

# Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions

Vassilis G. Gorgoulis<sup>1\*</sup>, Leandros-Vassilios F. Vassiliou<sup>1\*</sup>,  
 Panagiotis Karakaidos<sup>1</sup>, Panayotis Zacharatos<sup>1</sup>, Athanassios Kotsinas<sup>1</sup>,  
 Triantafillos Liloglou<sup>2</sup>, Monica Venere<sup>3,4</sup>, Richard A. DiTullio Jr<sup>3,4</sup>,  
 Nikolaos G. Kastrinakis<sup>1</sup>, Brynn Levy<sup>5</sup>, Dimitris Kletsas<sup>7</sup>, Akihiro Yoneta<sup>3</sup>,  
 Meenhard Herlyn<sup>3</sup>, Christos Kittas<sup>1</sup> & Thanos D. Halazonetis<sup>3,5</sup>

Le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains est celui codant la protéine p53, qui coordonne la réponse cellulaire au niveau du point de contrôle induit par les cassures doubles brin de l'ADN (Figure 1a). Divers modèles ont été construits pour expliquer la prévalence de l'inactivation de p53, une explication avancée étant que la croissance tumorale conduit au raccourcissement des télomères et à l'induction d'une hypoxie, résultant dans un DDR (DNA damage response). Ce modèle prédit que le DDR doit intervenir quelque temps après l'initiation cancéreuse. Dans ce travail, une analyse systématique de lésions précancéreuses a été réalisée, afin de déterminer à quelle étape se fait la mise en place des protéines constituant le point de contrôle de réponse aux cassures doubles brin de l'ADN.

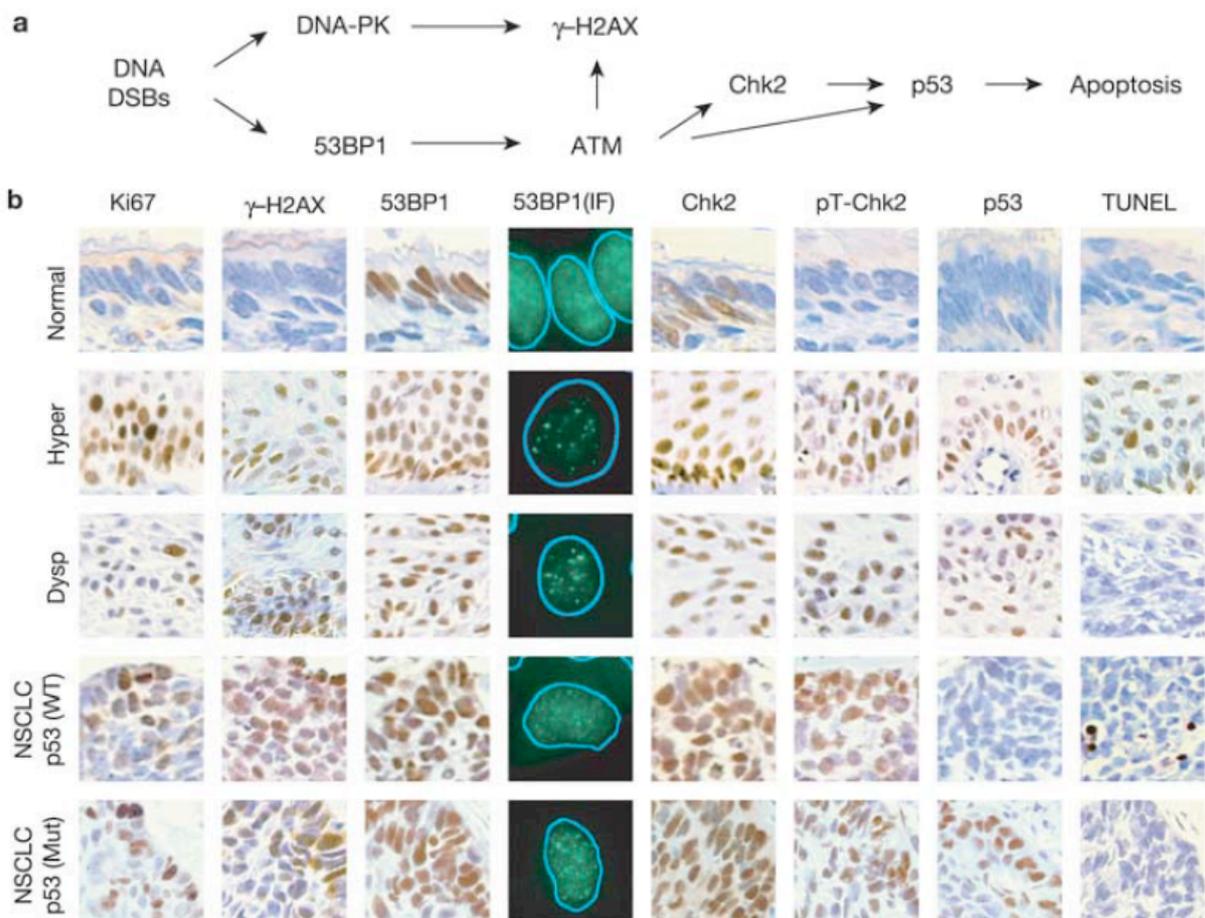


Figure 1

Une série d'échantillons (74) provenant de produits chirurgicaux de non-small cell lung carcinomas (NSCLC) de patients qui n'ont reçu aucun type de traitement avant l'événement chirurgical est utilisée (figure 1b). 72 de ces prélèvements contiennent également du tissu pulmonaire normal. 17 échantillons contiennent du tissu hyperplasique, et 2 des lésions dysplasiques, et leur localisation au sein de la tumeur suggère que ces lésions sont à l'origine des NSCLC. P53 est sauvage dans toutes les hyperplasies et mutant dans les dysplasies. Le statut de p53 est déterminé par séquençage de l'ADN. Le gène est muté dans 45, et sauvage dans 29 des NSCLC. Dans les 2 dysplasies, la même mutation de p53 est trouvée dans le NSCLC adjacent, ce qui est en accord avec l'origine présumée des NSCLC à partir des lésions dysplasiques.

La mise en route d'une réponse aux dommages à l'ADN peut être caractérisée en suivant la phosphorylation de l'histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX), la localisation subcellulaire de 53BP1, la phosphorylation activatrice de la kinase Chk2 sur la thréonine 68, ainsi que le niveau de p53 (Figure 1a). La figure 1b montre les résultats obtenus sur des coupes d'échantillons fixés à la formaline et inclus en paraffine. KI67 mesure la prolifération cellulaire, la localisation sub-cellulaire de 53BP1 est suivie par immunofluorescence (les contours des noyaux est surligné en bleu), l'anticorps Chk2 détecte la totalité de la kinase alors que pT-Chk2 montre la protéine spécifiquement phosphorylée sur la thréonine 68. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling).

Q1 : y a-t-il une réponse « dommages à l'ADN » dans le tissu sain (ligne normal dans la figure 1b)?

Q2 : que peut-t-on dire de la localisation de 53BP1 dans ces différents prélèvements?

Q3 : que détecte le marquage TUNEL ? que peut-t-on dire de son marquage pour les hyperplasies, dysplasies et NSCLC ?

Afin de généraliser les observations conduites sur les tumeurs pulmonaires, des prélèvements sont réalisés chez 61 patients atteints de mélanomes. 11 de ces patients ont des névus dysplasiques (Dysp, figure 1e) adjacents au mélanome (Melan, figure 1e). Les contrôles sont représentés par de la peau normale, ou de simples grains de beauté (freckle, figure 1f).

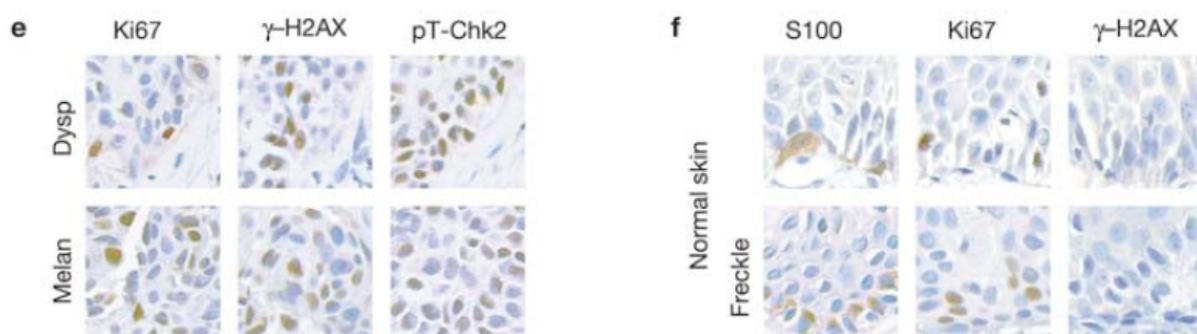
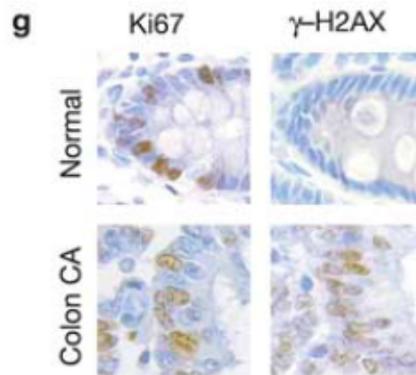


Figure 1

Q4 : les conclusions tirées sur les tumeurs pulmonaires sont elles généralisables à d'autres types de tumeurs et d'états pré-néoplasiques ?



Afin de s'assurer que l'expression des protéines associées aux dommages à l'ADN n'était pas simplement due à la prolifération accrue de ces cellules, mais bien à leur état précancéreux/cancéreux, l'analyse de ces marqueurs est réalisée sur des prélèvements de carcinomes du colon, comparé au tissu normal ; en effet dans ce tissu les cellules de l'épithélium colique normal sont en prolifération active afin de renouveler activement les cellules de l'épithélium digestif. Les résultats sont présentés dans la figure 1g, en comparant KI67 avec  $\gamma$ -H2AX.

Q5 : commentez cette figure. Y a-t-il un lien entre la prolifération et l'expression des protéines du point de contrôle lésionnel de l'ADN.

Afin de vérifier que le phénomène d'hyperplasie est bien à l'origine du développement des cancers, et les cancers se développant sur des périodes de plusieurs années, un modèle de souris xéno greffées est utilisé.

Dans ce modèle, des fragments de peau humains sont greffés sur le dos de souris immunodéficientes, et ces explants sont infectés par des adénovirus produisant des facteurs de croissance (Fibroblast Growth Factor 2, stem cell factor et endothéline 3). Les fragments greffés infectés avec les adénovirus codant des facteurs de croissance (les contrôles sont infectés avec des adénovirus exprimant la GFP) développent des hyperplasies en 4 semaines. L'expression des marqueurs moléculaires est étudiée sur ces hyperplasies (figure 2a, b). Les N° font référence aux xéno greffes utilisées. Pour le même échantillon de xéno greffe sur des souris différentes, Ctl : contrôle, GF : facteur de croissance. Figure 2c, mesure des protéines de point de contrôle par western bot. Figure 3d : l'évènement déclenchant l'expression des protéines de point de contrôle des lésions de l'ADN peut être le raccourcissement des télomères. La mesure de la taille de l'ADN télomérique est réalisée sur l'ADN extrait des tissus xéno greffés des souris 3 et 5, digérés par les enzymes Hinf1 et Rsa1 migré sur gel et révélé avec une sonde spécifique des télomères. la lignée hématopoïétique humaine K562 est utilisée comme contrôle. La figure 2e, résume les résultats obtenus en présentant le % de cellules positif pour chacun des marqueurs indiqués.

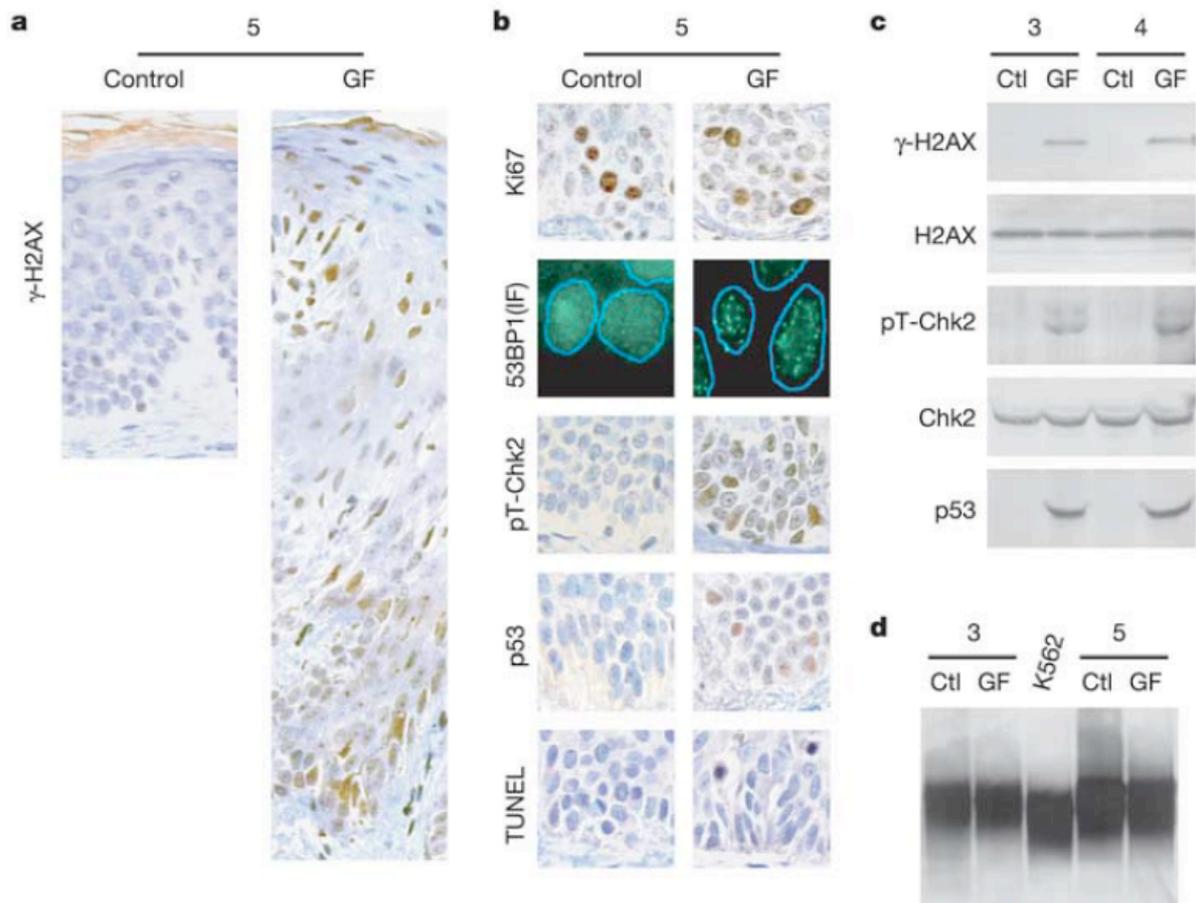


Figure 2

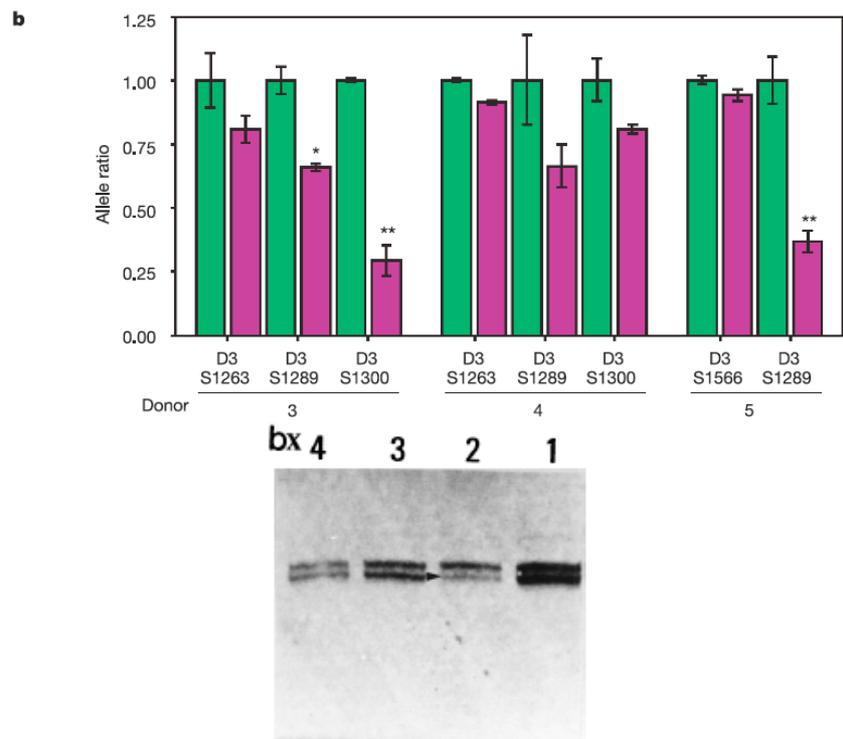
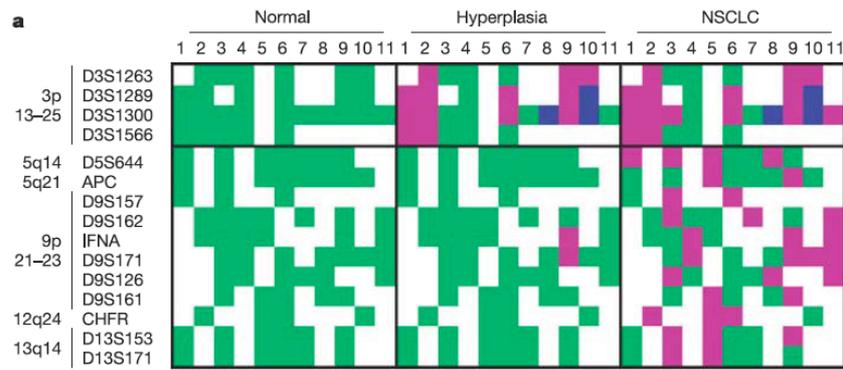
Q6 : les protéines du check point cassure ADN sont-elles induites dans les xénogreffes hyperplasiques ?

Q7 : le raccourcissement des télomères est-il responsable de l'induction de ce point de contrôle ?

Une cause possible de l'activation des protéines du point de contrôle des lésions à l'ADN peut être un stress réplicatif conduisant à des cassures de l'ADN au niveau des fourches de réplication. Les sites de l'ADN sujets à des cassures double brins en condition de stress réplicatifs sont appelés sites fragiles. Si les lésions de l'ADN sont dues à des cassures au niveau des fourches de réplication, on peut prédire que ces sites fragiles seront la cible d'un déséquilibre allélique suite aux cassures suivies par une réparation défectueuse des lésions.

Dans la figure 3a, le déséquilibre allélique sur le site fragile FRA3B sur le chromosome 3p14 est comparé aux sites qui montrent fréquemment des déséquilibres alléliques dans les cancers mais qui ne sont pas des sites fragiles de l'ADN. Les marqueurs microsatellites utilisés pour le site fragile FRA3B sont D3S1289 et D3S1300. Le marqueur D3S1263 se localise en 3p25 et le marqueur D3S1566 marque le chromosome 3p13. Les loci hétérozygotes sont en vert, les déséquilibres alléliques sont en rose, les microsatellites instables sont en bleu, et les loci homozygotes non informatifs en blanc.

Dans la figure 3b, le ratio allélique a été déterminé par deux PCR indépendantes par échantillons et calibré de telle sorte que le rapport entre les deux allèles soit fixé à 1 pour la xénogreffe contrôle. Les astérisques indiquent que le seuil de différence entre les contrôles et les xénogreffes hyperplasiques après un traitement par les adénovirus codant des facteurs mitogènes est statistiquement significatif.



Un exemple de résultat sur la détermination de la variabilité allélique est présenté pour le marqueur D9S171 (Tiré de Gorgoulis et al, American journal of pathology, vol 153, 1998, 1749-1765).

Q8 : le site fragile du chromosome 3 (marqueurs D3S1289 et D3S1300) est-il touchés dans les hyperplasies ?

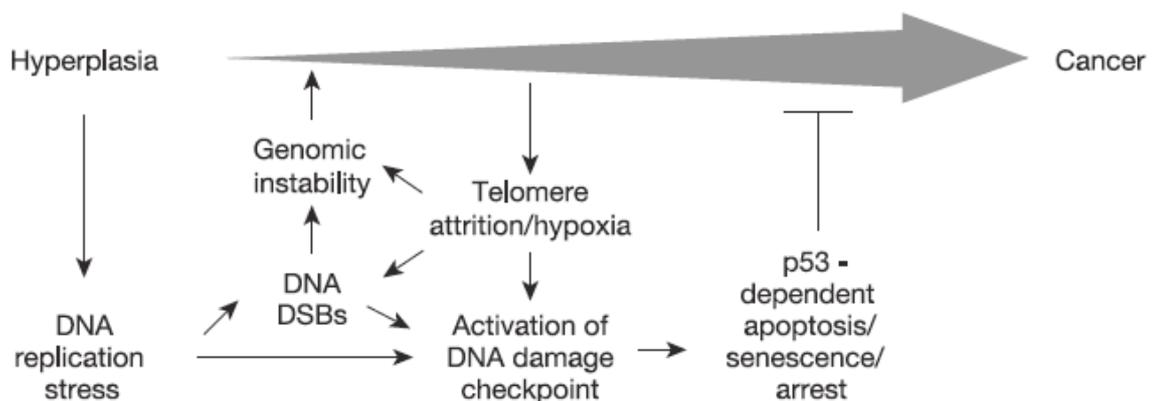


Figure3.

La figure 3c résume les événements moléculaires accompagnant la stabilité de l'ADN et décrits dans cet article.

Q9 : pourquoi dans ce contexte p53 est-il considéré comme un anti-oncogène ?