



INSTITUT DE FRANCE
Académie des sciences

Les traductions des Comptes Rendus

Biologies

Impact des R-loops sur le stress réplcatif induit par les oncogènes dans les cellules cancéreuses

Corps de l'article traduit par Jonathan Heuzé[®] et Yea-Lih Lin[®] et Armelle Langronne[®] et Jérôme Poli[®] et Philippe Pasero[®]

Date de publication : 2023-11-13

<https://doi.org/10.5802/crbio.123-fr>

Résumé : Le stress réplcatif correspond à une altération de la progression des fourches de réplication causé par une variété d'événements d'origine endogène ou exogène. Dans les lésions précancéreuses, ce stress est aggravé par la dérégulation de voies oncogéniques, qui perturbe notamment la coordination entre la réplication et la transcription du génome et entraîne une instabilité génétique contribuant au développement du cancer. Il est maintenant bien établi que la transcription peut interférer avec la réplication du génome de différentes façons, telles que des collisions frontales entre polymérase, l'accumulation de supertours positifs de l'ADN ou la formation de R-loops. Ces structures se forment au cours de la transcription lorsque l'ARN naissant se réassocie avec l'ADN derrière l'ARN polymérase, formant un hybride ADN :ARN stable. Dans cette revue, nous discutons comment ces différents processus cotranscriptionnels perturbent la progression des fourches de réplication et comment ils contribuent à l'instabilité génétique des cellules cancéreuses.

Mots-clés : Stress réplcatif, Conflits réplication–transcription, R-loops, Instabilité génomique, Oncogènes, Cancer

Article original :

Jonathan Heuzé; Yea-Lih Lin; Armelle Lengronne; Jérôme Poli;

Philippe Pasero, "Impact of R-loops on oncogene-induced replication stress in cancer cells". *Comptes Rendus Biologies*, vol. 346 (2023), p. 95-105. <https://doi.org/10.5802/crbio.123>

Les traductions des *Comptes Rendus* sont mises à disposition du public dans un but d'accessibilité mais n'ont pas reçu de validation scientifique avant leur publication, seule la publication initiale engage la responsabilité de l'Académie des sciences. Le projet Traduction des *Comptes Rendus* est soutenu par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et par la délégation à la langue française et aux langues de France du ministère de la Culture.

 This translation is licensed under the
CREATIVE COMMONS ATTRIBUTION 4.0 INTERNATIONAL LICENSE.
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



1. Introduction

Notre génome est particulièrement vulnérable lors de la phase S du cycle cellulaire, qui correspond au cycle de synthèse de l'ADN. Au cours de ce processus, les deux brins de la double-hélice sont séparés et les brins complémentaires sont synthétisés de manière fidèle afin que la cellule mère puisse transmettre deux copies identiques du génome aux cellules filles. Cette tâche est exécutée par des milliers de micromachines moléculaires appelées réplisomes, qui polymérisent l'ADN au niveau des fourches de réplication [1, 2]. Ce processus est initié au niveau d'éléments génétiques bien définis appelés origines de réplication [3]. Il dépend de l'assemblage de complexes pré-répliatifs sur les origines pendant la phase G₁ du cycle cellulaire et leur activation en phase S sous le contrôle des kinases CDK et DDK [4, 5, 6]. L'activation des origines permet le recrutement du complexe hélicase CMG, constitué de la protéine CDC45, l'hexamère MCM2-7 et le complexe tétramérique GINS. L'hélicase CMG interagit avec le complexe de protection des fourches de réplication (Claspin, Timeless, Tipin), ainsi qu'avec les ADN polymérases , , et divers facteurs accessoires du réplisome [1, 7, 8]. Les origines de réplication sont activées séquentiellement pendant toute la durée de la phase S, suivant un programme spatio-temporel précis [9, 10]. Les fourches de réplication progressent à la vitesse de 1 à 2 kb par minute le long des chromosomes jusqu'à ce qu'elles rencontrent des fourches progressant en sens opposé ou atteignent l'extrémité des chromosomes [11]. Les deux réplisomes sont alors désassemblés suivant un processus appelé terminaison de la réplication [12]. L'exécution correcte du programme spatial et temporel de réplication permet que chaque portion du génome soit répliquée une fois et une seule au cours de la phase S et assure une transmission fidèle du patrimoine génétique aux cellules filles. Cependant, les fourches de réplication rencontrent divers obstacles durant leur progression le long des chromosomes, ce qui induit ce que l'on appelle communément un stress répliatif [13].

2. Mécanismes de réponse au stress répliatif

Le blocage des fourches de réplication peut induire des cassures et des réarrangements chromosomiques. En effet, les défauts de réplication représentent la source majeure d'instabilité génétique endogène à l'origine des cancers. Les fourches bloquées sont des structures instables qui doivent être rapidement stabilisées et redémarrées afin d'éviter la formation d'intermédiaire de recombinaison toxiques et l'induction de réarrangements chromosomiques [11]. Au cours de l'évolution, des mécanismes de surveillance complexes sont apparus chez les cellules eucaryotes, le principal étant le point de contrôle ou « checkpoint » de phase S médié par les protéines ATR et CHK1 [14].

La kinase ATR est recrutée aux fourches via sa sous-unité ATRIP qui interagit avec RPA, un complexe qui protège l'ADN simple-brin. ATR est activée par TopBP1, un facteur recruté aux jonctions entre ADN simple brin et double brin [15]. Une fois activée, ATR phosphoryle la kinase effectrice CHK1 ce qui permet l'amplification et la propagation du signal de stress. Ce processus est médié par la protéine Claspin, qui fait partie du complexe de protection des fourches de réplication [16, 17, 18]. La voie ATR-CHK1 agit à plusieurs niveaux pour coordonner les processus de réparation des fourches, empêcher l'entrée prématurée en mitose et permettre de terminer la réplication de l'ADN [14].

Le redémarrage des fourches dépend de l'action concertée de nombreuses enzymes incluant des facteurs de recombinaison homologue, des hélicases, des nucléases, des translocases et des remodeleurs de chromatine [19]. En situation de stress, ces facteurs assurent un remodelage extensif de la structure de la fourche. Cela implique notamment un rapprochement des brins d'ADN naissants pour former une jonction à quatre voies appelée fourche réversée [20, 21]. La réversion de la fourche permet la dégradation contrôlée des brins d'ADN naissants par les nucléases MRE11, DNA2 et EXO1 [22] et le recrutement de la recombinaison RAD51 afin d'engager la réparation de la fourche par recombinaison homologue [23]. La résection excessive des brins naissants est empêchée par BRCA1 et BRCA2, deux protéines de réparation fréquemment mutées dans les cancers du sein et de l'ovaire [24, 25]. L'incapacité des cellules à répondre efficacement au stress répliatif entraîne une instabilité génomique chronique et contribue à la tumorigenèse.

3. Principales sources de stress réplicatif

Les mécanismes cellulaires de réponse au stress réplicatif ont été particulièrement étudiés en présence de drogues telles que l'hydroxyurée (HU) ou l'aphidicoline, qui bloquent la réplication en induisant respectivement une déplétion des pools de nucléotides ou en inhibant l'activité des ADN polymérases. Un stress réplicatif est également induit par la plupart des drogues couramment utilisées en chimiothérapie, comme les agents alkylants, les antimétabolites et les inhibiteurs de topoisomérases [26]. Ces drogues induisent un découplage entre l'activité des hélicases et des polymérases et augmentent la présence d'ADN simple-brin, qui est reconnu comme un signal universel de stress par la kinase ATR [13, 27]. Des données récentes indiquent que l'HU peut également ralentir la progression de la fourche indépendamment des pools de dNTP en induisant un stress oxydatif et en déplaçant Timeless du réplisome [28, 29].

En condition normale de croissance, les cellules sont également exposées à un stress réplicatif endogène. Ce stress peut provenir de complexes protéiques fortement associés à l'ADN, de structures secondaires de l'ADN (G-quadruplex, structure en épingle à cheveux...), ou de lésions induites par des produits du métabolisme cellulaire [13, 19]. En condition normale de croissance, ces obstacles sont correctement gérés par la cellule et leur impact sur la réplication reste limité. Un problème plus complexe concerne la disponibilité en désoxyribonucléotides (dNTPs) lors de la phase S. En effet, la production de dNTPs doit être étroitement coordonnée avec la synthèse d'ADN pour garantir une progression optimale des fourches de réplication [11]. Ainsi, il a été montré qu'un déficit en dNTPs ralentit les fourches et un excès accroît leur vitesse [30]. Un pool de dNTPs trop important ou déséquilibré peut aussi augmenter la fréquence de mutations. Le maintien d'un pool équilibré de dNTPs pendant toute la durée de la phase S nécessite un couplage étroit entre le cycle cellulaire et le métabolisme cellulaire [31]. Ainsi, les cellules doivent être à même de détecter la réplication en cours afin de produire les dNTPs au bon moment, ce qui est une fonction essentielle de la voie ATR-CHK1 [32]. De plus, des ribonucléotides (rNTPs) peuvent être incorporés par erreur lors de la synthèse d'ADN. Ces ribonucléotides sont normalement éliminés par le facteur RNase H2 [33, 34, 35]. En absence de cette enzyme, l'excision des ribonucléotides par la topoisomérase I (TOP1) génère des lésions non réparables de l'ADN entraînant des délétions et des cassures double-brin [36].

Une autre source majeure de stress réplicatif endogène résulte de conflits entre réplication et transcription. En effet, les polymérases à ADN et à ARN doivent partager le même substrat d'ADN lorsqu'elles se déplacent le long des chromosomes, ce qui rend les conflits inévitables [37]. Ces conflits peuvent se manifester de différentes façons, comme par exemple des collisions frontales entre les machineries de transcription et de réplication, l'accumulation de stress topologique le long de l'ADN ou via la formation de R-loops [38]. Les R-loops sont des structures d'acides nucléiques à trois brins qui se forment au cours de la transcription lorsque l'ARN naissant se réassocie avec le brin d'ADN matrice, laissant le brin non codant non apparié [39, 40]. Des données récentes indiquent que les R-loops représentent des obstacles pour la réplication, mais les mécanismes moléculaires impliqués dans cette interférence sont encore mal connus [38].

En condition normale de croissance (Figure 1A), le faible niveau de stress réplicatif endogène est correctement géré par la cellule. En effet, elle n'entre en phase S que lorsque son état métabolique le permet, elle régule les pools de dNTPs et coordonne les programmes de transcription et de réplication afin de limiter les conflits [11]. En revanche, l'activation aberrante d'oncogènes dans les cellules pré-tumorales perturbe cette coordination (Figure 1B). Le stress réplicatif endogène augmente, ce qui induit de l'instabilité génétique et contribue au développement de cancers [41].

4. Stress réplicatif induit par les oncogènes

Il a été montré que l'expression aberrante d'oncogènes tels que Ras, Myc ou CycE peut perturber la réplication de différentes manières, par exemple en dérégulant les pools de dNTPs, en augmentant les conflits réplication-transcription ou en provoquant une entrée prématurée des cellules en phase S [39, 41, 42, 43]. Ce stress réplicatif induit par les oncogènes représente une épée à double tranchant pour les cellules cancéreuses.

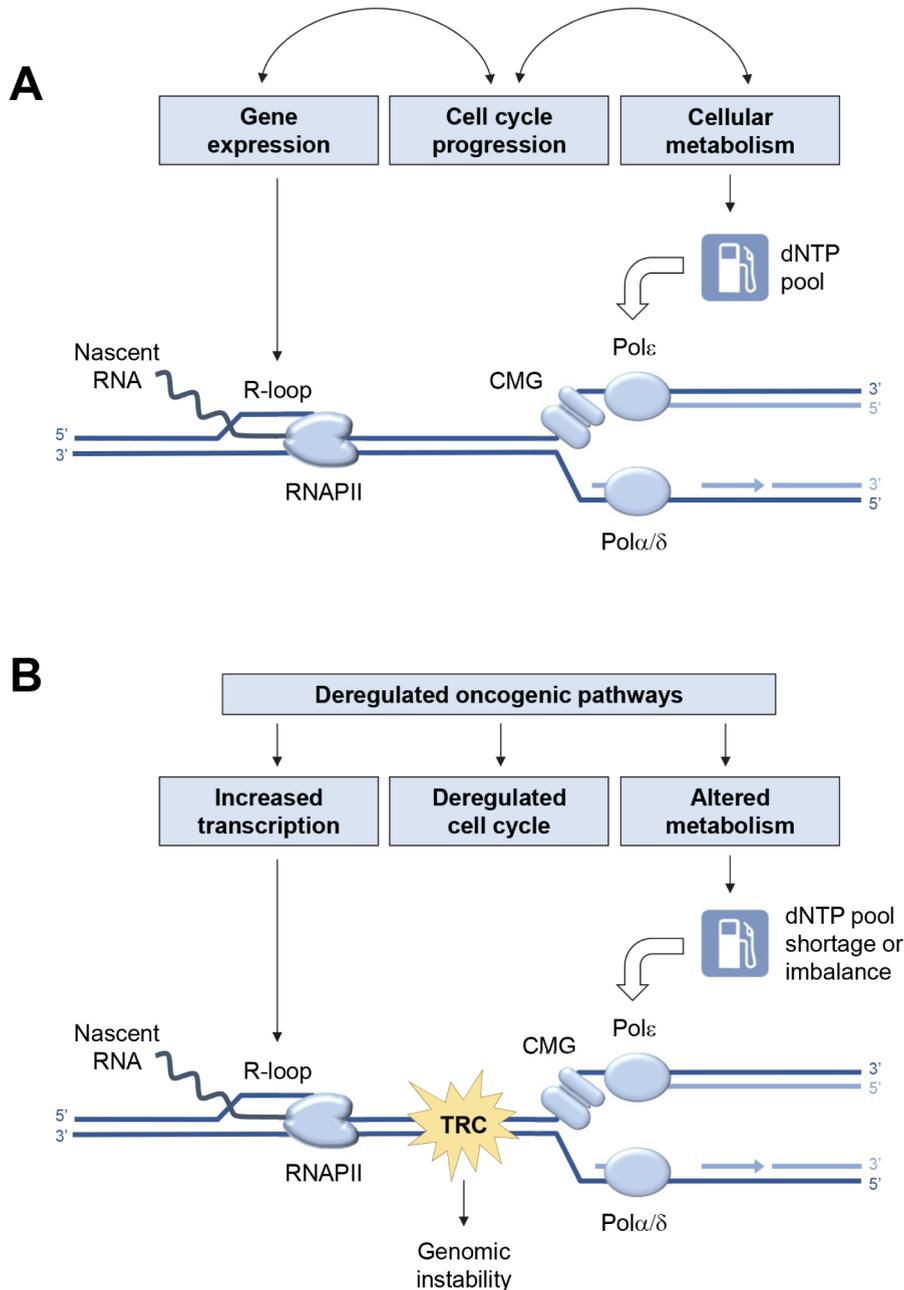


FIGURE 1 – Principales sources de stress de réplication endogène dans les cellules normales et cancéreuses. (A) La progression de la fourchette de réplication dépend d'un apport constant de désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP) pour alimenter l'activité des ADN polymérase α , δ et ϵ . La cellule doit également éviter les collisions entre les fourchettes de réplication et les complexes de transcription (RNAPII). Dans des conditions de croissance normales, cette coordination est obtenue par un couplage étroit entre les programmes de réplication et de transcription. (B) La dérégulation des voies oncogènes augmente la transcription et la formation de la boucle R, modifie la transition G_1/S et perturbe le métabolisme cellulaire. Cela entraîne une dérégulation des pools de dNTP, une augmentation des conflits de réplication-transcription et une accumulation de réarrangements chromosomiques.

Bien qu'il contribue au développement du cancer en favorisant l'instabilité génétique, il ralentit également la prolifération des cellules tumorales et active des barrières anticancéreuses conduisant à l'apoptose ou à la sénescence [44, 45, 46, 47]. Pour continuer à proliférer, les cellules cancéreuses doivent contourner ces barrières, tout en limitant les effets délétères du stress réplicatif sur la réplication de leurs chromosomes. Pour se faire, ces cellules développent une addiction à la voie ATR-CHK1 [48, 49, 50]. Elles parviennent également à s'adapter au stress réplicatif induit par les oncogènes en surexprimant des composants du complexe de protection des fourches de réplication tels que Claspin et Timeless, indépendamment d'ATR [51]. Cette surexpression est observée dans les carcinomes primaires du colon, du sein et du poumon et est généralement associée à un mauvais pronostic. De manière étonnante, la surexpression de Claspin et Timeless apparaît spontanément dans des fibroblastes humains immortalisés exprimant l'oncogène H-Ras^{V12} et leur permet d'échapper au stress réplicatif et à la sénescence [51].

5. Conflits réplication-transcription et cancer

Les conflits réplication-transcription contribuent de manière prépondérante au stress réplicatif détecté dans les cellules tumorales [43]. Etant donné que les complexes de transcription et de réplication progressent sensiblement à la même vitesse, les conflits les plus graves résultent de collisions frontales [52, 53]. Afin de limiter les effets délétères des conflits frontaux, le génome d'espèces bactériennes telles que *Bacillus subtilis* a évolué de manière ce que la plupart des gènes soient orientés de manière codirectionnelle par rapport aux fourches de réplication [54]. En revanche, les gènes associés à la pathogenèse et à la résistance au stress sont orientés en sens opposé à la réplication, ce qui augmente localement les dommages à l'ADN et favorise une évolution ciblée de ces gènes [55, 56]. Cette organisation codirectionnelle de la réplication et de la transcription n'est pas retrouvée chez les eucaryotes car contrairement aux chromosomes bactériens, qui ne présentent qu'une seule origine de réplication, les chromosomes eucaryotes peuvent en porter plusieurs milliers. D'autre part, la diversité des programmes d'expression génique chez les métazoaires ne permet pas de définir une organisation unique qui serait adaptée à tous les types cellulaires. Les eucaryotes ne sont pas pour autant démunis face aux effets délétères des conflits transcription-réplication. En effet, dans le contexte dynamique de la différenciation cellulaire, les cellules humaines utilisent une astuce consistant à promouvoir l'initiation de la réplication en amont des gènes fortement transcrits [57, 58, 59], ce qui permet à la plupart des gènes d'être répliqués codirectionnellement. Ainsi, le profil moyen de direction des fourches est positif (codirectionnel) entre le site de démarrage (TSS) et de terminaison (TTS) de la transcription dans les cellules HeLa (Figure 2A). Il est intéressant de noter que le sens de progression des fourches s'inverse à la fin des gènes, ce qui indique que les fourches de réplication initiées en aval des gènes convergent avec la transcription au niveau des TTS [60].

Une autre question importante concerne l'impact des R-loops sur les conflits réplication-transcription. L'utilisation de méthodes telles que le DRIP-seq, qui consistent à immunoprécipiter les R-loops avec un anticorps reconnaissant spécifiquement les hybrides ADN:ARN et à séquencer les acides nucléiques associés, a permis de montrer que les R-loops sont très abondantes et peuvent occuper jusqu'à 5% du génome humain [61, 62]. Ces structures jouent des rôles physiologiques importants, tels que le contrôle de l'expression des gènes, la recombinaison des gènes d'immunoglobulines et la réplication de l'ADN mitochondrial [39]. La question se pose alors de savoir si toutes les R-loops sont intrinsèquement difficiles à répliquer, ou si une classe particulière de R-loops est particulièrement toxique pour les fourches de réplication.

L'analyse de la distribution de marqueurs de stress réplicatif tel que le substrat d'ATR phospho-RPA32-S33 montre que la plupart des R-loops ne sont pas associées à un stress réplicatif dans le génome humain [60]. En effet, les R-loops cotranscriptionnelles sont principalement localisées au niveau des sites d'initiation (TSS) et de terminaison (TTS) de la transcription, alors qu'un enrichissement en phospho-RPA32-S33 n'est détecté qu'au niveau des TTS (Figure 2A). Etant donné que ces régions sont en moyenne répliquées en direction opposée au sens de la transcription, cela signifie que les conflits réplication-transcription ont lieu préférentiellement au niveau du TTS de gènes fortement transcrits et enrichis en R-loops, lorsque les machineries de réplication et

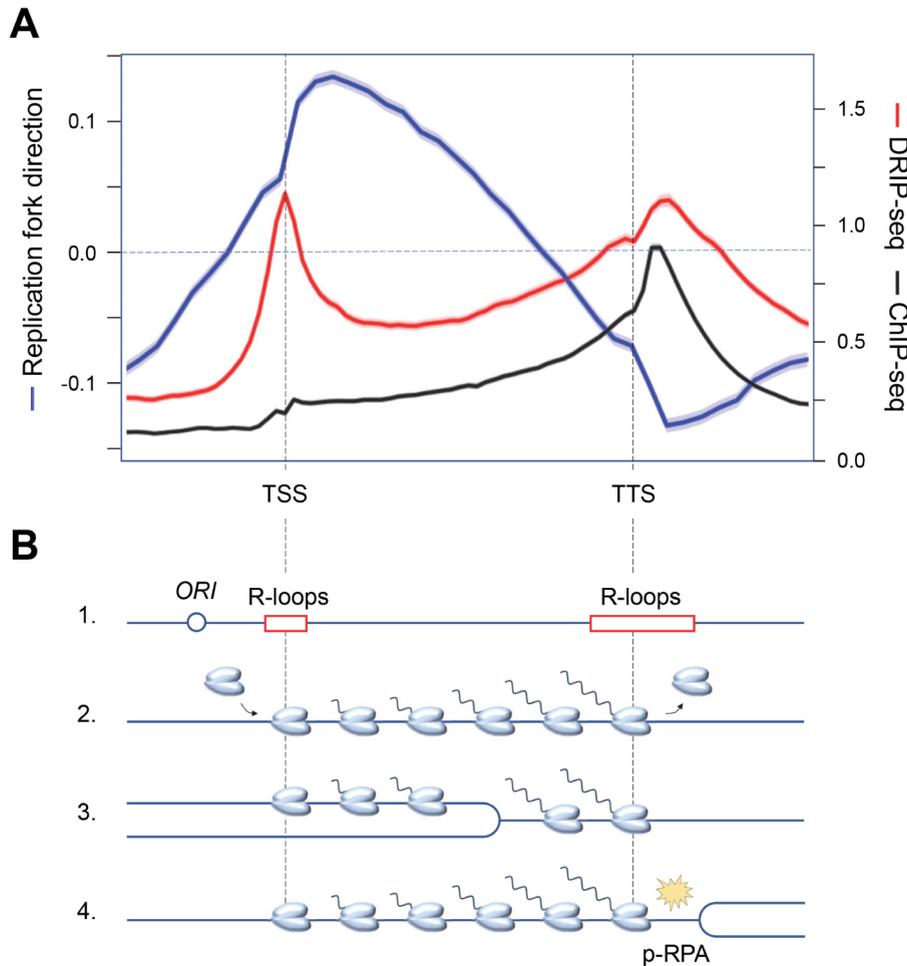


FIGURE 2 – Organisation fonctionnelle du génome humain et conflits réplication-transcription. (A) Distribution de la direction de la fourche de réplication (bleu), des boucles R (rouge) et d'un marqueur de stress de réplication (p-RPA32-S33, noir) au niveau d'un mégabase (16 000 gènes humains) aligné entre les sites de début de transcription (TSS) et de fin de transcription (TTS). Une direction de fourche de réplication positive indique que la fourche progresse dans le même sens que la transcription. (B) Représentation schématique de la distribution des origines de réplication et des boucles R (1), ainsi que des ARN polymérases avant la réplication (2), lorsque la réplication est initiée en amont du TSS (3), et lorsque la réplication et la transcription convergent au niveau du TTS, induisant un stress de réplication (étincelle jaune) et une accumulation de phospho-RPA32-S33 (4).

de transcription convergent (Figure 2B). Il est important de noter que ces conflits n'induisent pas automatiquement une cassure chromosomique, ces événements n'étant détectés que dans les cellules déplétées en Top1, qui n'arrivent pas à gérer les problèmes topologiques induits par la convergence de la réplication et de la transcription (Figure 3A). De plus, le stress réplcatif observé en absence de Top1 est supprimé par la surexpression de RNase H1, une enzyme impliquée dans la dégradation des hybrides ADN:ARN, ce qui atteste du fait que les R-loops contribuent aux conflits réplication-transcription [60, 63].

En conclusion, l'organisation fonctionnelle du génome humain permettrait de réduire l'instabilité génétique associée aux conflits réplication-transcription en limitant ces conflits à des zones bien définies en aval des gènes. Par contre, cette régulation ne peut opérer si l'initiation de la réplication a lieu à l'intérieur des

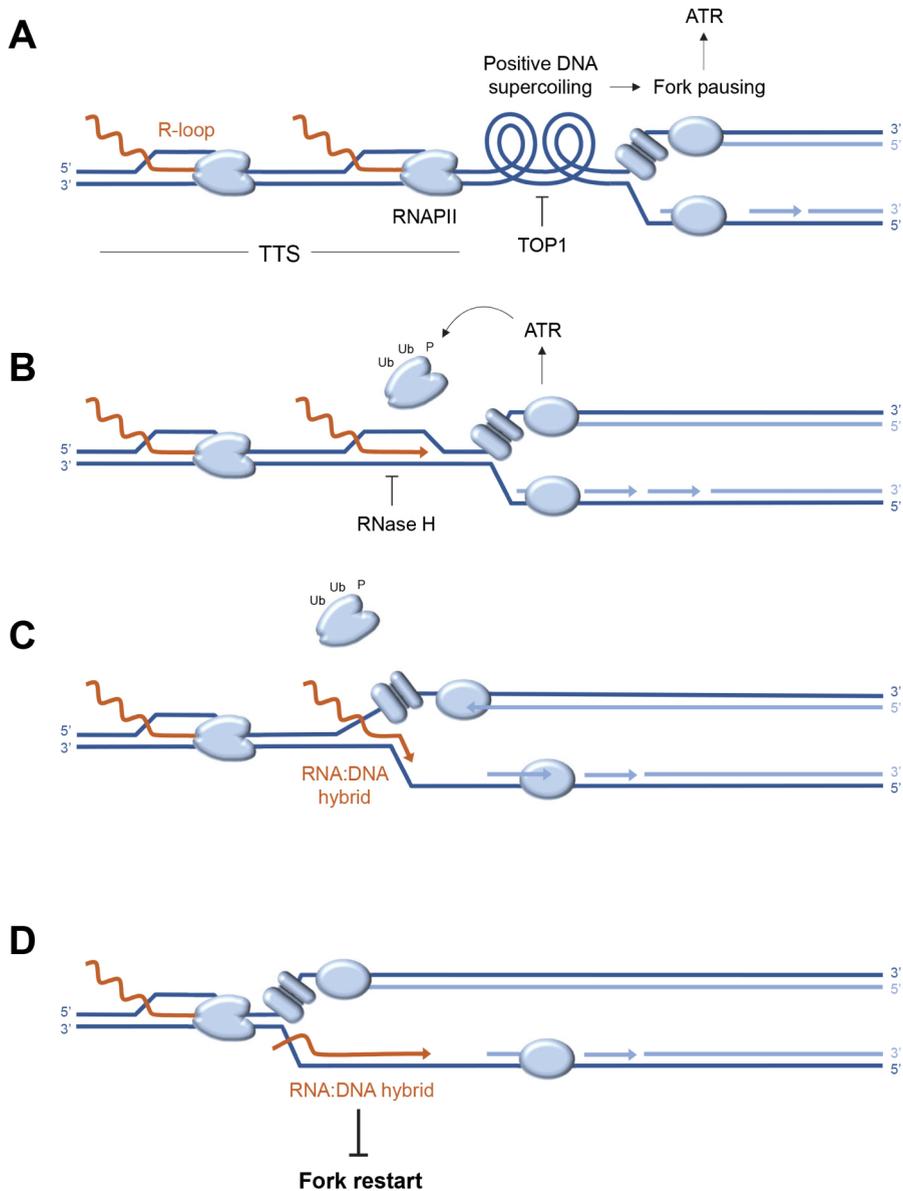


FIGURE 3 – Modèle de conflit de réplication-transcription impliquant la formation d'hybrides ARN :ADN post-réplication. (A) La convergence du réplisome et des ARN polymérase (RNAPII) au niveau des sites de terminaison de la transcription (TTS) induit l'accumulation d'un surenroulement d'ADN positif, ce qui provoque l'arrêt de la fourche de réplication et l'activation de la kinase ATR. La libération de cette contrainte topologique est médiée par Top1. (B) L'ATR favorise l'élimination des ARN polymérase bloquant la fourche. Dans le même temps, l'hybride ADN :ARN est dégradé par la RNase H pour éliminer la boucle R. (C) En l'absence de RNase H, l'hélicase répliquative progresse au-delà de la position de la boucle R, transférant l'hybride ADN :ARN derrière la fourchette et s'arrête au RNAPII suivant. (D) ARN : les hybrides d'ADN situés derrière la fourche interfèrent avec les mécanismes post-réplication tels que la résection de l'ADN naissant et empêchent le redémarrage de la fourche.

gènes, ce qui ne se produit que très rarement en conditions physiologiques normales. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'une nouvelle classe d'origines de réplication a été identifiée à l'intérieur des gènes en situation de stress oncogénique [64]. Cette initiation intragénique est associée à des réarrangements chromosomiques dans les cancers, possiblement car elle ne permet pas de gérer les conflits réplication-transcription de manière optimale.

6. R-loops et hybrides ADN-ARN post-réplicatifs

La cellule est bien équipée pour gérer les conflits entre réplication et transcription. D'une part, la fourche de réplication est capable de déplacer les complexes de transcription qui bloquent son passage (Figure 3B) en mobilisant différents facteurs coordonnés par la kinase ATR [65, 66, 67, 68]. D'autre part, la cellule dispose de toute une panoplie d'enzymes capable de dégrader ou déplacer les hybrides ADN :ARN au niveau des R-loops [40]. Il s'agit notamment des RNases H1 et H2, qui dégradent spécifiquement la partie ARN des hybrides ADN :ARN [69, 70, 71]. La RNase H2 est fréquemment mutée dans une interféronopathie sévère appelée le syndrome d'Aicardi-Goutières [72, 73]. D'autres acteurs clés comprennent des hélicases telles que Senataxin [74, 75] et FANCM [76]. Pourtant, malgré cette redondance de mécanismes de réparation, certaines R-loops interfèrent avec la réplication, suivant un mécanisme qui reste à élucider.

Il est généralement admis que les hybrides ADN :ARN sont intrinsèquement difficiles à répliquer et qu'ils bloquent la progression des fourches. Cependant, quand réplication et transcription convergent, l'hybride ADN :ARN est positionné sur le brin opposé à l'hélicase réplicative (CMG), ce qui ne devrait pas bloquer sa progression (Figure 3C). Des données récentes dérivées d'un système de réplication *in vitro* indiquent d'ailleurs que les hybrides ADN :ARN ne bloquent pas les fourches dans cette configuration, à moins que le brin d'ADN déplacé soit capable de former une structure secondaires de type G4 [77]. Alternativement, les hybrides ADN :ARN pourraient interférer avec des mécanismes post-réplicatifs agissant derrière les fourches pour permettre leur redémarrage [78, 79]. Ce modèle est supporté par des données non publiées de l'équipe, montrant qu'en absence de RNase H2, la résection des brins d'ADN naissants est inhibée par la persistance d'hybrides ADN :ARN non dégradés. Etant donné que la résection des fourches contribue à leur redémarrage [23, 80], ces hybrides ADN :ARN post-réplicatifs pourraient induire un stress répliatif pas uniquement en bloquant les fourches, mais surtout en empêchant le redémarrage des fourches bloquées (Figure 3D). Ce modèle est en accord avec des données récentes de l'équipe de Massimo Lopes [81], mettant en évidence par microscopie électronique la présence d'hybrides ADN :ARN derrière les fourches de réplication.

Ces récentes découvertes nous ont conduit à proposer un modèle dans lequel les R-loops et les complexes transcriptionnels ne représenteraient pas seulement un obstacle pour la fourche de réplication, mais que la progression limitée de l'hélicase réplicative au niveau du site de conflit pourrait convertir la R-loop en hybride ADN :ARN toxique, interférant avec le redémarrage de la fourche s'il n'est pas rapidement dégradé par la RNase H2 (Figures 3C,D). Ce modèle souligne l'importance pour la cellule d'éliminer de manière coordonnée le complexe de transcription et la R-loop afin d'éviter la formation d'un hybride ADN :ARN post-répliatif. Il est intéressant de noter que les cellules pourraient être particulièrement sensibles aux conflits transcription-réplication lorsque les fourches de réplication sont ralenties par HU ou le stress oxydatif [29]. Différents mécanismes pourraient d'ailleurs opérer lorsque la progression de la fourche est bloquée. En effet, il a été rapporté que le redémarrage de la fourche au niveau des lésions CPT dans les cellules humaines implique le clivage des fourches bloquées par MUS81 [82]. Chez la levure *S. pombe*, le redémarrage de la fourche aux lésions CPT, ainsi qu'à la barrière de la fourche de réplication *RTS1* dépend de la dégradation par la RNase H des amorces ARN sur les fragments d'Okazaki [83].

7. Conclusion et perspectives

En conclusion, les données rassemblées par différentes équipes au cours des dernières années éclairent d'un jour nouveau les mécanismes moléculaires à l'origine de l'instabilité génétique dans les cancers. Il appa-

rait maintenant que malgré une organisation fonctionnelle optimale du génome et une redondance des mécanismes de réparation, les conflits réplication-transcription représentent une source majeure d'instabilité génétique, notamment quand des voies oncogéniques sont dérégulées. Les R-loops contribuent significativement à ces conflits, mais les mécanismes moléculaires impliqués s'avèrent plus complexes qu'initialement envisagés. En effet, ces structures n'agiraient pas seulement comme des barrières de réplication, mais aussi comme des hybrides ARN :ADN postrépliatifs pour interférer avec le redémarrage des fourches bloquées. De telles structures ont récemment été imagées par microscopie électronique [81], mais le mécanisme de leur formation reste mal compris. De nouvelles technologies telles que le séquençage par nanopores pourraient aider à déterminer la position relative de l'ADN naissant et des hybrides ARN :ADN au niveau de la molécule unique. Une question importante qui reste à élucider est de savoir si ces hybrides post-répliatifs préexistent avant l'arrivée de la fourche, comme indiqué à la figure 3, ou s'ils sont synthétisés de novo par des polymérases à ARN agissant derrière la fourche bloquée. De ce point de vue, il est intéressant de noter que des hybrides ADN :ARN sont également détectés au niveau des cassures double-brin de l'ADN et que ces structures interfèrent avec la résection de l'ADN, affectant ainsi les mécanismes de réparation par recombinaison homologue [84]. Enfin, il est maintenant bien établi que les mécanismes de réparation des fourches et des cassures chromosomiques génèrent de petits fragments d'ADN qui s'accumulent dans le cytoplasme, activent la voie cGAS-STING et induisent une réponse inflammatoire [85, 86]. Une étude très récente montre également que les hybrides ADN :ARN issus de R-loops après clivage par des enzymes de réparation peuvent également activer la voie cGAS-STING [87]. Ces données indiquent que le stress répliatif engendré par les conflits réplication-transcription et les R-loops induit des réponses cellulaires agissant au-delà des limites de la cellule. Ce stress endogène pourrait ainsi stimuler l'élimination des cellules anormales par le système immunitaire, ouvrant des perspectives prometteuses pour la mise au point de nouvelles thérapies contre le cancer.

8. Déclaration d'intérêt

Les auteurs ne travaillent pas, ne conseillent pas, ne possèdent pas de parts, ne reçoivent pas de fonds d'une organisation qui pourrait tirer profit de cet article, et n'ont déclaré aucune autre affiliation que leurs organismes de recherche.

9. Remerciements

L'auteur remercie les membres de l'équipe « Maintien de l'intégrité du génome au cours de la réplication » pour leur contribution aux travaux mentionnés dans cette revue. Nos travaux sont soutenus par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), l'Institut National du Cancer (INCa), la Ligue contre le cancer (Equipe labélisée) et la Fonds MSDAvenir.

Références

- [1] K. Labib, « Building a double hexamer of DNA helicase at eukaryotic replication origins », *EMBO J.* **30** (2011), p. 4853-4855.
- [2] N. Y. Yao, M. O'Donnell, « Replisome structure and conformational dynamics underlie fork progression past obstacles », *Curr. Opin. Cell Biol.* **21** (2009), p. 336-343.
- [3] M. Fragkos, O. Ganier, P. Coulombe, M. Mechali, « DNA replication origin activation in space and time », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16** (2015), p. 360-374.
- [4] P. Pasero, E. Schwob, « Think global, act local—how to regulate S phase from individual replication origins », *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10** (2000), p. 178-186.
- [5] S. P. Bell, A. Dutta, « DNA replication in eukaryotic cells », *Annu. Rev. Biochem.* **71** (2002), p. 333-374.
- [6] J. F. Diffley, « Regulation of early events in chromosome replication », *Curr. Biol.* **14** (2004), p. R778-R786.

- [7] A. Johnson, M. O'Donnell, « Cellular DNA replicases : components and dynamics at the replication fork », *Annu. Rev. Biochem.* **74** (2005), p. 283-315.
- [8] A. Gambus, R. C. Jones, A. Sanchez-Diaz, M. Kanemaki, F. van Deursen, R. D. Edmondson, K. Labib, « GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks », *Nat. Cell Biol.* **8** (2006), p. 358-366.
- [9] D. Boos, P. Ferreira, « Origin firing regulations to control genome replication timing », *Genes (Basel)* **10** (2019), article no. 199.
- [10] A. E. Vouzas, D. M. Gilbert, « Mammalian DNA replication timing », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **13** (2021), article no. a040162.
- [11] H. Técher, P. Pasero, « The replication stress response on a narrow path between genomic instability and inflammation », *Front. Cell Dev. Biol.* **9** (2021), article no. 702584.
- [12] Y. Xia, « The fate of two unstoppable trains after arriving destination : replisome disassembly during DNA replication termination », *Front. Cell Dev. Biol.* **9** (2021), article no. 658003.
- [13] M. K. Zeman, K. A. Cimprich, « Causes and consequences of replication stress », *Nat. Cell Biol.* **16** (2014), p. 2-9.
- [14] J. C. Saldivar, D. Cortez, K. A. Cimprich, « The essential kinase ATR : ensuring faithful duplication of a challenging genome », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18** (2017), p. 622-636.
- [15] L. Zou, « Four pillars of the S-phase checkpoint », *Genes Dev.* **27** (2013), p. 227-233.
- [16] A. Kumagai, W. G. Dunphy, « Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts », *Mol. Cell* **6** (2000), p. 839-849.
- [17] C. C. S. Chini, J. Chen, « Human Claspin is required for replication checkpoint control », *J. Biol. Chem.* **278** (2003), p. 30057-30062.
- [18] K. Unsal-Kacmaz, P. D. Chastain, P.-P. Qu, P. Minoo, M. Cordeiro-Stone, A. Sancar, W. K. Kaufmann, « The human Tim/Tipin complex coordinates an intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement », *Mol. Cell Biol.* **27** (2007), p. 3131-3142.
- [19] S. Saxena, L. Zou, « Hallmarks of DNA replication stress », *Mol. Cell* **82** (2022), p. 2298-2314.
- [20] K. J. Neelsen, M. Lopes, « Replication fork reversal in eukaryotes : from dead end to dynamic response », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16** (2015), p. 207-220.
- [21] A. Quinet, D. Lemaçon, A. Vindigni, « Replication fork reversal : players and guardians », *Mol. Cell* **68** (2017), p. 830-833.
- [22] A. Delamarre, A. Barthe, C. de la Roche Saint-André, P. Luciano, R. Forey, I. Padioleau, M. Skrzypczak, K. Ginalski, V. Géli, P. Pasero *et al.*, « MRX increases chromatin accessibility at stalled replication forks to promote nascent DNA resection and cohesin loading », *Mol. Cell* **77** (2020), p. 395-410, e393.
- [23] P. Pasero, A. Vindigni, « Nucleases acting at stalled forks : how to reboot the replication program with a few shortcuts », *Annu. Rev. Genet.* **51** (2017), p. 477-499.
- [24] K. Schlacher, N. Christ, N. Siaud, A. Egashira, H. Wu, M. Jasin, « Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11 », *Cell* **145** (2011), p. 529-542.
- [25] S. Tye, G. E. Ronson, J. R. Morris, « A fork in the road : where homologous recombination and stalled replication fork protection part ways », *Semin. Cell. Dev. Biol.* **113** (2020), p. 14-26.
- [26] T. Ubhi, G. W. Brown, « Exploiting DNA replication stress for cancer treatment », *Cancer Res.* **79** (2019), p. 1730-1739.
- [27] B. Pardo, L. Crabbé, P. Pasero, « Signaling pathways of replication stress in yeast », *FEMS Yeast Res.* **17** (2017), article no. fow101.
- [28] K. Somyajit, R. Gupta, H. Sedlackova, K. J. Neelsen, F. Ochs, M. B. Rask, C. Choudhary, J. Lukas, « Redox-sensitive alteration of replisome architecture safeguards genome integrity », *Science* **358** (2017), p. 797-802.
- [29] M. Andrs, H. Stoy, B. Boleslavskva, N. Chappidi, R. Kanagaraj, Z. Nascakova, S. Menon, S. Rao, A. Oravet-zova, J. Dobrovolna *et al.*, « Excessive reactive oxygen species induce transcription-dependent replication stress », *Nat. Commun.* **14** (2023), article no. 1791.

- [30] J. Poli, O. Tsaponina, L. Crabbe, A. Keszthelyi, V. Pantesco, A. Chabes, A. Lengronne, P. Pasero, « dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress », *EMBO J.* **31** (2012), p. 883-894.
- [31] A. Chabes, L. Thelander, « DNA building blocks at the foundation of better survival », *Cell Cycle* **2** (2003), p. 171-173.
- [32] R. Forey, A. Poveda, S. Sharma, A. Barthe, I. Padioleau, C. Renard, R. Lambert, M. Skrzypczak, K. Ginalski, A. Lengronne *et al.*, « Mec1 is activated at the onset of normal S phase by low-dNTP pools impeding DNA replication », *Mol. Cell* **78** (2020), p. 396-410.
- [33] F. Lazzaro, D. Novarina, F. Amara, L. Watt Danielle, E. Stone Jana, V. Costanzo, M. Burgers Peter, A. Kunkel Thomas, P. Plevani, M. Muzi-Falconi, « RNase H and postreplication repair protect cells from ribonucleotides incorporated in DNA », *Mol. Cell* **45** (2012), p. 99-110.
- [34] M. A. Reijns, B. Rabe, R. E. Rigby, P. Mill, K. R. Astell, L. A. Lettice, S. Boyle, A. Leitch, M. Keighren, F. Kilanowski *et al.*, « Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development », *Cell* **149** (2012), p. 1008-1022.
- [35] J. S. Williams, S. A. Lujan, T. A. Kunkel, « Processing ribonucleotides incorporated during eukaryotic DNA replication », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17** (2016), p. 350-363.
- [36] S. M. Cerritelli, J. Iranzo, S. Sharma, A. Chabes, R. J. Crouch, D. Tollervey, A. El Hage, « High density of unrepaired genomic ribonucleotides leads to Topoisomerase 1-mediated severe growth defects in absence of ribonucleotide reductase », *Nucleic Acids Res.* **48** (2020), p. 4274-4297.
- [37] B. Gomez-Gonzalez, A. Aguilera, « Transcription-mediated replication hindrance : a major driver of genome instability », *Genes Dev.* **33** (2019), p. 1008-1026.
- [38] S. Kemiha, J. Poli, Y. L. Lin, A. Lengronne, P. Pasero, « Toxic R-loops : cause or consequence of replication stress? », *DNA Repair (Amst.)* **107** (2021), article no. 103199.
- [39] T. Garcia-Muse, A. Aguilera, « R loops : from physiological to pathological roles », *Cell* **179** (2019), p. 604-618.
- [40] J. R. Brickner, J. L. Garzon, K. A. Cimprich, « Walking a tightrope : the complex balancing act of R-loops in genome stability », *Mol. Cell* **82** (2022), p. 2267-2297.
- [41] M. Macheret, T. D. Halazonetis, « DNA replication stress as a hallmark of cancer », *Annu. Rev. Pathol. : Mech. Dis.* **10** (2015), p. 425-448.
- [42] C. Bester Assaf, M. Roniger, S. Oren Yifat, M. Im Michael, D. Sarni, M. Chaoat, A. Bensimon, G. Zamir, S. Shewach Donna, B. Kerem, « Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development », *Cell* **145** (2011), p. 435-446.
- [43] E. Petermann, L. Lan, L. Zou, « Sources, resolution and physiological relevance of R-loops and RNA-DNA hybrids », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23** (2022), p. 521-540.
- [44] R. Di Micco, M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P. G. Nuciforo, A. Bensimon *et al.*, « Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication », *Nature* **444** (2006), p. 638-642.
- [45] J. Bartkova, N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L. V. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V. C. Zoumpourlis *et al.*, « Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints », *Nature* **444** (2006), p. 633-637.
- [46] L. I. Toledo, M. Murga, O. Fernandez-Capetillo, « Targeting ATR and Chk1 kinases for cancer treatment : a new model for new (and old) drugs », *Mol. Oncol.* **5** (2011), p. 368-373.
- [47] L. I. Toledo, M. Murga, P. Gutierrez-Martinez, R. Soria, O. Fernandez-Capetillo, « ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks », *Genes Dev.* **22** (2008), p. 297-302.
- [48] J. Bartek, M. Mistrik, J. Bartkova, « Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment », *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012), p. 5-7.
- [49] M. Murga, S. Campaner, A. J. Lopez-Contreras, L. I. Toledo, R. Soria, M. F. Montaña, L. D'Artista, T. Schleker, C. Guerra, E. Garcia *et al.*, « Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors », *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18** (2011), p. 1331-1335.
- [50] A. J. Lopez-Contreras, O. Fernandez-Capetillo, « The ATR barrier to replication-born DNA damage », *DNA*

- Repair* **9** (2010), p. 1249-1255.
- [51] J. N. Bianco, V. Bergoglio, Y. L. Lin, M. J. Pillaire, A. L. Schmitz, J. Gilhodes, A. Lusque, J. Mazieres, M. Lacroix-Triki, T. I. Roumeliotis *et al.*, « Overexpression of Claspin and Timeless protects cancer cells from replication stress in a checkpoint-independent manner », *Nat. Commun.* **10** (2019), article no. 910.
- [52] S. Hamperl, M. J. Bocek, J. C. Saldivar, T. Swigut, K. A. Cimprich, « Transcription–replication conflict orientation modulates R-loop levels and activates distinct DNA damage responses », *Cell* **170** (2017), p. 774-786, e719.
- [53] M. Lalonde, M. Trauner, M. Werner, S. Hamperl, « Consequences and resolution of transcription–replication conflicts », *Life (Basel)* **11** (2021), article no. 637.
- [54] E. P. C. Rocha, « The organization of the bacterial genome », *Annu. Rev. Genet.* **42** (2008), p. 211-233.
- [55] H. Merrikh, « Spatial and temporal control of evolution through replication–transcription conflicts », *Trends Microbiol.* **25** (2017), p. 515-521.
- [56] K. S. Lang, A. N. Hall, C. N. Merrikh, M. Ragheb, H. Tabakh, A. J. Pollock, J. J. Woodward, J. E. Dreifus, H. Merrikh, « Replication–transcription conflicts generate R-loops that orchestrate bacterial stress survival and pathogenesis », *Cell* **170** (2017), p. 787-799, e718.
- [57] Y. H. Chen, S. Keegan, M. Kahli, P. Tonzi, D. Fenyo, T. T. Huang, D. J. Smith, « Transcription shapes DNA replication initiation and termination in human cells », *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26** (2019), p. 67-77.
- [58] N. Petryk, M. Kahli, Y. d'Aubenton Carafa, Y. Jaszczyszyn, Y. Shen, M. Silvain, C. Thermes, C.-L. Chen, O. Hyrien, « Replication landscape of the human genome », *Nat. Commun.* **7** (2016), article no. 10208.
- [59] C. Cayrou, P. Coulombe, A. Vigneron, S. Stanojcic, O. Ganier, I. Peiffer, E. Rivals, A. Puy, S. Laurent-Chabalier, R. Desprat *et al.*, « Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features », *Genome Res.* **21** (2011), p. 1438-1449.
- [60] A. Promonet, I. Padioleau, Y. Liu, L. Sanz, A. Biernacka, A. L. Schmitz, M. Skrzypczak, A. Sarrazin, C. Mettling, M. Rowicka *et al.*, « Topoisomerase 1 prevents replication stress at R-loop-enriched transcription termination sites », *Nat. Commun.* **11** (2020), article no. 3940.
- [61] D. Castillo-Guzman, F. Chédin, « Defining R-loop classes and their contributions to genome instability », *DNA Repair (Amst.)* **106** (2021), article no. 103182.
- [62] A. Sanz Lionel, R. Hartono Stella, W. Lim Yoong, S. Steyaert, A. Rajpurkar, A. Ginno Paul, X. Xu, F. Chédin, « Prevalent, dynamic, and conserved R-loop structures associate with specific epigenomic signatures in mammals », *Mol. Cell* **63** (2016), p. 167-178.
- [63] S. Tuduri, L. Crabbé, C. Conti, H. Tourrière, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, V. Pantesco, J. De Vos, A. Thomas, C. Theillet *et al.*, « Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription », *Nat. Cell Biol.* **11** (2009), p. 1315-1324.
- [64] M. Macheret, T. D. Halazonetis, « Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress », *Nature* **555** (2018), p. 112-116.
- [65] J. S. Im, M. Keaton, K. Y. Lee, P. Kumar, J. Park, A. Dutta, « ATR checkpoint kinase and CRL1betaTRCP collaborate to degrade ASF1a and thus repress genes overlapping with clusters of stalled replication forks », *Genes Dev.* **28** (2014), p. 875-887.
- [66] J. Poli, C. B. Gerhold, A. Tosi, N. Hustedt, A. Seeber, R. Sack, F. Herzog, P. Pasero, K. Shimada, K. P. Hopfner *et al.*, « Mec1, INO80, and the PAF1 complex cooperate to limit transcription replication conflicts through RNAPII removal during replication stress », *Genes Dev.* **30** (2016), p. 337-354.
- [67] H. B. Landsverk, L. E. Sandquist, L. T. E. Bay, B. Steurer, C. Campsteijn, O. J. B. Landsverk, J. A. Marteiijn, E. Petermann, L. Trinkle-Mulcahy, R. G. Syljuåsen, « WDR82/PNUTS-PP1 prevents transcription–replication conflicts by promoting RNA polymerase II degradation on chromatin », *Cell Rep.* **33** (2020), article no. 108469.
- [68] V. Hurst, K. Challa, F. Jonas, R. Forey, R. Sack, J. Seebacher, C. D. Schmid, N. Barkai, K. Shimada, S. M. Gasser *et al.*, « A regulatory phosphorylation site on Mec1 controls chromatin occupancy of RNA polymerases during replication stress », *EMBO J.* **40** (2021), article no. e108439.
- [69] M. Hyjek, M. Figiel, M. Nowotny, « RNases H : structure and mechanism », *DNA Rep. (Amst.)* **84** (2019),

article no. 102672.

- [70] H. D. Nguyen, T. Yadav, S. Giri, B. Saez, T. A. Graubert, L. Zou, « Functions of replication protein A as a sensor of R loops and a regulator of RNaseH1 », *Mol. Cell* **65** (2017), p. 832-847, e834.
- [71] A. Lockhart, V. B. Pires, F. Bento, V. Kellner, S. Luke-Glaser, G. Yakoub, H. D. Ulrich, B. Luke, « RNase H1 and H2 are differentially regulated to process RNA–DNA hybrids », *Cell Rep.* **29** (2019), p. 2890-2900, e2895.
- [72] Y. J. Crow, N. Manel, « Aicardi–Goutieres syndrome and the type I interferonopathies », *Nat. Rev. Immunol.* **15** (2015), p. 429-440.
- [73] A. Cristini, M. Tellier, F. Constantinescu, C. Accalai, L. O. Albulescu, R. Heiringhoff, N. Bery, O. Sordet, S. Murphy, N. Gromak, « RNase H2, mutated in Aicardi–Goutières syndrome, resolves co-transcriptional R-loops to prevent DNA breaks and inflammation », *Nat. Commun.* **13** (2022), article no. 2961.
- [74] M. Groh, L. O. Albulescu, A. Cristini, N. Gromak, « Senataxin : genome guardian at the interface of transcription and neurodegeneration », *J. Mol. Biol.* **429** (2017), p. 3181-3195.
- [75] U. Aiello, D. Challal, G. Wentzinger, A. Lengronne, R. Appanah, P. Pasero, B. Palancade, D. Libri, « Sen1 is a key regulator of transcription-driven conflicts », *Mol. Cell* **82** (2022), p. 2952-2966.
- [76] C. Hodson, S. van Twest, M. Dylewska, J. J. O'Rourke, W. Tan, V. J. Murphy, M. Walia, L. Abbouche, J. Nieminuszczy, E. Dunn *et al.*, « Branchpoint translocation by fork remodelers as a general mechanism of R-loop removal », *Cell Rep.* **41** (2022), article no. 111749.
- [77] C. Kumar, S. Batra, J. D. Griffith, D. Remus, « The interplay of RNA :DNA hybrid structure and G-quadruplexes determines the outcome of R-loop-replisome collisions », *Elife* **10** (2021), article no. e72286.
- [78] S. Barroso, E. Herrera-Moyano, S. Muñoz, M. García-Rubio, B. Gómez-González, A. Aguilera, « The DNA damage response acts as a safeguard against harmful DNA–RNA hybrids of different origins », *EMBO Rep.* **20** (2019), article no. e47250.
- [79] S. Šviković, A. Crisp, S. M. Tan-Wong, T. A. Guillian, A. J. Doherty, N. J. Proudfoot, G. Guilbaud, J. E. Sale, « R-loop formation during S phase is restricted by PrimPol-mediated repriming », *EMBO J.* **38** (2019), article no. e99793.
- [80] A. Teixeira-Silva, A. Ait Saada, J. Hardy, I. Iraqui, M. C. Nocente, K. Fréon, S. A. E. Lambert, « The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks », *Nat. Commun.* **8** (2017), article no. 1982.
- [81] H. Stoy, K. Zwicky, D. Kuster, K. S. Lang, J. Krietsch, M. P. Crossley, J. A. Schmid, K. A. Cimprich, H. Merrih, M. Lopes, « Direct visualization of transcription–replication conflicts reveals post-replicative DNA :RNA hybrids », *Nat. Struct. Mol. Biol.* **30** (2023), p. 348-359.
- [82] N. Chappidi, Z. Nascakova, B. Boleslavskaya, R. Zellweger, E. Isik, M. Andrs, S. Menon, J. Dobrovolna, C. Balbo Pogliano, J. Matos *et al.*, « Fork cleavage-religation cycle and active transcription mediate replication restart after fork stalling at Co-transcriptional R-loops », *Mol. Cell* **77** (2020), p. 528-541, e528.
- [83] C. Audouy, K. Schirmeisen, A. Ait Saada, A. Gesnik, P. Fernández-Varela, V. Boucherit, V. Ropars, A. Chaudhuri, K. Fréon, J. B. Charbonnier *et al.*, « RNA :DNA hybrids from Okazaki fragments contribute to establish the Ku-mediated barrier to replication-fork degradation », *Mol. Cell* **83** (2023), p. 1061-1074.
- [84] A. Marnef, G. Legube, « R-loops as Janus-faced modulators of DNA repair », *Nat. Cell Biol.* **23** (2021), p. 305-313.
- [85] F. Coquel, C. Neumayer, Y.-L. Lin, P. Pasero, « SAMHD1 and the innate immune response to cytosolic DNA during DNA replication », *Curr. Opin. Immunol.* **56** (2019), p. 24-30.
- [86] F. Coquel, M. Silva, H. Técher, K. Zadorozhny, S. Sharma, J. Nieminuszczy, C. Mettling, E. Dardillac, A. Barthe, A. Schmitz *et al.*, « SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction », *Nature* **557** (2018), p. 57-61.
- [87] M. P. Crossley, C. Song, M. J. Bocek, J. H. Choi, J. Kousorous, A. Sathirachinda, C. Lin, J. R. Brickner, G. Bai, H. Lans *et al.*, « R-loop-derived cytoplasmic RNA–DNA hybrids activate an immune response », *Nature* **613** (2023), p. 187-194.