *Nat. Commun.* **12**, 3827 (2021).
428. Maya-Mendoza, A., Olivares-Chauvet, P., Shaw, A. & Jackson, D. A. S Phase Progression in Human Cells Is Dictated by the Genetic Continuity of DNA Foci. *PLoS Genet.* **6**, e1000900 (2010).
429. Meuth, M. The molecular basis of mutations induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **181**, 305–316 (1989).
430. Kunz, B. A. *et al.* International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat. Res.* **318**, 1–64 (1994).

431. Davidson, M. B. *et al.* Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype: Genomic instability increases dNTP pools. *EMBO J.* **31**, 895–907 (2012).
432. Santana-Codina, N. *et al.* Oncogenic KRAS supports pancreatic cancer through regulation of nucleotide synthesis. *Nat. Commun.* **9**, 4945 (2018).
433. Bianco, J. N. *et al.* Overexpression of Claspin and Timeless protects cancer cells from replication stress in a checkpoint-independent manner. *Nat. Commun.* **10**, 910 (2019).
434. López-Contreras, A. J., Gutierrez-Martinez, P., Specks, J., Rodrigo-Perez, S. & Fernandez-Capetillo, O. An extra allele of Chk1 limits oncogene-induced replicative stress and promotes transformation. *J. Exp. Med.* **209**, 455–461 (2012).

Annexes

Communications orales et posters :

09-2021	American Association for Cancer Research: Pancreatic cancer (présentation flash, anglais), visioconférence
06-2021	European Association for Cancer Research: innovative cancer science (présentation flash, anglais), visioconférence
02-2021	Séminaire de 30 min au CRCT (présentation orale, français), visioconférence
07-2020	The 52 nd meeting of the European Pancreatic Club (présentation flash, anglais), visioconférence
11-2020	The 5 th AEK autumn school 2020: replicative stress and cancer (présentation orale, anglais), visioconférence
02-2020	Toulouse Onco Week 2020 (poster, anglais), Toulouse
11-2019	GSO Cancéropôle Grand Sud-Ouest 2019 (poster, anglais), Arcachon
10-2019	Association Française de la Recherche Contre le cancer du Pancréas (présentation orale, anglais), Toulouse
09-2019	Réunion du Club Français du Pancréas (présentation orale, français), Lyon
05-2019	Workshop GSO « Cancer, genome dynamics and replicative stress » (poster, anglais), Banyuls
04-2019	Journée de l'école doctorale de Toulouse (présentation orale, anglais)

Formations à l'école doctorale :

2020	APro'Doc : le serious game emploi
2020	Leadership et management
2020	Les docteurs et la fonction public – introduction et éléments de recrutement
2020	Journée sur les opportunités de carrière à l'internationale
2019	Vers le métier de chercheur
2018	Publier dans les revues scientifiques : enjeux et modalités pratiques à l'heure du numérique
2018	S'exprimer avec aisance en public
2018	Analyse transcriptomique de cellules uniques par qPCR

