

Un paradoxe et trois énigmes à propos du rôle de *BRCA1* dans les cancers du sein et de l'ovaire

par Jean Feunteun

Laboratoire de Génétique Oncologique UMR #8125, Institut Gustave Roussy, Villejuif. Tél. : 33 (0)1 42 11 42 94.
E-mail : feunteun@igr.fr

Reçu le 26 avril 2004

RÉSUMÉ

Plus de 50 % des formes héréditaires sont associées à une mutation germinale des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* (Breast Cancer 1/2). La protéine BRCA1 est exprimée de manière ubiquitaire et joue probablement un rôle dans plusieurs processus fondamentaux, parmi lesquels le maintien de l'intégrité du génome. Paradoxalement donc, *BRCA1* apparaît à la fois comme un gène essentiel à la prolifération des cellules embryonnaires et comme un gène suppresseur de tumeur. Le rôle de *BRCA1* dans la réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité du génome est généralement reconnu. Toutefois la nature de ce rôle reste énigmatique. Se pourrait-il que *BRCA1* soit un senseur des structures « anormales » de l'ADN, qui sont l'objet de remodelage chromatinien, y compris lors de l'hétérochromatinisation ? Ce modèle a reçu un début de validation à l'occasion d'une publication

récente selon laquelle *BRCA1* contribue au maintien de l'inactivation du chromosome X, le paradigme de l'hétérochromatinisation facultative.

Pourquoi les cellules épithéliales des glandes mammaires et de l'ovaire sont-elles les cibles privilégiées de la tumorigenèse chez les femmes porteuses de mutations germinales de *BRCA1* ?

Hériter de *BRCA1* confère aux femmes un statut de susceptibilité au cancer du sein et/ou de l'ovaire. La perte de l'allèle sauvage hérité du parent sain (LOH), couramment observée dans les tumeurs mammaires et ovariennes primaires chez ces femmes susceptibles, représente l'évènement initiateur de la tumorigenèse. Ce modèle classique « à deux coups », qui suppose que les cellules hétérozygotes sont « normales » jusqu'à la survenue stochastique de la LOH, reste énigmatique

SUMMARY A paradox and three enigmas about the role of *BRCA1* in breast and ovarian cancers

More than 50 % of the hereditary forms are associated with germ line mutation in either *BRCA1* or *BRCA2* genes (Breast Cancer 1/2). The BRCA1 protein is expressed ubiquitously and is likely to play a role in several fundamental processes, including the maintenance of genomic integrity.

Paradoxically, *BRCA1* appears as a gene essential for proliferation of embryonic cells that simultaneously carries tumor suppressor activity.

The nature of the role of *BRCA1* in DNA repair and maintenance of genome integrity remains enigmatic. BRCA1 may indeed be a sensor of "abnormal" DNA structures that undergo heterochromatinisation. This model finds some support in the recent report that *BRCA1* participates in the maintenance of

X-chromosome inactivation, a paradigm for facultative heterochromatinisation.

Why are epithelial cells from mammary glands and ovaries the privileged targets for tumorigenesis in women carrying germline mutations in *BRCA1* ?

The inheritance of a single defective copy of *BRCA1* by women confers a status of susceptibility for developing breast and/or ovarian cancer. The loss of the wild-type allele inherited from the unaffected parent (LOH), commonly observed in the primary breast and ovarian tumors in these susceptible women, represents the event that initiates the tumorigenesis process. This classical two hit model, which assumes that heterozygote cells are "normal" until the LOH occurs stochastically, remains enigmatic.

INTRODUCTION

Dix pour cent des femmes caucasiennes seront atteintes d'un cancer du sein avant l'âge de 80 ans. Parmi une majorité de cas sporadiques, 5 à 10 % de ces cancers sont

des formes héréditaires, caractérisées par l'excès familial de cancers mammaires ou ovariens. Un tel excès familial prédit une prédisposition à haut risque ajoutée aux autres facteurs que représentent le vieillissement, la ménopause précoce, la nulliparité, le traitement par des

œstrogènes, les facteurs diététiques (par exemple l'alcool)... Plus de 50 % des formes héréditaires sont associées à une mutation germinale des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* (Breast Cancer 1/2).

LE GÈNE *BRCA1*

Ce gène a été cloné en 1994 (Miki *et al.*, 1994). Il couvre plus de 81 Kb sur le chromosome 17q21 et comprend 24 exons épissés en un ARNm de 7 Kb. Les femmes qui portent un allèle germinale mutant de *BRCA1* sont prédisposées au cancer du sein et/ou de l'ovaire. Cette prédisposition est transmise comme un trait autosomal dominant avec un risque sur la durée de la vie de 70 à 80 % pour le cancer du sein et de 40 % pour le cancer de l'ovaire. Les 500 mutations indépendantes caractérisées jusqu'à présent ont toutes une pénétrance élevée.

La transcription du gène *BRCA1*, étroitement régulée au cours du cycle cellulaire, atteint un pic à l'entrée dans la phase S puis se maintient au long de cette phase et de G2/M. Le messager de *BRCA1* code pour une protéine à 1 863 amino-acides de poids moléculaire 220 Kda, qui présente peu d'homologies à d'autres polypeptides connus, mais qui contient plusieurs domaines fonctionnels : une région N-terminale en anneau (Cys-3-His-Cys4), éventuellement capable de lier du zinc ; un motif C-terminal, répété en tandem, constitué de deux motifs déjà identifiés dans des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ; un signal d'exportation nucléaire (NES pour Nuclear Export Signal) et deux motifs de localisation nucléaire (NLS).

La protéine *BRCA1* présente des localisations différentes dans le noyau au long du cycle : elle est distribuée de manière diffuse pendant la phase S, alors qu'elle se concentre dans des foyers très denses pendant les phases S et G2. Dans ces foyers, la protéine est hyperphosphorylée.

Dix ans après le clonage de *BRCA1*, sa fonction précise demeure mal élucidée et présente un paradoxe fonctionnel ainsi qu'au moins trois énigmes.

LE PARADOXE FONCTIONNEL

La protéine *BRCA1* est exprimée de manière ubiquitaire et joue probablement un rôle dans plusieurs processus fondamentaux, parmi lesquels le maintien de l'intégrité du génome, la régulation de la transcription, le fonctionnement du point de contrôle du cycle cellulaire (Deng & Brodie, 2000 ; Scully & Puget, 2002 ; Venkitaram, 2001).

Les tumeurs, qui se développent chez les individus porteurs d'une mutation germinale de *BRCA1*, présentent une fonction nulle de ce gène, car l'allèle sauvage y est systématiquement invalidé par perte de l'hétérozygotie (LOH pour Loss Of Heterozygosity). Le gène *BRCA1* entre donc dans la catégorie des gènes suppresseurs de tumeurs. L'expression forcée du *BRCA1* sauvage dans

certaines lignées de cellules tumorales inhibe effectivement leur potentiel tumoral chez la souris nude (Randrianarison *et al.*, 2001)

Le statut *BRCA1*^{-/-} est létal pour l'embryon de souris, qui n'atteint pas le stade de la gastrulation (Hakem *et al.*, 1996 ; Ludwig *et al.* 1997). Cette létalité résulte de l'absence de la poussée proliférative nécessaire à la mise en place des trois feuillettes germinatifs primordiaux. De manière intéressante, l'absence de *BRCA1* est moins nocive dans le contexte des génotypes p53 ou p21 nuls ; dans ces cas l'embryogenèse est prolongée de plusieurs jours (Ludwig *et al.* 1997 ; Hakem *et al.*, 1997). Cette dernière observation suggère que la prolifération cellulaire déficiente, liée à l'absence de *BRCA1*, serait due à un défaut dans le maintien de l'intégrité du génome, chez l'embryon hautement prolifératif, tout de suite après l'implantation. Ce défaut provoquerait une réponse qui conduirait à l'arrêt du cycle cellulaire.

Paradoxalement donc, *BRCA1* apparaît à la fois comme un gène essentiel à la prolifération des cellules embryonnaires et comme un gène suppresseur de tumeur. Sa fonction semble essentielle puisqu'en son absence, la laxité de la surveillance du génome produit des signaux d'arrêt de croissance. Ces signaux sont activés dans les cellules qui possèdent des "gate-keepers" fonctionnels (cellules embryonnaires et primaires) : dans celles dont les gate-keepers sont défectifs (cellules pré-malignes), la croissance est arrêtée et les mutations s'accumulent pendant la progression maligne.

L'activité suppressive de tumeur portée par le *BRCA1* sauvage, exprimée dans certaines lignées tumorales, reflète la restauration d'une voie capable d'activer l'arrêt de croissance dû aux gate-keepers en réponse à des lésions de l'ADN.

LA PREMIÈRE ÉNIGME

Les lignées cellulaires humaines *BRCA1*-nulles présentent une déficience de la réparation des cassures de l'ADN double-brin par recombinaison homologue et de la réparation couplée à la transcription (Le Page *et al.*, 2000). Ces deux anomalies peuvent être réparées par réintroduction de la protéine sauvage (Scully, 1999). Des partenaires multiples de *BRCA1* sont impliqués dans la réparation de l'ADN, en particulier Rad51 (Scully *et al.*, 1997), le complexe Rad50/MRE11/Nibrine (Zhong *et al.*, 1999), l'hélicase Bloom (Wang *et al.*, 2000), la protéine D2 de Fanconi (Garcia-Higuera *et al.*, 2001). *BRCA1* interagit également avec *BACH1*, un suppresseur de tumeur qui exerce une activité DEAH hélicase (Cantor *et al.*, 2001).

Le rôle de *BRCA1* dans la réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité du génome est généralement reconnu. Toutefois la nature de ce rôle reste énigmatique. Il faudrait un concept unificateur pour prendre en compte le rôle de *BRCA1* dans la biochimie de processus aussi radicalement différents que la réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue ou la réparation des dommages oxydatifs au cours de la répa-

ration couplée à la transcription. Se pourrait-il que *BRCA1* soit un senseur des structures « anormales » de l'ADN, qui sont l'objet de remodelage chromatinién, y compris lors de l'hétérochromatinisation ? Ce modèle a reçu un début de validation à l'occasion d'une publication récente selon laquelle *BRCA1* contribue au maintien de l'inactivation du chromosome X, le paradigme de l'hétérochromatinisation facultative. Et en effet, les cellules tumorales qui n'expriment pas *BRCA1* ne présentent ni les signaux FISH focalisés de l'ARN Xist, ni la localisation également focalisée de l'histone méthyllysine 9 H3 (Ganesan *et al.*, 2003). Ceci suggère qu'une autre conséquence, liée au sexe, de la perte de *BRCA1* serait de contribuer à la distribution des tumeurs associées à *BRCA1* et nous amène à la seconde énigme.

LA SECONDE ÉNIGME

Pourquoi les cellules épithéliales des glandes mammaires et de l'ovaire sont-elles les cibles privilégiées de la tumorigénèse chez les femmes porteuses de mutations germinales de *BRCA1* ? Le statut répondeur aux œstrogènes de ces deux organes a stimulé des recherches pour tenter de comprendre leur prédisposition au cancer lié à *BRCA1*. On a montré que *BRCA1* interfère avec l'activité du récepteur α des œstrogènes (ER α) d'une manière tissu-spécifique. Le *BRCA1* sauvage inhibe la signalisation par ER α aussi bien en présence qu'en absence du ligand, alors que les protéines mutantes n'ont pas cet effet (Fan *et al.*, 2001 ; Zheng *et al.*, 2001). Ces observations suggèrent que, dans les cellules *BRCA1* nulles, le signal de ER α est augmenté de manière constitutive, fournissant donc des signaux prolifératifs.

Dans une autre tentative d'explication de la spécificité des organes cibles de la mutation *BRCA1*, Elledge et Amon (2002) ont postulé que l'absence de *BRCA1*, résultant de la perte d'hétérozygotie dans les cellules portant une mutation germinale, est létale dans tous les tissus excepté le sein et l'ovaire. Selon leur argument, la survie des cellules épithéliales en l'absence de *BRCA1* peut être promue spécifiquement dans ces tissus par le contexte hormonal, avec pour conséquence la prolifération et l'accumulation d'autres mutations (survie dépendante de l'environnement).

Les deux modèles présentés ci-dessus impliquent que les cellules tumorales *BRCA1*-nulles doivent être sensibles à la stimulation hormonale et portent donc les récepteurs *ad hoc* à leur surface. Il est bien connu que la très grande majorité des tumeurs mammaires, qui se développent dans le contexte d'une mutation germinale de *BRCA1*, sont ER α négatives. Le moment de la perte d'ER pendant la tumorigénèse n'est pas connu mais, s'il s'agit d'un évènement précoce, tant la capacité de *BRCA1* à réguler négativement le signal de l'ER que l'effet de survie hormono-dépendant doivent avoir une importance mineure.

BRCA1 joue un rôle dans le développement de la glande mammaire (Xu *et al.*, 1999). Les souris chez lesquelles l'expression d'une forme inactivée de *BRCA1* a

été ciblée sur la glande mammaire présentent un défaut du développement des canaux et un cancer au bout de 12 mois. Empêcher le développement normal de la glande contribue peut-être à la susceptibilité cancéreuse. Effectivement une ramification réduite des canaux et une atrophie ovarienne sont observées chez les souris hétérozygotes pour un allèle *BRCA1* muté, lorsqu'elles sont traitées au diéthylstilbestrol (Bennett *et al.*, 2000). Cette observation conduit à la troisième énigme.

LA TROISIÈME ÉNIGME

Hériter de *BRCA1* confère aux femmes un statut de susceptibilité au cancer du sein et/ou de l'ovaire. La perte de l'allèle sauvage hérité du parent sain (LOH), couramment observée dans les tumeurs mammaires et ovariennes primaires chez ces femmes susceptibles, représente l'évènement initiateur de la tumorigénèse. Ce modèle classique « à deux coups », qui suppose que les cellules hétérozygotes sont « normales » jusqu'à la survenue stochastique de la LOH, reste énigmatique. Il est contesté par plusieurs résultats, selon lesquels les cellules hétérozygotes présentent tout de même des caractères phénotypiques qui leur confèrent une tendance à la tumorigénèse.

L'absence de la protéine *BRCA1* fonctionnelle provoque une radiosensibilité fortement accrue et l'accumulation d'anomalies chromosomiques dans les fibroblastes embryonnaires de souris *BRCA1*^{-/-} et dans une lignée tumorale *BRCA1*^{-/-} humaine (Shen *et al.*, 1998 ; Foray *et al.*, 1999 ; Scully *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter que les lymphoblastes humains *BRCA1*^{+/-} présentent également une radiosensibilité augmentée, un taux de micro-noyaux induits par l'irradiation plus élevé et un niveau de réparation DSB plus faible (Foray *et al.*, 1999). La radiosensibilité et des micro-noyaux plus fréquents ont également été rapportés dans les lymphocytes de femmes porteuses de *BRCA1* muté (Rothfuss *et al.*, 2000). De plus, utilisant un substrat de recombinaison extrachromosomique, Baldeyron *et al.* (2002) rapportent que la précision de la réparation des cassures de l'ADN *in vivo* est fortement réduite dans les cellules *BRCA1*^{+/-} comparées à celle des cellules ^{+/+} témoins, et que les extraits acellulaires de ces cellules hétérozygotes sont incapables de promouvoir une réaliser *in vitro* des jonctions d'extrémités sans erreurs. Enfin, comme on l'a vu plus haut, on observe une ramification réduite des canaux mammaires et une atrophie ovarienne chez les souris hétérozygotes pour un allèle *BRCA1* mutant (Bennett *et al.*, 2000).

Dans l'ensemble, ces observations suggèrent que la présence d'un seul allèle *BRCA1* muté peut provoquer des déficiences physiologiques : inefficacité et/ou infidélité de la réparation de l'ADN, défauts du développement... Des observations suggèrent même que l'expression de gènes *BRCA1* tronqués ou mutants peut abroger certains effets phénotypiques des allèles *BRCA1* sauvages, évoquant la possibilité d'un effet dominant négatif (Fan *et al.*, 2001). Enfin la présence d'une protéine

mutante pourrait conduire à une stabilité intracellulaire diminuée du *BRCA1* sauvage et à une haploinsuffisance (Baldeyron *et al.*, 2002). Découvrir les mécanismes des déficiences associées à la présence d'un seul allèle muté apportera sans aucun doute des explications sur le statut de prédisposition et conduira peut être à terme à des stratégies de prévention.

BIBLIOGRAPHIE

- Baldeyron C., Jacquemin E., Smith J., Jacquemont C., De O. I., Gad S., Feunteun J., Stoppa-Lyonnet D. & Papadopoulo D., A single mutated *BRCA1* allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. *Oncogene*, 2002, 21, 1401-1410.
- Bennett L. M., McAllister K. A., Malphurs J., Ward T., Collins N. K., Seely J. C., Gowen L. C., Koller B. H., Davis B. J. & Wiseman R. W., Mice heterozygous for a *Brcal* or *Brc2* mutation display distinct mammary gland and ovarian phenotypes in response to diethylstilbestrol. *Cancer Research*, 2000, 60, 3461-3469.
- Cantor S. B., Bell D. W., Ganesan S., Kass E. M., Drapkin R., Grossman S., Wahrer D. C. R., Sgroi D. C., Lane W. S., Haber D. A. & Livingston D. M., BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with *BRCA1* and contributes to its DNA repair function. *Cell*, 2001, 105, 149-160.
- Deng C. X. & Brodie S. G., Roles of *BRCA1* and its interacting proteins. *Bioessays*, 2000, 22, 728-737.
- Elledge S. J. & Amon A., The *BRCA1* suppressor hypothesis: an explanation for the tissue-specific tumor development in *BRCA1* patients. *Cancer Cell*, 2002, 1, 129-132.
- Fan S., Ma Y. X., Wang C., Yuan R. Q., Meng Q., Wang J. A., Erdos M., Goldberg, I.D., Webb, P., Kushner, P.J., Pestell, R.G. & Rosen E. M., Role of direct interaction in *BRCA1* inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene*, 2001, 20, 77-87.
- Fan S. J., Yuan R. Q., Ma Y. X., Meng Q. H., Goldberg I. D. & Rosen E. M., Mutant *BRCA1* genes antagonize phenotype of wild-type *BRCA1*. *Oncogene*, 2001, 20, 8215-8235.
- Foray N., Randrianarison V., Marot D., Perricaudet M., Lenoir G. & Feunteun J., Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of *BRCA1* or *BRCA2*. *Oncogene*, 1999, 18, 7334-7342.
- Ganesan S., Silver D. P., Greenberg R. A., Avni D., Drapkin R., Miron A., Mok S. C., Randrianarison V., Brodie S., Salstrom J., Rasmussen T. P., Klimke A., Marrese C., Marahrens Y., Deng C. X., Feunteun J. & Livingston D. M., *BRCA1* supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell*, 2003, 111, 393-405.
- Garcia-Higuera I., Taniguchi T., Ganesan S., Meyn M. S., Timmers C., Hejna J., Grompe M. & D'Andrea A. D., Interaction of the Fanconi anemia proteins and *BRCA1* in a common pathway. *Mol. Cell*, 2001, 7, 249-262.
- Hakem R., De la Pompa J. L., Eli A., Potter J. & Mak T. W., Partial rescue of *Brcal*⁵⁻⁶ early embryonic lethality by p53 or p21 null mutation. *Nature Gen.*, 1997, 16, 298-302.
- Hakem R., De la Pompa J. L., Sirard C., Mo R., Woo M., Hakem A., Wakeham A., Potter J., Reitmair A., Billia F., Firpo E., Hui C. C., Roberts J., Rossant J. & Mak T. W., The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*, 1996, 85, 1009-1023.
- Le Page F., Randrianarison V., Marot D., Cabannes J., Perricaudet M., Feunteun J. & Sarasin A., *BRCA1* and *BRCA2* are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res.*, 2000, 60, 5548-5552.
- Ludwig T., Chapman D. L., Papaioannou V. E. & Efstratiadis A., Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of *Brcal*, *Brc2*, *Brcal/Brc2*, *Brcal/p53*, and *Brc2/p53* nullizygous embryos. *Genes Dev.*, 1997, 11, 1226-1241.
- Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P. A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L. M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D. & Stone S., A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science*, 1994, 266, 66-71.
- Randrianarison V., Marot D., Foray N., Cabannes J., Meret V., Connault E., Vitrat N., Opolon P., Perricaudet M. & Feunteun J., *BRCA1* carries tumor suppressor activity distinct from that of p53 and p21. *Cancer Gene Ther.*, 2001, 8, 759-770.
- Rothfuss A., Schutz P., Bochum S., Volm T., Eberhardt E., Kreienberg R., Vogel W. & Speit G., Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a *BRCA1* mutation in breast cancer families. *Cancer Res.*, 2000, 60, 390-394.
- Scully R., Role of *BRCA* gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast Cancer Res.*, 2000, 2, 324-330.
- Scully R., Chen J. J., Plug A., Xiao Y. H., Weaver D., Feunteun J., Ashley T. & Livingston D. M., Association of *BRCA1* with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*, 1997, 88, 265-275.
- Scully R., Ganesan S., Vlasakova K., Chen J., Socolovsky M. & Livingston D. M., Genetic analysis of *BRCA1* function in a defined tumor cell line. *Mol. Cell*, 1999, 4, 1093-1099.
- Scully R. & Puget N., *BRCA1* and *BRCA2* in hereditary breast cancer. *Biochim.*, 2002, 84, 95-102.
- Shen S. X., Weaver Z., Xu X. L., Li C. L., Weinstein M., Chen L., Guan X. Y., Ried T. & Deng C. X., A targeted disruption of the murine *Brcal* gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene*, 1998, 17, 3115-3124.
- Venkitaraman A. R., Functions of *BRCA1* and *BRCA2* in the biological response to DNA damage. *J. Cell Sci.*, 2001, 114, 3591-3598.
- Wang W. S., Seki M., Narita Y., Sonoda E., Takeda S., Yamada K., Masuko T., Katada T. & Enomoto T., Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication. *EMBO J.*, 2000, 19, 3428-3435.
- Zheng L., Annab, L. A., Afshari C. A., Lee W. H. & Boyer T. G., *BRCA1* mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 9587-9592.
- Zhong Q., Chen C. F., Li S., Chen Y. M., Wang C. C., Xiao J., Chen P. L., Sharp Z. D. & Lee W. H., Association of *BRCA1* with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*, 1999, 285, 747-750.
- Xu X. L., Wagner K. U., Larson D., Weaver Z., Li C. L., Ried T., Hennighausen L., Wynshaw-Boris A. & Deng C. X., Conditional mutation of *Brcal* in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nature Gen.*, 1999, 22, 37-43.