

# INHIBITION DE LA RÉPARATION DES CASSURES DE L'ADN : QUEL INTÉRÊT EN RADIOTHÉRAPIE ET PHARMACOLOGIE ANTITUMORALE ?

Bernard SALLES

Pr Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Toulouse



UMR 1331 INRA/INP/UPS





**Radiobiologie et Réparation de l'ADN (1991-2010)**  
**Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale**



Equipe labélisée

**E. Boutet, MCU Pharmacie**

**P. Calsou, DR INSERM**

**S. Dauvillier, Tech**

**C. Delteil, Tech**

**Y Fédor, doctorant**

**P. Frit, CR CNRS**

**D. Gomez, CR CNRS**

**S. Hashim, Tech**

**G. Mirey, MCU Pharmacie**



Laboratoire de recherche correspondant

**Past collaborators (2005-2012)**

**M. Audebert, CR INRA**

**C. Bobby, IE INRA**

**O. Bombarde, post-doc**

**F. Bouquet, post-doc**

**S. Britton, post-doc**

**B. Dirat, PhD student**

**J. Drouet, industry**

**F. Fallone, Ass Pr. Pharmacy**

**O. Humbert, CR CNRS**

**A. Meulle, post-doc**

**S. Monferran, post-doc**

**C. Muller, PR Pharmacy**

**M. Ousset, PhD student**

**J. Paupert, post-doc**

**G. Wu, Ass Pr Taiwan**

**Collaborations 2005-2012**

**D. Biard (CEA Fontenay, FR)**

**D.J. Chen (Dallas, USA)**

**E. Gilson (Nice, FR)**

**M. Junop (McMaster Univ, CA)**

**In Toulouse :**

**P. Valet (INSERM)**

**B Ducommun (CNRS)**

**TOXALIM INRA/ENVT/Université 2011-  
Génotoxicité et Signalisation**



**E. Boutet, MCU Pharmacie**

**Y Fédor, doctorant**

**S. Hashim, Tech**

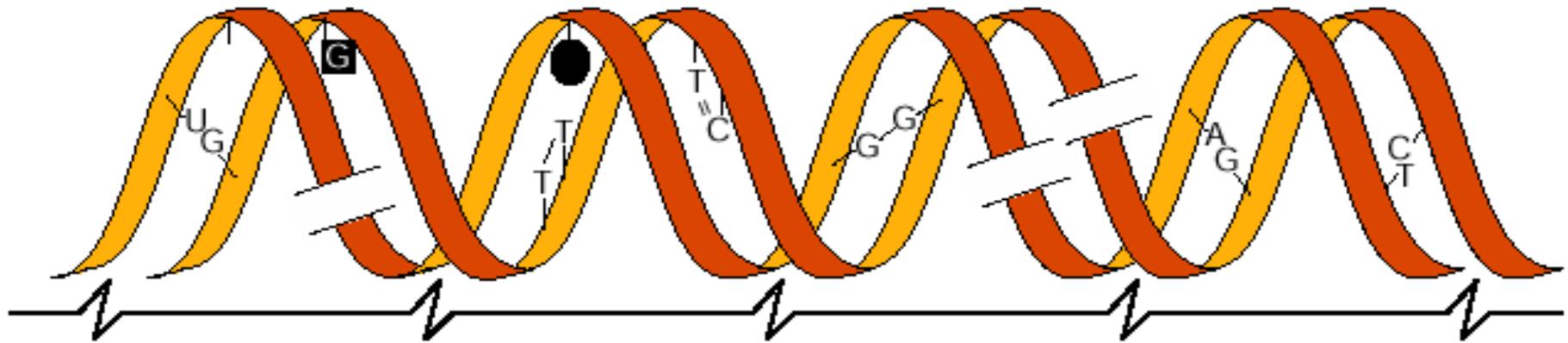
**G. Mirey, MCU Pharmacie (responsable)**

**J. Vignard, CR INRA**

**D Julien, post-doc**

# L'ADN, CIBLE DE NOMBREUX DOMMAGES

Origine des lésions  
ENDOGENES  
EXOGENES



Lésion

Cassures sb  
Bases oxydées (8-oxoG)  
Uracil  
Sites abasiques (sites AP)

CPD, (6-4)PP  
Adduits encombrants

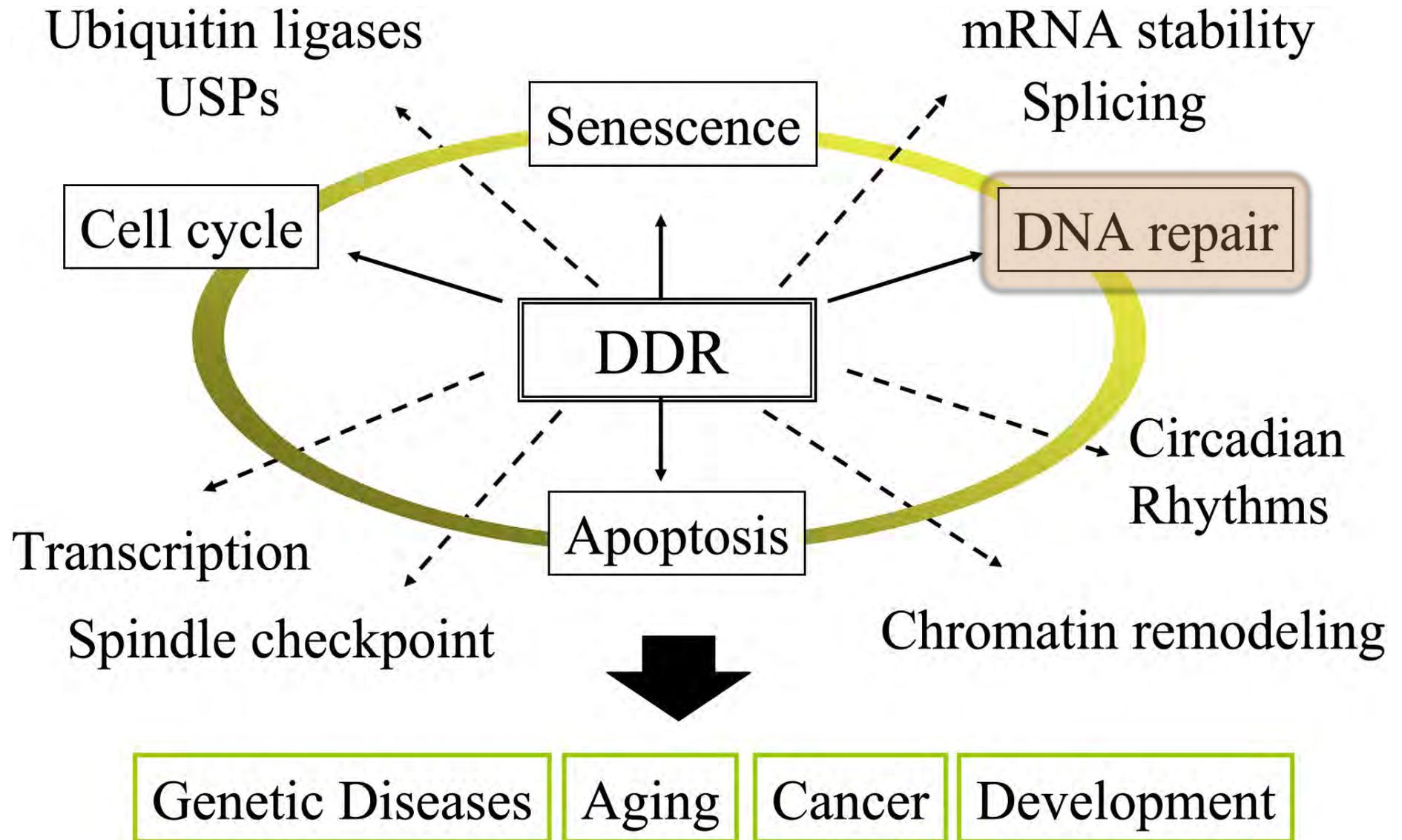
Cassures db  
Adduits interbrins

Mésappariements  
Insertion, délétion

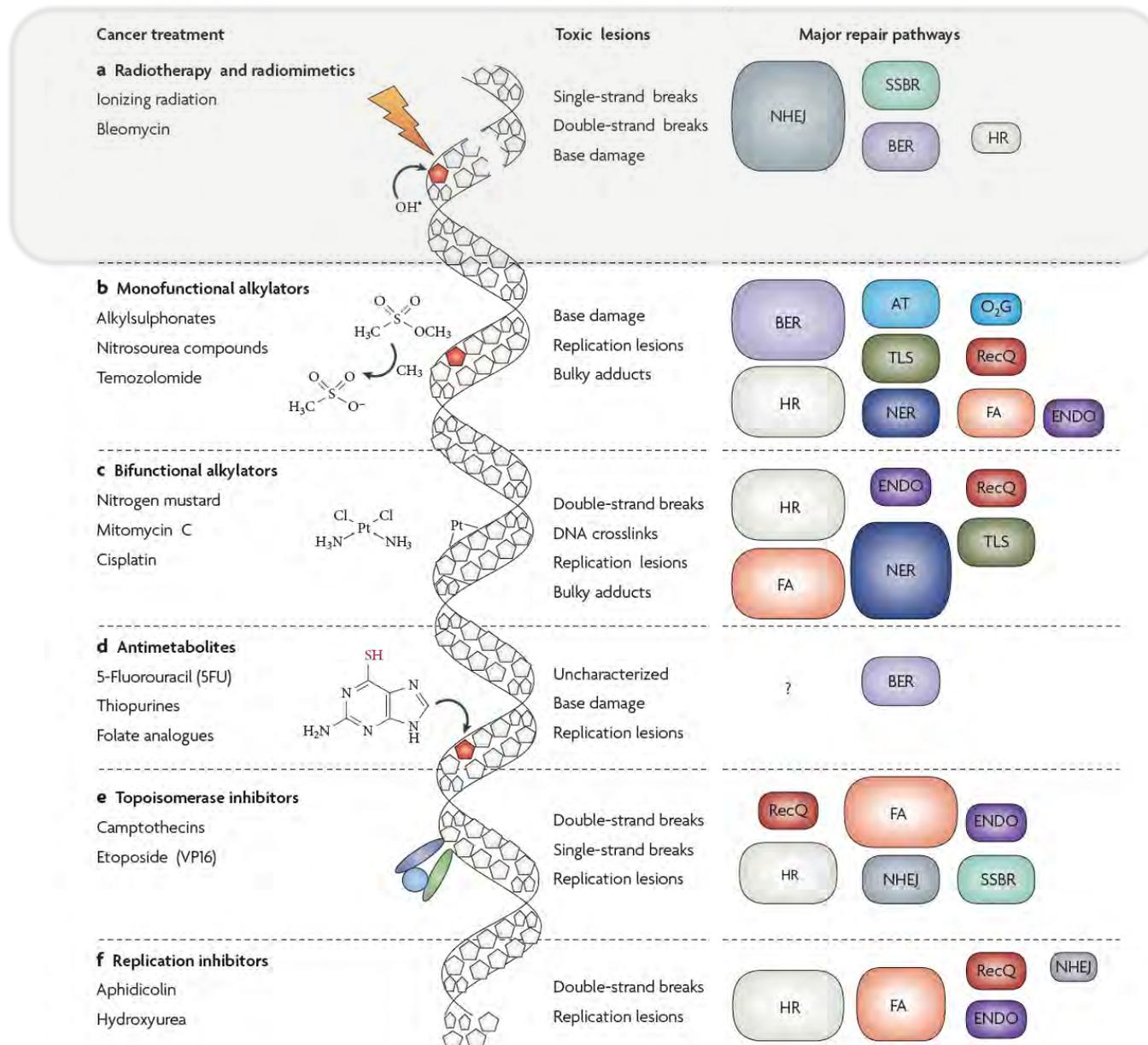


Réponses cellulaires

# LA RÉPONSE CELLULAIRE À LA PRÉSENCE DE LÉSIONS DE L'ADN (DDR)

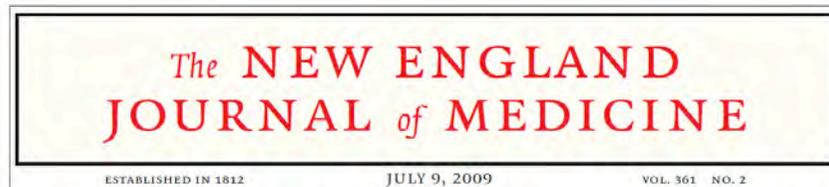


# LÉSIONS DE L'ADN INDUITES PAR LES TRAITEMENTS ANTITUMORAUX NON CIBLÉS ET MÉCANISMES DE RÉPARATION



# POURQUOI RECHERCHER DES INHIBITEURS D'ACTIVITÉ DE RÉPARATION?

- ✓ Action synergique avec des médicaments à effet génotoxique (MGMT, PARP, DNA-PK): adjuvant thérapeutique
- ✓ Diminution de la résistance de cellules tumorales surexprimant une voie de réparation (MGMT, DNA-PK)
- ✓ Combinaison d'inhibiteurs (MGMT et PARP, PARP et DNA-PK)
- ✓ Effet sur des cellules déficitaire dans la même voie de réparation (PARP; létalité synthétique)



## Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers

Peter C. Fong, M.D., David S. Boss, M.Sc., Timothy A. Yap, M.D., Andrew Tutt, M.D., Ph.D., Peijun Wu, Ph.D., Marja Mergui-Roelvink, M.D., Peter Mortimer, Ph.D., Helen Swaisland, B.Sc., Alan Lau, Ph.D., Mark J. O'Connor, Ph.D., Alan Ashworth, Ph.D., James Carmichael, M.D., Stan B. Kaye, M.D., Jan H.M. Schellens, M.D., Ph.D., and Johann S. de Bono, M.D., Ph.D.



## ✓ RÉPARATION DES CASSURES DOUBLE BRINS DE L'ADN

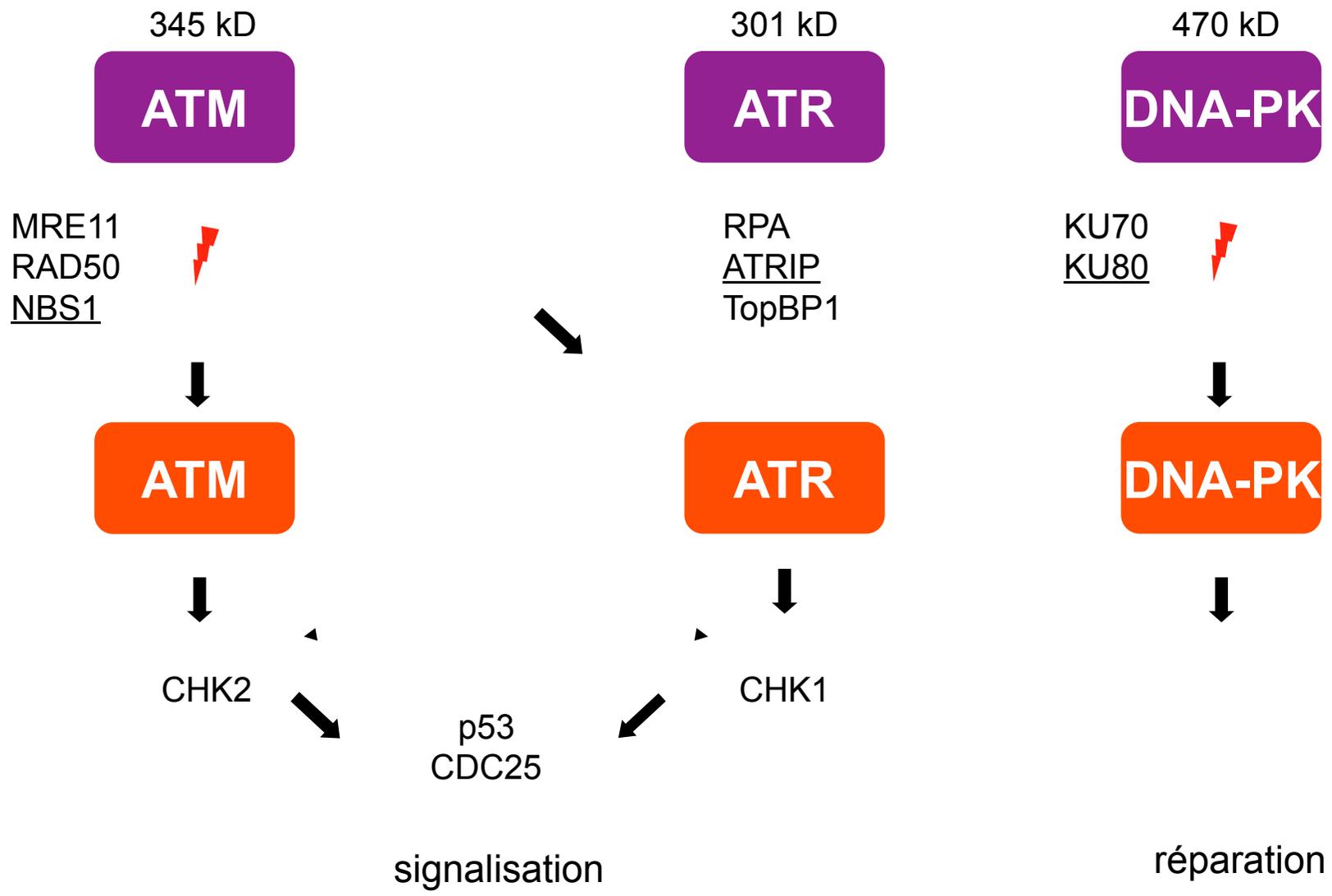
- RECOMBINAISON HOMOLOGUE
- RECOMBINAISON NON HOMOLOGUE (NHEJ) CLASSIQUE ET ALTERNATIVE

## ✓ INHIBITION DE LA RÉPARATION DES CASSURES

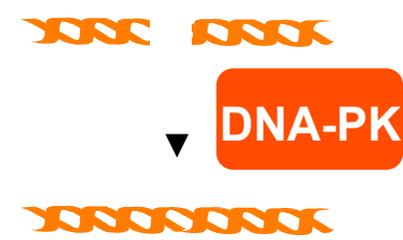
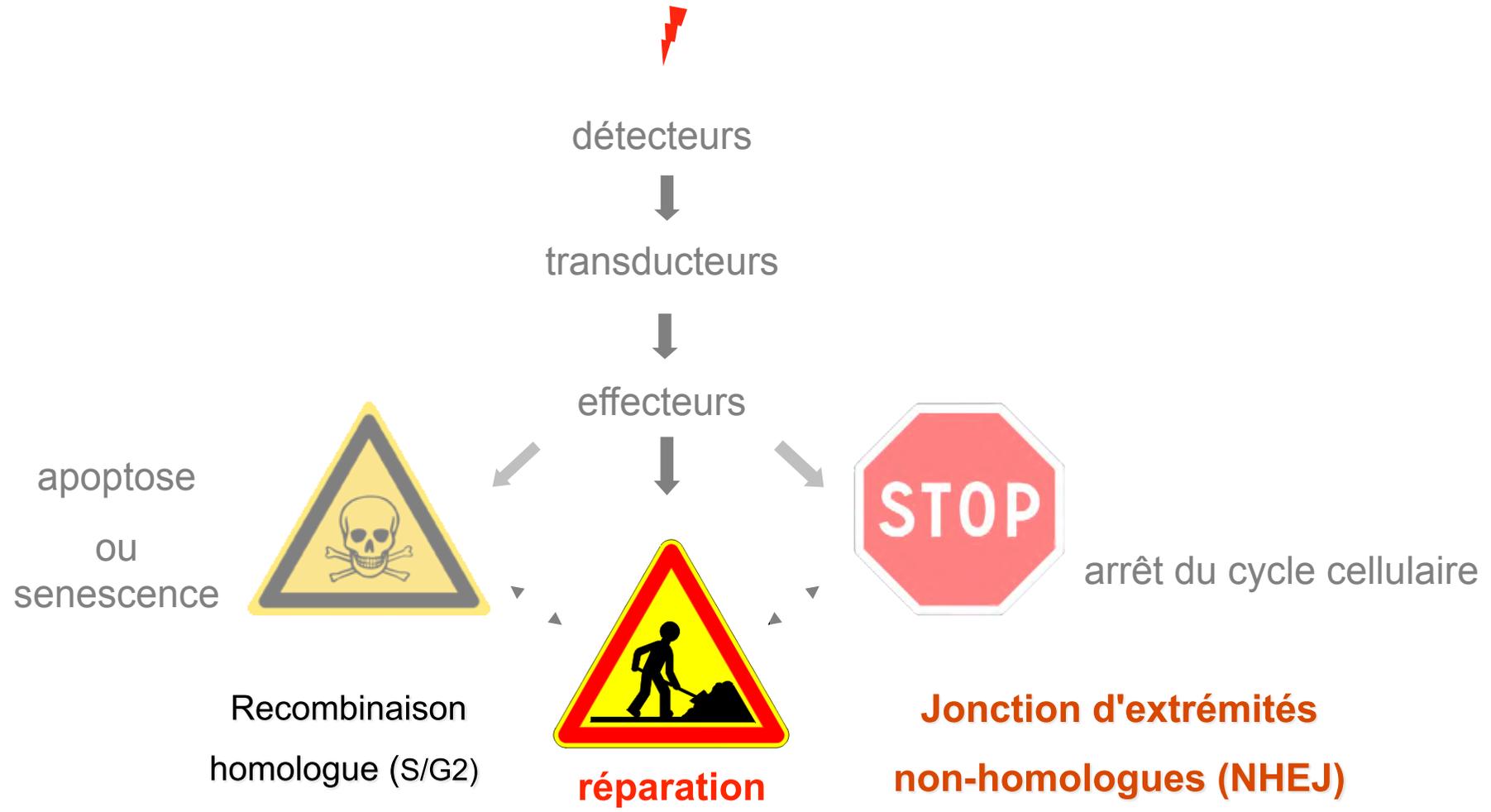
- VOIE NHEJ : CHIMIOTHÉRAPIE ADJUVANTE
  - 1<sup>er</sup> Complexe
  - 2<sup>ème</sup> Complexe
- LA POLY-ADP-RIBOSE POLYMÉRASE (PARP-1) :  
UNE AVANCÉE EN MONOCHIMIOTHÉRAPIE

## ✓ DISCUSSION ET PERSPECTIVES

# ATM, ATR, DNA-PK : LES PIK-KINASES CLEF D'AMONT



# RÉPONSES CELLULAIRES AUX CASSURES DOUBLE-BRINS



# PROTEINES DE REPARATION DE LA VOIE NHEJ

Syndrome humain RS-scid

DNA-PK (PI3KK)

Ku70  
Ku80

DNA-PKcs

Artemis

XRCC4

ADN Ligase IV

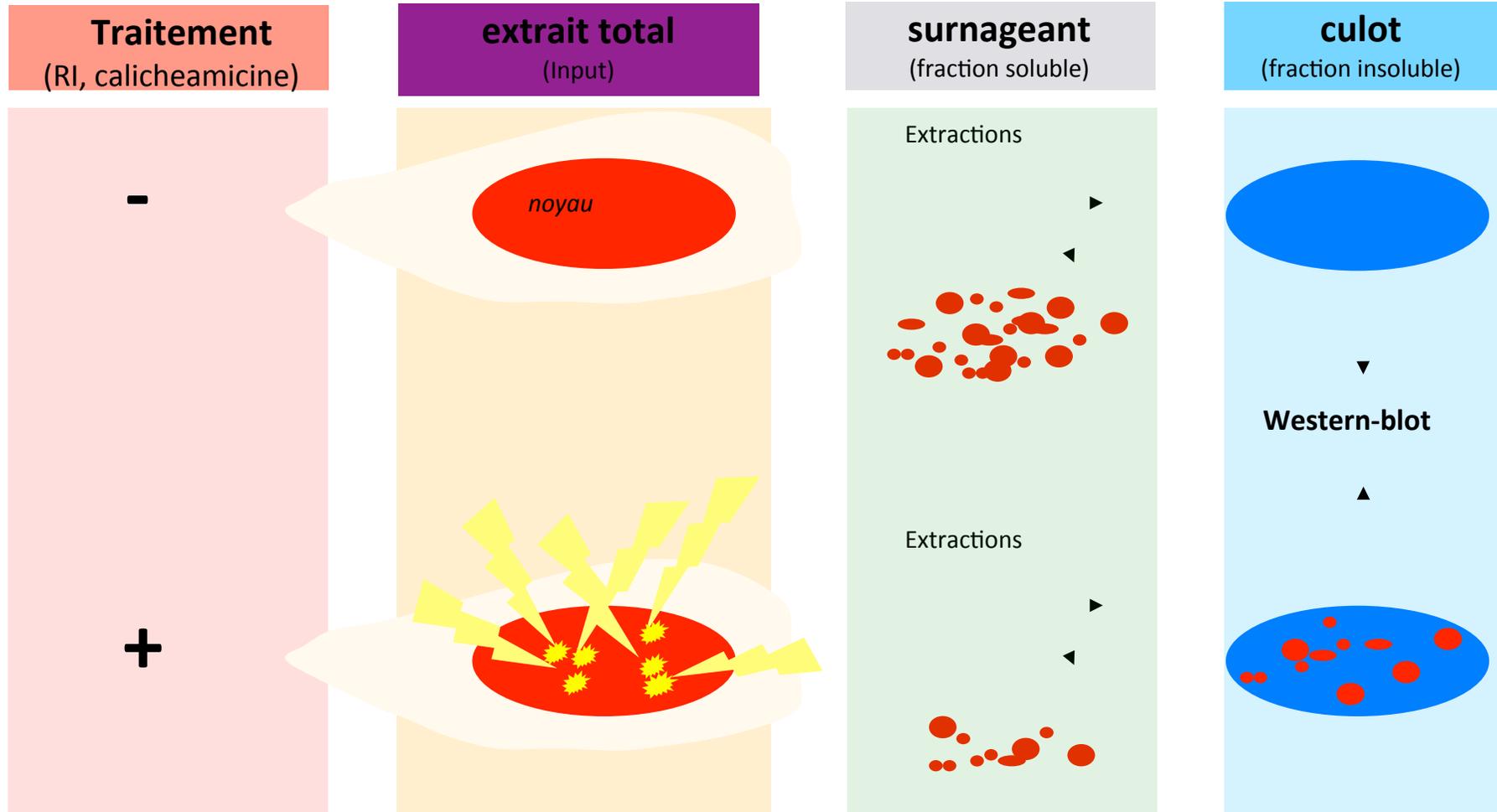
XLF



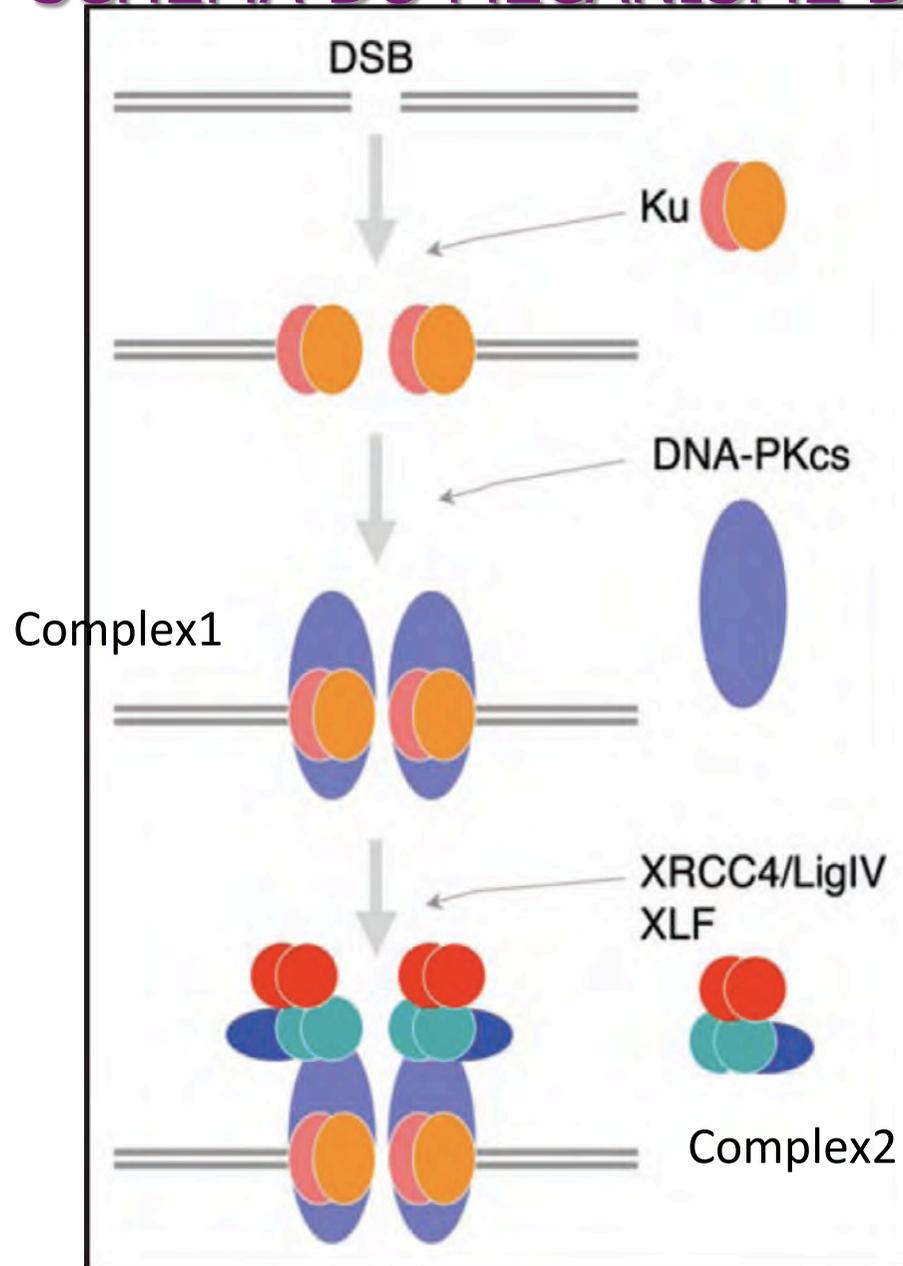
**COMPLEXE 1:  
LIAISON ET MATURATION DU  
COMPLEXE**

**COMPLEXE 2:  
COMPLEXE DE LIGATION**

# METHODE D'ANALYSE BIOCHIMIQUE DU COMPLEXE DE RÉPARATION



# SCHÉMA DU MÉCANISME DE RÉPARATION C-NHEJ



- ❖ Recrutement de Ku indépendant du co-recrutement des partenaires
- ❖ La DNA-PK est physiquement requise pour le recrutement stable de XLX
- ❖ La phosphorylation de XRCC4 est dépendante de DNA-PK mais non nécessaire au recrutement
- ❖ La DNA-PKcs est requise pour le recrutement d'Artemis
- ❖ XLF est phosphorylé par la DNA-PK mais n'est pas requis pour le recrutement des autres partenaires
- ❖ Le recrutement d'XLF est dépendant de Ligase IV et XRCC4. La Ligase IV est nécessaire pour la stabilisation du complexe XLX

Drouet et al. J Biol. Chem. 2005

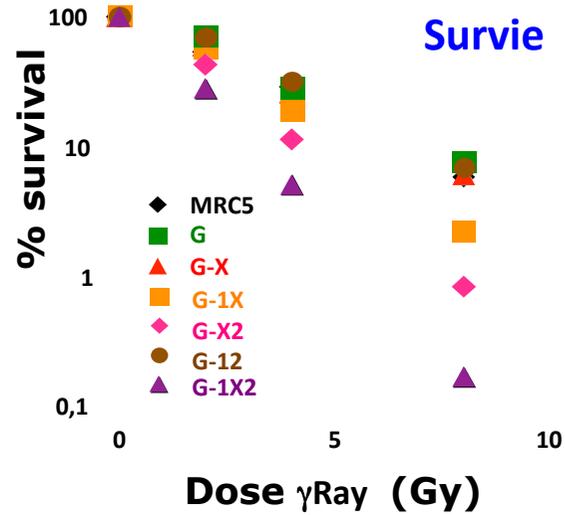
Drouet et al. J Biol. Chem. 2006

Wu et al. J. Biol. Chem. 2007

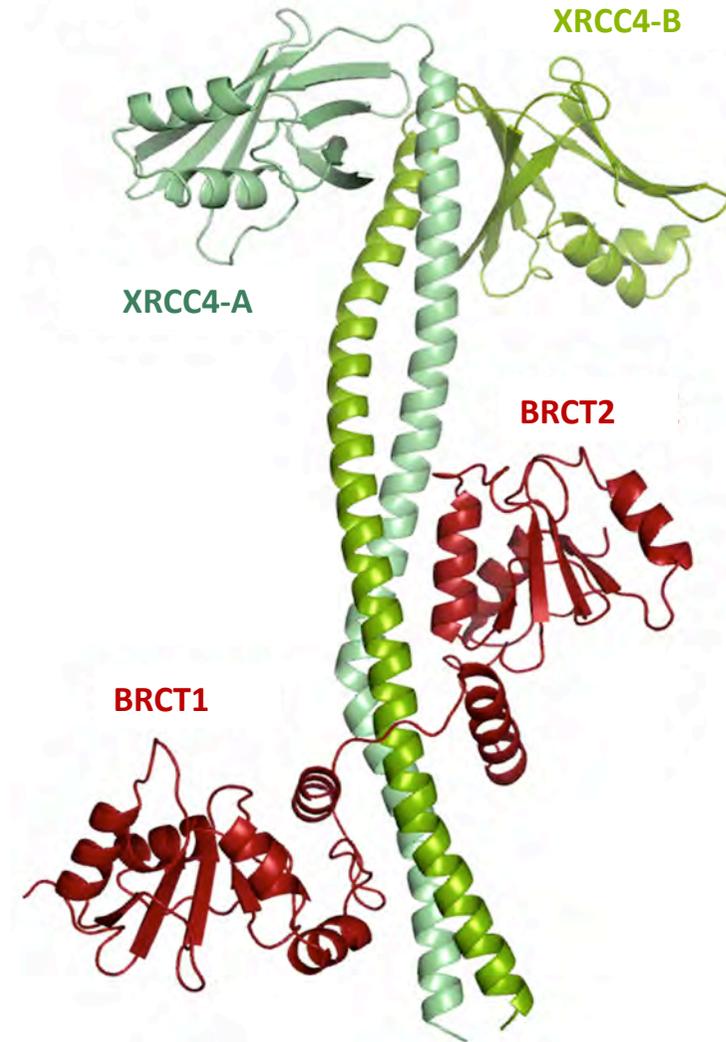
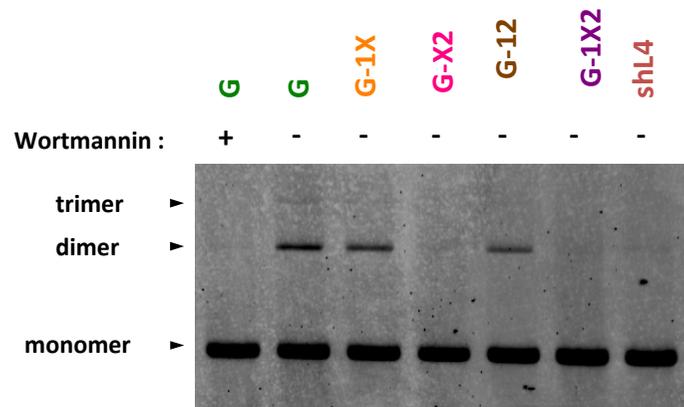
Wu et al. Mol Cell Biol. 2009

Cottarel et al. J Cell Biol. En révision

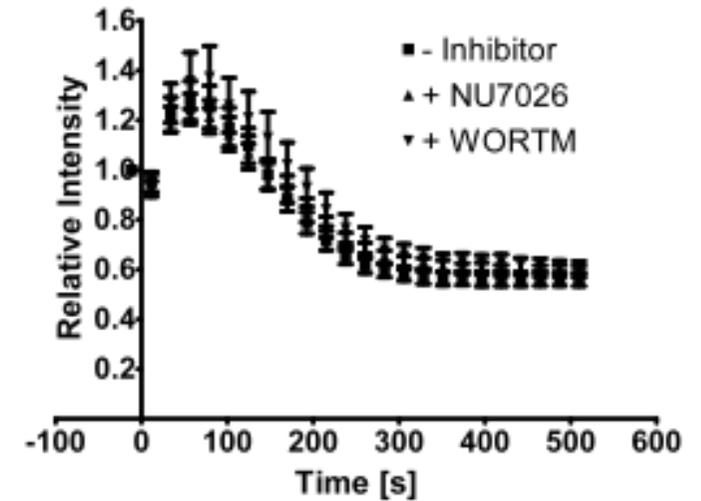
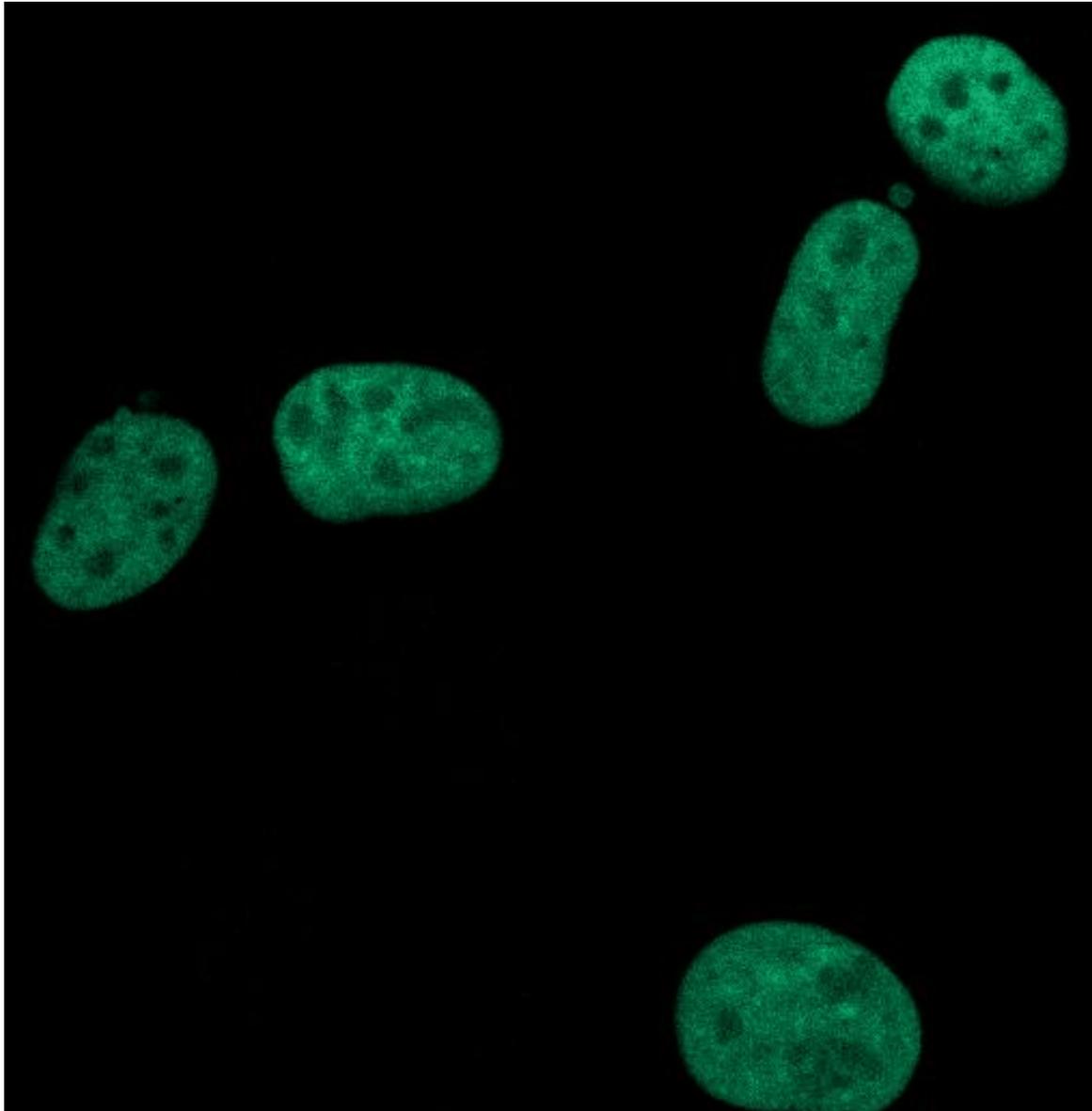
# LE DOMAINE BRCT2 EST ESSENTIEL POUR LA STABILITÉ DU COMPLEXE DE LIGATION



## Réaction NHEJ in vitro



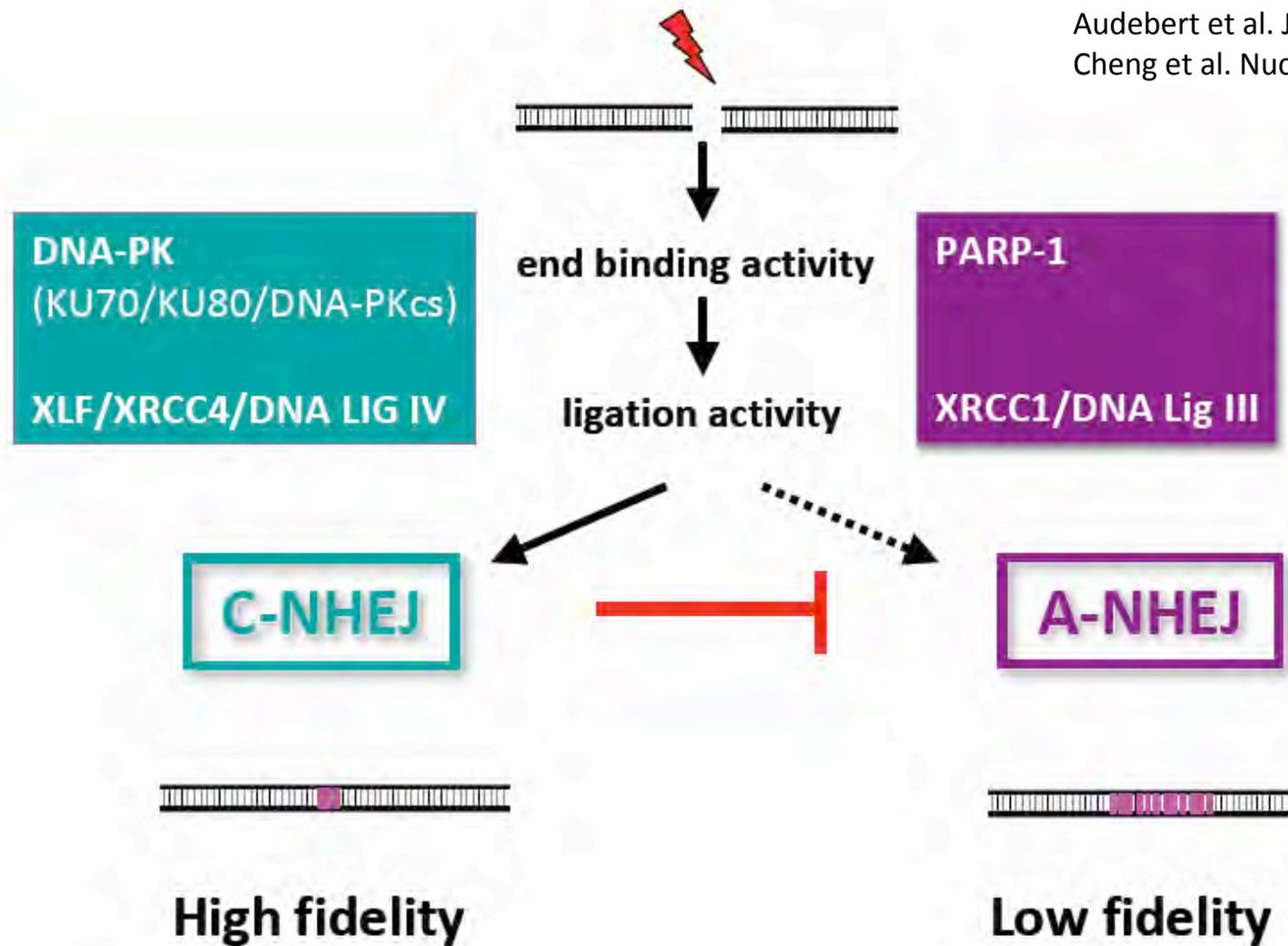
# IRRADIATION LOCALISÉE: MOBILISATION DE PROTEINES NHEJ EN RÉPONSE AUX CASSURES



- 1- LIAISON DE KU : premier évènement
- 2- LE COMPLEXE DE RÉPARATION (DNAPKcs et complexe de ligation) est ensuite recruté

# DEUX VOIES DE RÉPARATION NHEJ : CLASSIQUE ET ALTERNATIVE

Audebert et al. J Biol. Chem 2004  
 Audebert et al. J Mol Biol. 2006  
 Cheng et al. Nucleic Acids Res. 2011



## ✓ RÉPARATION DES CASSURES DOUBLE BRINS DE L'ADN

- RECOMBINAISON HOMOLOGUE
- RECOMBINAISON NON HOMOLOGUE (NHEJ) CLASSIQUE ET ALTERNATIVE

## ✓ INHIBITION DE LA RÉPARATION DES CASSURES

- VOIE NHEJ : CHIMIOTHÉRAPIE ADJUVANTE
  - 1<sup>er</sup> Complexe
  - 2<sup>ème</sup> Complexe
- LA POLY-ADP-RIBOSE POLYMÉRASE (PARP-1) :  
UNE AVANCÉE EN MONOCHIMIOTHÉRAPIE

## ✓ DISCUSSION ET PERSPECTIVES

# INHIBITEURS DE L'ACTIVITÉ KINASE : CRIBLAGE AVEC LA TECHNOLOGIE ALPHASCREEN

*Collaboration Inst. Rech. P. Fabre*

**35 000 extraits de plantes**



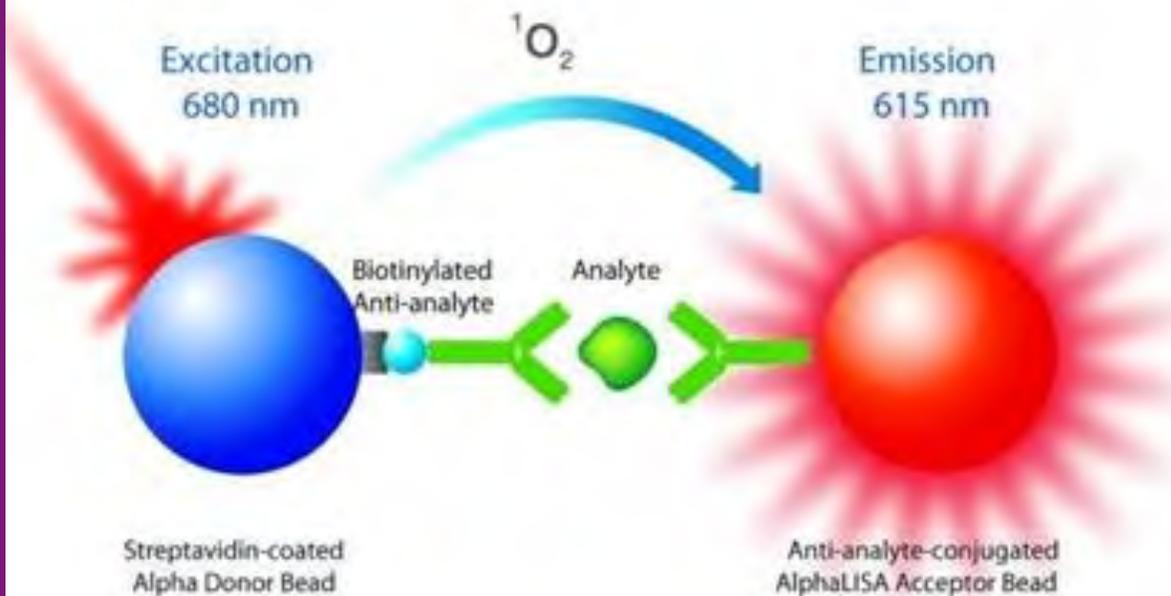
**17 (20) positifs**



**Purification guidée des mélanges  
obtention d'un seul composé actif**



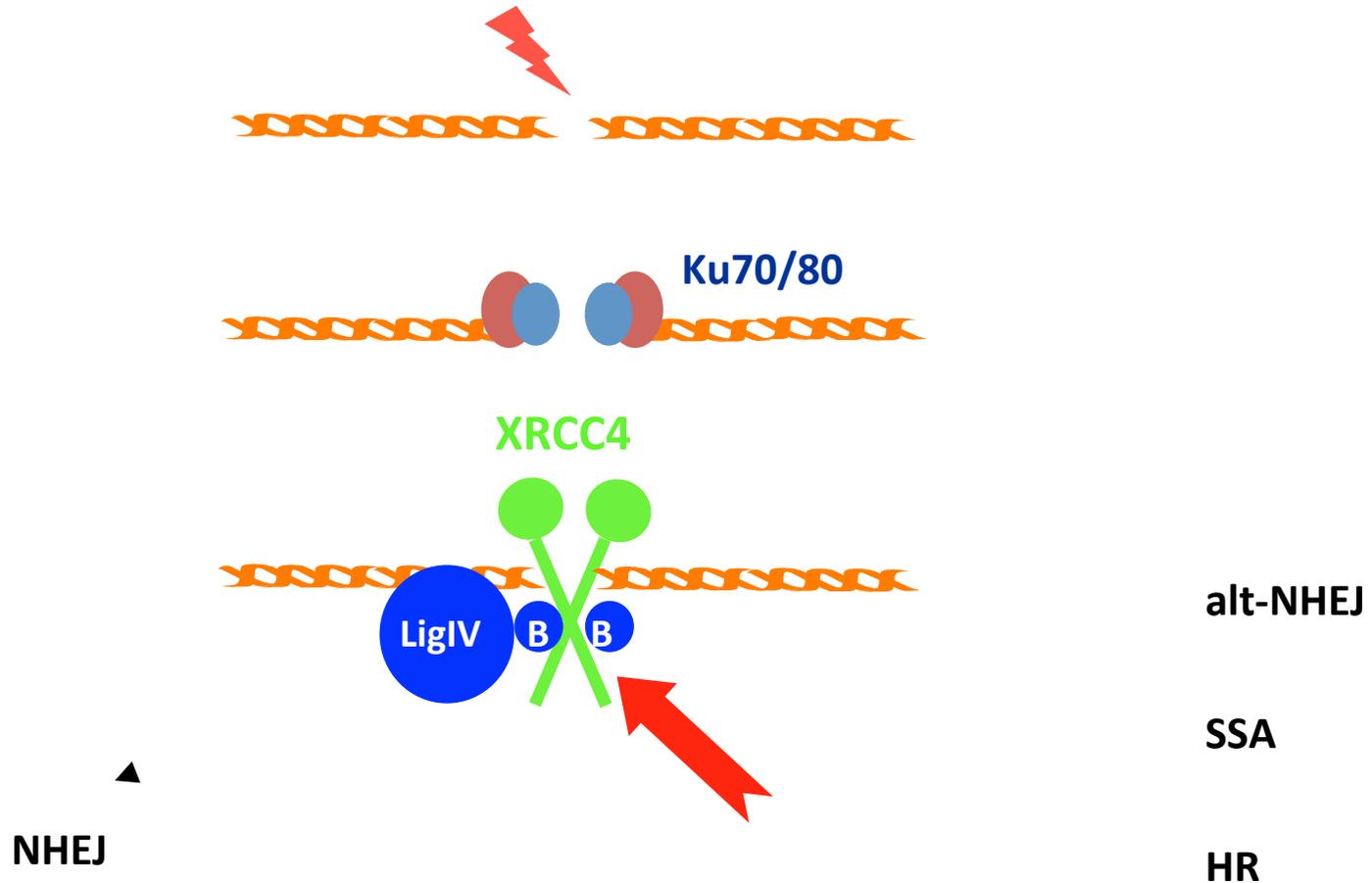
**2 composés évalués:  
effet inhibiteur > 100 µM**



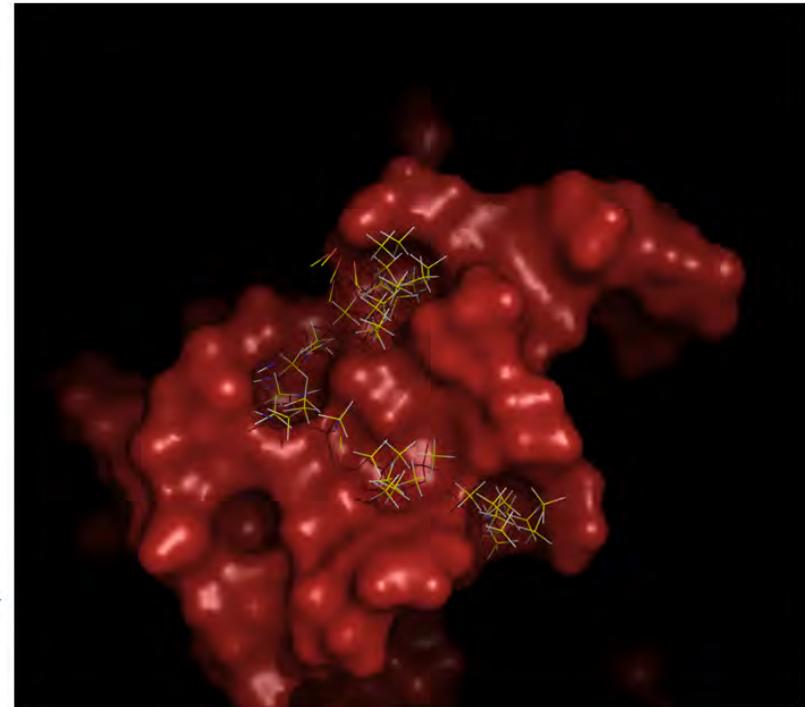
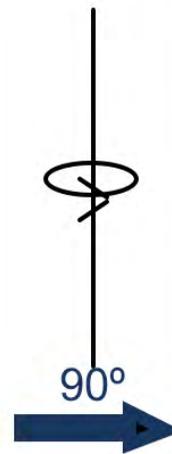
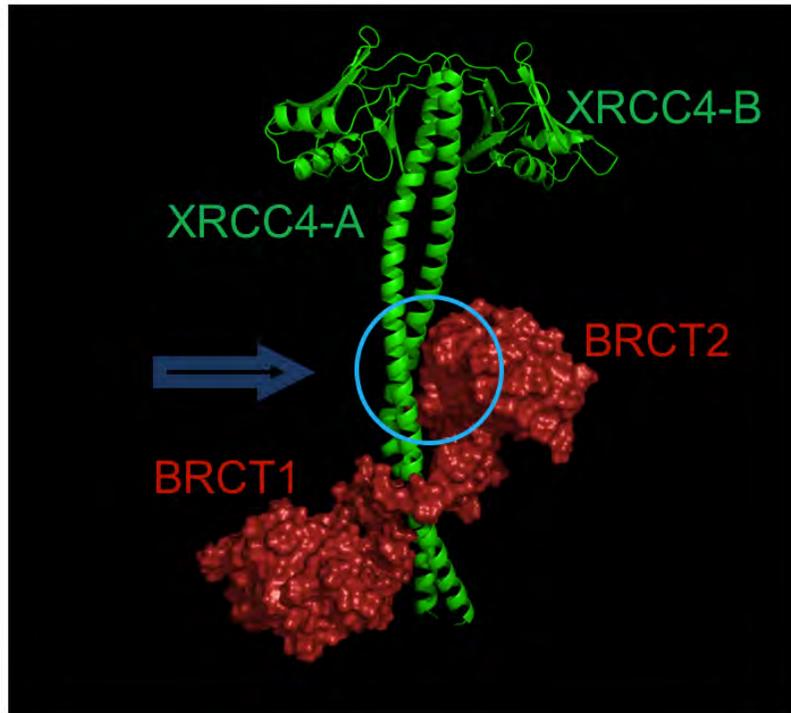
Biotin-peptide(p53)  
anti P-Ser(15)p53 antibody

**KUDOS : NU7441**

# INTÉRÊT POUR DES INHIBITEURS DU COMPLEXE DE LIGATURE

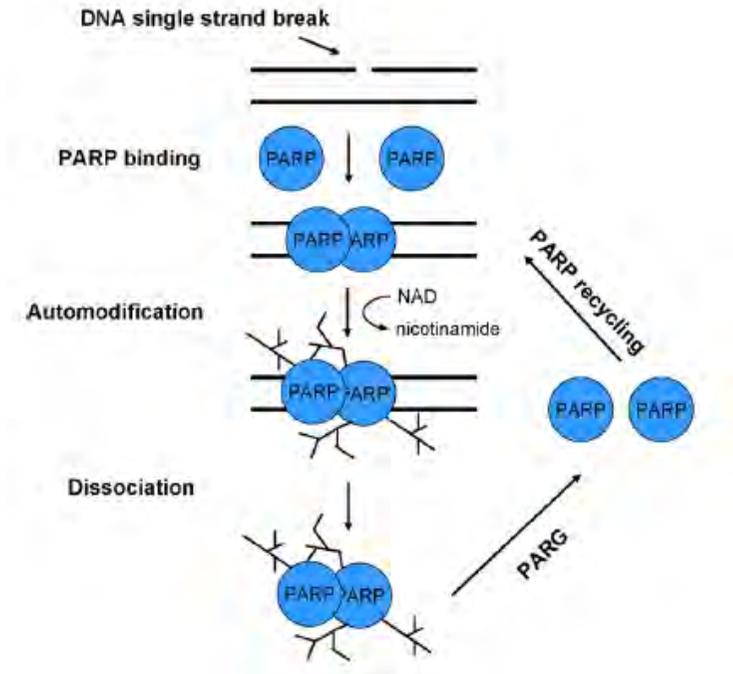


# RECHERCHE D'INHIBITEURS D'INTERACTION XRCC4 / LIG IV



# INHIBITEURS DE LA POLY-ADP-RIBOSE POLYMERASE

Drug	Company	Biophysical parameters	Synergizes with ( <i>in vitro</i> )	Clinical trials*	Phase*
ABT-888	Abbott	$K_i = 5.2$ nM (PARP1) $K_i = 2.9$ nM (PARP2) $EC_{50} = 2$ nM (C41 cells)	Temozolomide Platins Cyclophosphamide Ionizing radiation MNGG Topoisomerase I poisons	Glioblastoma multiforme (with temozolomide)  Solid tumours and leukaemia (various combinations)  BRCA1- or BRCA2-mutant tumours	Phase II  Phase I  Phase I
AG014699	Pfizer	$K_i = 1.4$ nM (PARP1)	Temozolomide Ionizing radiation Topotecan	BRCA1- or BRCA2-mutant tumours	Phase II
AZD2281 (olaparib)	AstraZeneca	$IC_{50} = 5$ nM (PARP1) $IC_{50} = 1$ nM (PARP2) $IC_{50} = 1.5$ $\mu$ M (tankyrase 1)	Temozolomide Platins MMS Ionizing radiation (with and without 17-AAG)	Platin-sensitive ovarian cancer  BRCA1- or BRCA2-mutant tumours (with carboplatin)  Triple-negative breast cancer (single-agent or with carboplatin)  Other solid tumours	Phase II  Phase II  Phase II  Phase I/II
BSI-201	Sanofi-Aventis	ND	Ionizing radiation Oxaliplatin Gemcitabine and carboplatin Topotecan	Triple-negative breast cancer (with gemcitabine and carboplatin)  Ovarian cancer, glioblastoma multiforme and uterine cancer (various combinations)  BRCA2-mutant pancreatic cancer (various combinations)  Other solid tumours	Phase III  Phase II  Phase Ib  Phase I/II
CEP-8983/ CEP-9722 (prodrug)	Cephalon	$IC_{50} = 20$ nM (PARP1) $IC_{50} = 6$ nM (PARP2)	Temozolomide Topoisomerase I poisons	Solid tumours (with temozolomide)	Phase I
MK-4827	Merck	$IC_{50} = 3.2$ nM (PARP1) $IC_{50} = 4$ nM (PARP2)		Solid tumours and ovarian cancer	Phase I



**EFFICACITÉ D'UNE MONOTHÉRAPIE AVEC DES INHIBITEURS DE PARP-1 POUR DES TUMEURS MUTÉES DANS LES GÈNES BRCA1/2**



**LETALITÉ SYNTHÉTIQUE**

- Inhibiteurs d'activité de réparation : des agents en phase I/II/III
- Sensibilisation dans le cadre d'un traitement adjuvant : toxicité
- Altération des activités de réparation des lésions : mutations, hypoxie
- La cellule tumorale, objet d'étude du pharmacologue
- Intérêt des inhibiteurs de la voie NHEJ en radiothérapie : inhibition c-NHEJ mais effet sur alt-NHEJ?
- Etape de ligature: une cible d'intérêt en thérapeutique adjuvante à la radiothérapie?
- Effet en monochimiothérapie dans un contexte de déficit en réparation : inhibiteurs PARP-1 et tumeurs BRCA1/2 mutées