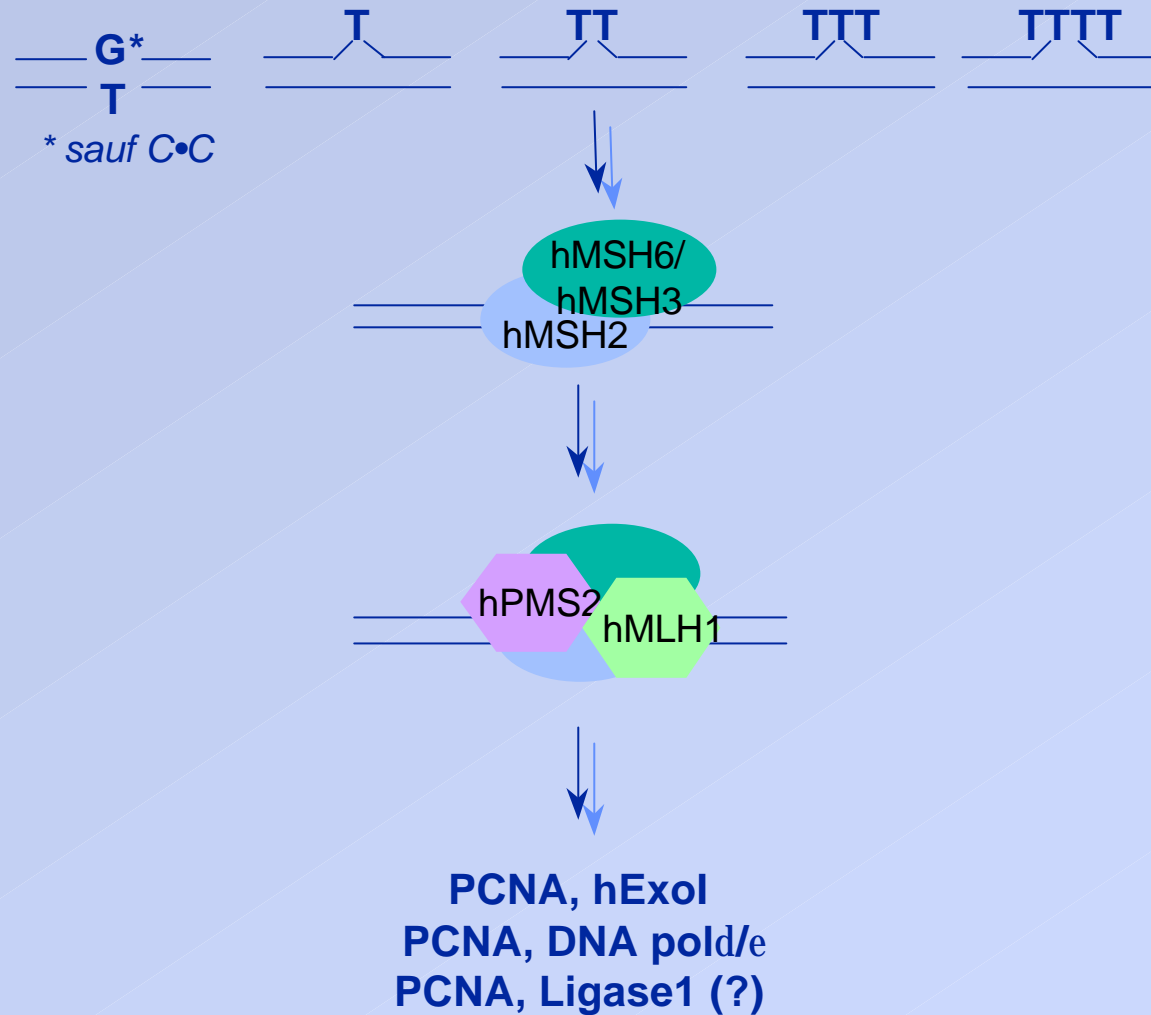


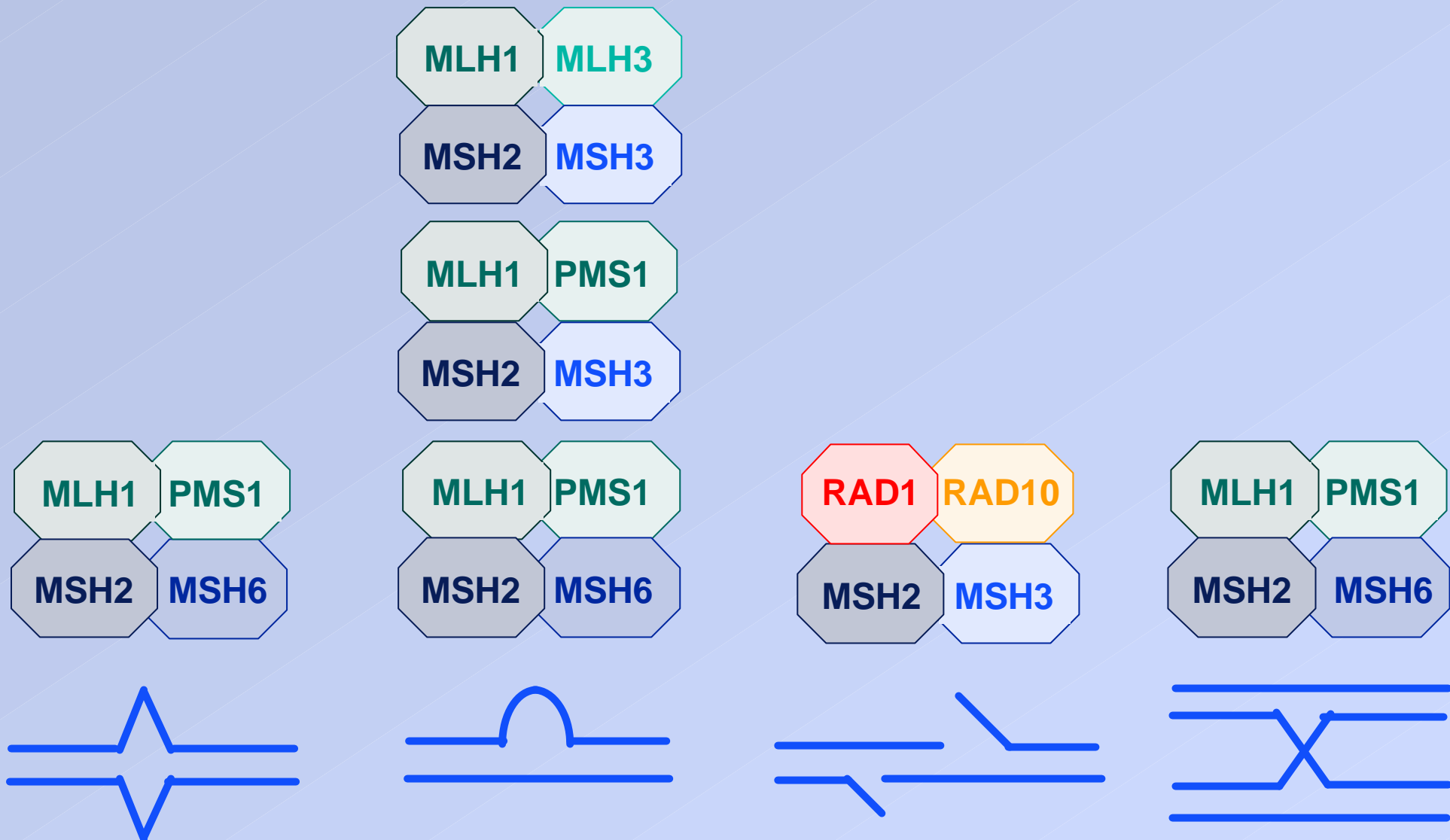
**Rôle du système de réparation des mésappariements de bases
dans la réponse des cellules de cancers colorectaux
aux inhibiteurs de topoisomérases**

**Françoise Praz
Institut Gustave Roussy
CNRS UMR 1598**

Systeme de réparation des mésappariements de bases

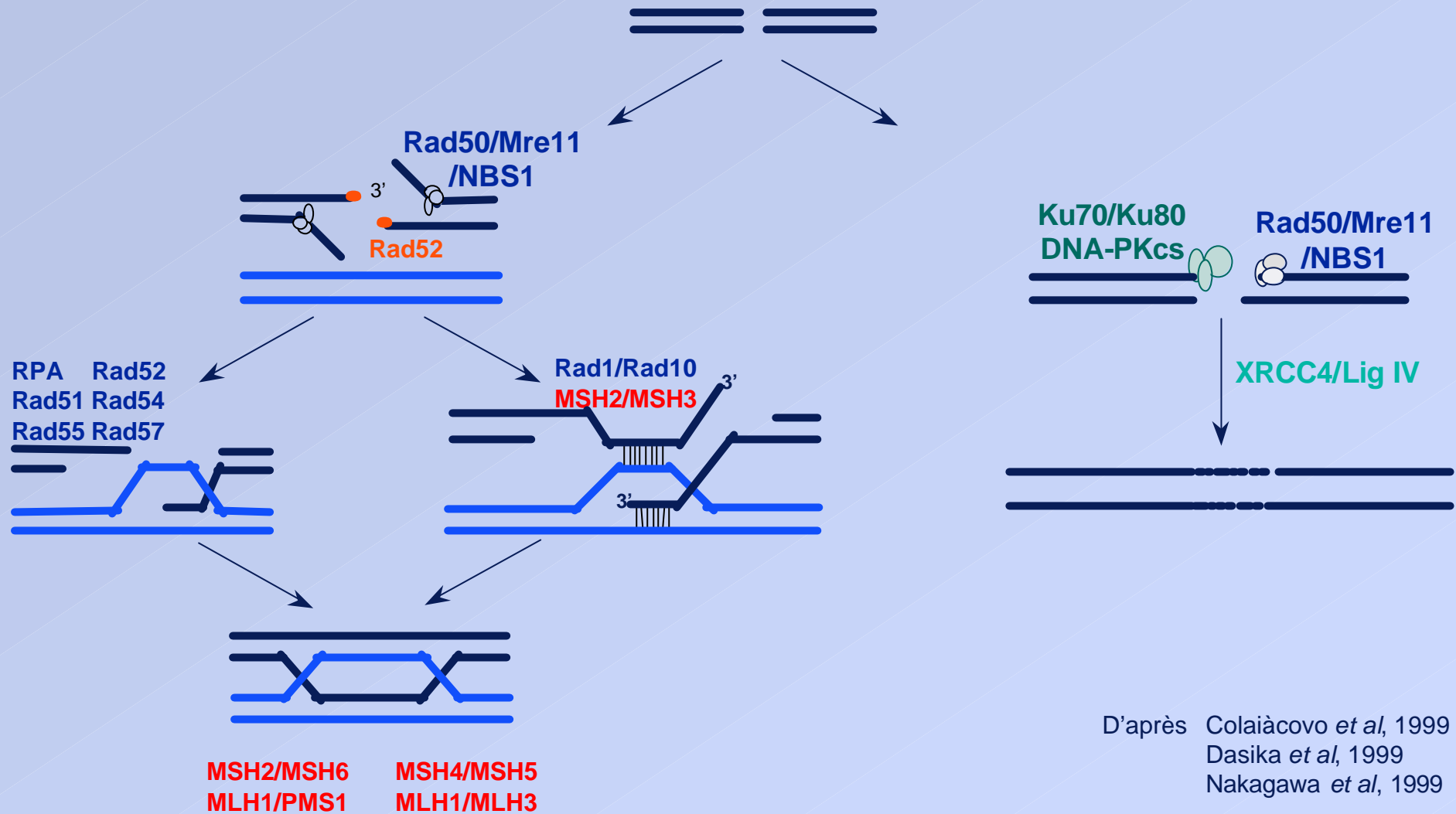


Systeme de réparation des mésappariements de bases



D'après Nakagawa, Datta & Kolodner. PNAS, 1999, 96: 14186.

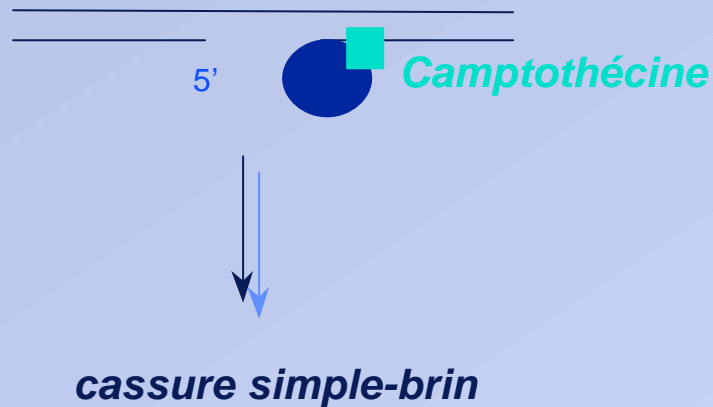
Mécanismes de réparation des cassures double-brin



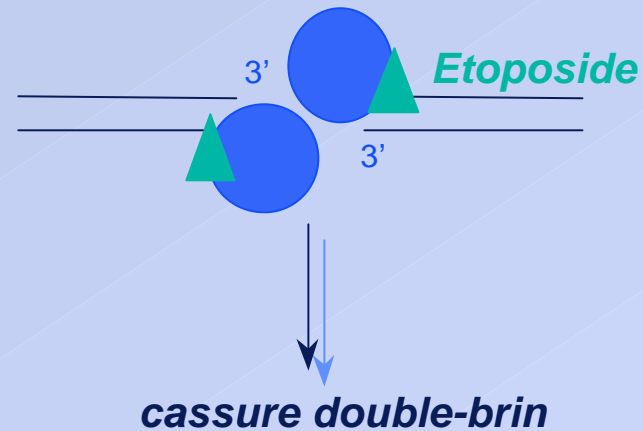
D'après Colaiacovo *et al*, 1999
Dasika *et al*, 1999
Nakagawa *et al*, 1999

Mécanismes d'action des inhibiteurs de topoisomérases

Topoisomérase I



Topoisomérase II



Ces inhibiteurs de topoisomérases provoquent:

- une augmentation des échanges entre chromatides sœurs
- des mutations, essentiellement par délétion
- des translocations

Systeme de réparation des mésappariements de bases et cancer

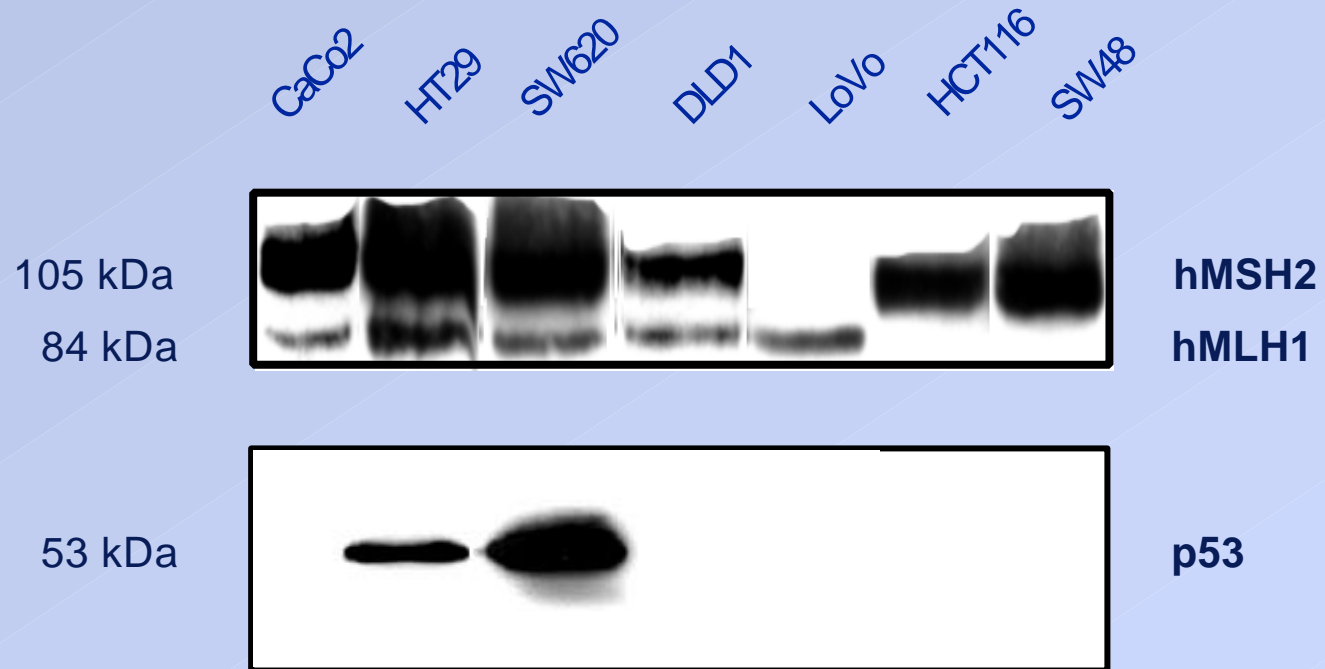
- Des mutations de certains des gènes du système de réparation des mésappariements de bases sont associées aux tumeurs colorectales familiales sans polyadénome: syndrome de Lynch ou HNPCC

- Analyse de 350 familles HNPCC (registre de mai 1999)

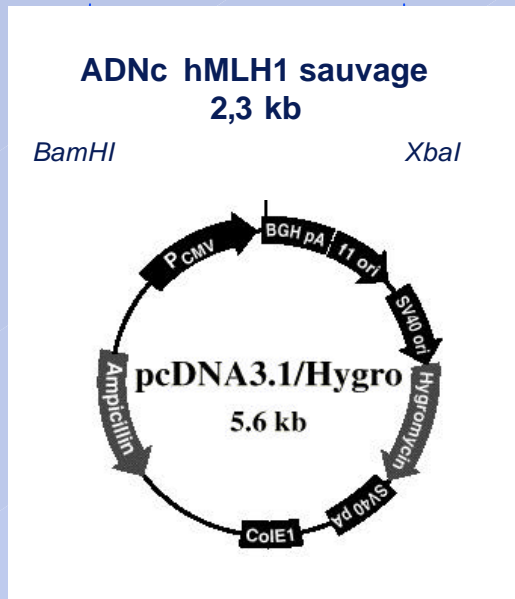
•hMLH1	61%
•hMSH2	36%
•hMSH6	2 familles
•hPMS2	2 familles
•hPMS1	1 famille (?)

- Les tumeurs présentent une instabilité des séquences répétées de type microsatellite (phénotype MSI+) dans 80-100% des cas

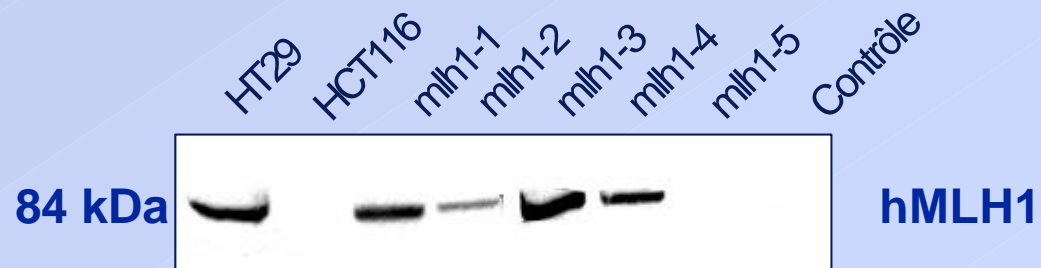
Analyse de l'expression de hMLH1, hMSH2 et p53 dans les lignées de cancers colorectaux



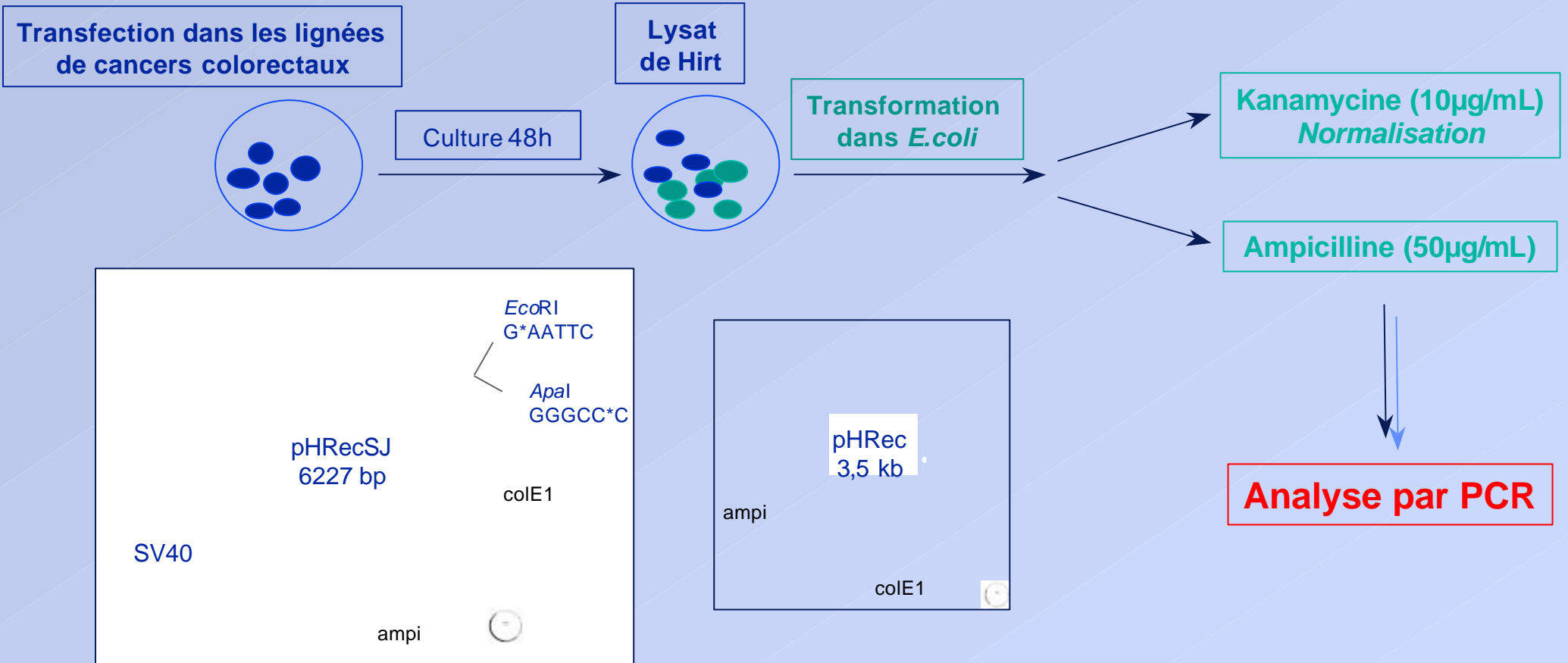
Expérience de complémentation fonctionnelle de hMLH1 dans la lignée HCT116



Transfection stable : lignée HCT116 (hMLH1⁻)
Sélection des clones en présence d'hygromycine.
Criblage des clones obtenus par Western blot.



Systeme experimental d'analyse des mecanismes de reparation des cassures double-brin



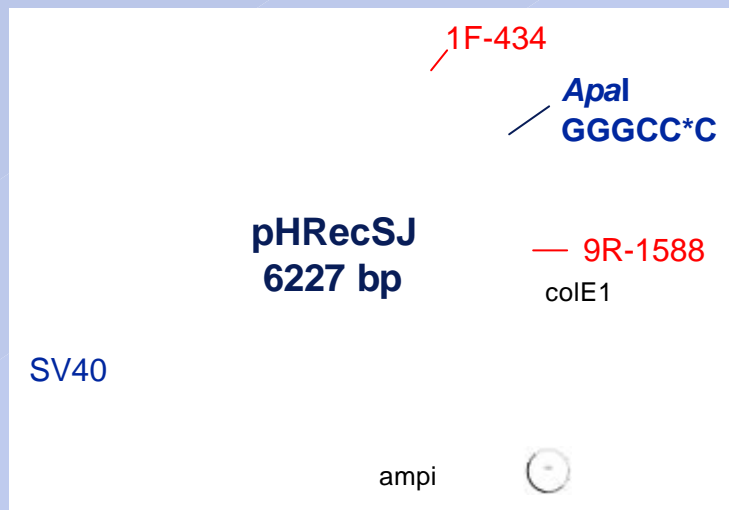
En collaboration avec Dora Papadopoulo, Institut Curie

Analyse des mécanismes de réparation des cassures double-brin

Lignée HT29

Non digéré

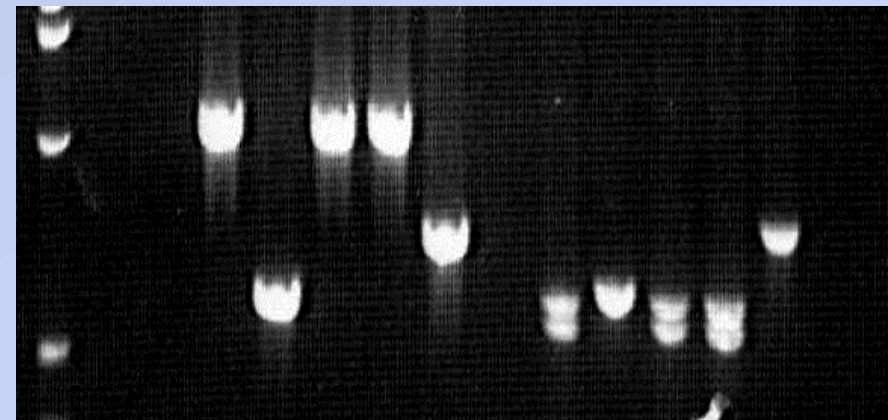
Digéré par *Apal*



1,6 kb

1 kb

0,5 kb

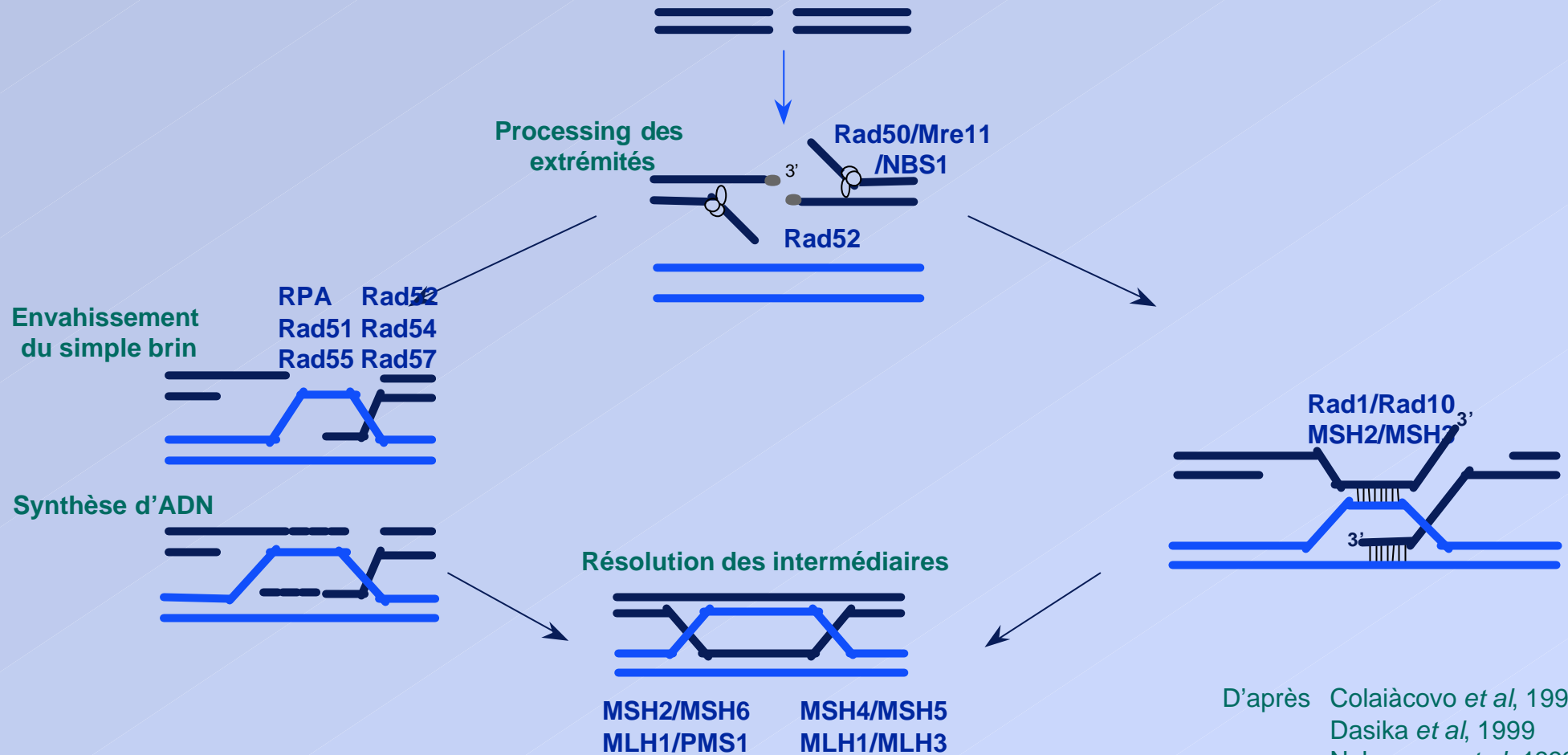


PCR sauvage: 1155 pb

Conclusions et hypothèses

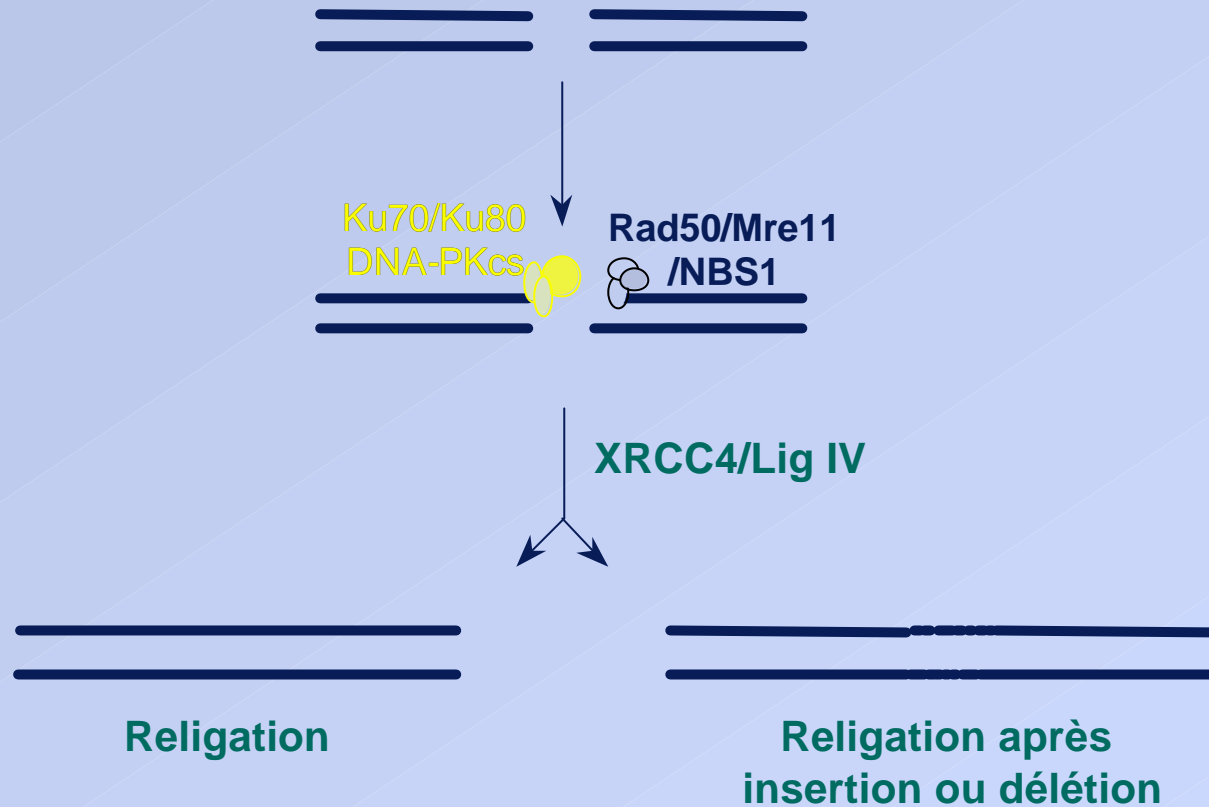
- Un défaut du système de réparation des mésappariements de bases confère, *in vitro*, aux cellules de cancers colorectaux, une hypersensibilité vis-à-vis des inhibiteurs des topoisomérases I et II.
- Cette hypersensibilité ne corrèle
 - ni avec les taux endogènes de topoisomérases
 - ni avec une dérégulation du cycle cellulaire
- La cytotoxicité des inhibiteurs de topoisomérase I résulterait de la transformation des cassures simple-brin en cassures double-brin.
- Un défaut de réparation des cassures double-brin pourrait être à l'origine de la sensibilité accrue des cellules dont le système de réparation des mésappariements de bases est non fonctionnel.

Mécanismes de réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue



D'après Colaiacovo *et al*, 1999
Dasika *et al*, 1999
Nakagawa *et al*, 1999

Mécanismes de réparation des cassures double-brin par recombinaison non-homologue ou illégitime



Inhibiteurs de topoisomérases et chimiothérapie

!Etoposide

- Utilisée dans le traitement des tumeurs peu différenciées
- Son utilisation en clinique se heurte à deux problèmes:
 - l'efficacité relative de pénétration intracellulaire en raison d'un efflux par le système d'excrétion de P-glycoprotéine (gène MDR)
 - la survenue de leucémies secondaires au traitement

!Camptothécine

- Les essais cliniques réalisés avec des analogues de la camptothécine ont donné des résultats prometteurs dans le traitement de diverses tumeurs, en particulier les cancers colorectaux métastatiques.
 - L'irinotécan (CPT11) n'est pas reconnu par le système de résistance multi-drogue MDR.

Principales voies de cancérogenèse colorectale

- Deux principales voies caractérisées par :

- *une perte de matériel chromosomique entraînant l'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs :*

- **tumeurs LOH+ (Loss Of Heterozygosity)**

- 5q21 (APC), 17p13 (p53), 18q12 (DCC/DPC4-Smad4), 8p23 (TSGA8)

- *une instabilité des séquences répétées de type microsatellite :*

- **tumeurs MSI+ (MicroSatellite Instability)**

Les tumeurs MSI+ sont souvent associées à des mutations germinales et/ou somatiques des gènes du système de réparation des mésappariements de bases

Cancers colorectaux et phénotype MSI+

FORMES «FAMILIALES»

5 % des CCR

Cancers héréditaires sans polyadénome
Transmission autosomique dominante

**Instabilité des séquences de type
microsatellite : 80 -100 %**

**Mutation germinale
d'un gène du SRMB
(hMLH1 /hMSH2)**

FORMES «SPORADIQUES»

95 % des CCR

**Instabilité des séquences de type
microsatellite : 15 - 20 %**

**Inactivation somatique
d'un gène du SRMB
(hMLH1)**

Fréquence du phénotype MSI + : 20 % des CCR

Objectifs de l'étude clinique

Définir le rôle éventuel du phénotype MSI+ des tumeurs dans la réponse des cancers colorectaux métastatiques à la chimiothérapie par le CPT11, analogue de la camptothécine.

- Aucun critère prédictif de réponse des cancers colorectaux à la chimiothérapie par les analogues de la camptothécine n'est connu à ce jour
- Essais cliniques de phase II et de phase III dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques:
 - Taux de réponse : environ 20%
- Modèle murin
 - Greffe de lignées tumorales colorectales MSI+ et MSI- chez la souris "nude"
 - Meilleure efficacité du CPT11 en cas de phénotype MSI+*

Caractéristiques cliniques des patients

! Etude rétrospective

- 35 patients: 20 hommes / 15 femmes
- Age moyen : 54,2 ans
- Traitement par CPT11 (Campto®) en 2ème ou 3ème ligne, après échec du 5-FU
- Tous en situation d'échappement métastatique

! Récupération du tissu tumoral

- Pièce d'exérèse colique ou de métastase hépatique
- Coupes histologiques paraffinées:
 - extraction d'ADN
 - marquage immunohistochimique

Evaluation du phénotype MSI des tumeurs

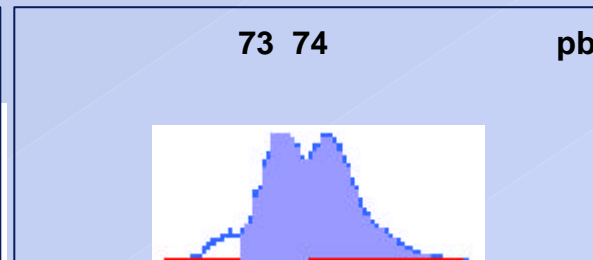
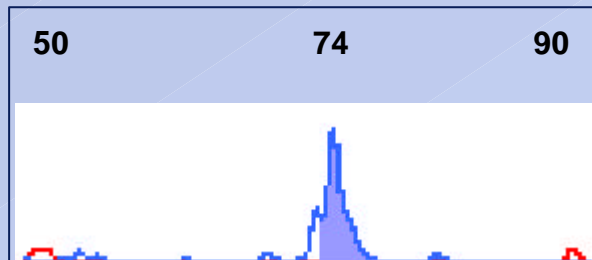
<i>Marqueurs</i>	<i>Taille de l'allèle sauvage</i>	<i>Répétition</i>	<i>Fonction</i>	<i>Fréquence de mutation (Tumeurs MSI+)</i>
BAT 26	123 pb	Poly-A (26)	?	100 %
RII-TGF β	78 pb	Poly-A (10)	Contrôle de la prolifération cellulaire et de la progression tumorale	90 %
BAX	94 pb	Poly-G (8)	Réponse apoptotique	50 %
hMSH3	153 pb	Poly-A (8)	SRMB	40 %
hMSH6	94 pb	Poly-C (8)	SRMB	30 %

Caractérisation du phénotype MSI des tumeurs

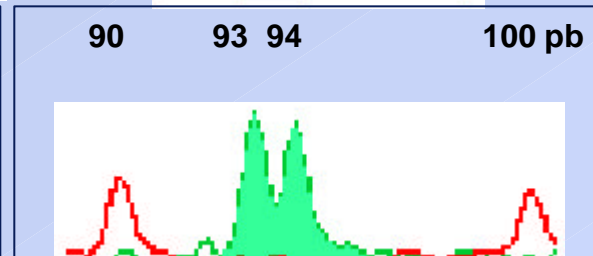
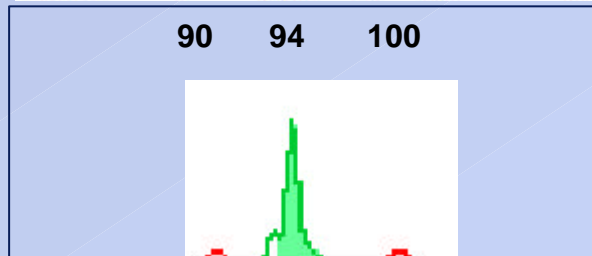
Sauvage

Muté

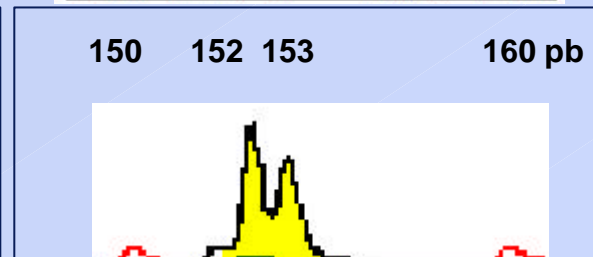
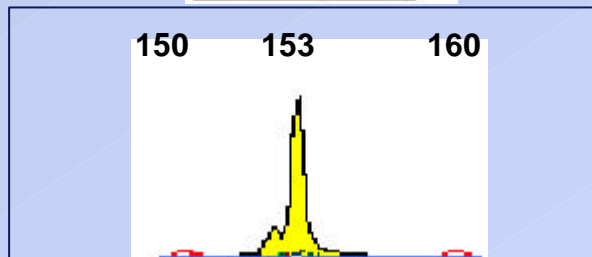
RII-TGFb



BAX



hMSH3



Analyse du phénotype MSI des tumeurs

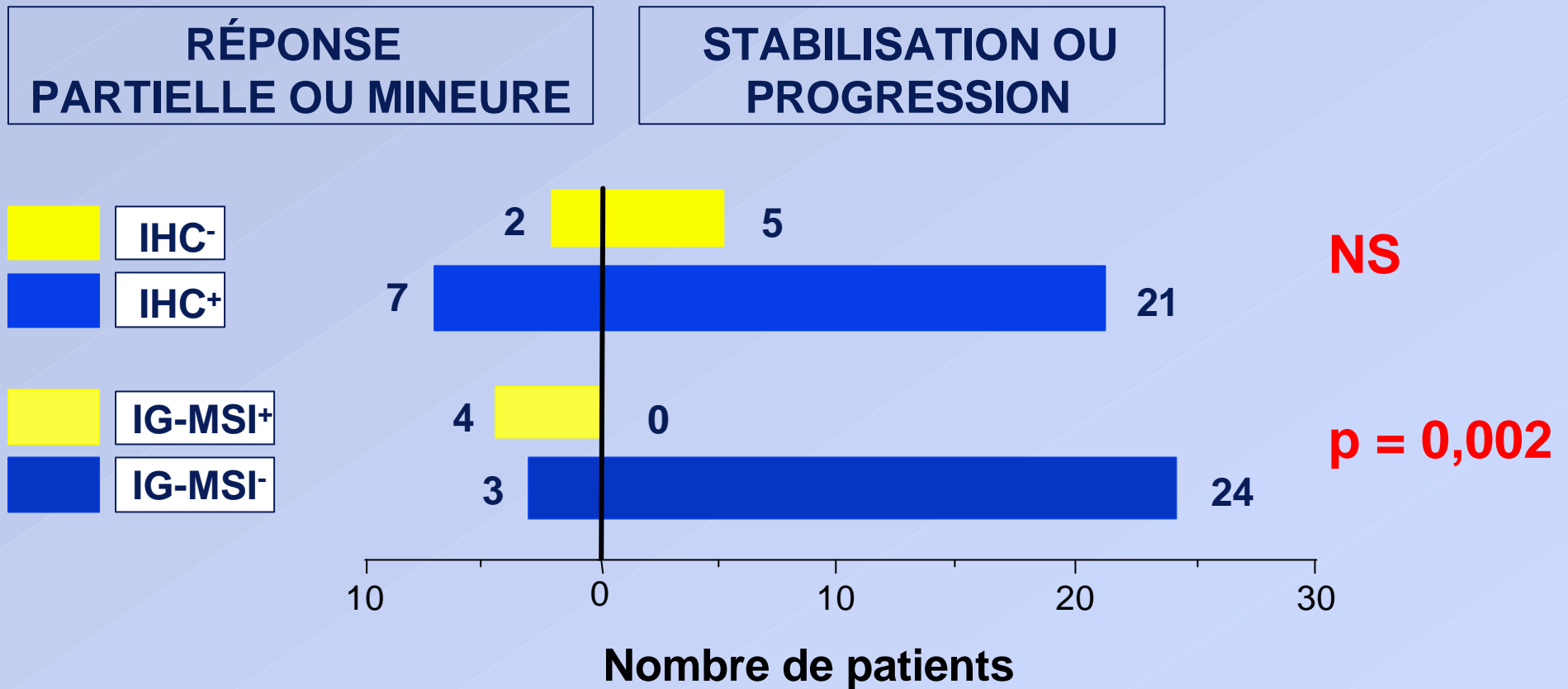
	<i>Muté</i>	<i>Sauvage</i>	<i>Non analysable</i>
BAT 26	0	18	17
RII TGFb	1	29	5
BAX	3	29	3
hMSH3	1	29	5
hMSH6	0	31	4

Patients dont la tumeur présente un défaut d'expression de hMLH1/hMSH2 ou un phénotype MSI+

hMSH2	hMLH1	CPT11	IG-MSI	RII-TGFb	BAX	hMSH3	hMSH6
Dark Blue	Yellow	Grey	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Grey	Dark Blue
Dark Blue	Yellow	Teal	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
Dark Blue	Dark Blue	Teal	Yellow	Yellow	Dark Blue	Yellow	Dark Blue
Dark Blue	Yellow	Grey	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
Dark Blue	Yellow	Grey	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
Dark Blue	Yellow	Light Grey	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
Dark Blue	Yellow	Grey	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
Dark Blue	Dark Blue	Cyan	Yellow	Dark Blue	Yellow	Dark Blue	Dark Blue
Yellow	Dark Blue	Cyan	Yellow	Grey	Yellow	Dark Blue	Dark Blue
Dark Blue	Dark Blue	Cyan	Yellow	Dark Blue	Yellow	Dark Blue	Dark Blue

- Absence de corrélation entre défaut d'expression de hMLH1 et phénotype MSI+
- Absence d'expression de hMSH2 associée au phénotype MSI+

Relations entre un défaut d'expression de hMSH2/hMLH1, le phénotype MSI des tumeurs et la réponse à la chimiothérapie par CPT11



Conclusions et perspectives

- Dans notre cohorte de patients, il n'existe pas de relation entre un défaut d'expression de hMLH1 et la présence de mutations dans les séquences répétées des gènes RII-TGF β , BAX, hMSH3 et hMSH6.
- Un défaut d'expression de hMLH1 n'est pas un facteur de réponse favorable à la chimiothérapie par les analogues de la camptothécine.
- La présence de mutations dans les gènes RII-TGF β , hMSH3 et BAX est associée à une meilleure efficacité de la chimiothérapie par les analogues de la camptothécine définissant le premier critère de choix de cette chimiothérapie.