



**HAL**  
open science

# Etude du rôle du corégulateur transcriptionnel RIP140 dans le contrôle de l'instabilité microsatellitaire des cancers colorectaux héréditaires

Pascale Palassin

► **To cite this version:**

Pascale Palassin. Etude du rôle du corégulateur transcriptionnel RIP140 dans le contrôle de l'instabilité microsatellitaire des cancers colorectaux héréditaires. Cancer. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT054 . tel-01976395

**HAL Id: tel-01976395**

**<https://theses.hal.science/tel-01976395>**

Submitted on 10 Jan 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

**En Sciences Biologiques pour la Santé**

**École doctorale CBS2**

**Unité de recherche INSERM U1194**

## **Etude du rôle du corégulateur transcriptionnel RIP140 dans le contrôle de l'instabilité microsatellitaire des cancers colorectaux héréditaires**

**Présentée par Pascale PALASSIN  
le 24 novembre 2017**

**sous la direction de Stéphane JALAGUIER**

**Devant le jury composé de**

**Simon GALAS**, PU, Université Montpellier, Institut des Biomolécules Max Mousseron

**Alex DUVAL**, DR, Centre De Recherche Saint-Antoine INSERM UMR S 938

**Sylviane OLSCHWANG**, PU-PH, Aix-Marseille Université, CHU Marseille, INSERM UMR S 910

**David TOUGERON**, PU-PH, Université Poitiers, EA 4331, CHU Poitiers

**Stéphane JALAGUIER**, CR, IRCM, INSERM U1194

**Audrey CASTET-NICOLAS**, MCU-PH, Université Montpellier, CHU Montpellier, INSERM U1194

**Vincent CAVAILLES**, DR, IRCM, INSERM U1194

**Président**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Directeur de thèse**

**Co-directeur de thèse**

**Co-directeur de thèse**



**UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER**

## REMERCIEMENTS

Je tiens ici à remercier toutes les personnes sans qui cette thèse n'aurait pu être possible.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Madame le Docteur **Sylviane Olschwang** et Monsieur le Docteur **Alex Duval**, je vous remercie tout particulièrement d'avoir pris le temps de lire, corriger et évaluer ce travail. Vos qualités scientifiques et médicales respectives vous précèdent et votre présence dans ce jury m'honore.

Monsieur le Docteur **Simon Galas**, vous avez accompagné mes premiers pas dans la recherche et vous présidez la concrétisation de ce parcours. Je vous suis sincèrement reconnaissante d'avoir accepté de présider ce jury.

Monsieur le Docteur **David Tougeron**, je vous remercie de participer à ce jury en qualité d'examineur. Votre expertise clinique dans le domaine d'étude honore ce travail.

Je tiens ensuite à adresser mes remerciements à ceux qui ont encadré mes travaux de thèse.

**Stéphan**, je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse. Tes qualités scientifiques, pédagogiques et linguistiques m'ont toutes été du plus grand secours, à chaque étape de ce travail. J'ose encore croire que la persévérance vient à bout de tout.

**Audrey**, tu es à l'origine de ma venue dans ce laboratoire de recherche qui a permis la réalisation de ce travail et un pas de plus vers mon objectif. Je te remercie de ton attention, de ton soutien et de ta confiance.

**Vincent**, tu as largement contribué à la direction de ce travail. Ta clairvoyance scientifique force toujours mon respect et je te remercie d'avoir pris le temps de la partager.

Je souhaite remercier sincèrement les Docteurs **Jean-Sébastien Hoffmann** et **Philippe Pourquoi** d'avoir suivi et encouragé la progression de ce travail en qualité de membres du comité de suivi de thèse.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres de l'équipe SHeC qui ont contribué à rendre ces années de travail si agréables !

**Cathynou**, tu vois, ce n'était qu'une question d'organisation ! Je te remercie pour tes conseils, ta patience, ta lucidité et ton amitié.

**Marion**, merci, merci ! Chose promise, chose due ! Je te dois beaucoup et je te remercie d'avoir accepté de répondre à mes (trop) nombreuses sollicitations !

**Sandrine**, Sandrinou !!! Si aucun filtre ne me limitait, je dirais que tu es un peu ma « maman » du labo ! Merci d'avoir toujours su être là quand il le fallait.

**Abdel**, je te remercie pour tous tes conseils, ta patience et ta présence, voilà au moins des choses qui n'ont pas servi à rien !

**Nour** et **Mouna**, mes co-doctorantes, que de rires et de pleurs partagés ! Je ne vous souhaite que le meilleur pour la suite !

L'amitié est irremplaçable. Je tiens à remercier mes amis qui ont toujours été présents. Je retire beaucoup de fierté, de bonheur et de joie de vivre de vous avoir comme amis. Je pense particulièrement à **Marine, Lolotte, Adeline, Noémie, Fabrice, Jérémy, Ben, Stéphan, Inès, ainsi qu'à la famille Constans dans son intégralité.**

Que ma **mère** et mon **frère** reçoivent également tous les remerciements qu'ils méritent. Je sais que pour vous ce qui compte le plus c'est que je sois heureuse et vous y contribuez ! **Victor**, oserais-je te dire que je ne suis pas sûre d'en avoir fini avec les exams...

Enfin, **Olivier**, cette thèse te revient quasiment autant qu'à moi. Tu m'as permis de franchir les deux dernières années, jalonnées de multiples difficultés, dans l'amour et le plus de sérénité « possible ». Cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui sans toi. Merci.

## **PREAMBULE**

Le cancer colorectal est une problématique majeure de santé publique dont les voies moléculaires de la tumorigenèse sont connues depuis de nombreuses années. Les données s'accumulent, les technologies progressent et les questions, bien que différentes, sont toujours aussi nombreuses. Les formes familiales, minoritaires, représentent un intérêt scientifique majeur par les signatures génétiques qu'elles permettent de mettre en évidence. L'histoire du syndrome de Lynch que nous aborderons dans ce manuscrit illustre la nécessité de transfert entre les observations cliniques et les recherches fondamentales.

L'équipe Signalisation Hormonale et Cancer, dirigée par le docteur Vincent Cavallès, s'intéresse à la régulation transcriptionnelle impliquée dans les pathologies cancéreuses, notamment digestives. Le corégulateur transcriptionnel RIP140 est aujourd'hui connu pour être un facteur de bon pronostic des cancers colorectaux sporadiques. Ce travail étudie le rôle de ce corégulateur dans la problématique des cancers colorectaux familiaux, de la réparation de l'ADN et du syndrome de Lynch. Ce projet a été financé pendant deux ans par l'INCa dans le cadre d'un «Soutien à la formation à la recherche translationnelle en cancérologie» du Plan Cancer 2014-2019. La troisième année a été supportée par l'ARS Occitanie dans le cadre d'un contrat d'«Année de recherche» de l'internat en pharmacie.

Après une introduction permettant un aperçu des contextes à la fois clinique et moléculaire du cancer colorectal, les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse seront présentés. La première partie des résultats aborde les effets du corégulateur transcriptionnel RIP140 sur un complexe majeur de la réparation de l'ADN, le complexe MutS $\alpha$ . La seconde partie s'intéresse à ses effets sur une polymérase translesionnelle particulière, Polk. Enfin, les résultats obtenus lors du développement d'outils nécessaires à ce projet seront présentés dans une troisième partie.



# TABLE DES MATIERES

<b>PREAMBULE</b> .....	<b>1</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>3</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>9</b>
<b>GLOSSAIRE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Le cancer colorectal</b> .....	<b>15</b>
1.1. Généralités .....	15
1.1.1. Epidémiologie.....	15
1.1.2. Particularités de l'épithélium colique et nomenclature .....	16
1.1.3. Facteurs de risque, dépistage et diagnostic.....	18
1.1.3.1. Facteurs de risque .....	18
1.1.3.2. Dépistage.....	19
1.1.3.3. Diagnostic .....	19
1.2. Stades et prise en charge thérapeutique .....	20
1.2.1. Stades.....	20
1.2.2. Prise en charge thérapeutique .....	22
1.2.2.1. Mécanismes d'action des molécules thérapeutiques .....	22
1.2.2.1.1. Cytotoxiques conventionnels.....	22
1.2.2.1.2. Agents de thérapie ciblée.....	23
1.2.2.2. Recommandations de traitement .....	25
1.2.2.2.1. Cancer colorectal non métastatique .....	25
1.2.2.2.2. Cancer colorectal métastatique (mCCR) .....	26
1.3. Le syndrome de Lynch.....	28
1.3.1. Définition et bases moléculaires .....	28
1.3.2. Caractéristiques et spectre du syndrome de Lynch .....	33
1.3.3. Particularités de la prise en charge et surveillance .....	36
1.3.4. Lynch Like Syndrome.....	40
<b>2. Bases moléculaires du cancer colorectal</b> .....	<b>42</b>
2.1. Caractéristiques des cellules cancéreuses.....	42
2.2. Phénotypes moléculaires d'instabilité génomique.....	44
2.2.1. Instabilité chromosomique et gènes suppresseurs de tumeur.....	45

2.2.2.	Instabilité microsatellitaire .....	46
2.2.3.	Phénomènes épigénétiques .....	49
2.3.	Voies de signalisation impliquées dans les cancers colorectaux .....	52
2.3.1.	La voie Wnt/ $\beta$ -caténine.....	53
2.3.2.	La voie du TGF $\beta$ .....	55
2.3.3.	La voie p53.....	55
2.3.4.	La voie de l'Epidermal Growth Factor (EGF) .....	56
2.3.4.1.	La voie Ras/Raf/MAPK.....	57
2.3.4.2.	La voie PI3K/AKT.....	58
2.4.	Sous-groupes moléculaires des cancers colorectaux.....	61
<b>3.</b>	<b>La réparation de l'ADN .....</b>	<b>63</b>
3.1.	O <sup>6</sup> -méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT) .....	65
3.2.	Le système de réparation par excision de base (BER) .....	66
3.3.	Le système de réparation par excision de nucléotide (NER).....	68
3.4.	Réparation des cassures double brin (DSBR) .....	69
3.4.1.	La jonction des extrémités non homologues (NHEJ) .....	70
3.4.2.	La recombinaison homologue (HR) .....	71
3.5.	Le système de réparation des mésappariements (MMR) .....	72
3.5.1.	Composition.....	72
3.5.2.	La réparation des mésappariements .....	75
3.5.3.	Fonctions non canoniques.....	78
3.5.4.	Efficacité des agents cytotoxiques et système MMR .....	80
3.5.5.	Implication dans le traitement du CCR.....	83
3.5.6.	Régulation d'expression .....	84
3.6.	Les polymérases translésionnelles (TLS) .....	86
3.6.1.	Caractéristiques des polymérases translésionnelles .....	86
3.6.2.	Fonctions.....	87
3.6.3.	Efficacité des agents cytotoxiques et TLS .....	91
3.6.4.	Régulation d'expression .....	93
<b>4.</b>	<b>Le corégulateur transcriptionnel RIP140 .....</b>	<b>95</b>
4.1.	Généralités sur les récepteurs nucléaires.....	95
4.2.	Structure et fonctions <i>in vitro</i> .....	95
4.3.	Implications physiopathologiques .....	99
4.3.1.	Métabolisme énergétique .....	100
4.3.2.	Inflammation.....	102
4.3.3.	Ovulation et développement de la glande mammaire .....	103
4.3.4.	Cognition.....	105



4.4.	Implication dans les cancers .....	106
4.4.1.	Cancers gynécologiques.....	106
4.4.2.	Cancers digestifs.....	108
4.4.2.1.	Foie .....	108
4.4.2.2.	Estomac.....	108
4.4.2.3.	Intestin et côlon .....	109
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>113</b>	
<b>RESULTATS .....</b>	<b>119</b>	
<b>1. Régulation du complexe MutSa par RIP140 et ses conséquences.....</b>	<b>119</b>	
1.1.	Introduction.....	119
1.2.	Article .....	119
1.3.	Résultats annexes.....	121
1.3.1.	Autres gènes MMR.....	121
1.3.2.	Lignées résistantes .....	122
1.3.3.	Autre niveau de dialogue entre RIP140 et le complexe MutSa .....	125
<b>2. Régulation transcriptionnelle du gène <i>POLK</i> par RIP140 .....</b>	<b>129</b>	
2.1.	Introduction.....	129
2.2.	Article .....	129
2.3.	Résultats annexes.....	131
<b>3. Développement d'outils .....</b>	<b>135</b>	
3.1.	Introduction.....	135
3.2.	Anticorps spécifique anti-RIP <sup>MSI</sup> .....	135
3.2.1.	Matériels et méthodes .....	135
3.2.2.	Résultats .....	139
3.3.	Invalidation de RIP140 par CRISPR-Cas9 .....	141
3.3.1.	Matériels et méthodes .....	142
3.3.2.	Résultats .....	143
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>147</b>	
<b>1. Mécanismes moléculaires des régulations mises en évidence .....</b>	<b>147</b>	
1.1.	Régulation transcriptionnelle des gènes MMR.....	147
1.2.	Autres mécanismes de régulation des gènes MMR .....	148
1.3.	Régulation de l'expression du gène <i>POLK</i> .....	149
<b>2. Sensibilité aux molécules cytotoxiques .....</b>	<b>150</b>	
2.1.	Limites des approches mises en œuvre .....	150

2.2.	Sensibilité aux molécules utilisées dans le traitement du CCR .....	151
2.3.	Réponse à d'autres agents cytotoxiques .....	152
<b>3.</b>	<b>Conséquences sur la stabilité du génome .....</b>	<b>153</b>
<b>4.</b>	<b>Autres effecteurs de RIP140 dans la réparation de l'ADN .....</b>	<b>154</b>
<b>5.</b>	<b>Rôle de RIP140 dans le lien entre œstrogènes, MMR et syndrome de Lynch.....</b>	<b>157</b>
5.1.	Dans le cancer colorectal .....	157
5.2.	Dans les cancers gynécologiques .....	157
<b>6.</b>	<b>La mutation RIP<sup>MSI</sup> dans les pathologies tumorales.....</b>	<b>158</b>
6.1.	Mise en évidence et pertinence clinique .....	158
6.2.	Autres moyens de détection de la mutation de RIP140 .....	159
6.3.	La mutation RIP <sup>MSI</sup> dans les cancers .....	160
6.4.	Autres altérations connues du gène <i>RIP140</i> .....	161
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>161</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>165</b>

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 Représentation schématique de la muqueuse colique.....	16
Figure 2 Anticorps monoclonaux anti-EGFR et effecteurs de la signalisation .....	24
Figure 3 Stratégies de continuité des soins du cancer colorectal métastatique .....	27
Figure 4 Implication des différentes altérations constitutionnelles des gènes MMR.....	30
Figure 5 Evénements moléculaires lors du développement d'un CCR dans le LS .....	32
Figure 6 Développement du syndrome de Lynch au niveau cellulaire.....	33
Figure 7 Modèle de susceptibilité du CCR.....	34
Figure 8 Stratégie diagnostique du syndrome de Lynch .....	37
Figure 9 Dichotomisation du HNPCC en fonction du statut MSI .....	41
Figure 10 Caractéristiques des cellules cancéreuses .....	43
Figure 11 Nombre de mutations somatiques dans les cancers humains.....	48
Figure 12 Sous-groupes de CCR en fonction des status MSI et CIMP.....	50
Figure 13 Rôle des micro-ARN dans la pathogenèse du CCR .....	51
Figure 14 Altérations génétiques et tumorigenèse colorectale .....	52
Figure 15 Représentation schématique de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine .....	54
Figure 16 Mutations des voies de signalisation en fonction du phénotype de CCR.....	59
Figure 17 Fréquence estimée des lésions de l'ADN et des mutations associées par jour.....	64
Figure 18 O <sup>6</sup> -MéthylGuanineMéthylTransférase MGMT.....	66
Figure 19 Le système de réparation par excision de base (BER) .....	67
Figure 20 Le système Nucleotide Excision Repair (NER) .....	68
Figure 21 Le système de jonction des extrémités non homologues (NHEJ) .....	70
Figure 22 Le système MMR reconstitué.....	76
Figure 23 Structure d'ADN non-B .....	89
Figure 24 Fonctions non canoniques des TLS de la famille Y .....	90
Figure 25 Facteurs impliqués dans la régulation d'expression des polymérase .....	94
Figure 26 Domaines répresseurs de RIP140 .....	96
Figure 27 Modifications post-traductionnelles de RIP140.....	97
Figure 28 Gènes cible régulés par RIP140 et fonctions associées.....	99
Figure 29 Rôle de RIP140 dans le tissu adipeux.....	101
Figure 30 Expansion du cumulus oosphorus nécessaire à l'ovulation.....	103
Figure 31 Importance de RIP140 dans le développement de la glande mammaire .....	104
Figure 32 Signalisation nucléaire de RIP140 dans différents cancers .....	110
Figure 33 Effet de RIP140 sur l'expression de MSH3, PMS2 et MLH1 .....	121
Figure 34 Expression de MSH2 et MSH6 dans des clones HCT116 résistants au SN38 .....	123
Figure 35 Courbes dose réponse de cellules HT29 résistantes au SN38.....	124

Figure 36 Expression des gènes RIP140 et MMR au sein de cellules HT29 résistantes au SN38.	124
Figure 37 Proximité de localisation nucléaire de RIP140 avec les protéines MSH2 et MSH6....	125
Figure 38 Courbes dose réponse des HCT116 CTRL et p53KO au 5-FU et au SN38.....	131
Figure 39 Régulation de l'expression de p53 par RIP140 dans différents modèles cellulaires.	132
Figure 40 Protéines de fusion à la GST .....	136
Figure 41 Processus de sélection des phages et production d'anticorps .....	137
Figure 42 Sélection des scFv anti-RIP140 et anti-RIP <sup>MSI</sup> .....	138
Figure 43 Caractérisation des scFv-Fc en Western Blot des protéines fusionnées à la GST.....	139
Figure 44 Caractérisation des scFv-Fc en immunofluorescence .....	140
Figure 45 Séquence codante du gène RIP140 et positionnement des ARN guide.....	142
Figure 46 Validation d'un clone par séquençage .....	143
Figure 47 Caractérisation d'un clone généré par CRISPR-Cas9 .....	144
Figure 48 Réponse aux dommages, réparation de l'ADN et signalisation ERα .....	156
Figure 49 Mutations de RIP140 détectées dans les tumeurs de l'endomètre.....	160

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Classification TNM/AJCC du cancer colorectal.....	21
Tableau 2 Stades du cancer colorectal en fonction de la classification TNM de la tumeur....	21
Tableau 3 Critères d'Amsterdam I et II - Critères élargis de Bethesda .....	29
Tableau 4 Hétérogénéité phénotypique des cancers associés aux mutations MMR.....	31
Tableau 5 Risques cumulatifs estimés par cancer en fonction du gène MMR muté .....	35
Tableau 6 Protocole de surveillance du syndrome de Lynch.....	38
Tableau 7 Marqueurs microsatellitaires utilisés pour le diagnostic MSI du CCR .....	47
Tableau 8 Gènes impliqués dans la tumorigenèse colorectale .....	60
Tableau 9 Taxonomie du cancer colorectal.....	62
Tableau 10 Homologues humains des composants du système MMR .....	74
Tableau 11 Substances dont la cytotoxicité est dépendante du statut du système MMR .....	81
Tableau 12 Fonctions connues des polymérases de la famille Y .....	91
Tableau 13 Caractéristiques des clones HCT116 sensibles et résistants au SN38.....	122
Tableau 14 Résultats de séquençage des clones et phénotypes associés .....	143



## GLOSSAIRE DES ABREVIATIONS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ANSM	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire et des produits de santé
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATP	Adénosine TriPhosphate
BER	Base Excision Repair
CCR	Cancer ColoRectal
CK1 $\alpha$	Casein Kinase 1 $\alpha$
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomal INstability
CtBP	C-terminal Binding Protein
DSBR	Double Strand Break Repair
DFS	Disease Free Survival
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EXO1	Exonuclease 1
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
5FU	5-Fluoro-Uracile
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$
HAS	Haute Autorité de Santé
HDAC	Histone Deacetylase
HNPCC	Hereditary Non Polyposis Colon Cancer
hMLH1	human MutL Homologue n°1
hMSH2	human MutS Homologue n°2
hMSH6	human MutS Homologue n°6
hPMS1	Post-Meiotic Segregation 1
hPMS2	Post-Meiotic Segregation 2
HR	Homologous Recombination
ICM	Institut régional du Cancer de Montpellier
IDL	Insertion Deletion Loop
IHC	Immunohistochimie
INCa	Institut National du Cancer
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IRCM	Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogen Homolog
LDL	Low Density Lipoprotein
LEF	Lymphoid Enhanced Factor
LLS	Lynch Like Syndrom
LOH	Loss Of Heterozygosity
LRP	LDL-Related Protein
MAP	MUTYH Associated Polyposis
MMR	Mismatch Repair
MSI	MicroSatellite Instability
MSI-H	Microsatellite Instability-High
MSS	MicroSatellite Stability
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NER	Nucleotide Excision Repair
NRIP1	Nuclear Receptor Interacting Protein 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OS	Overall Survival
PFS	Progression Free Survival
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RFC	Replication Factor C
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RF	Resistance Factor
RIP140	Receptor Interacting Protein of 140 kDa
RPA	Replication Protein A
RT	Reverse Transcription
SSA	Single Strand Annealing
TCF	T-Cell Factor
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor beta
TP53	Tumor Protein 53
UTR	UnTranslated Region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor



# INTRODUCTION



# INTRODUCTION

## 1. Le cancer colorectal

### 1.1. Généralités

#### 1.1.1. Epidémiologie

Le cancer colorectal est une pathologie hétérogène causée par des facteurs génétiques et environnementaux. Il s'agit du troisième cancer le plus fréquent en France et dans le monde. L'incidence est estimée à 43 068 nouveaux cas par an en France. Il est le deuxième cancer le plus fréquent chez la femme, après le cancer du sein et le troisième chez l'homme, après ceux du poumon et de la prostate (Ferlay et al., 2015). Il représente la deuxième cause de mortalité par cancer avec 17 833 décès estimés en 2015. Le taux de survie à 5 ans du cancer colorectal, tous stades confondus, est estimé à 63%. Cependant cette survie à 5 ans n'est plus que de 13% lors d'un diagnostic au stade IV, métastatique. L'âge médian au moment du diagnostic est de 71 ans pour les hommes et 75 ans pour les femmes (INCa).

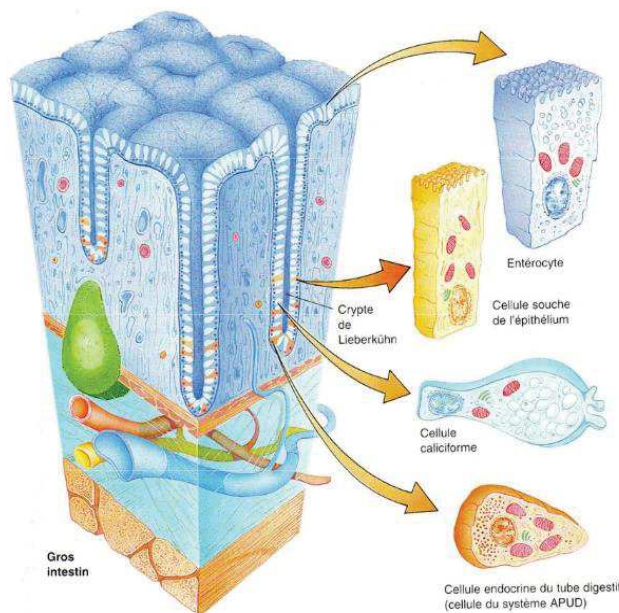
Le risque accru de ce cancer s'explique notamment par l'exposition réitérée de cet organe à de nombreuses substances toxiques, mais aussi par l'importante capacité de renouvellement de l'épithélium colique, où les tumeurs se développent dans 65% des cas. Elles affectent l'épithélium rectal dans 35% des cas.

Bien que les formes sporadiques soient les plus fréquentes, environ 15% des cancers colorectaux surviennent dans un contexte familial. Dans ce contexte, les formes héréditaires avec une mutation germinale identifiée ne représentent que 2 à 5% de tous les cancers colorectaux, dont la polypose adénomateuse familiale (FAP) et le syndrome de Lynch sont les plus fréquents (respectivement 1% et 2 à 3%) (Jasperson et al., 2010). La FAP se caractérise par le développement de milliers de polypes adénomateux qui évoluent en cancer colorectal en l'absence de traitement. Elle est due à une mutation germinale autosomique dominante du gène *APC* (Bisgaard et al., 1994), même s'il existe des formes dues à des mutations *de novo* (Zeichner et al., 2012). Il existe une forme atténuée (AFAP *Attenuated Familial Adenomatous Polyposis*) qui se caractérise par un nombre réduit de polypes (10 à 100) apparaissant à un âge plus tardif avec un risque de cancérisation diminué (Knudsen, 2003). La polypose associée à *MUTYH* (MAP) ressemble cliniquement à l'AFAP, sans mutation du gène *APC*, mais présente une mutation germinale biallélique du gène *MUTYH* impliqué dans le système de réparation de l'ADN *Base Excision Repair* (BER) (Win et al., 2014).

La dénomination de cancer héréditaire non polyposique peut correspondre, selon l'acception prédominante, au syndrome de Lynch. Cette pathologie est due à une première mutation germinale autosomique dominante d'un des gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN, le système *Mismatch repair* (MMR). Cette première mutation est suivie, au cours de la vie, d'une mutation somatique du second allèle conduisant à la perte totale d'expression de la protéine MMR concernée. Cette perte d'expression entraîne un dysfonctionnement global du système avec pour principale conséquence l'instabilité des régions microsatellites qui caractérise le syndrome de Lynch (Sehgal et al., 2014).

### 1.1.2. Particularités de l'épithélium colique et nomenclature

A la différence de l'intestin, l'épithélium de surface du côlon ne présente pas de microvillosités. L'épithélium est principalement constitué de cellules caliciformes, d'entérocytes et de cellules indifférenciées (Figure 1) (Booth and Potten, 2000). Les cellules caliciformes, cellules glandulaires à sécrétion muqueuse, lubrifient le tube digestif. Cet ensemble cellulaire définit un épithélium monostratifié, prismatique simple, dépourvu de cellules de Paneth, connues au sein de l'épithélium intestinal pour sécréter des agents antimicrobiens, tels que les défensines ou le lysozyme.



**Figure 1 Représentation schématique de la muqueuse colique**  
(Booth and Potten, 2000)

L'ensemble formé par l'épithélium invaginé et le chorion représente l'unité fonctionnelle du côlon, les glandes ou cryptes de Lieberkühn qui sont des glandes séro-muqueuses, tubuleuses droites s'ouvrant entre les villosités intestinales. Le côlon adulte contient 107 cryptes qui se composent chacune de 1000 à 4000 cellules. Une crypte et sa villosité associée constituent la plus petite unité d'auto-renouvellement de l'épithélium. La durée de vie des entérocytes et des cellules caliciformes est de 5 jours. L'épithélium colorectal humain se renouvelle intégralement tous les 2 à 3 jours (Okamoto and Watanabe, 2004). Le renouvellement résulte de la multiplication et de la différenciation des cellules souches situées à la base des glandes de Lieberkühn. L'élimination des cellules en fin de vie se fait par desquamation apicale. Le fort potentiel réplcatif de l'épithélium intestinal explique en partie le risque accru de mutations potentielles et de développement de cancer.

La nomenclature des tumeurs dépend de leur nature histologique. Dans le cadre du cancer colorectal, le tissu d'origine concerné est un tissu épithélial glandulaire. La tumeur bénigne qui peut se développer sera alors nommée adénome (*adenos* signifie glande et désigne une tumeur glandulaire). Le terme de polype regroupe l'ensemble des tumeurs bénignes qui apparaissent en surface de la paroi du côlon ou du rectum. Les polypes peuvent être plans, sessiles ou encore pédiculés. Seuls les polypes adénomateux évoluent en cancer et tout adénome bénin est une dysplasie de bas grade, dont la prévalence est de 30% à partir de 65 ans. Ils résultent de la prolifération des cellules des glandes de Lieberkühn. La polypose correspond à un nombre de polypes supérieur à 10. Le risque de cancer augmente avec le nombre, la taille (>1cm) et la composante villeuse des polypes. Le terme carcinome désigne, quant à lui, la tumeur épithéliale maligne. A l'inverse des tumeurs bénignes, elles sont mal délimitées, peu différenciées, elles présentent une croissance rapide et sont capables d'envahir des tissus à distance. Le stade de carcinome *in situ* ne se mentionne que dans le cas d'épithéliums séparés du tissu conjonctif par une membrane basale distincte. Les cancers colorectaux se développent dans 15% des cas au niveau du côlon ascendant, au niveau du côlon transverse dans 8% des cas et au niveau du côlon descendant dans 13% des cas.

### **1.1.3. Facteurs de risque, dépistage et diagnostic**

#### **1.1.3.1. Facteurs de risque**

La répartition géographique mondiale des cancers colorectaux illustre l'importance du mode de vie « occidental » dans la prévalence de ces cancers. En effet, une part des facteurs de risque sont inhérents à la personne et à son histoire familiale, tels que l'âge, les antécédents de polypes coliques, de cancer colorectal ou encore de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Néanmoins, les facteurs environnementaux comme l'alimentation, le tabagisme (Liang et al., 2009), la consommation d'alcool (Fedirko et al., 2011) et la sédentarité sont des facteurs de risque majeurs (Brenner et al., 2013). L'obésité, le diabète, une consommation excessive de viande rouge et une alimentation trop riche en graisses en font partie (Chan et al., 2011; Ma et al., 2013). L'alimentation peut également être, dans une moindre mesure, source de facteurs protecteurs lorsqu'elle est riche en fruits et légumes, en fibres et en produits frais (Aune et al., 2011). Le risque de développer un cancer colorectal est inversement associé à la prise ou au taux de vitamine D dans le sang, même si le mécanisme de cet effet protecteur n'est pas clairement défini (Ma et al., 2011). L'exercice physique régulier diminue le risque de cancer colorectal de 40%, indépendamment de l'indice de masse corporelle (IMC) (Boyle et al., 2012; Renehan et al., 2008). Certains médicaments ont été étudiés pour leur rôle potentiel dans la prévention du cancer colorectal. L'utilisation régulière d'acide salicylique (ASA) et d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est associée à une diminution du risque de CCR (Chan et al., 2008). En revanche, des études ont montré l'absence de bénéfice significatif des statines dans la prévention du CCR (Vasen et al., 2013).

L'ensemble des facteurs de risque permet de définir trois niveaux de risque de développer un cancer colorectal.

- Un niveau de risque très élevé concerne les personnes atteintes de formes familiales, liées à une prédisposition génétique, comme le cancer colorectal héréditaire non-polyposique (HNPCC) ou la polypose adénomateuse familiale (FAP).
- Le niveau de risque élevé est défini par un antécédent personnel d'adénome ou de cancer colorectal, un antécédent familial au premier degré de cancer colorectal ou d'adénome de plus de 1 cm avant 65 ans, deux ou plusieurs antécédents familiaux au premier degré de cancer colorectal ou encore une maladie inflammatoire chronique, telles que la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn.
- Le niveau de risque modéré concerne tous les individus âgés de plus de 50 ans.

### **1.1.3.2. Dépistage**

Un programme de dépistage national a été généralisé en 2009 et concerne les individus asymptomatiques qui présentent un risque modéré de développer un cancer colorectal, soit tout individu âgé de plus de 50 ans. Une évaluation de leur éligibilité à ce dépistage qui correspond à une recherche de sang occulte dans les selles est effectuée par le médecin traitant. Depuis 2015 le dépistage a évolué vers un test immunologique, plus sensible, qui nécessite moins d'échantillons de selles (1 contre 6 avec le précédent test au gaïac) (Guittet et al., 2009). Cette nouvelle procédure de dépistage se veut ainsi moins contraignante à mettre en œuvre et a pour objectif d'améliorer le niveau de participation. Car pour réduire de 15 à 18% le taux de mortalité induite par ce cancer, le taux de participation au dépistage doit excéder les 50%. Il était de 29,3% en 2015-2016 (INCa, 2017). En cas de positivité au test de dépistage, une coloscopie est prescrite (4,5% des cas). Dans le cas contraire, le patient est invité à réitérer le dépistage deux ans plus tard.

### **1.1.3.3. Diagnostic**

Certains symptômes, en dehors de la détection d'une masse abdominale et du dépistage, peuvent évoquer l'éventualité d'un cancer colorectal. Concernant le rectum, les rectorragies, un syndrome rectal (ténesmes, épreintes), l'alternance de diarrhées et constipation peuvent être des circonstances révélatrices. Le cancer du côlon peut se révéler par des douleurs abdominales, un trouble du transit, une anémie ferriprive sans autre cause identifiée. L'interrogatoire du patient tient une place importante afin de mettre en évidence les facteurs de risque, les antécédents personnels et familiaux, recherchés sur trois générations (HAS, 2012). La coloscopie indispensable au diagnostic, consécutive notamment à la découverte de sang occulte dans les selles, permet de visualiser la totalité du côlon et du rectum et de réaliser dans le même temps une exérèse et une biopsie des tumeurs ou polypes, dont dépendra la prise en charge thérapeutique. Cette analyse permet d'identifier le caractère malin de l'adénome excisé et de préciser le stade d'évolution du cancer.

## 1.2. Stades et prise en charge thérapeutique

### 1.2.1. Stades

Le stade se définit par l'étendue de la dissémination des cellules cancéreuses, selon trois critères :

- La taille et la profondeur de la tumeur : les cellules cancéreuses apparaissent en surface de la muqueuse et envahissent progressivement les couches plus profondes.
- Le nombre de ganglions lymphatiques atteints : ils sont localisés au niveau du tissu adipeux qui entoure le côlon et le rectum.
- Les métastases : qui signent la présence de cellules cancéreuses et le développement tumoral à distance du point initial. Les organes le plus souvent atteints sont le foie, les poumons et le péritoine.

L'ensemble de ces critères permet d'évaluer le score TNM d'une tumeur (pour *Tumor, Nodes and Metastasis*) (Tableau 1).

<b>T</b>	<b>Tumeur primitive</b>
<b>T<sub>x</sub></b>	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
<b>T<sub>0</sub></b>	Pas de signes de tumeur primitive
<b>T<sub>is</sub></b>	Tumeur <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la <i>lamina propria</i>
<b>T<sub>1</sub></b>	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
<b>T<sub>2</sub></b>	Tumeur envahissant la musculature
<b>T<sub>3</sub></b>	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péricoliques ou les tissus péricoliques et périrectaux non péritonéalisés
<b>T<sub>4</sub></b>	T <sub>4a</sub> : Tumeur perforant le péritoine viscéral
	T <sub>4b</sub> : Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures
<b>N</b>	<b>Adénopathies régionales</b>
<b>N<sub>x</sub></b>	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
<b>N<sub>0</sub></b>	Pas de métastase ganglionnaire régionale
<b>N<sub>1a</sub></b>	Métastase dans un ganglion lymphatique régional
<b>N<sub>1b</sub></b>	Métastase dans 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux



<b>N<sub>1c</sub></b>	Nodule(s) tumoraux, satellite(s), dans la sous-séreuse ou dans les tissus non-péritonéalisés péricoliques ou périrectaux sans métastase ganglionnaire régionale
<b>N<sub>2a</sub></b>	Métastases dans 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux
<b>N<sub>2b</sub></b>	Métastases dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux
<b>M</b>	<b>Métastase à distance</b>
<b>M<sub>0</sub></b>	Pas de métastase à distance
<b>M<sub>1a</sub></b>	Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s), autre que régional)
<b>M<sub>1b</sub></b>	Métastase dans plusieurs organes ou péritonéales

**Tableau 1 Classification TNM/AJCC du cancer colorectal**  
(Union internationale contre le cancer et al., 2010)

Le score TNM identifié permet de définir le stade de la tumeur (Tableau 2).

Stades	T	N	M
<b>Stade 0</b>	T <sub>is</sub>	N0	M0
<b>Stade I</b>	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
<b>Stade IIA</b>	T3	N0	M0
<b>Stade IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>Stade IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>Stade III</b>	Tous T	N1, N2	M0
	T1, T2	N1	M0
<b>Stade IIIA</b>	T1	N2a	M0
	T3, T4a	N1	M0
<b>Stade IIIB</b>	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
<b>Stade IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
<b>Stade IVC</b>	T4b	N1, N2	M0
	Tous T	Tous N	M1a
<b>Stade IVB</b>	Tous T	Tous N	M1b

**Tableau 2 Stades du cancer colorectal en fonction de la classification TNM de la tumeur**

(Union internationale contre le cancer et al., 2010)

### **1.2.2. Prise en charge thérapeutique**

La prise en charge thérapeutique est obligatoirement précédée d'un bilan pré-thérapeutique qui met en évidence les comorbidités du patient et évalue son état général, selon l'Indice de Karnofsky ou le *Performans Status* de l'OMS, ainsi que le statut nutritionnel. Il s'agit d'éléments pronostiques importants, susceptibles de modifier le suivi des recommandations. La chirurgie représente le principal traitement du cancer colorectal, seule préconisée aux stades 0, I et II, en l'absence de facteurs de risque de récurrence (Lee et al., 2012). Une radiothérapie est mise en place dans le cancer du tiers inférieur ou moyen du rectum, à titre curatif ou palliatif. La chimiothérapie adjuvante, qui permet de parfaire le traitement chirurgical, commence à être envisagée au stade II à haut risque de récurrence. En l'absence de définition consensuelle, l'*European Society of Medical Oncology* (ESMO) et l'*American Society of Clinical Oncology* (ASCO) considèrent à haut risque les lésions T4 et moins de 10 à 12 ganglions lymphatiques analysés avec des caractéristiques de haut risque (Benson et al., 2004; Labianca et al., 2013).

#### **1.2.2.1. Mécanismes d'action des molécules thérapeutiques**

##### **1.2.2.1.1. Cytotoxiques conventionnels**

Le 5-fluorouracile (5-FU) est une molécule cytostatique qui appartient à la classe des antimétabolites, les fluoropyrimidines. Par son analogie de structure avec l'uracile il bloque la synthèse de thymine (base azotée de l'ADN), inhibant ainsi la synthèse d'ADN, ce qui freine la prolifération cellulaire. Le 5-FU est un inhibiteur de la thymidilate synthase qui transforme l'uridine monophosphate en thymidine monophosphate. Il remplace l'uracile dans les molécules d'ARN (sous forme triphosphatée), entraînant des erreurs de lecture lors de la synthèse des protéines. Le sel lévogyre de l'acide folinique, le lévofolate de calcium (leucovorin), est fréquemment associé au 5-FU. Il potentialise l'inhibition de l'enzyme en stabilisant le complexe formé entre le 5-FU et la thymidilate synthase par l'augmentation du taux de folates intracellulaires (6-méthylène-tétrahydrofolate) qu'il induit. La capécitabine est un précurseur oral du 5-FU. L'enzyme terminale des réactions qui assurent sa conversion en 5-FU est la thymidine phosphorylase, présente à des taux plus importants dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains. La capécitabine permet de remplacer le 5-FU, mais ne peut être utilisée en combinaison avec les anti-EGFR.

L'oxaliplatine, sel de platine dérivé du 1,2-diaminocyclohexane, présente une activité cytostatique, anti-tumorale, liée aux ponts intra-brins et inter-brins (adduits volumineux) que

les dérivés hydratés de cette molécule sont capables de former avec l'ADN. Cela interrompt la synthèse d'ADN et induit l'apoptose.

L'irinotécan est un analogue synthétique d'un alcaloïde naturel la camptothécine (CPT-11). Le SN-38 est le métabolite actif de l'irinotécan. Il inhibe spécifiquement l'ADN topoisomérase I. Cette inhibition est spécifique de la phase S et entraîne des lésions simple brin de l'ADN qui bloquent la fourche de réplication de l'ADN et la prolifération cellulaire. Le SN38 est capable d'augmenter l'effet anti-tumoral de molécules telles que le 5-FU, le cisplatine et l'étoposide (pour revue (Panczyk, 2014)).

Le TAS-102 (LONSURF®) est une combinaison orale d'un analogue nucléotidique de la thymidine, la trifluridine et d'un inhibiteur de la thymidine phosphorylase, l'hydrochlorure de tipiracil, qui prévient la dégradation de la trifluridine et assure le maintien d'une concentration adéquate en substance active. La trifluridine est le composé cytotoxique de cette combinaison, dont la forme triphosphatée est incorporée à l'ADN assurant ses effets anti-tumoraux (Mayer et al., 2015). Il s'agit d'une nouvelle option en dernière ligne pour les patients qui présentent une maladie évolutive après avoir reçu tous les traitements possibles et disponibles.

#### **1.2.2.1.2. Agents de thérapie ciblée**

##### **- Anti-VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) :**

Le bévacizumab (AVASTIN®) est un anticorps monoclonal partiellement humanisé qui cible spécifiquement le VEGF-A circulant, auquel il se lie. Il diminue la néoangiogenèse propre à la croissance tumorale. Le bevacizumab augmente l'activité du FOLFIRI et des bolus de LV5FU ou encore de la capécitabine seule, en termes de taux de réponse, d'absence de progression et de survie globale (Kabbinar et al., 2008). Cependant son efficacité est diminuée chez les patients dont les tumeurs présentent des mutations acquises du gène KRAS (Hurwitz et al., 2009). Le bévacizumab n'est pas recommandé en monothérapie.

L'aflibercept (EYLEA®) est une protéine de fusion recombinante qui contient des fragments de liaison au VEGF provenant des domaines extracellulaires des récepteurs VEGF humains 1 et 2, fusionnés au fragment Fc de l'IgG1 humaine. Cette protéine de fusion bloque l'activité du VEGF-A et B en se comportant comme un récepteur soluble de haute affinité qui piège les ligands, empêchant leur liaison aux récepteurs endogènes et bloquant la signalisation d'aval. L'aflibercept améliore la survie globale lorsqu'il est associé au FOLFIRI (Van Cutsem et al., 2012).

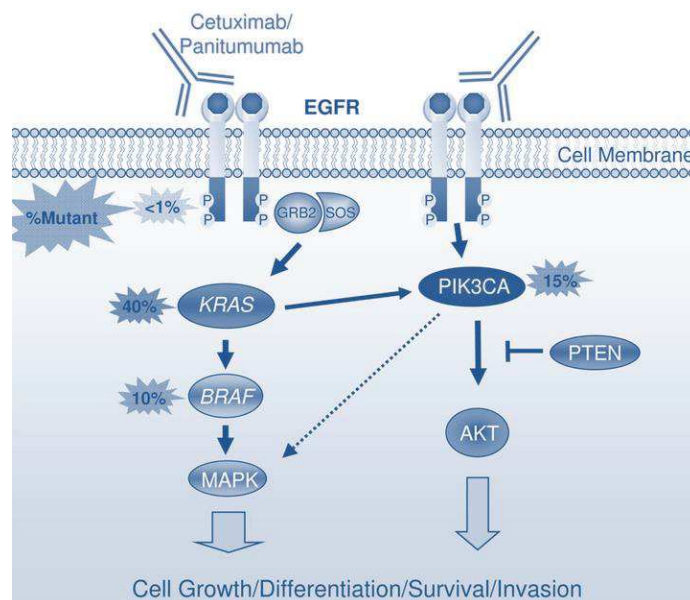
Le ramucirumab (CYRAMZA®) est un anticorps monoclonal entièrement humanisé (IgG-1), qui se lie avec une haute affinité au domaine extracellulaire du VEGFR-2, ce qui

empêche la liaison des ligands naturels du VEGFR et son activation. Cet anticorps monoclonal a montré son avantage en termes de survie globale lorsqu'il est associé au FOLFIRI en seconde ligne de traitement (Tabernero et al., 2015).

- Anti-EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) :

Le cétuximab (ERBITUX®) est un anticorps monoclonal chimérique spécifiquement dirigé contre le récepteur de l'EGF. L'affinité de cet anticorps pour l'EGFR est 5 à 10 fois supérieure à celle des ligands endogènes et en bloque ainsi la liaison et l'activation des voies de signalisation en aval (RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT, cf. section 2.3.4). Ces voies de signalisation sont impliquées dans la croissance tumorale, contrôlant différents paramètres cellulaires tels que la prolifération. Les mutations activatrices, indépendantes des signaux de l'EGFR, de KRAS et de BRAF inhibent la réponse au cétuximab des tumeurs présentant ces mutations acquises. Ces observations en font des marqueurs prédictifs de l'efficacité de ces traitements (Van Cutsem et al., 2011) (Figure 2).

Le panitumumab (VECTIBIX®) est un anticorps entièrement humanisé qui se lie spécifiquement et avec une grande affinité au domaine de liaison des ligands naturels de l'EGFR. Cela inhibe son activation par autophosphorylation. Le mécanisme d'action étant le même que celui du cétuximab, le statut de KRAS devra être étudié (Douillard et al., 2010).



**Figure 2 Anticorps monoclonaux anti-EGFR et effecteurs de la signalisation**  
Adapté de (Pritchard and al, 2011)

Ces molécules ont fourni la preuve de leur efficacité en augmentant l'activité cytotoxique du doublet FOLFOX, mais pas de l'oxaliplatine seul (Douillard et al., 2013; Maughan et al.,

2011). Cependant elles ne sont efficaces que chez une minorité de patients, en l'absence de mutation acquises des gènes KRAS et BRAF. Elles sont généralement bien tolérées, malgré des effets indésirables (rashes cutanés, des nausées et diarrhées) et représentent un coût considérable dans la prise en charge thérapeutique. Une méta-analyse réalisée sur 22 études cliniques a montré l'intérêt d'une analyse étendue des mutations potentielles des gènes KRAS, NRAS et BRAF ainsi que la fonctionnalité de la protéine PTEN, comme biomarqueurs pronostiques du bénéfice escompté des traitements anti-EGFR (Therkildsen et al., 2014). Il n'existe à ce jour pas de preuve de supériorité entre un traitement (anti-VEGF versus anti-EGFR) et un autre (Van Cutsem et al., 2016).

Le Regorafenib (STIVARGA®) est un inhibiteur oral récent de plusieurs kinases impliquées dans le développement et la progression du cancer colorectal, notamment celles impliquées dans l'angiogenèse tumorale (VEGFR1, 2, 3, TIE2), l'oncogenèse (KIT, RET, RAF1, BRAF et BRAF<sup>V600E</sup>) et le micro-environnement (PDGFR et FGFR). Ce traitement améliore modestement (1 mois) la survie globale par rapport à un placebo et présente des effets indésirables non négligeables. Il offre cependant une option supplémentaire de traitement chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique dont la pathologie a progressé malgré toutes les lignes de traitement et qui présentent encore un état général correct (Grothey et al., 2013).

### **1.2.2.2. Recommandations de traitement**

#### **1.2.2.2.1. Cancer colorectal non métastatique**

La chimiothérapie adjuvante recommandée à la suite du traitement chirurgical au stade III (tout T, N1-N2, M0) et du stade II à haut risque, associe le 5-fluorouracile (5-FU), l'acide folinique (métabolite actif de l'acide folique) et l'oxaliplatine dans le protocole FOLFOX (mFOLFOX6). Un autre schéma allie la capécitabine avec l'oxaliplatine (CAPOX). Ces deux schémas ont démontré leur efficacité en augmentant la survie en l'absence de maladie (DFS, *Disease Free Survival*) à 3 ans de 7% et de 4,4% respectivement, en comparaison au traitement par 5-fluorouracile et acide folinique seuls (Haller et al., 2011), y compris chez les patients dont les tumeurs présentent une mutation du gène *BRAF* (André et al., 2015). Quand l'adjonction d'oxaliplatine n'est pas recommandée, une infusion intraveineuse lente ou une administration orale du 5-FU doivent être préférées à des administrations en bolus (André et al., 2004; Labianca et al., 2013). Dans ce contexte non métastatique, le bénéfice d'une administration d'irinotécan (Van Cutsem et al., 2009) ou d'agents de thérapie ciblée, tels que

le bévacizumab (de Gramont et al., 2012) et le cétuximab (Alberts et al., 2012) n'a pas été prouvé.

#### **1.2.2.2. Cancer colorectal métastatique (mCCR)**

La chimiothérapie peut être qualifiée de néoadjuvante si elle est mise en place avant la chirurgie dans le but de faciliter la résection des métastases. C'est le cas du protocole FOLFOX qui associe le 5-FU, l'acide folinique et l'oxaliplatine. Cette chimiothérapie néoadjuvante permet une augmentation de la survie sans progression et est recommandée pour cette raison, même si elle ne semble pas modifier significativement la survie globale (Nordlinger et al., 2013).

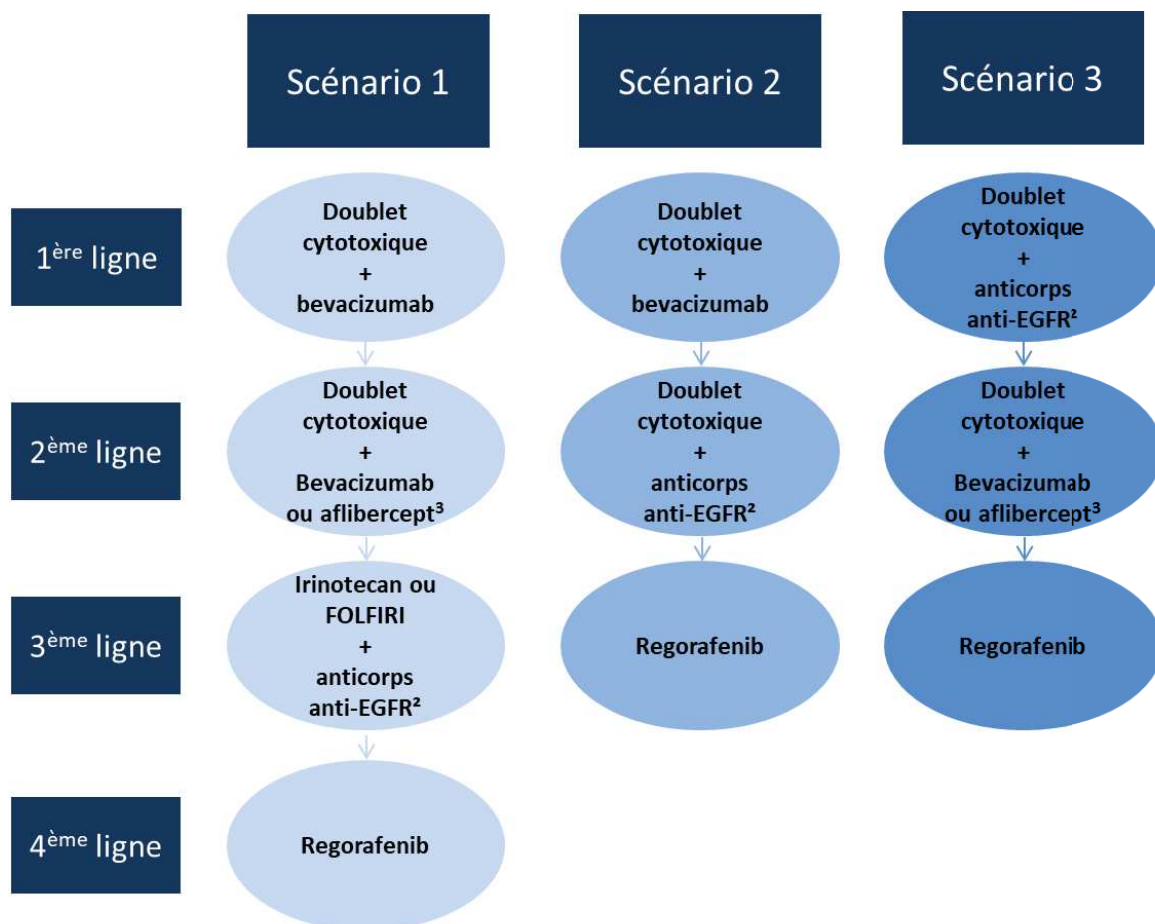
Au stade IV, le but du traitement clairement défini, influence le choix des molécules thérapeutiques et le schéma selon lequel elles seront administrées. Dans ses recommandations de prise en charge, actualisées en juillet 2016, l'ESMO a défini deux groupes de patients atteints de cancer colorectal métastatique (Van Cutsem et al., 2016). Les patients susceptibles de répondre à la chimiothérapie et ceux dont la présentation clinique ne correspond pas aux objectifs de ces traitements intensifs et qui recevront un traitement palliatif. Dans le premier groupe, les patients sont subdivisés en fonction de la résécabilité ou non de la tumeur et des métastases ainsi que de la menace clinique qu'elles représentent. Ces critères modifient la finalité de la chimiothérapie, de cytoréduction suivie de résection empêchant la progression de la maladie, à un « simple » contrôle de la maladie lorsque la résection n'est pas envisageable et que les symptômes cliniques ne sont pas majeurs. Au sein de ces deux sous-groupes, les principaux biomarqueurs qui orientent le traitement sont les statuts de RAS et BRAF (pour détails, cf. section 2.3.4).

La première ligne de chimiothérapie des mCCR comprend une fluoropyrimidine (5-fluorouracile, utilisé en administration intraveineuse) qui peut être employée en combinaison avec l'irinotécan (FOLFIRI) ou l'oxaliplatine (FOLFOX) (Van Cutsem et al., 2014). Ces combinaisons assurent de meilleures réponses que le 5-FU seul (de Gramont et al., 2000), (Douillard, 2000). Cependant la capécitabine (fluoropyrimidine orale) n'est pas utilisée en association avec l'irinotécan, car cette association s'avère plus toxique que le FOLFIRI (Fuchs et al., 2007). La majorité des patients seront traités en première ligne par un doublet cytotoxique (FOLFOX, CAPOX ou FOLFIRI), chez de très rares patients par un triplet cytotoxique (FOLFOXIRI) ou par une fluoropyrimidine seule lorsqu'ils sont asymptomatiques avec des métastases non résécables et non candidats à une polychimiothérapie. Les anticorps monoclonaux bevacizumab (anti-VEGF) ainsi que le



cetuximab et le panitumumab (anti-EGFR) améliorent les résultats obtenus en combinaison avec les agents de chimiothérapie conventionnels. Ils sont recommandés en première ligne de traitement chez tous les patients, en l'absence de contre-indication (Van Cutsem et al., 2011) mais ne doivent pas être associés à la capécitabine ni aux bolus de 5-FU.

Bien que très ardu à aborder, par la multiplicité des facteurs à prendre en compte et la multitude des schémas de traitement possibles, des preuves concordantes démontrent que, dans la mesure du possible, le traitement du mCCR doit comporter les trois cytotoxiques disponibles et l'ensemble des thérapies ciblées (anti-VEGF, anti-EGFR) (Grothey et al., 2004). Cela permet de comprendre le choix des traitements d'entretien et des éventuelles lignes ultérieures. Les molécules qui n'ont pas été utilisées dans les traitements antérieurs seront recommandées de même que certaines seront reconduites car elles ont été efficaces pour le patient concerné (Van Cutsem et al., 2016) (Figure 3).



Doublet cytotoxique: fluoropyrimidine + oxaliplatine ou irinotecan; <sup>2</sup>Ras WT; <sup>3</sup>seulement avec FOLFIRI

**Figure 3 Stratégies de continuité des soins du cancer colorectal métastatique**  
Adapté de (Van Cutsem et al., 2014)

### 1.3. Le syndrome de Lynch

#### 1.3.1. Définition et bases moléculaires

Le syndrome de Lynch est la forme la plus fréquente de prédisposition au cancer colorectal héréditaire, 1 à 3% de tous les CCR (Peltomäki, 2016). Ce syndrome correspond à une prédisposition héréditaire à un spectre de cancers (cf. section 1.3.2), due à une mutation autosomique dominante affectant un des gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN, le système *mismatch repair* (MMR) (cf. section 3.1). Les gènes dont les mutations germinales ont été associées au syndrome de Lynch sont MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2.

L'histoire de ce syndrome n'est pas simple et les contours n'en sont pas encore clairement définis aujourd'hui. Le système MMR n'avait pas encore été décrit chez l'Homme lors des premières suspicions cliniques d'une prédisposition héréditaire aux cancers colorectaux (Lynch et al., 1966). Le caractère héréditaire de ce syndrome a été réfuté par la communauté médicale jusque dans les années 1990 et l'avènement de la génétique. Ceci permet de comprendre les premières descriptions et les critères d'orientation diagnostique essentiellement cliniques (Tableau 3). Les patients dont l'histoire personnelle et familiale concorde avec les critères d'Amsterdam, établis historiquement en 1991 (Critères d'Amsterdam I), et élargis en 1999 (Critères d'Amsterdam II) (Vasen et al., 1999), sont diagnostiqués atteints d'un cancer colorectal héréditaire non polyposique (HNPCC), défini dans le syndrome de Lynch.

Ce Syndrome de Cancers Familiaux sera renommé par Boland en syndrome de Lynch (Boland and Troncale, 1984). Mais le terme de cancer colorectal non polyposique (HNPCC) reste également employé, initialement dans le but de le distinguer du syndrome familial héréditaire à forte polypose, que nous avons abordé précédemment, la FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*). Cette dénomination apparaît néanmoins incomplète pour désigner ce syndrome qui peut affecter d'autres organes que le côlon, même si celui-ci reste majoritaire (Boland, 2005).

Les critères issus de la conférence de Bethesda (Tableau 3) ont été proposés et révisés, en fonction des dernières avancées moléculaires dans la compréhension de ce syndrome, afin d'augmenter la sensibilité de détection des patients susceptibles d'être atteints (Umar et al., 2004).



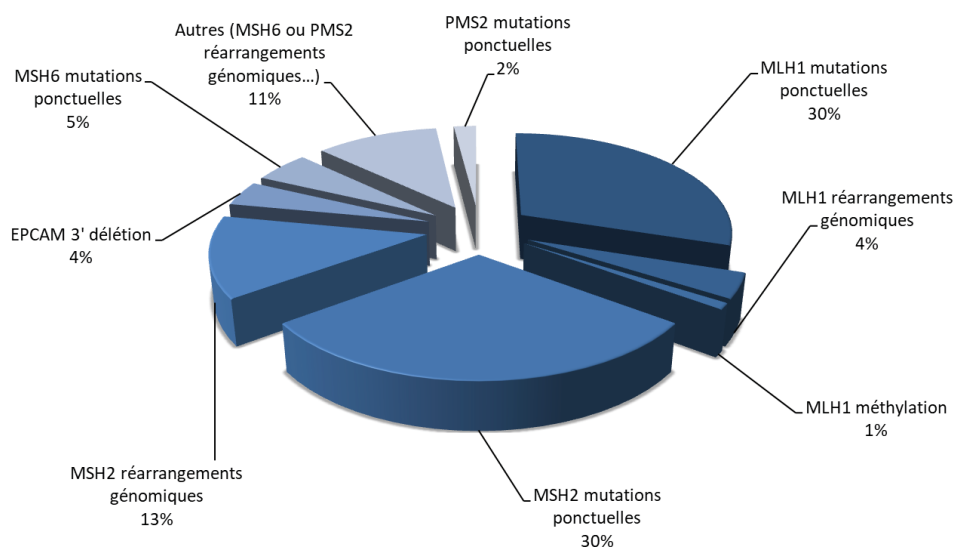
<b>Critères d'Amsterdam I</b> (Vasen et al., 1991)	<b>Au moins trois apparentés atteints d'un cancer colorectal histologiquement prouvé :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dont un doit être lié au premier degré avec les deux autres</li> <li>• Au moins deux générations successives atteintes</li> <li>• Au moins un de ces cancers diagnostiqué avant l'âge de 50 ans</li> <li>• Dont la polypose adénomateuse familiale a été exclue</li> </ul>
<b>Critères d'Amsterdam II</b> (Vasen et al., 1999)	<b>Au moins trois apparentés atteints d'un cancer du spectre large du syndrome HNPCC :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dont un doit être lié au premier degré avec les deux autres</li> <li>• Au moins deux générations successives affectées</li> <li>• Au moins un cancer associé au syndrome doit avoir été diagnostiqué avant l'âge de 50 ans</li> <li>• La polypose adénomateuse familiale a été exclue</li> <li>• Les tumeurs doivent être vérifiées aussi souvent que possible</li> </ul>
<b>Critères de Bethesda</b> (Umar et al., 2004)	<b>Permettent de tester les tumeurs colorectales avec instabilité microsatellitaire (MSI) :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CCR diagnostiqué chez un patient de moins de 50 ans</li> <li>• Présence d'autres cancers appartenant au spectre du syndrome de Lynch, en même temps ou non, sans notion d'âge</li> <li>• CCR avec une importante instabilité microsatellitaire (MSI-H) histologiquement diagnostiquée chez un patient de moins de 60 ans</li> <li>• CCR ou une tumeur associée au syndrome de Lynch avant l'âge de 50 ans chez au moins un des apparentés du premier degré</li> <li>• CCR ou une tumeur associée au syndrome, à n'importe quel âge chez deux apparentés du premier ou second degré</li> </ul>

**Tableau 3 Critères d'Amsterdam I et II - Critères élargis de Bethesda**  
Adapté de (Lynch et al., 2015)

En effet, les premières analyses génétiques des cancers associés à ce syndrome ont mis en évidence une de leurs caractéristiques fondamentales, l'instabilité microsatellitaire (MSI) (Thibodeau et al., 1993). Elle correspond à une augmentation de la fréquence des mutations acquises par insertion, délétion ou encore de mésappariements, au niveau des séquences microsatellites du génome. C'est à peu près à ce moment-là que le système *mismatch repair* (MMR) et son fonctionnement ont été caractérisés chez la levure (Strand et al., 1993). L'instabilité microsatellitaire est une conséquence du dysfonctionnement dans la correction

des erreurs de réplication de l'ADN par ce système. Les critères élargis de Bethesda ont alors intégré dans leurs recommandations une sélection plus large des patients candidats à l'analyse MSI.

Les premières cartographies du génome ont identifié les loci des gènes *MSH2* et *MLH1* et certaines de leurs mutations responsables du syndrome de Lynch chez quelques familles, suggérant déjà l'hétérogénéité étiologique de ce syndrome (Aaltonen et al., 1993). Plus tard les gènes *PMS1* et *PMS2* furent décrits. C'est en 1997 qu'une mutation délétère du gène *MSH6* a été rapportée, bien que les membres de cette famille ne répondaient pas aux critères d'Amsterdam I et présentaient essentiellement des cancers extra-coliques, faisant émerger la notion d'hétérogénéité phénotypique (Tableau 4). Les gènes MMR les plus fréquemment mutés sont *MLH1* (40%) et *MHS2* (34%). Les mutations de *MSH6* comptent pour 18% des cas et des mutations de *PMS2* sont retrouvées dans 8% des cas. Ne sont pas connues à ce jour de mutations des gènes *MSH4*, *MSH5* et *PMS1* associées au syndrome de Lynch (Peltomäki, 2016). Un certain nombre de cas est dû à une délétion de l'extrémité 3' du gène *EPCAM* (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), qui conduit à une extinction épigénétique de *MSH2* (Figure 4). Ce gène n'étant exprimé qu'au sein des tissus épithéliaux, l'extinction épigénétique de *MSH2* n'a lieu que dans ce type de tissus, ce qui explique le phénotype des tumeurs liées à cette mutation (Ligtenberg et al., 2013). La base de données InSiGHT (*International Society for Gastrointestinal and Hereditary Tumors*), créée en 2004, répertorie depuis toutes les mutations identifiées responsables de cancers dans le syndrome de Lynch (Thompson et al., 2014).



**Figure 4 Implication des différentes altérations constitutionnelles des gènes MMR**  
Adapté de (Olschwang and Eisinger, 2010)

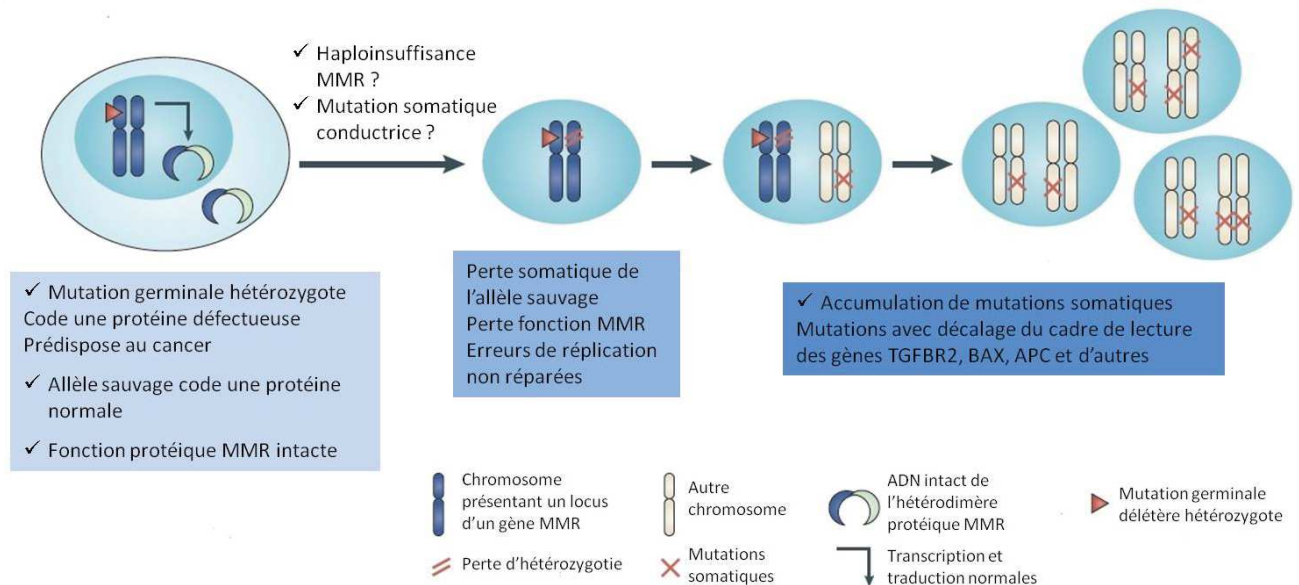
Malgré les améliorations techniques, près de 30% des familles suspectées cliniquement de présenter un syndrome de Lynch demeurent sans mutation germinale identifiée. De rares familles ont permis de mettre en évidence une mutation épigénétique constitutionnelle du gène *MLH1*. Cette mutation entraîne la méthylation du promoteur et l'inhibition de la transcription de cet allèle dans les tissus sains et a été associée à un haplotype *MLH1* présentant deux variants d'un nucléotide (Kwok et al., 2014). Cependant les mutations épigénétiques de *MLH1* surviennent majoritairement *de novo*, ce qui explique l'absence d'histoire familiale de ces cas. Les mutations épigénétiques de *MLH1* sont incriminées dans plus de 10% des cas de LS avec des tumeurs déficientes en protéine MLH1, mais sans mutation germinale retrouvée et dans une proportion équivalente de cancers sporadiques avec hyperméthylation du promoteur *MLH1*, survenant chez des personnes âgées de moins de 60 ans (Hitchins, 2013).

La pathogénicité de la plupart des mutations faux-sens des gènes MMR répertoriées demeure incertaine. Ces variants sont nommés VUS pour *Variants of Uncertain Significance*.

Mécanisme causal	Hétérogénéité des phénotypes associés
Mutation hétérozygote de <i>MLH1</i>	LS : prédominance du CCR ; cancers extracoliques moins fréquents qu'avec les mutations <i>MSH2</i>
Mutation hétérozygote de <i>MSH2</i>	LS : plus grande fréquence des cancers extracoliques
Mutation hétérozygote de <i>MSH6</i>	LS : prédominance des cancers de l'endomètre ; tumeurs avec parfois un faible niveau d'instabilité microsatellitaire
Mutation hétérozygote de <i>PMS2</i>	LS : peuvent présenter un excès de polypes coliques ; fréquence des cancers plus faible
Délétion hétérozygote d' <i>EPCAM</i>	LS : inhibe l'expression de <i>MSH2</i> ; souvent moins de risque de cancers extracoliques ; risque augmenté de cancers de l'endomètre
Epimutation monoallélique de <i>MLH1</i>	LS : l'expression phénotypique semble similaire à celle des porteurs de mutations <i>MLH1</i> ; une certaine proportion de mutations épigénétiques de <i>MLH1</i> sont héréditaires mais le plus souvent ces mutations arrivent <i>de novo</i>
Mutation bi-allélique de <i>MSH2</i> , <i>6</i> , <i>MLH1</i> ou <i>PMS2</i>	Définit le syndrome CMMR-D ; très jeune âge de survenue des cancers (pédiatriques), hématologiques, du tractus urinaire, glioblastomes et neurofibromatose

**Tableau 4 Hétérogénéité phénotypique des cancers associés aux mutations MMR**  
Adapté de (Lynch et al., 2015)

Pour qu'un cancer se développe chez ces patients génétiquement prédisposés par leur première mutation germinale héréditaire, il faut qu'un second événement génétique affecte l'allèle sauvage (Figure 5).



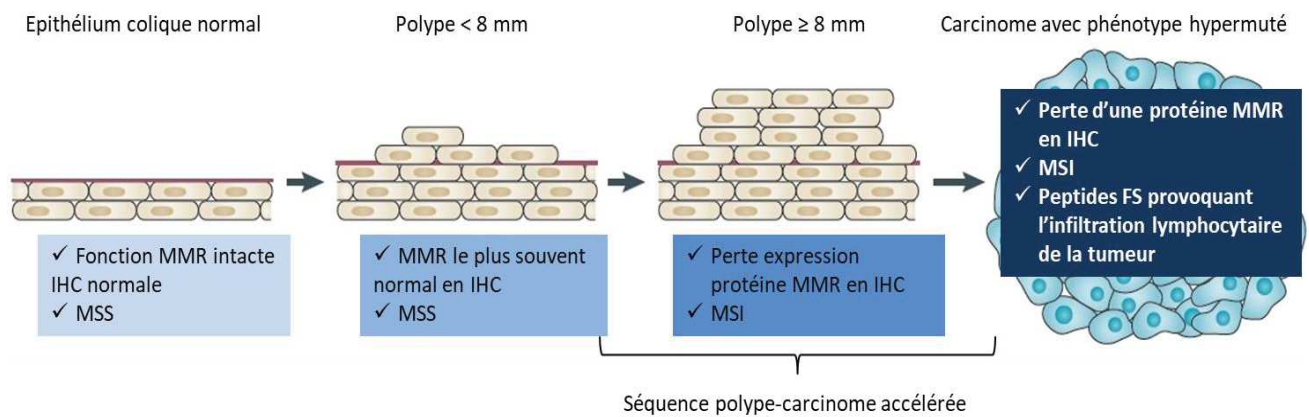
**Figure 5 Evénements moléculaires lors du développement d'un CCR dans le LS**

Adapté de (Lynch et al., 2015)

Nous savons aujourd'hui qu'il subsiste des CCR, avec instabilité microsatellitaire et une IHC des protéines MMR anormale, qui ne sont ni dus au syndrome de Lynch ni à une hyperméthylation du promoteur *MLH1*. Ces cas ont été nommés LLS (*Lynch like Syndrome*) pour, syndromes apparenté au syndrome de Lynch (Rodríguez-Soler et al., 2013). Une étude a rapporté l'existence de deux mutations acquises d'un gène MMR dans plus de 50% des CCR MSI analysés ( $n = 25$ ) qui pourraient être impliquées dans ce syndrome (Mensenkamp et al., 2014a). Certains cancers de l'endomètre sont également concernés (Haraldsdottir et al., 2014) (cf section 1.3.2.). Le cancer colorectal familial de type X est la dénomination qui a été attribuée à la moitié des familles qui remplissent les critères d'Amsterdam mais qui ne présentent ni d'instabilité microsatellitaire ni de mutation germinale d'un gène MMR (Lindor, 2009).

### 1.3.2. Caractéristiques et spectre du syndrome de Lynch

La majorité (70%) des cancers colorectaux survenant dans le syndrome de Lynch affectent le côlon droit proximal, au niveau de la courbure splénique et sont généralement « non polypoïdes ». Le phénomène de carcinogenèse colorectale est accéléré chez les patients souffrant de ce syndrome, en comparaison des formes sporadiques de CCR, seulement 2 à 3 ans contre 6 à 10 ans. Histologiquement ces cancers contiennent un excès de cellules mucineuses, peu différenciées et présentent un infiltrat lymphocytaire important (Figure 6). La présence de lymphocytes au sein de ces tumeurs entre probablement en ligne de compte dans l'avantage de survie connu chez ces patients en comparaison de ceux atteints d'un cancer sporadique au même stade (Watson et al., 1998).



**Figure 6 Développement du syndrome de Lynch au niveau cellulaire**  
Adapté de (Lynch et al., 2015)

Les porteurs d'une mutation germinale d'un gène MMR présentent un risque accru de développer, au cours de leur vie, un cancer colorectal (25 à 70%) (Figure 7), de l'endomètre (30 à 70%) et d'autres cancers, appartenant au spectre de ce syndrome, tels que l'estomac, l'intestin grêle, le système hépato-biliaire, le tractus urinaire supérieur, les ovaires, mais aussi le cerveau, avec les glioblastomes (Vasen et al., 2013). La moyenne d'âge à laquelle ces patients développent un cancer colorectal est inférieure à celle de la population générale (45 au lieu de 69 ans respectivement).

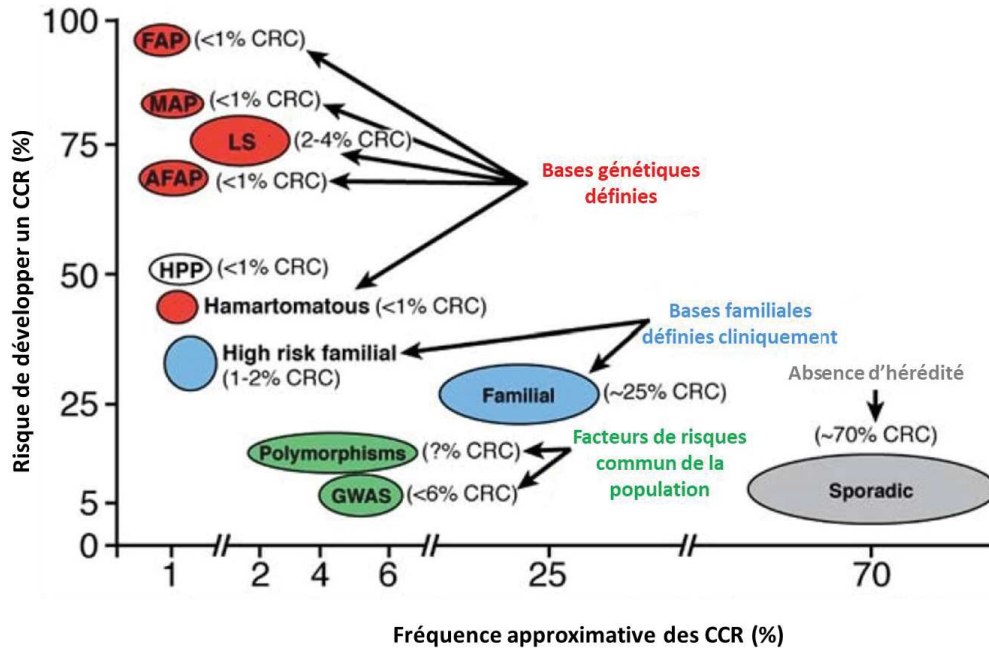


Figure 7 Modèle de susceptibilité du CCR  
Adapté de (Jasperson et al., 2010)

Le phénotype d'instabilité microsatellitaire, caractéristique des tumeurs du syndrome de Lynch, est également retrouvé dans 15% des cancers colorectaux sporadiques dus à la méthylation du promoteur du gène *MLH1*. Cependant la mutation du gène *BRAF* (V600E) caractéristique, quant à elle, des cancers colorectaux sporadiques de phénotype MSI, n'est quasiment jamais retrouvée dans le syndrome de Lynch (Laurent-Puig et al., 2009), ce qui oriente le diagnostic.

Une étude nationale française de l'estimation des risques cumulés de développer un cancer associé au syndrome de Lynch, chez les porteurs de mutations des gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* (ERISCAM, Estimation des Risques de Cancer chez les porteurs de mutation des gènes MMR) a été menée sur 537 familles, incluses entre 2007 et 2009 (Bonadona et al., 2011a). Cette étude a mis en évidence que le risque de développer un cancer associé au syndrome de Lynch, n'est pas significativement différent entre l'homme et la femme et ce quel que soit l'âge. A partir de 70 ans ce risque est le même pour les porteurs d'une mutation des gènes *MLH1* ou *MSH2*, à savoir 59% et 57% respectivement, alors qu'il est beaucoup plus faible, 25%, pour les porteurs d'une mutation affectant *MSH6*. Le risque cumulé de développer un cancer colorectal à partir de 70 ans est de 38% chez les hommes et de 31% chez les femmes. Ces risques sont de 33% pour le cancer de l'endomètre et de 9% pour le cancer des ovaires.



Le Tableau 5 illustre les résultats de cette étude concernant les risques cumulatifs estimés des différents cancers en fonction du gène MMR muté, à partir de l'âge de 70 ans.

	Colorectal		Endomètre		Ovaire	
	% de risque	IC 95%	% de risque	IC 95%	% de risque	IC 95%
<b>MLH1</b>	41	25-70	<b>54</b>	20-80	20	1-65
<b>MSH2</b>	<b>48</b>	30-77	21	8-77	<b>24</b>	3-52
<b>MSH6</b>	12	8-22	16	8-32	1	0-3

**Tableau 5 Risques cumulatifs estimés par cancer en fonction du gène MMR muté**

Adapté de (Bonadona et al., 2011b)

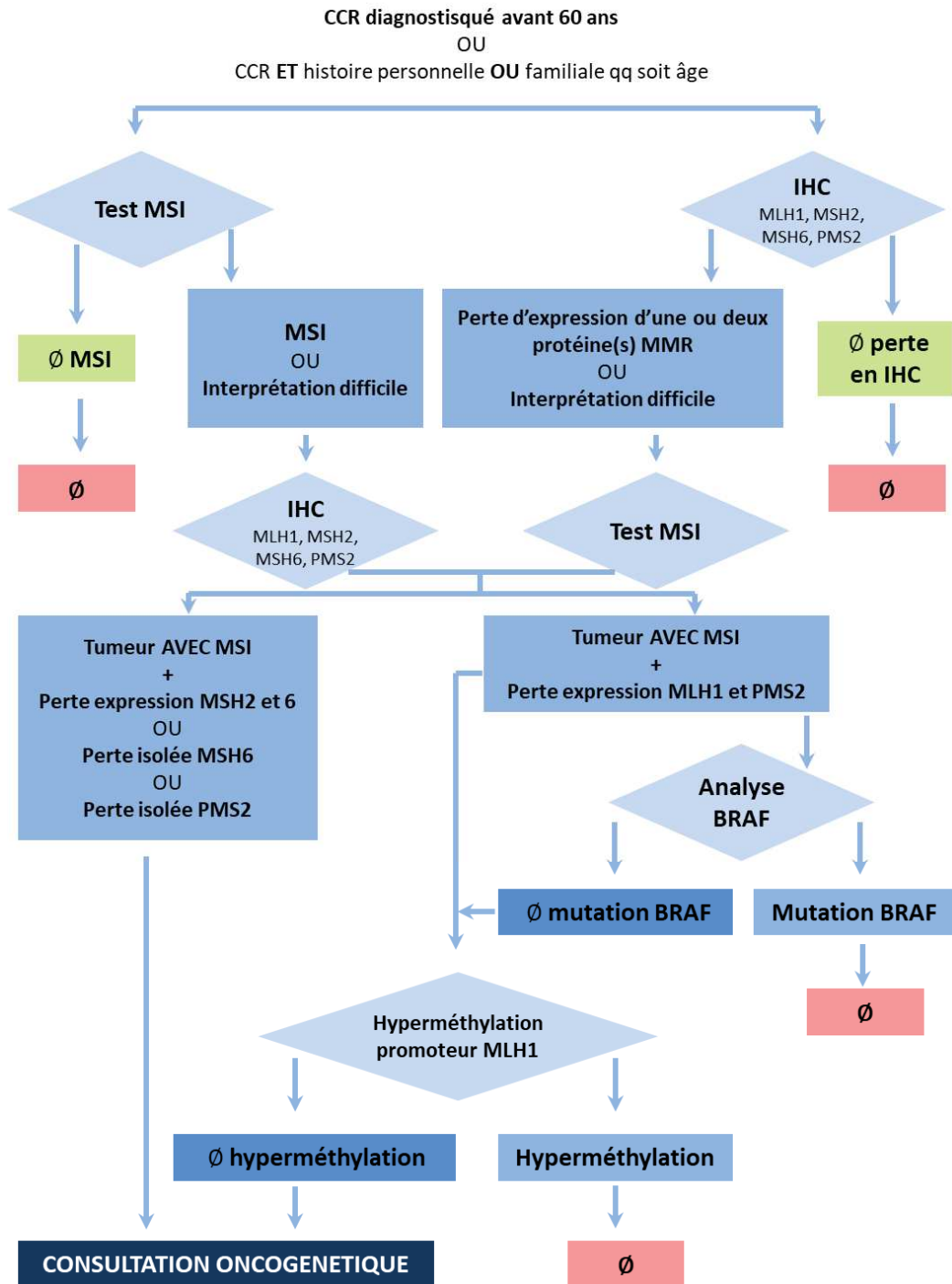
Concernant le cancer colorectal, ces risques cumulés estimés n'augmentent pas avant l'âge de 30 ans, de même que le risque de développer un cancer de l'endomètre ne dépasse pas 2% et celui de l'ovaire 1%, avant l'âge de 40 ans, quel que soit le gène muté considéré. Les autres carcinomes susceptibles de se développer, appartenant au spectre du LS, tels que l'estomac, l'intestin grêle, l'épithélium biliaire et urinaire ne présentent pas un risque de plus de 3% à 70 ans. Des tumeurs cutanées et cérébrales ont été décrites au sein de familles suspectées atteintes du syndrome de Lynch, il s'agit du syndrome de Muir-Torre et Turcot qui est considéré comme une variante du syndrome de Lynch (Watson et al., 2008). L'atteinte possible de ces différents organes définit les spectres, étroit et large, de ce syndrome. Le spectre étroit concerne le côlon et le rectum, l'endomètre, l'intestin grêle et les voies urinaires. Les critères d'Amsterdam I ont été élargis afin d'intégrer ces cancers extra-coliques. Ces spectres d'expression servent de signal d'appel pour motiver la recherche de mutation constitutionnelle délétère. Le développement d'un cancer de l'intestin grêle par exemple, malgré le faible risque chez un patient porteur d'une mutation, est un excellent indicateur de mutation car il est extrêmement rare dans la population générale. La fréquence des cancers du pancréas, du sein et de la prostate, qui n'appartiennent pas ou pas clairement à ce jour au spectre du LS, semble plus importante chez ces patients (Win et al., 2012).

### 1.3.3. Particularités de la prise en charge et surveillance

Comme nous l'avons déjà abordé, la transmission d'une mutation germinale d'un des gènes MMR est autosomique dominante. Le diagnostic du syndrome de Lynch est aujourd'hui basé sur une combinaison de paramètres cliniques, l'analyse pathologique de la tumeur et/ou la recherche de mutation. L'immunohistochimie (IHC) permet d'étudier sur une coupe histologique l'expression tissulaire des protéines MMR. A l'état normal, ces protéines sont exprimées dans le noyau de nombreuses cellules en particulier de l'intestin par les cellules du tiers inférieur des cryptes de la muqueuse, par les lymphocytes et les cellules endothéliales du stroma de la tumeur, qui servent de témoins positifs à la technique. La perte d'expression est exclusive entre MLH1 et MSH2, c'est-à-dire qu'elle ne concerne que l'une de ces deux protéines, et ne s'observe que dans les cellules tumorales. La perte d'expression de protéines MMR sert à la fois de biomarqueur et oriente la recherche de mutation causale. Une perte spécifique de l'expression de PMS2 ou MSH6 implique une mutation germinale de PMS2 ou de MSH6 respectivement, alors que la perte de MLH1 et PMS2 en IHC tend à suggérer une mutation de MLH1 (PMS2 étant déstabilisée en l'absence de MLH1, cf. section 3.5.1). La sensibilité de cette technique est inférieure à celle du génotypage car toutes les mutations ne modifient pas nécessairement l'épitope reconnu par l'anticorps (pour revue (Olschwang et al., 2004).

Le phénotype MSI de la tumeur doit être caractérisé lors de l'examen anatomopathologique par un génotypage standardisé de 5 marqueurs permettant d'isoler les patients qui doivent bénéficier d'une recherche de mutation délétère. La valeur prédictive d'une mutation délétère constitutionnelle est définie par le risque relatif qui peut être faible (1 à 5), intermédiaire (5 à 8) ou fort (>8). Ce risque relatif permet d'affiner les spectres. Les cancers de l'endomètre, du bassinet et de l'intestin grêle présentent un risque relatif supérieur à huit qui les classe dans le spectre étroit. Alors que le risque relatif intermédiaire de développer un cancer de l'estomac, des voies biliaires et des ovaires, les classe dans le spectre large. Il est aujourd'hui recommandé de tester tous les cancers colorectaux ainsi que les cancers de l'endomètre développés avant l'âge de 70 ans par IHC des quatre protéines MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) ou par génotypage du phénotype MSI pour améliorer la sensibilité de détection des patients atteints d'un syndrome de Lynch (Pritchard and al, 2011). L'arbre décisionnel ci-après (Figure 8) est issu du guide « Tests somatiques recherchant une déficience du système MMR au sein des tumeurs du spectre du syndrome de Lynch », collection Outils pour la pratique, (INCa 2016).





**Figure 8 Stratégie diagnostique du syndrome de Lynch**  
Adapté de (INCa, 2016)

Une consultation d'oncogénétique est indiquée pour tout patient qui remplit les critères d'Amsterdam II, ainsi que ceux dont la probabilité de cancer MSI est supérieure à 50% (cancer colorectal avant 40 ans, antécédent personnel de cancer colorectal ou de l'endomètre). Elle permet de définir le rythme et les modalités de surveillance et des membres de sa famille.

Lorsque le diagnostic de syndrome de Lynch est posé, une surveillance particulière des patients est recommandée. Les facteurs de risque du cancer colorectal reconnus dans la population générale ont un impact similaire chez les personnes qui présentent cette prédisposition. Cependant la précocité de l'âge au diagnostic des cancers du spectre étroit du syndrome de Lynch, nécessite la mise en place d'une prévention et d'un dépistage adaptés et anticipés. Les recommandations concernant la prise en charge globale du syndrome de Lynch ont été récemment révisées par un groupe d'experts européens (Vasen et al., 2013). Le tableau suivant, (Tableau 6), issu de ce travail, résume le consensus révisé des recommandations de surveillance.

Site atteint	Limite d'âge inférieure	Examen	Intervalle
Colorectum	20-25 ans	Coloscopie complète et chromocoloscopie à l'indigo carmin	1-2
Utérus / Ovaires	35-40 ans	Proposition d'examen gynécologique, ultrasons transvaginaux, biopsie d'aspiration, discuter « les pour et les contre »	1-2
Estomac	30-35	Endoscopie gastrointestinale supérieure seulement recommandée chez les familles LS de régions avec une forte incidence de cancers gastriques, de préférence dans un cadre de recherche. Dépistage de tous les porteurs de plus de 25 ans de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i>	1-2
Tractus urinaire	30-35	Surveillance (cytologie urinaire et ultrasons) des porteurs de mutation MSH2 seulement dans le cadre de recherche ou si ces résultats sont systématiquement collectés par un registre de LS	1

**Tableau 6 Protocole de surveillance du syndrome de Lynch**  
(LS, Lynch syndrome ; limite d'âge et intervalle en années)

L'hystérectomie et l'ovariectomie bilatérale préviennent le développement des cancers de l'endomètre et des ovaires et doivent être discutées chez les porteuses de mutation de plus de 40 ans qui ne souhaitent plus avoir d'enfants. Si une chirurgie colorectale est programmée, l'option d'une chirurgie prophylactique dans le même temps doit être envisagée. Une étude finlandaise a montré que 61% des décès par cancer du syndrome de Lynch sont dus à d'autres cancers que ceux du côlon et de l'endomètre. Malheureusement, le bénéfice de la surveillance

des autres cancers (gastrique, intestin grêle, tractus urinaire, prostate et sein) n'est pas connu et nécessite d'être préalablement évalué. Il est important de ne pas négliger les effets psychologiques potentiellement néfastes que peuvent avoir ces dépistages et une surveillance accrue chez des personnes encore saines. Il a été mis en évidence que la prise régulière d'aspirine pouvait réduire de manière significative l'incidence des CCR chez les patients atteints de LS (Movahedi et al., 2015), (pour revue (Vasen et al., 2013)).

Concernant la prise en charge chirurgicale du cancer colorectal dans le cadre d'un syndrome de Lynch, le risque de développer un deuxième cancer colorectal, après une colectomie partielle, en dépit de la surveillance accrue, est de 16% à 10 ans. Ce risque accru invite à considérer une résection plus étendue, même si cela doit être remis en perspective avec le risque réellement encouru et l'impact d'un tel traitement chirurgical sur la qualité de vie du patient et doit être discuté avec chacun, particulièrement chez les plus jeunes (Haanstra et al., 2012).

Nous verrons plus loin (3.5.4) que le système MMR, élément clé de la pathologie, est aussi impliqué dans la réponse globale à certaines formes de dommages à l'ADN (Sinicrope and Sargent, 2012). Bien qu'une sensibilité atténuée des cancers MSI au 5-FU ait été démontrée, il a également été mis en évidence une augmentation de la survie sans maladie (DFS) lors de l'utilisation de chimiothérapies adjuvantes associant l'oxaliplatine (Tougeron et al., 2016) ou le SN38 (Bertagnolli et al., 2009) au 5-FU. La poursuite des recherches pharmacogénomiques pourrait aboutir à des traitements plus adaptés à ces patients par une meilleure compréhension de l'effet de certaines mutations germinales sur les résultats thérapeutiques.

Un essai clinique a montré l'efficacité supérieure du pembrolizumab (KEYTRUDA®) qui est un anticorps monoclonal humanisé qui se lie au récepteur PD-1 (Programmed Death-1) et bloque son interaction avec les ligands PD-L1 et PD-L2, dans les tumeurs présentant une déficience MMR par rapport aux proficientes (Le et al., 2015). La voie de signalisation PD-1 est un rétrocontrôle négatif qui réprime l'activité cytotoxique de la réponse immunitaire  $T_H1$ , qui peut être toxique pour l'hôte, en l'absence de régulation. Cette voie est surexprimée dans de nombreuses tumeurs et leur micro-environnement, leur permettant ainsi d'échapper au système immunitaire. Le taux de réponse objectif et la survie sans progression, liés à l'immunité, sont significativement augmentés chez les patients qui présentent des cancers où le système MMR est déficient, quelle que soit la localisation du cancer, par rapport aux mêmes cancers sans défaut du système MMR, faisant du statut MMR un élément prédictif de la réponse à ce traitement et ouvrant de nouvelles perspectives thérapeutiques.

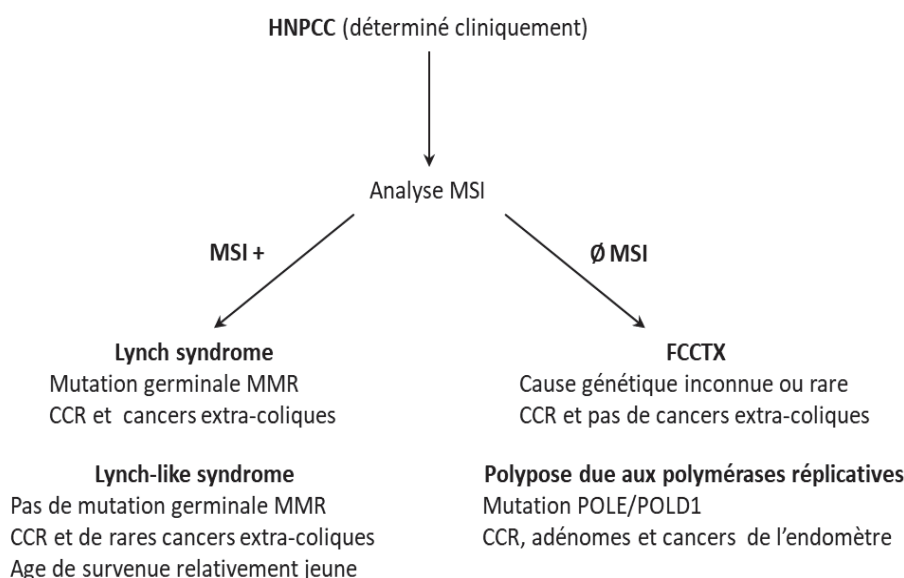
### 1.3.4. Lynch Like Syndrome

Au sein des familles qui remplissent les critères d'Amsterdam I, environ 80% d'entre elles présentent une anomalie héréditaire d'un gène MMR. La dénomination de *Lynch Like Syndrome* (LLS) désigne les 60 à 70% de cas où le syndrome de Lynch est suspecté, mais où les tests génétiques ne parviennent pas à identifier de mutation germinale des gènes MMR. Les tumeurs LLS sont MSI et l'IHC révèle une perte d'expression d'une protéine MMR. L'âge moyen de survenue d'un cancer colorectal dans ce contexte (53,7 +/- 16,8 ans) n'est pas statistiquement différent de celui du syndrome de Lynch (48,5 +/- 14,13 ans), mais significativement plus jeune que pour les cancers sporadiques (68,8 +/- 9 ans) (Rodríguez-Soler et al., 2013). Cela laisse supposer des mutations germinales non identifiées au moins pour une part de ces cas. Les apparentés ont un risque plus faible (2,12) de développer un cancer colorectal que ceux avec des mutations des gènes MMR (6,04), mais plus élevé que dans les familles sans prédisposition génétique où apparaissent les cancers sporadiques (0,48).

Il existe plusieurs voies d'explication de ce phénomène. Premièrement, il est possible que certains patients classés LLS puissent être atteints de LS, qu'il y ait une mutation germinale en cause au sein des gènes MMR qui ne soit à ce jour ni détectée, ni détectable. En effet, certaines d'entre elles n'ont été découvertes que très récemment, en partie à cause de la variabilité génomique due aux polymorphismes entre individus. Il apparaît intéressant d'explorer les séquences introniques ainsi que les régions promotrices des gènes MMR, afin d'étudier dans quelle mesure elles peuvent affecter l'expression de ces gènes (Boland, 2013). D'autres mécanismes sont capables d'inactiver le système MMR, engendrant un phénotype tumoral très proche du LS. Une inactivation somatique biallélique d'un gène MMR est retrouvée au sein des tumeurs de 50 à 60% des patients LLS (Mensenkamp et al., 2014b), (Sourrouille et al., 2013). Une mutation somatique de n'importe quel allèle d'un gène MMR couplée à une perte d'hétérozygotie de l'autre allèle est le schéma le plus communément accepté (le second étant deux mutations somatiques). Les mutations en mosaïque peuvent également expliquer le défaut de détection de mutations des gènes MMR, par les approches classiques, lié au mosaïcisme cellulaire de l'ADN dérivé des lymphocytes (Sourrouille et al., 2013). Il apparaît donc nécessaire de tester plusieurs sources d'ADN par individu, comprenant l'ADN dérivé des cellules sanguines, de la muqueuse normale et du tissu tumoral et de confirmer la présence de cette mutation dans le sang des apparentés (Buchanan et al., 2014). Il est également possible que les patients LLS présentent des mutations germinales ou somatiques affectant d'autres gènes que ceux du système MMR, cependant responsables

d'une perte d'expression des protéines MMR. Peut-être une inactivation génétique ou épigénétique d'un gène suppresseur de tumeur contribue-t-elle à l'initiation de la tumeur dans des cellules haploinsuffisantes (Peltomäki, 2016). Les différentes présentations cliniques des membres d'une famille présentant un LLS suggèrent qu'il existe d'autres mécanismes capables d'engendrer une déficience en protéine MMR et un phénotype MSI. D'où la nécessité de rechercher de nouveaux gènes de susceptibilité aux cancers du côlon survenant dans un contexte de LLS.

La dénomination HNPCC regroupe différentes pathologies (Figure 9), dont les phénotypes présentent des similitudes. Une confirmation génétique du diagnostic permet de différencier certains des syndromes HNPCC, mais ne modifie pas à ce jour les recommandations de surveillance des patients et de leurs apparentés.



**Figure 9 Dichotomisation du HNPCC en fonction du statut MSI**  
Adapté de (Carethers and Stoffel, 2015)

Enfin le syndrome de déficience MMR constitutionnelle (CMMRD, *Constitutional mismatch repair deficiency*) est une rare condition où une mutation biallélique germinale affecte un gène MMR, ce qui conduit au développement de cancers pédiatriques qui affectent particulièrement le cerveau et le tractus gastro-intestinal (notamment le côlon). Des cancers hématologiques tels que des leucémies ou des lymphomes sont également retrouvés (Bakry et al., 2014).

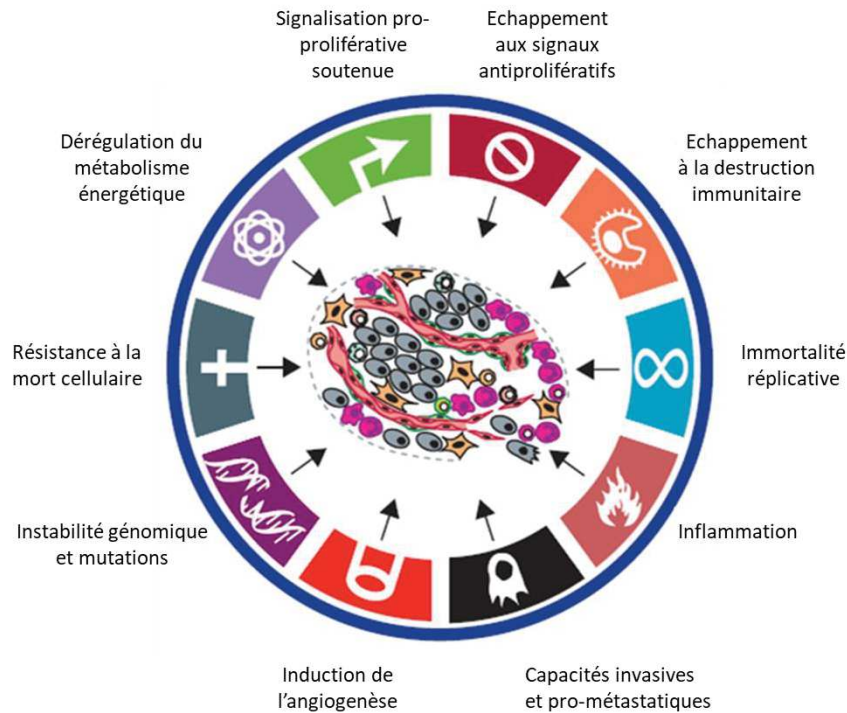
## **2. Bases moléculaires du cancer colorectal**

### **2.1. Caractéristiques des cellules cancéreuses**

L'être humain adulte est constitué de 10 000 milliards de cellules. Un milliard de cellules est renouvelé chaque jour pour remplacer les cellules perdues de façon continue dans les tissus à fort renouvellement, comme la peau, le tube digestif ou le système hématopoïétique. Il a été estimé que chaque cellule humaine est sujette à environ 70 000 lésions par jour (Lindahl and Barnes, 2000). Le mécanisme de division cellulaire est régulé par un grand nombre de protéines intervenant transitoirement et dans un ordre précis. Si cette régulation est perturbée, les cellules échappent aux différents freins qui limitent leur capacité de division et prolifèrent anormalement jusqu'à former une tumeur (une tumeur de 1 mm de diamètre correspond à l'accumulation d'un million de cellules cancéreuses) (Meijer, 2003). De même, la plupart des lésions de l'ADN subies chaque jour sont normalement efficacement réparées. Des mutations de gènes critiques, les gènes suppresseurs de tumeurs, les oncogènes ou encore les gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN, entraînent un stress réplcatif et transcriptionnel responsable de l'instabilité génétique et d'une perte progressive de la différenciation (Tubbs and Nussenzweig, 2017). Cela permet d'appréhender la progressivité du processus de transformation qu'est la tumorigénèse, qui s'étend sur de nombreuses années (Vogelstein et al., 2013a).

Les cellules tumorales sont qualifiées d'anormales car elles présentent des caractéristiques qui les distinguent des cellules normales, illustrées dans la figure ci-après (Figure 10) (pour revue (Hanahan and Weinberg, 2011)). Les cellules tumorales sont indépendantes des signaux qui proviennent de leur environnement, que ce soient des signaux prolifératifs ou antiprolifératifs. Les signaux prolifératifs sont généralement des facteurs de croissance dont la fixation sur des récepteurs permet l'activation de voies de signalisation intracellulaires qui contrôlent la progression du cycle cellulaire. La caractéristique la plus fondamentale des cellules cancéreuses est leur capacité proliférative soutenue qu'elles sont capables d'assurer de différentes façons : en produisant leurs propres facteurs de croissance et les récepteurs associés, en stimulant la production de ces facteurs par les cellules normales du stroma, en exprimant un taux élevé de récepteurs à ces facteurs de croissance ou encore par une activation constitutive des composants en aval des récepteurs, permettant de stimuler ces voies de signalisation de manière indépendante de la fixation du ligand. Ces signaux influencent d'autres paramètres biologiques tels que la survie et le métabolisme énergétique.





**Figure 10 Caractéristiques des cellules cancéreuses**  
Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011)

Les cellules tumorales se caractérisent notamment par la perte de l'inhibition de contact, permettant de maintenir l'homéostasie tissulaire. Elle renforce l'attachement cellule-cellule par l'intermédiaire de la cadhérine et limite l'émission de signaux mitogéniques par la séquestration des récepteurs des facteurs de croissance. Mais ce n'est pas le seul moyen de limiter la prolifération cellulaire, une signalisation exagérée de certaines oncoprotéines peut provoquer l'induction des phénomènes de sénescence et/ou d'apoptose (Collado and Serrano, 2010). Cependant, les cellules cancéreuses se sont adaptées à cette signalisation soutenue en désamorçant ces phénomènes, leur permettant de résister à la mort cellulaire. La sénescence explique le potentiel réplcatif limité des cellules normales. Son dépassement est le phénomène d'immortalisation, se traduisant par une capacité de prolifération illimitée. Les télomères, largement impliqués dans ce phénomène, sont des séquences hexanucléotidiques répétées en tandem qui protègent les extrémités des chromosomes. Ils se raccourcissent au fur et à mesure des différentes divisions cellulaires. La longueur de l'ADN télomérique révèle le nombre de générations encore possibles avant qu'il ne soit trop érodé et perde ses fonctions protectrices, provoquant l'entrée en crise des cellules. Les télomérases, quasiment absentes des cellules normales, sont des enzymes capables d'ajouter des segments à l'ADN télomérique et sont fortement exprimées par la majorité des cellules spontanément

immortelles, comme les cellules cancéreuses humaines, permettant de déjouer l'érosion des télomères (Blasco, 2005).

La mort cellulaire programmée par apoptose est elle aussi une barrière naturelle au développement cancéreux, déclenchée en réponse à un stress physiologique quelle que soit sa provenance. Le système apoptotique est composé de régulateurs et d'effecteurs capables de recevoir, d'intégrer et d'induire des signaux de mort cellulaire qui aboutissent à l'activation de protéases, normalement latentes (caspases 8 et 9). Ces caspases vont réaliser des cascades de protéolyse au cours desquelles les cellules vont être peu à peu désassemblées, puis phagocytées. Ce système apoptotique est contrôlé par un équilibre différentiel entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille des protéines régulatrices Bcl-2 (Adams and al., 2007). Les cellules tumorales sont capables de contourner l'apoptose, par autant de voies qu'il en existe pour l'activer.

Enfin, la nécrose est un autre type de mort cellulaire qui apparaît génétiquement contrôlé dans certaines circonstances. Elle entraîne un gonflement des cellules nécrotiques jusqu'à l'éclatement, ce qui libère dans le milieu environnant des molécules informatives, telles que des cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\alpha$ ). Ces molécules pro-inflammatoires permettent de recruter des cellules inflammatoires du système immunitaire, ce qui stimule la prolifération des cellules, l'angiogenèse et l'invasion (Galluzzi and Kroemer, 2008).

## **2.2. Phénotypes moléculaires d'instabilité génomique**

Les cancers colorectaux, sporadiques ou familiaux, peuvent présenter des phénotypes similaires alors que les mécanismes moléculaires qui les sous-tendent sont extrêmement différents. Ils résultent de l'accumulation progressive et séquentielle de mutations génétiques et épigénétiques qui favorisent la transformation de l'épithélium colique normal en adénome puis en dysplasie sévère jusqu'au carcinome. La carcinogenèse correspond à un déséquilibre entre l'apparition de mutations et les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2011). Trois voies pathogénétiques sont impliquées : l'instabilité chromosomique (CIN), l'instabilité microsatellitaire (MSI) ainsi que des phénomènes épigénétiques, tels que la méthylation des îlots CpG (CIMP). L'acquisition de mutations somatiques additionnelles est facilitée par la perte de stabilité du génome.



### 2.2.1. Instabilité chromosomique et gènes suppresseurs de tumeur

L'instabilité chromosomique (CIN) représente le phénotype le plus fréquent des cancers colorectaux (80% des CCR sporadiques) et se retrouve principalement dans les tumeurs du côlon distal (95%). Il rend compte de différents phénomènes, tels que l'altération du nombre de chromosomes, les réarrangements chromosomiques, l'amplification génique, les défauts de ségrégation chromosomique par une dysfonction des microtubules, un nombre anormal de centrosomes, une dysfonction des télomères ou encore leur surexpression, des dommages de l'ADN et enfin la perte d'hétérozygotie (LOH, *Loss of heterozygosity*) ou perte allélique. L'analyse des polymorphismes des fragments de restriction (RFLP) a permis de caractériser la fréquence et la localisation de ces pertes chromosomiques. L'allèle résiduel est fréquemment muté, ce qui conduit à une inactivation biallélique de ces gènes. Les pertes chromosomiques concernent principalement le bras court (p) des chromosomes 17 et 8 et le bras long (q) des chromosomes 5, 18 et 22. Ces régions chromosomiques contiennent des gènes suppresseurs de tumeurs, comme *TP53* qui est localisé en 17p ou *APC* localisé en 5q (Kanthan et al., 2012). Certaines mutations du gène *APC* engendrent une protéine tronquée qui n'exerce plus son rôle de maintien de la polymérisation des microtubules, contribuant à la CIN.

Le gène *TP53* code la protéine p53, facteur de transcription activé en réponse à un dommage de l'ADN qui induit l'expression du gène *p21* arrêtant le cycle cellulaire en phase G1 et jouant un rôle important dans l'apoptose (Fearon, 2011). L'inactivation de p53 est une étape importante dans la transition adénome – carcinome (Hager and Gu, 2014) (cf. section 2.3.3). En position 18q, plusieurs gènes sont candidats pour être des gènes suppresseurs de tumeurs ciblés par cette perte, comme le gène *DCC* (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) (Fearon and Vogelstein, 1990), qui semble être responsable de la progression de l'adénome dans la tumorigenèse colorectale. Le gène suppresseur de tumeur *SMAD4*, également en 18q est associé au syndrome de polypose juvénile (JPS), qui prédispose au cancer colorectal. La protéine SMAD4 est un médiateur intracellulaire répondant au *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β). Le récepteur TGF-β, après dimérisation, phosphoryle le récepteur SMAD (R-SMAD) qui se lie à SMAD4, formant un complexe qui entre dans le noyau, favorisant l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire. Les mutations de SMAD4 participent ainsi à la progression de l'adénome en carcinome (Lièvre et al., 2010).

### 2.2.2. Instabilité microsatellitaire

Le génome des cellules eucaryotes présente des régions de séquences répétées, les microsatellites, qui sont des séquences d'une à dix paires de bases répétées, en tandem, huit fois ou plus. Ces séquences se trouvent en majorité dans les régions non codantes, mais il en existe aussi dans les régions codantes. Au cours de la réplication, les ADN polymérases effectuent des erreurs, d'insertion ou de délétion, d'autant plus importantes et fréquentes que la séquence microsatellitaire est longue. Il est à noter que les répétitions de bases GC sont plus instables que celles composées de bases AT. Ces erreurs sont normalement prises en charge et réparées par le système de réparation des mésappariements de l'ADN, MMR (*MisMatch Repair*). Un dysfonctionnement de ce système conduit au caractère instable de ces régions et explique l'ancienne dénomination RER (*Replication Error*) (de la Chapelle and Hampel, 2010). L'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* est la cause la plus fréquente de cette inactivation, notamment au sein des cancers colorectaux sporadiques. Comme décrit précédemment (cf section 1.3.1), cela peut aussi provenir d'une première mutation germinale d'un allèle d'un des gènes MMR, associée une mutation ponctuelle du deuxième allèle, dans le cas du syndrome de Lynch.

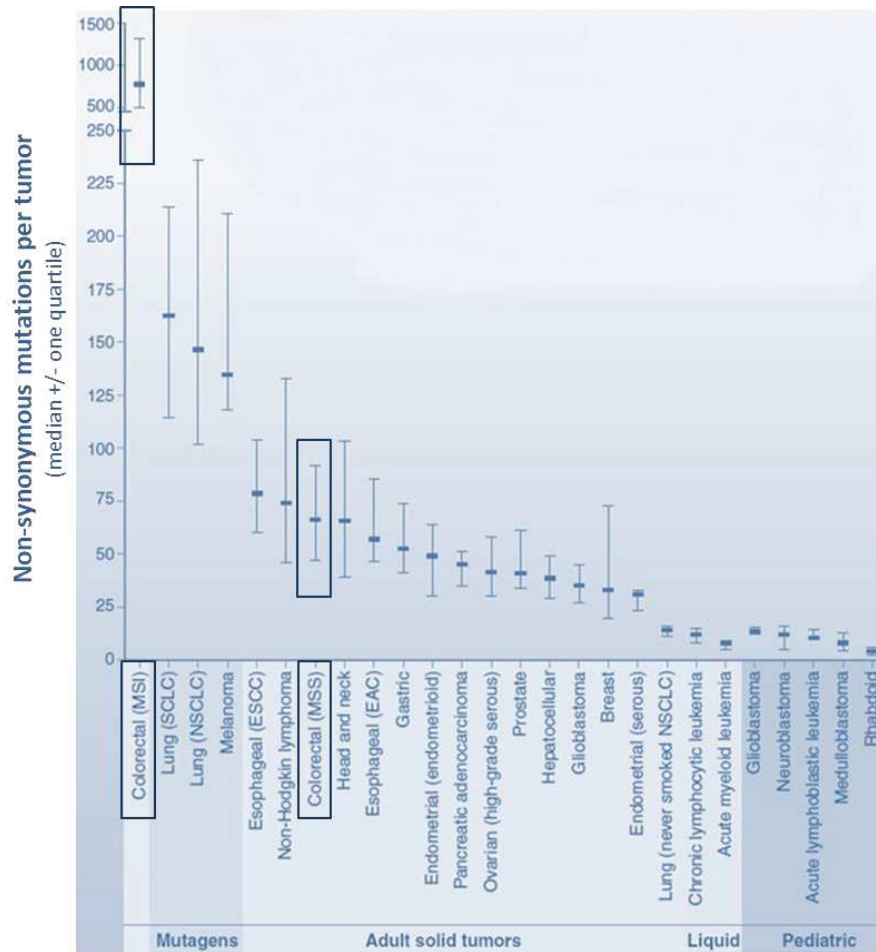
Le défaut de réparation des mésappariements est responsable du phénotype d'instabilité microsatellitaire (MSI+) qui caractérise 15% des CCR (85% des CCR sont MSS, stables). Le diagnostic de cette instabilité est basé sur l'analyse d'un panel de cinq marqueurs d'instabilité microsatellitaire, spécifiques de loci contenant des séquences répétées, par comparaison des longueurs des produits d'amplification par PCR de ces séquences microsatelitaires entre le tissu tumoral et le tissu adjacent sain. Les 5 marqueurs consensuellement recommandés (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et NR-27 (MONO27)) (Tableau 7) sont mononucléotidiques quasiment monomorphes. Il existe très peu de variants de taille de ces marqueurs au sein de la population générale, ce qui les rend très sensibles et spécifiques (Umar et al., 2004). A l'inverse, les marqueurs polymorphiques pentanucléotidiques Penta-C et Penta-D permettent de confirmer la concordance entre les ADN, tumoral et sain, et de vérifier ainsi l'absence de contamination inter échantillon.

Marqueur	Gène	Répétition microsatellite	Localisation chromosomique	Localisation du microsatellite
BAT-25	c-kit	A(25)	4q12	Intron 16
BAT-26	MSH2	A(26)	2p21	Intron 5
NR-21	SLC7A8	T(21)	14q11	5' UTR
NR-24	Zinc finger 2 (ZNF-2)	T(24)	2q11	3'UTR
NR-27	Inhibitor of apoptosis protein-1	A(27)	11q22	5'UTR

**Tableau 7 Marqueurs microsatellites utilisés pour le diagnostic MSI du CCR**  
(Boland and Goel, 2010)

Une tumeur est qualifiée d'instable si elle présente 2 marqueurs instables sur 5. Trois marqueurs instables sont nécessaires en l'absence de comparaison possible au tissu adjacent sain. Aujourd'hui le degré d'instabilité microsatellitaire n'est plus pris en considération, car les tumeurs MSI-Low (1 marqueur instable sur 5) ne présentent pas de différence clinique avec les tumeurs MSS (*Microsatellite Stable*), où tous les marqueurs analysés sont stables (Saridaki, Souglakos, et Georgoulis 2014). Les tumeurs de phénotype MSI+ sont peu différenciées, diploïdes et affectent plus fréquemment le côlon proximal avec une infiltration inflammatoire importante. Les mésappariements non corrigés peuvent entraîner un raccourcissement ou un allongement anormal de ces motifs microsatellites, associés à des mutations secondaires, ce qui conduit à un phénotype « hypermuté » (*mutator phenotype*) (Duval and Hamelin, 2002).

La figure ci-après (Figure 11) illustre l'écrasante supériorité du nombre de mutations somatiques estimées des CCR MSI par rapport aux MSS. Ces mutations secondaires peuvent affecter des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération, du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN (Kanthan et al., 2012). C'est notamment le cas du récepteur de type II du TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*). En revanche ces tumeurs présentent moins de mutations des gènes *TP53* et *APC* que les tumeurs CIN+ (Olschwang et al., 1997). Ce phénotype peut être d'origine sporadique ou héréditaire familiale, la mutation du proto-oncogène *BRAF* (cf. section 2.3.4.1) permettant de distinguer ces deux situations. En effet, cette mutation n'est quasiment jamais retrouvée dans les cancers MSI du syndrome de Lynch alors qu'elle est très fréquemment associée aux cancers MSI sporadiques (McGivern et al., 2004). Les cancers MMRd (MMR *deficient*) sont globalement de meilleur pronostic que les cancers MMRp (MMR *proficient*), ils métastasent moins fréquemment, mais sont de plus mauvais pronostic, une fois ce stade métastatique atteint.



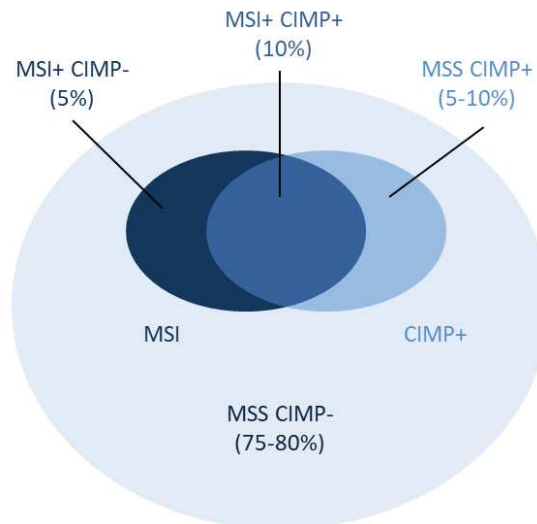
**Figure 11 Nombre de mutations somatiques dans les cancers humains**  
Adapté de (Vogelstein et al., 2013a)

Le phénotype MSI engendre la production de protéines mutées, en conséquence des mutations avec décalage du cadre de lecture (FS, *Frame Shift*) qui peuvent jouer le rôle de néo-antigènes (Tougeron et al., 2009). Cela explique l'importante infiltration de lymphocytes T cytotoxiques au sein de ces tumeurs, qui semble participer à la survie prolongée observée chez ces patients (Schwitalle et al., 2008). Les tumeurs MSI sont capables de persister dans ce micro-environnement immunitaire hostile, car elles sont capables de le contourner. Elles surexpriment des points de contrôle inhibiteurs de la réponse immunitaire adaptative (CKI, *checkpoint inhibitors*), notamment PD-1 (Llosa et al., 2015), ce qui permet la progression tumorale. Ces signaux inhibiteurs sont responsables de l'épuisement fonctionnel des cellules T et de l'absence de réponse immunitaire. Cela permet de comprendre le développement récent des anticorps monoclonaux (anti-PD-1/PD-L1) qui ciblent spécifiquement ces éléments régulateurs, plus efficaces sur les tumeurs MSI que MSS. Le phénotype MSI devient pour ces nouvelles thérapies un biomarqueur pronostique de leur efficacité (Le et al., 2015), pour revue (Colle et al., 2017).

### 2.2.3. Phénomènes épigénétiques

Le marqueur épigénétique le plus connu est la méthylation de l'ADN qui joue un rôle crucial dans l'expression des gènes et l'architecture des noyaux. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle de l'ADN par une ADN-méthyltransférase (DNMT, *DNA-N-methyltransferase*) qui transfère un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) en position 5 d'une cytosine précédant une guanine, au niveau des dinucléotides CpG (cytosine-phosphate-guanine). Ces dinucléotides ne sont pas distribués de manière aléatoire dans le génome. Il existe des régions particulièrement riches en CpG, les îlots CpG, au niveau de l'extrémité 5' promotrice de 40 à 50% des gènes (*CpG islands*) (Esteller, 2008). Cet ajout de groupement méthyle inhibe la liaison des facteurs de transcription par compaction de la chromatine et réprime l'initiation de la transcription. L'hyperméthylation des îlots CpG des régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs est un événement majeur à l'origine de nombreux cancers, cela décrit le phénotype tumoral CIMP (*CpG Island Methylator Phenotype*), qui caractérise environ 18% des CCR (Gallois et al., 2016). Ce phénotype n'est pas complètement indépendant des deux autres, l'hyperméthylation des îlots CpG peut affecter des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN (*MLH1*), les interactions cellulaires, l'apoptose, l'angiogenèse et par voie de conséquence promouvoir la tumorigenèse. Les patients qui présentent ce phénotype sont le plus souvent des femmes, d'un âge avancé, avec une localisation proximale de leur tumeur. Ces tumeurs sont le plus souvent associées à la présence d'une mutation activatrice du gène *BRAF*, mais elles se caractérisent également par la faible fréquence de leurs mutations des gènes *KRAS* et *TP53* (Weisenberger et al., 2006).

Il existe un panel de 5 gènes (*CACN1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOCS1*) utilisé pour déterminer le phénotype CIMP qui est fréquemment associé (10% des cas de CCR, 80% des CCR MSI+) au phénotype MSI des CCR sporadiques, dû à l'hyperméthylation du promoteur *MLH1*, ce qui leur confère un double phénotype MSI+/CIMP+ (Figure 12).



**Figure 12 Sous-groupes de CCR en fonction des statuts MSI et CIMP**  
(Gallois et al., 2016)

Les patients atteints de tumeurs CIMP+ et MSI+ présentent une meilleure survie globale, alors que le statut MMR n'a aucun impact chez les patients CIMP-. Les plus mauvais résultats sont observés lorsque les tumeurs sont à la fois CIMP+ et pMMR (MSI-) (Shiovitz et al., 2014). La comparaison des niveaux de méthylation du promoteur *MLH1* des différents CCR a permis de montrer que ce dernier est supérieur dans les cas de LS, à celui des tumeurs sporadiques MSS et qu'il est intermédiaire dans les cas de LLS. Le niveau le plus élevé de méthylation de ce promoteur est évidemment observé dans les cancers sporadiques MSI (Boland, 2016).

Les histones sont des protéines majeures de la régulation génique, par les changements de la chromatine qu'elles engendrent, après avoir elles-mêmes subi des modifications covalentes, comme l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitinylation le plus souvent au niveau de résidus lysine ou arginine (Portela and Esteller, 2010). L'acétylation des histones est une modification caractéristique des régions actives du génome, elle est assurée par les histones acétyltransférases qui agissent à l'inverse des désacétylases. L'acétylation active l'expression génique alors que la méthylation a tendance à l'inhiber. Dans la tumorigenèse colorectale, la désacétylation et la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, la mono-acétylation de la lysine 16 et la triméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 sont les modifications des histones les plus fréquemment retrouvées (Portela and Esteller, 2010).



Enfin, les micro-ARN sont de petites séquences non-codantes, de 18 à 25 nucléotides, qui régulent négativement l'expression des gènes en s'hybridant à l'extrémité 3'-UTR (*UnTranslated Region*). Cela conduit soit à une dégradation des ARN messagers soit à l'inhibition de leur traduction (Garzon et al., 2009). Les micro-ARN jouent un rôle important dans la pathogénèse colorectale en inhibant l'expression de gènes suppresseurs de tumeur et en favorisant la surexpression d'oncogènes. Il a été observé que les cancers MSS et MSI n'exhibent pas les mêmes profils d'expression de micro-ARN (Goel and Boland, 2012). Les miR-135a et b diminuent la traduction du gène *APC*. Le miR-126 stabilise normalement le signal PI3K mais il est perdu dans le CCR. Le miR-21 est réprimé, ce qui affecte l'expression du gène *PTEN*. Le miR-143 entraîne une diminution de l'expression de *KRAS*. Enfin le miR-34a induit l'apoptose en lien avec p53 et il est diminué dans 36% des CCR (Zhang et al., 2014a) ; (pour revue (Zoratto et al., 2014)). La figure ci-après, illustre les altérations les plus connues des micro-ARN et leurs cibles potentielles, donnant une vue d'ensemble des voies de signalisation impliquées dans la tumorigénèse colorectale (Figure 13).

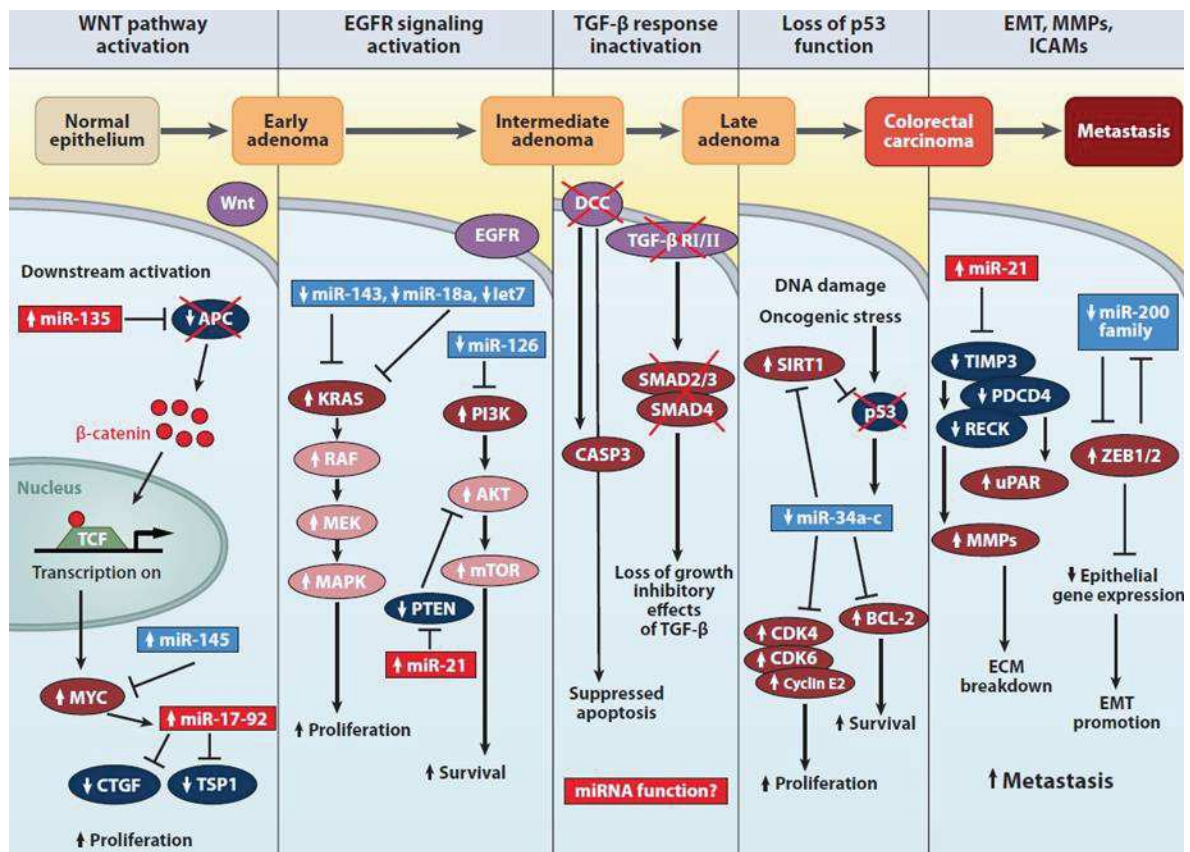
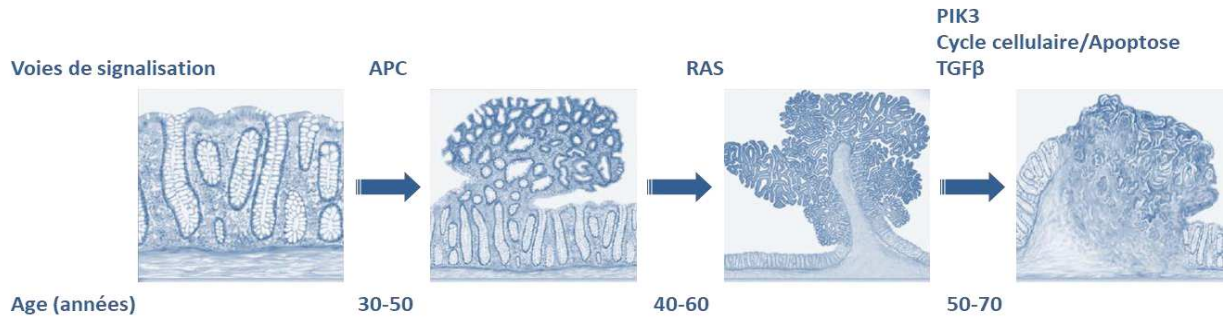


Figure 13 Rôle des micro-ARN dans la pathogénèse du CCR (Fearon, 2011)

### 2.3. Voies de signalisation impliquées dans les cancers colorectaux

Le schéma suivant représente la séquence des altérations génétiques les plus fréquemment en cause dans la tumorigenèse colorectale (Figure 14). L'âge des patients renseigne sur l'intervalle de temps entre chaque atteinte d'une voie de signalisation (Vogelstein et al., 2013a).



**Figure 14** Altérations génétiques et tumorigenèse colorectale  
Adapté de (Vogelstein et al., 2013a)

Les tumeurs évoluent par une succession de mutations dont la séquence a été largement décrite dans le cancer colorectal. Le premier événement confère à une cellule épithéliale normale un avantage prolifératif qui lui permet de former un clone microscopique (l'adénome). Dans le côlon, cette première mutation implique souvent le gène *APC*, elle est fréquemment suivie d'une mutation d'un gène *RAS*, tel que *KRAS* (*Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) favorisant à son tour l'expansion clonale de l'adénome. Ce processus continue avec la perte d'hétérozygotie (*LOH*) et la survenue de mutations de gènes tels que *PIK3CA*, *SMAD4* et *TP53* (Fearon, 2011). A ce stade, la tumeur maligne peut envahir la membrane basale sous-jacente et métastaser vers les ganglions lymphatiques ou des organes à distance. Si ces étapes précoces sont bien décrites pour les cancers de phénotype CIN, elles sont moins claires pour les cancers de phénotype MSI. Il semblerait par exemple que les patients atteints d'un syndrome de Lynch présentent déjà un phénotype MSI avant le développement de l'adénome (Coolbaugh-Murphy et al., 2010). Les mutations qui confèrent un avantage sélectif de croissance sont appelées les mutations conductrices ou « *driver* », à la différence des mutations passagères « *passengers* », qui apparaissent comme des conséquences et ne confèrent pas d'avantage prolifératif. Bien que très modeste (seulement 0,4% des mutations « *driver*»), ce maigre avantage prolifératif peut conduire sur plusieurs années au développement d'une masse de plusieurs milliards de cellules (Bozic et al., 2010).

Le fonctionnement de ces différentes voies de signalisation est détaillé ci-après, afin de mieux comprendre leur importance dans la tumorigenèse.

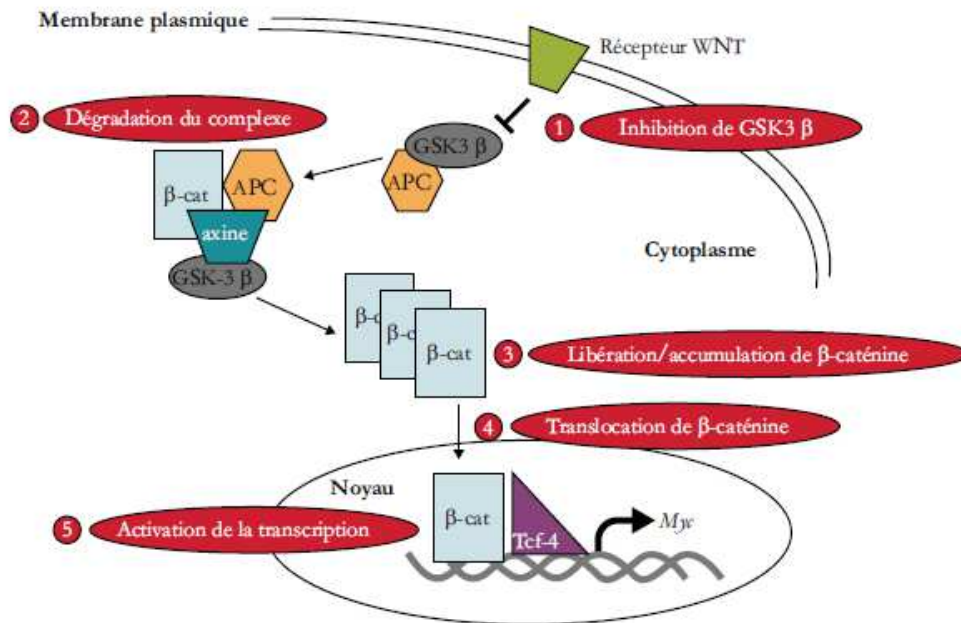


### 2.3.1. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est une voie de signalisation prépondérante de l'embryogenèse et la morphogenèse, impliquée dans la différenciation, la prolifération, la polarité et l'homéostasie des cellules intestinales. Les cellules prolifératives indifférenciées des glandes de Lieberkühn occupent les deux tiers inférieurs des cryptes du côlon et permettent le renouvellement de tous les types cellulaires nécessaires, en se différenciant au cours de leur progression le long des cryptes. La cascade de signalisation Wnt semble être la voie dominante de contrôle du destin des cellules le long de cet axe (Murray et al., 2010). Effecteur majeur de cette voie et gène suppresseur de tumeur, la protéine APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) présente un gradient d'expression (diminution du haut vers le bas), qui permet de maintenir le profil d'adhésion des cellules le long de la crypte. Ces forces d'adhésion différentielles assurent la migration des cellules nouvellement produites du bas vers le haut de la crypte et l'élimination des cellules mutées, par une signalisation Wnt ascendante augmentée (Song et al., 2014). La  $\beta$ -caténine libre cytoplasmique est maintenue inactive en l'absence de signal Wnt. Elle se déclenche lorsqu'un ligand vient se fixer sur un récepteur composé d'une protéine Frizzled à sept domaines transmembranaires et d'un récepteur apparenté aux LDL, appelé LRP5 ou 6, qui joue le rôle de corécepteur phosphorylable (*LDL-Related Protein*) (Polakis, 2000). La fixation du ligand Wnt permet l'association des protéines Frizzled et LRP au niveau extracellulaire ce qui conduit à la phosphorylation d'une protéine Dishevelled (Dsh ou Dvl chez les mammifères) au niveau intracellulaire. La protéine Dsh interagit avec l'axine, protéine de structure, empêchant la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par la GSK3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$* ). L'axine coordonne la phosphorylation séquentielle de la  $\beta$ -caténine sur la sérine en position 45, par la *Casein Kinase 1 $\alpha$*  (CK1 $\alpha$ ), sur la thréonine en position 41 et les sérines en position 37 et 33, par GSK3 $\beta$  (Kimelman and Xu, 2006). La  $\beta$ -caténine phosphorylée est reconnue par une protéine  $\beta$ -*Transducing Repeat Containing Protein* ( $\beta$ -TRCP), ubiquitine ligase E3. L'ubiquitinylation est le signal qui permet sa destruction par le protéasome. La régulation négative exercée par la protéine APC sur la  $\beta$ -caténine implique la formation d'un complexe avec l'axine et la GSK3 $\beta$ .

La  $\beta$ -caténine non phosphorylée n'est pas reconnue par  $\beta$ -TRCP, elle n'est plus conjuguée à l'ubiquitine et n'est alors pas dégradée. Elle s'accumule dans le cytoplasme et pénètre dans le noyau pour exercer son rôle de facteur de transcription en interaction avec d'autres facteurs de transcription appartenant à la famille des *T-Cell Factor* (TCF) et *Lymphoid Enhancer Factor* (LEF) (MacDonald et al., 2009) (Figure 15). Le facteur de transcription TCF réprime

normalement l'expression génique par interaction avec le répresseur Groucho (TLE1 chez l'humain), qui favorise la désacétylation des histones et la compaction de la chromatine.



**Figure 15 Représentation schématique de la voie Wnt/β-caténine**  
(Laurent-Puig et al., 2010)

Les gènes cible de la voie Wnt/β-caténine comprennent les gènes codant la *cycline D1*, *C-MYC*, *COX-2* et *NOS* (*Oxyde Nitrique Synthase*) inductible (Dijksterhuis et al., 2014). Le complexe TCF4/β-caténine, grâce à son contrôle de l'expression de *c-Myc* et de *p21*, inhibe la différenciation cellulaire, imposant un phénotype de progéniteur de crypte aux cellules. Plus de 90% des cancers colorectaux présentent une mutation de la voie de signalisation canonique Wnt, qui conduit à une stabilisation et une accumulation de la β-caténine dans le cytoplasme. Les changements de l'adhésion et de la migration des cellules contribuent au caractère invasif des tumeurs (Giles et al., 2003). Deux mécanismes peuvent conduire à l'augmentation des taux de β-caténine. Le premier fait intervenir des mutations du gène suppresseur de tumeur *APC*, muté dans 80% des CCR sporadiques (MacDonald et al., 2009). Une mutation germinale de ce gène est responsable de la polypose adénomateuse familiale (FAP), syndrome héréditaire autosomique dominant qui représente 0,5% des CCR (Lynch and de la Chapelle, 2003). Dans plus de 90% des cas, les mutations entraînent un clivage de la partie carboxyterminale de la protéine APC, ce qui empêche le recrutement de la β-caténine dans le complexe APC/Axine/CK-1α/GSK-3β. Le complexe β-caténine/TCF4 est alors stable et actif de manière constitutive, ce qui favorise la prolifération des cellules épithéliales coliques vers la surface des cryptes intestinales et participe à la formation de cryptes aberrantes, premières

lésions prénéoplasiques visibles. Le deuxième mécanisme, rencontré dans 50% des cancers du côlon, avec un gène *APC* sauvage, implique des mutations constitutionnelles du gène codant la  $\beta$ -caténine (*CTNNB1*) (Sparks et al., 1998). Ces mutations affectent la région aminoterminal de la protéine, la rendant réfractaire à toute régulation par APC et/ou phosphorylation par GSK3 $\beta$ . Dans les CCR CIN+, la voie de signalisation Wnt est activée majoritairement par une inactivation biallélique du gène *APC* (Powell et al., 1992), alors qu'il s'agit plus fréquemment de mutations activatrices du gène codant la  $\beta$ -caténine ou TCF4 dans les CCR MSI+ (Duval et al., 1999).

### 2.3.2. La voie du TGF $\beta$

La voie du TGF $\beta$  est activée dans 20 à 30% des cancers colorectaux de phénotype CIN et dans la quasi-totalité des CCR de phénotype MSI. Des mutations inactivatrices des gènes *SMAD2* et *SMAD4*, codant les protéines transductrices du signal sont retrouvées dans les tumeurs CIN et d'autres concernant le récepteur de type II du TGF $\beta$  dans 60 à 80% des CCR MSI (Parsons et al., 1995). La séquence codante du TGF $\beta$ RII présente un microsatellite de dix adénines, sujet aux erreurs de réplication non réparées par le système MMR. Cela entraîne un décalage du cadre de lecture et la génération d'un récepteur tronqué non fonctionnel. Le même type de mutation implique le gène codant l'IGFRII (*Insulin Growth Factor type II Receptor*) qui présente une répétition de 8 guanines dans sa séquence et qui active la voie du TGF $\beta$  en amont du TGF $\beta$ RII. La voie du TGF $\beta$  est impliquée dans l'inhibition de la prolifération dans le tissu normal, mais activée de manière aberrante dans les tumeurs, elle favorise l'oncogenèse. Au sein de tumeurs à un stade avancé, le TGF- $\beta$  active un programme cellulaire de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT pour *Epithelial to Mesenchymal Transition*) qui confère aux cellules cancéreuses des traits de malignité de haut-grade (Ikushima and Miyazono, 2010).

### 2.3.3. La voie p53

Le gène *TP53* qui code la protéine p53 est localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p). Il s'agit du gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté et dont les mutations sont des événements majeurs de la tumorigenèse. p53 est un facteur de transcription qui se lie à l'ADN par un domaine de liaison (DBD, *DNA Binding Domain*) et la plupart des mutations (faux-sens), qui l'inactivent, concernent cette région (Olivier et al., 2010). p53 est un acteur principal de la réponse au stress (lésion de l'ADN, hypoxie, activation d'oncogènes), au cours

de laquelle il active ses gènes cible, intervenant dans la régulation du cycle cellulaire (*CDKN1A* (p21), *GADD45a*)), l'apoptose (*BAX*, *BBC3* (PUMA), *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*), *NOXA*) et la sénescence, au travers desquels il exerce son effet anti-prolifératif. Les mutants de *TP53* exercent un effet dominant négatif et s'incorporent aux tétramères nécessaires à l'activité transcriptionnelle de p53, ce qui la perturbe. L'expression basale de p53, liée au stress physiologique (en dehors d'un stress aigu), active p21 (régulateur du cycle cellulaire, empêchant la transition entre les phases G1 et S) et le gène *MDM2* de manière constitutive. *MDM2* est un régulateur négatif de p53 qui fonctionne comme une E3-ubiquitine ligase et assure le rétro-contrôle négatif de l'expression de p53.

Les gènes suppresseurs de tumeurs régulés par p53 peuvent être haploinsuffisants, une seule copie fonctionnelle de ces gènes ne suffit pas à exercer leur fonction et l'inactivation d'un seul des deux allèles peut être la cause d'un développement tumoral. Cela permet de comprendre la tumorigénicité des mutations de p53 (Pappas et al., 2017). p53 est un gardien majeur de l'intégrité du génome et les altérations de *TP53* semblent être au cœur de la transformation maligne, autorisant des altérations génétiques multiples. La plupart des mutations de *TP53* sont des substitutions de bases ou des pertes alléliques. Une mutation germinale de *TP53* entraîne une prédisposition héréditaire à certaines tumeurs, définissant le syndrome de Li-Fraumeni (Olivier et al., 2010). L'inactivation de la voie p53 intervient dans 60 à 80% des CCR de type CIN, mais également dans 30 à 50% des CCR de phénotype MSI où le gène *BAX*, du fait d'une séquence répétée de huit guanines, est la cible de l'instabilité microsatellitaire (Hager and Gu, 2014).

#### **2.3.4. La voie de l'Epidermal Growth Factor (EGF)**

Le récepteur de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), aussi appelé HER1, est un récepteur des facteurs de croissance à activité tyrosine-kinase, dont le domaine effecteur est intracellulaire. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire dont les ligands, principalement l'EGF, le TGF $\alpha$ , l'amphiréguline, l'épiréguline et les neurégulines, se fixent au niveau de son domaine extracellulaire. Cela entraîne l'homo ou l'hétérodimérisation de ce récepteur et son activation par phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques du domaine intracellulaire. L'activation de ce récepteur est responsable de l'activation de deux voies, RAS/RAF/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et PI3K/AKT (*Phosphatidyl Inositol3-Kinase*), qui sont des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la prolifération, la différenciation, la migration, l'adhésion cellulaire, l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose. L'EGFR est surexprimé dans 30 à 85% des cancers colorectaux (Cohen, 2005) et il est

impliqué dans les phases précoces du développement tumoral. Dans 10 à 15% des CCR, l'EGFR est surexprimé, mais les voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT sont aussi activées de manière constitutive dans d'autres cas, avec pour conséquence, une activation constitutive de la cascade de signalisation de l'EGFR dans plus de 70% des CCR (Laurent-Puig et al., 2010).

#### 2.3.4.1. La voie Ras/Raf/MAPK

Cette voie de signalisation est activée en réponse à la stimulation de récepteurs tels que l'EGFR. Elle implique des GTPases qui sont des protéines dont la forme active est couplée au GTP et la forme inactive au GDP se comportant comme des « interrupteurs moléculaires ». Ces protéines permettent la transmission nucléaire de signaux extracellulaires qui interviennent dans la prolifération, la différenciation, la mobilité et la survie. Trois gènes codent les protéines Ras : *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* et sont le siège de nombreuses mutations somatiques dans les cancers (Malumbres and Barbacid, 2003). Des mutations somatiques de *KRAS* sont retrouvées dans 40% des CCR et moins de 5% des CCR présentent des mutations de *NRAS*. Il a été montré que ces mutations ne sont pas requises pour les stades précoces du développement tumoral, mais une fois présentes elles exercent un rôle majeur sur le comportement des cellules tumorales. Les mutations les plus fréquentes de *KRAS* sont des substitutions nucléotidiques sur les codons 12, 13, 61 et 146 qui stabilisent la protéine sous sa forme active, liée au GTP. Les protéines Ras exercent leurs effets sur les voies d'aval MAPK et PI3K. Le gène *BRAF* code une sérine-thréonine kinase en aval des protéines Ras qui l'activent. Ce gène est muté dans 10 à 15% des cancers colorectaux uniquement en l'absence de mutation de *KRAS* (mutations mutuellement exclusives) (Barault et al., 2008). La substitution nucléotidique d'une thymine par une adénine, en position 1796, conduit à la substitution d'une valine par un acide glutamique (V>E) au niveau du codon 600 (V600E) qui stabilise la protéine sous sa forme activée. Cette mutation de *BRAF* survient plus fréquemment dans les cancers MSI que CIN et semble associée au phénotype CIMP. Elle a des effets néfastes sur le pronostic, diminuant la survie sans progression ainsi que la survie globale quel que soit le traitement (Ogino et al., 2012) et représente une cause de non réponse aux thérapies anti-EGFR.

Les protéines Ras et B-Raf activées entraînent l'activation d'une protéine kinase MAPK, qui à son tour phosphoryle la MAPK-kinase (MAPKK). Celle-ci active par double phosphorylation la MAPK permettant sa translocation nucléaire et la promotion de l'expression de facteurs de transcription (c-FOS, c-MYC, c-JUN) qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans l'initiation du cycle cellulaire. Une induction des marqueurs des

cellules souches cancéreuses par la mutation *KRAS* a été mise en évidence en présence de la mutation du gène *APC*. En effet, la mutation *KRAS* renforce l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine favorisant la localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. La surexpression des formes constitutivement actives des gènes *KRAS*, *BRAF* et *MEK1* (MAPKK) suffit à induire la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), associée à une perte des marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine et l'occludine. Les cellules ainsi transformées perdent leur polarité épithéliale et acquièrent une capacité de migration et d'invasion dépendante de l'activité MEK (Moon et al., 2014).

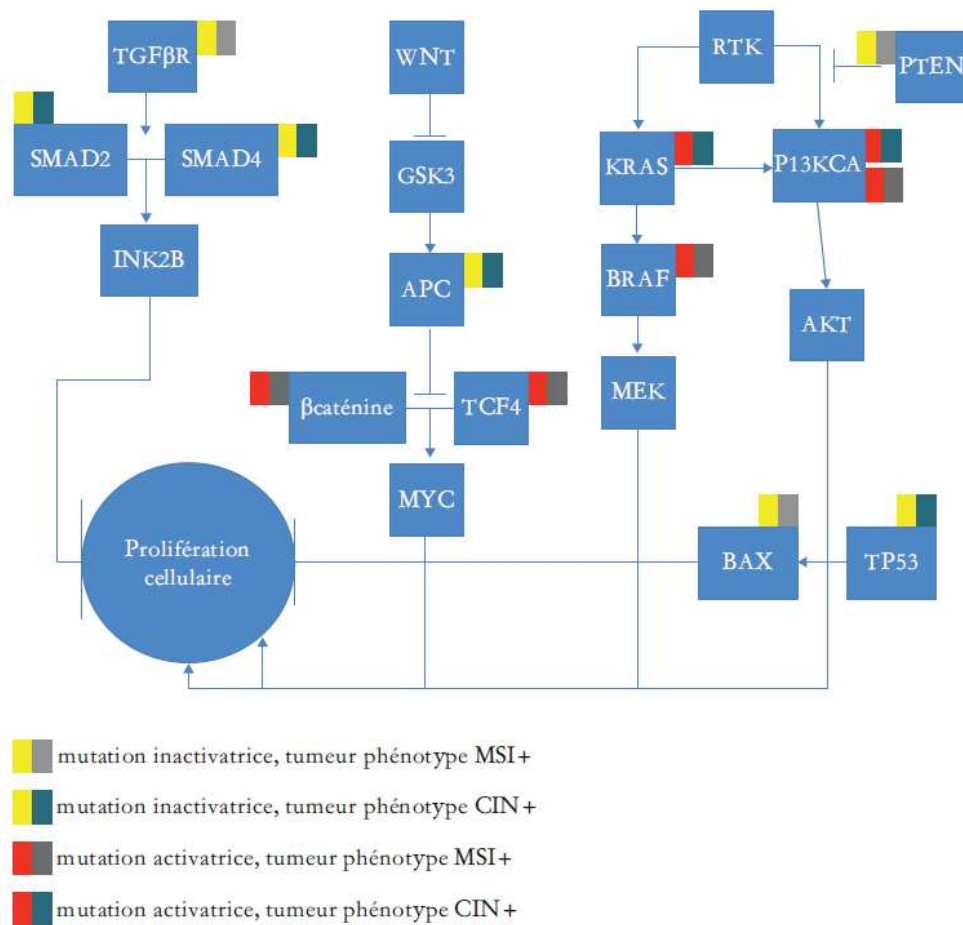
#### 2.3.4.2. La voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT appartient à la même famille que la voie RAS/MAPK, son fonctionnement et ses rôles cellulaires sont proches. Elle peut être activée par la phosphorylation de résidus tyrosine d'un récepteur tyrosine kinase, comme le récepteur de l'EGF. Cela permet le recrutement de la sous-unité catalytique de PI3K qui génère du PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) à partir du PIP2 (*Phosphatidyl Inositol diphosphate*). Des protéines kinases solubles PDK1 et PDK2 (*Phosphoinositide Dependent Kinase*) sont activées par le PIP3. PDK1 phosphoryle une sérine thréonine kinase (AKT), activée par la phosphorylation par PDK2. Une fois activée, la protéine AKT régule la transcription de l'ARN messager en permettant le recrutement de la petite sous-unité ribosomale. La protéine GSK3 $\beta$  inactivée par phosphorylation ne permet plus la dégradation des protéines par la voie du protéasome entraînant l'accumulation de cycline D1 et l'initiation du cycle cellulaire (Zoratto et al., 2014). Des mutations activatrices affectent la sous-unité catalytique de PI3K (*PI3KCA*) dans 12 à 15% des CCR, à fréquence égale entre les tumeurs de phénotype CIN et MSI. Il existe une association significative entre les mutations de *KRAS* et *PI3KCA*. La phosphatase PTEN (*Phosphatase with Tensin Homology*) permet d'inhiber la voie PI3K/AKT en favorisant la transformation du PIP3 en PIP2, ce qui lui confère un rôle de gène suppresseur de tumeur. Cependant, le gène *PTEN* est altéré (mutations, pertes alléliques ou hyperméthylation du promoteur) dans 15 à 30% des CCR indépendamment du statut MSI. Au sein des tumeurs MSS, les mutations de *PI3KCA* sont plus fréquemment associées au phénotype CIMP et affectent le côlon proximal. Une étude récente a mis en évidence le bon pronostic des CCR MSS associés à des mutations de *PI3KCA* (stades I à III). Bien que le mécanisme de cet avantage ne soit pas clairement élucidé, cela pourrait remettre en cause la nécessité d'une chimiothérapie adjuvante des stades II et III de ces patients (Manceau et al., 2015). Cette cohorte n'a pas permis de confirmer l'effet favorable de la prise d'aspirine en



fonction du statut PI3KCA. En effet, l'aspirine inhibe la signalisation PI3K par inhibition de la cyclo-oxygénase 2 (Liao et al., 2012). Enfin, la perte d'expression de la protéine PTEN prédit un mauvais taux de réponse global et un bénéfice clinique réduit des thérapies anti-EGFR (Therkildsen et al., 2014).

Bien que par des mécanismes moléculaires différents, les trois phénotypes CIN, MSI et CIMP entraînent des altérations fonctionnelles similaires des voies de signalisation majeures impliquées dans la tumorigenèse colorectale, dont le résultat commun est de conférer un avantage prolifératif aux cellules (Figure 16).



**Figure 16 Mutations des voies de signalisation en fonction du phénotype de CCR**  
(Laurent-Puig et al., 2010)

Le tableau suivant résume les acteurs majeurs impliqués dans la tumorigenèse colorectale (Tableau 8).

Gène	Fonction	Mécanisme par lequel la mutation augmente le risque de CCR
<i>APC</i>	Gène suppresseur de tumeur	Les mutations inactivatrices entraînent une perte de régulation des microtubules durant la mitose
<i>TP53</i>	Gène suppresseur de tumeur	Les mutations inactivatrices entraînent une perte de régulation de l'arrêt du cycle cellulaire et de la mort cellulaire
<i>RAS</i>	Oncogène	Les mutations activatrices favorisent la croissance cellulaire (voie MAPK)
<i>BRAF</i>	Oncogène	Les mutations activatrices favorisent la croissance cellulaire (voie MAPK)
<i>PIK3CA</i>	Oncogène	Les mutations activatrices régulent positivement la voie de signalisation PI3K ce qui favorise la synthèse des prostaglandines E2 et inhibe l'apoptose
<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>	Gènes MMR	Les mutations inactivatrices perturbent la capacité de réparation au sein des séquences répétées
<i>EPCAM</i>	Code une glycoprotéine transmembranaire molécule d'adhésion cellulaire épithéliale	La délétion de l'extrémité 3' d'EPCAM conduit à l'extinction épigénétique de <i>MSH2</i> (Spaepen et al., 2013).
<i>MYH</i>	Gène du système Base Excision Repair	Une mutation germinale inactivatrice de MYH conduit à des mutations somatiques du gène <i>APC</i> .

**Tableau 8 Gènes impliqués dans la tumorigenèse colorectale**  
(Zoratto et al., 2014)



## 2.4. Sous-groupes moléculaires des cancers colorectaux

En 2015, un consortium international a été créé (CRCSC, *Colorectal Cancer Subtyping Consortium*) entre différents groupes d'experts afin d'homogénéiser les classifications existantes des cancers colorectaux. Les résultats de six précédents algorithmes de classification, selon les profils d'expression génique (n = 4151 patients) ont été normalisés. Ces résultats issus de différentes plateformes d'expression génique ont été effectivement obtenus de manière rétrospective ou prospective, à partir de différents types d'échantillons. Ce travail collaboratif, de grande envergure, a eu pour ambition d'élaborer une classification plus juste facilitant sa transposition clinique, afin d'optimiser la prise en charge des patients (Guinney et al., 2015).

Cela a permis de décrire quatre grands sous-types moléculaires, appelés CMS1-4 (*Consensus Molecular Subtype*), intégrant les précédentes classifications.

- Le CMS1, MSI, Immunitaire (14% des CCR) se caractérise par un génotype hypermuté, avec un faible taux de variations du nombre de copies. Ce sous-groupe englobe la majorité des tumeurs MSI et présente une surexpression des protéines de réparation de l'ADN, concordant avec un système MMR déficient. Ces tumeurs présentent un phénotype hyperméthylé (CIMP), où *BRAF* est fréquemment muté. L'expression de gènes associés à la diffusion d'un infiltrat immunitaire (T<sub>H</sub>1 et LT cytotoxiques) est concomitante à l'activation des voies d'échappement à la réaction immunitaire. Ces cancers représentent ainsi des cibles pour les thérapies d'inhibition des points de contrôle du système immunitaire. D'un point de vue clinique, ces tumeurs sont fréquemment retrouvées chez les femmes, avec des lésions proximales, associées à un très mauvais pronostic après rechute.
- Le CMS2, canonique (37% des CCR) est caractérisé par une forte variation du nombre de copies plus importante que dans les autres sous-groupes, phénotype CIN. Les gains de copies concernent les oncogènes et des pertes de copies les gènes suppresseurs de tumeurs. Les profils d'expression génique illustrent la différenciation épithéliale et la régulation positive des gènes cible de *WNT* et *MYC*. Ces tumeurs sont préférentiellement retrouvées au niveau du côlon gauche, avec de meilleurs taux de survie après rechute.
- Le CMS3, métabolique (13% des CCR), présente des profils d'expression génique et épigénétiques différents des deux autres sous-types CIN, avec moins de variations du nombre de copies (CMS2 et 4). 30% des échantillons présentent un phénotype

hypermuté (chevauchement avec CMS1) et une plus grande prévalence de sous-groupes avec un phénotype CIMP faible (*CIMP-low*) qui correspond à des niveaux intermédiaires de méthylation du génome. Les mutations activatrices de *KRAS* et d'autres gènes du métabolisme sont fréquentes dans ce sous-type.

- Le CMS4, mésenchymal (23% des CCR), présente des profils d'expression génique avec une importante régulation positive des gènes impliqués dans l'EMT (*Epithelial to Mesenchymal Transition*). La voie du TGF $\beta$ , l'angiogenèse, les voies de remodelage de la matrice et la réponse inflammatoire associée au complément sont également activées. Ces tumeurs sont majoritairement diagnostiquées à des stades avancés (II à IV), ce qui conduit à une moins bonne survie globale et sans rechute.

Mise à part l'activation de la voie des récepteurs tyrosine kinase dans les sous-groupes CMS1 et 3, aucune autre association spécifique n'a été identifiée, soulignant les faibles corrélations entre génotype et phénotype dans le CCR. Le tableau ci-dessous, adapté de cette étude, résume cette classification des cancers colorectaux (Guinney et al., 2015).

CMS1 MSI Immun	CMS2 Canonique	CMS3 Métabolique	CMS4 Mésenchymateux
14%	37%	13%	23%
MSI CIMP++ Hypermutés	Variations du nombre de copies importantes CIN++	Mélange de status MSI CIN faible CIMP faible	CIN++
<i>BRAF</i> mutés		<i>KRAS</i> mutés	
Infiltrat immunitaire et activation	<i>WNT</i> and <i>MYC</i> activation	Dérèglement métabolique	Infiltration stromale Activation du TGF $\beta$ Angiogenèse
Mauvaise survie après rechute			Mauvaise survie globale et après rechute

**Tableau 9 Taxonomie du cancer colorectal**  
Adapté de (Guinney et al., 2015)

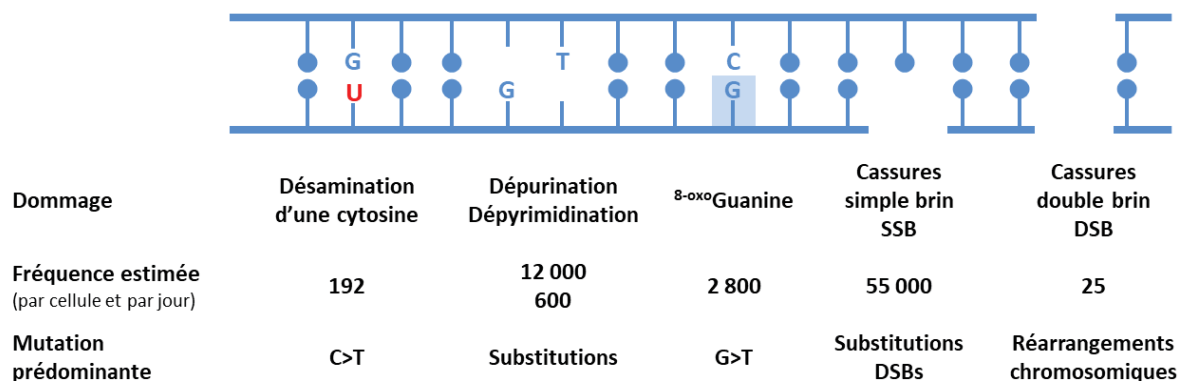
Il demeure néanmoins encore difficile de se prononcer sur la pertinence de ces outils de classification concernant l'évaluation du pronostic et les résultats attendus des traitements. Peu de biomarqueurs, mis à part les mutations de *RAS*, *BRAF* et les statuts MSI et CIMP, se sont traduits par une adaptation des traitements. Cela est lié au fait que la présence prépondérante d'un marqueur génétique ou épigénétique dans l'un des 4 sous-groupes n'est pas toujours exclusif, comme l'illustrent des mutations de *KRAS* retrouvées dans d'autres sous-types que celui où elles sont majoritaires. Cela peut expliquer les différences de réponses aux traitements au sein d'un même sous-type.

L'évaluation du génome, au niveau germinale et tumoral, pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients en leur proposant le traitement le plus adapté. Cependant, l'ensemble des connaissances accumulées sur le CCR doivent favoriser les moyens de prévention et de détection précoce, essentiels pour réduire significativement la morbidité et la mortalité de ces cancers (Vogelstein et al., 2013b).

### **3. La réparation de l'ADN**

Plus que ne peuvent l'expliquer les facteurs environnementaux et les prédispositions génétiques héréditaires, le nombre de divisions cellulaires des cellules souches d'un organe, est fortement corrélé ( $r = 0,81$ ,  $p < 3,5 \cdot 10^{-8}$ ) au risque de développer un cancer de cet organe (Tomasetti and Vogelstein, 2015).

Le génome humain contient environ  $6 \cdot 10^9$  nucléotides et subit en permanence des modifications induites par des molécules réactives endogènes, produites par la respiration mitochondriale ou la réponse inflammatoire. Les ultraviolets, les rayonnements ionisants, les métaux lourds, les polluants atmosphériques et les médicaments cytotoxiques sont autant de molécules exogènes susceptibles d'endommager l'ADN. Le nombre de lésions quotidiennes de l'ADN par cellule a été estimé à 70 000 (Lindahl and Barnes, 2000), que ce soient des lésions spontanées, liées au métabolisme cellulaire ou des erreurs de réplication. Les polymérases qui assurent la réplication du génome, sont elles-mêmes responsables d'erreurs ( $10^{-7}$  par nucléotide), malgré leur grande fidélité de réplication, due à leur capacité de correction intrinsèque. Les erreurs qu'elles provoquent entraînent une perte de complémentarité des deux brins et soulignent l'importance de la réplication dans la mutagenèse (McCulloch and Kunkel, 2008). La prolifération soutenue des cellules cancéreuses est responsable d'une déplétion de la réserve de dNTP, accentuant le risque d'erreurs. Les dommages subits par l'ADN peuvent être des modifications de bases (plus ou moins étendues), des cassures de brins, des croisements intra ou inter-brins ou encore des adduits protéine-ADN. La majorité des lésions (75%) correspond à des cassures simple brin, dues à des dommages oxydatifs ou hydrolytiques qui peuvent évoluer en cassures double brin, moins fréquentes mais plus dangereuses (Figure 17). Pour maintenir et préserver l'intégrité du génome, les cellules ont développé des systèmes de reconnaissance, de réparation et/ou de tolérance de ces dommages (Friedberg, 2003).



**Figure 17** Fréquence estimée des lésions de l'ADN et des mutations associées par jour

Adapté de (Tubbs and Nussenzweig, 2017)

En amont de la réparation, la détection et l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN ou DDR (*DNA Damage Response*) est primordiale (Harper and Elledge, 2007). Au sein des complexes moléculaires capables de détecter tout type de lésion dans le seul but de préserver l'intégrité du génome, les deux plus connus sont ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (*ATM and Rad3-related*). Ces kinases, activées dans les minutes qui suivent le dommage, appartiennent à la famille des *phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases* (PIKKs). ATM est activée en réponse aux radiations ionisantes et aux cassures double-brin, alors que les UV et les erreurs de réplication activent préférentiellement ATR. L'activation de ces kinases entraîne l'expression de facteurs de transcription qui contrôlent différents systèmes de réparation et permet l'arrêt momentané du cycle cellulaire, nécessaire à la réparation du dommage.

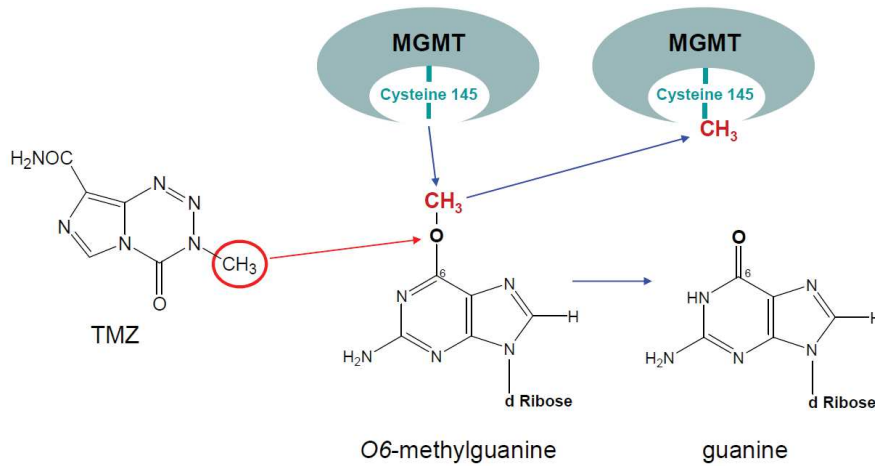
Le type de lésions détermine la kinase qui sera activée et le mécanisme de réparation d'aval (Gavande et al., 2016). Cet arrêt peut avoir lieu à deux transitions clé du cycle cellulaire dont le passage est régulé par des points de contrôle (*checkpoint*). Les « G1/S *checkpoint* » désignent les points de contrôle qui bloquent l'entrée en phase S (Cdk2, *Cyclin Dependent Kinase 2*) et les « G2 DNA damage *checkpoint* » les arrêts qui ont lieu avant l'entrée en phase M (blocage de Cdk1). ATM et ATR activent par phosphorylation les kinases Chk2 (Thr 68) et Chk1 (Ser345) qui inactivent les cyclines Cdc25A et Cdc25C. Cdk1 et 2 sont inactivées et le cycle cellulaire est arrêté, respectivement en phase G2/M ou G1/S. ATM et ATR peuvent phosphoryler directement p53 (Ser 15) ce qui stimule sa transactivation, de même que Chk1 et Chk2 (Ser 20), ce qui empêche la fixation de MDM2 et la dégradation de p53. La stabilisation et la transactivation de p53 entraînent l'induction de p21 qui inhibe le complexe Cdk2 - cyclin E - PCNA induisant un blocage en phase G1/S (Christmann et al., 2003). Lorsque la lésion n'est pas correctement réparée avant la fourche de réplication, il

existe une voie de tolérance aux dommages permettant d'éviter un arrêt de la réplication, il s'agit de la synthèse translésionnelle (TLS, *translesion synthesis*), assurée par des polymérases dites « de faible fidélité » (cf. section 3.6). La persistance d'un dommage, due à un défaut de réparation, si elle ne déclenche pas le programme de mort cellulaire, conduit au phénomène de mutagenèse et d'instabilité génomique, éléments prépondérants de la tumorigenèse (Christmann et al., 2003).

Après une vue d'ensemble des différents systèmes de réparation impliqués dans la pathologie cancéreuse, nous porterons une attention particulière au système MMR (*Mismatch Repair*) et aux polymérases translésionnelles, qui nous intéressent particulièrement dans cette étude.

### **3.1. O<sup>6</sup>-méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT)**

L'O<sup>6</sup>-méthylguanine (O<sup>6</sup>-meG) est une lésion mutagénique et cytotoxique fréquente, induite par des agents alkylants endogènes ou exogènes (tels que, le N-méthyl-N-nitroso-urée MNU, méthyl-méthane-sulfonate MMS, les UVC ou encore les radiations ionisantes). La détection d'O<sup>6</sup>-meG au cours de la transcription bloque partiellement l'activité de l'ARN polymérase II. L'O<sup>6</sup>-méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT), aussi connue sous le nom plus générique d'alkyltransférase (AGT), est une enzyme nucléaire qui permet une réparation directe, en une seule étape de ce type de lésion sans autre cofacteur. Elle retire les groupements alkyles en position O<sup>6</sup> de la guanine ou en position O<sup>4</sup> de la thymidine qu'elle transfère sur un résidu cystéine de son site catalytique (Christmann et al., 2011) (Figure 18). Cela restaure une base intacte et inactive la protéine MGMT qui peut être ubiquitinylée et dégradée. Ces lésions peuvent également être contournées par les polymérases translésionnelles, que nous décrirons plus loin, telles que les polymérases  $\eta$ ,  $\kappa$  et  $\zeta$ . Cependant, une fois la lésion dépassée, des bases cytosine ou uracile sont incorporées en regard de la base alkylée, ce qui produit des fragments d'ARN mutants pouvant coder une protéine défectueuse (Burns et al., 2010).

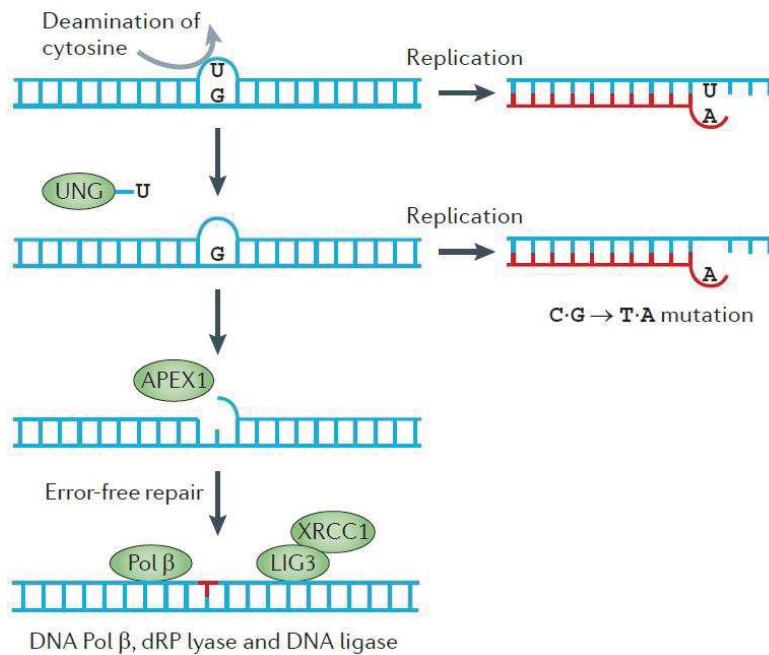


**Figure 18 O<sup>6</sup>-MéthylGuanineMéthylTransférase MGMT**  
(Zhang *et al.* 2012)

Des agents alkylants sont utilisés dans le traitement de glioblastomes ou de mélanomes métastatiques, tels que le témozolomide et la dacarbazine, contre lesquels la présence de MGMT permet de protéger les cellules (Christmann and Kaina, 2013). L'expression et l'activité de cette enzyme sont très variables, forte dans le foie et le côlon, très faible dans le cerveau. Son expression est fortement régulée au niveau transcriptionnel principalement par les facteurs de transcription p53, Sp1, AP-1 et Nf-κB, dont des sites consensuels de fixation sont retrouvés dans la séquence promotrice de cette enzyme (Bocangel *et al.*, 2009).

### 3.2. Le système de réparation par excision de base (BER)

Les modifications de bases sont des lésions très courantes, provoquées par l'oxydation, l'alkylation ou la désamination, qui expliquent que le système BER soit actif tout au long du cycle cellulaire. Il existe au moins cent lésions oxydatives différentes principalement liées à la respiration mitochondriale. La lésion la plus abondante est l'oxydation de la guanine en 8-oxo-dihydroguanine (8-oxo-dG) (plus de 180 guanines sont oxydées par jour dans le génome) (Lindahl, 1993). La 8-oxo-dG peut s'apparier avec une adénine ou une cytosine au cours de la réplication et provoquer des transitions nucléotidiques (Brégeon and Doetsch, 2011). La désamination est une autre réaction spontanée qui produit de l'uracile à partir de la cytosine, de l'inosine à partir de l'adénine et de la xanthosine à partir de la guanine. Cela conduit également à des transitions nucléotidiques (les bases lésées uracile et inosine pouvant s'apparier respectivement avec une adénine ou une cytidine). Ces lésions mutagènes peuvent freiner ou bloquer la progression des ARN polymérases et activer les réponses de mort cellulaire. Le fonctionnement du système est illustré ci-après (Figure 19).



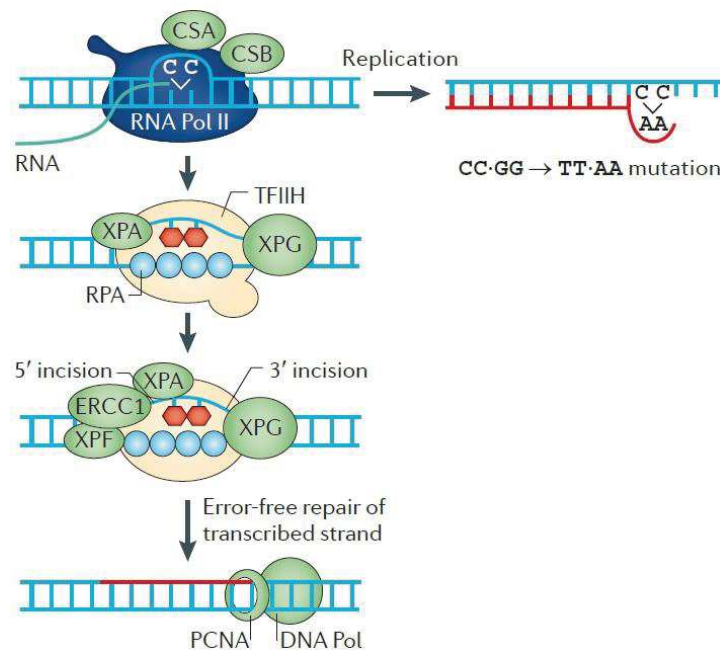
**Figure 19 Le système de réparation par excision de base (BER)**  
(Helleday et al., 2014)

La première étape de la prise en charge de ces lésions par le système BER est réalisée par des glycosylases mono ou bifonctionnelles, spécifiques de la lésion, qui reconnaissent et hydrolysent la liaison N-glycosidique de la base endommagée, laissant un site abasique (AP pour apurinique ou apyrimidique) (Odell et al., 2013). Les ADN glycosylases monofonctionnelles telles que l'uracile-ADN-glycosylase (UNG) et la N-méthylpurine-ADN-glycosylase (MPG), ne possèdent qu'une activité glycosylase. Les ADN glycosylases bifonctionnelles, comme la 8-oxoguanine-ADN-glycosylase (OGG1), l'homologue mutY (MUTYH), l'endonucléase III-like 1 (NTH1) et NEIL1 présentent en plus une activité intrinsèque 3'AP lyase (Jacobs and Schär, 2012). Des mutations germinales de *MUTYH* sont associées au développement de la polypose colorectale familiale associée à *MUTYH* (MAP) (Cheadle and Sampson, 2007). Les sites abasiques sont convertis en cassures simple brin par des endonucléases (APE1), puis sont comblés par une ADN polymérase ( $\beta$  si cela ne concerne qu'une seule base,  $\delta$  ou  $\epsilon$ , si la lésion concerne un plus grand nombre de bases). La ligature du point de coupure est assurée par une ligase.



### 3.3. Le système de réparation par excision de nucléotide (NER)

Il existe deux sous-types majeurs de cette voie de réparation, la réparation globale du génome (GG-NER, *Global Genome*), indépendante du cycle cellulaire, qui prévient la mutagenèse en recherchant les lésions qui perturbent la structure hélicoïdale de l'ADN (Gillet and Schärer, 2006) et celle couplée à la transcription (TC-NER, *Transcription Coupled*), qui gère les lésions bloquant la transcription. Ces lésions peuvent être des dimères générés par les UV, des adduits de bases provoqués par des agents chimiques (cisplatine et le benzo[a]pyrène) ou encore des lésions dues aux espèces réactives de l'oxygène, telles que les cyclopurines. La réponse NER se déroule en quatre grandes étapes (Figure 20).



**Figure 20** Le système *Nucleotide Excision Repair* (NER)  
(Helleday et al., 2014)

Le système reconnaît le dommage, coupe le brin de part et d'autre de la lésion et élimine le fragment contenant la lésion. S'ensuivent une étape de synthèse du nouveau brin d'ADN et la ligature du point de coupure (Iyama and et al, 2013). Les deux sous-types de réparation de ce système ne diffèrent que dans l'étape de reconnaissance des dommages. Concernant le GG-NER, le complexe XPC-RAD23B se fixe sur le brin opposé à la lésion (Schärer, 2007). Une fois lié, ce complexe recrute le facteur de transcription II H (TFIIH) qui favorise l'ouverture de l'ADN autour de la lésion permettant le recrutement de la protéine de réplication A (RPA) qui se lie au brin lésé (Missura et al., 2001). Les protéines spécifiques de la reconnaissance TC-NER sont les protéines CSA et CSB (pour *Cockayne syndrome WD repeat protein A* et



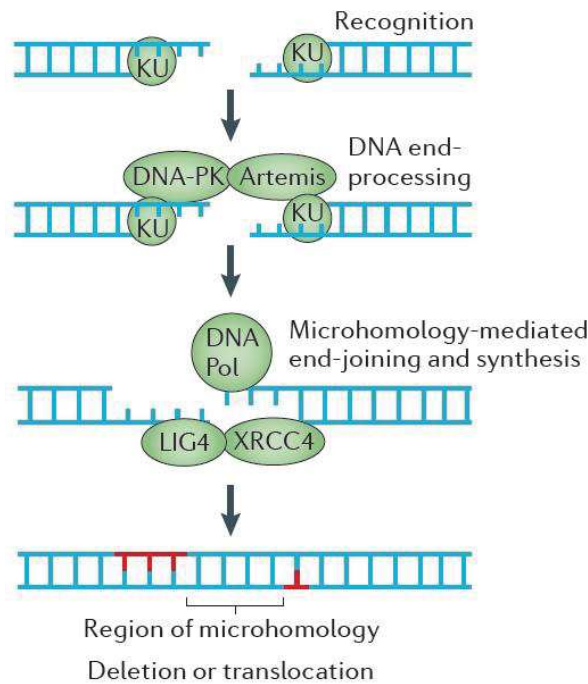
B), nécessaires à l'assemblage des autres composants (Marteijn et al., 2014). Le complexe XPF-ERRC1 (*excision repair cross-complementing 1*) et XPG sont deux endonucléases qui assurent respectivement l'incision en 5' et 3' du dommage. Ce sont les polymérases  $\epsilon$ ,  $\delta$  ou  $\kappa$  qui assurent la nouvelle synthèse en coopération avec le facteur de réplication RFC (*Replication Factor C*) et l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) (Ogi et al., 2010). Le choix de la polymérase dépend du statut prolifératif des cellules, Pol $\delta$  et  $\kappa$  étant les principales polymérases du système NER des cellules en prolifération. Des défauts de ce système entraînent des maladies autosomiques récessives qui se caractérisent par une sensibilité accrue aux rayonnements UV, comme le *Xeroderma Pigmentosum* ou le syndrome de Cockayne (Diderich et al., 2011).

### **3.4. Réparation des cassures double brin (DSBR)**

Les cassures double brin sont les lésions les plus délétères. Elles activent des réponses de mort cellulaire, en l'absence de réparation, et favorisent l'instabilité génomique, par des phénomènes de translocations, si elles sont mal réparées (Bohgaki and al., 2010). Elles peuvent être d'origine exogène (radiations ionisantes, anticancéreux) ou encore induites par le métabolisme cellulaire (espèces réactives de l'oxygène). La réparation simultanée des deux brins opposés ou un défaut de réplication peuvent également être en cause. Les cassures double brin sont également des intermédiaires naturels des réarrangements V(D)J qui assurent la diversité des immunoglobulines (Soulas-Sprauel et al., 2007) (cf. section 3.5.3). La réparation de ce type de lésions fait intervenir deux voies majeures qui entrent en compétition et dont le choix est déterminé par le stade du cycle cellulaire. En effet, la recombinaison homologue (HR, *Homologous Recombinaison*) a lieu dans les cellules en division durant la phase S du cycle cellulaire, car elle nécessite la présence de la chromatide sœur comme support de correction, alors que la jonction des extrémités non homologues (NHEJ, *Non Homologous End Joining*) fonctionne indépendamment du cycle cellulaire. L'initiation de la réparation nécessite la reconnaissance du dommage, assurée par un complexe capable de se lier à l'ADN et le maintien d'une jonction entre les deux extrémités de la cassure. L'inhibition de la résection favorise la NHEJ, alors qu'une résection étendue favorise la HR.

### 3.4.1. La jonction des extrémités non homologues (NHEJ)

La jonction des extrémités non homologues est le principal système de réparation des cassures double brin chez les eucaryotes, notamment lors des phases du cycle cellulaire où la chromatide sœur est absente, avec une plus grande activité en phase G1 (Lieber, 2010). Il permet la ligature directe des deux extrémités de la cassure. C'est un mécanisme très précis pour les cassures propres, mais source de nombreuses erreurs si les extrémités ne sont pas nettes. Il est non conservatif (contrairement à la réparation par recombinaison homologue), il ne restaure pas la séquence initiale de l'ADN, mais seulement la continuité de l'ADN endommagé par une cassure double brin avec généralement une perte partielle de l'information génétique pouvant engendrer une mutation. La réparation se déroule en trois étapes (Figure 21).



**Figure 21** Le système de jonction des extrémités non homologues (NHEJ)  
(Helleday et al., 2014)

La reconnaissance de la cassure double brin par le complexe Ku permet sa liaison directe aux deux extrémités de l'ADN. En fonction de la complexité de la cassure et de la nature des deux extrémités, différents facteurs peuvent être recrutés. L'endonucléase Artemis se positionne au niveau des surplombs simple brin en 3' et 5' et permet l'élimination des extrémités non complémentaires ou d'autres dommages à partir du point de cassure pour mettre en évidence de courtes séquences d'homologie et permettre la liaison par une ligase des deux extrémités (Heyer et al., 2010).

### 3.4.2. La recombinaison homologue (HR)

Ce système semble avoir évolué pour faire principalement face aux cassures double brin à une seule extrémité, caractéristiques des collapsés de la fourche de réplication, en présence de lésion empêchant la progression de la polymérase des cellules en cours de division. Ce système nécessite la présence de la chromatide sœur intacte comme modèle pour l'échange d'information. Le complexe MRN (formé par MRE11-RAD51 et la protéine NBS1) reconnaît la cassure et recrute ATM (Stracker and Petrini, 2011). Ce complexe MRN s'associe à la CtIP (*C-terminal Binding Protein-Interacting Protein*) qui assure la résection de 5' en 3' pour fournir l'extrémité 3' simple brin surplombante qui va servir à l'échange de brin (Sartori et al., 2007). La poursuite de la résection est assurée par une exonucléase et le simple brin résultant est stabilisé par la fixation de la protéine RPA qui au travers d'une interaction avec ATRIP, active ATR. La protéine Rad52 favorise le remplacement de RPA par Rad51 ce qui permet la formation des filaments nucléoprotéiques. Le simple brin d'ADN chargé de protéine Rad51 peut ainsi envahir la matrice duplexe d'ADN homologue (New et al., 1998). Après l'invasion et l'échange, l'extrémité 3' envahissante est alors étendue par synthèse d'ADN (polymérase  $\eta$ ), en utilisant le brin complémentaire du duplexe comme matrice (McIlwraith et al., 2005). Cela crée une boucle de déplacement (D-loop, *Displacement loop*) qui correspond à cet intermédiaire à trois brins. Une fois cette boucle formée, il existe deux modèles de résolution, le premier implique la formation d'une jonction de Holliday (jonction mobile entre quatre brins d'ADN), le second la voie de synthèse dépendante de l'hybridation du brin, SDSA (*Synthesis Dependant Strand Annealing*) qui se caractérise par le déplacement du brin envahissant de la boucle D et son appariement à la seconde extrémité de la cassure double brin (Heyer et al., 2010).

### 3.5. Le système de réparation des mésappariements (MMR)

Le système de réparation des mésappariements (MMR, *MisMatch Repair*) est un système post-réplicatif majeur pour le maintien de l'intégrité du génome, prévenant l'instabilité liée aux substitutions de bases ou aux séquences répétées. En effet, si l'intégrité de l'information génétique dépend de la précision du processus répliatif, elle dépend également des mécanismes de surveillance dont le système MMR fait partie. Les polymérases répliatives sont capables de relire et corriger leurs propres erreurs mais le système MMR correspond à un second contrôle qualité. Il augmente de 100 fois le niveau de fidélité de la répliation. Il reconnaît non seulement les erreurs qui ont échappé aux polymérases répliatives mais également les bases mésappariées et les ramifications d'ADN formées durant la recombinaison, de même que les bases modifiées chimiquement (Jiricny, 2006). Le système de réparation des mésappariements est impliqué dans des processus majeurs du métabolisme de l'ADN tels que l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose mais aussi d'autres phénomènes qui font intervenir les fonctions non canoniques de ce système (Peña-Diaz and Jiricny, 2012) (cf. section 3.5.3). Il permet l'élimination des cellules sévèrement endommagées, évitant la mutagenèse à court terme et la tumorigenèse à long terme (Iyama and et al, 2013). Un défaut du système MMR augmente le taux de mutations spontanées accentuant la susceptibilité aux cancers. Des mutations germinales de gènes majeurs de ce système sont responsables du syndrome de Lynch (cf. section 1.3) (Boland, 2016; Lynch and Chapelle, 1999).

#### 3.5.1. Composition

Un grand nombre de protéines du système MMR chez l'Homme ont été identifiées sur la base de leur homologie avec les protéines MMR bactériennes chez *Escherichia coli* (Tableau 10). Ce système est très conservé entre les espèces au cours de l'évolution. Cela concerne les homologues humains de MutS, MutL, EXOI, la protéine de liaison à l'ADN simple-brin RPA (*Replication Protein A*), l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), l'ADN polymérase  $\delta$  (Pol $\delta$ ) et l'ADN ligase I. La réaction de base du système MMR est une réaction au cours de laquelle la région d'un brin néosynthétisé contenant une base mésappariée est excisée et à nouveau synthétisée (Modrich, 2006). Les deux éléments majeurs de la réponse MMR sont MutS et MutL (Larrea and al., 2010). A la différence d'*E. Coli* où MutS et MutL sont des homodimères, ce sont des hétérodimères chez l'Homme. Chez les eucaryotes, il existe deux équivalents fonctionnels de MutS, MutS $\alpha$  et

MutS $\beta$ . Les protéines sont nommées hMSH pour *human MutS Homolog*, où *Mut* vient de *mutator* (simplifié en MSH). MSH2 forme un hétérodimère avec MSH6 ou MSH3 pour former respectivement MutS $\alpha$  et MutS $\beta$ . Ces deux complexes sont des ATPases qui jouent un rôle important dans la reconnaissance du mésappariement et l'initiation de la réparation. MutS $\alpha$  reconnaît préférentiellement les mésappariements base-base et les boucles d'insertion/délétion de 1 à 2 nucléotides. Le complexe MutS $\beta$ , composé des protéines MSH2 et MSH3, prend en charge les boucles d'insertion/délétion d'au moins deux bases. Le troisième complexe MSH (MSH4/MSH5) n'exerce pas de fonction dans la réparation des mésappariements, mais il est important dans la recombinaison méiotique. Il existe quatre homologues de MutL identifiés chez l'Homme hMLH1, hMLH3, hPMS1 et hPMS2. MLH1 s'associe en hétérodimère avec PMS2, PMS1, ou MLH3 pour former respectivement les complexes MutL $\alpha$ , MutL $\beta$  ou MutL $\gamma$ . MutL $\alpha$  possède une activité ATPase indispensable au fonctionnement du système. MutL $\beta$  et MutL $\gamma$  semblent avoir des rôles mineurs dans le MMR. MutL $\gamma$  joue un rôle dans la méiose. La fonction de coupure est assurée par les complexes MutL $\alpha$  et MutL $\gamma$ , alors que le complexe MutL $\beta$  ne possède pas d'activité endonucléasique (Kadyrov et al., 2006).

L'exonucléase EXO1, la protéine de réplication RPA, le facteur PCNA, le facteur de réplication RFC (*Replication Factor C*) et l'ADN polymérase répliquative Pol $\delta$  sont des composants de la machinerie répliquative impliqués dans les aspects majeurs du métabolisme de l'ADN, comme la recombinaison. Le rôle de EXO1 dans le système MMR a été identifié par son interaction avec les protéines MSH2 et MLH1 (Schmutte et al., 2001). Cette exonucléase joue un rôle dans l'étape d'excision, mais elle n'est pas essentielle (Kadyrov et al., 2009). Le PCNA est impliqué dans le système MMR lors de l'étape de néosynthèse. Il s'agit d'un facteur de processivité des ADN polymérases répliquatives qui participe à l'activation du système MMR. L'interaction de PCNA avec le complexe MutL $\alpha$  stimule son activité endonucléasique (Goellner et al., 2014). Les interactions entre certaines protéines MMR et le PCNA (motifs *PCNA-interacting peptide*, PIP, aux extrémités N-terminales de MSH3 et MSH6) ont permis de mettre en évidence le couplage du système MMR au processus répliquatif (Hombauer et al., 2011). Le facteur RFC est nécessaire au chargement du facteur PCNA sur l'ADN et la polymérase répliquative Pol $\delta$  apparaît nécessaire lors des reconstitutions *in vitro* sans exclure le rôle éventuel d'autres polymérases. La protéine RPA se lie à l'ADN hétéroduplexe avant que MutS $\alpha$  et MutL $\alpha$  stimulent l'excision du mésappariement. Elle protège l'ADN simple brin généré par l'excision et facilite, lorsqu'elle est phosphorylée, la nouvelle synthèse d'ADN par la polymérase  $\delta$  de la zone interrompue. Sa

forme non phosphorylée favorise l'excision du mésappariement (Genschel and Modrich, 2003).

<i>Escherichia coli</i>	Humain	Fonction
(MutS) <sub>2</sub>	<b>hMutSa (hMSH2-hMSH6)*</b> <b>hMutSβ (hMSH2-hMSH3)</b>	Reconnaissance du mésappariement, du dommage. Complexes partiellement redondants Chevauchement des spécificités de reconnaissance
(MutL) <sub>2</sub>	<b>hMutLα (hMLH1-hPMS2)*</b> <b>hMutLβ (hMLH1-hPMS1)</b> <b>hMutLγ (hMLH1-hMLH3)</b>	Activité endonucléasique intrinsèque, fin de l'excision MutLβ, facteur accessoire du système MutLγ se substitue à MutLα dans une minorité de mésappariements, résolution des intermédiaires de la HR
MutH	<b>Non identifié</b>	Discrimination du brin présentant la lésion
UvrD	<b>Non identifié</b>	DNA helicase II, favorise l'excision
ExoI, ExoVII, ExoX, RecJ	<b>ExoI</b>	Exonucléase double brin 5'-3', Excision du mésappariement
Pol III	<b>Pol δ</b>	Nouvelle synthèse d'ADN
β-clamp	<b>PCNA</b>	Facteur de processivité ; Stimule l'activité endonucléase de MutLα
SSB	<b>RPA (Replication Protein A)</b>	Protéine de liaison ADN simple brin Stimule l'excision du mésappariement Favorise la nouvelle synthèse d'ADN
	<b>HMGB1</b>	Excision provoquée par le mésappariement
γ-Complex	<b>RFC</b>	Chargement de PCNA. Réparation dirigée en 3' du point de coupure
ADN ligase	<b>ADN ligase I</b>	Ligature du point de coupure après synthèse d'ADN

**Tableau 10 Homologues humains des composants du système MMR**

Adapté de (Li, 2007; Reyes et al., 2015)

\*Composant majoritaire dans les cellules

Alors que les protéines PCNA, RPA, RFC et Polδ sont essentielles à la viabilité des cellules, les mutations des protéines MSH2 et MLH1, conduisant à des pertes de fonction, entraînent une perte complète de l'activité MMR. A la différence d'une perte de fonction de la protéine MSH6 qui résulte en un défaut de correction des mésappariements base-base (que lui seul reconnaît). Les protéines MSH3, MLH3 et PMS2 ont des effets légers et redondants avec les autres protéines du système auxquelles elles s'appartiennent (Kolodner, 2016).

### 3.5.2. La réparation des mésappariements

Les polymérases répliquatives (famille B) sont responsables d'un très faible taux d'erreurs lors de la réplication qui peut être drastiquement augmenté en cas de dysfonctionnement du système MMR (Peña-Diaz and Rasmussen, 2015). La réplication est initiée au niveau d'origines de réplication où la polymérase  $\alpha$  assure la première élongation des fragments d'Okazaki (réplication du brin retardé) (O'Donnell et al., 2013), poursuivie par la polymérase  $\delta$ . La polymérase  $\epsilon$  assure la synthèse d'ADN du brin précoce. Ces polymérases majoritaires ( $\delta$  et  $\epsilon$ ) possèdent, à la différence de Pol $\alpha$ , une activité intrinsèque 3'-exonucléasique qui leur permet de corriger une partie de leurs erreurs (Johansson and Dixon, 2013). Il existe de nombreuses illustrations de la réciprocity existant entre le taux, le type et les loci où surviennent les erreurs de réplication et le niveau d'expression et l'efficacité du système MMR. Il a été démontré que la réplication du brin retardé est deux fois moins précise que celle du brin précoce et que le système MMR est deux fois plus efficace dans la réparation des erreurs du brin tardif que du précoce (Lujan et al., 2014).

Le rôle majeur du système MMR est la réparation des erreurs de réplication qui implique la voie MutS $\alpha$ /MutL $\alpha$ . Elle est initiée lorsque l'hétérodimère MutS $\alpha$ , qui comporte deux sites actifs ATPasiques, se fixe au niveau d'un mésappariement (base-base ou petites insertions/délétions). La fixation au mésappariement et la présence d'ATP induisent un changement conformationnel de MutS $\alpha$ , de telle sorte qu'il forme une pince capable de se déplacer le long de l'ADN (Lee et al., 2014; Liao et al., 2015). Cet état activé permet son interaction avec l'hétérodimère MutL $\alpha$ . Le PCNA, chargé sur l'ADN par le RFC, stimule l'activité endonucléasique de MutL $\alpha$  (située à l'extrémité N-terminale de PMS2) pour l'excision du brin néosynthétisé contenant l'erreur (Kadyrov et al., 2006). Le fragment manquant est à nouveau synthétisé sans erreur par la polymérase  $\delta$  ou  $\epsilon$ , puis la ligature, par la ligase I, termine la réaction (Jiricny, 2013) (Figure 22). Le système eucaryote n'utilise pas l'asymétrie de méthylation post-répliquative comme signal discriminant de brin à la différence d'*E. coli* (Putnam, 2016). Bien qu'aucun signal spécifique de brin n'ait été définitivement identifié, le système MMR apparaît dirigé par un point de coupure préexistant lui permettant de discriminer le brin néosynthétisé contenant la base mésappariée. En effet, la seule présence d'un hétéroduplexe au sein d'une molécule d'ADN circulaire ne suffit pas à déclencher la correction du mésappariement. La présence d'une entaille, en 5' ou en 3' du mésappariement, est nécessaire à la correction par les protéines MMR de l'hétéroduplexe en homoduplexe (Fang and Modrich, 1993). L'activité endonucléasique de MutL $\alpha$ , stimulée par le PCNA, permet de générer une coupure spécifique du brin contenant le mésappariement, à proximité



de celui-ci que ce soit en 5' ou en 3' et préférentiellement sur un brin contenant déjà une coupure (Pluciennik et al., 2010).

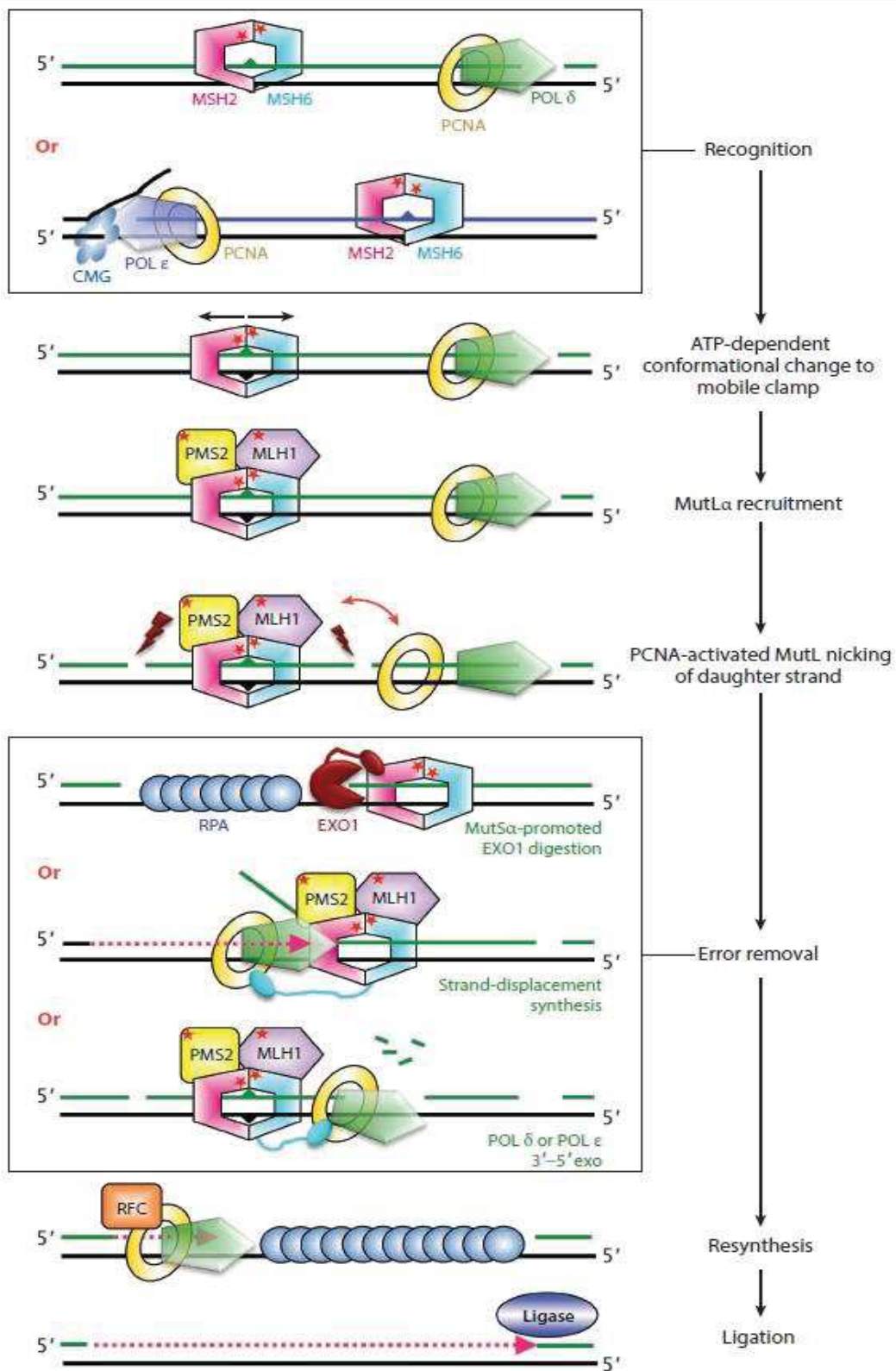


Figure 22 Le système MMR reconstitué (Kunkel and Erie, 2015)



Si le point de coupure préexistant est situé en 5' du mésappariement, le complexe MutL $\alpha$  n'intervient pas dans l'excision mais empêche l'hydrolyse du brin normal. Lorsque le point de coupure se trouve en 3' du mésappariement, MutL $\alpha$  assure la création d'une coupure en 5', ce qui correspond à la principale source d'extrémités d'ADN disponibles pour le retrait des mésappariements. Il semblerait que ce soit le chargement asymétrique du PCNA sur le brin d'ADN par le RFC qui permette la discrimination du brin et l'orientation spécifique de l'activité endonucléasique de MutL $\alpha$  sur le brin néosynthétisé (Erdeniz et al., 2007). Les extrémités 5' des fragments d'Okazaki servent également de signal de discrimination de brin pour le retrait des mésappariements générés durant leur synthèse au niveau des origines de réplication (Lujan et al., 2014). Bien qu'inutile au phénomène de coupure, il semblerait que l'interaction entre MutS $\alpha$  et MutL $\alpha$  permette de localiser l'activité endonucléasique de MutL $\alpha$  à proximité du mésappariement (Kadyrov et al., 2007).

Différents modèles de formation des complexes mésappariement-MutS $\alpha$ -MutL $\alpha$  et de la signalisation subséquente pour la réparation ont été proposés. L'un d'eux suggère que MutS $\alpha$  et MutL $\alpha$  forment une pince coulissante qui diffuse le long de l'ADN jusqu'à son interaction avec le signal de discrimination du brin. Un autre établit une capture de MutS $\alpha$  à proximité du mésappariement par MutL $\alpha$  et une polymérisation de MutL $\alpha$  induite par MutS $\alpha$  (Hombauer et al., 2011; Modrich, 2006). Concernant le retrait du mésappariement, trois mécanismes sont évoqués. Le premier correspond à l'excision de 5' en 3' par EXO1, où MutS $\alpha$  piège le domaine C-terminal d'EXO1, ce qui supprime l'action auto-inhibitrice de son site catalytique, permettant l'excision du brin de 5' en 3' jusqu'au niveau du mésappariement. Le deuxième implique également des extrémités d'ADN 5', mais le retrait du mésappariement repose sur une synthèse d'ADN par les polymérases Pol $\delta$  ou  $\epsilon$ , par déplacement de brin. Enfin, la troisième possibilité est une excision du mésappariement de 3' en 5' grâce à l'activité exonucléasique de Pol $\delta$  et  $\epsilon$  (Kadyrova and Kadyrov, 2016).

Le système MMR est impliqué dans d'autres voies du métabolisme de l'ADN, comme la recombinaison mitotique et méiotique. Cette dernière implique principalement MutL $\gamma$  (MLH1-MLH3) qui semble fonctionner avec le complexe MSH4-MSH5 (Lipkin et al., 2002). Les protéines MMR sont fortement impliquées dans la recombinaison homologue (HR) et la jonction des extrémités non homologues (NHEJ). La recombinaison homologue apparie les chromosomes homologues avant la méiose, ce qui assure la diversité génétique de la reproduction sexuée. Elle est initiée au cours de la méiose par de nombreuses cassures double brin programmées. De l'échange de brins qu'elle entraîne résultent des hétéroduplexes d'ADN qui présentent des nucléotides mésappariés, dus aux différences des séquences

chromosomales parentales. Le système MMR assure la prise en charge de ces mésappariements, ce qui conduit à l'échange non réciproque de l'information génétique (ou conversion génique). Le MMR supprime la recombinaison homologue lorsque l'ADN hétéroduplexe formé contient un excès de bases mésappariées. Cette régulation assure la précision de la réparation des cassures double brin et contribue au maintien des barrières interspèces de la reproduction sexuée (Spies and Fishel, 2015).

### 3.5.3. Fonctions non canoniques

Les protéines MMR ne sont pas seulement impliquées dans des voies du métabolisme de l'ADN qui assurent le maintien de l'intégrité du génome (réparation ou recombinaison). L'étude de ce système a révélé les rôles mutagéniques qu'il pouvait assurer lorsqu'il n'est pas couplé à la réplication. L'hypermutation somatique (*Somatic Hypermutation*, SHM), la commutation isotypique (*Class Switch Recombination*, CSR) et l'instabilité des répétitions trinuécléotidiques sont des phénomènes qui illustrent ce caractère mutagène (Jiricny, 2013; Peña-Diaz and Jiricny, 2012).

La variété des anticorps du système immunitaire permet de faire face aux nombreux antigènes auxquels l'organisme est confronté. Cependant cette diversité n'est pas initialement contenue dans le génome, des processus mutagéniques au niveau des loci des immunoglobulines (Ig) altèrent l'information génétique pour créer cette diversité. La première étape de ce processus correspond à des cassures de l'ADN et des événements de ligature entre des segments géniques variables permettant l'assemblage des gènes codant les immunoglobulines (Ig, V(D)J). Cela constitue un premier répertoire d'anticorps de faible affinité, les IgM (Schatz and Swanson, 2011). Un second événement modifie la séquence et la structure des gènes des Ig, lorsque les lymphocytes B sont exposés à des antigènes. La SHM introduit des mutations dans la région variable du gène de l'Ig, alors que la CSR entraîne la recombinaison de la région variable avec la région constante du locus de l'Ig, après cassure double brin. Ces deux événements sont initiés par une désamination ciblée de l'ADN, catalysée par une enzyme (AID, *Activation-Induced Deaminase*) (Chaudhuri et al., 2003). L'AID assure la conversion de cytosines en uraciles sur un ADN simple brin qui conduit, en l'absence de réparation, à des transitions (C>G ou T>A) ou des transversions nucléotidiques. La désamination initie ces processus mutagéniques auxquels participent les polymérases de faible fidélité et paradoxalement les systèmes BER, MMR et NHEJ (Chahwan et al., 2011). Lors de la SHM, les mésappariements U : G peuvent être reconnus par les systèmes BER et MMR. Une réparation BER inefficace conduit à l'excision de l'uracile et une incision par

APE1 peut être utilisée comme point d'entrée par le système MMR permettant la dégradation du brin par EXO1 (il peut également utiliser l'activité endonucléasique de PMS2 comme point d'entrée) (Dingler et al., 2014). Ces processus ont lieu en dehors de la phase S, ce qui explique que les polymérase répliquatives soient peu présentes et la réserve de dNTP faible. Ces circonstances entravent la resynthèse d'ADN provoquant la monoubiquitinylation du PCNA (PCNA-Ub) (Zlatanou et al., 2011). Cela favorise l'intervention des polymérase de faible fidélité, comme la polymérase  $\eta$ , susceptible d'engendrer des mutations à d'autres endroits que les sites de désamination (Chahwan et al., 2012). La CSR repose sur la formation de cassures double brin des régions commutatives hautement répétées, situées en amont de chacun des gènes de la chaîne lourde de la région constante des Ig. Ces cassures semblent être générées par les actions combinées des systèmes BER et MMR lorsque les incisions du système BER se situent à l'opposé et à proximité de la dégradation du brin par le système MMR (van Oers et al., 2010). La prise en charge de ces cassures par le système NHEJ entraîne des événements de recombinaison.

L'expansion de répétitions trinuécléotidiques est un phénomène responsable d'altérations géniques conduisant à des gains ou des pertes de fonctions responsables de nombreuses maladies neurodégénératives et neuromusculaires comme, la maladie de Huntington ou la dystrophie myotonique de type 1. Ces répétitions polymorphiques sont instables et leur longueur signe leur degré d'instabilité et de pathogénicité. L'instabilité est générée au cours des divisions méiotiques et mitotiques. Les répétitions les plus fréquemment impliquées en pathologie sont les triplets nucléotidiques (CAG, CTG, CGG et GAA) (Mirkin, 2007). La première implication du système MMR, dans l'expansion de ces séquences répétées, fut donnée par une équipe ayant mis en évidence la diminution de l'expansion de triplets CAG chez des souris MSH2KO en comparaison de leurs homologues sauvages. Etant donné la fonction du système MMR, concernant les répétitions des séquences microsatellites, le contraire eût été escompté (Kovalenko et al., 2012; Manley et al., 1999). La protéine MSH3, à la différence de MSH6, apparaît nécessaire à l'expansion des triplets CTG dans la dystrophie myotonique et des triplets CAG au niveau striatal dans la maladie de Huntington (Dragileva et al., 2009). Ce qui illustre que les complexes MutS $\alpha$  et MutS $\beta$  ne jouent pas le même rôle vis-à-vis de ces expansions de répétitions. Le complexe MutS $\beta$  inhibe la délétion de ces répétitions trinuécléotidiques par le système BER, en bloquant l'activité de l'endonucléase FEN1, favorisant ainsi leur expansion (Lai et al., 2016). Par ailleurs, la fonctionnalité de l'hétérodimère MutL $\alpha$  est indispensable à l'élimination des extrusions de répétitions CAG ou

CTG (qui servent de site de chargement au PCNA nécessaire à l'activation de l'endonucléase de MutL $\alpha$ ) (Pluciennik et al., 2013).

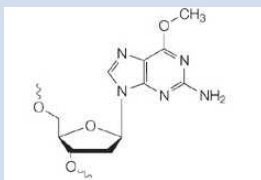
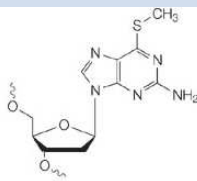
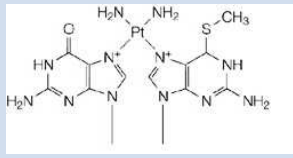
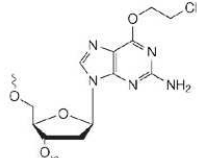
La diversification des anticorps et l'expansion des répétitions de triplets nucléotidiques, illustrent des loci propices à la mutagenèse dont il existe un large spectre dans l'ensemble du génome. Il est probable que les effets mutagéniques non canoniques du système MMR ne se limitent pas à ces loci mais influencent l'intégrité génomique à plus grande échelle.

### **3.5.4. Efficacité des agents cytotoxiques et système MMR**

Le système MMR est impliqué dans la réparation et la cytotoxicité d'un certain nombre de lésions causées notamment par les agents alkylants ( $S_{N1}$ ), la 6-thioguanine, les fluoropyrimidines, le cisplatine et les UV. Définir le rôle exact du système MMR dans l'induction de la mort cellulaire due à ces différents agents est compliqué par le large spectre de dommages provoqués et la convergence de multiples voies de réparation dans le traitement de ces lésions (BER, NER, DSBR) (cf. sections 3.2, 3.3, 3.4).

Les agents alkylants tels que le N-méthyl-N'-nitrosoguanidine (MNNG), le méthylnitrosourée (MNU) et le témozolomide sont capables de méthyler les quatre bases de l'ADN, produisant des lésions qui sont des substrats de l'O<sup>6</sup>-méthylguanine-méthyltransférase (MGMT) et du système BER. Dans le cas des agents alkylants de type  $S_{N1}$  (Tableau 11), la réponse aux dommages (DDR) requiert des composants du système MMR. Des défauts des complexes MutS $\alpha$  ou MutL $\alpha$  ont été associés à la tolérance de lésions potentiellement cytotoxiques dont l'exposition prolongée n'est plus reliée à la mort cellulaire (Karran, 2001). Les lésions du type O<sup>6</sup>-méthylguanine (O<sup>6</sup>-MG) sont des contributeurs majeurs des effets mutagéniques et cytotoxiques des agents alkylants. De faibles doses de MNNG induisent un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, lors du second cycle cellulaire après exposition, dépendant du système MMR après activation d'ATR (Jiricny, 2013). L'apoptose qui s'ensuit est dirigée dans la plupart des cas par la phosphorylation de p53 qui nécessite la fonctionnalité des complexes MutS $\alpha$  et MutL $\alpha$  (Brown et al., 2003; Kim et al., 2007). Le rôle des protéines MMR dans l'arrêt du cycle cellulaire explique en partie la perte de sensibilité des cellules déficientes en protéines MMR à certaines molécules cytotoxiques. Lorsqu'une lésion O<sup>6</sup>-MG est présente dans l'ADN au cours de la réplication, la synthèse d'ADN par une polymérase répllicative ou translésionnelle (TLS) peut entraîner la génération de mésappariements qui vont être reconnus et pris en charge par le système MMR. L'excision et la synthèse assurées par le MMR concernant uniquement le brin néosynthétisé, la lésion O<sup>6</sup>-MG peut donc persister si elle est située sur le brin parent et conduire à la formation d'un nouveau

mésappariement et des cycles itératifs de réparation MMR infructueux, nommés cycles futiles (Li, 2007). La persistance de l'O<sup>6</sup>-MG finit par entraîner une collapse de la fourche de réplication et une cassure double brin activant les points de contrôle du cycle cellulaire et finalement l'apoptose induite par p53 (York and Modrich, 2006).

Type de substance	Molécules	Métabolite cytotoxique	Mécanisme d'action
Substitution nucléophile SN <sub>1</sub> Agents méthylants	N-méthyl-N-nitroso-urea (MNU), N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) Témozolomide, Procarbazine, Dacarbazine	 6-O-méthyl-2'-déoxyguanosine	MeG s'apparie avec T durant la réplication. Lésions traitées sans succès par le système MMR, arrêt du cycle cellulaire en G2.
	Antimétabolites 6-Thioguanine (6-TG)	 6-S-méthylthio-2'-déoxyguanosine	Idem ci-dessus 2 cycles de réplication nécessaires 6-TG incorporée à l'ADN avant d'être méthylée
Agents responsables d'ICLs	Cis-diamine-dichloroplatinum (II) (CDDP, cisplatine)		Lésion réparée par NER Si persiste jusqu'à la réplication, arrêt de la fourche Implication du MMR
	1-(2-chloroéthyl)-3-cyclohexyl-nitroso-urea (lomustine, CCNU), mitomycine-C (MMC)		Groupe chloroéthyl réagit avec brin d'ADN opposé créant une liaison covalente. Cellules MMRd plus sensibles Rôle système MMR inconnu.

**Tableau 11 Substances dont la cytotoxicité est dépendante du statut du système MMR**  
(Jiricny, 2006)

Le système MMR est impliqué dans la réparation et la cytotoxicité d'agents tels que le cisplatine qui forment des adduits volumineux sur l'ADN. Le plus fréquent est la formation de liaisons croisées intrabrins impliquant des bases puriques adjacentes, prises en charge par le système NER. Le cisplatine engendre aussi la formation de liaisons croisées interbrins (ICL, *Interstrand Cross-Links*), plus toxiques par le blocage complet de la réplication et de la transcription qu'elles induisent. Il n'est pas encore évident de comprendre comment le système MMR participe à la réparation de ces ICLs ou en module la cytotoxicité, car il est loin d'être le seul à répondre à ce type de dommage (Pani et al., 2007). Cependant il a été

démonstré que MutS $\beta$  se lie au cisplatine *in vitro* et que le système MMR assure la cytotoxicité du cisplatine au travers d'une voie de signalisation des caspases (Topping et al., 2009).

Un défaut de MSH3 est capable d'inhiber complètement le processus de recombinaison homologue nécessaire à la prise en charge de ces lésions (Park et al., 2013a).

Les polymérase translésionnelles peuvent encore outrepasser la lésion et poursuivre la synthèse d'ADN, fournissant potentiellement un substrat à la recombinaison homologue pour réparer une cassure double brin (Zhang and Walter, 2014). Au vu de nos connaissances sur le fonctionnement canonique du système MMR, il semble peu probable que le système MMR participe directement au retrait des ICLs, mais il est sûrement apte à moduler d'autres intervenants tels que la HR ou les TLS (Pabla et al., 2011; Spies and Fishel, 2015).

Les dommages oxydatifs de l'ADN sont en premier lieu gérés par le système BER. Mais le système MMR intervient dans la réparation de certaines lésions, notamment les mésappariements dus à la 7,8-dihydro-8-oxo-guanine (8-oxoG), où il est capable d'exciser la lésion 8-oxoG et de cibler les mésappariements 8-oxoG :A (Bridge et al., 2014). Une voie non canonique, indépendante de la voie BER et de MLH1 a été mise en évidence, qui semble cohérente avec l'augmentation de sensibilité aux agents oxydants observées avec les cellules déficientes en protéine MSH2, mais non en MLH1 (Martin et al., 2009). La reconnaissance par MutSa et l'excision de la lésion oxydative entraîne la monoubiquitinylation de PCNA et le recrutement de la polymérase translésionnelle Pol $\eta$ , au lieu des polymérase répliquatives Pol $\delta$  ou  $\epsilon$  (Zlatanou et al., 2011).

Le système NER est le premier à intervenir en réponse aux dommages induits par les UV. Cependant la fréquence des tumeurs de la peau induite par les UV est plus importante chez les souris MSH2 déficientes de même que le nombre de mutations des cellules de mammifères MMRd (Borgdorff et al., 2006). Un nouveau rôle du système MMR a été mis en évidence par l'exposition de cellules souches embryonnaires de souris, déficientes en système NER et/ou MMR, aux UV. Il s'agit d'une réparation post synthèse translésionnelle (TLS, *Translesion Synthesis*) (cf. section 3.6) dans les cellules prolifératives. Le complexe MutSa cible les mésappariements occasionnés par les TLS face aux lésions induites par les UV, en aval des réponses NER et TLS, activant la signalisation ATR et des cassures chromosomiques au cycle suivant (Tsaalbi-Shtylik et al., 2015). Dans le cadre du syndrome de Lynch, la perte de cette réparation post-TLS, la mutagenèse élevée inhérente au syndrome et l'exposition constante de l'intestin à de multiples agents génotoxiques pourraient expliquer le tropisme colorectal caractéristique de ce syndrome.



### 3.5.5. Implication dans le traitement du CCR

Bien que les patients atteints de CCR avec un système MMR déficient (MMRd) semblent perdre le bénéfice d'un traitement par le 5-FU (Devaud and Gallinger, 2013; Sargent et al., 2010), le protocole FOLFOX demeure le traitement adjuvant standard du cancer du côlon de stade III. L'exposition des cellules aux fluoropyrimidines, telles que le 5-FU (cf. section 1.2.2.1.1), entraîne une réponse aux dommages dépendante de MutS $\alpha$  et MutL $\alpha$  (Meyers et al., 2005). Le 5-FU inhibe la thymidylate synthase (TS), qui assure la synthèse *de novo* des bases pyrimidiques, entraînant une déplétion de précurseurs nucléotidiques. Au cours de la réplication, le 5-FU est incorporé par les ADN polymérases dans le brin néosynthétisé, face à une guanine ou une adénine. Le mésappariement induit par le 5-FU sera détecté et retiré par le système MMR, à la différence des lésions de type O<sup>6</sup>-MG qui sont plus fréquemment retrouvées sur le brin parent. La prise en charge des mésappariements dus au 5-FU entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et une mort programmée dès le premier cycle (Liu et al., 2008). Cela permet d'expliquer, en partie, la différence de sensibilité observée des patients atteints de tumeurs MSI (MMRd) en comparaison des tumeurs MSS. Cependant, une exposition prolongée au 5-FU conduit à un arrêt en G2, indépendant du système MMR, qui correspond à une réponse de la voie BER.

Lorsque les cellules sont traitées directement avec un inhibiteur de la TS, il n'existe pas de différence de sensibilité entre les cellules dont le système MMR est proficient ou déficient (MMRp ou MMRd) (Iwaizumi et al., 2011), suggérant que l'incorporation de fluorouracile dans l'ADN est la voie majeure de la sensibilité différentielle entre ces cellules (Li et al., 2009). Néanmoins, le statut MMR seul apparaît insuffisant pour prédire la réponse au traitement utilisant des fluoropyrimidines étant donnée la complexité des interactions entre les systèmes BER et MMR (Li et al., 2016). Le niveau d'expression de *MSH2* joue un rôle dans l'apparente résistance au 5-FU. La baisse d'expression de *MSH2*, due à une surexpression du miR-21, entraîne une diminution de l'efficacité du 5-FU (Valeri et al., 2010a). Des résultats démontrent une augmentation de l'expression du miR-21 dans les cellules continuellement exposées au 5-FU (Rossi et al., 2007). L'ajout d'oxaliplatine dans le traitement adjuvant permet de compenser la perte d'efficacité du 5-FU des cancers MMRd (Kim et al., 2010).

Les adduits de platine formés par l'oxaliplatine sur l'ADN ne sont pas reconnus par le système MMR, à la différence de ceux engendrés par le cisplatine et le carboplatine. Les cellules MMRd demeurent sensibles à l'oxaliplatine (Sinicrope et al., 2013). Une étude rétrospective a montré que les patients atteints d'un cancer colorectal de stade III, MMRd,



présentent de meilleurs résultats avec le FOLFOX que le 5-FU seul (Zaanan et al., 2010), ce qui modère le pronostic basé sur le statut MMR (Zaanan et al., 2011).

Le SN38 entraîne des cassures double brin à partir de cassures simple brin par inhibition de la topoisomérase I qui stabilise le complexe formé entre l'enzyme et l'ADN. Ces cassures sont réparées par HR dans laquelle le système MMR est impliqué (Siehler et al., 2009). Un arrêt de courte durée du cycle cellulaire, au point de contrôle G2/M indépendant de p53, est suivi d'un arrêt G1 des cellules tétraploïdes dépendant de p53. Ce deuxième arrêt est plus long dans les cellules MMRp ce qui entraîne une plus forte activation des kinases Chk1 et 2. Ces cellules apparaissent plus sensibles au SN38 (Bhonde et al., 2010; Ma et al., 2015). Les cellules déficientes en MSH3 sont plus sensibles au SN38 et à l'oxaliplatine mais non au 5-FU, indépendamment du statut MLH1 (Park et al., 2013b). Un défaut de MLH1 induit une augmentation de la sensibilité au SN38 (4 à 9 fois plus importante) (Vilar et al., 2008). Ces résultats sont confirmés par les études cliniques qui suggèrent un allongement de la survie sans rechute (DFS) des patients MMRd vs MMRp (Fallik et al., 2003). Les lignées cellulaires avec un défaut de MSH6 ont une sensibilité au SN38 proche des cellules de phénotype MSS, ce qui suggère un rôle mineur de cette protéine MMR dans la sensibilité à ce cytotoxique. Un système MMR déficient entraîne des mutations secondaires susceptibles d'affecter les gènes impliqués dans la réparation des cassures double-brin, permettant d'expliquer aussi en partie la différence observée de sensibilité au SN38.

### 3.5.6. Régulation d'expression

D'un point de vue transcriptionnel, il apparaît que le promoteur du gène *MSH2* peut être activé en réponse aux UV-B d'une manière dépendante de p53 et de c-Jun (Scherer et al., 2000). Bien que cette séquence promotrice présente plusieurs sites de liaison de p53, ils ne semblent pas capables d'induire l'expression du gène endogène (Warnick et al., 2001). Le facteur de transcription AP-1 est également impliqué dans la régulation de l'expression de *MSH2*, la mutation de leurs sites de liaison ou l'expression d'un dominant négatif de c-Jun ont mis en évidence la perte d'induction de *MSH2* en réponse au TPA qui stimule l'activité d'AP-1 (Humbert et al., 2003). Cependant, cette stimulation positive ne conduit pas à une augmentation de l'expression du gène endogène *MSH2*. Il existe des sites de fixation de p53 au sein des séquences promotrices de *PMS2* et *MLH1* et ces régulations ont été confirmées par une augmentation de l'expression génique après expression hétérologue de p53 (Chen and Sadowski, 2005).

L'hypoxie entraîne une instabilité génétique au travers d'une perte d'expression de MSH2. Le facteur de transcription HIF1- $\alpha$ , est un acteur majeur de la réponse cellulaire à l'hypoxie et il est fréquemment surexprimé dans les cancers, notamment colorectaux sporadiques. HIF1- $\alpha$  apparaît capable d'inhiber l'expression du complexe MutS $\alpha$  en déplaçant le facteur activateur c-Myc de ses sites de fixation Sp1, de manière dépendante de p53 (Koshiji et al., 2005). L'hypoxie serait également responsable d'une inhibition épigénétique de l'expression de *MLH1* par modification des histones (Lu et al., 2014).

Certains micro-ARN, tels que le miR21 et le miR155, sont connus pour réguler les niveaux d'expression géniques et protéiques des gènes MMR (cf. section 2.2.3). Des sites de liaison de miR-21 ont été identifiés dans les régions 3' non traduites (3'-UTR, *UnTranslated Region*) des gènes *MSH2* et *MSH6* (Valeri et al., 2010a, 2010b). La surexpression du miR-21, fréquente dans les cancers colorectaux, semble contribuer à la diminution de leurs niveaux d'expression (Schetter et al., 2008). Les gènes *MLH1* et *PMS2* sont rapidement induits lors d'une exposition au cisplatine. Lors d'une exposition au MNNG, la phosphorylation et la translocation nucléaire de MSH2 et 6 ont été observées suggérant des mécanismes post-traductionnels impliqués dans la régulation de ces gènes. En effet, l'acétylation et la phosphorylation, semblent nécessaires pour assurer des niveaux d'expression suffisants de MSH2 (Zhang et al., 2014b). Reste cependant à savoir si l'augmentation de l'expression de ces gènes à la suite d'un stress génotoxique augmente la capacité de réparation du système.

La stabilité des protéines MMR est étroitement liée à leur hétérodimérisation avec leur partenaire, MSH3 et 6 avec MSH2 et PMS2 avec MLH1 (Kolodner, 2016). Il a été mis en évidence que des mutations concomitantes des gènes MSH3 et MSH6 peuvent affecter la stabilité de MSH2 (Morak et al., 2017). La disponibilité de ces protéines peut, en outre, affecter leur efficacité. Si celles-ci ne sont pas localisées au niveau de la fourche de réplication lorsque les erreurs se produisent, elles ne peuvent y parvenir à temps pour les corriger. Les études qui s'intéressent à l'expression des protéines MMR au cours du cycle cellulaire suggèrent qu'elles sont exprimées en phase G1 avec une augmentation en phase S et G2 (Edelbrock et al., 2013).

Le statut de la chromatine joue également un rôle sur l'activité du système MMR. Il existe une interaction physique entre MutS $\alpha$  et le facteur d'assemblage de la chromatine CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) (Schöpf et al., 2012) qui permet d'allonger la fenêtre temporelle durant laquelle le système MMR peut effectuer des réparations avant l'assemblage de la chromatine après réplication. Une interaction entre MSH6 et l'histone triméthylée H3K36me3 explique en partie la rapidité d'intervention du système au cours de la réplication

en permettant son association à la chromatine (Li et al., 2013). Des mutations du gène de l'histone méthyltransférase *SETD2*, qui assure la triméthylation de l'histone H3K36, sont corrélées à l'instabilité de certains cancers où aucune modification génétique ou épigénétique des gènes MMR n'a été mise en évidence (LLS) (Kadyrova et al., 2013).

A l'ère de la médecine personnalisée, une meilleure compréhension du fonctionnement, de la régulation et des interactions du système MMR avec d'autres voies de signalisation demeure essentielle pour améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients.

### **3.6. Les polymérases translésionnelles (TLS)**

Les précédents chapitres ont illustré le stress cellulaire que peut représenter la réplication du génome malgré la grande précision des polymérases répliquatives de la famille B. Les lésions qui perturbent la structure normale de l'ADN représentent des obstacles majeurs à la réplication. Un des mécanismes développés par les cellules pour assurer la réplication malgré ces obstacles repose sur les polymérases translésionnelles (TLS, *Translesion Synthesis*). Ces polymérases, bien que moins fidèles permettent d'achever la réplication, ce qui est parfois préférable à la survie cellulaire. Les polymérases translésionnelles les mieux caractérisées appartiennent à la famille Y, elles sont au nombre de quatre (Pol $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$  et Rev1) et participent à de nombreux processus physiologiques qu'elles exercent en coordination avec les polymérases de la famille B (dont Pol $\zeta$ , polymérase spécialisée dans la synthèse translésionnelle) (Barnes and Eckert, 2017; Vaisman and Woodgate, 2017).

#### **3.6.1. Caractéristiques des polymérases translésionnelles**

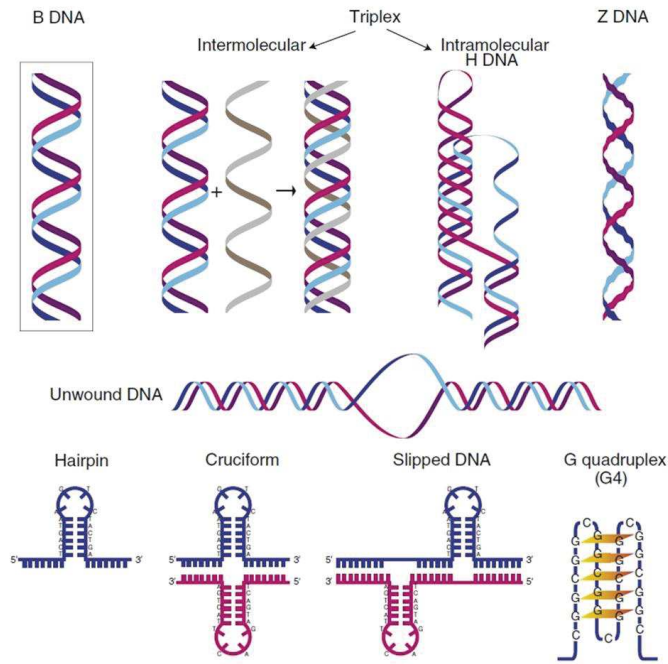
Les polymérases translésionnelles, tout comme le système MMR, ont été conservées au cours de l'évolution. Elles ne sont pas indispensables à la vie, puisque des animaux n'exprimant plus au moins l'une de chaque polymérase ont pu être générés, contrairement à Pol $\zeta$  dont une invalidation homozygote n'est pas viable (Jansen et al., 2014). Leur site actif est suffisamment flexible pour leur permettre de tolérer des nucléotides endommagés qui bloqueraient les polymérases répliquatives, mais assez stringent pour maintenir une interaction étroite avec l'ADN (Friedberg et al., 2005; Maxwell and Suo, 2014). Elles sont moins processives, moins fidèles que les polymérases répliquatives (Choi et al., 2010). Ce qui s'explique par leur faible capacité de discrimination entre les nucléotides et l'absence d'activité de correction 3'-5' exonucléolytique intrinsèque (Khare and Eckert, 2002). Elles

présentent des similarités avec les polymérase répliquatives par leur structure en « main droite », où le domaine « pouce » (*thumb*) permet le contact avec l'ADN, le domaine « doigt » (*finger*) assure le positionnement de l'ADN pour permettre l'appariement de nucléotides et où le domaine « paume » (*palm*) contient le site catalytique (extrémité N-terminale). C'est le domaine « petit doigt » (*Little finger*) qui détermine les fonctions biologiques particulières de chaque enzyme (Wilson et al., 2013). La protéine Rev1 possède, à la différence des autres, un domaine de localisation mitochondriale à son extrémité N-terminale. La longueur de la région C-terminale, importante pour la régulation et les interactions protéines-protéines, est variable. Polk diffère des autres polymérase de la famille Y par son extension N-terminale « N-Clasp » qui lui permet d'encercler l'ADN.

### 3.6.2. Fonctions

Les polymérase translésionnelles assurent la synthèse d'ADN lorsque les polymérase répliquatives sont inhibées, dépassées ou lorsqu'il est nécessaire de combler des fragments d'ADN en dehors de la réplication (Lehmann and Fuchs, 2006). Malgré certains caractères communs, chaque polymérase présente ses particularités. PolI est très peu processive (2 à 3 nucléotides par fixation à l'ADN) contre une processivité moyenne de Polk, capable d'insérer 20 à 30 nucléotides à chaque événement. Cependant, sa capacité à discriminer un désoxy d'un ribonucléotide est plus faible que celle de Rev1 (Brown et al., 2010). Les polymérase Polη et κ, comme les polymérase répliquatives, sont capables d'assurer les quatre appariements de bases correctement, alors que l'activité catalytique de PolI et Rev1 dépend de la base présente sur le brin modèle. De même, l'introduction spécifique d'erreurs et de mutations est différente d'une polymérase à l'autre. Alors que PolI et η sont plus sujettes aux mésappariements, Polk est la polymérase translésionnelle la plus fidèle ( $6.10^{-3}$  erreurs) (Ohashi et al., 2000). Elle assure principalement l'extension des amorces mésappariées ou mal alignées, ce qui génère souvent des délétions d'un nucléotide entraînant des mutations avec décalage du cadre de lecture. Le manque de fidélité de PolI est très utile, permettant l'incorporation d'une guanine à la place d'une adénine face aux nucléotides T et U, ce qui restaure la signification répliquative des cytosines qui subissent des désaminations spontanées ou induites par un dommage (Vaisman and Woodgate, 2001). Cette capacité, bien qu'essentielle, peut empêcher une mutagenèse souhaitée, comme l'hypermutation somatique décrite auparavant. Cela permet de comprendre pourquoi les cellules ne recrutent pas PolI pour ce processus malgré son grand potentiel mutagène (McDonald et al., 2003). Polη et κ assurent la réplication des séquences répétitives AT microsatellites qui inhibent les polymérase répliquatives α et δ (Hile et al.,

2011). Ces séquences fréquentes dans le génome sont souvent enrichies de séquences difficiles à répliquer, les sites fragiles (CFS, *Common Fragile Sites*) (Barnes et al., 2017; Bergoglio et al., 2013; Hile et al., 2011). Des mutations de Pol $\eta$  et  $\kappa$  conduisent à des cassures de ces sites fragiles, renforçant leur importance dans le maintien de l'intégrité du génome (Rey et al., 2009). La forme B de l'ADN correspond à la forme la plus courante, en double hélice droite, mais il existe de nombreuses autres conformations de l'ADN, notamment favorisées par les séquences répétitives. Les séquences riches en AT favorisent le déroulement de l'ADN et la formation d'une double hélice gauche (ADN Z) ; les répétitions en miroir, des formations triplexes (ADN H) ; les répétitions inversées, la formation de têtes d'épingle ou de croix ; les répétitions trinuécléotidiques, des glissements d'ADN et les microsatellites, des formations quadruplexes (G4). Ces conformations, dites non B, de l'ADN compliquent la progression de la fourche de répllication entraînant des ralentissements et sont source d'erreurs (Figure 23) (Branzei and Foiani, 2010). Le domaine *Little Finger* de Pol $\eta$  lui permet par une interaction étroite avec le site catalytique, de contraindre la molécule d'ADN à prendre une forme B, ce qui explique la plus grande capacité de cette polymérase à incorporer des nucléotides face à certaines lésions induites par les UV, plutôt que la répllication des séquences répétitives (Biertümpfel et al., 2010). Pol $\kappa$  est capable, tout en interagissant avec l'amorce d'ADN, d'encercler le brin parent, par liaison du *Little finger* avec le « pouce » malgré la distance entre les deux, ce qui lui permet d'accueillir les lésions volumineuses du sillon étroit de l'ADN (Lone et al., 2007). Pol $\kappa$  assure la synthèse des séquences microsatellitaires avec une grande fidélité, supérieure à certaines polymérases répllicatives, telles que Pol $\delta$  (Hile et al., 2011). Plus ouvert que celui des polymérases répllicatives, le site actif de Pol $\kappa$  est plus étroit que celui de Pol $\eta$ , ce qui explique sa fidélité intermédiaire.

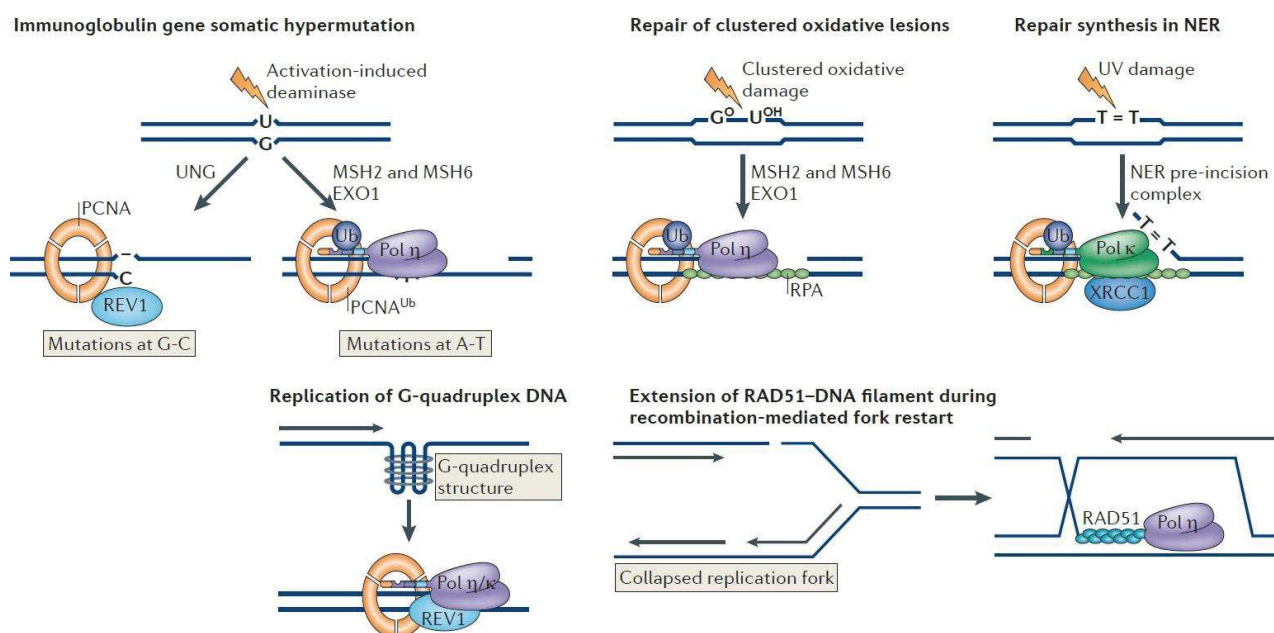


**Figure 23 Structure d'ADN non-B**  
(Boyer et al., 2013)

Polk est spécialisée dans l'étape d'extension après le dépassement d'une lésion. Les adduits volumineux de benzo[a]pyrène-diol-époxyde désoxyguanosines (BPDE, carcinogène communément présent dans la fumée de cigarette) sont facilement pris en charge par le site actif de Polk, dans la mesure où l'ADN conserve sa forme B (Jha et al., 2016a). Polk est capable d'insérer une cytosine face à la guanine lésée (Suzuki et al., 2002). Elle assure également la protection des cellules contre le stress oxydatif par sa capacité à gérer les lésions 8-oxo-G. Cette capacité des polymérase translésionnelles de permettre la réplification des structures d'ADN non-B est probablement liée à leur aptitude à forcer l'ADN non-B à se conformer en ADN-B (Boyer et al., 2013). Polη est la polymérase qui outrepassent le plus efficacement les dimères de thymidines formés par les UV, ce qui en fait le meilleur agent protecteur contre la tumorigenèse induite par les UV chez les mammifères (Masutani et al., 1999). Cependant, elle favorise la progression tumorale par ses capacités à dépasser les ICLs formés entre deux guanines adjacentes par des agents tels que l'oxaliplatine et le cisplatine, conférant une résistance à ces agents (Vaisman et al., 2000). Les TLS sont capables de prendre en charge les lésions induites par les UV qui auraient échappé au système NER, en poursuivant la synthèse au-delà de la lésion et en introduisant un nucléotide souvent non informatif, générant des mutations. Le complexe MutSα du système MMR est capable, au cycle suivant, de reconnaître ces mésappariements et d'entraîner une cascade de réponses cellulaires conduisant à l'apoptose. Ce système de réparation post-TLS serait même plus



efficace que les autres pour diminuer le taux de mutations induites par les UV (Tsaalbi-Shtylik et al., 2015). Pol $\eta$  est également impliquée dans le phénomène d'hypermutation somatique des immunoglobulines (Seki et al., 2005), dans la réplication des sites fragiles et des télomères et enfin dans la recombinaison homologue (Bétous et al., 2009). Pol $\kappa$  est impliquée dans la réparation NER (Ogi et al., 2010) et Pol $\iota$  pourrait jouer un rôle dans certaines formes spécialisées de BER. Pol $\kappa$  participe à la phosphorylation de Chk1 et à la synthèse de courts intermédiaires de réplication au niveau des fourches bloquées. Elle interagit avec la sous-unité Rad9 du complexe 9-1-1, illustrant son rôle majeur dans la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) (Bétous et al., 2013) (Figure 24).



**Figure 24 Fonctions non canoniques des TLS de la famille Y**  
(Sale et al., 2012)

Les TLS contiennent un, deux ou trois domaines d'interaction avec le PCNA (domaine PIP, *PCNA-Interacting Protein*), respectivement pour Pol $\iota$ ,  $\kappa$  et  $\eta$ . Le PCNA, facteur essentiel au fonctionnement des polymérase répliquatives, permet les interactions protéiques avec l'ADN. Il est également crucial dans le phénomène de mutagenèse induite par les polymérase translésionnelles assurant la localisation de ces dernières au niveau des foci de réplication lorsqu'elle est arrêtée. Le PCNA stimule l'efficacité de toutes les TLS sur l'ADN, endommagé ou non, il améliore leur processivité permettant de poursuivre l'élongation du brin suffisamment longtemps pour prévenir sa dégradation par l'activité exonucléasique des polymérase répliquatives (Masuda et al., 2015; Wit et al., 2015). Il joue un rôle de modulateur



d'activité des polymérase et il est un élément structurel de base du large complexe multiprotéique auquel les polymérase peuvent se fixer (De Biasio and Blanco, 2013).

Les polymérase translésionnelles de la famille Y participent ainsi au maintien de l'intégrité du génome alors qu'elles étaient apparues uniquement pro-mutagéniques au départ (Tableau 12). Ce n'est pas sans évoquer le système MMR plus connu pour son rôle de gardien de l'intégrité du génome que pour les phénomènes mutagènes dans lesquels il est également impliqué. Pol $\eta$ ,  $\kappa$  et  $\iota$  interagissent toutes trois avec le système MMR, suggérant leur interdépendance pour assurer à la fois l'intégrité du génome et la diversité génétique (Lv et al., 2013; Peña-Díaz et al., 2012; Wilson et al., 2005; Zhang et al., 2013).

Polymérase spécialisée	Gène de la famille Y	Fonctions cellulaires
<b>Eta (<math>\eta</math>)</b>	<b><i>POLH</i></b>	Synthèse translésionnelle Stabilité des sites fragiles (CFS) Synthèse d'ADN au cours MMR et HR Hypermuation somatique
<b>Kappa (<math>\kappa</math>)</b>	<b><i>POLK</i></b>	Synthèse translésionnelle Synthèse de l'ADN G4 et des microsatellites Synthèse d'ADN au cours NER, DSBR Signalisation ATR
<b>Iota (<math>\iota</math>)</b>	<b><i>POLI</i></b>	Synthèse translésionnelle Hypermuation somatique
<b>Rev1</b>	<b><i>REV1</i></b>	Synthèse translésionnelle

**Tableau 12 Fonctions connues des polymérase de la famille Y**  
Adapté de (Barnes and Eckert, 2017)

### 3.6.3. Efficacité des agents cytotoxiques et TLS

Les principales polymérase impliquées dans la réparation des ICLs induits par le cisplatine sont Pol $\zeta$  et Rev1, alors que Pol $\kappa$  semble avoir un rôle significatif mais plus faible (Enoiu et al., 2012) et indépendant de la réplication (prioritairement en phases G0/G1) (Williams et al., 2012). La chimiothérapie sélectionne les cellules résistantes et favorise la synthèse translésionnelle, conduisant à la formation de mutations, à leur tour impliquées dans la résistance. L'inhibition de REV1 et REV3 augmente la sensibilité au cisplatine par diminution de la résistance acquise. Les polymérase translésionnelles peuvent apparaître comme des prédicteurs de l'efficacité de certains traitements (Xie et al., 2010). Il a été mis en

évidence que Polk est impliquée dans la protection des neurones périphériques, non protégés par la barrière hématoencéphalique des lésions engendrées par les chimiothérapies à base de sels de platine. L'expression de Polk est beaucoup plus importante au niveau de ces neurones suggérant son rôle majeur dans l'atténuation des effets secondaires neurotoxiques, par exemple du cisplatine (Zhuo et al., 2017). Pol $\eta$  a également été impliquée dans la réparation des dommages induits par le cisplatine, les cellules déficientes sont plus sensibles, même si cette sensibilité est moins prononcée que dans les cellules déficientes en Rev1 (Zhao et al., 2012).

Polk est surexprimée dans les cellules de glioblastome et les tissus tumoraux après une exposition au témozolomide, autre agent anticancéreux. La surexpression de Polk au sein de cellules sensibles confère une résistance au témozolomide, alors que son inhibition sensibilise les cellules résistantes. D'un point de vue mécanistique, il semblerait que la déplétion de Polk perturbe la réparation par recombinaison homologue et la reprise des fourches de réplication bloquées. Cela affecte la signalisation ATR-Chk1, retarde la reprise du cycle cellulaire, expliquant l'augmentation de sensibilité (Peng et al., 2016). La monoubiquitinylation du facteur PCNA favorise l'échange entre une polymérase répllicative et la polymérase translésionnelle Pol $\eta$ , dans le dépassement des lésions induites par les UV, au cours de la réplication. Le stress oxydatif entraîne la monoubiquitinylation du facteur PCNA permettant le recrutement de Pol $\eta$  au niveau des sites de dommage oxydatif grâce à ses sites de liaison au PCNA et à l'ubiquitine. Il a été démontré que la présence du complexe MutS $\alpha$  est indispensable, à cette voie alternative de réponse aux dommages oxydatifs qui coordonne le retrait de ces lésions, permettant d'expliquer les forts taux de lésions oxydatives au sein des cellules MSH2 déficientes (Zlatanou et al., 2011).

Polk est capable d'insérer une cytosine face à un adduit volumineux formé sur une guanine par le Benzo[a]pyrène (B[a]P). Ce mécanisme de synthèse translésionnelle permet d'assurer une réplication fidèle d'un adduit volumineux sans mésappariement ou perte d'alignement. Polk stabilise l'ADN lésé dans une conformation d'ADN B ce qui permet l'insertion du nucléotide correct en face de la lésion (Jha et al., 2016b). Polk est importante dans la réponse cellulaire aux dommages induits également par les UV et les agents alkylants, comme le méthanesulfonate de méthyle (MMS). Les cellules qui présentent des mutations de Polk deviennent hypersensibles au MMS, mais non au BPDE et aux UV. Polk et  $\eta$  semblent redondantes dans la prise en charge des lésions induites par le MMS. Polk exerce un rôle protecteur contre la cytotoxicité induite par le méthylnitrosourée (MNU), indépendamment de la monoubiquitinylation de PCNA et sans engendrer un grand nombre de mutations (Wit et

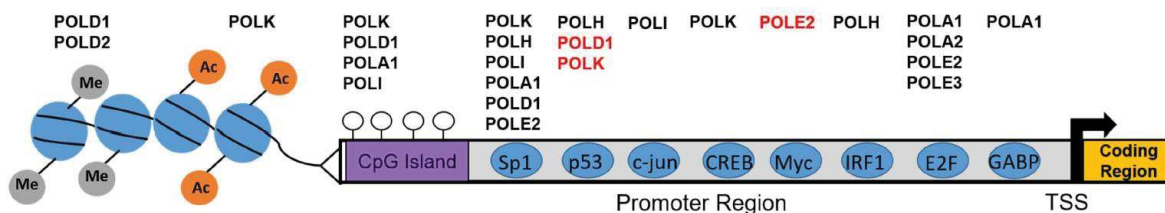
al., 2015). La diminution d'expression de Polk entraîne un retard sévère dans la survenue d'une seconde mitose car les lésions O<sup>6</sup>-MG ne peuvent pas être dépassées. Polk protège partiellement les cellules de la cytotoxicité des lésions O<sup>6</sup>-MG, dépendante du système MMR, en restaurant l'intégrité des duplexes par l'insertion d'une cytosine face à la guanine méthylée (Lupari et al., 2012). Les polymérases translésionnelles permettent la tolérance des dommages en étant capables d'assurer la réplication de l'ADN au-delà des lésions induites par des molécules cytotoxiques. Elles diminuent ainsi la sensibilité des cellules à de nombreuses molécules qui pourraient s'avérer beaucoup plus toxiques si elles n'étaient pas tolérées et que la réponse aux dommages de l'ADN était correctement activée (Zafar and Eoff, 2017).

La résistance et les récives tumorales sont des phénomènes fréquemment observés au cours des traitements par chimiothérapies anticancéreuses à base d'agents alkylants. Ces limitations pourraient être en partie dues aux mutations induites par la prise en charge des lésions alkylantes de l'ADN par les TLS. Les thymidines alkylées persistent souvent dans les tissus, ce qui peut inhiber la réplication et induire des transitions nucléotidiques de type T>C, sources de mutations. Une déficience de Polη ou ζ entraîne une diminution importante de la capacité à dépasser ces lésions. De plus, Polk et ι n'exercent pas de fonctions redondantes aux deux autres dans la prise en charge de ces dommages. (Wu et al., 2016).

#### **3.6.4. Régulation d'expression**

Ces polymérases sont relativement peu exprimées, notamment au sein des organes à faible renouvellement cellulaire (Velasco-Miguel et al., 2003). Leur expression varie peu au cours du cycle cellulaire, mis à part Polη qui serait plus exprimée en phases G2/M (Diamant et al., 2012). Concernant la régulation transcriptionnelle de ces polymérases, des sites de liaison du facteur de transcription Sp1, notamment impliqué dans la régulation d'expression de plusieurs gènes du système MMR (Beishline and Azizkhan-Clifford, 2015), ont été identifiés dans les séquences promotrices de *POLK*, *POLI* et *POLH* (Lemée et al., 2007; Qi et al., 2012; Zhou et al., 2012) (Figure 25). Des mutations d'un élément de liaison CREB ou de sites de liaison Sp1 entraînent une diminution de l'activité du promoteur *POLK* (Lemée et al., 2007). Un site Sp1 a également été mis en évidence en position +60 du gène *POLK* permettant d'expliquer l'activation de son expression en réponse au BPDE (Benzo[a]pyrène-Diol-Epoxide) (Zhu et al., 2012). Une augmentation de l'expression (ARNm et protéine) de *POLH* sous le contrôle de p53 a été mise en évidence après exposition aux radiations ionisantes et à la camptothécine, mais pas aux UV (Liu and Chen, 2006). L'effet de p53 sur l'expression de

*POLK* n'est pas aussi évident. Des études rapportent que l'expression de *POLK* est stimulée par p53 dans les cellules murines, alors qu'elle ne semble pas affectée dans les cellules humaines (Velasco-Miguel et al., 2003) ou alors diminuée (Wang et al., 2004). L'activation du promoteur *POLK* apparaît cependant plus importante dans un contexte de cellules *TP53KO*, la fixation de p53 pouvant empêcher la fixation de Sp1.



**Figure 25 Facteurs impliqués dans la régulation d'expression des polymérase**  
(Barnes and Eckert, 2017)

D'autre part, un traitement avec la trichostatine A (TSA) induit une augmentation de cinq fois de l'expression de *POLK* suggérant que le statut d'acétylation des histones participe à la régulation d'expression de cette enzyme (Lemée et al., 2007).

Le miR20, dont un site de fixation a été déterminé en 3'-UTR (*Untranslated Region*) de *POLK* (Guo et al., 2016), semble également impliqué dans la régulation de son expression. *POLK* est surexprimé dans certains cancers, notamment du poumon, de l'ovaire et de la prostate (Velculescu et al., 1995).

L'hypothèse d'effets mutagènes potentiels d'une surexpression transitoire ou permanente de *POLK* a été confirmée dans les cellules humaines surexprimant *POLK*, où elle semble être redirigée vers les fourches de réplication et interférer avec la machinerie réplivative normale, supportant le concept de réplisome tumoral (Bergoglio et al., 2002; Hoffmann and Cazaux, 2010). Cependant *POLK* est également sous-exprimée dans d'autres cancers, tels que les cancers du sein, de l'estomac et du côlon (Pillaire et al., 2010). Cela est en partie expliqué par les expressions diminuées de CREB et Sp1 dans ces cancers. Les fonctions de Polk décrites précédemment suggèrent qu'une perte d'expression de Polk peut contribuer à l'instabilité génétique et à la progression tumorale par des mécanismes différents de ceux observés lors de la surexpression.

Les gènes *POLH*, *POLI* et *POLK* sont tous trois induits par les dommages alkylants de l'ADN. Un traitement au MNNG induit l'expression de *POLH* au travers d'une voie dépendante du facteur IRF1 (*Interferon Regulatory Factor 1*) et de *POLI* d'une manière dépendante de Sp1 (Zhu et al., 2010). Une exposition au MNNG est également responsable de

l'activation de la sous-unité REV3 de la polymérase translésionnelle Pol $\zeta$  et la région impliquée dans cette induction contient des sites de liaison pour CREB, NF- $\kappa$ B et AP-2 (Yu et al., 2004).

## **4. Le corégulateur transcriptionnel RIP140**

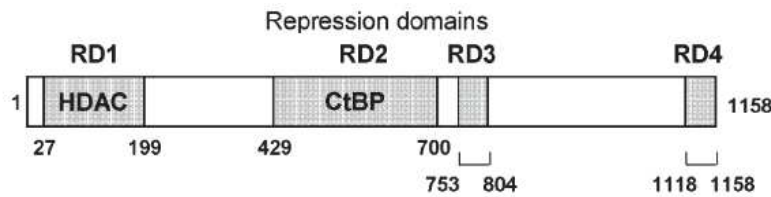
### **4.1. Généralités sur les récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription, activés par la fixation d'un ligand, qui régulent l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires (Mangelsdorf et al., 1995). Ils se subdivisent en trois groupes, les récepteurs nucléaires des hormones qui se lient à l'ADN sous forme d'homodimères, les récepteurs nucléaires métaboliques qui s'associent à l'ADN sous forme d'hétérodimères avec le RXR (*Retinoic X Receptor*) et les récepteurs nucléaires orphelins qui n'ont pas à ce jour de ligand identifié. L'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires est modulée par des corégulateurs leur permettant de cibler les promoteurs des gènes et de moduler des voies de signalisation dépendantes d'autres facteurs de transcription, tels que les facteurs Sp1, AP-1, p53 ou NF- $\kappa$ B (Berger et al., 2013; Kushner et al., 2000), pour revue (Triki et al., 2017).

### **4.2. Structure et fonctions in vitro**

La protéine RIP140 (*Receptor Interacting Protein of 140 kDa*), également nommée NRIP1 (*Nuclear Receptor Interacting Protein 1*), est constituée de 1158 acides aminés. Il s'agit de l'un des premiers cofacteurs transcriptionnels à avoir été décrit. Le corégulateur transcriptionnel RIP140 a été mis en évidence dans des cellules de cancer du sein au travers de son interaction avec le domaine d'activation transcriptionnelle du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  (Cavaillès et al., 1995). Cette protéine possède la particularité d'être un coactivateur ou un corépresseur en fonction de son recrutement sur ses gènes cible (Castet et al., 2006). RIP140 interagit avec la plupart des récepteurs nucléaires, mais aussi avec de nombreux facteurs de transcription et des enzymes de modification des histones (L'Horset et al., 1996) (Nautiyal et al., 2013a). Le gène codant la protéine RIP140 est localisé en position q11.2 du chromosome 21 chez l'Homme. L'ensemble de la séquence codante de RIP140 est comprise dans un seul large exon et plusieurs exons non codants ont été identifiés dans la région 5' du gène, jusqu'à 100 kb en amont du promoteur (Augereau et al., 2006a). La séquence de la protéine est relativement conservée entre les espèces (83% d'homologie entre les séquences humaine et murine). La protéine RIP140, exprimée de manière ubiquitaire, est localisée

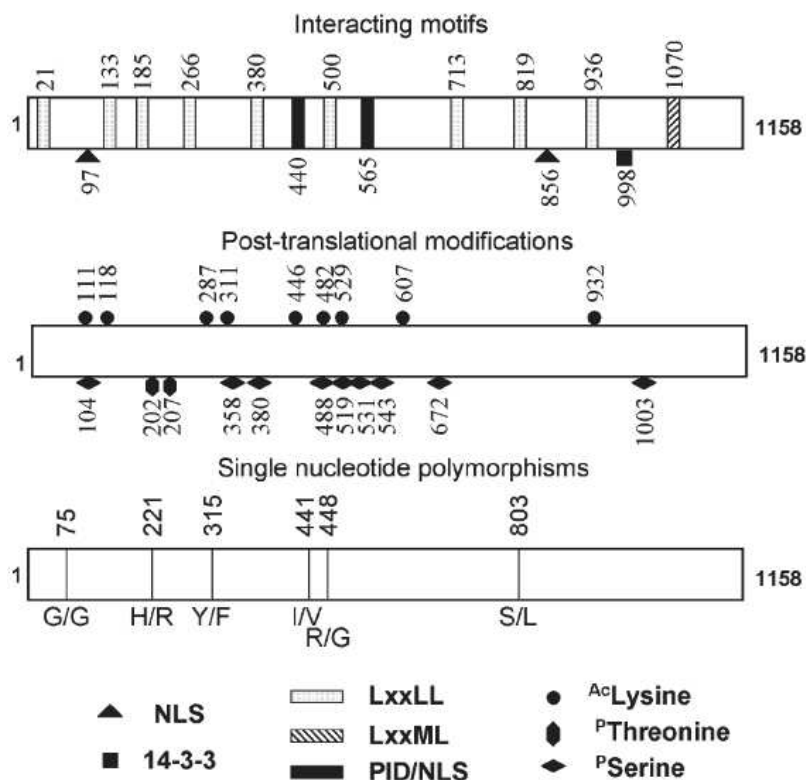
majoritairement dans le noyau des cellules. Elle présente deux signaux de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localization Signal*) en position 97 et 856, et neuf motifs riches en Leucine, de type LxxLL (Figure 27). Ces motifs correspondent à des séquences dont la structure en hélice  $\alpha$  permet leur interaction avec les récepteurs nucléaires (L'Horset et al., 1996) (Augereau et al., 2006b). L'analyse de l'activité répressive de RIP140 a permis d'identifier quatre domaines répresseurs autonomes dont certains fonctionnent par liaison de protéines répressives additionnelles et/ou des enzymes de modification des histones. Le premier domaine répresseur est localisé entre les acides aminés 27 et 199 et agit par recrutement des histones désacétylases de classe I et II (HDAC), responsables de la compaction de la chromatine qui entraîne une répression de la transcription (Castet et al., 2004; Wei et al., 2000). Le deuxième domaine répresseur est compris entre les résidus 429 et 739 et interagit avec les protéines CtBP1 et 2 (*C-terminal Binding Protein 1 et 2*), qui à leur tour, peuvent recruter des HDACs (Castet et al., 2004; Christian et al., 2004; Vo et al., 2001a) (Figure 26).



**Figure 26 Domaines répresseurs de RIP140**  
(Castet et al. 2004)

L'interaction entre RIP140 et les HDACs est modulée par des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation de deux thréonines en position 202 et 207 augmente l'activité transrépressive de RIP140, en favorisant son interaction avec HDAC3 (Gupta et al., 2005; Huq et al., 2005). Des sites d'acétylation (4 dans le RD1 et 3 dans le RD2) ont été identifiés et l'hyperacétylation de RIP140 augmente son activité répressive (Huq and Wei, 2005). Cependant, l'acétylation de la lysine 446, au niveau du site de fixation des CtBPs inhibe cette interaction et diminue l'activité transrépressive de RIP140 (Vo et al., 2001b). De même, la méthylation des arginines en position 240, 650 et 948 semble diminuer l'activité corépressive de RIP140 par une diminution du recrutement des HDACs (Mostaql Huq et al., 2006) (Figure 27).





**Figure 27 Modifications post-traductionnelles de RIP140**  
(Augereau et al. 2006)

Les domaines répresseurs 3 et 4, situés dans la région C-terminale de RIP140, respectivement entre les résidus 753 à 804 et 1118 à 1158, ne possèdent pas d'effecteurs clairement identifiés. Cependant, deux lysines, en position 756 et 1154, situées dans les domaines RD3 et RD4 respectivement, peuvent être SUMOylées de manière réversible par la protéine SUMO-1. Il semblerait que la SUMOylation de RIP140 affecte sa localisation nucléaire et l'activité répressive des domaines RD3 et 4, sans pour autant perturber sa stabilité (Rytinki and Palvimo, 2008).

Il a été démontré que RIP140 est capable de réguler l'activité transcriptionnelle des ERRs (ERR, *Estrogen Receptor-Related Receptors*), différemment en fonction des séquences cible des promoteurs (Castet et al., 2006). En effet, RIP140 est capable d'inhiber la transactivation par ERR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de gènes rapporteurs naturels ou artificiels contenant différents types d'éléments de réponse. Cette inhibition est corrélée à la liaison, observée *in vitro*, entre RIP140 et les trois isoformes ERR. Alors que RIP140 inhibe la transactivation du récepteur  $\alpha$  des hormones thyroïdiennes (TR $\alpha$ ) par ERR $\beta$ , il l'augmente au travers d'ERR $\alpha$  et ERR $\gamma$ . Le promoteur du TR $\alpha$  contient des sites Sp1 et il a été démontré que RIP140 régule positivement la transactivation, par les ERR, d'autres cibles connues des facteurs Sp1, comme le gène p21, où les histones désacétylases interviennent. Il semblerait que le fort recrutement des HDACs



par RIP140 lui permette de déréguler ce promoteur par une titration de ces enzymes. De manière équivalente, il a été démontré que l'activation du promoteur p21 par p53, implique la dissociation d'HDAC1 de l'extrémité C-terminale de Sp1, pour permettre la formation du complexe activateur Sp1-p53.

RIP140 est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle dépendante du facteur AP-1, induite par les œstrogènes, indépendamment du recrutement des HDACs. En présence d'œstradiol (E2), le récepteur ER $\alpha$  favorise la transcription déclenchée par la protéine activatrice AP-1 (*Activator Protein 1*). Cette induction est permise par l'interaction directe entre le facteur de transcription c-Jun et ER $\alpha$  qui stabilise un complexe multiprotéique contenant le coactivateur GRIP1 (*Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1*). RIP140 se lie à c-Jun et forme un complexe multiprotéique avec ER $\alpha$ . L'effet négatif de RIP140 est inhibé par la surexpression du coactivateur GRIP1. Les deux cofacteurs entrent en compétition pour se lier à c-Jun et ER $\alpha$  et leurs niveaux d'expression respectifs peuvent permettre de déterminer l'efficacité de l'E2 dans la stimulation des gènes, sous contrôle du facteur AP-1 (Teyssier et al., 2003).

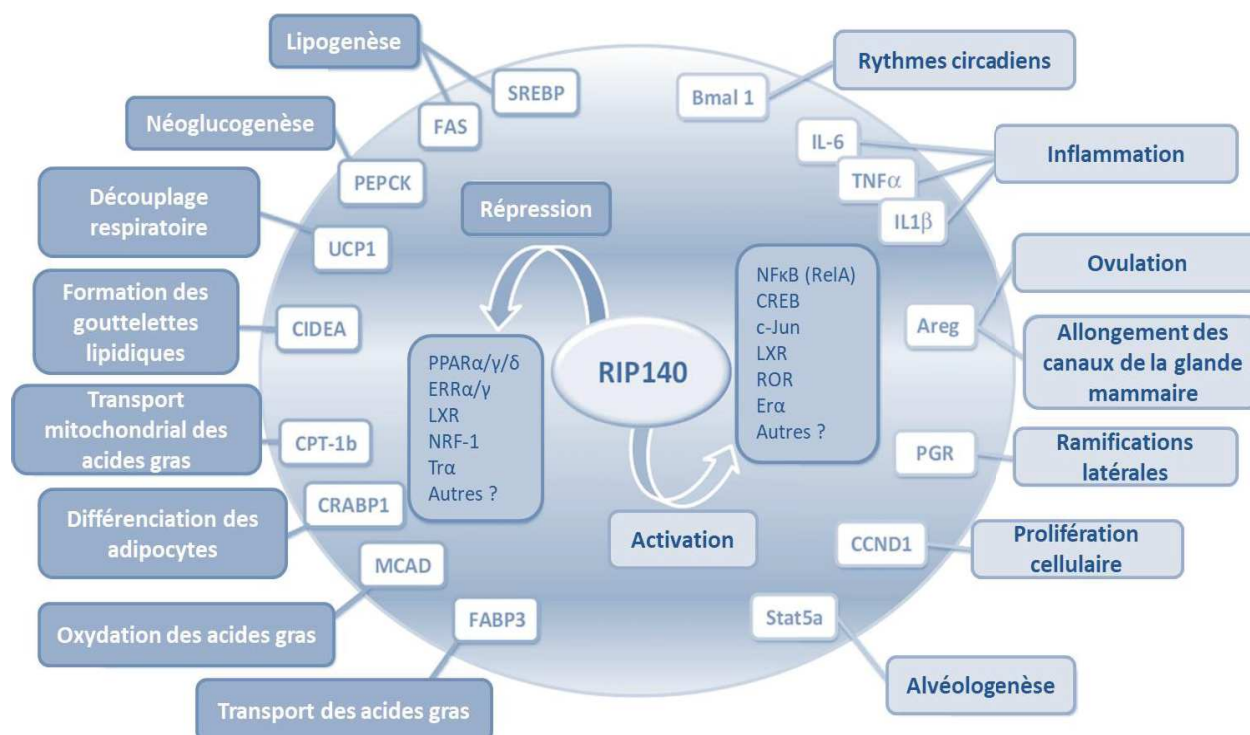
La tumorigenèse du sein et de l'ovaire est liée à une altération de l'équilibre entre les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Une expression ectopique d'ER $\beta$  inhibe les effets mitogènes et les réponses transcriptionnelles induites par l'E2 et augmente la formation d'hétérodimères ER $\alpha$ /ER $\beta$ . RIP140 est un répresseur transcriptionnel majeur d'ER $\alpha$ , mais son interaction avec ER $\beta$  est également importante. Le recrutement de RIP140 sur un rapporteur ERE (*Estrogen Response Element*) est augmenté lors de la surexpression d'ER $\beta$  et l'activité d'ER $\beta$  est plus sensible à la répression par RIP140. Une diminution de l'expression de *RIP140* inhibe les effets répressifs du récepteur ER $\beta$  activé. Ces résultats illustrent le rôle clé de RIP140 dans les effets inhibiteurs d'ER $\beta$  sur la signalisation œstrogénique dans le cancer de l'ovaire (Docquier et al., 2013).

Les facteurs de transcription E2Fs sont connus pour leurs rôles majeurs dans le contrôle du cycle cellulaire, la réplication, l'apoptose, la différenciation cellulaire (Iaquinta and Lees, 2007) et par voie de conséquence, la tumorigenèse (Chen et al., 2009). Le facteur E2F1 est capable d'induire l'apoptose de manière dépendante ou non de p53 (Wu et al., 2009). Il a été démontré que RIP140 réprime la transactivation du facteur E2F1 et inhibe l'expression de plusieurs gènes cible d'E2F1 (Docquier et al., 2010). L'analyse de tumeurs de cancers du sein, a mis en évidence que de faibles niveaux d'expression de *RIP140* étaient corrélés à de hauts niveaux d'expression des gènes cible du facteur E2F1. Cette régulation est complexe car RIP140 est également un gène cible d'E2F1. L'expression de RIP140 est finement régulée au

cours du cycle cellulaire, augmentant jusqu'à 5 fois lors des transitions G1/S et G2/M. Le promoteur de *RIP140* contient des éléments de réponse E2Fs et son activité est augmentée par la surexpression des facteurs E2F1/DP1. Cette régulation positive implique les facteurs de transcription Sp1 et s'accompagne du rétrocontrôle négatif exercé par RIP140. E2F1 participe à l'induction de RIP140 au cours de la différenciation des adipocytes, permettant d'expliquer certains des effets des facteurs E2F1 dans les cancers et les maladies métaboliques (Docquier et al., 2012).

### 4.3. Implications physiopathologiques

RIP140 intervient dans une grande variété de processus physiologiques, au travers de ses interactions avec les facteurs de transcription (Figure 28). Les fonctions biologiques de RIP140 ont été étudiées grâce au développement de modèles murins génétiquement modifiés, principalement des souris dont le gène *RIP140* a été invalidé, par remplacement de la région codante par une cassette exprimant la  $\beta$ -galactosidase (RIPKO, *Knock Out*) (White et al., 2000), ou surexprimé de manière constitutive (Fritah et al., 2010).



**Figure 28 Gènes cible régulés par RIP140 et fonctions associées**  
Adapté de (Nautiyal et al., 2013b)

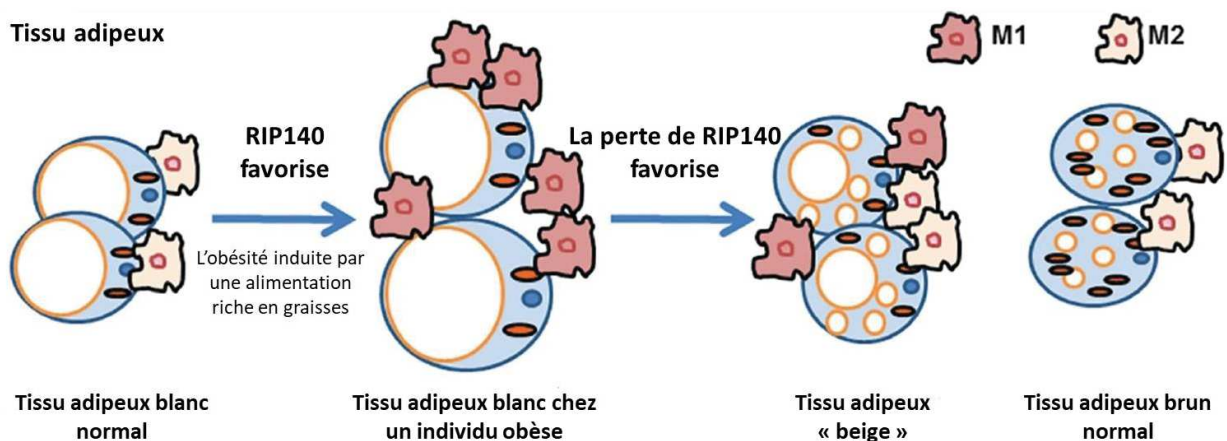
### 4.3.1. Métabolisme énergétique

Le tissu adipeux peut être considéré comme un organe endocrine qui produit et sécrète des hormones, telles que l'œstradiol (E2), la leptine, la résistine, l'adiponectine et les cytokines inflammatoires, assurant l'homéostasie énergétique (Stern et al., 2016). RIP140 est un corépresseur de nombreux récepteurs nucléaires et facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme énergétique, tels que PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), TR $\alpha$ , ERR $\alpha$ , ERR $\gamma$ , LXR (*Liver X Receptor*), le facteur de respiration nucléaire 1 (NRF-1, *Nuclear Respiratory Factor-1*) et le facteur de transcription E2F1. En participant à la régulation de la composition du tissu adipeux, RIP140 permet de maintenir l'équilibre entre la consommation d'énergie et son stockage (Hu et al., 2015; Liu et al., 2015).

Le tissu adipeux blanc sert de réservoir pour le stockage des triglycérides. Les adipocytes de ce tissu sont capables d'augmenter de taille en cas d'obésité afin d'assurer un stockage lipidique plus important. Ils deviennent inflammatoires, ce qui favorise la résistance à l'insuline. Le tissu adipeux brun, présent chez l'adulte (Cypess et al., 2009; Rosell and al., 2011), est impliqué dans la thermogénèse par oxydation des acides gras. Les souris RIPKO sont plus maigres que les souris sauvages (20% de perte de masse corporelle), avec une perte de 70% de la masse graisseuse et une diminution de la taille de leurs adipocytes. Le stockage lipidique intra-hépatique est également plus faible que chez les animaux sauvages. Les souris RIPKO présentent une résistance à l'obésité induite par une nourriture enrichie en graisses (HFD, *High Fat Diet*) (Leonardsson et al., 2004). La fonction de site de stockage des adipocytes de leur tissu adipeux blanc est altérée chez les souris RIPKO, car ils expriment des gènes caractéristiques du tissu adipeux brun, impliqués dans la dépense énergétique (Christian et al., 2005). RIP140 fonctionne comme un corépresseur des voies cataboliques, telles que l'oxydation des acides gras, la phosphorylation oxydative, la biogénèse mitochondriale et la glycolyse (Powelka et al., 2006). Il est également un corépresseur de la néoglucogénèse et un coactivateur de la synthèse des triglycérides (Herzog et al., 2007). Une abolition de RIP140 entraîne, par voie de conséquence, une augmentation de l'expression de gènes normalement réprimés et une augmentation de la dépense énergétique.

Le tissu adipeux beige a récemment été caractérisé, il se développe au sein du tissu adipeux blanc lors d'une exposition au froid ou par l'action d'agonistes  $\beta$ 2-adrénergiques. Il est considéré comme bénéfique, car impliqué dans la thermogénèse, même si sa signature moléculaire diffère du tissu adipeux brun. RIP140 semble jouer un rôle dans l'expression de gènes du tissu adipeux brun dans les adipocytes du tissu adipeux blanc (Kiskinis et al., 2014).

Les macrophages, outre leur fonction dans l'immunité innée, sont impliqués dans l'homéostasie énergétique. Ils existent sous deux états d'activation M1 et M2 qui présentent différents profils d'expression génique et transcriptionnel (Gautier et al., 2012). L'état M2 permet de maintenir la sensibilité à l'insuline alors que l'état M1, associé à l'inflammation chronique, favorise le développement de la résistance à l'insuline. RIP140 modifie la polarisation des macrophages d'un état à l'autre. En condition HFD son expression, augmentée dans les macrophages, stimule la polarisation M1 et le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux blanc (Liu et al., 2015). Dans ces conditions, une invalidation spécifique dans les macrophages de RIP140, non seulement réduit l'infiltration des macrophages M1, mais augmente la proportion de macrophages M2 anti-inflammatoires, ce qui conduit au « brunissement » du tissu adipeux blanc et à une restauration de la sensibilité à l'insuline (Liu et al., 2014) (Figure 29).



**Figure 29 Rôle de RIP140 dans le tissu adipeux**  
Adapté de (Nautiyal, 2017)

Dans les muscles squelettiques, RIP140 est aussi un régulateur clé du métabolisme énergétique. Deux types principaux de fibres musculaires se distinguent en fonction de leur métabolisme énergétique. Les fibres glycolytiques, correspondent à des fibres à contraction rapide qui dépendent de la respiration anaérobie, alors que les fibres oxydatives sont des fibres à contraction lente qui nécessitent des taux élevés de phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras. Les fibres musculaires oxydatives remplacent les fibres glycolytiques chez les souris RIPKO (Seth et al., 2007). RIP140 est plus fortement exprimé dans les fibres glycolytiques et son niveau d'expression détermine le mode d'utilisation de l'énergie dans les muscles ainsi que le changement du type de fibre prédominant (Fritah et al., 2012). Le cœur est un muscle dont la fonction contractile repose sur une importante activité

mitochondriale de synthèse d'ATP. RIP140 est peu exprimé au sein du muscle cardiaque et sa surexpression chez des souris transgéniques entraîne rapidement une hypertrophie cardiaque, une fibrose ventriculaire et une augmentation de la mortalité dans les quatre premières semaines de vie. La répression des gènes cible de RIP140 impliqués dans le métabolisme des acides gras, dans la biogenèse et les fonctions mitochondriales, est étroitement liée avec la pathologie cardiaque qui apparaît comme une conséquence de la diminution de l'activité mitochondriale et de la consommation d'oxygène (Fritah et al. 2010).

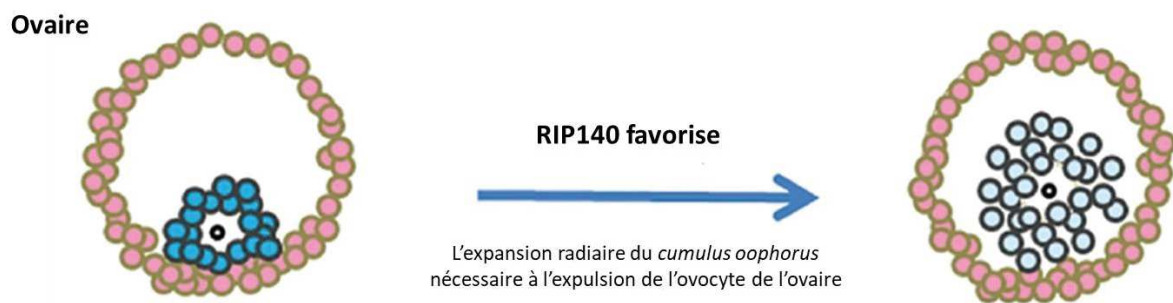
#### 4.3.2. Inflammation

Les récepteurs *Toll-Like* (TLR, *Toll-Like receptors*) permettent à l'organisme de reconnaître une infection microbienne, un dommage tissulaire et d'initier la réponse immunitaire innée, en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires. Le phénomène de tolérance des endotoxines (ET, *Endotoxin Tolerance*) est un mécanisme protecteur qui évite la surproduction de cytokines proinflammatoires en réponse à une infection. En l'absence de ce processus d'ET, l'incidence de chocs septiques et la mortalité associée augmenteraient. En qualité plus rare de coactivateur, RIP140 stimule les processus inflammatoires et participe à la régulation positive de l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages exposés à des ligands TLR (*Toll-Like receptors*). Ce rôle coactivateur de RIP140 repose sur sa capacité à interagir directement avec la sous-unité activatrice, RelA, du facteur NF- $\kappa$ B, régulateur clé de l'inflammation dans de nombreux tissus. RIP140 recrute pour ce faire la protéine de liaison CREB (CBP, *cAMP-Response Element (CREB)-Binding Protein*) qui est une histone acétylase. RIP140 favorise l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, le TNF $\alpha$ , et l'IL-1 $\beta$ , ce qui est cohérent avec ses rôles métaboliques (Zschiedrich et al., 2008). Certains ligands TLR peuvent entraîner la dégradation de RIP140, permettant la résolution de la réponse inflammatoire et contribuant à l'ET. De plus, la sous-unité RelA apparaît capable de moduler sa propre activité transcriptionnelle en recrutant un complexe qui conduit à la dégradation ciblée de son coactivateur. En effet, la phosphorylation de résidus tyrosine de RIP140 par la protéine Syk et le recrutement d'une E3 ligase dépendant de RelA sont les prérequis de sa dégradation déclenchée par un lipopolysaccharide (LPS). L'invalidation spécifique de RIP140 dans les macrophages conduit à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. La capacité de l'INF $\gamma$  (*INterFeron  $\gamma$* ) à restaurer la sensibilité aux endotoxines semble ainsi liée à l'inhibition de la dégradation de RIP140 (Ho et al., 2012).



### 4.3.3. Ovulation et développement de la glande mammaire

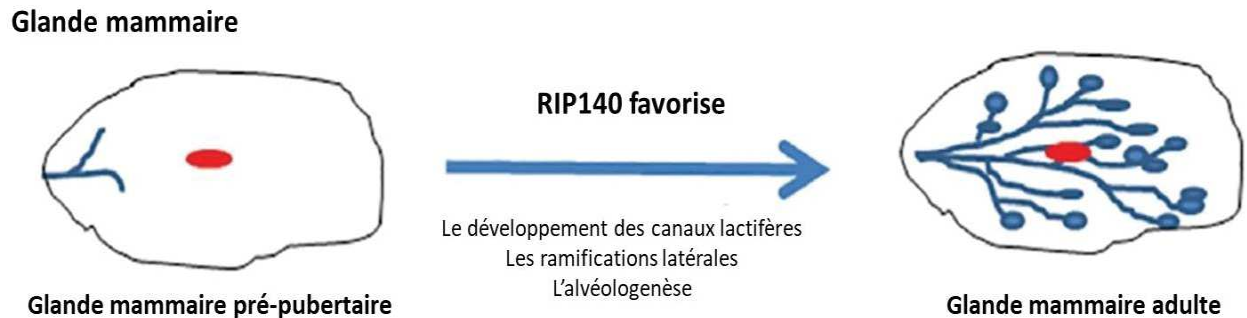
Les souris adultes femelles RIPKO présentent un retard de maturation sexuelle, en lien avec le vieillissement et des niveaux réduits d'IGF1 circulant (IGF1, *Insulin Growth Factor I*) (Yuan et al., 2012). Ces souris sont stériles par défaut d'ovulation, malgré un œstrus normal (Nautiyal et al., 2013c; White et al., 2000). La folliculogénèse, de même que la lutéinisation se déroulent normalement, mais le corps jaune retient l'ovocyte, expliquant ce phénotype d'anovulation (Leonardsson et al., 2002; Nautiyal et al., 2010; White et al., 2000). Des défauts de la régulation transcriptionnelle et de l'expression dépendantes de RIP140 des facteurs de croissance de la famille EGF-like (*Epidermal Growth Factor*), tels que l'amphiréguline (AREG), l'épiréguline (EREG) et la bétacellulin (BTC), ont été mis en évidence (Tullet et al., 2005). La perte d'expression de ces facteurs entrave l'expansion du *cumulus oophorus*, qui correspond aux cellules qui entourent l'ovocyte et accompagnent sa sortie de l'ovaire (Figure 30). Une analyse du promoteur *Areg* dans des cellules de la granulosa, a permis de mettre en évidence sa régulation d'expression par RIP140 par l'intermédiaire de la coactivation des facteurs de transcription CREB et c-Jun (Nautiyal et al., 2010). Le phénotype de ces souris est très proche de celui du syndrome du follicule lutéinisé non rompu, responsable de stérilité chez la femme (White et al., 2000).



**Figure 30 Expansion du *cumulus oophorus* nécessaire à l'ovulation**  
Adapté de (Nautiyal, 2017)

Les souris RIPKO présentent en outre, de graves défauts de développement de la glande mammaire. La croissance des canaux lactifères à la puberté est principalement affectée, entraînant chez les souris adultes un réseau épithélial très peu développé. L'épithélium mammaire débute son expansion par une division cellulaire massive sous l'influence des œstrogènes qui agissent par l'intermédiaire d'ER $\alpha$  et les actions mitogéniques paracrines d'Areg. Or l'expression de ce facteur de croissance, indispensable au développement de la glande mammaire, est sous le contrôle de facteurs de transcription (c-Jun et CREB), eux-

mêmes régulés par RIP140. A l'inverse, la glande mammaire des souris transgéniques, qui surexpriment de manière constitutive RIP140, exhibe une croissance précoce, de nombreuses ramifications latérales avec une hyperplasie des canaux lactifères (Nautiyal et al., 2013c) (Figure 31). Ces souris transgéniques meurent trop rapidement de cardiomyopathies, en lien avec le métabolisme énergétique, pour permettre l'étude de la tumorigenèse de la glande mammaire (Fritah et al., 2010).



**Figure 31 Importance de RIP140 dans le développement de la glande mammaire**  
Adapté de (Nautiyal, 2017)

Cependant, l'analyse de populations cellulaires mammaires issues de ces souris transgéniques a démontré que la surexpression de RIP140 entraîne une augmentation de la population de cellules basales. Dans la population luminale, il a été mis en évidence une augmentation préférentielle des cellules progénitrices par rapport aux cellules différenciées, indiquant que RIP140, en favorisant la prolifération et bloquant la différenciation, participe à la détermination du destin cellulaire dans la glande mammaire. Des analyses globales par ChIP-seq (*Chromatin ImmunoPrecipitation-sequencing*) des sites de fixation du récepteur ER $\alpha$  dans les tissus mammaires, ont révélé que certains des régulateurs du développement de la glande mammaire, qui sont des gènes cible d'ER, sont transcriptionnellement coactivés par RIP140 (Nautiyal et al., 2013c).



#### 4.3.4. Cognition

RIP140 est fortement exprimé dans le cerveau des souris au niveau des aires corticales et hippocampiques, depuis le stade embryonnaire (Lee et al., 1998). Cette expression tend cependant à diminuer avec l'âge. Une augmentation de l'expression de RIP140 a été mise en évidence dans l'hippocampe des patients atteints d'un syndrome de Down (Gardiner, 2006), ce qui s'explique par la localisation au niveau du chromosome 21 du gène codant RIP140. Cette surexpression contribuerait, par ces effets sur le coactivateur du PPAR $\gamma$  (PGC-1), aux dysfonctions chromosomiques et à la sévérité phénotypique de ce syndrome (Izzo et al., 2014). Les interactions de RIP140 avec des récepteurs impliqués dans les processus de plasticité cérébrale, tels qu'ER $\alpha$  ou GR, renforcent la possibilité d'une implication de RIP140, tout en compliquant son décryptage. Des tests comportementaux ont été réalisés sur des souris mâles RIPKO, âgées de 2 mois, dépourvues d'altération morphologique corticale et/ou hippocampique. La coordination motrice et l'activité générale ne sont pas significativement différentes avec celles des animaux sauvages. Il a été observé une diminution de la vitesse de nage chez les souris RIPKO, mais qui peut être attribuée à la faiblesse musculaire de ces individus en comparaison aux sauvages ou encore par l'altération de la signalisation GR (Kolber et al., 2008). Les souris RIPKO présentent des défauts de mémorisation spatiale marqués, là où les souris hétérozygotes exhibent seulement une tendance de diminution de ces capacités (Duclot et al., 2012). Ces données illustrent le rôle bénéfique de RIP140 sur les fonctions cognitives, qui pourrait expliquer la déficience atténuée de l'apprentissage chez des animaux trisomiques pour le chromosome 21, ainsi que les nombreuses perturbations métaboliques et développementales associées à ce syndrome (Gardiner et al., 2010). Il a été démontré que la translocation cytoplasmique de RIP140, dans les neurones hippocampiques, les protège de la mort cellulaire induite par le stress calcique du réticulum endoplasmique (RE). En effet, une fois dans le cytoplasme, l'extrémité C-terminale de RIP140 se lie à l'extrémité C-terminale du récepteur de l'inositol triphosphate (IP $_3$ R) responsable de la libération de calcium, localisé au niveau de la membrane du RE. Cette interaction empêche l'ouverture du canal calcique gardé par IP $_3$ R et la libération excessive et toxique de Ca $^{2+}$  (Feng et al., 2014). RIP140 participerait également à la différenciation des cellules N2A de neuroblastome *in vitro* (Feng et al., 2015). L'implication de RIP140 dans la maladie d'Alzheimer a été récemment mise en évidence. Il est principalement exprimé dans les aires affectées, corticales et hippocampiques, et le contrôle négatif de l'expression de gènes impliqués dans la formation des plaques  $\beta$ -amyloïdes par un mécanisme dépendant des PPAR $\gamma$  supportent ce rôle (Blondrath et al., 2016).

#### **4.4. Implication dans les cancers**

L'importance de RIP140 dans les processus physiologiques décrits, de la croissance à la différenciation cellulaire de différents organes, laisse entrevoir les rôles que ce cofacteur activateur ou répresseur peut jouer dans la tumorigenèse, pour revue (Lapierre et al., 2015a). Nous nous concentrerons au cours des sous-chapitres suivants sur les implications de RIP140 dans les tumeurs solides. Il est cependant à noter qu'il a été identifié comme étant un facteur pronostique des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) (van't Veer et al., 2006). Ces facteurs pronostiques sont corrélés au profil, muté ou non, des segments variable de la chaîne lourde des immunoglobulines (IGHVs), un profil non muté est associé à un mauvais pronostic alors qu'un profil IGHV muté signe un pronostic plus favorable. De faibles niveaux d'expression de RIP140 ont été associés à un mauvais pronostic de survie globale et de temps avant traitement (Herold et al., 2011), pour revue (Lapierre et al., 2015b).

##### **4.4.1. Cancers gynécologiques**

La diminution de l'expression du récepteur ER $\beta$  et de la signalisation subséquente dans les cancers épithéliaux ovariens ont été associées à la sévérité des tumeurs et à un plus mauvais pronostic (Drummond and Fuller, 2010). Le récepteur ER $\beta$  stimule le recrutement de RIP140, au niveau des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE), avec lequel il interagit très étroitement. L'invalidation de RIP140 abolit les effets répressifs des récepteurs ER $\beta$  activés sur la régulation transcriptionnelle dépendante des œstrogènes (Docquier et al., 2013). Les profils transcriptionnels de trois lignées cancéreuses ovariennes ont été étudiés afin de comprendre comment le facteur de croissance hépatocytaire (HGF, *Hepatocyte growth Factor*) était capable de sensibiliser ces cellules au cisplatine par le biais de l'activation du récepteur tyrosine kinase MET (oncogène qui active des voies de signalisation antiapoptotique) (Bardella et al., 2007). Il a été mis en évidence que RIP140 est l'un des gènes dont l'expression est la plus diminuée dans ces cellules sensibilisées au cisplatine par l'HGF et que cette diminution entraîne la mort cellulaire et/ou une augmentation de la sensibilité au cisplatine (Lorenzato et al., 2012).

RIP140 est nécessaire au développement de la glande mammaire comme coactivateur de la signalisation œstrogénique. Il existe de plus une interaction complexe entre RIP140 et le facteur E2F1. Ce facteur de transcription régule positivement l'expression de RIP140, à son tour capable de réprimer la transactivation du promoteur E2F1 dans une boucle de rétrocontrôle négatif. L'analyse de cancers du sein humains a révélé que de faibles niveaux

d'expression de RIP140 étaient associés à de hauts niveaux d'expression des gènes cible du facteur E2F1 et aux tumeurs de type basal (Docquier et al., 2010, 2012). RIP140 est un composant indispensable du complexe transcriptionnel formé avec ER $\alpha$ , dont il partage 80% des sites de liaison. La signature moléculaire des gènes régulés par RIP140 a permis l'identification d'individus atteints de cancer du sein non répondeurs au traitement par le tamoxifène (action anti-œstrogénique par liaison aux ER dans le sein) (Rosell et al., 2014). L'analyse d'échantillons tissulaires tumoraux indique que l'expression de RIP140 est augmentée dans les tumeurs mammaires en comparaison au tissu adjacent sain. Cette surexpression a également été retrouvée dans les lignées cellulaires de cancer du sein, où il a été démontré qu'une inhibition de l'expression de RIP140 diminue la prolifération cellulaire et l'apoptose de manière significative. L'expression de RIP140 est augmentée dans des modèles de cancers du sein induits chez les animaux par le DMBA (diméthylbenz[a]anthracène), or cette induction de la carcinogenèse n'a pas lieu chez les souris RIPKO. L'ensemble de ces données illustrent le rôle critique joué par RIP140 dans le développement et la progression des cancers du sein (Aziz et al., 2015).

Le corépresseur transcriptionnel LCoR (*Ligand-dependent coRepressor*) a récemment été identifié comme un partenaire et une cible transcriptionnelle de RIP140. Tout comme RIP140, LCoR a été initialement identifié par son interaction avec le récepteur ER $\alpha$ , dont il est un répresseur, ainsi que d'autres facteurs de transcription, par l'intermédiaire des HDACs et des CtBPs. RIP140 régule positivement l'expression de LCoR dans des cellules de cancers du sein et dans les modèles animaux transgéniques. Ces deux corégulateurs sont capables d'interagir au travers du domaine HTH (*helix-turn-helix*) de LCoR. Ce domaine s'avère indispensable à ses effets inhibiteurs de l'activité transcriptionnelle et de la prolifération. L'interaction avec RIP140 apparaît également nécessaire aux effets répresseurs de LCoR et sollicite les régions N et C terminales de la protéine RIP140. L'analyse transcriptomique de biopsies de cancer du sein a révélé une corrélation d'expression de ces deux facteurs. Une expression élevée, associée aux tumeurs de type luminal, est corrélée à un meilleur pronostic (Jalaguier et al., 2017).

## 4.4.2. Cancers digestifs

### 4.4.2.1. Foie

L'expression de RIP140 est diminuée dans 70% des carcinomes hépatocellulaires en comparaison au tissu hépatique normal. Il a été démontré que la surexpression de RIP140 dans des lignées cellulaires d'hépatocarcinome est responsable d'une diminution de la prolifération et de la migration cellulaires. Une inhibition de la voie de signalisation TCF/ $\beta$ -caténine a été impliquée au travers d'une interaction directe de RIP140 avec la  $\beta$ -caténine (Zhang et al., 2015). Une dérégulation du miR-140-3-p capable de cibler l'ARNm de RIP140 pourrait être impliquée dans sa diminution d'expression, stimulant une signalisation antiapoptotique susceptible de contribuer à l'hépatocarcinogénèse (Takata et al., 2011).

### 4.4.2.2. Estomac

Les travaux, soumis pour publication, de Mouna Triki ont permis de mettre évidence par des marquages immunohistochimiques de tumeurs gastriques et colorectales, une corrélation positive entre l'expression des deux corégulateurs transcriptionnels, RIP140 et LCoR, au sein de ces tumeurs. Leur expression a tendance à diminuer dans les cancers colorectaux alors qu'elle semble plus forte dans les tumeurs gastriques, en comparaison au tissu adjacent sain. Dans ces deux types de cancers, l'expression de RIP140 et LCoR a pu être corrélée au stade TNM de la tumeur et à son niveau de différenciation. Des corrélations significatives avec des protéines impliquées dans la progression et l'invasion, telles que l'E-cadhérine et Cox-2 ont été mises en évidence. Dans les cancers gastriques, LCoR apparaît comme un marqueur indépendant de mauvais pronostic, lorsqu'il est surexprimé, tout comme dans les cancers colorectaux. RIP140 semble, quant à lui, associé aux cancers gastriques de mauvais pronostic, alors que c'est un facteur de bon pronostic des cancers colorectaux. Un autre volet des travaux de Mouna Triki, en cours de soumission, s'est intéressé aux mécanismes moléculaires des effets de RIP140 dans les cancers gastriques. L'utilisation de lignées humaines de cancer gastrique présentant des dérégulations d'expression de RIP140 lui ont permis de démontrer l'effet anti-prolifératif de RIP140, au sein de ces cellules. Cet effet semble s'exercer au travers d'une régulation transcriptionnelle positive de l'expression du gène  $p21^{WAF1/CIP1}$ , confirmée par l'augmentation de l'expression du gène endogène et de la protéine p21, ainsi que de la voie de signalisation Hippo. RIP140 diminue la migration cellulaire et augmente l'expression de l'E-cadhérine. Il régule aussi positivement l'expression de LCoR permettant d'expliquer les effets de RIP140 sur la prolifération et la migration cellulaire.

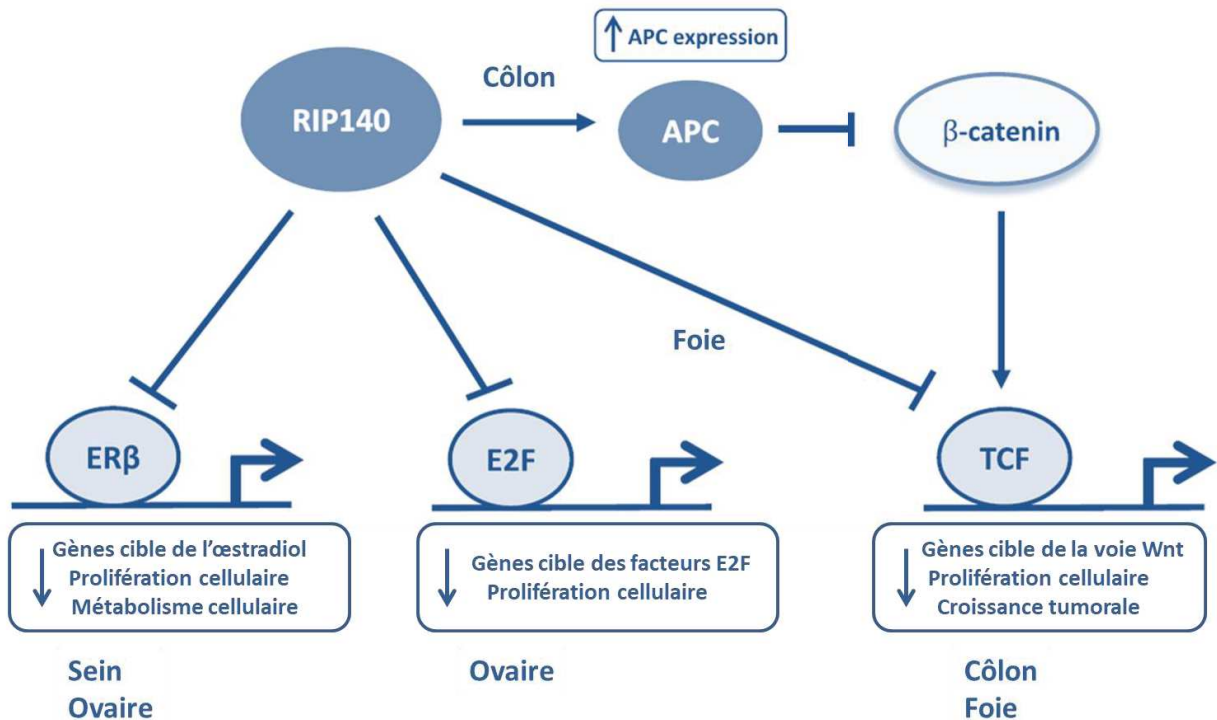
#### 4.4.2.3. Intestin et côlon

RIP140 participe à la régulation de l'homéostasie mais également à la tumorigenèse intestinale (Lapierre et al., 2014). RIP140 est en effet exprimé dans tous les tissus murins et particulièrement dans l'intestin et le côlon, où il est détecté dans le noyau de toutes les cellules épithéliales, avec une expression croissante le long de l'axe crypte/villosité. La longueur de cet axe apparaît augmentée chez les souris transgéniques qui surexpriment RIP140 alors qu'elle est diminuée chez les souris RIPKO. Néanmoins, associée à une diminution de la longueur de l'intestin grêle chez les individus KO et une augmentation chez les transgéniques, les animaux conservent une surface épithéliale totale identique. Il a été démontré que RIP140 inhibe la prolifération cellulaire intestinale (marquage EdU) et l'apoptose (méthode TUNEL, *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) au sein de l'épithélium intestinal murin. La surexpression de RIP140 entraîne une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération tels que c-Myc ou PCNA. En effet miroir, son invalidation augmente leur expression. Ces données illustrent le rôle de RIP140 dans l'inhibition du renouvellement de l'épithélium intestinal.

Connaissant le rôle critique joué par la voie de signalisation Wnt dans la prolifération des cancers coliques, l'effet de RIP140 sur cette voie de signalisation a été exploré au sein de l'épithélium intestinal murin et dans différentes lignées cellulaires humaines de cancer colorectal. La surexpression de RIP140 entraîne une inhibition de la voie Wnt au travers d'une régulation positive de l'expression du gène *APC*, impliqué dans la formation du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine. L'expression de la  $\beta$ -caténine active est augmentée chez les souris RIPKO et diminuée chez les souris surexprimant RIP140. Cette inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par RIP140 a été confirmée par l'analyse des niveaux d'expression de ses gènes cible, qui s'avèrent inversement corrélés à ceux de *RIP140*. L'expression de *RIP140* est cependant corrélée positivement aux niveaux d'expression des gènes codant les protéines du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine (*APC*, *AXIN*, *GSK3 $\beta$* ). L'expression de RIP140 suit le même gradient d'expression, le long de l'axe crypte/villosité, que celui de la protéine APC. Des expériences de ChIP ont permis de confirmer le recrutement de RIP140 au niveau de la région proximale du promoteur *APC*, qui est une cible transcriptionnelle directe. RIP140 inhibe l'activation de la  $\beta$ -caténine, en régulant positivement l'expression des protéines impliquées dans sa dégradation. RIP140 bloque la progression du cycle cellulaire en phase G1 de manière significative et spécifique et sa surexpression au sein de lignées de CCR humaines inhibe leur prolifération *in vitro* et *in vivo*, après xénogreffe chez la souris athymique. L'utilisation de souris dont le gène *APC* est invalidé de manière hétérozygote (*APC<sup>Δ14/+</sup>*) ont

permis d'étudier l'effet d'une invalidation hétérozygote concomitante de RIP140, associée à une diminution de la durée de vie. Les animaux  $APC^{d14/+}$  avec une invalidation homozygote de RIP140 ne sont, quant à eux, pas viables. La comparaison de tissus humains, tumoraux et normaux, a révélé une diminution de l'expression de RIP140 dans les biopsies de CCR (60%). Les tumeurs qui surexpriment RIP140 présentent un volume tumoral significativement plus faible (2,5 fois). L'expression de RIP140 est corrélée de manière positive à la survie globale. Ces résultats illustrent l'association de la tumorigenèse colorectale à la diminution de l'expression de RIP140 et son rôle en qualité de marqueur de bon pronostic de ces cancers.

La figure ci-après illustre l'ensemble des implications de RIP140 dans la régulation des voies de signalisation clé de la tumorigenèse des différents organes décrits (Figure 32).



**Figure 32 Signalisation nucléaire de RIP140 dans différents cancers**  
Adapté de (Lapierre et al., 2015a)

# OBJECTIFS





## OBJECTIFS

Dans le cadre du syndrome de Lynch, un dépistage précoce est nécessaire à l'optimisation de la prise en charge des patients et de leur entourage. Le phénotype d'instabilité microsatellitaire et l'expression des protéines MMR sont aujourd'hui recherchés en pratique courante. Cela a conduit à une détection accrue de patients avec une perte d'expression d'une protéine MMR au sein du tissu tumoral ou un phénotype MSI. Cependant certains d'entre eux ne présentent pas de mutation germinale délétère des gènes codant ces protéines. Ces personnes et leurs apparentés sont suivis de la même manière que les patients atteints d'un syndrome de Lynch, car la suspicion de ce diagnostic persiste. Malgré une détection de plus en plus précise de nouvelles mutations et de leur signification clinique, l'anomalie génétique qui sous-tend les cancers de phénotype MSI, apparentés au syndrome de Lynch (LLS), n'est pas encore clairement identifiée (Rodríguez-Soler et al., 2013).

RIP140 est un corégulateur transcriptionnel impliqué dans de nombreux cancers appartenant au spectre du syndrome de Lynch. Les données récentes obtenues dans la tumorigenèse colorectale sporadique soulèvent la question de son implication dans la problématique des cancers colorectaux héréditaires. La régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la réparation, notamment du système MMR, fait intervenir des facteurs de transcription connus pour être régulés ou interagir avec RIP140. L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier les effets de ce corégulateur transcriptionnel dans la problématique particulière du syndrome de Lynch, au travers des effets qu'il exerce sur les gènes de la réparation de l'ADN, principalement le système MMR. La régulation transcriptionnelle d'une polymérase translésionnelle par RIP140 a également été mise en évidence. Enfin, un autre aspect de ce travail a consisté à évaluer les conséquences fonctionnelles d'une mutation particulière de RIP140 sur l'expression de ces gènes.



# RESULTATS



# **Partie 1**

## **RIP140 & MMR**





## RESULTATS

### 1. Régulation du complexe MutS $\alpha$ par RIP140 et ses conséquences

#### 1.1. Introduction

Les recherches sur le syndrome de Lynch ont permis de mieux comprendre l'implication du système de réparation des mésappariements de l'ADN. Cependant, des questions comme celle de l'haploinsuffisance, subsistent (Peltomäki, 2016). La présence d'une seule copie intacte d'un gène MMR dans les cellules somatiques ne permet pas d'assurer une signalisation des dommages et une signalisation pro-apoptotique appropriées, ce qui peut représenter un avantage pour la tumorigenèse (Cejka et al., 2003; Kawate et al., 2000). Dans le cadre du LS, le développement d'un adénome colorectal apparaît possible même s'il persiste un allèle sauvage du gène MMR de prédisposition (Valo et al., 2015; Yurgelun et al., 2012). Les organes ne requérant pas les mêmes niveaux d'expression de protéines MMR, leur susceptibilité tumorale peut être différente (Lotsari et al., 2012). L'inactivation d'autres gènes pourrait contribuer à l'initiation tumorale des cellules haploinsuffisantes.

L'hétérodimère MutS $\alpha$  est le complexe majeur de reconnaissance des dommages du système MMR et les altérations de la protéine MSH2 comptent parmi les plus délétères au fonctionnement de ce système. Les effets du corégulateur transcriptionnel RIP140 dans la tumorigenèse intestinale sporadique ont été récemment décrits par notre équipe (Lapierre et al., 2014). La modulation de l'expression de RIP140 au sein de modèles, principalement cellulaires, a permis d'analyser les effets de ce corégulateur transcriptionnel sur le système MMR et plus particulièrement sur les gènes qui codent les protéines formant le complexe MutS $\alpha$ . Les conséquences phénotypiques et fonctionnelles de cette régulation ont été étudiées. L'identification d'une mutation de RIP140 questionne sur sa fonctionnalité et ses effets. Ces derniers ont été étudiés et la présence de cette mutation a été recherchée au sein de prélèvements tumoraux humains.

Ce travail a donné lieu à un article en soumission pour publication, intitulé :

**“RIP140 regulates MutS $\alpha$  expression and microsatellite instability in colon cancer”**

#### 1.2. Article



# **RIP140 regulates MutS $\alpha$ expression and microsatellite instability in colon cancer**

P. Palassin<sup>1</sup>, M. Lapierre<sup>1</sup>, R. Stehle<sup>1</sup>, S. Bonnet<sup>1</sup>, A. Boulahtouf<sup>1</sup>, C. Rodriguez<sup>1</sup>, A. Ho-Pun-Cheung<sup>1</sup>, E. Crapez<sup>1</sup>, F Boissière<sup>1</sup>, F. Bibeau, J. Selves<sup>2</sup>, JS Hoffmann<sup>2</sup>, S. Jalaguier<sup>1</sup>, A. Castet-Nicolas<sup>1,3,4§</sup>, V. Cavailles<sup>1\*§</sup>

<sup>1</sup>IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France; INSERM, U1194, Montpellier, F-34298, France; Université de Montpellier, Montpellier, F-34090, France; Institut régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, F-34298, France.

<sup>2</sup> IUCT, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopôle, Département de Pathologie, 31059 Toulouse, France.

<sup>3</sup> Centre Hospitalo-Universitaire Montpellier, <sup>4</sup> Unité de Formation et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 34090 Montpellier, France.

**Short title:** RIP140 in familial colon cancer

§ Should be considered as co-last authors

\* Corresponding author: Vincent Cavailles, IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM, U1194, 208 rue des Apothicaires, 34298 Montpellier cedex 5, France; Tel: (33)467612405; Fax: (33)467613787; E-mail: [vincent.cavailles@inserm.fr](mailto:vincent.cavailles@inserm.fr)

## **ABSTRACT**

Colorectal cancer (CRC) is a common neoplasm with familial forms such as Lynch syndrome which is due to inherited germline mutation of one gene of the DNA mismatch repair (MMR) system leading to microsatellite instability (MSI). Some clinically diagnosed families do not exhibit MMR gene alterations and are classified as Lynch-like syndrome (LLS). We recently reported the role of the transcription factor RIP140 (Receptor Interacting Protein of 140 kDa) in sporadic intestinal tumorigenesis and describe herein its potential role in LLS. By using different engineered human colorectal and murine cell lines together with human CRC biopsies, we demonstrated that RIP140 positively regulates at the transcriptional level the expression of the *MSH2* and *MSH6* genes which encode the MutS $\alpha$  MMR recognition complex. In line with these regulations, RIP140 expression was associated with increased microsatellite stability and with resistance to several drugs including oxaliplatin, 5-fluorouracil and SN38. Finally, in MSI CRCs, we detected a frameshift mutation in the RIP140 coding sequence which generates a truncated protein. This mutation was found in about 17% of tumors from LLS patients, impaired the regulation of MutS $\alpha$  gene expression by RIP140 and was associated with a decreased overall survival of patients. In conclusion, by decreasing the expression of genes implicated in maintenance of genome integrity, the mutation in the *RIP140* gene could lead to microsatellite instability in familial CRC patients, especially those where no MMR gene mutations are found.

**233 words**

**Keywords:** Colorectal cancer, Lynch syndrome, RIP140, mismatch repair, microsatellite instability.

## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in males and the second in females in the world, and is responsible of more than 600 000 deaths each year<sup>1</sup>. About 20-30% of CRC cases have an inherited component including Lynch syndrome (LS) which accounts for 2-4% of all CRCs<sup>2</sup>. LS is defined by an autosomal dominant heterozygous constitutional mutation in one mismatch repair (MMR) gene<sup>3,4</sup> which can lead to cancer development after a second somatic hit in the respective gene. The MMR system is necessary for maintaining genome fidelity and corrects mistakes in DNA replication which, once impaired, generates a hypermutated tumor that accumulates hundreds of random point mutations and frameshifts in the genome<sup>5,6</sup>. The manifestation could thus be microsatellite instability (MSI) and absence of one or more of the 4 MMR proteins on immunohistochemical staining. In contrast, *MLH1* gene promoter hypermethylation is mainly implicated in MSI sporadic CRC<sup>6</sup>.

It has been evidenced that patients with high level of MSI (MSI-H) stage I/II CRC including sporadic and Lynch syndrome-related familial colorectal cancers, tend to have a less aggressive clinical behavior and a favorable prognosis compared to patients harboring MSS tumors (see<sup>7</sup> for a recent review) which possibly links to local inflammation<sup>8</sup> in response to the production of highly immunogenic frameshift peptides transcribed from microsatellite-unstable genes in LS mucosa<sup>9</sup>. Moreover, clinicians reported an inefficiency of Fluorouracil (5-FU) based adjuvant chemotherapy in patients with a stage II MMR-deficient disease<sup>10</sup>.

In 60-70% of cases in which LS is clinically suspected, patients do not exhibit any germline MMR gene mutation<sup>11</sup>. These patients are affected by a Lynch-like syndrome (LLS) which represents a major clinical challenge, as for patients themselves and also their related in order to adjust prevention strategy. Several potential explanations are advanced for LLS, *i.e.* undetectable germline MMR gene mutations by current testing or other mechanisms that inactivate DNA MMR which could also result in tumor phenotype as Lynch syndrome<sup>6</sup>.

Within the MMR system, the DNA recognition complexes MutS $\alpha$  and MutS $\beta$  consist in heterodimers of the different MutS homolog (MSH) *i.e.* MSH2-MSH6 or MSH2-MSH3, respectively. Following mismatch or insertion/deletion loops detection, the execution complex MutL $\alpha$  (MLH1-PMS2) bind to MutS $\alpha$  or MutS $\beta$  to signal other proteins for excision and re-synthesis of the mismatched DNA or commits the cell to

programmed cell death<sup>6,12,13</sup>. Moreover, MutS $\alpha$  and MLH1 exhibit a significant role in DNA-damage repair, since these proteins belong to the BRCA1-associated genome surveillance complex which maintains genomic integrity in response to DNA damage<sup>14</sup>.

The transcription coregulator RIP140 (Receptor Interacting Protein, 140 kDa), also known as NRIP1 (Nuclear Receptor-Interacting Protein 1), was first identified in human cancer cells through its interaction with nuclear hormone receptors<sup>15,16</sup>. RIP140 was also shown to interact with other transcription factors such as E2F<sup>17</sup>. RIP140 mainly acts as a transcriptional repressor by means of four inhibitory domains<sup>18</sup> and several post-translational modifications play important roles in controlling its subcellular location and repressive activity<sup>19</sup>. The physiological importance of RIP140 has been evaluated using mice lacking the *Rip140* gene (RIPKO mice). These animals are viable but display a wide range of phenotypic alterations in various tissues and organs such as infertility of female mice<sup>20</sup> or reduced body fat content<sup>21</sup>, diminished proinflammatory cytokine response<sup>22</sup> and, more recently, severe cognitive impairments<sup>23</sup> and mammary gland morphogenesis<sup>24</sup>. Moreover, in the human pathology, a single nucleotide polymorphism which introduces an amino-acid change in the RIP140 coding sequence was associated to various pathologies, including endometriosis<sup>25</sup> and lung cancer<sup>26</sup>. More recently, our laboratory demonstrated that RIP140 plays a major role in normal and malignant development of the intestinal epithelium through a negative regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway<sup>27</sup>. In CRC, RIP140 appeared as a good prognosis marker since its expression (which decreased in tumor samples as compared to the adjacent healthy tissue) significantly correlated with a better overall survival of patients.

In the present study, we demonstrated that RIP140 positively regulates *MutS $\alpha$*  gene expression at the transcriptional level, alters microsatellite stability and modifies the response to cytotoxic drugs in CRC cells. Moreover, in MSI CRC cells and tumors, we identified a frameshift mutation in the RIP140 coding sequence which impaired its biological activity. Very interestingly, this mutation was associated with poor overall survival and detected in LLS tumors. We propose that, by modulating MMR gene expression, RIP140 actively participates to this MMR deficient phenotype.

## RESULTS

### **RIP140 regulates MMR gene expression in mouse models**

To decipher the role of RIP140 on the regulation of MMR gene expression, we first used transgenic mice in which RIP140 was either knocked-out (RIPKO mice) or overexpressed (RIPTg mice)<sup>28</sup>. As shown in Figure 1A, a significant decrease in the levels of MSH2 and MSH6 mRNAs (which encode the proteins forming the MutS $\alpha$  complex) was observed in the intestinal epithelium of RIPKO mice, whereas an increase was noted in RIPTg mice as compared to wild-type animals. These regulations appeared specific since the expression of other MMR genes such as *MLH1* did not vary in the different genotypes (data not shown). The decreased expression of *MSH2* and *MSH6* gene expression was confirmed by immunohistochemical analysis of the intestinal epithelium of RIPKO mice and their WT littermates, using MSH2 or MSH6 specific antibodies (Figure 1B).

The MSH2/MSH6 gene expression was also significantly reduced in immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from the RIPKO or WT mice. This regulation was observed at the mRNA level (Figure 1C) and at the protein level, either by western-blot analysis (Figure 1D) or by immunofluorescence (Figure 1E). Altogether, these results demonstrate that RIP140 controls the expression of the two genes which encode the MutS $\alpha$  complex in the mouse intestinal epithelium.

### **RIP140 regulates *MSH2/MSH6* gene transcription in CRC cells**

To get closer to the human pathology, we then analyzed the effect of RIP140 on MutS $\alpha$  gene expression in human CRC cell lines. By using HCT116 cells stably overexpressing RIP140, we confirmed the increased expression of the *MSH2/MSH6* genes at the mRNA (Figure 2A) and protein (Figure 2B) levels. The regulation of *MSH2/MSH6* mRNA levels was also observed after transient transfection of HCT116 cells with a RIP140 expression vector (supplementary Figure S1A). As expected, when the expression of the *RIP140* gene was silenced in HCT116 cells, a significant decrease in *MSH2/MSH6* gene expression was noticed (Figure 2C). Moreover, a significant reduction of MSH2/MSH6 protein levels was observed by immunofluorescence staining after RIP140 silencing (Figure 2D). In order to eliminate possible off-target effects, we used another siRNA targeting RIP140 which raised the



same effects on *MSH2/MSH6* gene expression (supplementary Figure S1B). As shown in supplementary Figure S2, the same regulation of *MSH2/MSH6* gene expression at the mRNA and protein levels was observed upon RIP140 ectopic expression in SW480 (panels A and B) and silencing in RKO (panels C and D) colon cancer cells. Moreover, the results were also confirmed in other cell lines including SW620 cells (data not shown).

To further investigate the mechanisms underlying the positive regulation of *MSH2/MSH6* gene expression by RIP140, we set up transient transfection experiments of HCT116 CRC cells using luciferase reporter constructs encompassing the proximal promoter regions of the *MSH2* or *MSH6* genes (Figure 3A). As observed in Figure 3B, increasing doses of the RIP140 expression vector significantly increased in a dose-dependent manner the luciferase activity driven by the *MSH2* and *MSH6* gene promoters, thus supporting a positive transcriptional regulation of these two genes by RIP140. Although RIP140 was first identified as a transcriptional repressor, we and others have reported positive regulation of gene expression (for a review see<sup>29</sup>). In particular, we described transcriptional activation of gene expression by RIP140 implicating Sp1-mediated mechanisms<sup>30</sup>. Since both *MSH2* and *MSH6* gene promoters exhibit Sp1 binding sites, we tested if the mutation of these Sp1 binding sites affected the transcriptional response to RIP140 ectopic expression. As shown in Figure 3C, the induction of luciferase activity by RIP140 was significantly reduced when we used the Sp1-mutated reporter constructs, suggesting that the regulation of *MSH2* and *MSH6* gene expression by RIP140 was at least in part Sp1-mediated.

### **Correlation of gene expression in human CRC biopsies**

In order to validate in human CRC tumor biopsies, the expression data obtained in mouse tissues and in CRC cells, we first reanalyzed a transcriptomic dataset from 396 human CRC<sup>31</sup>. As shown in Figure 4A, we observed a very significant positive correlation between RIP140 mRNA levels and those transcribed from the *MSH2* ( $r=0.65$ ;  $p<2.2e-16$ ) and *MSH6* ( $r=0.57$ ;  $p<2.2e-16$ ). Interestingly, the correlations appeared even better when we considered only the MSS tumors, although *MSH2* was also significantly correlated with that of RIP140 in MSI tumors (Figure 4B). In order to validate these data, we reanalyzed another transcriptomic data set from the TCGA (TCGA-COAD RNA-seq data obtained on 415 samples)<sup>32</sup> which confirmed a

significant correlation between RIP140 and *MSH2* ( $r=0.43$ ;  $p<2.2e-16$ ) and *MSH6* ( $r=0.31$ ;  $p=3.6e-16$ ) mRNA levels (Figure 4C).

This dataset was further reanalyzed taking into account the different molecular subtypes<sup>33</sup>. Interestingly, the best correlations were observed in the C1, C3 and C6 subgroups whereas the correlations were not significant in the C4 and C2/C5 groups for *MSH2* and *MSH6*, respectively (Figure 4C). Moreover, significant positive correlations of *RIP140* gene expression with *MSH2* ( $r=0.17$ ;  $p=0.00005$ ) expression were also found using a third dataset<sup>33</sup> thus strengthening the results (data not shown).

### **Functional consequences of the regulation of MutS $\alpha$ by RIP140**

The major consequence of DNA mismatch repair system defect is microsatellite instability<sup>34</sup>. We therefore asked whether the regulation of *MSH2* and *MSH6* gene expression by RIP140 could lead to a modification of microsatellite instability. This was monitored by analyzing 7 mononucleotide repeats (BAT-25, BAT-26, MONO-27, NR-21, NR-24, Penta C and Penta D) using a multiplexed PCR assay identical to that used for patient diagnosis in clinical routine (Figure 5). As a first step, we analyzed two HCT116 cell lines with low (HCT116LR) or high (HCT116HR) RIP140 expression levels. In HCT116HR cells, the expression levels of *MSH2* and *MSH6* genes were, as expected, higher as compared to HCT116LR (supplementary Figure S3). As shown in Figure 5A and C, microsatellite analysis in these two cell lines revealed a higher instability in HCT116LR cells in which RIP140, *MSH2* and *MSH6* genes were expressed at lower levels. Indeed, 4 out of 5 mononucleotide repeats (*i.e.* BAT-25, BAT-26, MONO-27 and NR-21) were found unstable in HCT116LR cells whereas only MONO-27 and NR-24 were unstable in HCT116HR cells.

In order to demonstrate that the differential expression of RIP140 was indeed the causation of this instability, we performed the analysis in HCT116LR cells ectopically expressing RIP140. As shown in Figure 5B and C, the HCT116-RIP140 cells which exhibit higher levels of *MSH2/MSH6* genes (Figure 2A) were more stable than the HCT116-GFP cells. Altogether, these analyses indicated that high RIP140 levels correlated with high *MSH2* and *MSH6* gene expression and with increased microsatellite instability.

Another consequence of the MMR system disruption is a differential sensitivity to cytotoxic drugs used in CRC chemotherapy. For instance, the MMR system

participates to the cytotoxic effect of 5-FU and loss of function of this system leads to a decreased sensitivity of MSI tumors to this drug<sup>35,36</sup>. Using our engineered cell models (MEFs and HCT116 cells), we measured the effects of the altered expression of the *RIP140* gene on drug sensitivity by comparing IC<sub>50</sub> ratios. As shown in Figure 6 and supplementary Figure S4A, we observed a significant increase of sensitivity to 5-FU, oxaliplatin and SN38 (the active metabolite of irinotecan) when RIP140 was knocked-out in MEFs (Figure 6, panels A, C and E) and a decrease of sensitivity when RIP140 was overexpressed in HCT116LR CRC cells (Figure 6, panels B, D and F). Interestingly, the same IC<sub>50</sub> ratio variations were observed for two other drugs, namely hydroxyurea and gemcitabine, which are DNA replication inhibitors (Supplementary Figure S4).

In conclusion, these data indicated that the regulation of *MSH2* and *MSH6* gene expression by RIP140 correlated with phenotypic changes in term of microsatellite instability and drug sensitivity. This results strongly suggested that a loss-of-function of the *RIP140* gene might lead to a decreased expression of *MutS $\alpha$*  genes in CRC cells, and be the causative parameter leading to microsatellite instability and intestinal tumorigenesis especially in Lynch-like syndrome.

### **Identification and characterization of a RIP140 frameshift mutation**

In order to support this hypothesis, we screened several MSI CRC cell lines by sequencing the total RIP140 coding exon. This allowed us to identify in LoVo cells a frame-shift mutation deleting an adenosine at nucleotide 2176 (modification from 8A to 7A) leading to a truncated protein lacking the last 431 amino-acids and exhibiting a short specific RKLP sequence (Figure 7A).

This RIP140 variant protein (called RIP<sup>MSI</sup>) exhibited the same subcellular localization than the wild-type protein, as shown after transient transfection of HCT116 cells with a Cherry- or GFP-fused plasmids (Figure 7B). However, in reporter assays using Gal4DBD constructs in which the wild-type or the mutated RIP140 coding sequences were fused to the DNA binding domain of the Gal4 transcription factor, we observed a clear decrease of the intrinsic transrepression effect of RIP<sup>MSI</sup> (Figure 7C), probably due to the loss of the repression domains RD3 and RD4 (Figure 7A).

The biological activity of the RIP<sup>MSI</sup> variant was then tested on different cell parameters using RIPKO MEFs engineered to stably express either the wild-type or the RIP<sup>MSI</sup> protein (see supplementary Figure S5A). As shown in Figure 7D, ectopic

expression of the RIP<sup>MSI</sup> protein resulted in a slight increase in cell proliferation as compared to the significant inhibition observed with the wild-type RIP140 protein. The same “dominant” negative effect was observed on the response to 5-FU, with an increased sensitivity of RIP<sup>MSI</sup> expressing cells as compared to the increased sensitivity observed with the wild-type protein (Figure 7E).

Finally, we tested the activity of the RIP<sup>MSI</sup> variant on *MutS $\alpha$*  gene expression in RIPKO MEFs, in those cells, the RIP<sup>MSI</sup> protein was less efficient to increase *MSH2* and *MSH6* gene expression than the wild-type protein (Figure 8A and supplementary Figure S5B). In luciferase reporter assays performed in HCT116LR cells (Figure 8B), RIP<sup>MSI</sup> induced a weaker stimulation of *MSH2* gene promoter. The same results were obtained on endogenous gene expression in HT29 CRC cells transiently overexpressing wild-type RIP140 or the RIP<sup>MSI</sup> mutant (Figure 8C and supplementary Figure S5B).

Interestingly, the RIP<sup>MSI</sup> mutant appeared to exert a dominant negative effect since, its ectopic expression slightly increased *MSH2* and *MSH6* gene expression in RIPKO MEFs both at the mRNA and protein levels (see Figure 8 D and E), whereas a significant decrease of the expression of the two target genes was observed in WT MEFs which express RIP140 endogenously (see Figure 8 D and F).

### **Identification of the RIP<sup>MSI</sup> mutation in LLS colon cancer biopsies**

In order to analyze the presence of the RIP<sup>MSI</sup> mutation in colon cancers with microsatellite instability, we used a cohort of 126 tumor samples with MSI (Table 1) and sequenced the tumor DNA. The RIP<sup>MSI</sup> mutation was found in 19% of all the cases (Figure 9A). In the subgroup of tumors with a MMR gene alteration, the frequency higher in samples with *MLH1* promoter hypermethylation, increased in samples with *MLH1/PMS2* mutations (25%), whereas it was slightly decreased in those with mutation in the *MSH2/MSH6* genes (17.1%). Moreover and most importantly, the RIP<sup>MSI</sup> mutation was detected in 16.2% of tumors without any genetic alteration (neither *MLH1* hypermethylation promoter nor germinal mutations of the MMR genes) which correspond to the so-called Lynch-like syndrome. The correlation with the clinico-biological parameters revealed that the RIP<sup>MSI</sup> mutation was associated with a significant decreased of patient overall survival (p=0.01) (Figure 9B).

## DISCUSSION

Colorectal cancer (CRC) is a frequent neoplasm with sporadic and familial forms with microsatellite instability due to defects in the MMR system. We recently described that the transcription factor RIP140 was an important player in the regulation of intestinal homeostasis and tumorigenesis<sup>28</sup>. In the present study, we report its potential role in MSI colorectal cancers and in familial forms known as Lynch-like syndrome<sup>11</sup>.

First, our data clearly demonstrated that RIP140 positively regulates *MSH2* and *MSH6* gene expression both in mouse and human cells and tissues. This regulation takes place at the transcriptional level and might, at least partly, implicate Sp1 transcription factors. However, other transcription factors including p53<sup>37,38</sup>, c-Myc<sup>39</sup>, E2Fs<sup>40</sup> have been described to regulate the expression of these three genes and it would be interesting to define their relevance in mediating the positive regulation by RIP140. Interestingly, it has been reported that the transcriptional deregulation of the *MSH2* gene in response to Bcl2 was causing microsatellite instability<sup>41</sup>. The same observation was made in response of CRC cells to HIF1 $\alpha$ , which induced genetic instability by transcriptionally down-regulating *MSH2/MSH6* expression<sup>42</sup>. More recently, Fang *et al.* show that *CRTC2* was acting as a lymphoma tumor suppressor gene that preserves genomic integrity by stimulating transcription of DNA mismatch repair genes including *MSH6* and *PMS1*<sup>43</sup>. Our present work demonstrated that the deregulation of MutS $\alpha$  gene expression in response to RIP140 ectopic expression was associated with an increased microsatellite instability. It is therefore clear that besides genetic or epigenetic alterations, the transcriptional deregulation of several MMR genes could lead to microsatellite instability.

By regulating *MSH2* and *MSH6* gene expression, RIP140 might induce other phenotypic consequences including, for instance, the sensitivity to cytotoxic drugs. Indeed, although MMR deficiency has been linked to resistance to 5-FU<sup>44</sup>, several papers have reported an increased sensitivity to different molecules such as methotrexate<sup>45</sup>, gemcitabine or hydroxyurea<sup>46</sup>. Our present work confirmed that RIP140 deregulation impacted the sensitivity to such molecules. However, we also observed an increase sensitivity to 5-FU in cells with a decrease of MutS $\alpha$  expression in response to RIP140 knock-down. This apparent discrepancy with the literature might be explained by the fact that RIP140 might regulate other DNA repair

systems and cellular pathways involved in coping DNA damages in response to 5-FU. Another explanation of these results could be linked to indirect effect of RIP140 on cell proliferation. Indeed, cells invalidated for the *RIP140* gene proliferate at a higher rate and might, as a consequence, be more efficiently targeted by cytotoxic drugs in an MMR-independent effect as previously reported<sup>47</sup>.

Other phenotypic consequences might imply the regulation of chromosomal instability since it has been shown that MSH2 deficiency was leading to chromosomal abnormalities, centrosome amplification and telomere capping defect<sup>48</sup>. It has also been reported that MSH2-MSH6 complex was an S-phase component of replication centers independent of mispaired bases, suggesting that *MutS $\alpha$*  genes may have a role beyond canonical MMR *in vivo*<sup>49,50</sup>. Finally, regulation of fertility<sup>51</sup> or ageing<sup>52</sup> by RIP140 could at least partly involve MMR gene deregulation since this repair machinery has been implicated in the regulation of such biological processes<sup>53,54</sup>.

Concerning cancer development and progression, the suppression of MMR activity directly leads to an increase in the mutation frequency, and finally to malignancy. Therefore, MMR functions as a “caretaker” by preventing the accumulation of deleterious mutations<sup>55</sup>. In line with this observation and with our above-mentioned data, we detected, in MSI CRC cells and samples, a RIP140 frameshift mutation which impaired the normal function of the protein in term of intrinsic transrepression, regulation of MMR gene expression, inhibition of cell proliferation and drug response. This mutation (previously reported in MMR-deficient endometrial cancers<sup>56,57</sup>) was found at the heterozygous status and several lines of evidence suggested that it might exert a dominant negative effect on the wild-type protein. Of note, we recently identified a heterozygous truncating mutation in the *RIP140* gene in a family of patients with congenital anomalies of the kidneys and urinary tract<sup>58</sup>. This truncated mutant interferes with retinoic acid transcriptional signaling by acting in a dominant manner. Further experiments will be necessary to further analyze the effects of the RIP<sup>MSI</sup> truncated variant on other transcriptional responses including steroid receptors or E2F transcription factors<sup>59</sup>.

Based on the role played by RIP140 in the control of *MutS $\alpha$*  gene expression, a mutation within the RIP140 protein abrogating this regulation could be the initial cause of MMR deficiency. This hypothesis is strongly supported by the detection in Lynch-like syndrome where no alterations of MMR genes were found (presence of the RIP<sup>MSI</sup> mutation in 16% of the cases). These results have to be confirmed on

larger LLS cohorts either by sequencing or by detection of serum antibodies against the RIP140 frameshift peptide. Indeed, humoral immune responses against a variety of different frameshift peptide (FSP) antigens have been detected in MSI CRC patients with Lynch syndrome. Low level of FSP-specific antibody responses were observed in healthy Lynch syndrome mutation carriers without tumor history thus supporting future diagnostic and therapeutic applications based on the detection of such specific antibodies<sup>60</sup>.

## **CONCLUSION**

This study demonstrates for the first time that in CRC cells RIP140 1) transcriptionally regulates the expression of the genes encoding the MutS $\alpha$  complex, 2) controls the level of microsatellite instability and 3) modulates the response to drug cytotoxicity. At the clinical level, we found a correlation of *RIP140* gene expression with *MSH2* and *MSH6* in human CRC tumors and identified a RIP140 frameshift mutation in MSI CRC samples, which encodes a truncated protein with altered biological properties. This mutation found in tumors of LLS patients is associated with a decreased overall survival and could play a major role in the promotion of intestinal tumorigenesis.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plasmids**

pRL-CMV-renilla and pGL promoters were obtained from Promega (Charbonnières, France). pEF-cmyc-RIP140 was previously described<sup>61</sup>. pEGFP-RIP140 is a kind gift of Dr Johanna Zilliacus, (Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden)<sup>62</sup>. pEF-cmyc-RIP<sup>MSI</sup> was generated by mutagenesis using the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). pEF-cmyc-RIP<sup>MSI</sup> was digested with *Afl*III and *EcoRV* enzymes and the resulting insert was cloned into pEGFP-RIP140 to create pEGFP-RIP<sup>MSI</sup>. GFP, GFP-RIP140 and GFP-RIP140(MSI) were PCR amplified and cloned into pTRIPZ previously digested with *Age*I and *Mlu*I to create pTRIPZ-GFP, pTRIPZ-RIP140 and pTRIPZ-RIP<sup>MSI</sup> respectively. All the engineered PCR constructs were sequenced.

### **Cell culture and transfections**

Mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from wild-type or RIPKO mice were previously described<sup>28</sup> and grown in DMEM-F12 medium supplemented with 10% FCS, 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 100mg/ml sodium pyruvate. MEFs were stably transfected using the above-described pTRIPZ plasmids and selected with 40 µg/mL puromycin. HCT116 and HT29 human CRC cells were grown in DMEM-F12, McCoy medium, respectively, RKO and SW480 human CRC cells were grown in RPMI, all supplemented with 10% FCS, 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin and 100mg/ml sodium pyruvate. HCT116 cells were stably transfected with the empty pEGFP vector (Clontech®) or with the same vector containing the full-length human RIP140 cDNA<sup>63</sup>. HCT116-GFP and HCT116-RIP140 cells were previously described<sup>28</sup> and grown in McCoy medium and 750µg/ml G418. Small interfering RNA (siRNA) transfections were performed using INTERFERin® on cells seeded the day before in 6-well plate ( $3 \cdot 10^5$  cells per well). Each transfection was performed in triplicates and interference efficiencies were tested by quantitative RT-PCR.

### **Luciferase assays**

HCT116 cells were plated in 96-well plates ( $2.5 \cdot 10^4$  cells per well) 24h prior to DNA transfection with Jet-PEI® (275ng of total DNA). Increasing doses of pEF-c-myc-RIP140 or pEF-c-myc-RIP<sup>MSI</sup> were cotransfected with the pGL3-MSH2-Luc or the Sp1 mutant pGL3-MSH2m1-Luc (kind gifts of E. Huang)<sup>42</sup>. Similar experiments were performed with the pGL3-MSH6-Luc reporter vector and a Sp1 mutant pGL3-

MSH6M1-2/7-Luc (kind gifts of R.D. Kolodner)<sup>64</sup>. The pRL-CMV-renilla plasmid (Ozyme®) was used to normalize transfection efficiency. Firefly luciferase values were measured and normalized by the Renilla luciferase activity. Values were expressed as the mean ratio of luciferase activities.

### **Cell proliferation and cytotoxicity assays**

Cells were seeded in quadruplicate at a density of  $2 \cdot 10^3$  cells per well. At the indicated time, 0.5mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) was added and incubated at 37°C for 4h. Formazan crystals were solubilized in DMSO and absorbance read at 560 nm on a spectrophotometer. Results were normalized to the cell density at day 1. For cytotoxicity assays, cells were seeded in quadruplicate in 96-well plate ( $2.5 \cdot 10^3$  cells per well) and exposed the day after to increasing concentrations of cytotoxic drugs including 5-fluorouracil, SN38, oxaliplatin (Sigma-Aldrich®) or to vehicle alone. The cells were exposed to the drug during six days and cell proliferation was quantified each day using MTT assay. Results were normalized to the mean optical density of the control for each day.

### **Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)**

Total RNA was extracted from cells using Quick-RNA kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1µg) was subjected to reverse-transcription using qScript cDNA SuperMix (QuantaBio, VWR). RT-qPCR were performed with the Roche LightCycler® 480 instrument and the PerfeCTa SYBR Green FastMix (QuantaBio, VWR) and were carried out in a final volume of 10µl using 0.25µL of each primer (25µM), 5µL of the supplied enzyme mix, 2.5µl of H<sub>2</sub>O and 2µl of the template diluted at 1:10 (See Table S1 for primer sequences). After pre-incubation at 95°C, runs corresponded to 35 cycles of 15s each at 95°C, 5s at 60°C and 15s at 72°C. Melting curves of the PCR products were analyzed using the LightCycler® software to exclude amplification of unspecific products. Results were normalized to mouse RS9 or human 28S housekeeping gene transcripts.

### **Immunohistochemistry and immunofluorescence analysis**

For immunohistochemistry (IHC), mouse tissues were fixed with 3,7% paraformaldehyde, embedded in paraffin and sectioned (3µm). Paraffin-embedded intestinal sections were examined for expression of MSH6 protein using the following MSH6 antibody (ab92471, Abcam®). Following incubation in citrate buffer solution, tissue sections were incubated with PBS-1% BSA for 3h to reduce non-specific

binding. Sections were then incubated with 100µL of MSH6 specific antibody, diluted in PBS-1%BSA (1:200) overnight at 4°C. Incubation with labelled HRP anti-rabbit and visualization with 3,3-diaminobenzidine (Vector Laboratories SK-4100). All slides were counter stained with hematoxylin and images were taken using NanoZoomer (Hamamatsu Photonics).

For immunofluorescence, cells were fixed with 3,7% paraformaldehyde, permeabilized with PBS-0.1% Triton for 15 minutes, blocked with PBS-Tween, 2% BSA for at least 30mn and incubated with the primary antibodies (RIP140, 1:120, ab42126 ; MSH2, 1:1000, ab70270 ; MSH6, 1:1000 ab92471) overnight at 4°C, diluted in PBS-Tween, 2% BSA. Revelation was performed using Alexa-conjugated secondary rabbit antibodies IgG (AF488®, AF594®, AF546®, 1/400, Invitrogen®). After washing, slides were counter stained with Hoechst (1/1000, Sigma Aldrich®) and mounted with Mowiol (Sigma-Aldrich®) for fluorescence microscopy. The staining quantification was performed at x40 magnifications using the measurement available on AxioVision software (Carl Zeiss®).

### **Immunoblotting**

RIPA solution was used to extract whole cell proteins. Cell extract were analyzed after migration of 40µg protein extract by Western blotting using a primary antibody against RIP140 (ab42125; Abcam®), MSH2 (ab70270; Abcam®) and MSH6 (ab92471; Abcam®). Signals were revealed using a rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody (1/5000, A6154 Sigma®) and enhanced chemiluminescence (ECL-RevelBlotPlus; GE Healthcare®) according to the manufacturer's instructions. Protein quantifications were normalized with the β-actin signal (A3854; SIGMA®).

### **Detection of the RIP<sup>MSI</sup> frame shift mutation in tumor samples**

Resection specimens with documented MMR status were identified at the Pathology Departments of the Montpellier Cancer Institute and of the Cancer Research Center of Toulouse. Only deficient MMR samples, defined by the presence of microsatellite instability and/or loss of MMR protein expression in the tumor were selected for the study. This resulted in a series of 126 patients (80 from Montpellier and 46 from Toulouse), of which 108 colon and 18 rectal cancers. Tumor samples were collected following French legal dispositions and their use was declared to the French Ministry of Higher Education and Research (declaration number DC-2008-695). All patients were informed about the use of their tissue samples for research and a specific written consent was systematically obtained for germline MMR gene mutations

analysis. The study was approved by the local translational research committee before initiation and was conducted in accordance with the principles enunciated in the Declaration of Helsinki.

The MMR status was determined by IHC analysis of the MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 proteins and by fluorescent multiplex PCR-based analysis of five microsatellite markers as previously described<sup>65</sup>. Amongst the 126 samples analyzed for the RIP<sup>MSI</sup> mutation, 57 corresponded to Lynch syndrome patients, 32 were identified with hMLH1 promoter hypermethylation and 37 were classified as Lynch-like syndrome with microsatellite instability but without any MMR gene alteration found to date.

DNA was extracted from manually dissected FFPE tumor samples using the QIAamp DNA FFPE kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

All DNA were analyzed using deep-sequencing for the presence of the RIP<sup>MSI</sup> mutation (Integrage genomics®, France). The library was sequenced on paired end 2x100b run on the Illumina HiSeq4000. Image analysis and base calling was performed using Illumina Real Time Analysis with default parameters.

### **MSI analysis**

Genomic DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®) according to the manufacturer instructions. The MSI Analysis System (Promega®) was used to analyze 5 mononucleotide repeats (BAT-25, BAT-26, NR-21 and MONO-27). Fluorescent amplicons were separated by capillary electrophoresis with the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA). Results were generated using the GeneMapper® software (Applied Biosystems, Foster City, CA). DNA showing instability for two or more markers were considered as unstable (MSI), the others being classified as stables (MSS).

### **DNA microarray analysis**

A published DNA microarray study obtained on a cohort encompassing 396 colon tumor samples<sup>66</sup> was reanalyzed for *RIP140*, *MSH2* and *MSH6* mRNA expression. Statistical significance was assessed using a Spearman correlation analysis. To strengthen the results, two other cohorts were used, one from Marisa *et al*<sup>33</sup> and the second from the TCGA-COAD RNA-seq data<sup>32</sup>.

### **Statistical analysis**

All experiments were conducted independently at least three times. Results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (S.D.). Statistical comparisons were

performed with Mann-Whitney or Spearman tests. A probability level ( $p$  value) of 0.05 was chosen for statistical significance. Overall Survival (OS) was calculated from the date of tumor resection until death as represented using Kaplan-Meier curves. The analysis was conducted on dead patients only since follow-up data were lacking for many patients. The log-rank test was used to test the differences between groups which were considered statistically significant at the  $p < 0.05$  level. GraphPad Prism® statistical software was used for the analyses.

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors have no conflict of interest to declare.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by INSERM, INCa (Plan Cancer pour la Formation à la Recherche Translationnelle en Cancérologie; ASC14080FSA), CHU Montpellier (Contrat année recherche for PP), the Fondation Val d'Aurelle, Université de Montpellier and the Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM). We thank the Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM) for histology facilities. We are also grateful to Drs J. Zilliacus, R.D. Kolodner, and E. Huang for plasmid sharing.

## REFERENCES

1. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 87–108 (2015).
2. Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* **138**, 2044–2058 (2010).
3. Peltomäki, P. & Vasen, H. F. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **113**, 1146–1158 (1997).
4. Ligtenberg, M. J. L. *et al.* Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* **41**, 112–117 (2009).
5. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330–337 (2012).
6. Carethers, J. M. & Stoffel, E. M. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J. Gastroenterol.* **21**, 9253–9261 (2015).
7. Chang, L., Chang, M., Chang, H. M. & Chang, F. Expanding Role of Microsatellite Instability in Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancers. *J. Gastrointest. Cancer* (2017). doi:10.1007/s12029-017-9991-0
8. Takemoto, N. *et al.* The correlation of microsatellite instability and tumor-infiltrating lymphocytes in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and sporadic colorectal cancers: the significance of different types of lymphocyte infiltration. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **34**, 90–98 (2004).
9. Linnebacher, M. *et al.* Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int. J. Cancer* **93**, 6–11 (2001).
10. Tougeron, D. *et al.* Efficacy of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer With Microsatellite Instability: A Large Multicenter AGEO Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **108**, (2016).
11. Carethers, J. M. Differentiating Lynch-like from Lynch syndrome. *Gastroenterology* **146**, 602–604 (2014).
12. Hsieh, P. & Yamane, K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 391–407 (2008).

13. Li, S. K. H. & Martin, A. Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends Mol. Med.* **22**, 274–289 (2016).
14. Wang, Y. *et al.* BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* **14**, 927–939 (2000).
15. Cavallès, V. *et al.* Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* **14**, 3741–3751 (1995).
16. Augereau, P. *et al.* The nuclear receptor transcriptional coregulator RIP140. *Nucl. Recept. Signal.* **4**, e024 (2006).
17. Docquier, A. *et al.* The transcriptional coregulator RIP140 represses E2F1 activity and discriminates breast cancer subtypes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 2959–2970 (2010).
18. Castet, A. *et al.* Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1957–1966 (2004).
19. Yang, X.-J. & Seto, E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol. Cell* **31**, 449–461 (2008).
20. White, R. *et al.* The nuclear receptor co-repressor nr1p1 (RIP140) is essential for female fertility. *Nat. Med.* **6**, 1368–1374 (2000).
21. Leonardsson, G. *et al.* Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 8437–8442 (2004).
22. Ho, P.-C., Tsui, Y.-C., Feng, X., Greaves, D. R. & Wei, L.-N. NF- $\kappa$ B-mediated degradation of the coactivator RIP140 regulates inflammatory responses and contributes to endotoxin tolerance. *Nat. Immunol.* **13**, 379–386 (2012).
23. Duclot, F. *et al.* Cognitive impairments in adult mice with constitutive inactivation of RIP140 gene expression. *Genes Brain Behav.* **11**, 69–78 (2012).
24. Nautiyal, J. *et al.* The transcriptional co-factor RIP140 regulates mammary gland development by promoting the generation of key mitogenic signals. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 1079–1089 (2013).
25. Caballero, V. *et al.* Preliminary molecular genetic analysis of the Receptor Interacting Protein 140 (RIP140) in women affected by endometriosis. *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* **2**, 11 (2005).
26. Rudd, M. F. *et al.* Variants in the GH-IGF axis confer susceptibility to lung cancer. *Genome Res.* **16**, 693–701 (2006).



27. Lapierre, M. *et al.* RIP140 increases APC expression and controls intestinal homeostasis and tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* **124**, 1899–1913 (2014).
28. Lapierre, M. *et al.* RIP140 increases APC expression and controls intestinal homeostasis and tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* **124**, 1899–1913 (2014).
29. Augereau, P. *et al.* Negative regulation of hormone signaling by RIP140. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **102**, 51–59 (2006).
30. Castet, A. *et al.* Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **20**, 1035–1047 (2006).
31. Salazar, R. *et al.* Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 17–24 (2011).
32. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330–337 (2012).
33. Marisa, L. *et al.* Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* **10**, e1001453 (2013).
34. Marra, G. & Jiricny, J. DNA mismatch repair and colon cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **570**, 85–123 (2005).
35. Tajima, A., Hess, M. T., Cabrera, B. L., Kolodner, R. D. & Carethers, J. M. The mismatch repair complex hMutS alpha recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: implications for chemosensitivity and resistance. *Gastroenterology* **127**, 1678–1684 (2004).
36. Sargent, D. J. *et al.* Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3219–3226 (2010).
37. Warnick, C. T., Dabbas, B., Ford, C. D. & Strait, K. A. Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 27363–27370 (2001).
38. Scherer, S. J. *et al.* p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J. Biol. Chem.* **275**, 37469–37473 (2000).

39. Menssen, A. & Hermeking, H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6274–6279 (2002).
40. Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E. & Ginsberg, D. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* **21**, 437–446 (2002).
41. Youn, C.-K. *et al.* Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nat. Cell Biol.* **7**, 137–147 (2005).
42. Koshiji, M. *et al.* HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpha expression. *Mol. Cell* **17**, 793–803 (2005).
43. Fang, M. *et al.* The CREB Coactivator CRTC2 Is a Lymphoma Tumor Suppressor that Preserves Genome Integrity through Transcription of DNA Mismatch Repair Genes. *Cell Rep.* **11**, 1350–1357 (2015).
44. Devaud, N. & Gallinger, S. Chemotherapy of MMR-deficient colorectal cancer. *Fam. Cancer* **12**, 301–306 (2013).
45. Martin, S. A. *et al.* Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2. *EMBO Mol. Med.* **1**, 323–337 (2009).
46. Takahashi, T. *et al.* Hypersensitivity in DNA mismatch repair-deficient colon carcinoma cells to DNA polymerase reaction inhibitors. *Cancer Lett.* **220**, 85–93 (2005).
47. Choudhary, C. *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**, 834–840 (2009).
48. Campbell, M. R., Wang, Y., Andrew, S. E. & Liu, Y. Msh2 deficiency leads to chromosomal abnormalities, centrosome amplification, and telomere capping defect. *Oncogene* **25**, 2531–2536 (2006).
49. Hombauer, H., Campbell, C. S., Smith, C. E., Desai, A. & Kolodner, R. D. Visualization of eukaryotic DNA mismatch repair reveals distinct recognition and repair intermediates. *Cell* **147**, 1040–1053 (2011).
50. Peña-Díaz, J. *et al.* Noncanonical Mismatch Repair as a Source of Genomic Instability in Human Cells. *Mol. Cell* **47**, 669–680 (2012).
51. White, R. *et al.* The nuclear receptor co-repressor nr1p (RIP140) is essential for female fertility. *Nat. Med.* **6**, 1368–1374 (2000).

52. Yuan, R. *et al.* Genetic coregulation of age of female sexual maturation and lifespan through circulating IGF1 among inbred mouse strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 8224–8229 (2012).
53. Mukherjee, S., Ridgeway, A. D. & Lamb, D. J. DNA mismatch repair and infertility. *Curr. Opin. Urol.* **20**, 525–532 (2010).
54. Hsieh, P. & Yamane, K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 391–407 (2008).
55. Jiricny, J. & Nyström-Lahti, M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 157–161 (2000).
56. Ferreira, A. M. *et al.* New target genes in endometrial tumors show a role for the estrogen-receptor pathway in microsatellite-unstable cancers. *Hum. Mutat.* **35**, 1514–1523 (2014).
57. Gibson, W. J. *et al.* The genomic landscape and evolution of endometrial carcinoma progression and abdominopelvic metastasis. *Nat. Genet.* **48**, 848–855 (2016).
58. Vivante, A. *et al.* A Dominant Mutation in Nuclear Receptor Interacting Protein 1 Causes Urinary Tract Malformations via Dysregulation of Retinoic Acid Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **28**, 2364–2376 (2017).
59. Augereau, P. *et al.* The nuclear receptor transcriptional coregulator RIP140. *Nucl. Recept. Signal.* **4**, e024 (2006).
60. Reuschenbach, M. *et al.* Serum antibodies against frameshift peptides in microsatellite unstable colorectal cancer patients with Lynch syndrome. *Fam. Cancer* **9**, 173–179 (2010).
61. Jalaguier, S. *et al.* Complex regulation of LCoR signaling in breast cancer cells. *Oncogene* (2017). doi:10.1038/onc.2017.97
62. Zilliacus, J. *et al.* Regulation of glucocorticoid receptor activity by 14--3-3-dependent intracellular relocalization of the corepressor RIP140. *Mol. Endocrinol.* **15**, 501–511 (2001).
63. Zilliacus, J. *et al.* Regulation of glucocorticoid receptor activity by 14--3-3-dependent intracellular relocalization of the corepressor RIP140. *Mol. Endocrinol.* **15**, 501–511 (2001).
64. Gazzoli, I. & Kolodner, R. D. Regulation of the human MSH6 gene by the Sp1 transcription factor and alteration of promoter activity and expression by polymorphisms. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7992–8007 (2003).

65. Boissière-Michot, F. *et al.* The Non-Crosslinking Fixative RCL2®-CS100 is Compatible with Both Pathology Diagnosis and Molecular Analyses. *Pathol. Oncol. Res. POR* (2012). doi:10.1007/s12253-012-9556-2
66. Salazar, R. *et al.* Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 17–24 (2011).

**Table 1. Table for patients and tumor characteristics**

Anatomopathological characteristics of the 126 MSI colorectal cancer samples and clinico-genetic features of the related patients.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. RIP140 regulates MutS $\alpha$ expression in mouse tissue and cells.

**A)** RT-qPCR analysis of *MSH2* and *MSH6* mRNA in intestinal epithelium of knocked-out mice for the *RIP140* gene (in grey) and in transgenic mice overexpressing *RIP140* (in black). Results for each gene are given in arbitrary units (AU) and represent fold change  $\pm$  S.D. vs levels in wild-type mice (in white, dotted line) after normalization to RS9 mRNA. **B)** Immunohistochemistry of MSH6 protein in intestinal epithelium of RIPKO mice compared to their wild-type littermates, (left panels x10, right panels x40). **C)** Same as in panel A in immortalized mice embryonic fibroblasts lacking the *RIP140* gene (in grey) or not (in white). **D)** Whole-cell extracts from the indicated WT and RIPKO MEF cells were used for western blot analysis. Membranes were incubated with an anti-MSH2 (104 kDa, upper panel) or an anti-MSH6 antibody (160 kDa, lower panel). Quantifications are expressed in arbitrary units (AU) after normalization to the  $\beta$ -actin (42 kDa), used as a control of protein migration. **E)** MSH2 and MSH6 immunofluorescence in WT and RIPKO MEF cells (40x). Quantifications represent means  $\pm$  S.D. A Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

### Figure 2. RIP140 regulates MutS $\alpha$ expression in CRC cells.

**A)** HCT116LR cells were stably transfected with a pEGFP-RIP140-expressing vector, or a pEGFP alone. *RIP140*, *MSH2* and *MSH6* mRNA levels were checked by RT-qPCR. Results represent fold change  $\pm$  S.D. vs levels in control cells after normalization to 28S mRNA. **B)** MSH2 and MSH6 protein expression levels of these stably transfected HCT116 cells were assessed by Western-blot analysis of whole-cell extracts. **C)** HCT116HR human colorectal cancer cells were transiently transfected with siCTRL or siRIP140 siRNAs as indicated. *RIP140*, *MSH2* and *MSH6* mRNA levels were quantified by real-time PCR. Results represent fold change  $\pm$  S.D. vs levels in control cells after normalization to 28S mRNA; n=3 independent experiments for each condition. **D)** RIP140, MSH2 and MSH6 immunofluorescence after transient knock-down of RIP140 in HCT116 cells described above (40x). Quantifications represent means  $\pm$  S.D. A Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**Figure 3. RIP140 regulates MutS $\alpha$  at the transcriptional level in CRC cells.**

**A)** Schematic representations of the luciferase reporters driven by the MSH2 promoter region cloned in a pGL3 promoter and one putative Sp1 mutant of the minimal reporter promoter (left panel) as well as an MSH6 reporter promoter and its Sp1 sites mutant reporter (right panel). **B)** The reporters described above have been transiently co-transfected into HCT116LR cells with increasing doses of a pEF-cmyc-RIP140 expression vector and pRL-CMV-renilla as internal control. Luciferase values were normalized to the renilla luciferase control and expressed as the percentage of the luciferase activity in the absence of transfected RIP140. The reporter activity was presented as relative luciferase activity (RLU) as mean  $\pm$  S.D.; n=3 independent experiments. **C)** Same as in panel B with the mutant forms of these reporter promoters (MSH2 m1 and MSH6 M1-2/7). Values are means  $\pm$  S.D.; n=3 independent experiments. A Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\* p<0.05, \*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001).

**Figure 4. RIP140 expression is correlated with that of MutS $\alpha$  in human CRC samples.**

**A)** Correlation between *RIP140* and *MSH2* and *MSH6* gene expression in 396 colorectal adenocarcinomas<sup>31</sup>. **B)** Statistical significance was assessed using a Spearman correlation analysis on this cohort, containing 247 microsatellite stable (MSS) and 29 microsatellite instable (MSI) samples. Corresponding critical values for Spearman correlation coefficient between *RIP140* and *MSH2* or *MSH6* genes are indicated for the whole cohort, MSS and MSI samples. **C)** The correlation analyses between *RIP140* and *MSH2/6* mRNA levels were performed using TCGA-COAD RNA-seq data<sup>32</sup> obtained on 415 samples taking into account the molecular subtypes defined by Marisa *et al*<sup>33</sup>. The number of samples in each subgroup is indicated together with the correlation coefficients and the p values.

**Figure 5. RIP140 influences microsatellite instability in CRC cells.**

**A)** Analysis of microsatellite instability status of five repeated markers from the MSI Analysis System kit Version 1.2 (Promega®). The number of peaks illustrates the level of instability and the comparison of the five mononucleotide repeated markers determines the level of instability of the HCT116LR versus HCT116HR cells. **B)**



Same as in panel A for HCT116 RIP140 versus HCT116 GFP stable cells, previously described. **C)** Summary table of the results shown in panels A and B.

**Figure 6. RIP140 affects the response to cytotoxic drugs.**

**A)** MEF WT and RIPKO cells were exposed to increasing doses of 5-FU (from 0.1 to 10  $\mu$ M) or vehicle. Optical density of diluted formazan crystals was expressed in percentage relative to the control. IC<sub>50</sub> values of each cell type were mentioned. The p-value indicates the significance of the comparison of IC<sub>50</sub> between each cell type dose response after nonlinear regression performed with the GraphPad® software. **B)** Non-linear regression of HCT116 GFP and HCT116 RIP140 stable cells dose response to the same increasing doses of 5-FU. IC<sub>50</sub> and the p-value of the comparison between each cell type were mentioned. **C)** Same experiment described in panel A with increasing doses of oxaliplatin (from 0.1 to 50  $\mu$ M). **D)** Same as in panel C with HCT116 stable cells exposed to oxaliplatin (from 0.05 to 50  $\mu$ M). **E)** MEF WT and RIPKO cells were exposed to SN38 (from 0.01 to 0.1  $\mu$ M), the active metabolite of irinotecan. **F)** Exposition of HCT116 stable cells to SN38 (from 0.0001 to 0.05  $\mu$ M).

**Figure 7. Biological characterization of the RIP<sup>MSI</sup> frame shift mutation.**

**A)** Schematic representation of the RIP140 wild-type (1158 amino-acids) and truncated protein (732 aa) which is referred to as RIP<sup>MSI</sup>. The C-terminal domain of the mutant protein exhibits four different amino-acids as compared to the wild-type RIP140 protein (RKLP). **B)** Immunolabelling of HCT116LR cells transiently co-transfected with the pmCherry-RIP140 (red fluorescence signal) and the pEGFP-RIP<sup>MSI</sup> (green fluorescence signal) expression vectors to detect both localizations of the wild-type and the mutant form of RIP140 proteins (40x). **C)** Intrinsic transrepression of increasing doses of a RIP140 expression vector in transiently transfected HCT116LR cells with a Gal4DBD construct. **D)** Cell proliferation of stably transfected RIPKO MEF cells overexpressing either the GFP alone (in white) or the GFP fused with the wild-type (in black) or the mutant (in grey) form of RIP140 was quantified at days 4 and 6. Absorbance of formazan crystals was read on a spectrophotometer. Results represent fold change  $\pm$  S.D. vs levels in GFP cells after normalisation of each condition to the cell density at day 1; n=3 independent experiments. A Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis (ns = not

significant, \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ). **E)** Stable RIPKO MEF cells (expressing the GFP, RIP140 or RIP<sup>MSI</sup>) were exposed to increasing doses of 5-FU. IC<sub>50</sub> of each cell type and the p-value of the comparison between the three different nonlinear regression curves were mentioned in the graph.

**Figure 8. Effect of the RIP<sup>MSI</sup> frame shift mutation on MSH2 and MSH6 expression.**

**A)** mRNA quantification of *MSH2* and *MSH6* genes in stable RIPKO MEF cells expressing either the GFP alone (in white) or the GFP fused with the wild-type (in black) or the mutant form (in grey) of RIP140; n=3 independent experiments. **B)** Luciferase reporter experiments on the pGL3-MSH2-Luc reporter promoter were performed with increasing doses of the wild-type and the mutant pEF-cmyc-RIP140/MSI2 expression vectors. Values represent means  $\pm$  S.D. n=3 independent experiments. **C)** mRNA quantification of *RIP140*, *MSH2* and *MSH6* in HT29 CRC cells transiently transfected with pEGFP, pEGFP-RIP140 or a pEGFP-RIP<sup>MSI</sup> expression vectors. **D)** Relative mRNA level of *MSH2* and *MSH6* after stable overexpression of the RIP<sup>MSI</sup> protein in RIPKO MEF versus RIPWT MEF cells. Values represent means  $\pm$  S.D. n=3 independent experiments. **E)** Western Blot analysis of MSH2 and MSH6 proteins of whole cell extracts of MEF RIPWT cells stably transfected with the GFP or the RIP<sup>MSI</sup> plasmids. **F)** Western Blot analysis of MSH2 and MSH6 proteins of whole cell extracts of RIPKO MEF cells stably transfected with the GFP or the RIP<sup>MSI</sup> plasmids. A Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis (ns = not significant, \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**Figure 9. RIP<sup>MSI</sup> mutation in MSI CRC samples**

**A)** Repartition of the frequency of the RIP<sup>MSI</sup> mutation among the 126 colorectal cancer samples depending on MMR genetic or epigenetic alteration. **B)** Kaplan-Meier plots of overall survival of patients according to the detection or not of the RIP<sup>MSI</sup> mutation in the tumoral DNA.

## LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURES

### **Supplementary Figure 1. RIP140 regulates *MSH2/6* expression in transiently transfected HCT116 cells.**

**A)** *RIP140*, *MSH2* and *MSH6* mRNA quantification after transient transfection of a *RIP140* expression vector (indiquer la quantité) in HCT116LR cells. Values represent means  $\pm$  S.D. n=3 independent experiments. A Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001). **B)** mRNA relative quantification of the *RIP140* gene expression and immunolabelling of the corresponding protein after transient knock-down of *RIP140* in HCT116HR cells using another specific siRNA than the siRNA used in Figure 2B.

### **Supplementary Figure 2. RIP140 regulates *MSH2/6* expression in other CRC cells.**

**A)** mRNA quantification of *RIP140*, *MSH2* and *MSH6* genes by RT-qPCR in stable SW480 cells generated as the HCT116LR cells stably overexpressing *RIP140* (shown in Figure 2A). Results represent fold change  $\pm$  S.D. vs levels in control cells after normalization to 28S mRNA. n=3 independent experiments. **B)** Western-blot analysis for *MSH2* and *MSH6* protein expression from whole cell extracts of the cells described above. **C)** mRNA quantification of the same genes in RKO cells after transient knock-down of the *RIP140* gene. Results represent fold change  $\pm$  S.D. vs levels in control cells after normalization to 28S mRNA. n=3 independent experiments. **D)** *MSH2* and *MSH6* protein expression of whole cell extracts from these RKO transient cells after transient knock-down of *RIP140*.

A Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001).

### **Supplementary Figure 3. Expression of *MSH2* and *MSH6* in HCT116 cells used to monitor microsatellite instability.**

Quantification of *RIP140*, *MSH2* and *MSH6* mRNA levels in two authenticated HCT116 cell lines displaying a differential of *RIP140* gene expression used to monitor microsatellite instability. Values represent fold changes  $\pm$  S.D. corrected by 28S mRNA and normalized to HCT116LR.

**Supplementary Figure 4. RIP140 affects the response to cytotoxic drugs.**

**A)** Summary table of the different drugs tested with MEF WT versus MEF RIPKO cells and the HCT116LR GFP and RIP140 stable cells. This table contains IC<sub>50</sub> ratios between each cell type and the p-values of their comparison. **B)** Nonlinear regression of dose response curves of MEF WT and RIPKO exposed to increasing doses of hydroxyurea (from 0,15 to 1,2mM). **C)** Same as in panel B) with HCT116 stable cells. **D** and **E)** Nonlinear regression of gemcitabin dose response (from 0,5 to 500nM) in MEF and HCT116 cells respectively.

**Supplementary Figure 5. Biological characterization of a RIP140 frame shift mutation.**

**A)** *RIP140* and *GFP* mRNA quantification in RIPKO MEF cells stably transfected with the pTRIPZ-GFP plasmids to monitor RIP140 and RIP<sup>MSI</sup> expression levels. **B)** RIP140, MSH2 and MSH6 immunofluorescence in RIPKO stably transfected MEFs. **C)** Same measurement than in panel A but in HT29 transiently transfected CRC cells.

**Table S1: Primer sequences**

<b>Gene Symbol</b>	<b>Forward Sequence</b>	<b>Reverse Sequence</b>
<b>mLacZ</b>	CCGGTCGCTACCATTACCAG	CCGATTGTCTGTTGTGCC
<b>mRIP140</b>	AGAACGCACATCAGGTGGCA	GATGGCCAGACACCCCTTTG
<b>mMSH2</b>	TGGCAGTTTTTGTGACTCCT	AAGGAACTCGTGGTTTTCCA
<b>mMSH6</b>	AGGCAAAGGATCTCAACGG	TTAGCCCAAACCAAATCACC
<b>hRIP140</b>	AATGTGCACTTGAGCCATGATG	TCGGACACTGGTAAGGCAGG
<b>hMSH2</b>	TTCTGACTTCTCCAAGTTTCAGG	GGATCAAATGAAGGTTTTACAAGG
<b>hMSH6</b>	GCGAAGAACCTCAACGGAG	CAGGGGTAACCCTCCATCTT

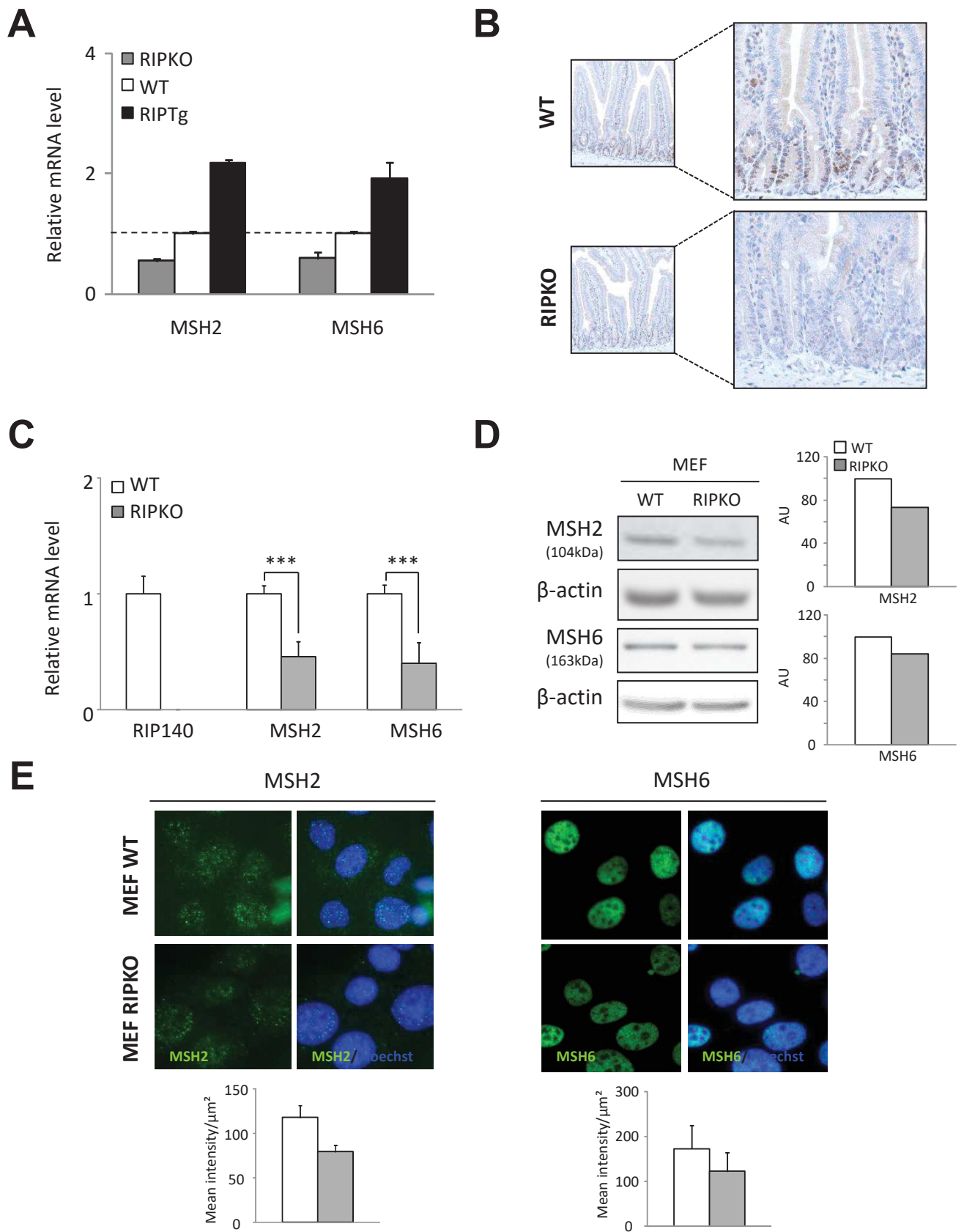


**Table 1. Patients and tumor characteristics**

	<b>N = 126</b>
<b>Age at diagnosis (median, years)</b>	<b>54.7 [20.7-93.9]</b>
<b>Sex</b>	
<b>Male</b>	<b>58 (46%)</b>
<b>Female</b>	<b>68 (54%)</b>
<b>Tumor site</b>	
<b>Colon</b>	<b>108 (85.7%)</b>
<b>Rectum</b>	<b>18 (14.3%)</b>
<b>pTNM stage</b>	
<b>0</b>	<b>2 (1.6%)</b>
<b>I</b>	<b>18 (14.3%)</b>
<b>II</b>	<b>58 (46%)</b>
<b>III</b>	<b>37 (29.4%)</b>
<b>IV</b>	<b>9 (7.1%)</b>
<b>MD</b>	<b>2 (1.6%)</b>
<b>MMR mutation</b>	
<b>No</b>	<b>69 (54.8%)</b>
<b>Yes</b>	<b>57 (45.2%)</b>

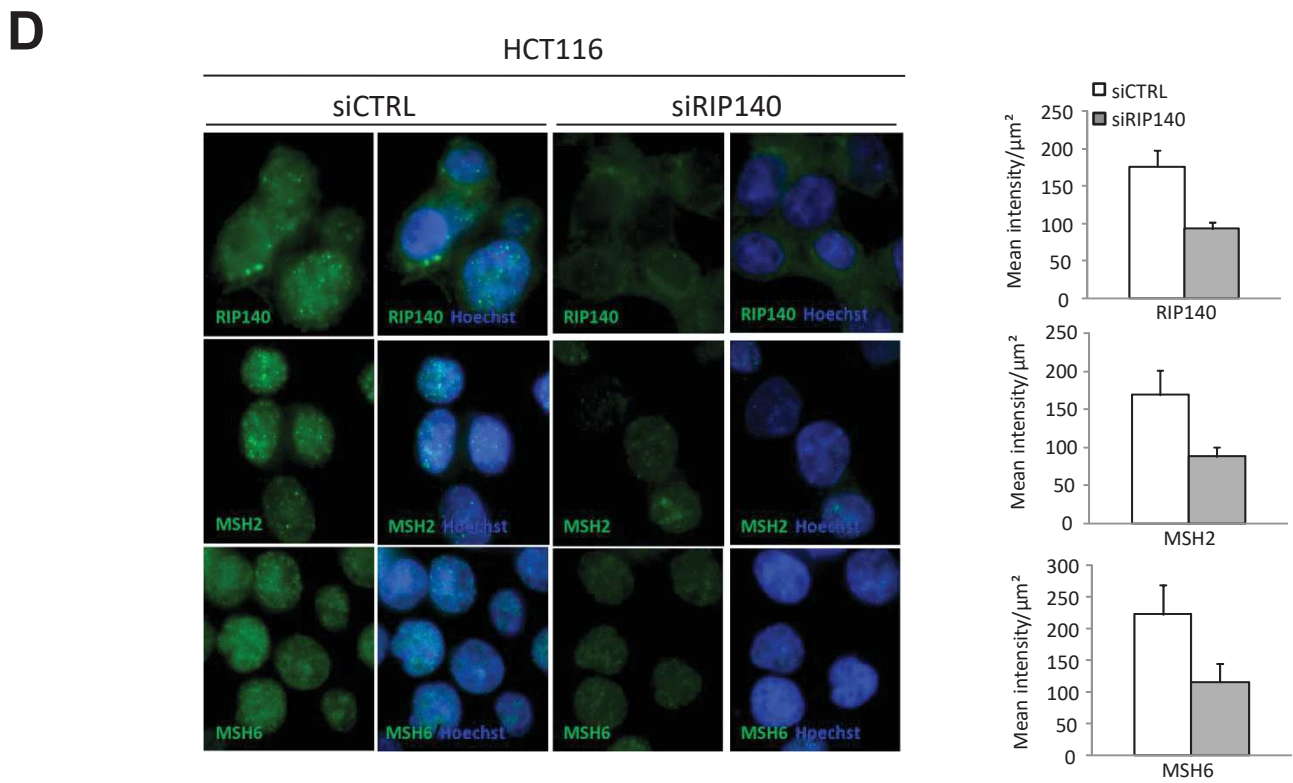
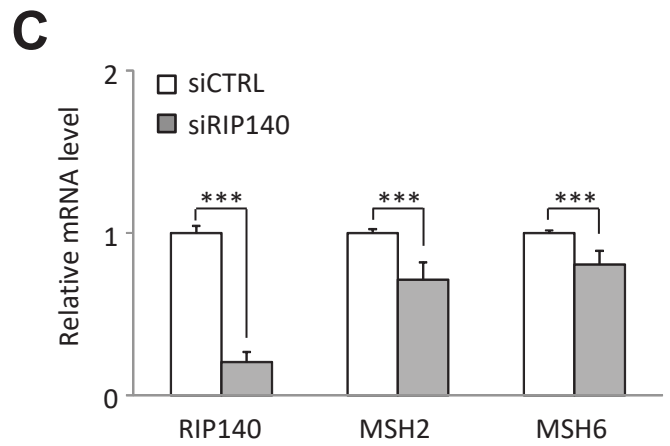
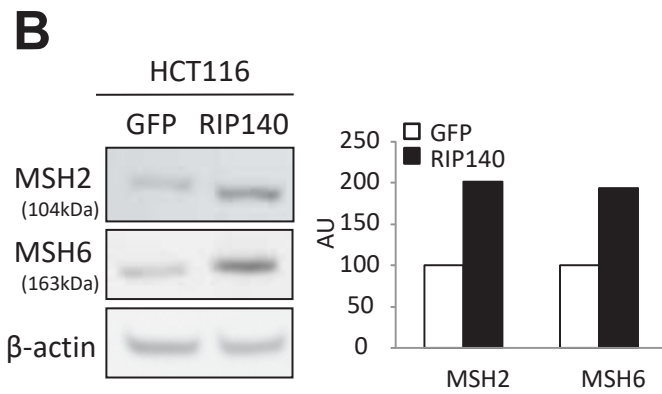
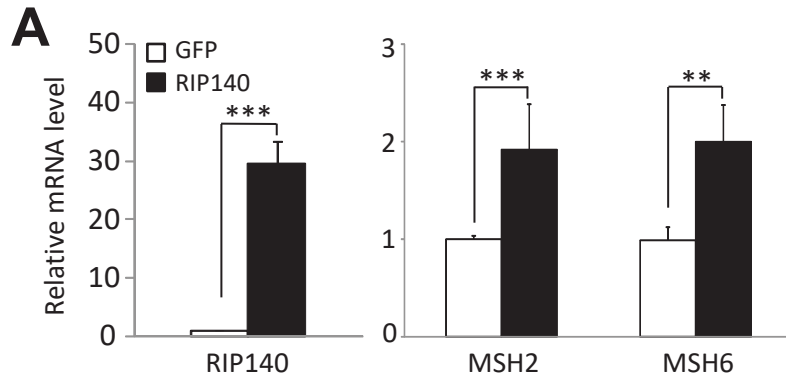
**Table 1**





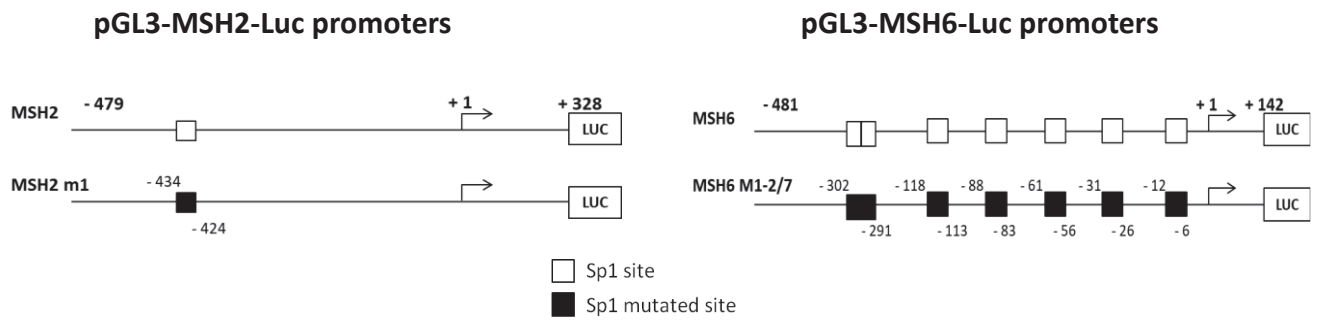
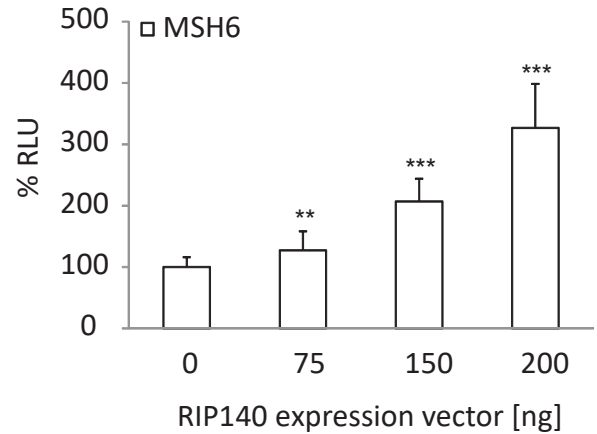
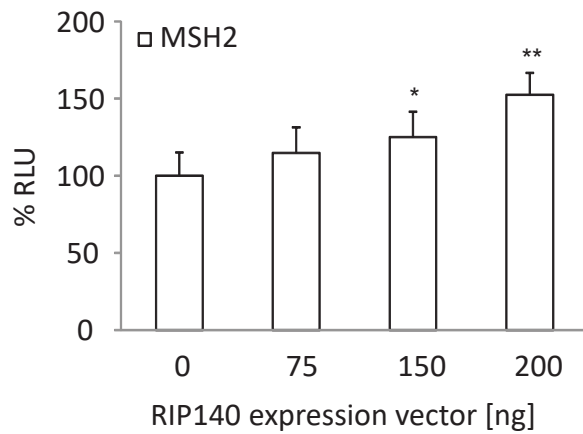
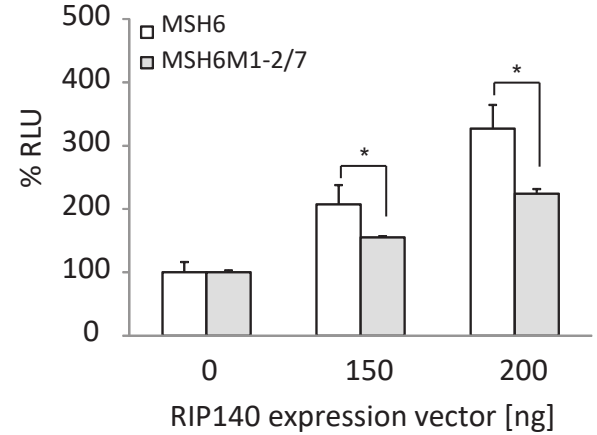
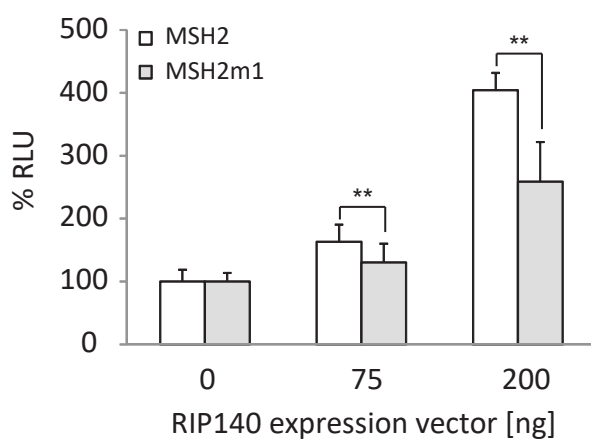
**RIP140 regulates MutS $\alpha$  expression in mouse tissue and cells**

**Figure 1**



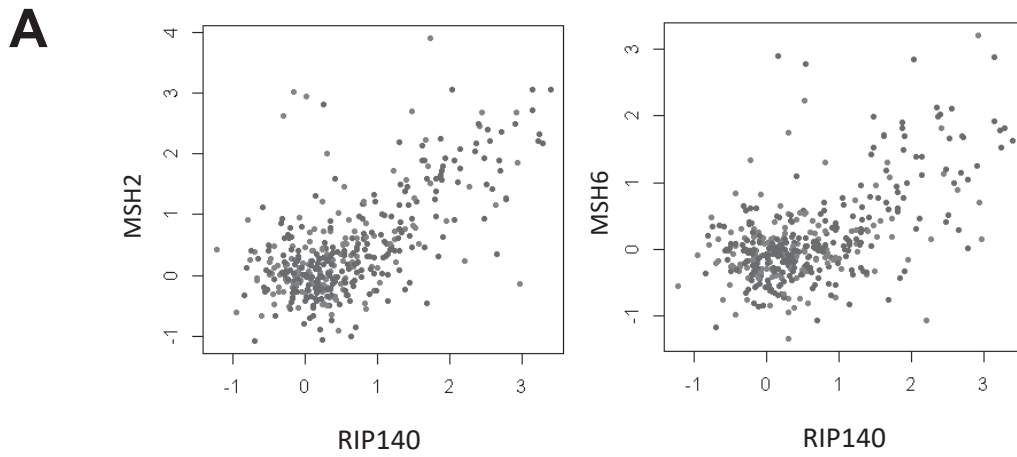
**RIP140 regulates MutSα expression in HCT116 CRC cells**

**Figure 2**

**A****B****C**

**RIP140 regulates MutS $\alpha$  at the transcriptional level  
in CRC cells**

**Figure 3**



**B**

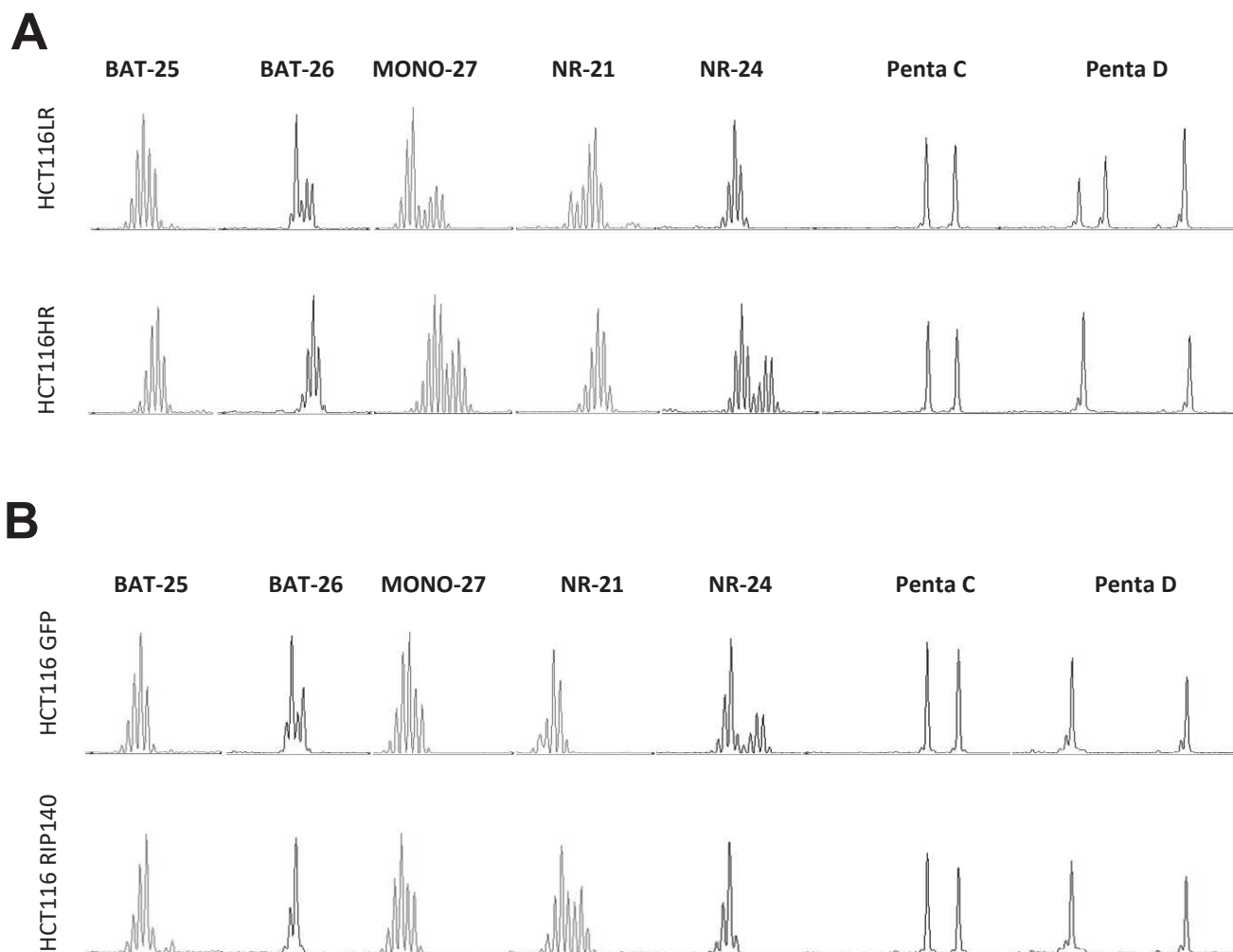
	MSH2		MSH6	
	r	p	r	p
All samples (n=396)	0.65	<2.2E-16	0.57	<2.2E-16
MSS samples (n=247)	0.73	<2.2E-16	0.63	<2.2E-16
MSI samples (n=29)	0.58	<1E-03	0.23	0,232

**C**

	MSH2		MSH6	
	r	p	r	p
All samples (n=415)	0,43	<2.2E-16	0,31	<4E-12
C1 group (n=46)	0,78	9,00E-11	0,67	3,00E-07
C2 group (n=75)	0,37	<1E-3	0,15	NS
C3 group (n=66)	0,50	<3E-5	0,49	2,50E-05
C4 group (n=51)	0,20	NS	0,3	<0,05
C5 group (n=100)	0,22	<0,05	-0,003	NS
C6 group (n=77)	0,55	<2E-7	0,43	<8E-5

**Correlation of RIP140 expression with MSH2 and MSH6 in human CRC tumors**

**Figure 4**

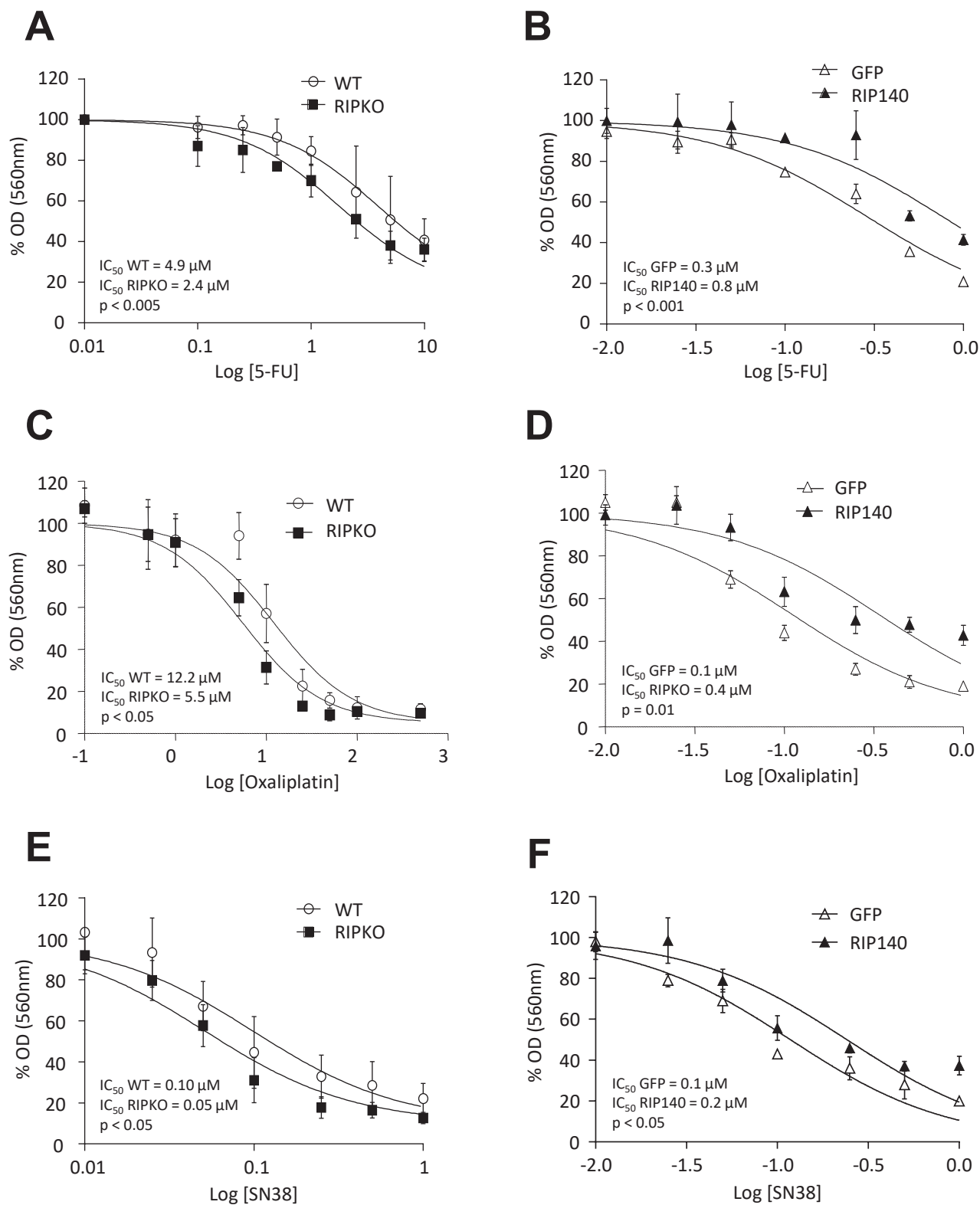


**C**

Marker	HCT116LR	HCT116HR	HCT116 GFP	HCT116 RIP140
BAT-25	<b>Unstable</b>	Stable	<b>Unstable</b>	Stable
BAT-26	<b>Unstable</b>	Stable	<b>Unstable</b>	Stable
MONO-27	<b>Unstable</b>	<b>Unstable</b>	<b>Unstable</b>	Stable
NR-21	<b>Unstable</b>	Stable	Stable	<b>Unstable</b>
NR-24	Stable	<b>Unstable</b>	<b>Unstable</b>	Stable
	<b>4/5</b>	<b>2/5</b>	<b>4/5</b>	<b>1/5</b>

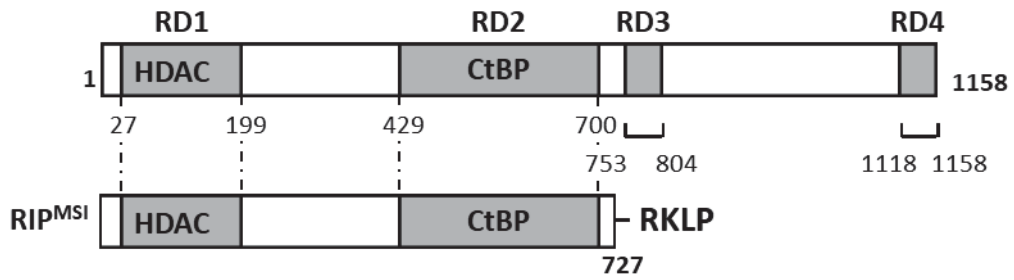
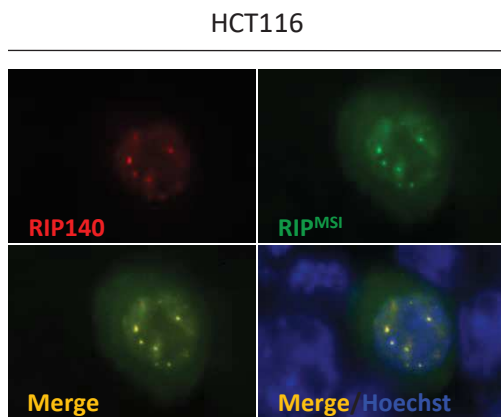
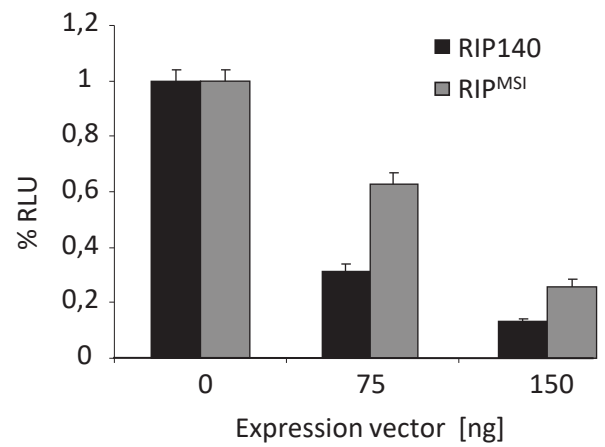
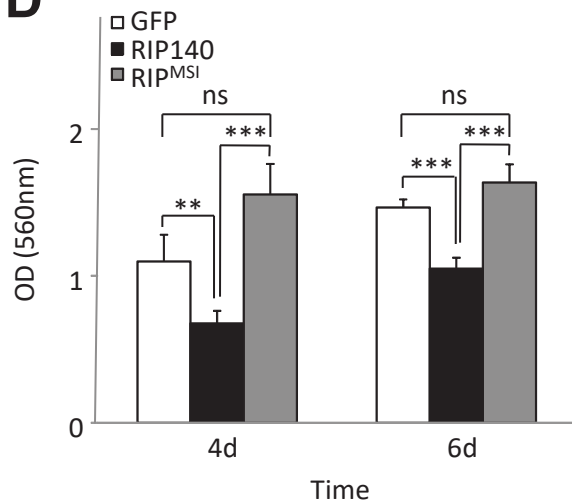
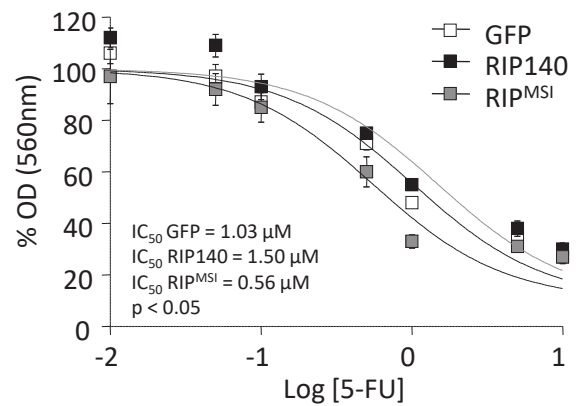
**RIP140 influences microsatellite instability  
in CRC cells**

**Figure 5**



**RIP140 affects the response to cytotoxic drugs**

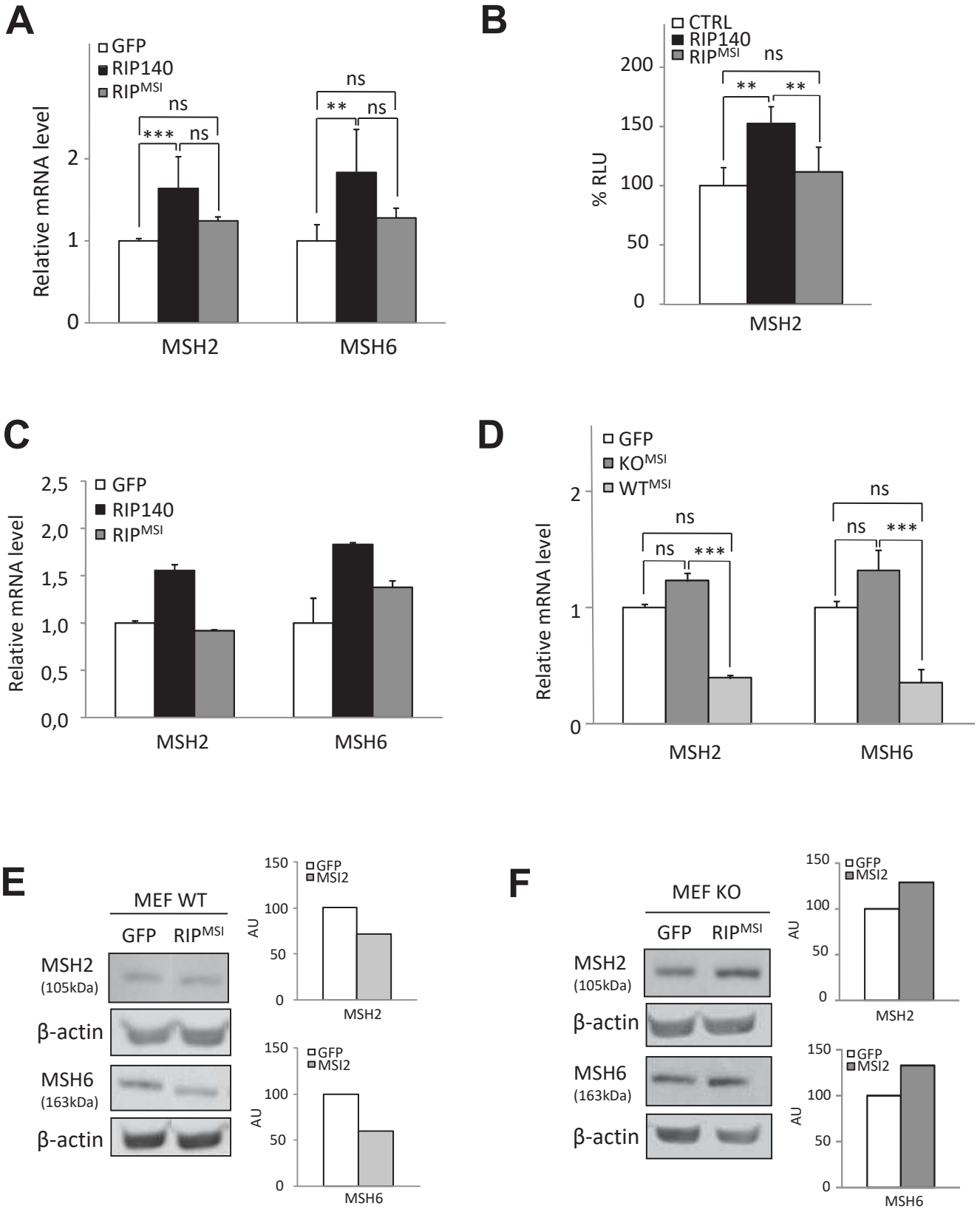
**Figure 6**

**A****B****C****D****E**

**Biological characterization  
of the RIP<sup>MSI</sup> frame shift mutation**

**Figure 7**



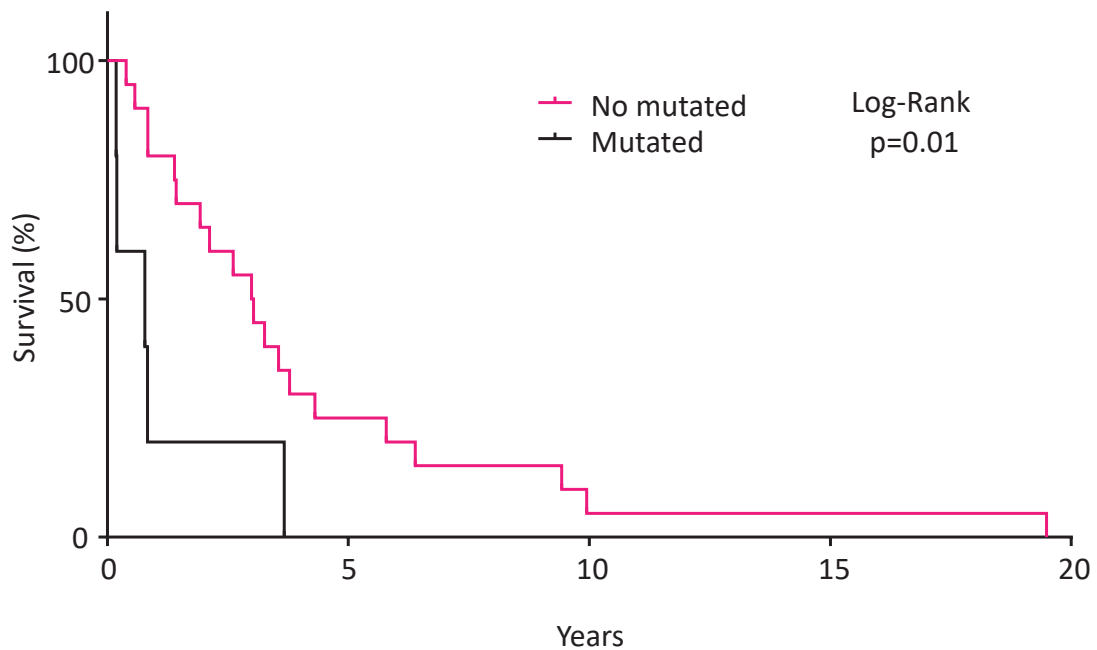


**Effect of the RIP<sup>MSI</sup> frame shift mutation on MSH2 and MSH6**

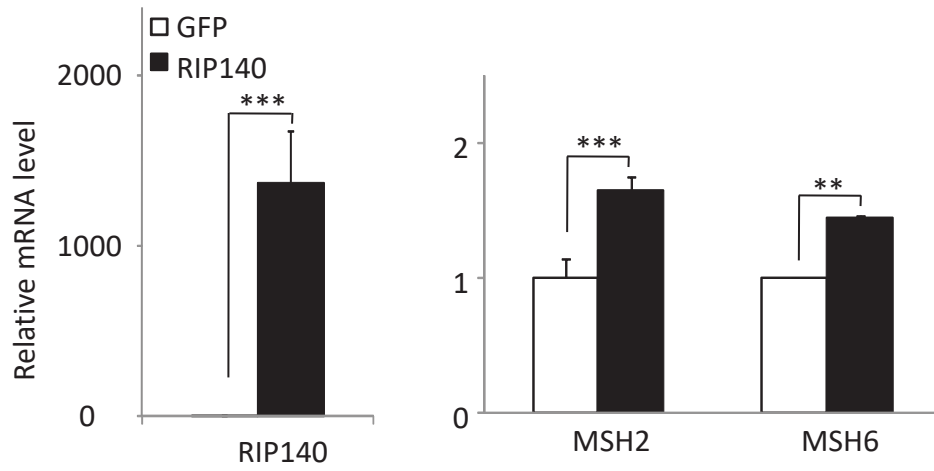
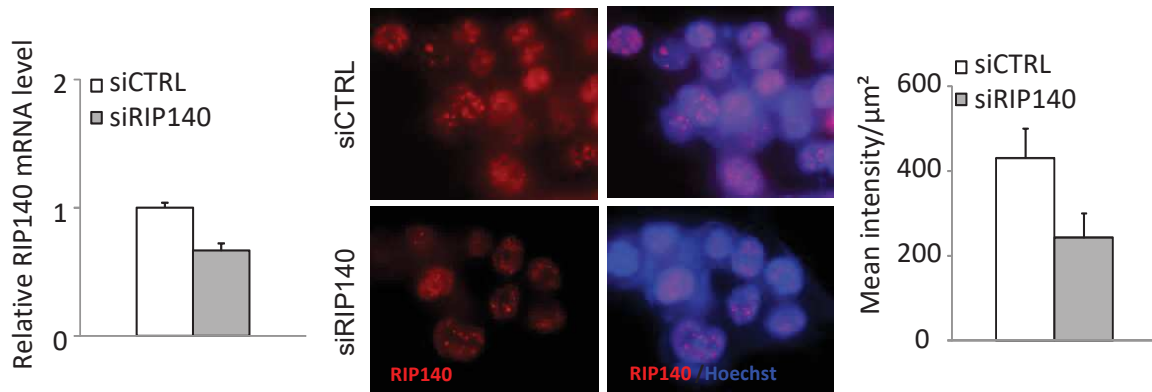
**Figure 8**

**A**

	Total	RIP <sup>MSI</sup> mutation	%
<b>All patients</b>	<b>126</b>	<b>24</b>	<b>19</b>
<b>MMR gene alteration</b>	<b>89</b>	<b>18</b>	<b>20.2</b>
hMSH2/hMSH6 mutation	41	7	17.1
hMLH1/hPMS2 mutation	16	4	25
hMLH1 promoter hypermethylation	32	7	21.9
<b>No MMR gene alteration</b>	<b>37</b>	<b>6</b>	<b>16.2</b>

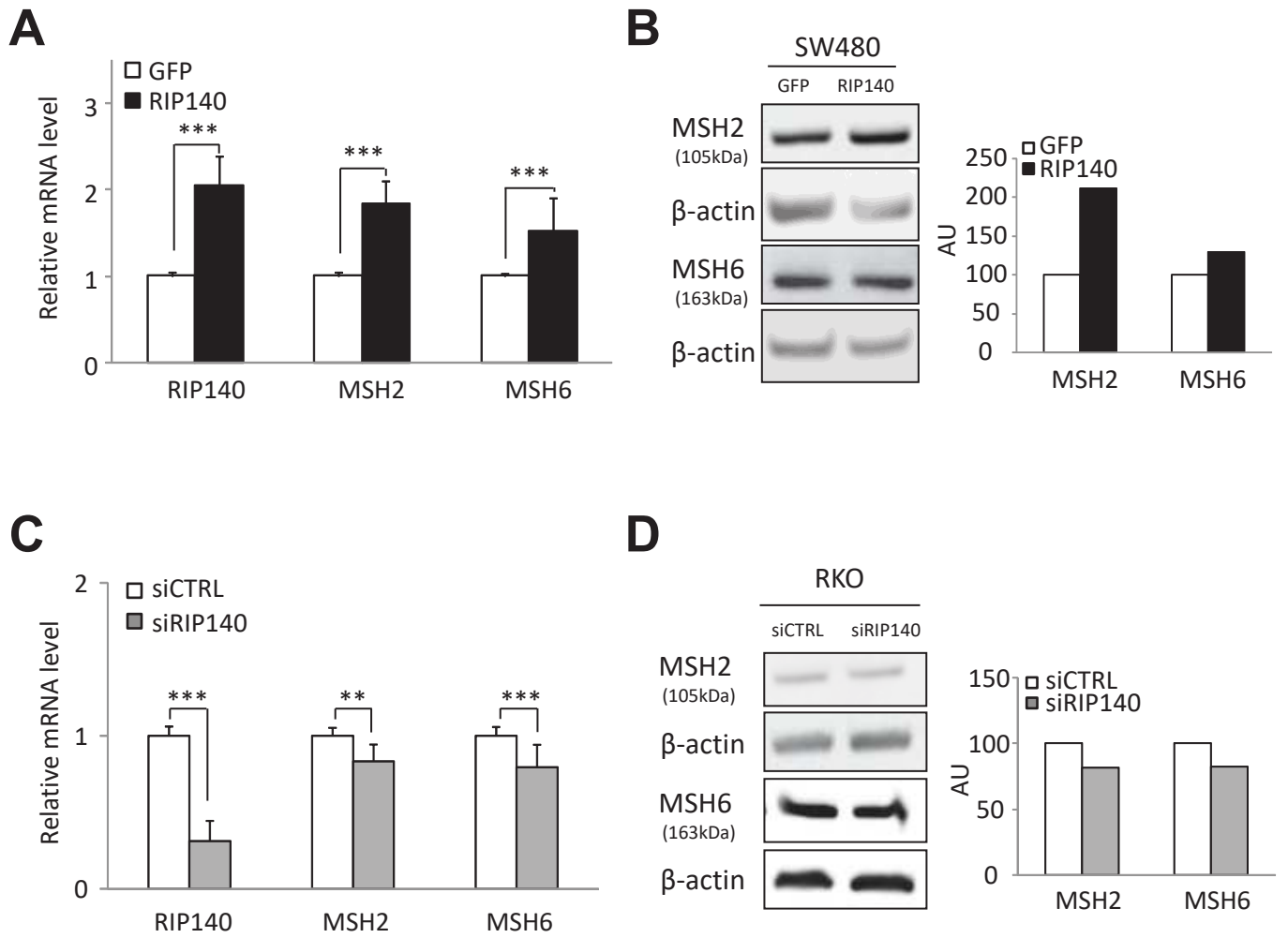
**B****RIP<sup>MSI</sup> mutation in MSI CRC samples****Figure 9**

# Supplementary data

**A****B**

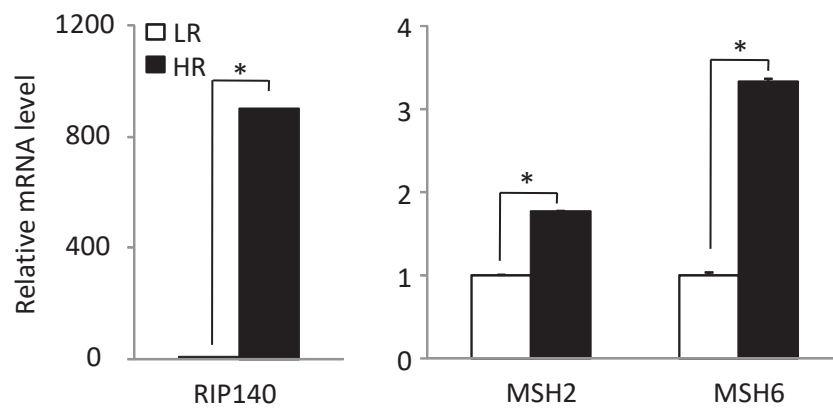
**RIP140 regulates MSH2/6 expression in transiently transfected HCT116 CRC cells**

**Figure S1**



**RIP140 regulates MSH2/6 expression in other CRC cells**

**Figure S2**

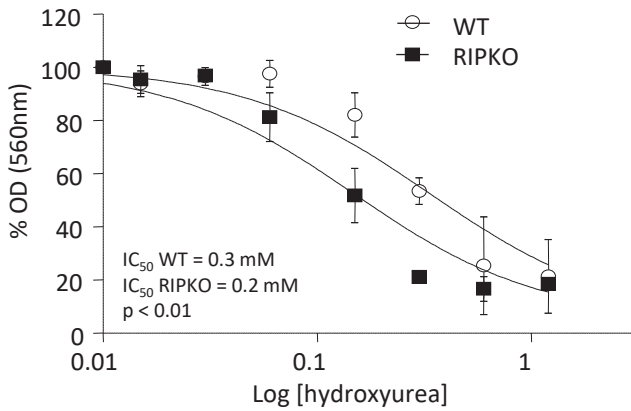
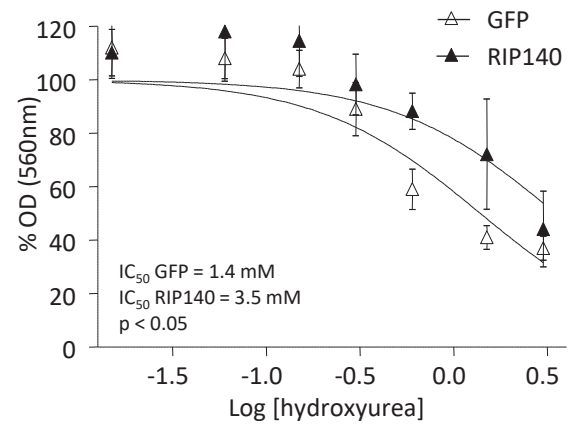
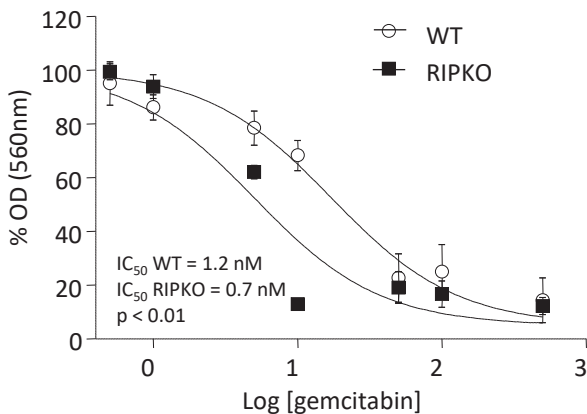
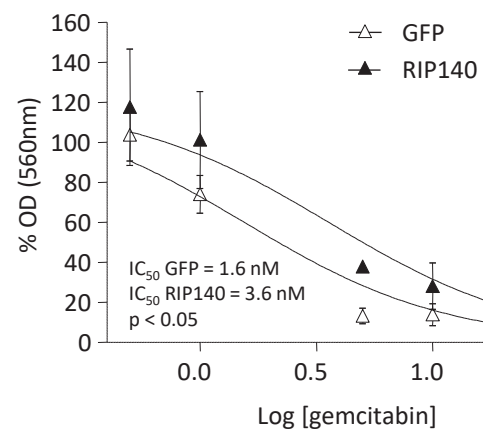


**Expression of RIP140, MSH2 and MSH6  
in HCT116LR and HR cells  
used to monitor microsatellite instability**

**Figure S3**

**A**

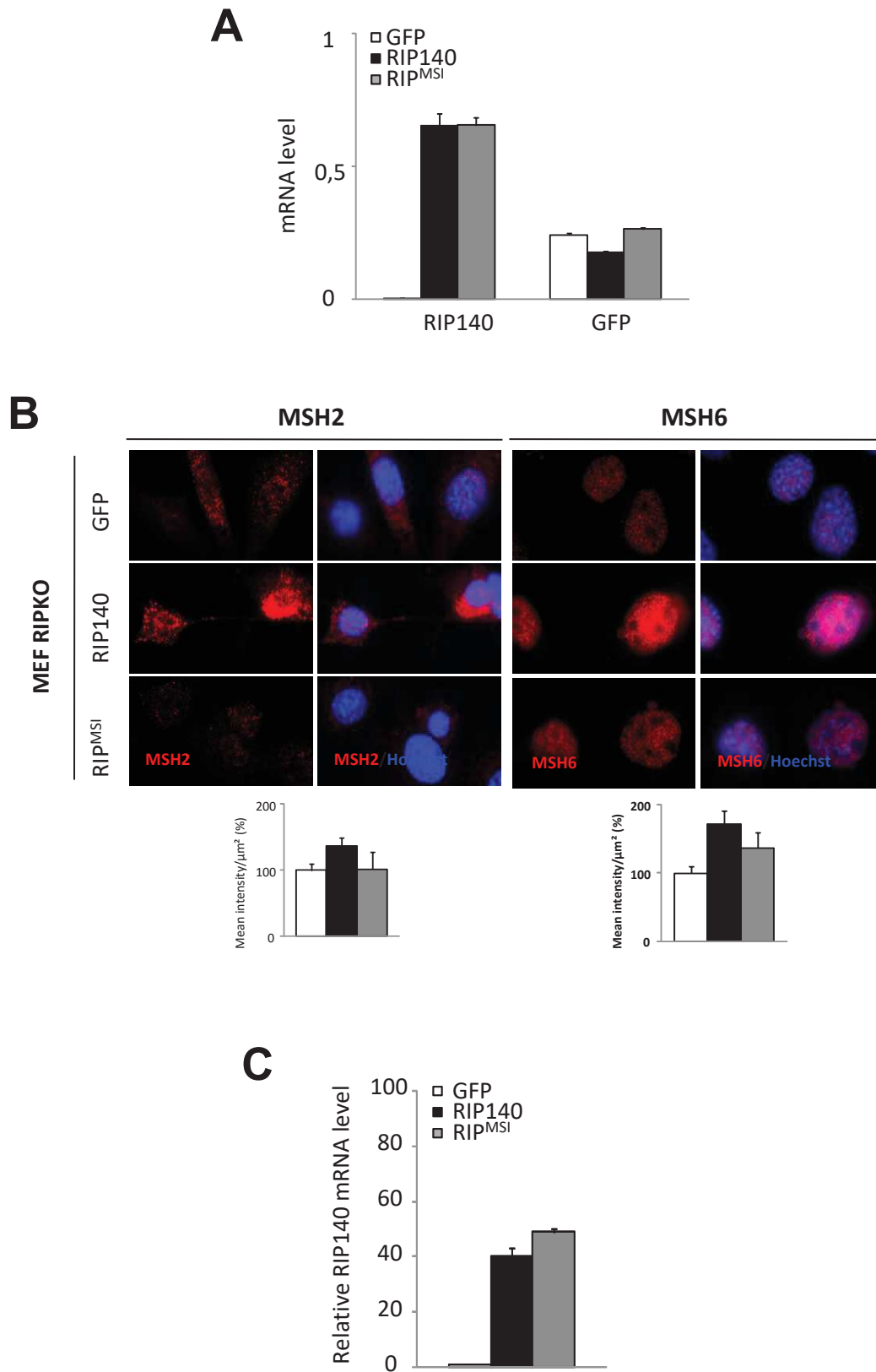
Drug	IC <sub>50</sub> ratios (MEFs) WT vs KO	p-value	IC <sub>50</sub> ratios (HCT116) RIP140 vs GFP	p-value
Oxaliplatin [ $\mu$ M]	2.21	< 0.05	3.05	< 0.05
5-FU [ $\mu$ M]	2.03	< 0.01	2.65	< 0.001
SN38 [ $\mu$ M]	1.92	< 0.05	2.06	< 0.05
Hydroxyurea [mM]	2.27	< 0.05	2.53	< 0.05
Gemcitabin [nM]	2.70	< 0.01	2.30	< 0.05

**B****C****D****E**

**RIP140 affects response to cytotoxic drugs**

**Figure S4**





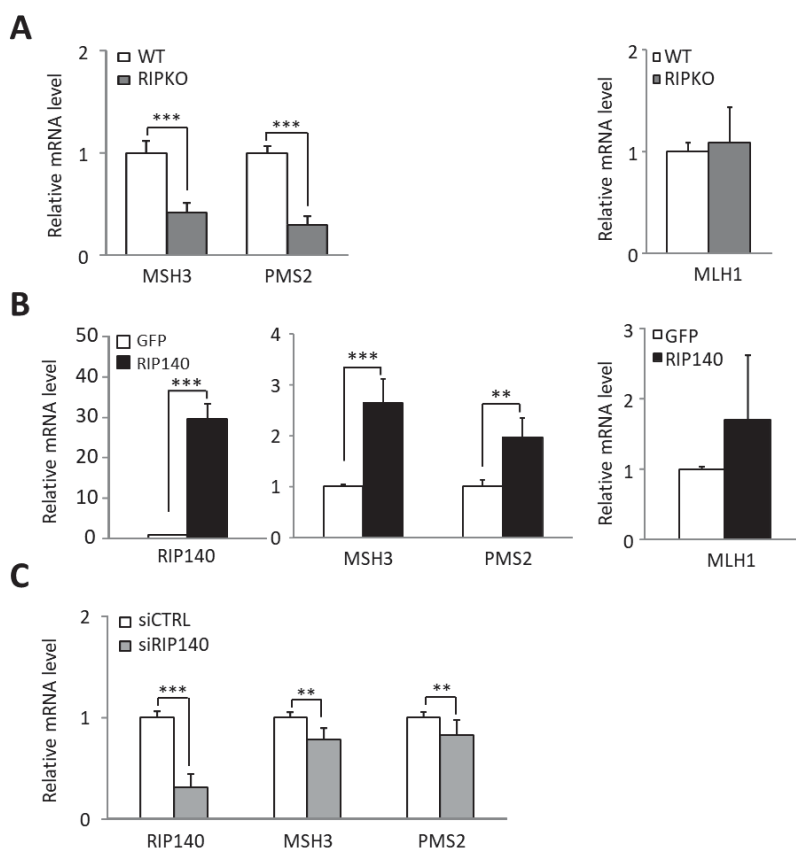
**Biological characterization  
of the RIP<sup>MSI</sup> frame shift mutation**

**Figure S5**

### 1.3. Résultats annexes

#### 1.3.1. Autres gènes MMR

Les mêmes modèles cellulaires et les mêmes techniques de quantification de l'expression des gènes, que ceux décrits précédemment, ont été utilisés pour évaluer l'expression d'autres membres du système MMR. Les gènes *MSH3* et *PMS2* apparaissent régulés positivement par RIP140 de manière significative (Figure 33). Il est intéressant de rappeler ici que *MSH3* est l'un des deux partenaires potentiels de *MSH2*, qui participe également à la reconnaissance des dommages. *PMS2* quant à lui est le partenaire de *MLH1* portant l'activité endonucléasique du complexe MutL $\alpha$ . A l'inverse, l'expression du gène *MLH1* ne semble pas être modulée significativement par les niveaux d'expression de RIP140. Il en est de même pour les gènes *MSH4* et *MSH5*, mais qui ne participent pas à l'activité de réparation du système MMR (résultats non montrés).



**Figure 33** Effet de RIP140 sur l'expression de *MSH3*, *PMS2* et *MLH1*

A) Fibroblastes embryonnaires murins MEF-WT et MEF-RIPKO, B) Lignée colorectale HCT116 surexprimant de manière stable le vecteur d'expression codant RIP140 ou la GFP seule et C) Lignée de CCR RKO transitoirement transfectée par siCTRL ou siRIP140. Les résultats sont en unités arbitraires et représentent les niveaux de variation par rapport à leur contrôle respectif, après correction des niveaux d'expression par un gène de normalisation. Chaque quantification a été réalisée en triplicat et le test de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique (\*\* p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001).

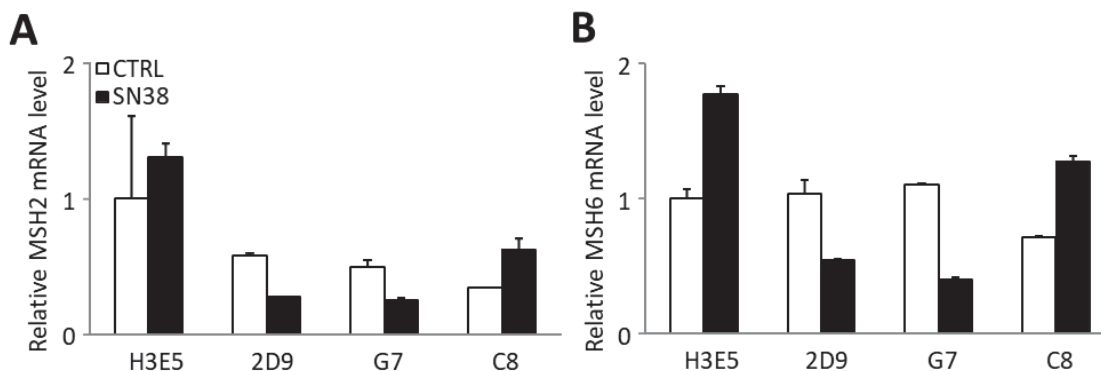
### 1.3.2. Lignées résistantes

La modulation de l'expression de RIP140 entraîne des variations de la sensibilité cellulaire à plusieurs molécules cytotoxiques. Il est apparu important de comprendre le lien de causalité potentiel entre la régulation d'expression de gènes majeurs du système MMR et ces différences de sensibilité observées. Des clones de cellules HCT116, présentant différents niveaux de résistance au SN38 ont été générés par une équipe de l'IRCM (M. Del Rio, C. Gongora), qui s'intéresse aux mécanismes moléculaires de la résistance. Ces clones résistants ont été obtenus en exposant des cellules HCT116 sensibles (HCT116-s, IC<sub>50</sub> = 1,9 nM) à des concentrations croissantes de SN38 (Candeil et al., 2004). Il n'a pas été relevé de résistance croisée de ces clones avec la doxorubicine, le 5-FU et l'oxaliplatine. Ces clones résistants au SN38 présentent des mutations de la topoisomérase I (cible du SN38), qui diminuent la formation de cassures double-brin induites par le SN38, sans en affecter l'expression ni l'activité (Gongora et al., 2011). L'obtention des ARNm de différents clones sensibles et résistants traités ou non par une dose de 0,5 µM de SN38 (Tableau 13), ont permis la quantification des gènes *MSH2* et *MSH6* afin d'analyser si l'expression de ces gènes est modifiée en fonction de la sensibilité ou non des cellules au SN38.

Nom du clone HCT116 Traité/Non traité (SN38 0,5 µM)	Sensible (S) Résistant (R)	IC <sub>50</sub> (nM)	Niveau de résistance par rapport au clone sensible
H3E5	S	1,9	1
H3E5 SN38	S		
2D9	R	11,2	6
2D9 SN38	R		
G7	R	28	15
G7 SN38	R		
C8	R	56	29
C8 SN38	R		

**Tableau 13** Caractéristiques des clones HCT116 sensibles et résistants au SN38  
Adapté de (Candeil et al., 2004)

L'expression de *MSH2* semble diminuer avec l'augmentation du niveau de résistance au SN38, en dehors de tout traitement, alors que celle de *MSH6* reste stable, excepté pour le plus haut niveau de résistance. D'autre part, l'expression de ces deux gènes augmente lors du traitement ponctuel d'un clone sensible et elle apparaît diminuée lors du traitement des clones résistants jusqu'à un certain niveau de résistance où la tendance s'inverse à nouveau, tout en demeurant inférieure aux cellules non traitées.

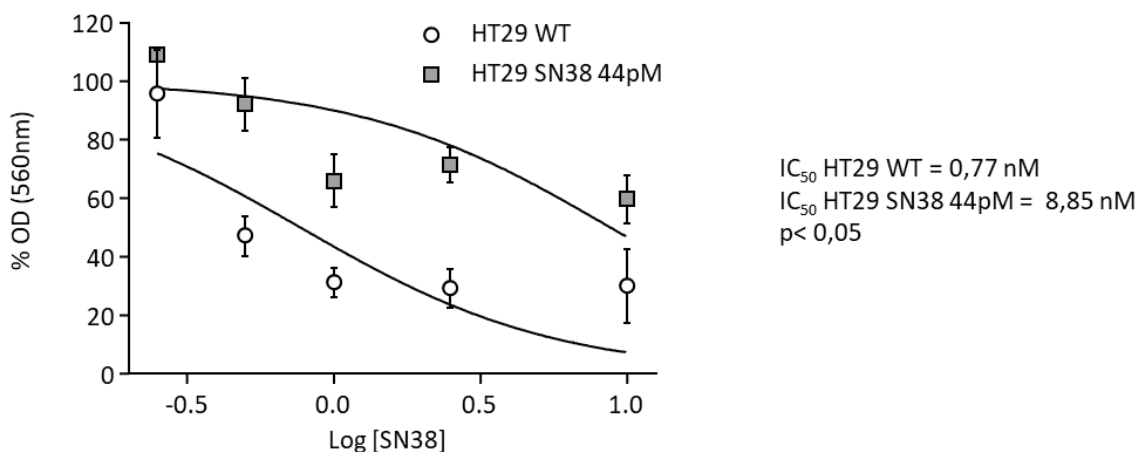


**Figure 34 Expression de *MSH2* et *MSH6* dans des clones HCT116 résistants au SN38**

Quantification de l'ARNm de (A) *MSH2* et (B) *MSH6*, dans les clones décrits ci-dessus après un traitement de 24h par 0,5  $\mu$ M de SN38. Les résultats sont donnés en unités arbitraires et représentent les niveaux de variation de l'expression de ces gènes par rapport au clone sensible non traité, après correction des niveaux d'expression par un gène de normalisation.

La difficulté d'interprétation de ces résultats et l'impossibilité de quantifier des variations d'expression de *RIP140* au sein de cette lignée colorectale, ont motivé la génération de cellules résistantes au SN38 dans une lignée de CCR stable (MSS), HT29, qui présente un plus haut niveau d'expression endogène de *RIP140*. Après évaluation de l' $IC_{50}$  des ces cellules au SN38 (0,96nM), la concentration de départ choisie a été de 4pM et elle a été augmentée jusqu'à 48pM. Les augmentations de doses ont été réalisées à chaque passage, en fonction de la tolérance des cellules. L'expression des gènes MMR a été évaluée ainsi que l'évolution de la réponse cytotoxique au SN38 de ces cellules capables de croître sous une pression de sélection de cette molécule en comparaison à la lignée parentale entretenue parallèlement.

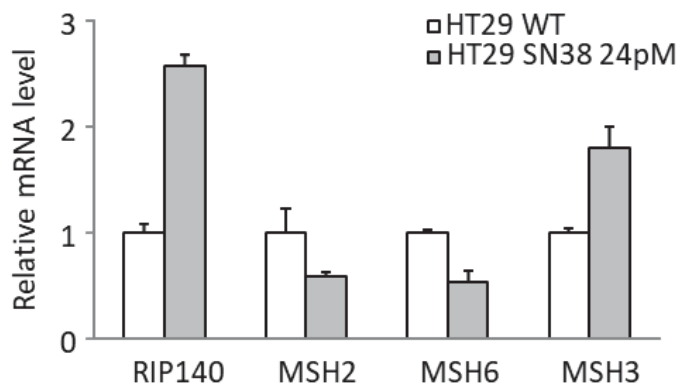
La viabilité cellulaire après exposition au SN38 des clones obtenus sous pression de sélection a été évaluée par la technique de MTT, préalablement décrite. La courbe dose réponse de ces cellules entretenues sous pression de sélection, présente un  $IC_{50}$  significativement différent et augmenté par rapport à la lignée sauvage (Figure 35).



**Figure 35 Courbes dose réponse de cellules HT29 résistantes au SN38**

Dose réponse au SN38 (0 à 100 nM) des cellules HT29 WT et HT29 entretenues avec une concentration de 44 pM de SN38. Les résultats de densité optique mesurée à 560 nm sont exprimés en pourcentage de la condition donnée non traitée.

La pression de sélection exercée par le SN38 au sein des cellules HT29 entraîne une diminution de l'expression de *MSH2* et *MSH6*, comme cela a été observé précédemment au sein des lignées HCT116 résistantes au SN38. Seul le gène *MSH3* semble suivre la tendance d'expression de *RIP140* (Figure 36).

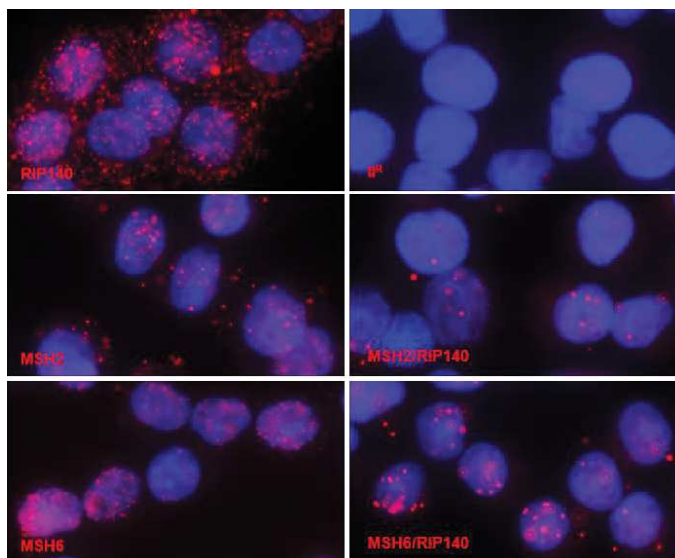


**Figure 36 Expression des gènes *RIP140* et MMR au sein de cellules HT29 résistantes au SN38**

Expression relative des gènes *RIP140*, *MSH2*, *MSH6* et *MSH3* analysée par RT-qPCR au sein de cellules HT29 capables de croître sous une pression de sélection de 24pM de SN38 en comparaison aux cellules sauvages.

### 1.3.3. Autre niveau de dialogue entre RIP140 et le complexe MutSa

RIP140 est une protéine essentiellement nucléaire, de même que MSH2 et MSH6. La lignée colorectale HT29 affiche un phénotype microsatellitaire stable et elle présente de plus forts niveaux d'expression de RIP140 que d'autres lignées colorectales (telles que les HCT116). Ces deux caractéristiques ont justifié son utilisation pour réaliser des expériences de PLA (*Proximity Ligation Assay*) afin de mettre en évidence la proximité physique de RIP140 avec MSH2 et MSH6. Les cellules sontensemencées, fixées, perméabilisées et saturées de la même façon que décrit plus haut pour une expérience d'immunofluorescence (IF) classique. Le protocole du kit Duolink II® *proximity ligation assay kit* (Eurogentec®) a ensuite été suivi selon les instructions du fabricant. Les anticorps primaires utilisés sont le sc9459, SantaCruz® pour RIP140, les anticorps spécifiques de MSH2 et MSH6 ont été décrits précédemment. Les images ci-dessous illustrent les résultats obtenus au grossissement (x40) avec le microscope droit à fluorescence Axio Imager.M2® (ZEISS) (Figure 37).



**Figure 37 Proximité de localisation nucléaire de RIP140 avec les protéines MSH2 et MSH6**

A gauche, images obtenues de chaque protéine, individuellement, RIP140, MSH2 et MSH6, dans la lignée CCR humaine HT29 au grossissement x40. A droite, de haut en bas, sont présentés les résultats obtenus dans le puits contenant seulement l'anticorps secondaire de révélation (II), utilisé comme contrôle négatif et les signaux donnés par la proximité de localisation entre les protéines RIP140 et MSH2 et RIP140 et MSH6.

Ces images suggèrent une proximité de localisation de ces protéines, ce qui semble cohérent, au vu de leurs fonctions respectives. Les images d'IF de l'expression de MSH2 et MSH6, illustrent leur différence d'expression, les foci formés par MSH2 sont plus larges et épars que ceux de MSH6. Cette différence de répartition se retrouve dans cette expérience de proximité de localisation de ces protéines avec RIP140.



# **Partie 2**

## **RIP140 & Pol Kappa**





## **2. Régulation transcriptionnelle du gène POLK par RIP140**

### **2.1. Introduction**

Le maintien de l'intégrité du génome repose sur des points de contrôle détectant le blocage des fourches de réplication et stimulant les réponses cellulaires appropriées et l'intervention de multiples systèmes capables de réparer ou tolérer les dommages de l'ADN. La dysfonction de l'un de ces systèmes peut entraîner une réplication incomplète, favorisant l'instabilité génétique. Au sein de la famille Y des polymérases translésionnelles (TLS), la polymérase Polk possède la capacité particulière d'assurer la réplication des séquences microsatellitaires du génome avec une plus grande précision que les polymérases réplicatives (Hile et al., 2011). L'expression de Polk est diminuée dans les CCR et le phénotype d'instabilité génétique consécutif à une telle diminution semble refléter la perte de ses fonctions physiologiques, à savoir, la synthèse des séquences microsatellitaires, des formes d'ADN non B, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et la réponse aux dommages de l'ADN (Pillaire et al., 2014).

Les nombreuses fonctions croisées des TLS et du système MMR (Lupari et al., 2012; Lv et al., 2013; Tsaalbi-Shtylik et al., 2015), nous ont amenés à étudier les effets du corégulateur transcriptionnel RIP140 sur l'expression de cette polymérase. Les niveaux de régulation observés des gènes MMR sont modestes mais plusieurs membres de ce système sont affectés simultanément, de même que l'expression de la polymérase Polk.

En perturbant la régulation d'expression d'acteurs prépondérants du maintien de la stabilité des régions microsatellitaires du génome, RIP140 et sa mutation peuvent affecter plus largement l'instabilité microsatellitaire des cancers, où des altérations directes de ces gènes impliqués dans la réparation ne sont pas retrouvées.

Ce travail a donné lieu à un article en soumission pour publication, intitulé :

**“Transcriptional regulation of POLK gene expression by RIP140  
in colon cancer cells”**

### **2.2. Article**



# Transcriptional regulation of POLK gene expression by RIP140 in colon cancer cells

P. Palassin<sup>1</sup>, M. Lapierre<sup>1</sup>, S. Bonnet<sup>1</sup>, MJ Pillaire<sup>2</sup>, JS Hoffmann<sup>2</sup>,  
C. Teyssier<sup>1</sup>, S. Jalaguier<sup>1</sup>, A. Castet-Nicolas<sup>1,3,4</sup>, V. Cavailles<sup>1\*\$</sup>

<sup>1</sup> IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France; INSERM, U1194, Montpellier, F-34298, France; Université de Montpellier, Montpellier, F-34090, France; Institut régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, F-34298, France. <sup>2</sup> Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer Labex Toucan, Cancer Research Center of Toulouse, INSERM U1037, CNRS ERL5294, Toulouse, France; University Paul Sabatier, Toulouse, France. <sup>3</sup> Centre Hospitalo-Universitaire Montpellier, <sup>4</sup> Unité de Formation et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 34090 Montpellier, France.

**Short title:** RIP140 and POLK expression

\*Corresponding author: Vincent Cavailles, IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM, U1194, 208 rue des Apothicaires, 34298 Montpellier cedex 5, France; Tel: (33)467612405; Fax: (33)467613787; E-mail: [vincent.cavailles@inserm.fr](mailto:vincent.cavailles@inserm.fr)

## **ABSTRACT**

The transcription factor RIP140 (Receptor Interacting Protein of 140 kDa) is involved in sporadic and familial intestinal tumorigenesis in particular through its positive effect on the expression of the *MSH2* and *MSH6* genes which encode the MutS $\alpha$  complex critical for the mismatch repair system. By using different mouse models together with engineered human colorectal cancer cell lines, we demonstrated in the present work that RIP140 positively regulates, at the transcriptional level, the expression of the *POLK* gene which encodes a translation synthesis polymerase involved in microsatellite stability. This regulation seems to involve the p53 tumor suppressor since it was abolished in HCT116 CRC cells lacking the *TP53* gene. In different cohorts of CRC biopsies, a strong positive correlation was observed between *RIP140* and *POLK* gene expression. Finally, the cellular response to methyl methane sulfonate, an alkylating drug which induces DNA lesions known to be bypassed by Polk, was altered in cells lacking the *RIP140* gene. In conclusion, the regulation of *POLK* gene expression by *RIP140* could reinforce its impact on the expression of the MutS $\alpha$  complex and thus participate in the control of genome integrity, in particular in the maintenance of microsatellite stability.

**192 words**

**Keywords:** Colorectal cancer, RIP140, translation synthesis polymerase, Pol Kappa, genome stability.

## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent cancers worldwide and genetic instability exerts a driving role in this malignancy [1]. The mismatch repair (MMR) system is one of the various cellular systems involved in the maintenance of genome integrity through the correction of mistakes that occur during DNA replication. Once impaired (as it occurs in 2-3% of CRC cases with an inherited component including Lynch syndrome [2],[3]), it generates microsatellite instability (MSI) and a hypermutated tumor phenotype with a high frequency of point and frameshift mutations [4],[5].

In addition to molecular machineries which cope DNA repair, mammalian cells possess enzymes with translesion DNA synthesis (TLS) activity. The *POLK* gene encodes one of the Y-family TLS polymerases which possesses unique DNA damage bypass and fidelity profiles without proofreading exonuclease activity [6]. Interestingly, Polk seems to protect against spontaneous mutagenesis, as evidenced by the generation of *POLK*<sup>-/-</sup> mice which have a spontaneous mutator phenotype in various tissues and, as a consequence, a shorter survival than wild-type or heterologous mice [7]. Polk seems also to play an important role in preventing DNA damage-induced toxic effects of methylnitrosourea which is dependent of MMR system [8], thus supporting a link between the two mechanisms. Indeed, recent data suggested that Polk could be involved in MSI maintenance [9]. Interestingly, Polk interacts with MSH2 [10] and partially protects human cells from the MMR-dependent cytotoxicity of O6-methylguanine lesions [8].

Our laboratory recently reported that the *RIP140* (Receptor Interacting Protein of 140kDa) gene was involved in normal and tumoral development of the intestinal epithelium. RIP140, also known as NRIP1 (Nuclear Receptor-Interacting Protein 1), was first identified as a transcriptional repressor of nuclear hormone receptors [11],[12]. We and others then characterized RIP140 as a coregulator of various transcription factors, including for instance E2F [13] or NFκB [14]. The repressive activity of RIP140 involves several inhibitory domains interacting with histone deacetylases [15] and is controlled by different post-translational modifications [16]. Using a mouse model lacking the *RIP140* gene, a wide range of physiological processes were shown to be regulated by RIP140, including female fertility [17] and mammary gland morphogenesis [18], fat metabolism [19], proinflammatory cytokine response [20] or cognition [21].

In the intestinal epithelium, our laboratory demonstrated that RIP140 inhibits the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and, as a consequence, exerts an anti-proliferative effect [22]. In line with this biological role, RIP140 expression decreased in CRC samples as compared to the adjacent healthy tissue. Interestingly, in sporadic CRC, RIP140 mRNA and protein levels significantly correlated with a better overall survival of patients and were identified as good prognosis markers [22]. More recently, we demonstrated that RIP140 was acting as a transcriptional regulator of *MSH2* and *MSH6* gene expression and could be involved in MSI regulation in CRC cells (Palassin *et al*, submitted for publication). Interestingly, a frame shift mutation in the RIP140 coding sequence was identified in MSI CRC tumors, mainly with a familial history, but without any mutation of the genes encoding the MMR system.

In the present study, we demonstrated that RIP140 positively regulates *POLK* gene expression at the transcriptional level via a p53-dependent mechanism. A strong correlation was observed between the expression of the *RIP140* and *POLK* genes in CRC biopsies. Moreover, MEFs knocked-out for the *RIP140* gene were shown to be more sensitive to methyl methane sulfonate (MMS), a drug known to induce DNA lesions dealt by Polk. We propose that the modulation of *POLK* gene expression by RIP140 could reinforce its effect on the maintenance of genome integrity and more particularly, on microsatellite stability.

## RESULTS

### RIP140 regulates *POLK* gene expression in mouse models

To decipher the role of RIP140 on the regulation of the *POLK* polymerase gene expression, we first used transgenic mice in which the *RIP140* gene was either knocked-out (RIPKO mice) or overexpressed (RIPTg mice) [23]. As shown in Figure 1A, a significant decrease in the levels of *POLK* mRNA was observed in the intestinal epithelium of RIPKO mice, whereas an increase was noted in RIPTg mice as compared to wild-type animals (WT). These regulations appeared specific since the expression of other TLS polymerase genes from the Y subfamily such as *POLI* did not vary between the different genotypes (Figure 1A and data not shown). The steady-state levels of *POLK* mRNA were also significantly reduced in immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from the RIPKO mice as compared to cells isolated from WT animals (Figure 1B). Altogether, these results demonstrate

that RIP140 positively controls the expression of the *POLK* gene in mouse cells and tissues.

### **RIP140 regulates *POLK* gene expression in CRC cells**

To get closer to the human pathology, we then analyzed the effect of RIP140 on *POLK* gene expression in human CRC cell lines. We confirmed the increased expression of the *POLK* gene at the mRNA levels in HCT116 cells either stably overexpressing RIP140, (Figure 1C) or transiently transfected with a RIP140 expression vector (Figure 1D). As expected, when the expression of the *RIP140* gene was silenced in HCT116 or RKO CRC cells, a significant decrease in *POLK* mRNA accumulation was noticed (Figure 1E and F, respectively). Moreover, the reduction of *POLK* gene expression was also observed at the protein level after RIP140 silencing in RKO cells (Figure 1G). In order to eliminate possible off-target effects, we used another RIP140-targeting siRNA which raised the same effects on *POLK* gene expression in HCT116 cells (supplementary Figure S1A). As shown in supplementary Figure S1B, the same regulation of *POLK* mRNA levels was observed upon RIP140 ectopic expression in the metastatic SW620 CRC cell line and under ectopic expression or silencing in HT29 CRC cells (Figure S1C and D).

### **Transcriptional regulation of *POLK* gene transcription in CRC cells**

To decipher the mechanisms underlying the positive regulation of *POLK* gene expression by RIP140, we set up transient transfection experiments of HCT116 cells using luciferase reporter constructs encompassing the proximal promoter region of the *POLK* gene (Figure 2A). As observed in Figure 2B, RIP140 significantly increased, in a dose-dependent manner, the luciferase activity driven by the *POLK* gene promoter, thus supporting a positive transcriptional regulation by RIP140. The same effects were observed in other CRC cells including RKO, SW480 and SW620 cells (Figure 2C).

### **Mechanism of the transcriptional regulation by RIP140**

Although RIP140 was first identified as a transcriptional repressor, we and others have reported positive regulation of gene expression (for a review see [24]). In particular, we described a transcriptional activation of gene expression by RIP140 through Sp1-mediated mechanisms [25]. Since the *POLK* gene promoter exhibits



Sp1 binding sites, we tested if the deletion of these sites affected the transcriptional response to RIP140 ectopic expression. As shown in Figure 2D, the induction of luciferase activity by RIP140 was significantly reduced when we used the Sp1-deleted reporter construct (POLK29) suggesting that the regulation of *POLK* gene expression by RIP140 might be, at least in part, Sp1-mediated. The transcription factor p53 has been reported to play a role in the transcriptional regulation of the *POLK* gene [26],[27]. By using HCT116 cells expressing or not the *TP53* gene, we showed that the positive induction of the *POLK* gene after ectopic expression of RIP140 appeared to require the presence of p53. Indeed, the regulation of *POLK* gene expression by RIP140 was abolished in HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells when monitored at the mRNA level (Figure 2E) or using a luciferase reporter assay (Figure 2F).

### **The RIP<sup>MSI</sup> mutation impairs the regulation of POLK gene expression**

We recently identified a frameshift mutation in the RIP140 coding sequence in MSI CRCs (Palassin *et al*, submitted for publication). This mutation (that we called RIP<sup>MSI</sup>) generated a truncated protein which impaired the biological activity of the RIP140 protein. When tested on the endogenous gene expression (Figure 3A) or in luciferase assays (Figure 3B), the RIP<sup>MSI</sup> protein was found to be less efficient than the wild-type (WT) protein to transactivate the *POLK* gene promoter. As shown in Figure 3C and D, the same results were obtained on endogenous gene expression in HT29 or SW480 CRC cells overexpressing wild-type or mutated RIP140. Interestingly, the RIP<sup>MSI</sup> mutant might exhibit a dominant negative effect since its ectopic expression significantly decreased *POLK* mRNA accumulation only in WT MEFs which express normal levels of RIP140 and not in RIPKO MEFs which no longer express the *RIP140* gene (Figure 3E).

### **Functional consequences of the regulation of Polk by RIP140**

The *POLK* gene has been involved in the cellular response to cytotoxic drugs including methyl methane sulfonate (MMS) [28]. Using our engineered MEF models, we measured the effects of RIP140 on MMS sensitivity by comparing IC<sub>50</sub> ratios between MEF WT and RIPKO. As shown in Figure 4A, we observed a significant increase of sensitivity to MMS when the *RIP140* gene was knocked-out (IC<sub>50</sub> ratio WT/RIPKO = 9.7, p < 0.05).

Since Polk has also been involved in cellular protection after cisplatin exposure [29], we also investigated the response of MEF WT and RIPKO to this drug. As shown in Figure 4B, an increased sensitivity of RIPKO cells was observed after exposure to cisplatin ( $IC_{50}$  ratio WT/RIPKO = 1.9,  $p < 0.001$ ). Altogether these data indicated that the regulation of *POLK* gene expression by RIP140 might be implicated in the cellular response to cytotoxic molecules.

### **Correlation of gene expression in human CRC biopsies**

In order to validate in human CRC biopsies, the expression data obtained in mouse tissues and in CRC cells *in vitro*, we first reanalyzed a transcriptomic dataset from 396 human CRC [30]. As shown in Figure 5A, we observed a very significant positive correlation between *RIP140* and *POLK* mRNA levels ( $r=0.74$ ;  $p=5.2e-69$ ). Interestingly, *POLK* and *RIP140* gene expression were significantly correlated in MSI tumors although the correlation appeared even better when we considered only the MSS tumors (Figure 5B).

We confirmed these data in another cohort comparing the expression of “DNA replication” genes in CRC and in the adjacent normal mucosa [31]. We confirmed that *RIP140* gene expression strongly decreased in the tumor (data not shown) and that there was a strong correlation in the expression ratio (normal vs tumoral) of the two genes ( $r=0.68$ ;  $p=0.0001$ ) (Figure 5C).

Finally, we reanalyzed another transcriptomic dataset from the TCGA-COAD RNA-seq data [32] obtained on 415 samples which confirmed a significant correlation between *RIP140* and *POLK* ( $r=0.65$ ;  $p<2.2e-16$ ) mRNA levels (Figure 5D). This dataset was further reanalyzed taking into account the different molecular subtypes [33]. This allowed us to show a significant correlation with *POLK* in the 6 different subgroups (Figure 5D), in particular in the C2 group which corresponds to the MMR deficient (MMRd) subgroup. Interestingly, a significant positive correlation of *RIP140* gene expression with *POLK* expression ( $r=0.46$ ;  $p=2e-16$ ) was also found using a fourth dataset [33] thus strengthening the results (data not shown).

## **DISCUSSION**

Colorectal cancer (CRC) is a frequent neoplasm with high genomic instability including microsatellite instability due to defects in the MMR system. We recently

described that the transcription factor RIP140 was a key factor in the regulation of intestinal homeostasis and tumorigenesis [23]. We also showed that this transcription factor could be involved in familial forms through the regulation of *MSH2/MSH6* gene expression and microsatellite instability (Palassin *et al*, submitted for publication).

In the present study, we demonstrated that RIP140 also strongly regulates *POLK* gene expression, both in mouse and human cells and tissues. Data obtained using luciferase reporter assays demonstrated that this regulation took place at the transcriptional level and implicated the proximal region of the *POLK* gene. Several transcription factors including p53 [27], Sp1 and CREB [34] or AhR [35] have been shown to control the expression of the *POLK* gene and some of them have their activity regulated by RIP140 [36]. The data presented herein suggested that p53 is a good candidate to mediate the regulation of *POLK* gene expression since the positive effect of RIP140 is lost in HCT116 cells no longer expressing the *TP53* gene. Moreover, it has been shown that the HDAC inhibitor Trichostatin A was able to induce *POLK* gene expression [34]. Since RIP140 is strongly partnering with HDACs [37], it is possible that HDAC sequestration out of the *POLK* gene promoter also participates in the positive effect exerted by RIP140 on *POLK* gene transcription as already demonstrated for other transcription factors [25].

By regulating *POLK* gene expression, RIP140 may induce phenotypic cellular consequences including the sensitivity to cytotoxic drugs. Indeed, it has been reported that Polk was able to protect mammalian cells from the mutagenic effects of alkylating agents such as MMS [38] or benzo[a]pyrene (B[a]P) [39]. Our present work confirmed that RIP140 deregulation impacted the sensitivity to MMS. It is worth mentioning that the phenotypic consequences of the regulation of MutS $\alpha$  gene expression by RIP140 (Palassin *et al*, submitted for publication) could be intensified by the coordinated regulation of *POLK* gene expression. Indeed, this TLS polymerase displays a high accuracy during dinucleotide microsatellite DNA synthesis and has been proposed to play a role in the maintenance of microsatellite stability [9]. Moreover, Polk interacts with MSH2 [10] and could therefore participate in the control of MutS $\alpha$  activity.

*POLK* gene expression appeared to be significantly down-regulated in colorectal tumors [31] and in other tumors including lung, stomach and breast cancers [40]. Moreover, several lines of evidence suggest that loss of expression of Polk in these malignancies contributes to genetic instability and cancer progression [41]. Depletion

of Polk might lead to stalled or collapsed forks as suggested by the increase of  $\gamma$ -H2AX foci in S phase [42]. In addition, the basal level of  $\gamma$ -H2AX is higher in *POLK*-deficient mouse embryonic fibroblast cells than in their wild type counterparts [43]. Altogether these data suggest that *POLK*-defective cells exhibit an altered DNA replication program thus explaining the spontaneous genetic alterations observed in *POLK*-deficient mice [44].

Transcriptional deregulation of *POLK* gene expression may therefore participate in intestinal tumorigenesis and account, at least in part, for the tumor suppressor role of RIP140 that we previously suggested. Further experiments combining *in vitro* and *in vivo* approaches will be needed to validate this hypothesis.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plasmids**

pRL-CMV-renilla and pGL promoters were obtained from Promega (Charbonnières, France). pEF-cmyc-RIP140 was previously described [45]. pEGFP-RIP140 is a kind gift of Dr Johanna Zilliacus, (Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden) [46]. pEF-cmyc-RIP<sup>MSI</sup> was generated by mutagenesis using the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). pEF-cmyc-RIP<sup>MSI</sup> was digested with *Afl*III and *Eco*RV enzymes and the resulting insert was cloned into pEGFP-RIP140 to create pEGFP-RIP<sup>MSI</sup>. GFP, GFP-RIP140 and GFP-RIP<sup>MSI</sup> were PCR amplified and cloned into pTRIPZ previously digested with *Age*I and *Mlu*I to create pTRIPZ-GFP, pTRIPZ-RIP140 and pTRIPZ-RIP<sup>MSI</sup> respectively. All the engineered PCR constructs were sequenced.

### **Cell culture and transfections**

Mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from wild-type or RIPKO mice previously described [23] and the stably transfected MEFs described in Palassin *et al* (submitted for publication) were grown in DMEM-F12 medium supplemented with 10% FCS, 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 100mg/ml sodium pyruvate, with 40  $\mu$ g/mL puromycin for selection of stably transfected cells. HCT116, RKO, SW480 and HT29 human colon cancer cells were grown as previously described (Palassin *et al* submitted for publication) and stably transfected with the empty pEGFP vector (Clontech®) or with the same vector containing the full-length human RIP140 cDNA

[47]. The SW620 human cell line was grown identically. HCT116-GFP and HCT116-RIP140 cells were previously described [23] and grown in McCoy medium and 750µg/ml G418. Small interfering RNA (siRNA) transfections were performed using INTERFERin® on cells seeded the day before in 6-well plate ( $3 \times 10^5$  cells per well). Each transfection was performed in triplicates and interference efficiencies were tested by quantitative RT-PCR.

### **Luciferase assays**

HCT116 cells were plated in 96-well plates ( $2.5 \times 10^4$  cells per well) 24h prior to DNA transfection with Jet-PEI® (275ng of total DNA). The pGL3-POLK Luc and its truncated mutant pGL3-83 (kind gifts of J.-S. Hoffmann) [48] from which the pGL3-29 has been constructed in the lab, have been also co-transfected in HCT116 cells. The pRL-CMV-renilla plasmid (Ozyme®) was used to normalize transfection efficiency. Firefly luciferase values were measured and normalized by the Renilla luciferase activity. Values were expressed as the mean ratio of luciferase activities.

### **Cell proliferation and cytotoxicity assays**

Cells were seeded in quadruplicate at a density of  $2 \cdot 10^3$  cells per well. At the indicated time, 0.5mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) was added and incubated at 37°C for 4h. Formazan crystals were solubilized in DMSO and absorbance read at 560 nm on a spectrophotometer. Results were normalized to the cell density at day 1. For cytotoxicity assays, cells were seeded in quadruplicate in 96-well plate ( $2.5 \times 10^3$  cells per well) and exposed the day after to increasing concentrations of cytotoxic drugs or to vehicle alone. The cells were exposed to the drug during six days and cell proliferation was quantified each day using MTT assay. Results were normalized to the mean optical density of the control for each day. Methylmethane sulfonate (MMS) and cisplatin were obtained from Sigma-Aldrich®.

### **Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)**

Total RNA was extracted from cells using Quick-RNA kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1µg) was subjected to reverse-transcription using qScript cDNA SuperMix (QuantaBio, VWR). RT-qPCR were performed with the Roche LightCycler® 480 instrument and the PerfeCTa SYBR Green FastMix (QuantaBio, VWR) and were carried out in a final volume of 10µl using 0.25µL of each primer (25µM), 5µL of the supplied enzyme mix, 2.5µl of H<sub>2</sub>O and 2µl of the template diluted at 1:10 (See Table S1 for primer sequences). After

pre-incubation at 95°C, runs corresponded to 35 cycles of 15s each at 95°C, 5s at 60°C and 15s at 72°C. Melting curves of the PCR products were analyzed using the LightCycler® software to exclude amplification of unspecific products. Results were normalized to mouse RS9 or human 28S housekeeping gene transcripts.

### **Immunoblotting**

RIPA solution was used to extract whole cell proteins. Cell extract were analyzed after migration of 30 µg protein extract by Western blotting using a primary polyclonal antibody against Polk (1/1000, Abcam ab57070). Protein quantifications were normalized with the actinin signal (1/1000, Millipore).

### **DNA microarray analysis**

A published DNA microarray study obtained on a cohort encompassing 396 colon tumor samples [49] was reanalyzed for *RIP140* and *POLK* mRNA expression. Statistical significance was assessed using a Spearman correlation analysis. Correlation between *RIP140* and *POLK* gene expression was also studied using another cohort [31]. Finally, a transcriptomic data set from the TCGA-COAD RNA-seq data obtained on 415 samples was also used [32].

### **Statistical analysis**

All experiments were conducted independently at least three times. Results were expressed as the mean ± standard deviation (S.D.). Statistical comparisons were performed with Mann-Whitney or Spearman tests. A probability level ( $p$  value) of 0.05 was chosen for statistical significance.

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors have no conflict of interest to declare.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by INSERM, INCa (Plan Cancer pour la Formation à la Recherche Translationnelle en Cancérologie; ASC14080FSA), CHU Montpellier (Contrat année recherche for PP), the Fondation Val d'Aurelle, Université de Montpellier 1 and the Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM). We thank the Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM) for histology facilities. We are also grateful to Drs J. Zilliacus for plasmid sharing.



## REFERENCES

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65: 87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
2. Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 1997; 113: 1146–58.
3. Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TYH, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJB, Tsui WY, Kong CK, Brunner HG, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet.* 2009; 41: 112–7. doi: 10.1038/ng.283.
4. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012; 487: 330–7. doi: 10.1038/nature11252.
5. Carethers JM, Stoffel EM. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2015; 21: 9253–61. doi: 10.3748/wjg.v21.i31.9253.
6. Lange SS, Takata K, Wood RD. DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11: 96–110. doi: 10.1038/nrc2998.
7. Stancel JNK, McDaniel LD, Velasco S, Richardson J, Guo C, Friedberg EC. Polk mutant mice have a spontaneous mutator phenotype. *DNA Repair.* 2009; 8: 1355–62. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.09.003.
8. Lupari E, Ventura I, Marcon F, Aquilina G, Dogliotti E, Fortini P. Pol kappa partially rescues MMR-dependent cytotoxicity of O6-methylguanine. *DNA Repair.* 2012; 11: 579–86. doi: 10.1016/j.dnarep.2012.03.004.
9. Hile SE, Wang X, Lee MYWT, Eckert KA. Beyond translesion synthesis: polymerase  $\kappa$  fidelity as a potential determinant of microsatellite stability. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 1636–47. doi: 10.1093/nar/gkr889.
10. Lv L, Wang F, Ma X, Yang Y, Wang Z, Liu H, Li X, Liu Z, Zhang T, Huang M, Friedberg EC, Tang T-S, Guo C. Mismatch repair protein MSH2 regulates translesion DNA synthesis following exposure of cells to UV radiation. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 10312–22. doi: 10.1093/nar/gkt793.

11. Cavailles V, Dauvois S, L'Horset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ, Parker MG. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J*. 1995; 14: 3741–51.
12. Augereau P, Badia E, Carascossa S, Castet A, Fritsch S, Harmand P-O, Jalaguier S, Cavailles V. The nuclear receptor transcriptional coregulator RIP140. *Nucl Recept Signal*. 2006; 4: e024. doi: 10.1621/nrs.04024.
13. Docquier A, Harmand P-O, Fritsch S, Chanrion M, Darbon J-M, Cavailles V. The transcriptional coregulator RIP140 represses E2F1 activity and discriminates breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010; 16: 2959–70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3153.
14. Zschiedrich I, Hardeland U, Kronen-Herzig A, Berriel Diaz M, Vegiopoulos A, Müggenburg J, Sombroek D, Hofmann TG, Zawatzky R, Yu X, Gretz N, Christian M, White R, et al. Coactivator function of RIP140 for NFkappaB/RelA-dependent cytokine gene expression. *Blood*. 2008; 112: 264–76. doi: 10.1182/blood-2007-11-121699.
15. Castet A, Boulahtouf A, Versini G, Bonnet S, Augereau P, Vignon F, Khochbin S, Jalaguier S, Cavailles V. Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 1957–66. doi: 10.1093/nar/gkh524.
16. Yang X-J, Seto E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*. 2008; 31: 449–61. doi: 10.1016/j.molcel.2008.07.002.
17. White R, Leonardsson G, Rosewell I, Ann JM, Milligan S, Parker M. The nuclear receptor co-repressor nrip1 (RIP140) is essential for female fertility. *NatMed*. 2000; 6: 1368–74.
18. Nautiyal J, Steel JH, Mane MR, Oduwole O, Poliandri A, Alexi X, Wood N, Poutanen M, Zwart W, Stingl J, Parker MG. The transcriptional co-factor RIP140 regulates mammary gland development by promoting the generation of key mitogenic signals. *Dev Camb Engl*. 2013; 140: 1079–89. doi: 10.1242/dev.085720.
19. Leonardsson G, Steel JH, Christian M, Pocock V, Milligan S, Bell J, So PW, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, White R, Parker MG. Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 8437–42.



20. Ho P-C, Tsui Y-C, Feng X, Greaves DR, Wei L-N. NF- $\kappa$ B-mediated degradation of the coactivator RIP140 regulates inflammatory responses and contributes to endotoxin tolerance. *Nat Immunol.* 2012; 13: 379–86. doi: 10.1038/ni.2238.
21. Duclot F, Lapierre M, Fritsch S, White R, Parker MG, Maurice T, Cavailles V. Cognitive impairments in adult mice with constitutive inactivation of RIP140 gene expression. *Genes Brain Behav.* 2012; 11: 69–78. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00731.x.
22. Lapierre M, Bonnet S, Bascoul-Mollevi C, Ait-Arsa I, Jalaguier S, Del Rio M, Plateroti M, Roepman P, Ychou M, Pannequin J, Hollande F, Parker M, Cavailles V. RIP140 increases APC expression and controls intestinal homeostasis and tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2014; 124: 1899–913. doi: 10.1172/JCI65178.
23. Lapierre M, Bonnet S, Bascoul-Mollevi C, Ait-Arsa I, Jalaguier S, Del Rio M, Plateroti M, Roepman P, Ychou M, Pannequin J, Hollande F, Parker M, Cavailles V. RIP140 increases APC expression and controls intestinal homeostasis and tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2014; 124: 1899–913. doi: 10.1172/JCI65178.
24. Augereau P, Badia E, Balaguer P, Carascossa S, Castet A, Jalaguier S, Cavailles V. Negative regulation of hormone signaling by RIP140. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006; 102: 51–9. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.09.005.
25. Castet A, Herledan A, Bonnet S, Jalaguier S, Vanacker J-M, Cavailles V. Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 2006; 20: 1035–47. doi: 10.1210/me.2005-0227.
26. Velasco-Miguel S, Richardson JA, Gerlach VL, Lai WC, Gao T, Russell LD, Hladik CL, White CL, Friedberg EC. Constitutive and regulated expression of the mouse Dinb (Polkappa) gene encoding DNA polymerase kappa. *DNA Repair.* 2003; 2: 91–106.
27. Wang Y, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Takenaga K, Shishikura T, Nakagawara A, Sakiyama S, Tagawa M, O-Wang J. Elevated expression of DNA polymerase kappa in human lung cancer is associated with p53 inactivation: Negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int J Oncol.* 2004; 25: 161–5.

28. Wit N, Buoninfante OA, van den Berk PCM, Jansen JG, Hogenbirk MA, de Wind N, Jacobs H. Roles of PCNA ubiquitination and TLS polymerases  $\kappa$  and  $\eta$  in the bypass of methyl methanesulfonate-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: 282–94. doi: 10.1093/nar/gku1301.
29. Zhuo M, Gorgun MF, Englander EW. Translesion Synthesis DNA Polymerase Kappa Is Indispensable for DNA Repair Synthesis in Cisplatin Exposed Dorsal Root Ganglion Neurons. *Mol Neurobiol.* 2017; . doi: 10.1007/s12035-017-0507-5.
30. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, Lopez-Doriga A, Santos C, Marijnen C, Westerga J, Bruin S, Kerr D, Kuppen P, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011; 29: 17–24. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1077.
31. Pillaire M-J, Selves J, Gordien K, Gourraud P-A, Gouraud P-A, Gentil C, Danjoux M, Do C, Negre V, Bieth A, Guimbaud R, Trouche D, Pasero P, et al. A “DNA replication” signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. *Oncogene.* 2010; 29: 876–87. doi: 10.1038/onc.2009.378.
32. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012; 487: 330–7. doi: 10.1038/nature11252.
33. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, Etienne-Grimaldi M-C, Schiappa R, Guenot D, Ayadi M, Kirzin S, Chazal M, Fléjou J-F, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* 2013; 10: e1001453. doi: 10.1371/journal.pmed.1001453.
34. Lemée F, Bavoux C, Pillaire MJ, Bieth A, Machado CR, Pena SD, Guimbaud R, Selves J, Hoffmann JS, Cazaux C. Characterization of promoter regulatory elements involved in downexpression of the DNA polymerase kappa in colorectal cancer. *Oncogene.* 2007; 26: 3387–94. doi: 10.1038/sj.onc.1210116.
35. Ogi T, Mimura J, Hikida M, Fujimoto H, Fujii-Kuriyama Y, Ohmori H. Expression of human and mouse genes encoding polkappa: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech.* 2001; 6: 943–53.
36. Madak-Erdogan Z, Katzenellenbogen BS. Aryl hydrocarbon receptor modulation of estrogen receptor  $\alpha$ -mediated gene regulation by a multimeric chromatin

- complex involving the two receptors and the coregulator RIP140. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 2012; 125: 401–11. doi: 10.1093/toxsci/kfr300.
37. Wei LN, Hu X, Chandra D, Seto E, Farooqui M. Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *JBiolChem.* 2000; 275: 40782–7.
  38. Takenaka K, Ogi T, Okada T, Sonoda E, Guo C, Friedberg EC, Takeda S. Involvement of vertebrate Polkappa in translesion DNA synthesis across DNA monoalkylation damage. *J Biol Chem.* 2006; 281: 2000–4. doi: 10.1074/jbc.M506153200.
  39. Ogi T, Shinkai Y, Tanaka K, Ohmori H. Polkappa protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 15548–53. doi: 10.1073/pnas.222377899.
  40. Pan Q, Fang Y, Xu Y, Zhang K, Hu X. Down-regulation of DNA polymerases kappa, eta, iota, and zeta in human lung, stomach, and colorectal cancers. *Cancer Lett.* 2005; 217: 139–47. doi: 10.1016/j.canlet.2004.07.021.
  41. Pillaire M-J, Bétous R, Hoffmann J-S. Role of DNA polymerase  $\kappa$  in the maintenance of genomic stability. *Mol Cell Oncol.* 2014; 1: e29902. doi: 10.4161/mco.29902.
  42. Bétous R, Pillaire M-J, Pierini L, van der Laan S, Recolin B, Ohi-Séguy E, Guo C, Niimi N, Grúz P, Nohmi T, Friedberg E, Cazaux C, Maiorano D, et al. DNA polymerase  $\kappa$ -dependent DNA synthesis at stalled replication forks is important for CHK1 activation. *EMBO J.* 2013; 32: 2172–85. doi: 10.1038/emboj.2013.148.
  43. Zhang X, Lv L, Chen Q, Yuan F, Zhang T, Yang Y, Zhang H, Wang Y, Jia Y, Qian L, Chen B, Zhang Y, Friedberg EC, et al. Mouse DNA polymerase kappa has a functional role in the repair of DNA strand breaks. *DNA Repair.* 2013; 12: 377–88. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.02.008.
  44. Stancel JNK, McDaniel LD, Velasco S, Richardson J, Guo C, Friedberg EC. Polk mutant mice have a spontaneous mutator phenotype. *DNA Repair.* 2009; 8: 1355–62. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.09.003.
  45. Jalaguier S, Teyssier C, Nait Achour T, Lucas A, Bonnet S, Rodriguez C, Elarouci N, Lapierre M, Cavailles V. Complex regulation of LCoR signaling in breast cancer cells. *Oncogene.* 2017; . doi: 10.1038/onc.2017.97.

46. Zilliacus J, Holter E, Wakui H, Tazawa H, Treuter E, Gustafsson JA. Regulation of glucocorticoid receptor activity by 14--3-3-dependent intracellular relocalization of the corepressor RIP140. *MolEndocrinol*. 2001; 15: 501–11.
47. Zilliacus J, Holter E, Wakui H, Tazawa H, Treuter E, Gustafsson JA. Regulation of glucocorticoid receptor activity by 14--3-3-dependent intracellular relocalization of the corepressor RIP140. *MolEndocrinol*. 2001; 15: 501–11.
48. Lemée F, Bavoux C, Pillaire MJ, Bieth A, Machado CR, Pena SD, Guimbaud R, Selves J, Hoffmann JS, Cazaux C. Characterization of promoter regulatory elements involved in downexpression of the DNA polymerase kappa in colorectal cancer. *Oncogene*. 2007; 26: 3387–94. doi: 10.1038/sj.onc.1210116.
49. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, Lopez-Doriga A, Santos C, Marijnen C, Westerga J, Bruin S, Kerr D, Kuppen P, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011; 29: 17–24. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1077.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. RIP140 regulates *POLK* gene expression.

**A)** RT-qPCR analysis of *POLK* and *POL1* mRNA in intestinal epithelium of mice lacking the *RIP140* gene (RIPKO) and in transgenic mice overexpressing *RIP140* (RIPTg) as compared to their WT littermates. Results for each gene are given in arbitrary units (AU) and expressed in fold change  $\pm$  S.D. relatively to WT after normalization to mouse RS9 mRNA. **B)** Same as in panel A in immortalized MEFs from WT or RIPKO mice. **C)** HCT116 cells were stably transfected with the pEGFP-*RIP140*-expressing vector, or with pEGFP alone. *RIP140*, *POLK* and *POL1* mRNA levels were checked by RT-qPCR. Results are expressed relatively to WT  $\pm$  S.D. after normalization to human 28S mRNA. **D)** Same as in panel C in HCT116 cells transiently transfected with a *RIP140* expression vector. **E)** *RIP140* and *POLK* mRNA levels were quantified by real-time quantitative PCR in HCT116 cells transiently transfected with siCTRL or si*RIP140* siRNAs as indicated. Results are expressed as fold change  $\pm$  S.D. relatively to siCTRL after normalization to 28S mRNA; n=3 independent experiments for each condition. **F)** Same as in panel E performed in RKO CRC cells. **G)** Polk expression analysis by western blot of whole cell extract from RKO cells 48h after transient siRNA transfection. Quantifications are expressed in arbitrary units (AU) after normalization to actinin), used as a control of protein migration. A Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\*\*\*) p<0.001).

### Figure 2. RIP140 regulates *POLK* at the transcriptional level in CRC cells.

**A)** Schematic representation of *POLK* proximal promoter cloned in a pGL3 promoter and the putative regulatory sites identified as well as the *POLK*29 deletion mutant. **B)** The proximal *POLK* promoter described above was transiently co-transfected into HCT116 cells with increasing doses of a pEF-cmyc-*RIP140* expression vector and pRL-CMV-renilla as internal control. The reporter activity was presented as relative luciferase activity (RLU) as mean  $\pm$  S.D.; n=3 independent experiments. **C)** Same reporter assay as in B) performed in RKO, SW480 and SW620 cells. **D)** Luciferase reporter assay performed with the two reporter vectors described in A. Values are means  $\pm$  S.D.; n=3 independent experiments. **E)** Effect of *RIP140* ectopic expression on *POLK* mRNA levels after transient transfection in p53WT or p53KO HCT116 cells. **F)** Transactivation of the *POLK* gene promoter by increasing doses of a *RIP140*

expression vector in p53WT or p53KO HCT116 cells. A Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**Figure 3. Effect of the  $RIP^{MSI}$  frame shift mutation on *POLK* gene expression.**

**A)** mRNA quantification of the *POLK* and *POL1* gene in MEF RIPKO stable cells expressing either the GFP (white box) or the GFP fused wild-type form (black box) or the  $RIP^{MSI}$  mutant form (grey box) of RIP140. **B)** Luciferase reporter experiments on the pGL3-*POLK* reporter promoter were performed with ectopic expression of the wild-type or the mutant pEF-cmyc- $RIP^{MSI}$  expression vectors. Values represent means  $\pm$  S.D.  $n=3$  independent experiments. **C)** mRNA quantification of the *POLK* gene in HT29 CRC cells transiently transfected with pEGFP, pEGFP-RIP140 or a pEGFP- $RIP^{MSI}$  expression vectors. **D)** Analyses of the mRNA expression of the *POLK* gene in MEFs cells stably transfected with the human expression vector of  $RIP^{MSI}$  in a RIP140 wild-type background (MEF WT) or knock-out (MEF RIPKO) as compared to the control transfected with a GFP expressing vector in each condition. A Mann-Whitney test was used for statistical analysis (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**Figure 4. RIP140 expression affects the response to cytotoxic drugs.**

**A)** MEF WT and RIPKO cells were exposed or not to increasing doses of methyl methane sulfonate (from 0.5  $\mu$ M to 1 mM). Optical density of diluted formazan crystals was expressed in percentage relative to the control.  $IC_{50}$  values of each cell type were mentioned together with the p-value of the nonlinear regression performed with the GraphPad® software allowing the comparison of  $IC_{50}$  between each cell type dose-response ( $IC_{50}$  ratio WT/RIPKO = 9.7,  $p < 0.05$ ). **B)** Same as in panel A with increasing doses of cisplatin (from 0.1 to 20  $\mu$ M) ( $IC_{50}$  ratio WT/RIPKO = 1.9,  $p < 0.001$ ).

**Figure 5. Correlation of *RIP140* and *POLK* gene expression in human CRC samples.**

**A)** Correlation between *RIP140* and *POLK* gene expression in 396 colorectal adenocarcinomas [30]. **B)** Statistical significance was assessed using a Spearman correlation analysis on this cohort, containing 247 microsatellite stable (MSS) and 29 microsatellite instable (MSI) samples. Spearman correlation coefficients between *RIP140* and *POLK* gene expression are indicated for the whole cohort, MSS and MSI

samples. **C)** Correlation between *POLK* and *RIP140* gene expression in a cohort comparing the expression of “DNA replication” genes in CRC and in the adjacent normal mucosa (n = 26) [31]. **D)** Correlations between *RIP140* and *POLK* gene expression performed with TCGA RNA-Seq cohort (n = 415) [32] showing the correlations found in the different CRC molecular subtypes described in this cohort.

## LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURES

### **Supplementary Figure 1. Expression of *POLK* in human CRC cells.**

**A)** mRNA quantification of *RIP140* and *POLK* genes by RT-qPCR in stable RKO cells after transient transfection of an alternative siRIP140. **B)** RT-qPCR analysis of *RIP140* and *POLK* gene expression in SW620 cells after transient transfection of pEF-cmyc-RIP140. **C)** Same analysis as in panel B after transfection of HT29 CRC cells with the same plasmid. **D)** *RIP140* and *POLK* gene expression after transient invalidation of the *RIP140* gene in HT29 CRC cells transfected with the siRIP140 used in Figure 1.

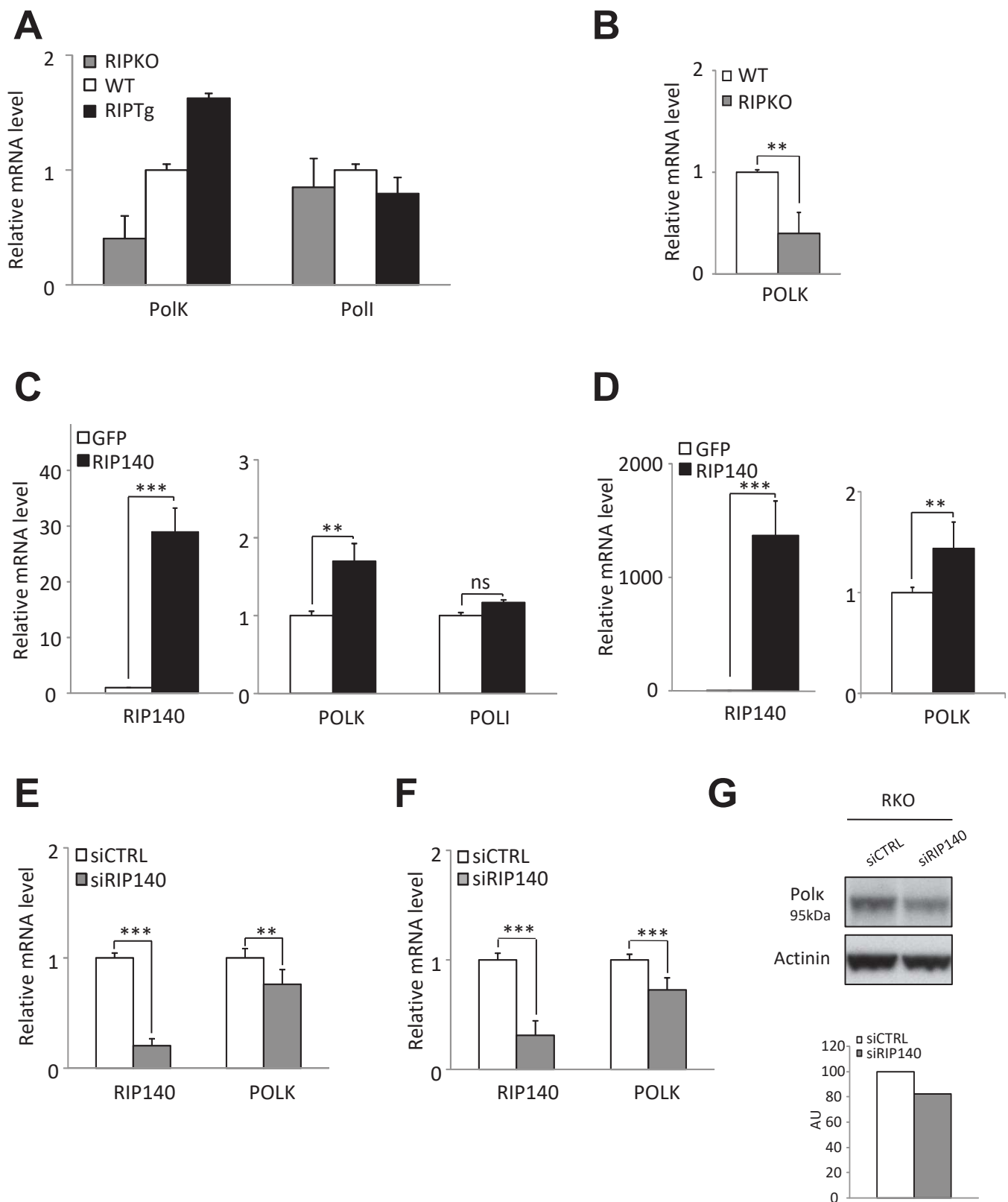
### **Supplementary Figure 2. Correlation of *RIP140* expression with *POLK* in human CRC tumors.**

Correlation analyses between the expression of *RIP140* and *POLK* genes in different molecular subtypes of CRC samples [33].



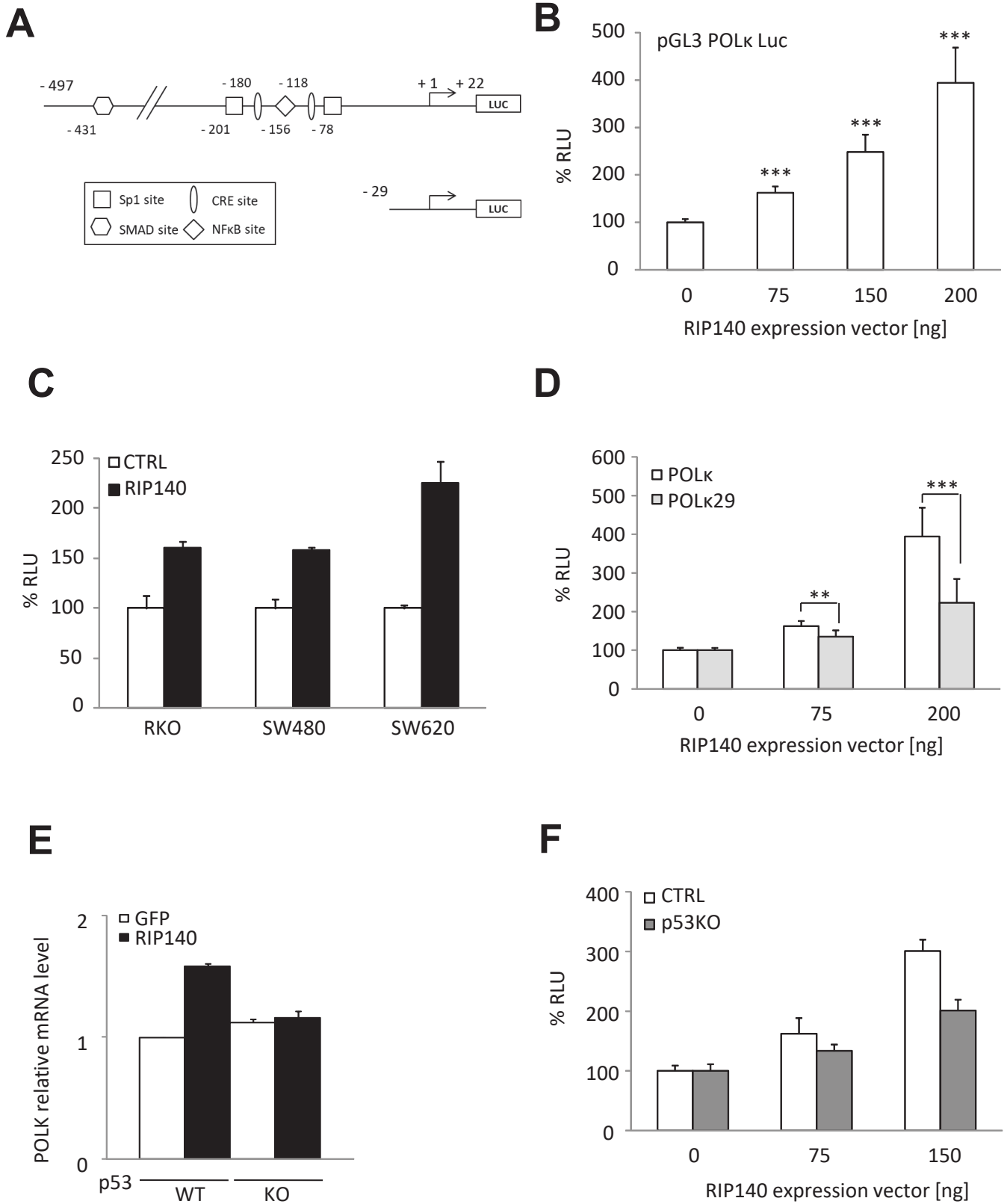
**Table S1: Primer sequences**

<b>Gene Symbol</b>	<b>Forward Sequence</b>	<b>Reverse Sequence</b>
<b>mRIP140</b>	AGAACGCACATCAGGTGGCA	GATGGCCAGACACCCCTTTG
<b>mPOLK</b>	AGCCTGGCTTCCGATTCT	TCCATGATGCAAACAGGGTA
<b>mPOLI</b>	AGGGCCTATGGACTGCTACC	TGTGAGAGTCTTCCGTGTGG
<b>hRIP140</b>	AATGTGCACTTGAGCCATGATG	TCGGACACTGGTAAGGCAGG
<b>hPOLK</b>	CCTCCTGGGAGTTGTAGTCG	CCCATCCTAAGCAGAAGATCA
<b>hPOLI</b>	GGTCGTGAGAGTCGTCAGTG	ATCAACCATTGGGGTCATCA



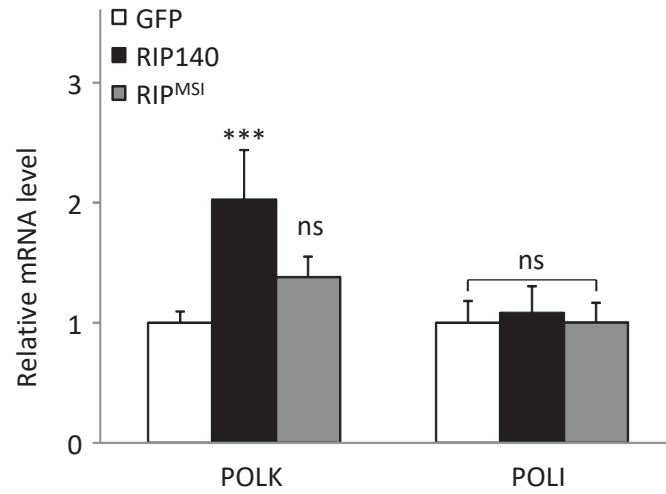
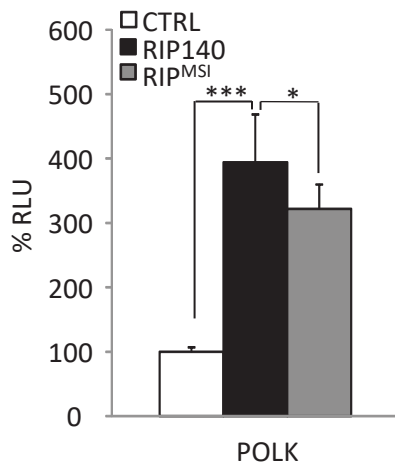
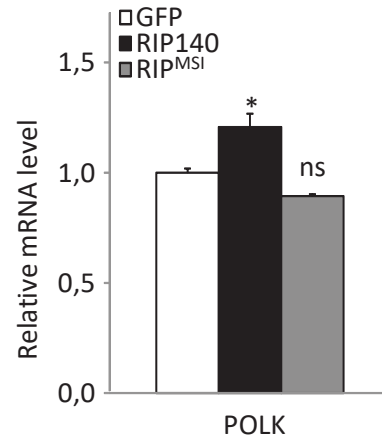
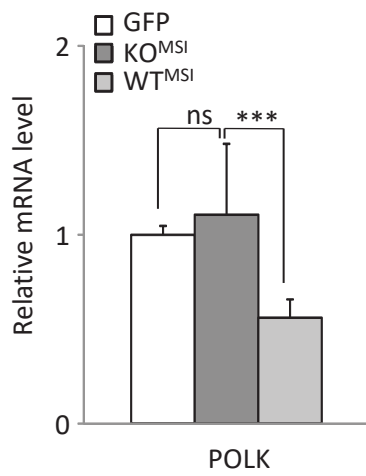
**RIP140 regulates the expression of the translesion synthesis polymerase POLK**

**Figure 1**



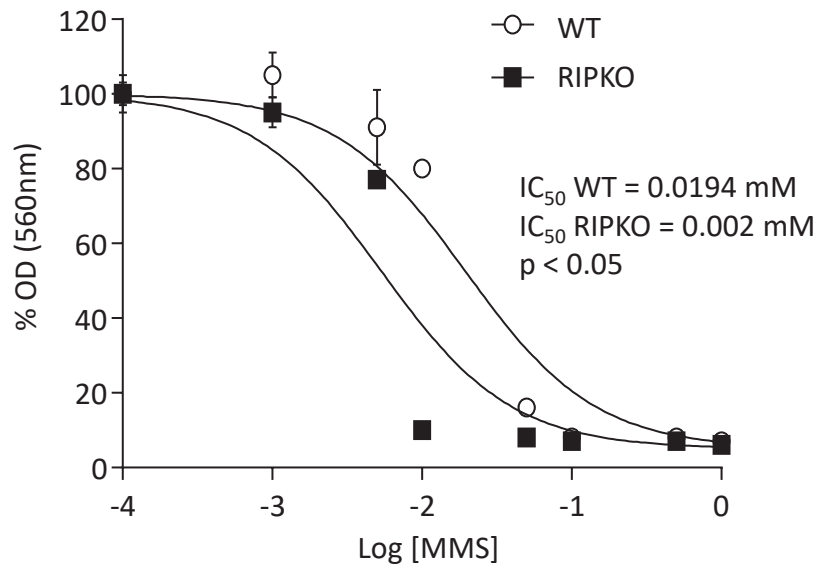
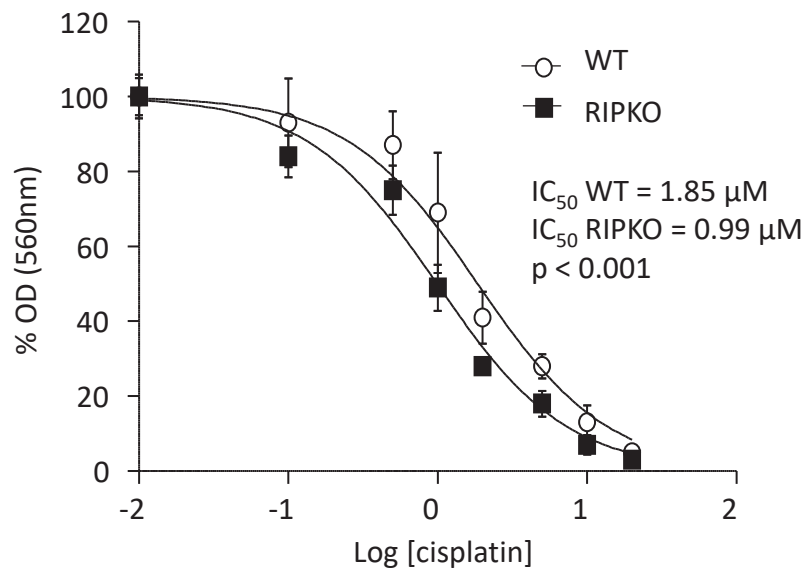
**RIP140 regulates the transcription of the POLK gene**

**Figure 2**

**A****B****C****D**

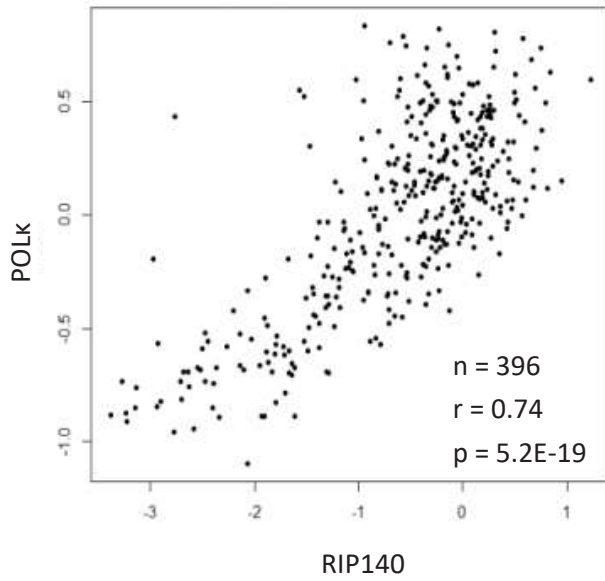
**Effect of the RIPMSI mutation  
on the expression of POLK**

**Figure 3**

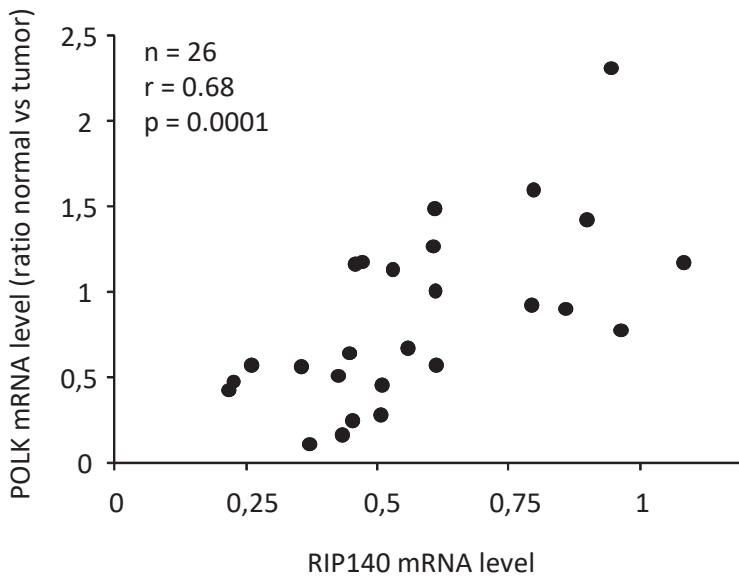
**A****B**

**RIP140 affects response to cytotoxic drugs**

**Figure 4**

**A****B**

	POLK	
	r	p
All samples (n=396)	0.74	5.2E-69
MSS samples (n=247)	0.78	9.7E-51
MSI samples (n=29)	0.76	1.6E-06

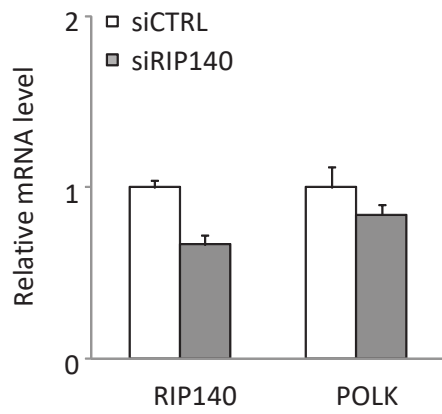
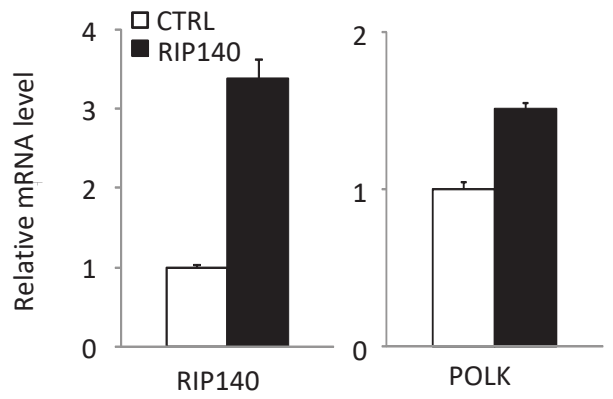
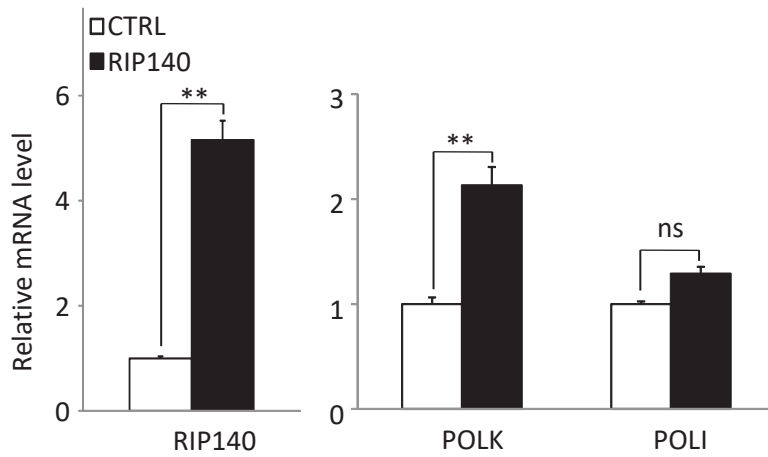
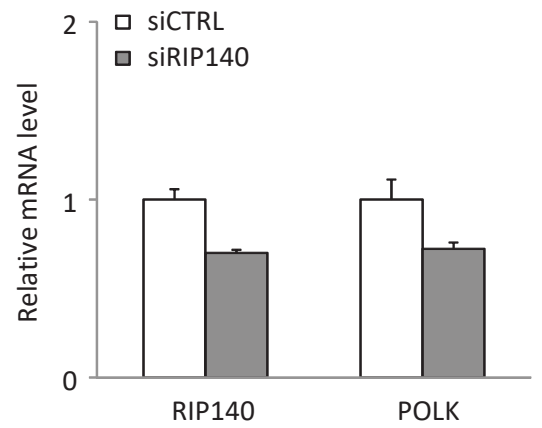
**C****D**

	POLK	
	r	p
All samples (n=415)	0,65	<2.2E-16
C1 group (n=46)	0,79	<9E-11
C2 group (n=75)	0,49	<7E-6
C3 group (n=66)	0,71	<2E-11
C4 group (n=51)	0,80	1,00E-12
C5 group (n=100)	0,47	<8E-7
C6 group (n=77)	0,72	<2E-13

**Correlation of RIP140 expression with POLK  
in human CRC tumors**

**Figure 5**

# Supplementary data

**A****B****C****D**

**Expression of POLK in human CRC cells**

**Figure S1**



<b>Molecular subgroups</b>	<b>Correlation coefficients</b>
<b>ALL</b>	<b>0,461</b>
<b>C1</b>	0,490
<b>C2</b>	0,526
<b>C3</b>	0,524
<b>C4</b>	0,286
<b>C5</b>	0,279
<b>C6</b>	0,696

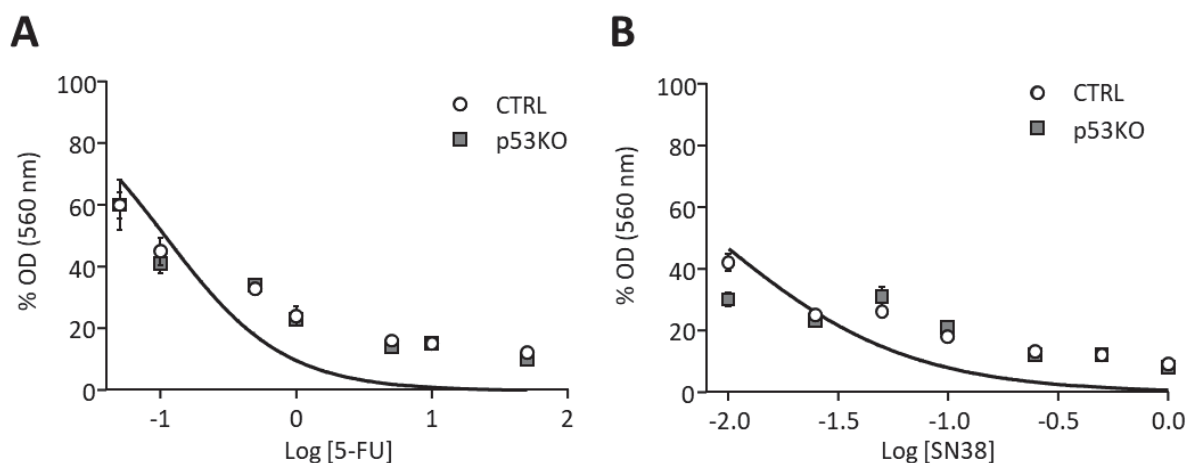
**Correlation of RIP140 expression with POLK  
in human CRC tumors**

**Figure S2**

### 2.3. Résultats annexes

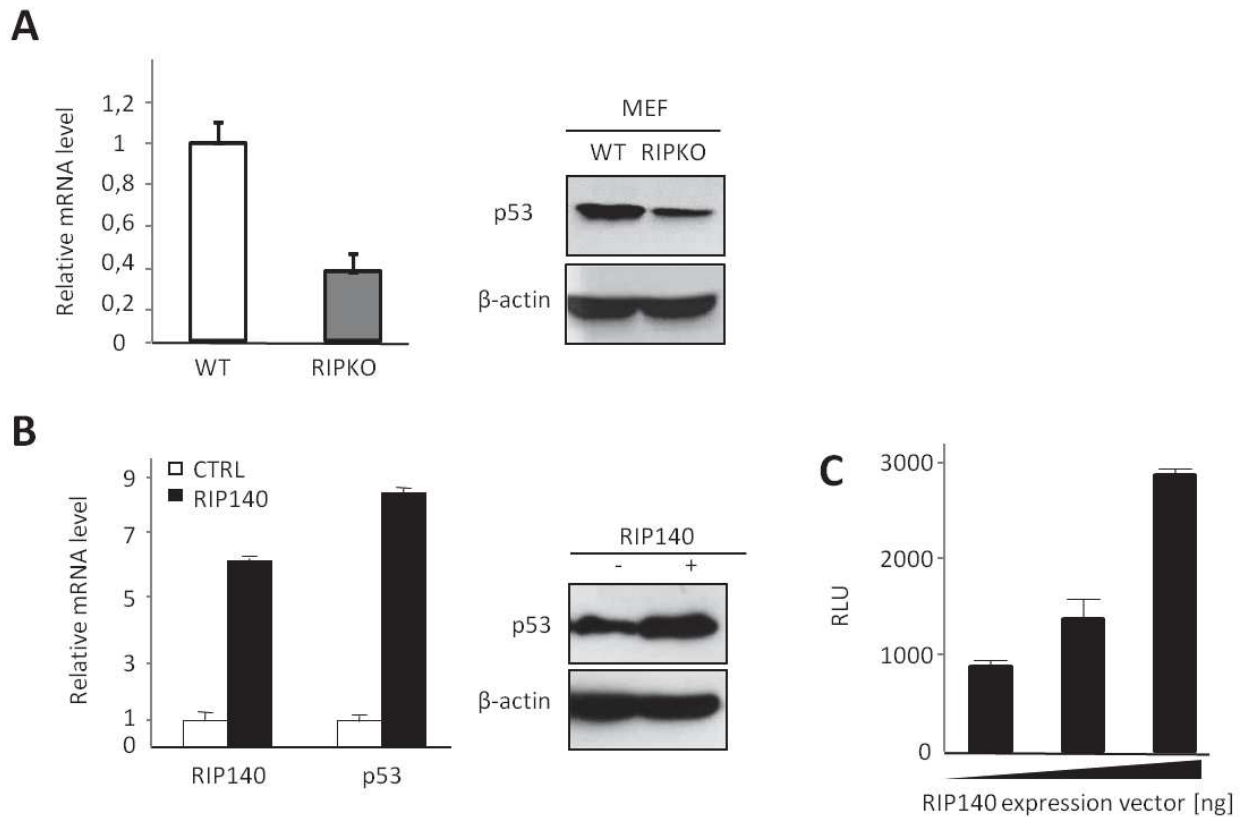
Nous avons vu dans la section 3.6.4 concernant les régulations de l'expression des polymérases translésionnelles, l'implication équivoque du facteur de transcription p53 dans la régulation de l'expression de *POLK*. Nos résultats suggèrent que la présence de p53 est importante au sein de cellules cancéreuses colorectales humaines (HCT116, dont le statut de p53 est sauvage), pour permettre l'effet positif de RIP140 sur l'expression de *POLK* au niveau transcriptionnel.

Nous avons testé la réponse de ces cellules (HCT116 CTRL et p53KO) à des doses croissantes de 5-FU et de SN38, selon le protocole préalablement décrit. Ces résultats préliminaires ne présentent pas de différence de sensibilité entre ces deux modèles, suggérant que le statut de p53 n'intervient pas de façon majeure dans les différences de sensibilité observées précédemment (Figure 38) (Netter et al., 2015).



**Figure 38 Courbes dose réponse des HCT116 CTRL et p53KO au 5-FU et au SN38**  
 Evaluation de la viabilité cellulaire des HCT116 CTRL et p53KO après exposition à des doses croissantes A) de 5-FU (0,05 à 50  $\mu$ M) et B) de SN38 (0,01 à 1  $\mu$ M).

Des résultats, non publiés, obtenus au sein de l'équipe illustrent une régulation positive de p53 par RIP140 (Figure 39).



**Figure 39 Régulation de l'expression de p53 par RIP140 dans différents modèles cellulaires**  
 A) Fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) transformées par l'oncogène RAS, WT et RIPKO et B) Cellules HCT116 surexprimant (RIP140) ou non (CTRL) RIP140. C) Activation du promoteur p53, contenant un gène rapporteur luciférase, par des doses croissantes d'un vecteur d'expression de RIP140.

Ces résultats représentent une voie d'explication des mécanismes qui sous-tendent les régulations positives observées de ces gènes.

**Partie 3**

**DEVELOPPEMENT**

**D'OUTILS**



### 3. Développement d'outils

#### 3.1. Introduction

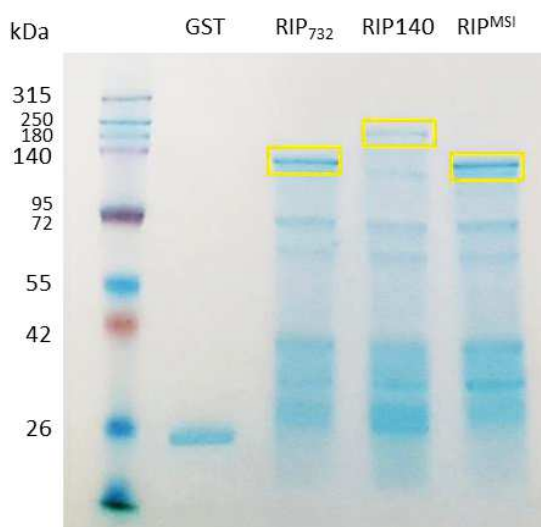
Nous avons décrit précédemment la mutation avec décalage du cadre de lecture de RIP140, nommée RIP<sup>MSI</sup>. La délétion d'une adénine au sein d'une séquence mononucléotidique entraîne un décalage du cadre de lecture, générant une protéine tronquée de 732 acides aminés au lieu de 1158. Cette forme mutée de RIP140 a été détectée dans une proportion non négligeable de CCR MSI sans mutation retrouvée des gènes MMR (16%). L'association de cette mutation à une diminution de la survie globale, ainsi que la perte de régulation positive observée des gènes MMR et de Polk, ont encouragé la volonté de développer un anticorps spécifique de la mutation RIP<sup>MSI</sup>. Cet outil permettrait de détecter la mutation au sein d'échantillons tumoraux tissulaires en IHC. Cette approche avait également pour but l'amélioration des outils anticorps commerciaux dont nous disposons pour RIP140. L'un de ces anticorps est spécifique de l'extrémité N-terminale (ab42125) et l'autre de l'extrémité C-terminale (ab42126), dont l'épitope est situé au-delà des 732 premiers acides aminés. RIP140 régule positivement l'expression des gènes *MSH2*, *MSH6* et *POLK*. L'instabilité microsatellitaire semble également varier selon le niveau d'expression de RIP140. Nous avons souhaité développer une lignée de CCR humain n'exprimant plus RIP140. Une invalidation complète, stable et durable de RIP140 apparaît être un outil utile pour étudier son rôle sur l'instabilité microsatellitaire au sein d'une lignée initialement stable. Pour ce faire, nous avons mis au point une expérience de CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palendromic Repeat – Cas9, CRISPR Associated protein*).

#### 3.2. Anticorps spécifique anti-RIP<sup>MSI</sup>

##### 3.2.1. Matériels et méthodes

Le décalage du cadre de lecture engendré par cette délétion entraîne, non seulement la génération d'un codon stop mais modifie également les quatre derniers acides aminés de la séquence protéique normale de RIP140 (motif RKLP). Cette modification de séquence a permis le développement d'un peptide purifié spécifique de la forme mutée. Nous disposons également de son homologue sauvage RIP<sub>732</sub>, dont le nombre d'acides aminés est équivalent à celui de la forme tronquée, mais dont la séquence est conforme à la séquence sauvage. Outre ces outils peptides purifiés que nous nous sommes procurés, nous avons généré des protéines de fusion avec la GST (*Gluthation S-Transférase*).

Pour cela, nous avons utilisé des vecteurs d'expression de type pGEX-RIP140FL, pGEX-RIP<sub>732</sub> et pGEX-RIP<sup>MSI</sup>. L'expression de protéines recombinantes par les bactéries transformées avec ces plasmides est induite par l'addition de 0,1 mM d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) lors de la phase exponentielle de croissance (évaluée par une densité optique à 600 nm comprise entre 0,4 et 0,6). Après 3h de culture à 37°C, les culots bactériens sont lysés et subissent une étape de sonication. Le surnageant est ensuite incubé toute une nuit à 4°C avec des billes de Glutathion Sépharose préalablement lavées, ce qui va permettre la fixation des protéines de fusion GST sur ces billes. Après lavage, les protéines fixées sur les billes seront éluées par une solution de Glutathion. Les éluats sont ensuite dialysés toute une nuit, puis dosés et déposés sur gel SDS-PAGE pour vérifier la production (Figure 40). La protéine de fusion GST-RIP<sup>MSI</sup> contient 959 acides aminés (de l'ATG de la GST au codon stop RIP<sup>MSI</sup>), soit une masse moléculaire estimée à 110kDa.



**Figure 40 Protéines de fusion à la GST**

Gel SDS-PAGE, 12%, coloré en bleu (PageBlue™, Protein Staining Solution). Migration des protéines fusionnées à la GST produites. De gauche à droite sur le gel, GST pure, GST-RIP<sub>732</sub>, GST-RIP<sub>140</sub> et GST-RIP<sup>MSI</sup> diluées au ½ dans du Laemmli 2X. Bandes des protéines attendues encadrées en jaune.

Les peptides et les protéines de fusion ont été transmis à la plateforme GenAc® de l'IRCM, spécialisée dans le développement d'anticorps thérapeutiques et de diagnostic. Afin de sélectionner des anticorps spécifiques, la technique du *Phage Display* est utilisée. Cette technique repose sur la propriété des bactériophages à exprimer des protéines à leur surface. Dans cet emploi particulier, ils vont exprimer une librairie « naïve » de scFv entièrement humains. Les scFv (*single chain variable fragment*) sont des protéines de fusion formées par la liaison des fragments variables des chaînes lourde et légère des immunoglobulines (Ig) par

un peptide de liaison. Elles conservent les spécificités de reconnaissance des Ig naturelles et sont beaucoup plus faciles à exprimer que des Ig entières. Une plaque est recouverte avec les peptides ou protéines purifiés d'intérêt (RIP140 et RIP<sup>MSI</sup>, dans notre cas). Cette plaque est ensuite incubée avec la librairie « naïve » de phages. Après plusieurs lavages, les phages sont élués et sont à nouveau utilisés pour infecter les bactéries permettant leur multiplication, avant d'être confrontés à un nouveau cycle de sélection. La première sélection des scFv est ensuite réalisée par ELISA. Les clones positifs en ELISA sont séquencés puis couplés à un fragment constant (Fc) humain ou de toute autre espèce (dans notre cas, lapin) (Figure 41).

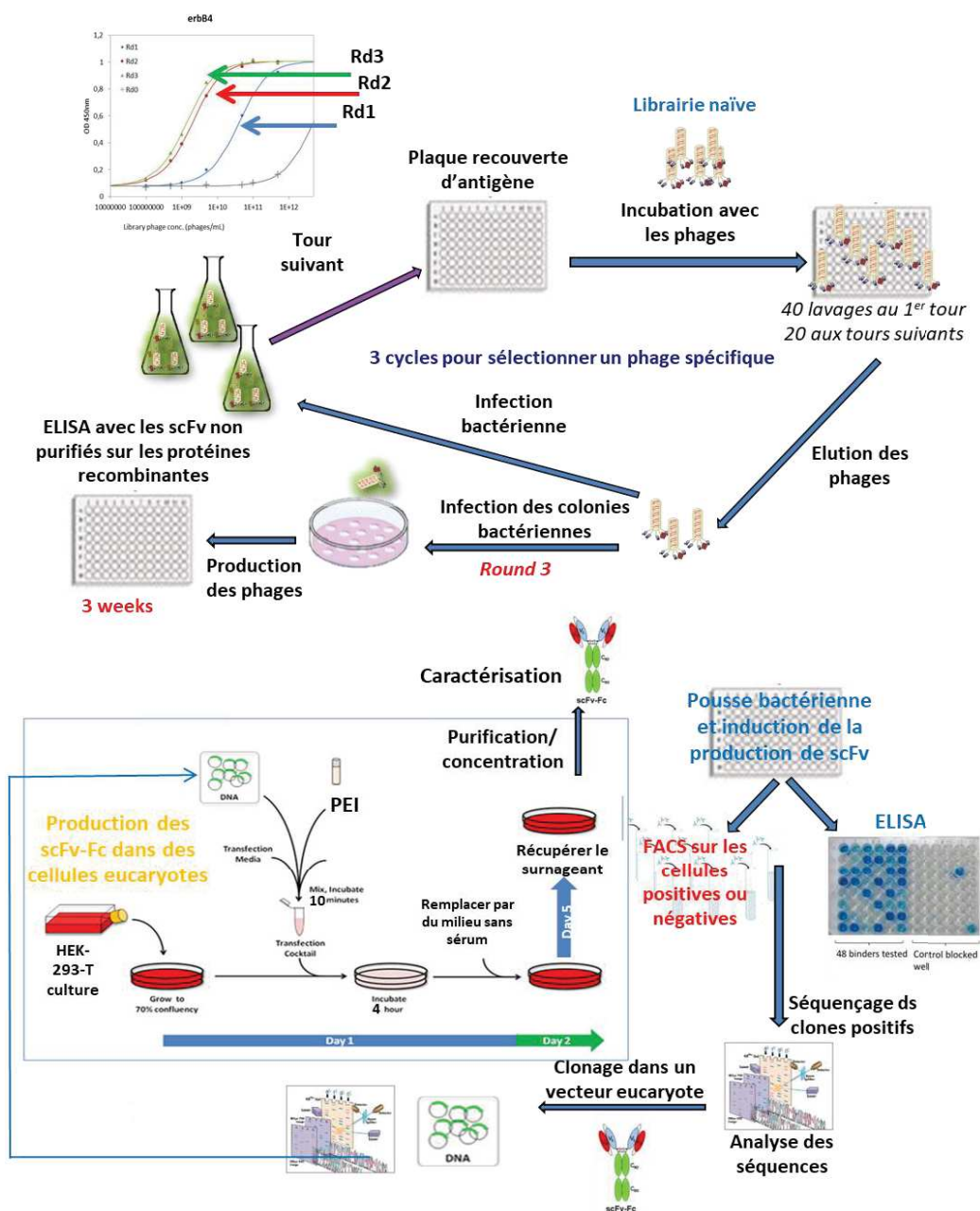
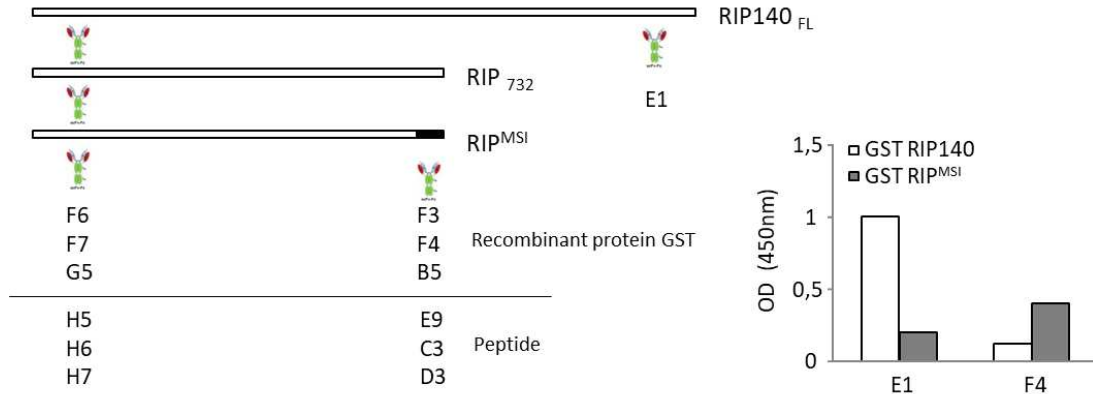


Figure 41 Processus de sélection des phages et production d'anticorps  
Schéma adapté de la plateforme GenAc®



Lors de la sélection ELISA, six anticorps spécifiques de l'extrémité C-terminale de la protéine RIP<sup>MSI</sup> ont été isolés, six spécifiques de l'extrémité N-terminale, non discriminante, et un spécifique de l'extrémité C-terminale de RIP140 (Figure 42).

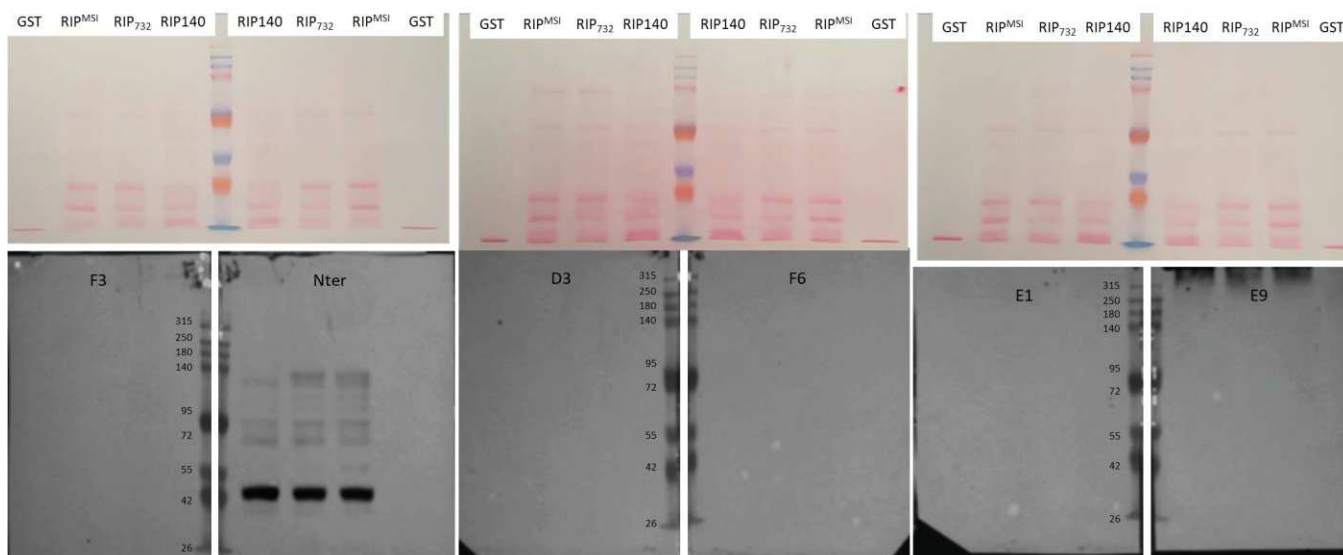


**Figure 42 Sélection des scFv anti-RIP140 et anti-RIP<sup>MSI</sup>**

Schéma des différents scFv sélectionnés en ELISA à partir des peptides purifiés et des protéines de fusion à la GST. Le graphique illustre le choix des scFv en fonction de leur spécificité de liaison par mesure de la densité optique à 450nm.

### 3.2.2. Résultats

La caractérisation des scFv-Fc générés appartient au laboratoire demandeur. Nous avons réalisé une expérience de Western Blot en utilisant les protéines de fusion avec la GST produites. Pour permettre le marquage des formes sauvage et mutée de RIP140, nous avons choisi d'utiliser l'anticorps commercial spécifique de l'extrémité N-terminale (ab42125), dont la concentration de marquage recommandée est de 0,6  $\mu\text{g/mL}$ . Les scFv-Fc ont en revanche été utilisés à une concentration 20 fois supérieure (12  $\mu\text{g/mL}$ ), les premiers tests effectués à 0,6 $\mu\text{g/mL}$  s'étant avérés infructueux. Nous n'observons cependant pas de marquage, malgré ces concentrations plus élevées, comme l'illustre la Figure 43, ci-dessous. La coloration au rouge Ponceau des membranes est affichée pour éliminer un problème de transfert des protéines.

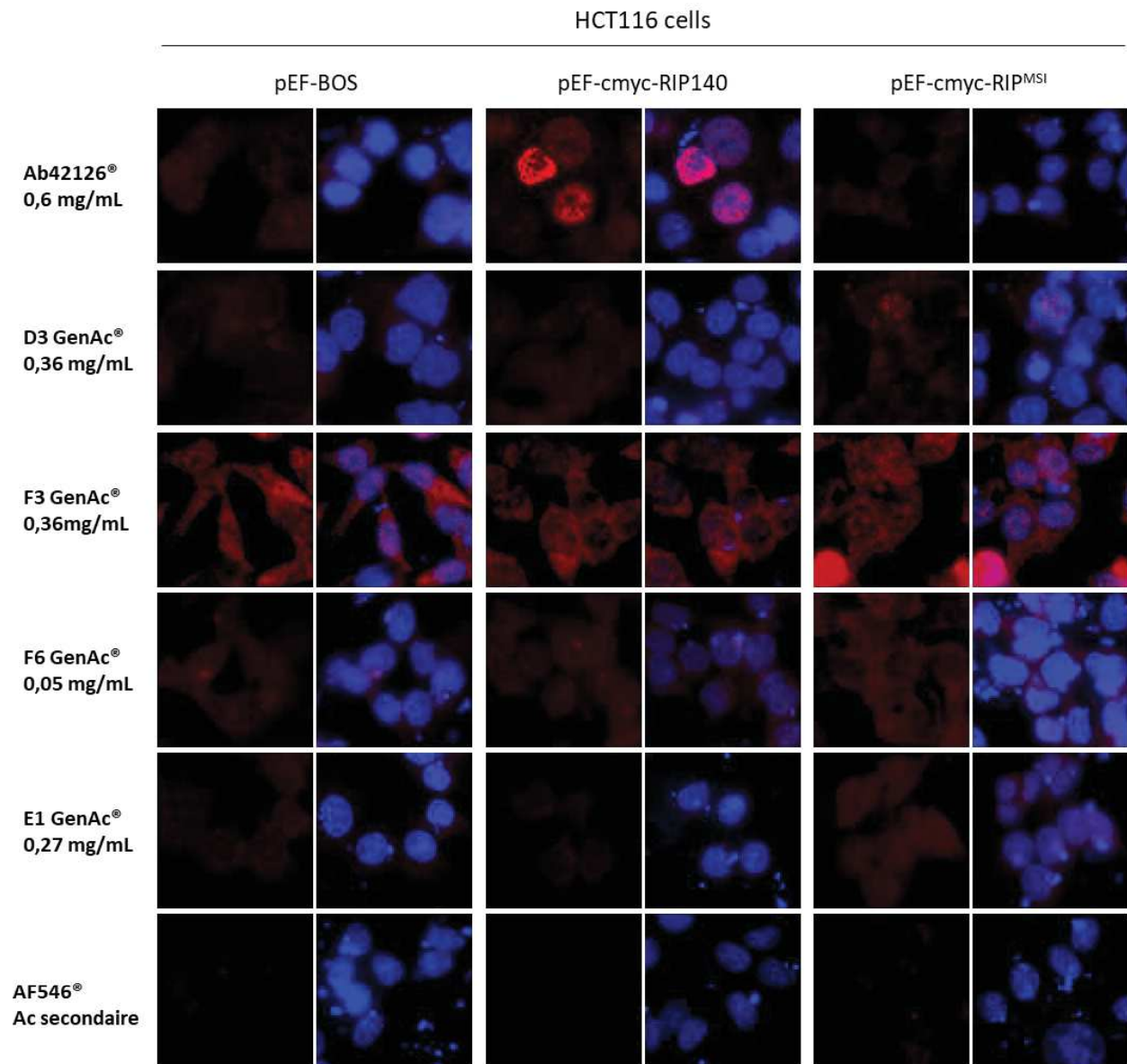


**Figure 43** Caractérisation des scFv-Fc en Western Blot des protéines fusionnées à la GST Gels SDS-PAGE à 10%. Les extraits protéiques sont déposés en miroir de part et d'autre du marqueur de poids moléculaire.

Il apparaît difficile de détecter la forme sauvage de RIP140, même avec l'anticorps commercial, qui permet néanmoins une détection correcte de la forme mutée RIP<sup>MSI</sup> et de son homologue de taille sauvage RIP732.

Par ailleurs, des cellules colorectales humaines HCT116 parentales ont été transfectées avec différents vecteurs d'expression, permettant d'exprimer de manière transitoire les formes sauvage (pEF-cmyc-RIP140) ou mutée (pEF-cmyc-RIP<sup>MSI</sup>) de RIP140 fusionnées à la protéine c-myc. Une condition contrôle consiste en la transfection d'un vecteur vide pEF-BOS. Une partie de ces cellules a permis de réaliser une expérience d'immunofluorescence

(IF) dans le but de comparer les signaux obtenus avec les scFv-Fc à celui de notre anticorps commercial, spécifique de l'extrémité C-terminale (ab42126) (Figure 44).



**Figure 44 Caractérisation des scFv-Fc en immunofluorescence**

Marquage des cellules HCT116 transfectées avec les vecteurs d'expression pEF-BOS, pEF-cmyc-RIP140 et pEF-cmyc-RIP<sup>MSI</sup> par chacun des 5 anticorps différents (5 µg/mL). 60.10<sup>4</sup> cellules sont ensemencées par puits et fixées 24h après ensemencement. Un marquage uniquement par l'anticorps secondaire (AF546® anti-rabbit) sert de contrôle dans chacune des conditions cellulaires.

Seule la condition transfectée avec la forme sauvage de RIP140 permet d'observer un signal avec l'anticorps ab42126, ce qui permet d'illustrer l'efficacité de la transfection, la spécificité de cet anticorps et sert de contrôle positif du marquage de RIP140. Le seul résultat qui apparaît potentiellement intéressant dans cette expérience est le signal obtenu dans la condition transfectée avec le plasmide pEF-cmyc-RIP<sup>MSI</sup> et marquée avec le scFv-Fc D3.

Cependant, ce résultat n'a pour le moment pas été reproduit. Le scFv-Fc F3 n'assure pas un marquage spécifique, en marquant toutes les conditions de la même façon. Le léger signal qui semble être perçu avec le scFv-Fc F6 n'est pas adéquat puisqu'il marque la condition pEF-cmyc-RIP<sup>MSI</sup> alors qu'il devrait être spécifique de la partie N-terminale de la protéine commune à toutes les formes de RIP140. Enfin, le scFv E1 ne devrait permettre la détection que de l'extrémité C-terminale, spécifique de la forme sauvage, or aucun signal n'est observé dans cette condition.

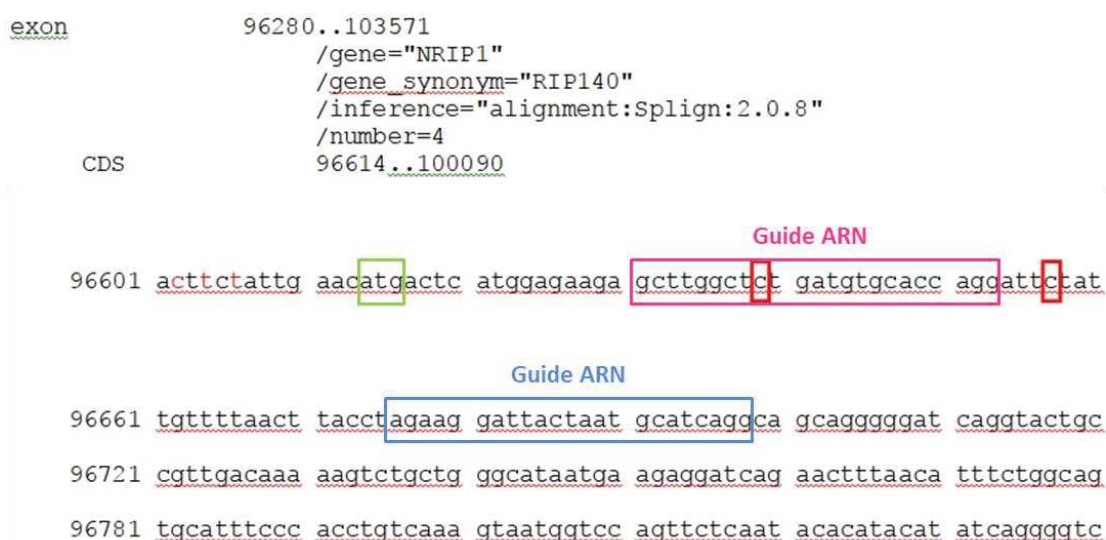
Les mêmes cellules transfectées ont été utilisées pour une analyse en Western Blot à partir d'extraits protéiques de cellules entières. Le marquage avec un anticorps anti-c-myc a permis de détecter la forme sauvage et la forme mutée de RIP140. Un marquage de RIP140 a été réalisé avec l'anticorps ab42126 permettant la détection, très légère, de la bande spécifique de RIP140. Le marquage avec les scFv-Fc n'a permis la détection d'aucun signal (données non montrées).

### **3.3. Invalidation de RIP140 par CRISPR-Cas9**

Le but de cette expérience était de créer une lignée cellulaire dont l'expression de RIP140 serait complètement abolie de manière stable. Pour cela nous avons mis au point la méthode la plus simple de l'expérience de CRISPR-Cas9 qui consiste à transfecter un vecteur codant une enzyme capable de générer une cassure double brin, après ciblage par un ARN guide, dans les 100 première paires de bases de la séquence codante du gène d'intérêt. Cette cassure double brin, si aucun brin modèle de réparation n'est fourni aux cellules, va être prise en charge par le système de jonction des extrémités non homologues (NHEJ). Ce système présente l'avantage d'intervenir très rapidement et les réparations qu'il effectue sont souvent mutagènes par les insertions ou délétions aléatoires qu'il engendre au cours de son activité de réparation. Ces propriétés mutagènes sont particulièrement recherchées dans l'expérience de CRISPR pour induire des insertions ou des délétions susceptibles de décaler le cadre de lecture et de générer un codon stop (Sander and Joung, 2014). Souhaitant tester l'hypothèse d'une induction de l'instabilité microsatellitaire par l'invalidation durable de l'expression de RIP140, nous avons réalisé cette expérience dans deux lignées MSS de CCR humain, les lignées HT29 et SW480.

### 3.3.1. Matériels et méthodes

Deux expériences ont été réalisées. Nous avons rapidement pris conscience que la ploïdie des cellules devait être prise en compte pour l'inactivation complète d'un gène, ce pourquoi les SW480 ne représentent pas un modèle idéal, étant données leur aneuploïdie et les additions chromosomiques qui affectent le chromosome 21. Nous avons déterminé deux ARN guide qui sont des séquences permettant de localiser la Cas9 à l'endroit souhaité (Figure 45). L'enzyme se fixe à l'ADN au niveau d'un motif trinucleotidique particulier de type NGG, accolé au guide, appelé séquence PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). La coupure est générée 3 à 4 nucléotides en amont de cette séquence PAM.



**Figure 45** Séquence codante du gène *RIP140* et positionnement des ARN guide

Extrait de la séquence codante de *RIP140*. Le codon d'initiation de la traduction est matérialisé par un cadre vert. Les cadres rouges matérialisent des polymorphismes nucléotidiques de la séquence de *RIP140* retrouvés par le séquençage des lignées HT29 et SW480.

Les ratios de transfection entre le vecteur codant la GFP-Cas9 et les guides ont été différents selon les transfections, mais le clone finalement caractérisé a été obtenu par un ratio (1/4 : 3/4). 24h après la transfection, les cellules sont sélectionnées et ensemencées, à raison d'une cellule par puits en plaque 96 puits, par tri FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*) sur la base du signal GFP fusionnée à la Cas9. Lorsque les clones commencent à croître, il est nécessaire de rapidement valider la perte de la protéine d'intérêt pour ne conserver qu'un minimum de clones inutiles. La détection de *RIP140* étant relativement mal aisée en WB, nous avons choisi l'immunofluorescence comme moyen de sélection des clones, en plaque 96 puits. Après avoir été sélectionnés sur la base d'une diminution du signal fluorescent, un séquençage des clones a été réalisé à partir de l'ADN génomique.

### 3.3.2. Résultats

Le caractère aléatoire des modifications produites par le système NHEJ ainsi que des défauts potentiels de l'expression du guide ARN, de la Cas9 ou encore du clivage engendré, laissent entrevoir les possibilités de génotypes pouvant résulter de cette expérience. Nous avons testé dans l'une de nos conditions, la transfection de deux guides ARN simultanément. Parmi les divers génotypes obtenus, certains clones présentent une délétion de la séquence comprise entre les deux guides avec conservation du cadre de lecture. Sur environ 200 clones sélectionnés, 55 ont été menés jusqu'au séquençage et 3 présentent des mutations bialléliques, avec décalage du cadre de lecture (Tableau 14).

Guide	Clones	Mutés	Mutation monoallélique dans le cadre de lecture	Mutation monoallélique avec décalage du cadre de lecture	Mutation biallélique identique dans le cadre de lecture	Mutation biallélique dont 1 seule entraîne un décalage	Mutation biallélique avec décalage du cadre de lecture
1	9	1	0	0	0	0	1
1+3	25	11	1	1	6	2	0
1	21	3	0	0	1	0	2
	55	15	1	1	7	2	3
			Hétérozygote WT Mutant	Hétérozygote WT Mutant de délétion	Mutants de délétion homozygotes	Mutants de délétion hétérozygotes	Perte totale de l'expression protéique

**Tableau 14 Résultats de séquençage des clones et phénotypes associés**

L'un d'eux présente une perte de 7 nucléotides, engendrant un codon stop et la production d'une protéine dont seuls les 26 premiers acides aminés sont communs à la forme sauvage de RIP140 (Figure 46).

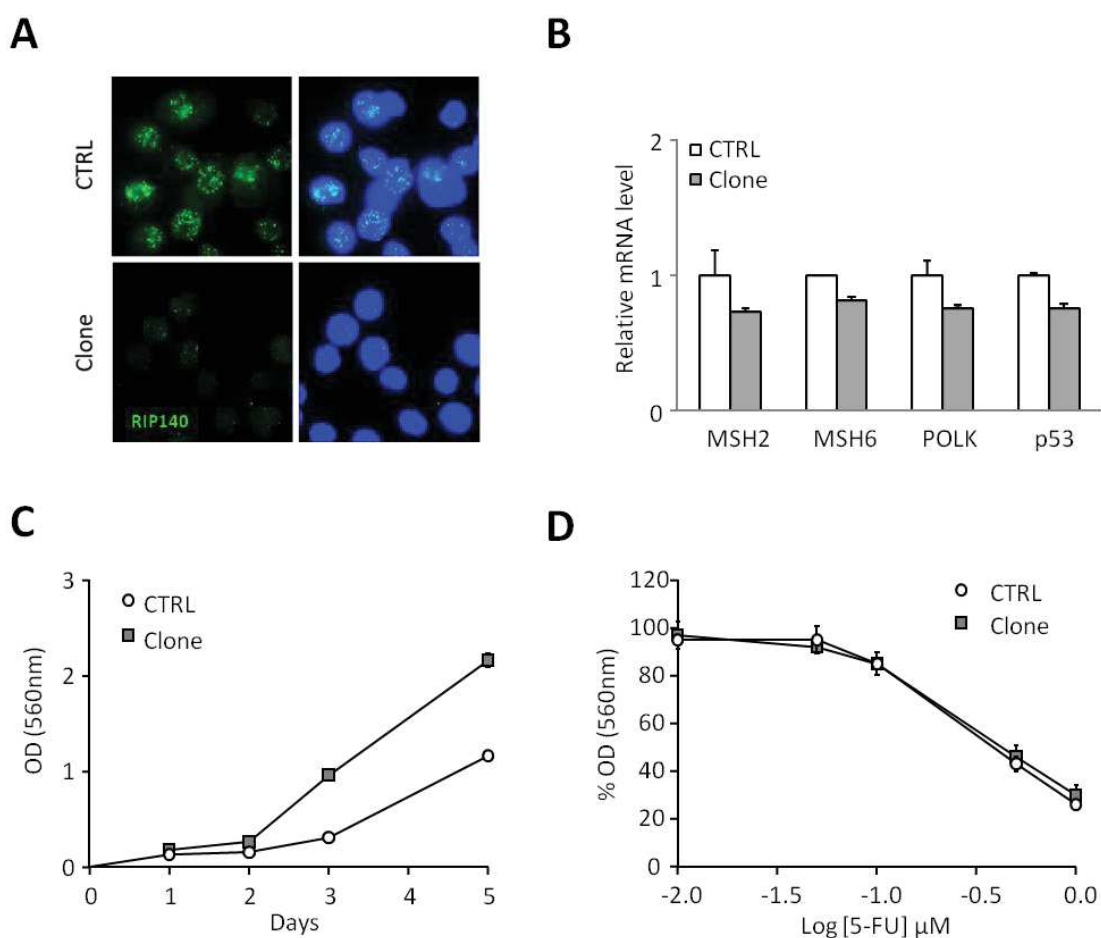
CTRL	TACCTAGAAGGATTACTAATGCATCAGGCAGCAGGGGGATCAGGTACTGCCGTT
Clone	TACCTAGAAGGATTACTAATGCA-----GCAGGGGGATCAGGTACTGCCGTT

**Figure 46 Validation d'un clone par séquençage**

Des tests ont été effectués afin de valider la perte d'expression protéique de RIP140. La Figure 47A permet d'observer une diminution importante du signal de RIP140 détecté avec le ab42126, spécifique de l'extrémité C-terminale. La quantification de l'expression de nos



gènes cible d'intérêt apparaît légèrement diminuée (Figure 47B). La prolifération plus soutenue de ce clone en comparaison au contrôle (Figure 47C) est en accord avec les effets attendus de RIP140. Cependant, l'analyse de l'instabilité microsatellitaire n'a montré aucune différence significative entre le clone et son contrôle, de même que la sensibilité au 5-FU (Figure 47D).



**Figure 47 Caractérisation d'un clone généré par CRISPR-Cas9**

A) Marquage de RIP140 avec l'anticorps spécifique de l'extrémité C-terminale (ab42126). B) Quantification de l'expression des gènes *MSH2*, *MSH6*, *POLK* et *p53* dans le clone et son contrôle. C) Courbe dose réponse du clone et du contrôle au 5-FU (0,01 à 10  $\mu$ M). D) Courbes de prolifération entre le clone et la condition contrôle.

Il semblerait que nous ayons généré un mutant, mais que l'expression de RIP140 ne soit pas complètement abolie, comme l'illustre le marquage résiduel en IF. Les effets modestes sur la régulation des gènes ou l'instabilité microsatellitaire évoquent plutôt les effets observés avec une diminution de l'expression de RIP140. Cela nous invite à penser à l'existence potentielle d'un ATG interne (séquence IRES, *Internal Ribosome Entry Site*) permettant la traduction d'un ARN messager de manière interne. De plus amples validations sont encore nécessaires pour caractériser ce clone.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES





## DISCUSSION

### 1. Mécanismes moléculaires des régulations mises en évidence

Par ces travaux de thèse, nous avons mis en évidence la régulation positive exercée par le corégulateur transcriptionnel RIP140 sur l'expression de gènes majeurs du système MMR, codant les protéines du complexe de reconnaissance MutS $\alpha$ . Ces résultats ont été renforcés par la corrélation positive de l'expression de ces différents gènes au sein des tumeurs colorectales humaines, quel que soit le sous-type moléculaire. Cette régulation d'expression s'accompagne d'une modification de la sensibilité à de nombreuses molécules cytotoxiques, notamment celles utilisées dans le traitement du cancer colorectal, ainsi que de variations de l'instabilité microsatellitaire. Il semblerait également que des niveaux d'expression différentiels de RIP140 puissent perturber d'autres paramètres contrôlés, au moins en partie par le système MMR, tels que l'instabilité chromosomique. Le phénotype d'instabilité microsatellitaire, retrouvé dans 15% des tumeurs colorectales, peut avoir de nombreuses causes, dont toutes ne sont pas aujourd'hui élucidées. Différents acteurs interviennent pour assurer le maintien de l'intégrité du génome, dont l'instabilité microsatellitaire est un défaut. Le système MMR est l'acteur majeur de la stabilité des régions microsatellitaires du génome, mais ce n'est pas le seul. Parmi les protagonistes de cette organisation complexe, la polymérase Polk joue un rôle certain. Nous avons également démontré sa régulation positive par RIP140 et leur corrélation d'expression. Des résultats préliminaires associent le facteur de transcription p53 comme une voie potentielle d'explication de ces effets positifs. Des études mécanistiques seront nécessaires pour décrypter les bases moléculaires qui sous-tendent ces régulations et les effets observés.

#### 1.1. Régulation transcriptionnelle des gènes MMR

Nous avons mis en évidence une régulation positive des gènes *MSH2* et *MSH6* exercée par RIP140 au niveau transcriptionnel. Cependant, il a été démontré que le promoteur du gène *MSH2*, de même que d'autres gènes de la réparation, présente un ou plusieurs sites de liaison du facteur de transcription AP-1. Ce facteur de transcription semble exercer une régulation positive transcriptionnelle du gène *MSH2* qui ne se traduit pas par une augmentation de l'expression du gène endogène (Humbert et al., 2003), contrairement à ce que nous observons lors d'une stimulation par RIP140, dans nos différents modèles. D'autre part, RIP140 est

capable d'inhiber la transcription dépendante d'AP-1 induite par les œstrogènes (Teyssier et al., 2003).

Par ailleurs, il a été démontré que l'expression de la protéine MSH2 est régulée positivement par E2F1, au travers de deux sites de fixation de ce facteur de transcription sur sa séquence promotrice. Le facteur E2F1 régule également positivement l'expression de nombreux gènes, comme la thymidylate synthase (TS), l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) et négativement l'expression d'autres gènes, comme le TGF $\beta$  (Polager et al., 2002). Or, RIP140 est capable de réprimer la transactivation du facteur de transcription E2F1 sur de nombreux promoteurs, inhibant ainsi l'expression de ses gènes cible (Docquier et al., 2010).

Nos résultats mettent en évidence l'importance d'autres éléments régulateurs présents au sein des promoteurs des gènes étudiés, tels que les facteurs Sp1, dans les régulations positives observées. Le rôle des facteurs AP-1 et E2F1, dont les effets transcriptionnels peuvent être régulés par RIP140, offrent des pistes intéressantes d'études mécanistiques. Ils pourraient atténuer les effets positifs de RIP140 sur l'expression du gène *MSH2*. Des expériences de ChIP sont actuellement en cours dans le but d'identifier le recrutement de RIP140 au sein des complexes régulateurs des promoteurs de ces gènes.

## **1.2. Autres mécanismes de régulation des gènes MMR**

Les micro-ARN sont impliqués dans la régulation de l'expression allélique et génique. Un autre niveau de contrôle, épigénétique, de l'expression des gènes MMR par RIP140 pourrait être intéressant à étudier. Il a été démontré que la surexpression du micro-ARN 155 (miR-155) diminue le niveau d'expression des protéines MSH2, MSH6 et MLH1, ce qui entraîne une instabilité microsatellitaire. Cela a été confirmé par la corrélation inverse, retrouvée dans des échantillons de CCR humains, entre le miR-155 et les protéines MLH1 et MSH2. Certaines tumeurs de phénotype MSI, sans altération des gènes MMR, présentent une surexpression du miR-155, bien que toutes les tumeurs avec une surexpression de ce miR ne soient pas de phénotype MSI (Valeri et al., 2010b). Il a été en outre démontré que le miR-155 est responsable d'une diminution de 50% de l'expression d'un allèle du gène *APC* et du *TGF $\beta$ RI*. Il pourrait être utile d'étudier l'effet de ce miR sur l'expression de RIP140 mais également l'influence potentielle de RIP140 sur l'expression de ce même micro-ARN.

Plus récemment, il a été démontré dans la lignée de CCR COLO205 que le récepteur ER $\beta$  est capable d'augmenter l'expression du gène *MLH1* et l'activité du système MMR, au travers d'une régulation du miR-135b (He et al., 2012). Il apparaît donc très intéressant d'étudier le rôle de RIP140 dans ces régulations, étant données ses interactions et son activité répressive sur les récepteurs des œstrogènes, en particulier avec le récepteur ER $\beta$  (Docquier et al., 2013). Nous aborderons plus en détail l'intérêt de la signalisation œstrogénique dans ces régulations au chapitre 5.

### **1.3. Régulation de l'expression du gène *POLK***

Nous avons mis en évidence une régulation transcriptionnelle positive de l'expression de la polymérase translésionnelle Polk par RIP140 et l'importance potentielle du facteur de transcription p53 dans cette régulation.

Ce facteur de transcription exerce des effets qui apparaissent contradictoires entre les régulations observées chez la souris et chez l'Homme. p53 semble stimuler positivement l'expression de *POLK* dans certains tissus et cellules murines (Velasco-Miguel et al., 2003), alors que d'autres rapportent une meilleure activité du promoteur *POLK* dans un contexte où p53 est invalidé (Wang et al., 2004). Dans nos mains, il semble que l'expression endogène de p53 soit importante pour la stimulation de l'expression du gène *POLK* ainsi que l'activation du promoteur en réponse à RIP140. Il est intéressant de relever que les effets répresseurs de p53 sur l'activité du promoteur *POLK* ont été mis en évidence par une surexpression ectopique de p53, alors que nous utilisons une lignée cellulaire de CCR HCT116, dont l'expression de p53 est invalidée de manière stable. En outre, les résultats de Wang et al. ont été mis en évidence dans des cellules de cancer du poumon, où *Polk* est généralement surexprimée, à la différence du cancer colorectal, où son expression est le plus souvent diminuée. Il serait intéressant de répéter nos expériences de transfections transitoires avec le promoteur *POLK* contenant un gène rapporteur luciférase en réponse à des doses croissantes d'un vecteur d'expression de RIP140, dans nos modèles cellulaires HCT116 WT ou p53KO, dans lesquels serait transfecté en parallèle un vecteur d'expression de p53. Cela permettrait de vérifier si l'activation du promoteur *POLK*, affectée dans le contexte p53KO, peut être restaurée par une surexpression ectopique de p53.

Une étude basée sur la caractérisation des éléments régulateurs du promoteur *POLK*, impliqués dans la diminution de son expression dans les cancers colorectaux, a mis en

évidence l'importance de facteurs dont l'activité est sensible à la trichostatine A (TSA), un inhibiteur des histones désacétylases de classe I et II (Lemée et al., 2007). Les facteurs de transcription tels que les protéines p53, Sp1, E2Fs, NF- $\kappa$ B, mais également RIP140 connu pour interagir avec ces dernières, sont sensibles à l'acétylation de lysines des histones permettant de réguler leurs effets sur l'expression des gènes. La TSA est susceptible de modifier l'action d'un facteur de transcription ou de moduler directement les modifications post-traductionnelles de CREB et Sp1, facteurs qui stimulent l'expression de Polk. Cela renforce l'intérêt d'études mécanistiques plus poussées du rôle de RIP140 dans ces régulations.

## **2. Sensibilité aux molécules cytotoxiques**

L'expression de RIP140 module la réponse cellulaire à différentes molécules cytotoxiques que nous attribuons, en partie, à ses effets sur l'expression des gènes MMR et de la polymérase Polk. Cependant, les capacités de reconnaissance croisées des dommages de l'ADN et les actions successives de plusieurs systèmes de réparation dans la gestion de lésions induites par un agent cytotoxique particulier, compliquent la relation directe entre la fonctionnalité d'un système et la réponse à ces agents. Les rôles ambivalents joués par le système MMR face aux molécules cytotoxiques assurant d'une part leur cytotoxicité, par l'induction des mécanismes de mort cellulaire, et d'autre part la mort cellulaire lors d'un défaut de réparation, compliquent encore cette relation de cause à effet.

### **2.1. Limites des approches mises en œuvre**

Les résultats obtenus à ce jour demeurent corrélatifs. Un défaut d'expression de RIP140 diminue l'expression de gènes majeurs de la reconnaissance de certaines lésions, elles-mêmes corrélées à une augmentation de la sensibilité des cellules à de nombreuses molécules cytotoxiques. Il serait pertinent de reproduire ces expériences en utilisant en parallèle de nos modèles de surexpression de RIP140, des approches de diminution transitoire, simultanée ou séquentielle, de l'expression des gènes *MSH2*, *MSH6* et *POLK*, par technique de *siRNA*. Cela permettrait d'établir un lien causal entre les régulations de l'expression de ces gènes par RIP140 et la sensibilité aux molécules testées.

Il apparaît également pertinent de relever qu'aucun modèle cellulaire n'est idéal, la lignée cancéreuse colorectale humaine HCT116, par sa faible expression endogène de RIP140, a

permis le développement d'un modèle de surexpression ectopique stable. Cette lignée est de phénotype MSI, avec une mutation du gène *MLH1*, mais elle présente l'avantage d'avoir un statut sauvage de p53, qui semble important dans les régulations exercées par RIP140. Les résultats obtenus, de modifications de sensibilité à des molécules cytotoxiques dans ces modèles, doivent être pondérés au regard des altérations préexistantes susceptibles de modifier leur sensibilité. Néanmoins, ces résultats ont été confirmés en utilisant la lignée colorectale humaine MSS, SW480, dépourvue de mutation des gènes MMR, mais dont le statut de p53 est muté. Enfin, les fibroblastes embryonnaires murins, malgré le modèle d'inactivation totale de RIP140 qu'ils représentent, demeurent un modèle artificiel et éloigné de la pathologie humaine.

## **2.2. Sensibilité aux molécules utilisées dans le traitement du CCR**

L'intégration de ce sujet à une forte problématique clinique, nous a conduits à tester en priorité les molécules utilisées dans le traitement du cancer colorectal.

La confrontation de nos résultats à l'efficacité des molécules cytotoxiques dans le traitement du CCR, en fonction du statut MMR, bien que nécessaire, est parfois délicate. Des études montrent qu'un système MMR déficient est associé à une plus grande sensibilité au FOLFOX (5-FU et Oxaliplatine), au SN38, et que l'adjonction d'oxaliplatine permet de compenser la perte de sensibilité au 5-FU liée à un défaut du système MMR (Park et al., 2013b; Tougeron et al., 2016; Zaanan et al., 2011). Un défaut du système MMR ne permet pas, à lui seul, d'expliquer toutes les différences de sensibilité observées, qui peuvent également être des conséquences des mutations secondaires induites par un dysfonctionnement de ce système. Il apparaît intéressant d'évoquer le phénomène de létalité synthétique, qui implique la perte de fonctionnalité d'un système de secours dans la prise en charge de lésions (Nickoloff et al., 2017). Au travers de la dérégulation de plusieurs systèmes impliqués dans la prise en charge de dommages de l'ADN, RIP140 pourrait avoir des conséquences, sur la sensibilité à certaines molécules, différentes de l'inactivation isolée d'un gène particulier.

### 2.3. Réponse à d'autres agents cytotoxiques

De nouvelles expériences de cytotoxicité sont en cours, utilisant des molécules connues pour impliquer plus directement les systèmes étudiés (Christmann and Kaina, 2013).

#### *Agents alkylants*

Nous avons décrit l'importance du système MMR et de Polk dans la prise en charge des lésions O<sup>6</sup>-méthylguanine. Polk exerce un effet protecteur partiel de la cytotoxicité des lésions O<sup>6</sup>-MG, dépendante du système MMR. Elle permet, en effet, de restaurer l'intégrité des duplexes par l'insertion d'une cytosine face à la guanine méthylée, évitant les cycles futiles du système MMR qui conduisent à la mort cellulaire (Lupari et al., 2012). Il en est de même pour la prise en charge d'un autre type de lésion alkylante plus volumineuse l'O<sup>6</sup>-carboxyméthylguanine (O<sup>6</sup>-CMG), produite par la nitrosation des acides biliaires dans le tractus gastrointestinal, qui apparaît importante dans la carcinogenèse (Räz et al., 2016). Il a été mis en évidence que Polk était impliquée dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN induits par le méthanesulfonate de méthyle (MMS) (Wit et al., 2015). Un défaut de la polymérase Polk serait impliqué dans l'augmentation de sensibilité des cellules au MMS, sachant que l'expression de *POLH* (Polη), exerçant des fonctions redondantes dans le dépassement des lésions induites par le MMS, ne semble pas modifiée par les dérégulations d'expression de RIP140. La différence de sensibilité à cette molécule des cellules MEF WT et RIPKO est en cours de confirmation au sein des cellules de CCR humain (HCT116 GFP *versus* HCT116 RIP140).

#### *Benzo[a]Pyrène (B[a]P) et Benzo[a]pyrene-diol-epoxide (BPDE)*

Il a été démontré que Polk est capable de dépasser les adduits formés par le B[a]P sur les guanines, évitant ainsi la formation de mutations au niveau des lésions générées (Jha et al., 2016b; Ogi et al., 2002). En effet, l'expression de *POLK* apparaît significativement augmentée 12 et 24h après traitement par le BPDE (métabolite actif du B[a]P) (Zhu et al., 2012). Les facteurs de transcription impliqués dans l'augmentation de l'expression du gène *POLK* en réponse au BPDE demeurent inconnus. Une étude effectuée dans des cellules humaines pré-B a démontré les effets protecteurs de Polk en réponse à la toxicité et à la mutagenèse induite par le BPDE (Kanemaru et al., 2017). Aussi, apparaît-il intéressant de tester la réponse de nos modèles cellulaires au BPDE et d'étudier l'importance de l'effet de RIP140 sur l'expression de *POLK* en réponse à ce toxique (Christmann et al., 2016).

### 3. Conséquences sur la stabilité du génome

#### *Instabilité microsatellitaire*

La surexpression stable de RIP140 dans une lignée cellulaire de CCR MSI diminue le niveau d'instabilité microsatellitaire de ces cellules. Nous avons souhaité développer une lignée de CCR MSS n'exprimant plus la protéine RIP140 de manière durable par CRISPR-Cas9 afin de confirmer cet effet par la mise en évidence de l'apparition d'une instabilité microsatellitaire dans ce modèle. Les résultats obtenus à ce jour avec l'outil développé ne nous ont pas permis d'observer cet effet.

Cependant, d'autres approches sont envisageables pour valider l'effet de RIP140 sur l'instabilité microsatellitaire. La construction d'un plasmide hétéroduplexe contenant un mésappariement dans la séquence codant la GFP (*Green Fluorescent Protein*) permet d'analyser la fonctionnalité du système MMR. La présence d'un point de coupure dirige la réparation du système sur le brin contenant la base mal incorporée (Lei et al., 2004) (Zhou et al., 2009). Cette expérience qui repose sur la restauration de la fluorescence des cellules MMRp, transfectées avec ce plasmide, pourrait s'avérer intéressante à mettre en œuvre dans des modèles cellulaires où l'expression de RIP140 est augmentée ou invalidée.

#### *Phénotype hypermutateur*

L'analyse du phénotype mutateur peut être un autre moyen d'étudier la fonctionnalité de systèmes impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome. Cette expérience consiste à observer l'émergence de clones résistants à la 6-thioguanine (6-TG), après avoir inhibé l'expression de la MGMT et supprimé les mutants endogènes de l'enzyme HPRT (*Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase*). La croissance de clones résistants indique la réapparition de mutants HPRT qui peut être due, notamment, à la déficience du système MMR (Fang et al., 2015; Houlleberghs et al., 2016). Ce test, en cours de mise au point dans nos modèles cellulaires colorectaux, permettrait d'évaluer la mutagenèse et par voie de conséquence la fonctionnalité des différents systèmes impliqués (Li et al., 2016). L'effet protecteur de Polk sur la mutagenèse induite après une exposition au B[a]P a notamment été évalué par cette technique (Ogi et al., 2002).

#### *Stabilité chromosomique*

L'importance du système MMR et notamment de la fonctionnalité de la protéine MSH2 dans le maintien de la stabilité chromosomique a été rapportée (Campbell et al., 2006). En effet, l'utilisation de fibroblastes embryonnaires murins primaires, dont l'expression de *MSH2*



a été invalidée (*MSH2*<sup>-/-</sup>), a permis de mettre en évidence une augmentation de l'aneuploïdie, des cassures de chromatides et des aberrations chromosomiques. Il nous a semblé intéressant d'étudier les effets de l'invalidation de RIP140 au sein de nos fibroblastes embryonnaires murins qui présentent une expression réduite de *MSH2* (mais aussi *MSH6*, *POLK*, *MSH3* et *PMS2*) sur ces paramètres chromosomiques (données non montrées). Des étalements métaphasiques ont été réalisés avec les MEFs WT et RIPKO qui, du fait de leur immortalisation, ne constituent pas le meilleur outil d'étude chromosomique. Bien que toutes aneuploïdes, le nombre de chromosomes des MEF RIPKO apparaît cependant plus élevé que celui des WT, avec un plus grand nombre de chromatides cassées détectées. Ces expériences ont été renouvelées avec des MEFs primaires sauvages (WT), présentant une invalidation hétérozygote ou homozygote de RIP140. Leur caryotype apparaît haploïde et les MEFs RIPKO semblent présenter à nouveau plus de cassures de chromatides et un aspect général des chromosomes altéré en comparaison aux deux autres conditions. RIP140 pourrait ainsi participer, au travers ou non de la régulation des gènes MMR, au maintien de la stabilité chromosomique. D'autres expériences seront nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires.

#### **4. Autres effecteurs de RIP140 dans la réparation de l'ADN**

Les régulations que nous observons sont modestes et nous attribuons leur impact à l'addition des effets qu'elles peuvent avoir. D'autres gènes impliqués dans la réparation de l'ADN pourraient également être des cibles transcriptionnelles de RIP140.

Les gènes codant les polymérase répliquatives Pol $\epsilon$  et Pol $\delta$  font partie des cibles potentielles. En effet, des mutations germinales de ces polymérase ont été rapportées comme des causes de prédisposition aux CCR sporadiques (Palles et al., 2013). Des études ont également mis en évidence l'importance de mutations somatiques des sites exonucléasiques de ces polymérase, comme une voie d'explication de certains syndromes apparentés au syndrome de Lynch (LLS). Cette perte de fonction de relecture pourrait entraîner une perte de l'activité du système MMR et l'instabilité microsatellitaire (Elsayed et al., 2015; Jansen et al., 2015).

L'analyse combinée des statuts mutationnels somatiques et germinaux des gènes associés au CCR, a permis d'identifier les mutations, vraisemblablement causales, de 86% des cas de LLS présentant une déficience MSH2. Elles correspondent à des mutations somatiques des gènes MMR, de l'H3K36 triméthyltransférase SETD2 ou du domaine exonucléasique des polymérases répliquatives (Vargas-Parra et al., 2017). Cependant, ces mutations ne permettent pas d'expliquer tous les cas de LLS, laissant la place à l'étude d'autres gènes susceptibles d'engendrer ces défauts d'expression.

Nous avons donc également analysé l'expression de gènes majeurs d'autres systèmes de réparation dans nos modèles d'étude. De manière intéressante, il semblerait que les gènes *ATM* et *ATR* soient sensiblement régulés par RIP140 et ce, quelle que soit la condition cellulaire testée. Cela confirme l'intérêt d'étudier d'autres régulations permettant d'expliquer les phénomènes observés.

Le système MMR constitue une cible directe ou indirecte des œstrogènes. Ils peuvent avoir des effets protecteurs sur l'instabilité microsatellitaire, perdus lorsque le système MMR est défectueux, mais également des effets carcinogéniques, capables d'inactiver le système MMR et d'engendrer de l'instabilité microsatellitaire. Cette instabilité peut être la cause de mutations de cofacteurs importants dans la signalisation œstrogénique, la perturbant en retour.

RIP140 a été initialement identifié comme un corépresseur de la voie de signalisation œstrogénique ER $\alpha$  dans les cellules de cancer du sein (Cavaillès et al., 1995) et de la signalisation ER $\beta$  dans les cellules cancéreuses ovariennes (Docquier et al., 2013). De manière intéressante, la signalisation par ER $\alpha$  affecte la réponse aux dommages de l'ADN à de nombreux niveaux (Caldon, 2014) (Figure 48). Ces phénomènes favorisent la prolifération et peuvent affecter la réponse aux traitements hormonaux et à la chimiothérapie. Il a été mis en évidence que les fonctions de la protéine ATR peuvent être inhibées par ER $\alpha$  (Pedram et al., 2009). Le récepteur ER $\alpha$  est, en outre, capable de réprimer la transcription dépendante de p53, au travers du recrutement de corépresseurs ou par la répression de ses gènes cible (Lewandowski et al., 2005; Bailey et al., 2012; Shirley et al., 2009). De plus, la protéine régulatrice MDM2 peut s'associer avec ER $\alpha$  dans un complexe ternaire incluant p53, ce qui inhibe l'activité du récepteur ER $\alpha$  (Duong et al., 2007; Brekman et al., 2011).

RIP140 pourrait réprimer les effets inhibiteurs du récepteur ER $\alpha$  sur l'expression d'effecteurs majeurs de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, participant ainsi plus largement au maintien de l'intégrité du génome, au-delà de ses effets sur les gènes MMR et Polk.

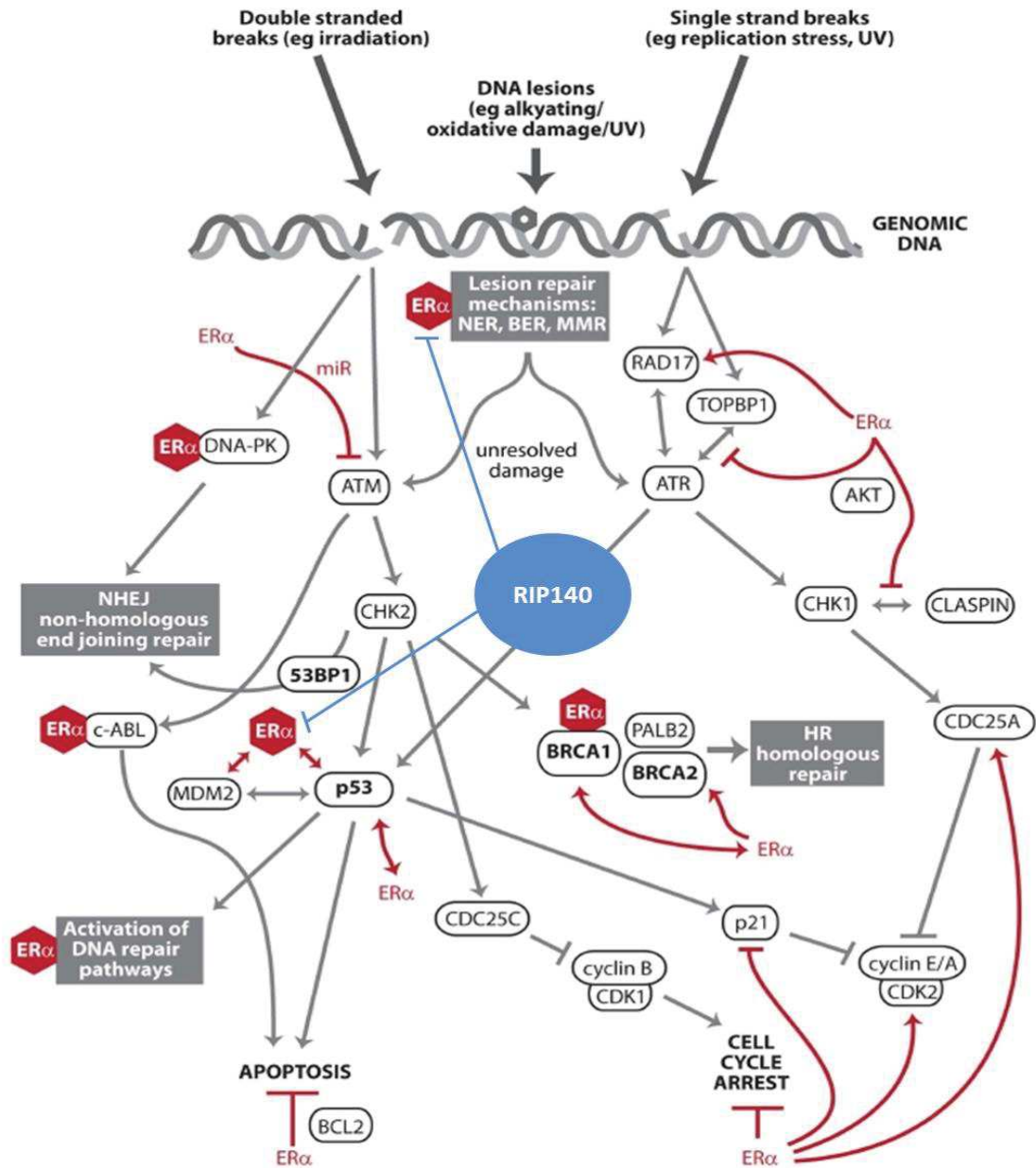


Figure 48 Réponse aux dommages, réparation de l'ADN et signalisation ERα  
Adapté de (Caldon, 2014)

Un autre niveau de dialogue entre les ERs et le système MMR, dans lequel RIP140 pourrait intervenir, est soutenu par la mise en évidence du rôle de la protéine MSH2 en tant que coactivateur du récepteur ERα. Le récepteur ERα se lierait à MSH2 au niveau de son domaine d'interaction avec MSH6 ou MSH3 (Wada-Hiraike et al., 2005). La proximité de localisation que nous avons observée entre RIP140 et MSH2 (Figure 37) permet d'envisager leur présence dans un même complexe régulateur.

## 5. Rôle de RIP140 dans le lien entre œstrogènes, MMR et syndrome de Lynch

Nous avons décrit précédemment des associations qui placent la voie de signalisation ER comme un effecteur potentiel des effets observés de RIP140 sur la réparation de l'ADN. D'autres liens existent entre la signalisation œstrogénique et la tumorigenèse de cancers appartenant au spectre du syndrome de Lynch, dans lesquels RIP140 pourrait s'inscrire.

### 5.1. Dans le cancer colorectal

Des effets protecteurs des œstrogènes ont été rapportés dans le CCR, au travers de la signalisation ER $\beta$ , majoritaire dans la muqueuse intestinale (Hasson et al., 2014). Des diminutions de la prolifération et de l'instabilité microsatellitaire de lignées de CCR ont été expliquées par l'induction positive de l'expression du gène *MLH1* par les œstrogènes (E2), au travers d'éléments de réponse présents dans sa séquence promotrice (Lu et al., 2017). Cependant, une diminution de la signalisation ER $\beta$  ne semble pas avoir de valeur pronostique chez les patients atteints de CCR (Pérez-Ruiz et al., 2017). La signalisation ER des CCR apparaît inversement corrélée à la présence d'instabilité microsatellitaire. Les CCR de phénotype MSI sont généralement caractérisés par un meilleur pronostic et une meilleure survie globale. Il semblerait que dans le cas particulier des CCR MSI, la signalisation œstrogénique soit inversement associée à la survie (Liu, 2016). Une explication possible de ces corrélations observées est que la voie de signalisation ER exerce des effets différents sur la survie cellulaire, en fonction du statut MSS ou MSI de la tumeur, ce qui est soutenu par des études *in vitro* sur des lignées de CCR (Hartman et al., 2009).

### 5.2. Dans les cancers gynécologiques

Les tumeurs ovariennes et endométriales font partie du spectre du syndrome de Lynch et des défauts d'expression des gènes MMR expliquent certaines formes héréditaires de ces cancers (Kobayashi et al., 2013). A l'inverse, l'association entre le cancer du sein et le syndrome de Lynch a été décrite, même si elle reste controversée (Walsh et al., 2010; Lotsari et al., 2012), (Win et al., 2013).

D'autre part, de hauts niveaux d'œstrogènes favorisent la prolifération cellulaire et l'apparition de dommages de l'ADN, dont les cellules se protégeraient par une augmentation

de l'expression et de l'activité du système MMR (Miyamoto et al., 2006). Cependant, les effets des œstrogènes peuvent varier en fonction de l'organe considéré et de la présence relative de différents corégulateurs transcriptionnels. L'expression de RIP140 est, elle-même, finement régulée par les œstrogènes dans des boucles de rétrocontrôle (Augereau et al., 2006a) et pourrait intervenir dans cette régulation positive du système MMR.

Un lien entre la résistance à l'hormonothérapie utilisée dans le traitement du cancer du sein (toutes classes confondues, 20% des cancers ER+) et la perte d'un complexe MutL (MLH1/3, PMS1/2) a été récemment mis en évidence. Le taux élevé de mutations de ces cancers ER+ et leur mauvais pronostic suggèrent des défauts de la réparation de l'ADN (Haricharan et al., 2017). Il serait intéressant d'étudier les effets potentiels de RIP140 sur la réponse à l'hormonothérapie des cellules de cancer du sein ER+, au travers des régulations des gènes MMR.

## **6. La mutation $RIP^{MSI}$ dans les pathologies tumorales**

### **6.1. Mise en évidence et pertinence clinique**

Nous avons identifié une mutation de RIP140, présente dans une proportion non négligeable de tumeurs colorectales MSI, apparentées au syndrome de Lynch. Cette mutation perturbe la régulation positive de l'expression des gènes *MSH2*, *MSH6* et *POLK*. Elle pourrait de cette façon initier ou aggraver l'instabilité microsatellitaire. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons testé l'instabilité microsatellitaire des lignées murines où nous avons surexprimé de manière stable les formes sauvages et mutées de RIP140, en utilisant des marqueurs déjà décrits (Woerner et al., 2015). L'absence d'un contrôle MSS ne nous a pas permis, à ce jour, de mettre en évidence de différence significative entre nos différentes lignées murines. Des modèles de surexpression stable de la forme mutée de RIP140 dans des lignées de CCR sont en cours de génération.

Cette mutation de RIP140 semble corrélée à une diminution de la survie globale des patients, qui demeure toutefois à confirmer dans une plus grande cohorte. Cela est cohérent avec l'augmentation connue de ce type de mutations (avec décalage du cadre de lecture) des CCR MSI, associée à la progression tumorale. Ces mutations affectent fréquemment des gènes impliqués dans l'instabilité microsatellitaire (*MSH3*, *MSH6*) ou d'autres voies majeures de la tumorigenèse. Les régulations positives exercées par RIP140 sur l'expression des gènes MMR et de la polymérase translesionnelle Polk nous invitent à penser qu'une perte de cette

régulation positive, due à la mutation RIP<sup>MSI</sup>, pourrait provoquer ou aggraver le phénomène d'instabilité microsatellitaire. De la même manière que certains gènes MMR, RIP140 serait alors à la fois une cause et une cible de cette instabilité.

## **6.2. Autres moyens de détection de la mutation de RIP140**

Le développement d'un anticorps spécifique de la forme mutée RIP<sup>MSI</sup> apparaissait très utile pour permettre sa détection au sein d'échantillons tissulaires tumoraux. Cependant, les efforts réalisés dans ce sens n'ont pas permis, pour le moment, l'obtention d'un tel outil. Cela peut s'expliquer par l'antigénicité limitée de cette mutation. Il semble intéressant de reproduire les expériences qui ont été conduites en augmentant les concentrations utilisées des scFv-Fc, sûrement trop faibles en raison d'une quantité limitée fournie. Nous envisageons également de reproduire des protéines de fusion purifiées, en vue d'une nouvelle sélection de phages, plus stricte encore.

D'autres options de détection indirecte de la mutation RIP<sup>MSI</sup> nous apparaissent envisageables. Comme nous l'avons précédemment discuté, l'instabilité microsatellitaire engendre un grand nombre de mutations d'insertion/délétion entraînant souvent un décalage du cadre de lecture, de gènes dont la séquence codante contient des microsatellites (Duval and Hamelin, 2002). Les nouveaux peptides générés peuvent ne pas être reconnus par le complexe majeur d'histocompatibilité et être immunogènes. Il a été démontré que l'infiltration lymphocytaire (LT, CD3+) de la tumeur est associée au nombre de mutations avec décalage du cadre de lecture et de nouveaux peptides générés (Tougeron et al., 2009). Plus récemment, le profil d'expression de cytokines impliquées dans la réponse immunitaire de type T<sub>H1</sub> et le recrutement de LT mémoires a été démontré (Boissière-Michot et al., 2014). Cette réponse immunitaire adaptative est détectable chez les patients qui présentent un CCR avec une forte instabilité microsatellitaire, mais également chez les porteurs sains d'une mutation d'un des gènes du système MMR (Reuschenbach et al., 2010). Le peptide RIP<sup>MSI</sup> pourrait être utilisé pour mettre en évidence, directement dans le sérum des patients, la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre cette forme tronquée de RIP140. Cette détection utilisant la technique d'ELISA indirect pourrait représenter une alternative au développement d'un anticorps.



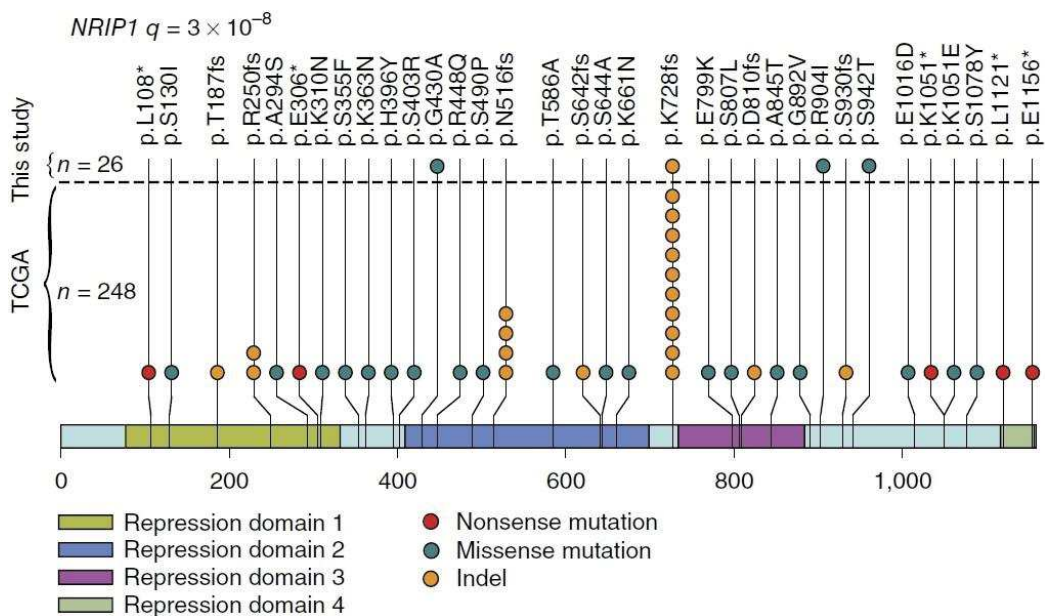
### 6.3. La mutation RIP<sup>MSI</sup> dans les cancers

Il apparaît intéressant de relever que la mutation RIP<sup>MSI</sup> a été mise en évidence dans 7% des CCR MSI-H (n = 46) (Mori et al., 2001), mais également dans 12,5% des cas de tumeurs gastriques MSI-H (n = 18). Sur la totalité des loci analysés, la séquence microsatellitaire de RIP140 appartient aux 43 loci les plus fréquemment mutés (Mori et al., 2002).

Ces résultats ont été confirmés par la recherche étendue de gènes cible d'une déficience du système MMR dans des échantillons de tumeurs MSI-H de l'endomètre (n = 42), de CCR (n = 40) et gastriques (n = 15). La mutation RIP<sup>MSI</sup> est retrouvée respectivement dans 34%, 22% et 13% des cas (Ferreira et al., 2014). Cette étude révèle *RIP140* comme étant le gène le plus fréquemment muté dans les cancers de l'endomètre avec instabilité microsatellitaire, affectant des voies majeures impliquées dans leur développement.

Le séquençage global de l'exome de 98 biopsies de tumeurs de l'endomètre a permis d'identifier la mutation RIP<sup>MSI</sup> dans 12,5% des cas (Gibson et al., 2016) (Figure 49). La plupart ont été retrouvées dans des tumeurs MSI (soit chez 20% des patientes MSI), où les altérations de RIP140 semblent être des mutations prépondérantes de l'oncogénèse endométriale.

Une réanalyse récente des données du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) a permis de mettre en évidence que 14% des tumeurs colorectales MSI présentent cette mutation de RIP140 (Gibson et al., 2016).



**Figure 49 Mutations de RIP140 détectées dans les tumeurs de l'endomètre**  
(Gibson et al., 2016)

#### **6.4. Autres altérations connues du gène RIP140**

Un nombre croissant d'études rapportent l'importance de mutations de RIP140 dans différentes pathologies, cancéreuses ou non, et leurs effets délétères. Ainsi, une mutation hétérozygote dominante semble être responsable du syndrome congénital associant des anomalies rénales et du tractus urinaire (CAKUT, *Congenital anomalies of the kidney and urinary tract*) (Vivante et al., 2017).

Par ailleurs, de nombreux polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) de RIP140 ont été décrits. Les conséquences phénotypiques de certains de ces polymorphismes, associés à des pertes ou des altérations de fonction de RIP140, ont été validées (obésité, dépression) (Horikoshi et al., 2016; Song et al., 2013). L'un de ces SNP, correspondant au remplacement d'une arginine (R) par une glycine (G) en position 448 (R448G), a été mis en évidence comme étant un facteur de prédisposition de l'endométriose (Caballero et al., 2005). Il a été observé au sein de l'équipe que ce SNP entraîne une perte de l'activité transrépressive du domaine RD2 qui semble être liée à une altération du recrutement des CtBPs (données non publiées). Ce polymorphisme fait partie des SNPs associés les plus significativement au cancer du poumon (Rudd et al., 2006). D'autres SNPs de RIP140 ont été associés à des cancers du sein dépendant des hormones (Ghoussaini et al., 2012), où l'expression de RIP140 est connue pour être significativement plus importante que dans les tumeurs ER négatives (Reyal et al., 2008).

## **CONCLUSION**

Pour conclure ce travail, RIP140 contrôle l'expression de gènes majeurs impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces régulations positives est aujourd'hui requise. Une mutation de ce corégulateur transcriptionnel perturbe ces régulations, affectant ainsi la stabilité du génome, alors même que d'autres mutations responsables ne sont pas identifiées. Des études cliniques sur des cohortes plus conséquentes sont désormais nécessaires pour valider son intérêt en tant que marqueur utilisable dans la prise en charge des patients.





# BIBLIOGRAPHIE



## BIBLIOGRAPHIE

Aaltonen, L.A., Peltomäki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin, J.P., Järvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., and Hamilton, S.R. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260, 812–816.

Adams, J.M., and al. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324–1337.

Alberts, S.R., Sargent, D.J., Nair, S., Mahoney, M.R., Mooney, M., Thibodeau, S.N., Smyrk, T.C., Sinicrope, F.A., Chan, E., Gill, S., et al. (2012). Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 307, 1383–1393.

André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., et al. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2343–2351.

André, T., de Gramont, A., Vernerey, D., Chibaudel, B., Bonnetain, F., Tijeras-Raballand, A., Scriver, A., Hickish, T., Tabernero, J., Van Laethem, J.L., et al. (2015). Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 4176–4187.

Augereau, P., Badia, E., Fuentes, M., Rabenoelina, F., Corniou, M., Derocq, D., Balaguer, P., and Cavailles, V. (2006a). Transcriptional regulation of the human NRIP1/RIP140 gene by estrogen is modulated by dioxin signalling. *Mol. Pharmacol.* 69, 1338–1346.

Augereau, P., Badia, E., Carascossa, S., Castet, A., Fritsch, S., Harmand, P.-O., Jalaguier, S., and Cavailles, V. (2006b). The nuclear receptor transcriptional coregulator RIP140. *Nucl. Recept. Signal.* 4, e024.

Aune, D., Lau, R., Chan, D.S.M., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., and Norat, T. (2011). Nonlinear reduction in risk for colorectal cancer by fruit and vegetable intake based on meta-analysis of prospective studies. *Gastroenterology* 141, 106–118.

Aziz, M.H., Chen, X., Zhang, Q., DeFrain, C., Osland, J., Luo, Y., Shi, X., and Yuan, R. (2015). Suppressing NRIP1 inhibits growth of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* 6, 39714–39724.

Bailey, S.T., Shin, H., Westerling, T., Liu, X.S., and Brown, M. (2012). Estrogen receptor prevents p53-dependent apoptosis in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 18060–18065.

Bakry, D., Aronson, M., Durno, C., Rimawi, H., Farah, R., Alharbi, Q.K., Alharbi, M., Shamvil, A., Ben-Shachar, S., Mistry, M., et al. (2014). Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 50, 987–996.

Barault, L., Veyrie, N., Jooste, V., Lecorre, D., Chapusot, C., Ferraz, J.-M., Lièvre, A., Cortet, M., Bouvier, A.-M., Rat, P., et al. (2008). Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K

(phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int. J. Cancer* 122, 2255–2259.

Bardella, C., Dettori, D., Olivero, M., Coltella, N., Mazzone, M., and Di Renzo, M.F. (2007). The therapeutic potential of hepatocyte growth factor to sensitize ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 2191–2198.

Barnes, R., and Eckert, K. (2017). Maintenance of Genome Integrity: How Mammalian Cells Orchestrate Genome Duplication by Coordinating Replicative and Specialized DNA Polymerases. *Genes* 8.

Barnes, R.P., Hile, S.E., Lee, M.Y., and Eckert, K.A. (2017). DNA polymerases eta and kappa exchange with the polymerase delta holoenzyme to complete common fragile site synthesis. *DNA Repair* 57, 1–11.

Beishline, K., and Azizkhan-Clifford, J. (2015). Sp1 and the “hallmarks of cancer.” *FEBS J.* 282, 224–258.

Benson, A.B., Schrag, D., Somerfield, M.R., Cohen, A.M., Figueredo, A.T., Flynn, P.J., Krzyzanowska, M.K., Maroun, J., McAllister, P., Van Cutsem, E., et al. (2004). American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22, 3408–3419.

Berger, C., Qian, Y., and Chen, X. (2013). The p53-estrogen receptor loop in cancer. *Curr. Mol. Med.* 13, 1229–1240.

Bergoglio, V., Bavoux, C., Verbiest, V., Hoffmann, J.-S., and Cazaux, C. (2002). Localisation of human DNA polymerase kappa to replication foci. *J. Cell Sci.* 115, 4413–4418.

Bergoglio, V., Boyer, A.-S., Walsh, E., Naim, V., Legube, G., Lee, M.Y.W.T., Rey, L., Rosselli, F., Cazaux, C., Eckert, K.A., et al. (2013). DNA synthesis by Pol  $\eta$  promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *J. Cell Biol.* 201, 395–408.

Bertagnolli, M.M., Niedzwiecki, D., Compton, C.C., Hahn, H.P., Hall, M., Damas, B., Jewell, S.D., Mayer, R.J., Goldberg, R.M., Saltz, L.B., et al. (2009). Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 1814–1821.

Bétous, R., Rey, L., Wang, G., Pillaire, M.-J., Puget, N., Selves, J., Biard, D.S.F., Shin-ya, K., Vasquez, K.M., Cazaux, C., et al. (2009). Role of TLS DNA polymerases eta and kappa in processing naturally occurring structured DNA in human cells. *Mol. Carcinog.* 48, 369–378.

Bétous, R., Pillaire, M.-J., Pierini, L., van der Laan, S., Recolin, B., Ohl-Séguy, E., Guo, C., Niimi, N., Grúz, P., Nohmi, T., et al. (2013). DNA polymerase  $\kappa$ -dependent DNA synthesis at stalled replication forks is important for CHK1 activation. *EMBO J.* 32, 2172–2185.

Bhonde, M.R., Hanski, M.-L., Stehr, J., Jebautzke, B., Peiró-Jordán, R., Fechner, H., Yokoyama, K.K., Lin, W.-C., Zeitz, M., and Hanski, C. (2010). Mismatch repair system decreases cell survival by stabilizing the tetraploid G1 arrest in response to SN-38. *Int. J. Cancer NA-NA.*

- Biertümpfel, C., Zhao, Y., Kondo, Y., Ramón-Maiques, S., Gregory, M., Lee, J.Y., Masutani, C., Lehmann, A.R., Hanaoka, F., and Yang, W. (2010). Structure and mechanism of human DNA polymerase  $\epsilon$ . *Nature* *465*, 1044–1048.
- Bisgaard, M.L., Fenger, K., Bülow, S., Niebuhr, E., and Mohr, J. (1994). Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum. Mutat.* *3*, 121–125.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 611–622.
- Blondrath, K., Steel, J.H., Katsouri, L., Ries, M., Parker, M.G., Christian, M., and Sastre, M. (2016). The nuclear cofactor receptor interacting protein-140 (RIP140) regulates the expression of genes involved in A $\beta$  generation. *Neurobiol. Aging* *47*, 180–191.
- Bocangel, D., Sengupta, S., Mitra, S., and Bhakat, K.K. (2009). p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer Res.* *29*, 3741–3750.
- Bohgaki, T., and al. (2010). DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome Integr.* *1*, 15.
- Boissière-Michot, F., Lazennec, G., Frugier, H., Jarlier, M., Roca, L., Duffour, J., Du Paty, E., Laune, D., Blanchard, F., Le Pessot, F., et al. (2014). Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Oncoimmunology* *3*, e29256.
- Boland, C.R. (2005). Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Fam. Cancer* *4*, 211–218.
- Boland, C.R. (2013). The mystery of mismatch repair deficiency: lynch or lynch-like? *Gastroenterology* *144*, 868–870.
- Boland, C.R. (2016). Recent discoveries in the molecular genetics of Lynch syndrome. *Fam. Cancer*.
- Boland, C.R., and Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* *138*, 2073–2087.e3.
- Boland, C.R., and Troncale, F.J. (1984). Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann. Intern. Med.* *100*, 700–701.
- Bonadona, V., Bonaïti, B., Olschwang, S., Grandjouan, S., Huiart, L., Longy, M., Guimbaud, R., Buecher, B., Bignon, Y.-J., Caron, O., et al. (2011a). Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* *305*, 2304–2310.
- Bonadona, V., Bonaïti, B., Olschwang, S., Grandjouan, S., Huiart, L., Longy, M., Guimbaud, R., Buecher, B., Bignon, Y.-J., Caron, O., et al. (2011b). Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *305*, 2304–2310.

- Booth, C., and Potten, C.S. (2000). Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J. Clin. Invest.* *105*, 1493–1499.
- Borgdorff, V., Pauw, B., van Hees-Stuivenberg, S., and de Wind, N. (2006). DNA mismatch repair mediates protection from mutagenesis induced by short-wave ultraviolet light. *DNA Repair* *5*, 1364–1372.
- Boyer, A.-S., Grgurevic, S., Cazaux, C., and Hoffmann, J.-S. (2013). The human specialized DNA polymerases and non-B DNA: vital relationships to preserve genome integrity. *J. Mol. Biol.* *425*, 4767–4781.
- Boyle, T., Keegel, T., Bull, F., Heyworth, J., and Fritschi, L. (2012). Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* *104*, 1548–1561.
- Bozic, I., Antal, T., Ohtsuki, H., Carter, H., Kim, D., Chen, S., Karchin, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Nowak, M.A. (2010). Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18545–18550.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 208–219.
- Brégeon, D., and Doetsch, P.W. (2011). Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 218–227.
- Brekman, A., Singh, K.E., Polotskaia, A., Kundu, N., and Bargonetti, J. (2011). A p53-independent role of Mdm2 in estrogen-mediated activation of breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res. BCR* *13*, R3.
- Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2013). Colorectal cancer. *Lancet*.
- Bridge, G., Rashid, S., and Martin, S.A. (2014). DNA mismatch repair and oxidative DNA damage: implications for cancer biology and treatment. *Cancers* *6*, 1597–1614.
- Brown, J.A., Fowler, J.D., and Suo, Z. (2010). Kinetic basis of nucleotide selection employed by a protein template-dependent DNA polymerase. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 5504–5510.
- Brown, K.D., Rathi, A., Kamath, R., Beardsley, D.I., Zhan, Q., Mannino, J.L., and Baskaran, R. (2003). The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. *Nat. Genet.* *33*, 80–84.
- Buchanan, D.D., Rosty, C., Clendenning, M., Spurdle, A.B., and Win, A.K. (2014). Clinical problems of colorectal cancer and endometrial cancer cases with unknown cause of tumor mismatch repair deficiency (suspected Lynch syndrome). *Appl. Clin. Genet.* *7*, 183–193.
- Burns, J.A., Dreij, K., Cartularo, L., and Scicchitano, D.A. (2010). O6-methylguanine induces altered proteins at the level of transcription in human cells. *Nucleic Acids Res.* *38*, 8178–8187.
- Caldon, C.E. (2014). Estrogen signaling and the DNA damage response in hormone dependent breast cancers. *Front. Oncol.* *4*, 106.

- Campbell, M.R., Wang, Y., Andrew, S.E., and Liu, Y. (2006). Msh2 deficiency leads to chromosomal abnormalities, centrosome amplification, and telomere capping defect. *Oncogene* 25, 2531–2536.
- Candeil, L., Gourdier, I., Peyron, D., Vezzio, N., Copois, V., Bibeau, F., Orsetti, B., Scheffer, G.L., Ychou, M., Khan, Q.A., et al. (2004). ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int. J. Cancer* 109, 848–854.
- Carethers, J.M., and Stoffel, E.M. (2015). Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J. Gastroenterol.* WJG 21, 9253–9261.
- Castet, A., Boulahtouf, A., Versini, G., Bonnet, S., Augereau, P., Vignon, F., Khochbin, S., Jalaguier, S., and Cavailles, V. (2004). Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res.* 32, 1957–1966.
- Castet, A., Herledan, A., Bonnet, S., Jalaguier, S., Vanacker, J.-M., and Cavailles, V. (2006). Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes. *Mol. Endocrinol.* Baltim. Md 20, 1035–1047.
- Cavaillès, V., Dauvois, S., L’Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., and Parker, M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* 14, 3741–3751.
- Cejka, P., Stojic, L., Mojas, N., Russell, A.M., Heinemann, K., Cannavó, E., di Pietro, M., Marra, G., and Jiricny, J. (2003). Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *EMBO J.* 22, 2245–2254.
- Chahwan, R., Edelmann, W., Scharff, M.D., and Roa, S. (2011). Mismatch-mediated error prone repair at the immunoglobulin genes. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 65, 529–536.
- Chahwan, R., Edelmann, W., Scharff, M.D., and Roa, S. (2012). AIDing antibody diversity by error-prone mismatch repair. *Semin. Immunol.* 24, 293–300.
- Chan, A.T., Giovannucci, E.L., Meyerhardt, J.A., Schernhammer, E.S., Wu, K., and Fuchs, C.S. (2008). Aspirin dose and duration of use and risk of colorectal cancer in men. *Gastroenterology* 134, 21–28.
- Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., and Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS One* 6, e20456.
- de la Chapelle, A., and Hampel, H. (2010). Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 3380–3387.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726–730.



- Cheadle, J.P., and Sampson, J.R. (2007). MUTYH-associated polyposis--from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA Repair* 6, 274–279.
- Chen, J., and Sadowski, I. (2005). Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4813–4818.
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., and Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer* 9, 785–797.
- Choi, J.-Y., Lim, S., Kim, E.-J., Jo, A., and Guengerich, F.P. (2010). Translesion synthesis across abasic lesions by human B-family and Y-family DNA polymerases  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ , and REV1. *J. Mol. Biol.* 404, 34–44.
- Christian, M., Tullet, J.M.A., and Parker, M.G. (2004). Characterization of four autonomous repression domains in the corepressor receptor interacting protein 140. *J. Biol. Chem.* 279, 15645–15651.
- Christian, M., Kiskinis, E., Debevec, D., Leonardsson, G., White, R., and Parker, M.G. (2005). RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9383–9391.
- Christmann, M., and Kaina, B. (2013). Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res.* 41, 8403–8420.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., and Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193, 3–34.
- Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W.P., and Kaina, B. (2011). O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* 1816, 179–190.
- Christmann, M., Boisseau, C., Kitzinger, R., Berac, C., Allmann, S., Sommer, T., Aasland, D., Kaina, B., and Tomicic, M.T. (2016). Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations. *Nucleic Acids Res.* 44, 10727–10743.
- Cohen, S.J. (2005). Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer--more than skin deep. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 5374–5385.
- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* 10, 51–57.
- Colle, R., Cohen, R., Cochereau, D., Duval, A., Lascols, O., Lopez-Trabada, D., Afchain, P., Trouilloud, I., Parc, Y., Lefevre, J.H., et al. (2017). Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. *Bull. Cancer (Paris)* 104, 42–51.
- Coolbaugh-Murphy, M.I., Xu, J.-P., Ramagli, L.S., Ramagli, B.C., Brown, B.W., Lynch, P.M., Hamilton, S.R., Frazier, M.L., and Siciliano, M.J. (2010). Microsatellite instability in the peripheral blood leukocytes of HNPCC patients. *Hum. Mutat.* 31, 317–324.

- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1509–1517.
- De Biasio, A., and Blanco, F.J. (2013). Proliferating cell nuclear antigen structure and interactions: too many partners for one dancer? *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* *91*, 1–36.
- Devaud, N., and Gallinger, S. (2013). Chemotherapy of MMR-deficient colorectal cancer. *Fam. Cancer* *12*, 301–306.
- Diamant, N., Hendel, A., Vered, I., Carell, T., Reissner, T., de Wind, N., Geacinov, N., and Livneh, Z. (2012). DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle and exhibits differential mutagenicity. *Nucleic Acids Res.* *40*, 170–180.
- Diderich, K., Alanazi, M., and Hoeijmakers, J.H.J. (2011). Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. *DNA Repair* *10*, 772–780.
- Dijksterhuis, J.P., Petersen, J., and Schulte, G. (2014). WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 1195–1209.
- Dingler, F.A., Kemmerich, K., Neuberger, M.S., and Rada, C. (2014). Uracil excision by endogenous SMUG1 glycosylase promotes efficient Ig class switching and impacts on A:T substitutions during somatic mutation. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1925–1935.
- Docquier, A., Harmand, P.-O., Fritsch, S., Chanrion, M., Darbon, J.-M., and Cavaillès, V. (2010). The transcriptional coregulator RIP140 represses E2F1 activity and discriminates breast cancer subtypes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 2959–2970.
- Docquier, A., Augereau, P., Lapierre, M., Harmand, P.-O., Badia, E., Annicotte, J.-S., Fajas, L., and Cavaillès, V. (2012). The RIP140 gene is a transcriptional target of E2F1. *PloS One* *7*, e35839.
- Docquier, A., Garcia, A., Savatier, J., Boulahtouf, A., Bonnet, S., Bellet, V., Busson, M., Margeat, E., Jalaguier, S., Royer, C., et al. (2013). Negative regulation of estrogen signaling by ER $\beta$  and RIP140 in ovarian cancer cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *27*, 1429–1441.
- Douillard, J.Y. (2000). Irinotecan and high-dose fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer. *Oncol. Williston Park N* *14*, 51–55.
- Douillard, J.-Y., Siena, S., Cassidy, J., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., et al. (2010). Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 4697–4705.
- Douillard, J.-Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., et al. (2013). Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *369*, 1023–1034.

- Dragileva, E., Hendricks, A., Teed, A., Gillis, T., Lopez, E.T., Friedberg, E.C., Kucherlapati, R., Edelmann, W., Lunetta, K.L., MacDonald, M.E., et al. (2009). Intergenerational and striatal CAG repeat instability in Huntington's disease knock-in mice involve different DNA repair genes. *Neurobiol. Dis.* *33*, 37–47.
- Drummond, A.E., and Fuller, P.J. (2010). The importance of ERbeta signalling in the ovary. *J. Endocrinol.* *205*, 15–23.
- Duclot, F., Lapierre, M., Fritsch, S., White, R., Parker, M.G., Maurice, T., and Cavallès, V. (2012). Cognitive impairments in adult mice with constitutive inactivation of RIP140 gene expression. *Genes Brain Behav.* *11*, 69–78.
- Duong, V., Boule, N., Daujat, S., Chauvet, J., Bonnet, S., Neel, H., and Cavallès, V. (2007). Differential regulation of estrogen receptor alpha turnover and transactivation by Mdm2 and stress-inducing agents. *Cancer Res.* *67*, 5513–5521.
- Duval, A., and Hamelin, R. (2002). Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* *62*, 2447–2454.
- Duval, A., Gayet, J., Zhou, X.P., Iacopetta, B., Thomas, G., and Hamelin, R. (1999). Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* *59*, 4213–4215.
- Edelbrock, M.A., Kaliyaperumal, S., and Williams, K.J. (2013). Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *743–744*, 53–66.
- Elsayed, F.A., Kets, C.M., Ruano, D., van den Akker, B., Mensenkamp, A.R., Schruppf, M., Nielsen, M., Wijnen, J.T., Tops, C.M., Ligtenberg, M.J., et al. (2015). Germline variants in POLE are associated with early onset mismatch repair deficient colorectal cancer. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *23*, 1080–1084.
- Enoiu, M., Jiricny, J., and Schärer, O.D. (2012). Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. *Nucleic Acids Res.* *40*, 8953–8964.
- Erdeniz, N., Nguyen, M., Deschênes, S.M., and Liskay, R.M. (2007). Mutations affecting a putative MutLalpha endonuclease motif impact multiple mismatch repair functions. *DNA Repair* *6*, 1463–1470.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* *358*, 1148–1159.
- Fallik, D., Borrini, F., Boige, V., Viguier, J., Jacob, S., Miquel, C., Sabourin, J.-C., Ducreux, M., and Praz, F. (2003). Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res.* *63*, 5738–5744.
- Fang, W.H., and Modrich, P. (1993). Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. *J. Biol. Chem.* *268*, 11838–11844.

Fang, M., Pak, M.L., Chamberlain, L., Xing, W., Yu, H., and Green, M.R. (2015). The CREB Coactivator CRTC2 Is a Lymphoma Tumor Suppressor that Preserves Genome Integrity through Transcription of DNA Mismatch Repair Genes. *Cell Rep.* *11*, 1350–1357.

Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *6*, 479–507.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759–767.

Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., et al. (2011). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *22*, 1958–1972.

Feng, X., Krogh, K.A., Wu, C.-Y., Lin, Y.-W., Tsai, H.-C., Thayer, S.A., and Wei, L.-N. (2014). Receptor-interacting protein 140 attenuates endoplasmic reticulum stress in neurons and protects against cell death. *Nat. Commun.* *5*, 4487.

Feng, X., Yu, W., Liang, R., Shi, C., Zhao, Z., and Guo, J. (2015). Receptor-interacting protein 140 overexpression promotes neuro-2a neuronal differentiation by ERK1/2 signaling. *Chin. Med. J. (Engl.)* *128*, 119–124.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* *136*, E359-386.

Ferreira, A.M., Tuominen, I., Sousa, S., Gerbens, F., van Dijk-Bos, K., Osinga, J., Kooi, K.A., Sanjabi, B., Esendam, C., Oliveira, C., et al. (2014). New target genes in endometrial tumors show a role for the estrogen-receptor pathway in microsatellite-unstable cancers. *Hum. Mutat.* *35*, 1514–1523.

Friedberg, E.C. (2003). DNA damage and repair. *Nature* *421*, 436–440.

Friedberg, E.C., Lehmann, A.R., and Fuchs, R.P.P. (2005). Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol. Cell* *18*, 499–505.

Fritah, A., Steel, J.H., Nichol, D., Parker, N., Williams, S., Price, A., Strauss, L., Ryder, T.A., Mobberley, M.A., Poutanen, M., et al. (2010). Elevated expression of the metabolic regulator receptor-interacting protein 140 results in cardiac hypertrophy and impaired cardiac function. *Cardiovasc. Res.* *86*, 443–451.

Fritah, A., Steel, J.H., Parker, N., Nikolopoulou, E., Christian, M., Carling, D., and Parker, M.G. (2012). Absence of RIP140 reveals a pathway regulating glut4-dependent glucose uptake in oxidative skeletal muscle through UCP1-mediated activation of AMPK. *PloS One* *7*, e32520.

Fuchs, C.S., Marshall, J., Mitchell, E., Wierzbicki, R., Ganju, V., Jeffery, M., Schulz, J., Richards, D., Soufi-Mahjoubi, R., Wang, B., et al. (2007). Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 4779–4786.

- Gallois, C., Laurent-Puig, P., and Taieb, J. (2016). Methylator phenotype in colorectal cancer: A prognostic factor or not? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *99*, 74–80.
- Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* *135*, 1161–1163.
- Gardiner, K. (2006). Transcriptional dysregulation in Down syndrome: predictions for altered protein complex stoichiometries and post-translational modifications, and consequences for learning/behavior genes ELK, CREB, and the estrogen and glucocorticoid receptors. *Behav. Genet.* *36*, 439–453.
- Gardiner, K., Herault, Y., Lott, I.T., Antonarakis, S.E., Reeves, R.H., and Dierssen, M. (2010). Down syndrome: from understanding the neurobiology to therapy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 14943–14945.
- Garzon, R., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2009). MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Med.* *60*, 167–179.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* *13*, 1118–1128.
- Gavande, N.S., VanderVere-Carozza, P.S., Hinshaw, H.D., Jalal, S.I., Sears, C.R., Pawelczak, K.S., and Turchi, J.J. (2016). DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol. Ther.* *160*, 65–83.
- Genschel, J., and Modrich, P. (2003). Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol. Cell* *12*, 1077–1086.
- Gibson, W.J., Hoivik, E.A., Halle, M.K., Taylor-Weiner, A., Cherniack, A.D., Berg, A., Holst, F., Zack, T.I., Werner, H.M.J., Staby, K.M., et al. (2016). The genomic landscape and evolution of endometrial carcinoma progression and abdominopelvic metastasis. *Nat. Genet.* *48*, 848–855.
- Giles, R.H., van Es, J.H., and Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1653*, 1–24.
- Gillet, L.C.J., and Schärer, O.D. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* *106*, 253–276.
- Goel, A., and Boland, C.R. (2012). Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology* *143*, 1442–1460.e1.
- Goellner, E.M., Smith, C.E., Campbell, C.S., Hombauer, H., Desai, A., Putnam, C.D., and Kolodner, R.D. (2014). PCNA and Msh2-Msh6 activate an Mlh1-Pms1 endonuclease pathway required for Exo1-independent mismatch repair. *Mol. Cell* *55*, 291–304.
- Gongora, C., Vezzio-Vie, N., Tuduri, S., Denis, V., Causse, A., Auzanneau, C., Collod-Beroud, G., Coquelle, A., Pasero, P., Pourquier, P., et al. (2011). New Topoisomerase I mutations are associated with resistance to camptothecin. *Mol. Cancer* *10*, 64.

de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., et al. (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *18*, 2938–2947.

de Gramont, A., Van Cutsem, E., Schmoll, H.-J., Tabernero, J., Clarke, S., Moore, M.J., Cunningham, D., Cartwright, T.H., Hecht, J.R., Rivera, F., et al. (2012). Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* *13*, 1225–1233.

Grothey, A., Sargent, D., Goldberg, R.M., and Schmoll, H.-J. (2004). Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *22*, 1209–1214.

Grothey, A., Van Cutsem, E., Sobrero, A., Siena, S., Falcone, A., Ychou, M., Humblet, Y., Bouché, O., Mineur, L., Barone, C., et al. (2013). Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* *381*, 303–312.

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* *21*, 1350–1356.

Guittet, L., Bouvier, V., Mariotte, N., Vallee, J.P., Levillain, R., Tichet, J., and Launoy, G. (2009). Comparison of a guaiac and an immunochemical faecal occult blood test for the detection of colonic lesions according to lesion type and location. *Br. J. Cancer* *100*, 1230–1235.

Guo, J., Jiang, Z., Li, X., Wang, X.I., and Xiao, Y. (2016). miR-20b downregulates polymerases  $\kappa$  and  $\theta$  in XP-V tumor cells. *Oncol. Lett.* *11*, 3790–3794.

Gupta, P., Huq, M.D.M., Khan, S.A., Tsai, N.-P., and Wei, L.-N. (2005). Regulation of co-repressive activity of and HDAC recruitment to RIP140 by site-specific phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *4*, 1776–1784.

Haanstra, J.F., de Vos Tot Nederveen Cappel, W.H., Gopie, J.P., Vecht, J., Vanhoutvin, S.A.L.W., Cats, A., van der Zaag-Loonen, H.J., Langers, A.M.J., Bergmann, J.H.W., van de Meeberg, P.C., et al. (2012). Quality of life after surgery for colon cancer in patients with Lynch syndrome: partial versus subtotal colectomy. *Dis. Colon Rectum* *55*, 653–659.

Hager, K.M., and Gu, W. (2014). Understanding the non-canonical pathways involved in p53-mediated tumor suppression. *Carcinogenesis* *35*, 740–746.

Haller, D.G., Tabernero, J., Maroun, J., de Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Gilberg, F., Rittweger, K., and Schmoll, H.-J. (2011). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 1465–1471.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.



Haraldsdottir, S., Hampel, H., Tomsic, J., Frankel, W.L., Pearlman, R., de la Chapelle, A., and Pritchard, C.C. (2014). Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology* *147*, 1308–1316.e1.

Haricharan, S., Punturi, N., Singh, P., Holloway, K.R., Anurag, M., Schmelz, J., Schmidt, C., Lei, J.T., Suman, V., Hunt, K., et al. (2017). Loss of MutL Disrupts CHK2-Dependent Cell-Cycle Control through CDK4/6 to Promote Intrinsic Endocrine Therapy Resistance in Primary Breast Cancer. *Cancer Discov.*

Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* *28*, 739–745.

Hartman, J., Edvardsson, K., Lindberg, K., Zhao, C., Williams, C., Ström, A., and Gustafsson, J.-A. (2009). Tumor repressive functions of estrogen receptor beta in SW480 colon cancer cells. *Cancer Res.* *69*, 6100–6106.

HAS (2012). Haute Autorité de Santé - ALD n° 30 - Cancer colorectal.

Hasson, R.M., Briggs, A., Carothers, A.M., Davids, J.S., Wang, J., Javid, S.H., Cho, N.L., and Bertagnolli, M.M. (2014). Estrogen receptor  $\alpha$  or  $\beta$  loss in the colon of Min/+ mice promotes crypt expansion and impairs TGF $\beta$  and HNF3 $\beta$  signaling. *Carcinogenesis* *35*, 96–102.

He, Y., Sheng, J., Ling, X., Fu, L., Jin, P., Yen, L., and Rao, J. (2012). Estradiol regulates miR-135b and mismatch repair gene expressions via estrogen receptor- $\beta$  in colorectal cells. *Exp. Mol. Med.* *44*, 723–732.

Helleday, T., Eshtad, S., and Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 585–598.

Herold, T., Jurinovic, V., Metzeler, K.H., Boulesteix, A.-L., Bergmann, M., Seiler, T., Mulaw, M., Thoene, S., Dufour, A., Pasalic, Z., et al. (2011). An eight-gene expression signature for the prediction of survival and time to treatment in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *25*, 1639–1645.

Herzog, B., Hallberg, M., Seth, A., Woods, A., White, R., and Parker, M.G. (2007). The nuclear receptor cofactor, receptor-interacting protein 140, is required for the regulation of hepatic lipid and glucose metabolism by liver X receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *21*, 2687–2697.

Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., and Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* *44*, 113–139.

Hile, S.E., Wang, X., Lee, M.Y.W.T., and Eckert, K.A. (2011). Beyond translesion synthesis: polymerase fidelity as a potential determinant of microsatellite stability. *Nucleic Acids Res.* *40*, 1636–1647.

Hitchins, M.P. (2013). The role of epigenetics in Lynch syndrome. *Fam. Cancer* *12*, 189–205.

Ho, P.-C., Tsui, Y.-C., Feng, X., Greaves, D.R., and Wei, L.-N. (2012). NF- $\kappa$ B-mediated degradation of the coactivator RIP140 regulates inflammatory responses and contributes to endotoxin tolerance. *Nat. Immunol.* *13*, 379–386.

Hoffmann, J.-S., and Cazaux, C. (2010). Aberrant expression of alternative DNA polymerases: a source of mutator phenotype as well as replicative stress in cancer. *Semin. Cancer Biol.* *20*, 312–319.

Hombauer, H., Campbell, C.S., Smith, C.E., Desai, A., and Kolodner, R.D. (2011). Visualization of eukaryotic DNA mismatch repair reveals distinct recognition and repair intermediates. *Cell* *147*, 1040–1053.

Horikoshi, M., Beaumont, R.N., Day, F.R., Warrington, N.M., Kooijman, M.N., Fernandez-Tajes, J., Feenstra, B., van Zuydam, N.R., Gaulton, K.J., Grarup, N., et al. (2016). Genome-wide associations for birth weight and correlations with adult disease. *Nature* *538*, 248–252.

Houllberghs, H., Dekker, M., Lantermans, H., Kleinendorst, R., Dubbink, H.J., Hofstra, R.M.W., Verhoef, S., and Te Riele, H. (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis screen to identify pathogenic Lynch syndrome-associated MSH2 DNA mismatch repair gene variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 4128–4133.

Hu, F., Wang, M., Xiao, T., Yin, B., He, L., Meng, W., Dong, M., and Liu, F. (2015). miR-30 promotes thermogenesis and the development of beige fat by targeting RIP140. *Diabetes* *64*, 2056–2068.

Humbert, O., Achour, I., Lautier, D., Laurent, G., and Salles, B. (2003). hMSH2 expression is driven by AP1-dependent regulation through phorbol-ester exposure. *Nucleic Acids Res.* *31*, 5627–5634.

Huq, M.D.M., and Wei, L.-N. (2005). Post-translational modification of nuclear co-repressor receptor-interacting protein 140 by acetylation. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *4*, 975–983.

Huq, M.D.M., Khan, S.A., Park, S.W., and Wei, L.-N. (2005). Mapping of phosphorylation sites of nuclear corepressor receptor interacting protein 140 by liquid chromatography-tandem mass spectroscopy. *Proteomics* *5*, 2157–2166.

Hurwitz, H.I., Yi, J., Ince, W., Novotny, W.F., and Rosen, O. (2009). The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *The Oncologist* *14*, 22–28.

Iaquinta, P.J., and Lees, J.A. (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 649–657.

Ikushima, H., and Miyazono, K. (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 415–424.

INCa (2016). Tests somatiques recherchant une déficience du système MMR au sein des tumeurs du spectre du syndrome de Lynch.

INCa (2017). Le programme de dépistage organisé du cancer colorectal - Dépistage du cancer colorectal | Institut National Du Cancer.

INCa Les niveaux de risque - Institut National Du Cancer.



- Iwaizumi, M., Tseng-Rogenski, S., and Carethers, J.M. (2011). DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* *12*, 756–764.
- Iyama, T., and et al, (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* *12*, 620–636.
- Izzo, A., Manco, R., Bonfiglio, F., Cali, G., De Cristofaro, T., Patergnani, S., Cicatiello, R., Scrima, R., Zannini, M., Pinton, P., et al. (2014). NRIP1/RIP140 siRNA-mediated attenuation counteracts mitochondrial dysfunction in Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.*
- Jacobs, A.L., and Schär, P. (2012). DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma* *121*, 1–20.
- Jalaguier, S., Teyssier, C., Nait Achour, T., Lucas, A., Bonnet, S., Rodriguez, C., Elarouci, N., Lapierre, M., and Cavallès, V. (2017). Complex regulation of LCoR signaling in breast cancer cells. *Oncogene* *36*, 4790–4801.
- Jansen, A.M., van Wezel, T., van den Akker, B.E., Ventayol Garcia, M., Ruano, D., Tops, C.M., Wagner, A., Letteboer, T.G., Gómez-García, E.B., Devilee, P., et al. (2015). Combined mismatch repair and POLE/POLD1 defects explain unresolved suspected Lynch syndrome cancers. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*.
- Jansen, J.G., Temviriyankul, P., Wit, N., Delbos, F., Reynaud, C.-A., Jacobs, H., and de Wind, N. (2014). Redundancy of mammalian Y family DNA polymerases in cellular responses to genomic DNA lesions induced by ultraviolet light. *Nucleic Acids Res.* *42*, 11071–11082.
- Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* *138*, 2044–2058.
- Jha, V., Bian, C., Xing, G., and Ling, H. (2016a). Structure and mechanism of error-free replication past the major benzo[a]pyrene adduct by human DNA polymerase  $\kappa$ . *Nucleic Acids Res.* *44*, 4957–4967.
- Jha, V., Bian, C., Xing, G., and Ling, H. (2016b). Structure and mechanism of error-free replication past the major benzo[a]pyrene adduct by human DNA polymerase  $\kappa$ . *Nucleic Acids Res.*
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 335–346.
- Jiricny, J. (2013). Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a012633.
- Johansson, E., and Dixon, N. (2013). Replicative DNA polymerases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Kabbinavar, F., Irl, C., Zurlo, A., and Hurwitz, H. (2008). Bevacizumab improves the overall and progression-free survival of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based regimens irrespective of baseline risk. *Oncology* *75*, 215–223.

- Kadyrov, F.A., Dzantiev, L., Constantin, N., and Modrich, P. (2006). Endonucleolytic function of MutL $\alpha$  in human mismatch repair. *Cell* 126, 297–308.
- Kadyrov, F.A., Holmes, S.F., Arana, M.E., Lukianova, O.A., O'Donnell, M., Kunkel, T.A., and Modrich, P. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* MutL $\alpha$  is a mismatch repair endonuclease. *J. Biol. Chem.* 282, 37181–37190.
- Kadyrov, F.A., Genschel, J., Fang, Y., Penland, E., Edelman, W., and Modrich, P. (2009). A possible mechanism for exonuclease 1-independent eukaryotic mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8495–8500.
- Kadyrova, L.Y., and Kadyrov, F.A. (2016). Endonuclease activities of MutL $\alpha$  and its homologs in DNA mismatch repair. *DNA Repair* 38, 42–49.
- Kadyrova, L.Y., Mertz, T.M., Zhang, Y., Northam, M.R., Sheng, Z., Lobachev, K.S., Shcherbakova, P.V., and Kadyrov, F.A. (2013). A reversible histone H3 acetylation cooperates with mismatch repair and replicative polymerases in maintaining genome stability. *PLoS Genet.* 9, e1003899.
- Kanemaru, Y., Suzuki, T., Sassa, A., Matsumoto, K., Adachi, N., Honma, M., Numazawa, S., and Nohmi, T. (2017). DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis. *Genes Environ. Off. J. Jpn. Environ. Mutagen Soc.* 39, 6.
- Kanthan, R., Senger, J.-L., and Kanthan, S.C. (2012). Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Pathol. Res. Int.* 2012, 597497.
- Karran, K. (2001). Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* 22, 1931–1937.
- Kawate, H., Itoh, R., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., Ide, F., Ishikawa, T., Noda, T., Nawata, H., and Sekiguchi, M. (2000). A defect in a single allele of the Mlh1 gene causes dissociation of the killing and tumorigenic actions of an alkylating carcinogen in methyltransferase-deficient mice. *Carcinogenesis* 21, 301–305.
- Khare, V., and Eckert, K.A. (2002). The proofreading 3'→5' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis. *Mutat. Res.* 510, 45–54.
- Kim, S.T., Lee, J., Park, S.H., Park, J.O., Lim, H.Y., Kang, W.K., Kim, J.Y., Kim, Y.H., Chang, D.K., Rhee, P.-L., et al. (2010). Clinical impact of microsatellite instability in colon cancer following adjuvant FOLFOX therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 659–667.
- Kim, W.-J., Rajasekaran, B., and Brown, K.D. (2007). MLH1- and ATM-dependent MAPK signaling is activated through c-Abl in response to the alkylator N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine. *J. Biol. Chem.* 282, 32021–32031.
- Kimelman, D., and Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482–7491.
- Kiskinis, E., Chatzeli, L., Curry, E., Kaforou, M., Frontini, A., Cinti, S., Montana, G., Parker, M.G., and Christian, M. (2014). RIP140 represses the “brown-in-white” adipocyte program

including a futile cycle of triacylglycerol breakdown and synthesis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 28, 344–356.

Knudsen, A.L. (2003). Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam. Cancer* 2, 43–55.

Kobayashi, H., Ohno, S., Sasaki, Y., and Matsuura, M. (2013). Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review). *Oncol. Rep.* 30, 1019–1029.

Kolber, B.J., Wiczorek, L., and Muglia, L.J. (2008). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered glucocorticoid or mineralocorticoid receptor function. *Stress Amst. Neth.* 11, 321–338.

Kolodner, R.D. (2016). A personal historical view of DNA mismatch repair with an emphasis on eukaryotic DNA mismatch repair. *DNA Repair* 38, 3–13.

Koshiji, M., To, K.K.-W., Hammer, S., Kumamoto, K., Harris, A.L., Modrich, P., and Huang, L.E. (2005). HIF-1 $\alpha$  induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS $\alpha$  expression. *Mol. Cell* 17, 793–803.

Kovalenko, M., Dragileva, E., St Claire, J., Gillis, T., Guide, J.R., New, J., Dong, H., Kucherlapati, R., Kucherlapati, M.H., Ehrlich, M.E., et al. (2012). Msh2 acts in medium-spiny striatal neurons as an enhancer of CAG instability and mutant huntingtin phenotypes in Huntington's disease knock-in mice. *PLoS One* 7, e44273.

Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2015). Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu. Rev. Genet.* 49, 291–313.

Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M., and Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 311–317.

Kwok, C.-T., Vogelaar, I.P., van Zelst-Stams, W.A., Mensenkamp, A.R., Ligtenberg, M.J., Rapkins, R.W., Ward, R.L., Chun, N., Ford, J.M., Ladabaum, U., et al. (2014). The MLH1 c.-27C>A and c.85G>T variants are linked to dominantly inherited MLH1 epimutation and are borne on a European ancestral haplotype. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 22, 617–624.

Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G.D., Mosconi, S., Mandalà, M., Cervantes, A., Arnold, D., and ESMO Guidelines Working Group (2013). Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 24 Suppl 6, vi64-72.

Lai, Y., Budworth, H., Beaver, J.M., Chan, N.L.S., Zhang, Z., McMurray, C.T., and Liu, Y. (2016). Crosstalk between MSH2-MSH3 and pol $\beta$  promotes trinucleotide repeat expansion during base excision repair. *Nat. Commun.* 7, 12465.

Lapierre, M., Bonnet, S., Bascoul-Molleivi, C., Ait-Arsa, I., Jalaguier, S., Del Rio, M., Plateroti, M., Roepman, P., Ychou, M., Pannequin, J., et al. (2014). RIP140 increases APC expression and controls intestinal homeostasis and tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 124, 1899–1913.

- Lapierre, M., Docquier, A., Castet-Nicolas, A., Gitenay, D., Jalaguier, S., Teyssier, C., and Cavailles, V. (2015a). The emerging role of the transcriptional coregulator RIP140 in solid tumors. *Biochim. Biophys. Acta* *1856*, 144–150.
- Lapierre, M., Castet-Nicolas, A., Gitenay, D., Jalaguier, S., Teyssier, C., Bret, C., Cartron, G., Moreaux, J., and Cavailles, V. (2015b). Expression and role of RIP140/NRIP1 in chronic lymphocytic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* *8*, 20.
- Larrea, A.A., and al. (2010). SnapShot: DNA mismatch repair. *Cell* *141*, 730.e1.
- Laurent-Puig, P., Cayre, A., Manceau, G., Buc, E., Bachet, J.-B., Lecomte, T., Rougier, P., Lievre, A., Landi, B., Boige, V., et al. (2009). Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 5924–5930.
- Laurent-Puig, P., Agostini, J., and Maley, K. (2010). [Colorectal oncogenesis]. *Bull. Cancer (Paris)* *97*, 1311–1321.
- Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Lubner, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2509–2520.
- Lee, C.H., Chinpaisal, C., and Wei, L.N. (1998). Cloning and characterization of mouse RIP140, a corepressor for nuclear orphan receptor TR2. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6745–6755.
- Lee, J.-B., Cho, W.-K., Park, J., Jeon, Y., Kim, D., Lee, S.H., and Fishel, R. (2014). Single-molecule views of MutS on mismatched DNA. *DNA Repair* *20*, 82–93.
- Lee, J.K., Delaney, C.P., and Lipman, J.M. (2012). Current state of the art in laparoscopic colorectal surgery for cancer: Update on the multi-centric international trials. *Ann. Surg. Innov. Res.* *6*, 5.
- Lehmann, A.R., and Fuchs, R.P. (2006). Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. *DNA Repair* *5*, 1495–1498.
- Lei, X., Zhu, Y., Tomkinson, A., and Sun, L. (2004). Measurement of DNA mismatch repair activity in live cells. *Nucleic Acids Res.* *32*, e100.
- Lemée, F., Bavoux, C., Pillaire, M.J., Bieth, A., Machado, C.R., Pena, S.D., Guimbaud, R., Selves, J., Hoffmann, J.S., and Cazaux, C. (2007). Characterization of promoter regulatory elements involved in downexpression of the DNA polymerase kappa in colorectal cancer. *Oncogene* *26*, 3387–3394.
- Leonardsson, G., Jacobs, M.A., White, R., Jeffery, R., Poulosom, R., Milligan, S., and Parker, M. (2002). Embryo transfer experiments and ovarian transplantation identify the ovary as the only site in which nuclear receptor interacting protein 1/RIP140 action is crucial for female fertility. *Endocrinology* *143*, 700–707.
- Leonardsson, G., Steel, J.H., Christian, M., Pocock, V., Milligan, S., Bell, J., So, P.-W., Medina-Gomez, G., Vidal-Puig, A., White, R., et al. (2004). Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8437–8442.

- Lewandowski, S.A., Thierry, J., Jalil, A., Leclercq, G., Szczylik, C., and Chouaib, S. (2005). Opposite effects of estrogen receptors alpha and beta on MCF-7 sensitivity to the cytotoxic action of TNF and p53 activity. *Oncogene* 24, 4789–4798.
- L’Horset, F., Dauvois, S., Heery, D.M., Cavallès, V., and Parker, M.G. (1996). RIP-140 interacts with multiple nuclear receptors by means of two distinct sites. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6029–6036.
- Li, G.-M. (2007). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18, 85–98.
- Li, F., Mao, G., Tong, D., Huang, J., Gu, L., Yang, W., and Li, G.-M. (2013). The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSa. *Cell* 153, 590–600.
- Li, L.S., Morales, J.C., Veigl, M., Sedwick, D., Greer, S., Meyers, M., Wagner, M., Fishel, R., and Boothman, D.A. (2009). DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* 158, 679–692.
- Li, Z., Pearlman, A.H., and Hsieh, P. (2016). DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair* 38, 94–101.
- Liang, P.S., Chen, T.-Y., and Giovannucci, E. (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 124, 2406–2415.
- Liao, X., Lochhead, P., Nishihara, R., Morikawa, T., Kuchiba, A., Yamauchi, M., Imamura, Y., Qian, Z.R., Baba, Y., Shima, K., et al. (2012). Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N. Engl. J. Med.* 367, 1596–1606.
- Liao, Y., Schroeder, J.W., Gao, B., Simmons, L.A., and Biteen, J.S. (2015). Single-molecule motions and interactions in live cells reveal target search dynamics in mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181–211.
- Lièvre, A., Blons, H., and Laurent-Puig, P. (2010). Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene* 29, 3033–3043.
- Ligtenberg, M.J.L., Kuiper, R.P., Geurts van Kessel, A., and Hoogerbrugge, N. (2013). EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. *Fam. Cancer* 12, 169–174.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715.
- Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 127–133.
- Lindor, N.M. (2009). Familial Colorectal Cancer Type X: The Other Half of Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer Syndrome. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 18, 637–645.

- Lipkin, S.M., Moens, P.B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., Thomas, J., Cheng, J., Touchman, J.W., Green, E.D., et al. (2002). Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat. Genet.* *31*, 385–390.
- Liu, D. (2016). Gene signatures of estrogen and progesterone receptor pathways predict the prognosis of colorectal cancer. *FEBS J.* *283*, 3115–3133.
- Liu, G., and Chen, X. (2006). DNA polymerase eta, the product of the xeroderma pigmentosum variant gene and a target of p53, modulates the DNA damage checkpoint and p53 activation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 1398–1413.
- Liu, A., Yoshioka, K.-I., Salerno, V., and Hsieh, P. (2008). The mismatch repair-mediated cell cycle checkpoint response to fluorodeoxyuridine. *J. Cell. Biochem.* *105*, 245–254.
- Liu, P.-S., Lin, Y.-W., Lee, B., McCrady-Spitzer, S.K., Levine, J.A., and Wei, L.-N. (2014). Reducing RIP140 expression in macrophage alters ATM infiltration, facilitates white adipose tissue browning and prevents high fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*.
- Liu, P.-S., Lin, Y.-W., Burton, F.H., and Wei, L.-N. (2015). M1-M2 balancing act in white adipose tissue browning - a new role for RIP140. *Adipocyte* *4*, 146–148.
- Llosa, N.J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E.C., Hechenbleikner, E.M., Taube, J.M., Blosser, R.L., Fan, H., Wang, H., Lubber, B.S., et al. (2015). The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* *5*, 43–51.
- Lone, S., Townson, S.A., Uljon, S.N., Johnson, R.E., Brahma, A., Nair, D.T., Prakash, S., Prakash, L., and Aggarwal, A.K. (2007). Human DNA polymerase kappa encircles DNA: implications for mismatch extension and lesion bypass. *Mol. Cell* *25*, 601–614.
- Lorenzato, A., Martino, C., Dani, N., Oligschläger, Y., Ferrero, A.M., Biglia, N., Calogero, R., Olivero, M., and Di Renzo, M.F. (2012). The cellular apoptosis susceptibility CAS/CSE1L gene protects ovarian cancer cells from death by suppressing RASSF1C. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 2446–2456.
- Lotsari, J.E., Gylling, A., Abdel-Rahman, W.M., Nieminen, T.T., Aittomäki, K., Friman, M., Pitkänen, R., Aarnio, M., Järvinen, H.J., Mecklin, J.-P., et al. (2012). Breast carcinoma and Lynch syndrome: molecular analysis of tumors arising in mutation carriers, non-carriers, and sporadic cases. *Breast Cancer Res. BCR* *14*, R90.
- Lu, J.-Y., Jin, P., Gao, W., Wang, D.-Z., and Sheng, J.-Q. (2017). Estrogen enhances mismatch repair by induction of MLH1 expression via estrogen receptor- $\beta$ . *Oncotarget* *8*, 38767–38779.
- Lu, Y., Wajapeyee, N., Turker, M.S., and Glazer, P.M. (2014). Silencing of the DNA mismatch repair gene MLH1 induced by hypoxic stress in a pathway dependent on the histone demethylase LSD1. *Cell Rep.* *8*, 501–513.
- Lujan, S.A., Clausen, A.R., Clark, A.B., MacAlpine, H.K., MacAlpine, D.M., Malc, E.P., Mieczkowski, P.A., Burkholder, A.B., Fargo, D.C., Gordenin, D.A., et al. (2014). Heterogeneous polymerase fidelity and mismatch repair bias genome variation and composition. *Genome Res.* *24*, 1751–1764.



- Lupari, E., Ventura, I., Marcon, F., Aquilina, G., Dogliotti, E., and Fortini, P. (2012). Pol kappa partially rescues MMR-dependent cytotoxicity of O6-methylguanine. *DNA Repair* 11, 579–586.
- Lv, L., Wang, F., Ma, X., Yang, Y., Wang, Z., Liu, H., Li, X., Liu, Z., Zhang, T., Huang, M., et al. (2013). Mismatch repair protein MSH2 regulates translesion DNA synthesis following exposure of cells to UV radiation. *Nucleic Acids Res.* 41, 10312–10322.
- Lynch, H.T., and Chapelle, A. de la (1999). Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J. Med. Genet.* 36, 801–818.
- Lynch, H.T., and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919–932.
- Lynch, H.T., Shaw, M.W., Magnuson, C.W., Larsen, A.L., and Krush, A.J. (1966). Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch. Intern. Med.* 117, 206–212.
- Lynch, H.T., Snyder, C.L., Shaw, T.G., Heinen, C.D., and Hitchins, M.P. (2015). Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat. Rev. Cancer* 15, 181–194.
- Ma, J., Zhang, Y., Shen, H., Kapesa, L., Liu, W., Zeng, M., and Zeng, S. (2015). Association between mismatch repair gene and irinotecan-based chemotherapy in metastatic colon cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36, 9599–9609.
- Ma, Y., Zhang, P., Wang, F., Yang, J., Liu, Z., and Qin, H. (2011). Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 3775–3782.
- Ma, Y., Yang, Y., Wang, F., Zhang, P., Shi, C., Zou, Y., and Qin, H. (2013). Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PloS One* 8, e53916.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459–465.
- Manceau, G., Marisa, L., Boige, V., Duval, A., Gaub, M.-P., Milano, G., Selves, J., Olschwang, S., Jooste, V., le Legrain, M., et al. (2015). PIK3CA mutations predict recurrence in localized microsatellite stable colon cancer. *Cancer Med.* 4, 371–382.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839.
- Manley, K., Shirley, T.L., Flaherty, L., and Messer, A. (1999). Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice. *Nat. Genet.* 23, 471–473.
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H.J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 465–481.

- Martin, S.A., McCarthy, A., Barber, L.J., Burgess, D.J., Parry, S., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2009). Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2. *EMBO Mol. Med.* *1*, 323–337.
- Masuda, Y., Kanao, R., Kaji, K., Ohmori, H., Hanaoka, F., and Masutani, C. (2015). Different types of interaction between PCNA and PIP boxes contribute to distinct cellular functions of Y-family DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* *43*, 7898–7910.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. (1999). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature* *399*, 700–704.
- Maughan, T.S., Adams, R.A., Smith, C.G., Meade, A.M., Seymour, M.T., Wilson, R.H., Idziaszczyk, S., Harris, R., Fisher, D., Kenny, S.L., et al. (2011). Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet Lond. Engl.* *377*, 2103–2114.
- Maxwell, B.A., and Suo, Z. (2014). Recent insight into the kinetic mechanisms and conformational dynamics of Y-Family DNA polymerases. *Biochemistry (Mosc.)* *53*, 2804–2814.
- Mayer, R.J., Van Cutsem, E., Falcone, A., Yoshino, T., Garcia-Carbonero, R., Mizunuma, N., Yamazaki, K., Shimada, Y., Tabernero, J., Komatsu, Y., et al. (2015). Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *372*, 1909–1919.
- McCulloch, S.D., and Kunkel, T.A. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res.* *18*, 148–161.
- McDonald, J.P., Frank, E.G., Plosky, B.S., Rogozin, I.B., Masutani, C., Hanaoka, F., Woodgate, R., and Gearhart, P.J. (2003). 129-derived strains of mice are deficient in DNA polymerase iota and have normal immunoglobulin hypermutation. *J. Exp. Med.* *198*, 635–643.
- McGivern, A., Wynter, C.V.A., Whitehall, V.L.J., Kambara, T., Spring, K.J., Walsh, M.D., Barker, M.A., Arnold, S., Simms, L.A., Leggett, B.A., et al. (2004). Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam. Cancer* *3*, 101–107.
- McIlwraith, M.J., McIlwraith, M.J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., and West, S.C. (2005). Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol. Cell* *20*, 783–792.
- Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncol.-PARIS-* *5*, 311–326.
- Mensenkamp, A.R., Vogelaar, I.P., van Zelst-Stams, W.A.G., Goossens, M., Ouchene, H., Hendriks-Cornelissen, S.J.B., Kwint, M.P., Hoogerbrugge, N., Nagtegaal, I.D., and Ligtenberg, M.J.L. (2014a). Somatic Mutations in MLH1 and MSH2 Are a Frequent Cause of Mismatch-Repair Deficiency in Lynch Syndrome-Like Tumors. *Gastroenterology* *146*, 643–646.e8.



- Mensenkamp, A.R., Vogelaar, I.P., van Zelst-Stams, W.A.G., Goossens, M., Ouchene, H., Hendriks-Cornelissen, S.J.B., Kwint, M.P., Hoogerbrugge, N., Nagtegaal, I.D., and Ligtenberg, M.J.L. (2014b). Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* *146*, 643–646.e8.
- Meyers, M., Wagner, M.W., Mazurek, A., Schmutte, C., Fishel, R., and Boothman, D.A. (2005). DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage. *J. Biol. Chem.* *280*, 5516–5526.
- Mirkin, S.M. (2007). Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* *447*, 932–940.
- Missura, M., Buterin, T., Hindges, R., Hübscher, U., Kaspárková, J., Brabec, V., and Naegeli, H. (2001). Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. *EMBO J.* *20*, 3554–3564.
- Miyamoto, T., Shiozawa, T., Kashima, H., Feng, Y.-Z., Suzuki, A., Kurai, M., Nikaido, T., and Konishi, I. (2006). Estrogen up-regulates mismatch repair activity in normal and malignant endometrial glandular cells. *Endocrinology* *147*, 4863–4870.
- Modrich, P. (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J. Biol. Chem.* *281*, 30305–30309.
- Moon, B.-S., Jeong, W.-J., Park, J., Kim, T.I., Min, D.S., and Choi, K.-Y. (2014). Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J. Natl. Cancer Inst.* *106*, djt373.
- Morak, M., Käsbauer, S., Kerscher, M., Laner, A., Nissen, A.M., Benet-Pagès, A., Schackert, H.K., Keller, G., Massdorf, T., and Holinski-Feder, E. (2017). Loss of MSH2 and MSH6 due to heterozygous germline defects in MSH3 and MSH6. *Fam. Cancer*.
- Mori, Y., Yin, J., Rashid, A., Leggett, B.A., Young, J., Simms, L., Kuehl, P.M., Langenberg, P., Meltzer, S.J., and Stine, O.C. (2001). Instability typing: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res.* *61*, 6046–6049.
- Mori, Y., Sato, F., Selaru, F.M., Oлару, A., Perry, K., Kimos, M.C., Tamura, G., Matsubara, N., Wang, S., Xu, Y., et al. (2002). Instability typing reveals unique mutational spectra in microsatellite-unstable gastric cancers. *Cancer Res.* *62*, 3641–3645.
- Mostaqul Huq, M.D., Gupta, P., Tsai, N.-P., White, R., Parker, M.G., and Wei, L.-N. (2006). Suppression of receptor interacting protein 140 repressive activity by protein arginine methylation. *EMBO J.* *25*, 5094–5104.
- Movahedi, M., Bishop, D.T., Macrae, F., Mecklin, J.-P., Moeslein, G., Olschwang, S., Eccles, D., Evans, D.G., Maher, E.R., Bertario, L., et al. (2015). Obesity, Aspirin, and Risk of Colorectal Cancer in Carriers of Hereditary Colorectal Cancer: A Prospective Investigation in the CAPP2 Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 3591–3597.
- Murray, P.J., Kang, J.-W., Mirams, G.R., Shin, S.-Y., Byrne, H.M., Maini, P.K., and Cho, K.-H. (2010). Modelling spatially regulated beta-catenin dynamics and invasion in intestinal crypts. *Biophys. J.* *99*, 716–725.

- Nautiyal, J. (2017). Transcriptional coregulator RIP140: an essential regulator of physiology. *J. Mol. Endocrinol.* *58*, R147–R158.
- Nautiyal, J., Steel, J.H., Rosell, M.M., Nikolopoulou, E., Lee, K., Demayo, F.J., White, R., Richards, J.S., and Parker, M.G. (2010). The nuclear receptor cofactor receptor-interacting protein 140 is a positive regulator of amphiregulin expression and cumulus cell-oocyte complex expansion in the mouse ovary. *Endocrinology* *151*, 2923–2932.
- Nautiyal, J., Christian, M., and Parker, M.G. (2013a). Distinct functions for RIP140 in development, inflammation, and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *24*, 451–459.
- Nautiyal, J., Christian, M., and Parker, M.G. (2013b). Distinct functions for RIP140 in development, inflammation, and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *24*, 451–459.
- Nautiyal, J., Steel, J.H., Mane, M.R., Oduwole, O., Poliandri, A., Alexi, X., Wood, N., Poutanen, M., Zwart, W., Stingl, J., et al. (2013c). The transcriptional co-factor RIP140 regulates mammary gland development by promoting the generation of key mitogenic signals. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 1079–1089.
- Netter, J., Lehmann-Che, J., Lambert, J., Tallet, A., Lourenco, N., Soliman, H., Bertheau, P., Pariente, B., Chirica, M., Pocard, M., et al. (2015). Functional TP53 mutations have no impact on response to cytotoxic agents in metastatic colon cancer. *Bull. Cancer (Paris)* *102*, 117–125.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* *391*, 407–410.
- Nickoloff, J.A., Jones, D., Lee, S.-H., Williamson, E.A., and Hromas, R. (2017). Drugging the Cancers Addicted to DNA Repair. *J. Natl. Cancer Inst.* *109*.
- Nordlinger, B., Sorbye, H., Glimelius, B., Poston, G.J., Schlag, P.M., Rougier, P., Bechstein, W.O., Primrose, J.N., Walpole, E.T., Finch-Jones, M., et al. (2013). Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *14*, 1208–1215.
- Odell, I.D., Wallace, S.S., and Pederson, D.S. (2013). Rules of engagement for base excision repair in chromatin. *J. Cell. Physiol.* *228*, 258–266.
- O'Donnell, M., Langston, L., and Stillman, B. (2013). Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- van Oers, J.M.M., Roa, S., Werling, U., Liu, Y., Genschel, J., Hou, H., Sellers, R.S., Modrich, P., Scharff, M.D., and Edelmann, W. (2010). PMS2 endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 13384–13389.
- Ogi, T., Shinkai, Y., Tanaka, K., and Ohmori, H. (2002). Polkappa protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15548–15553.
- Ogi, T., Limsirichaikul, S., Overmeer, R.M., Volker, M., Takenaka, K., Cloney, R., Nakazawa, Y., Niimi, A., Miki, Y., Jaspers, N.G., et al. (2010). Three DNA polymerases,

recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol. Cell* 37, 714–727.

Ogino, S., Shima, K., Meyerhardt, J.A., McCleary, N.J., Ng, K., Hollis, D., Saltz, L.B., Mayer, R.J., Schaefer, P., Whittom, R., et al. (2012). Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 890–900.

Ohashi, E., Ogi, T., Kusumoto, R., Iwai, S., Masutani, C., Hanaoka, F., and Ohmori, H. (2000). Error-prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase kappa. *Genes Dev.* 14, 1589–1594.

Okamoto, R., and Watanabe, M. (2004). Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J. Gastroenterol.* 39, 1–6.

Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001008.

Olschwang, S., and Eisinger, F. (2010). MisMatch Repair genes and Lynch syndrome, recent updates.

Olschwang, S., Hamelin, R., Laurent-Puig, P., Thuille, B., De Rycke, Y., Li, Y.J., Muzeau, F., Girodet, J., Salmon, R.J., and Thomas, G. (1997). Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12122–12127.

Olschwang, S., Bonaiti, C., Feingold, J., Frebourg, T., Grandjouan, S., Lasset, C., Laurent-Puig, P., Lecuru, F., Millat, B., and Sobol, H. (2004). Identification and management of HNPCC syndrome (hereditary non polyposis colon cancer), hereditary predisposition to colorectal and endometrial adenocarcinomas]. *Bull. Cancer (Paris)* 91, 303.

Pabla, N., Ma, Z., McIlhatton, M.A., Fishel, R., and Dong, Z. (2011). hMSH2 recruits ATR to DNA damage sites for activation during DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 286, 10411–10418.

Palles, C., Cazier, J.-B., Howarth, K.M., Domingo, E., Jones, A.M., Broderick, P., Kemp, Z., Spain, S.L., Guarino, E., Guarino Almeida, E., et al. (2013). Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat. Genet.* 45, 136–144.

Panczyk, M. (2014). Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World J. Gastroenterol.* 20, 9775.

Pani, E., Stojic, L., El-Shemerly, M., Jiricny, J., and Ferrari, S. (2007). Mismatch repair status and the response of human cells to cisplatin. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 1796–1802.

Pappas, K., Xu, J., Zairis, S., Resnick-Silverman, L., Abate, F., Steinbach, N., Ozturk, S., Saal, L.H., Su, T., Cheung, P., et al. (2017). p53 maintains baseline expression of multiple tumor suppressor genes. *Mol. Cancer Res. MCR.*

Park, J.M., Huang, S., Tougeron, D., and Sinicrope, F.A. (2013a). MSH3 Mismatch Repair Protein Regulates Sensitivity to Cytotoxic Drugs and a Histone Deacetylase Inhibitor in Human Colon Carcinoma Cells. *PLoS ONE* 8, e65369.

- Park, J.M., Huang, S., Tougeron, D., and Sinicrope, F.A. (2013b). MSH3 mismatch repair protein regulates sensitivity to cytotoxic drugs and a histone deacetylase inhibitor in human colon carcinoma cells. *PLoS One* 8, e65369.
- Parsons, R., Myeroff, L.L., Liu, B., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 55, 5548–5550.
- Pedram, A., Razandi, M., Evinger, A.J., Lee, E., and Levin, E.R. (2009). Estrogen inhibits ATR signaling to cell cycle checkpoints and DNA repair. *Mol. Biol. Cell* 20, 3374–3389.
- Peltomäki, P. (2016). Update on Lynch syndrome genomics. *Fam. Cancer.*
- Peña-Díaz, J., and Jiricny, J. (2012). Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends Biochem. Sci.* 37, 206–214.
- Peña-Díaz, J., and Rasmussen, L.J. (2015). Approaches to diagnose DNA mismatch repair gene defects in cancer. *DNA Repair.*
- Peña-Díaz, J., Bregenhorn, S., Ghodgaonkar, M., Follonier, C., Artola-Borán, M., Castor, D., Lopes, M., Sartori, A.A., and Jiricny, J. (2012). Noncanonical mismatch repair as a source of genomic instability in human cells. *Mol. Cell* 47, 669–680.
- Peng, C., Chen, Z., Wang, S., Wang, H.-W., Qiu, W., Zhao, L., Xu, R., Luo, H., Chen, Y., Chen, D., et al. (2016). The Error-Prone DNA Polymerase  $\kappa$  Promotes Temozolomide Resistance in Glioblastoma through Rad17-Dependent Activation of ATR-Chk1 Signaling. *Cancer Res.* 76, 2340–2353.
- Pérez-Ruiz, E., Rueda, A., Pérez, L., Rivas-Ruiz, F., Torres, E., de Luque, V., Álvarez, M., Sevilla, I., Redondo, M., Padilla-Ruiz, M., et al. (2017). Expression and Prognostic Value of Oestrogen Receptor Beta in Colorectal Cancer. *Pathol. Oncol. Res. POR.*
- Pillaire, M.-J., Selves, J., Gordien, K., Gourraud, P.-A., Gouraud, P.-A., Gentil, C., Danjoux, M., Do, C., Negre, V., Bieth, A., et al. (2010). A “DNA replication” signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. *Oncogene* 29, 876–887.
- Pillaire, M.-J., Bétous, R., and Hoffmann, J.-S. (2014). Role of DNA polymerase  $\kappa$  in the maintenance of genomic stability. *Mol. Cell. Oncol.* 1, e29902.
- Pluciennik, A., Dzantiev, L., Iyer, R.R., Constantin, N., Kadyrov, F.A., and Modrich, P. (2010). PCNA function in the activation and strand direction of MutL $\alpha$  endonuclease in mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16066–16071.
- Pluciennik, A., Burdett, V., Baitinger, C., Iyer, R.R., Shi, K., and Modrich, P. (2013). Extrahelical (CAG)/(CTG) triplet repeat elements support proliferating cell nuclear antigen loading and MutL $\alpha$  endonuclease activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12277–12282.
- Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E., and Ginsberg, D. (2002). E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* 21, 437–446.
- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14, 1837–1851.

- Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 28, 1057–1068.
- Powelka, A.M., Seth, A., Virbasius, J.V., Kiskinis, E., Nicoloso, S.M., Guilherme, A., Tang, X., Straubhaar, J., Cherniack, A.D., Parker, M.G., et al. (2006). Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J. Clin. Invest.* 116, 125–136.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237.
- Pritchard, C.C., and al. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 60, 116–129.
- Putnam, C.D. (2016). Evolution of the methyl directed mismatch repair system in *Escherichia coli*. *DNA Repair* 38, 32–41.
- Qi, H., Zhu, H., Lou, M., Fan, Y., Liu, H., Shen, J., Li, Z., Lv, X., Shan, J., Zhu, L., et al. (2012). Interferon regulatory factor 1 transactivates expression of human DNA polymerase  $\eta$  in response to carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Biol. Chem.* 287, 12622–12633.
- Ráz, M.H., Dexter, H.R., Millington, C.L., van Loon, B., Williams, D.M., and Sturla, S.J. (2016). Bypass of Mutagenic O(6)-Carboxymethylguanine DNA Adducts by Human Y- and B-Family Polymerases. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 1493–1503.
- Rehman, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F., and Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371, 569–578.
- Reuschenbach, M., Kloor, M., Morak, M., Wentzensen, N., Germann, A., Garbe, Y., Tariverdian, M., Findeisen, P., Neumaier, M., Holinski-Feder, E., et al. (2010). Serum antibodies against frameshift peptides in microsatellite unstable colorectal cancer patients with Lynch syndrome. *Fam. Cancer* 9, 173–179.
- Rey, L., Sidorova, J.M., Puget, N., Boudsocq, F., Biard, D.S.F., Monnat, R.J., Cazaux, C., and Hoffmann, J.-S. (2009). Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3344–3354.
- Reyes, G.X., Schmidt, T.T., Kolodner, R.D., and Hombauer, H. (2015). New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma* 124, 443–462.
- Rodríguez-Soler, M., Pérez-Carbonell, L., Guarinos, C., Zapater, P., Castillejo, A., Barberá, V.M., Juárez, M., Bessa, X., Xicola, R.M., Clofent, J., et al. (2013). Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. *Gastroenterology* 144, 926-932.e1; quiz e13-14.
- Rosell, M., and al. (2011). Role of nuclear receptor corepressor RIP140 in metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 919–928.



- Rosell, M., Nevedomskaya, E., Stelloo, S., Nautiyal, J., Poliandri, A., Steel, J.H., Wessels, L.F.A., Carroll, J.S., Parker, M.G., and Zwart, W. (2014). Complex formation and function of estrogen receptor  $\alpha$  in transcription requires RIP140. *Cancer Res.* *74*, 5469–5479.
- Rossi, L., Bonmassar, E., and Faraoni, I. (2007). Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* *56*, 248–253.
- Rytinki, M.M., and Palvimo, J.J. (2008). SUMOylation modulates the transcription repressor function of RIP140. *J. Biol. Chem.* *283*, 11586–11595.
- Sale, J.E., Lehmann, A.R., and Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 141–152.
- Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* *32*, 347–355.
- Sargent, D.J., Marsoni, S., Monges, G., Thibodeau, S.N., Labianca, R., Hamilton, S.R., French, A.J., Kabat, B., Foster, N.R., Torri, V., et al. (2010). Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 3219–3226.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509–514.
- Schärer, O.D. (2007). Achieving broad substrate specificity in damage recognition by binding accessible nondamaged DNA. *Mol. Cell* *28*, 184–186.
- Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 167–202.
- Scherer, S.J., Maier, S.M., Seifert, M., Hanselmann, R.G., Zang, K.D., Muller-Hermelink, H.K., Angel, P., Welter, C., and Scharl, M. (2000). p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J. Biol. Chem.* *275*, 37469–37473.
- Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N., Yuen, S.T., Chan, T.L., Kwong, D.L.W., Au, G.K.H., et al. (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* *299*, 425–436.
- Schmutte, C., Sadoff, M.M., Shim, K.S., Acharya, S., and Fishel, R. (2001). The interaction of DNA mismatch repair proteins with human exonuclease I. *J. Biol. Chem.* *276*, 33011–33018.
- Schöpf, B., Bregenhorn, S., Quivy, J.-P., Kadyrov, F.A., Almouzni, G., and Jiricny, J. (2012). Interplay between mismatch repair and chromatin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 1895–1900.
- Schwitalle, Y., Kloor, M., Eiermann, S., Linnebacher, M., Kienle, P., Knaebel, H.P., Tariverdian, M., Benner, A., and von Knebel Doeberitz, M. (2008). Immune response against

frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 134, 988–997.

Sehgal, R., Sheahan, K., O'Connell, P.R., Hanly, A.M., Martin, S.T., and Winter, D.C. (2014). Lynch syndrome: an updated review. *Genes* 5, 497–507.

Seki, M., Gearhart, P.J., and Wood, R.D. (2005). DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Rep.* 6, 1143–1148.

Seth, A., Steel, J.H., Nichol, D., Pocock, V., Kumaran, M.K., Fritah, A., Mobberley, M., Ryder, T.A., Rowlerson, A., Scott, J., et al. (2007). The transcriptional corepressor RIP140 regulates oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell Metab.* 6, 236–245.

Shiovitz, S., Bertagnolli, M.M., Renfro, L.A., Nam, E., Foster, N.R., Dzieciatkowski, S., Luo, Y., Lao, V.V., Monnat, R.J., Emond, M.J., et al. (2014). CpG Island Methylator Phenotype Is Associated With Response to Adjuvant Irinotecan-Based Therapy for Stage III Colon Cancer. *Gastroenterology*.

Shirley, S.H., Rundhaug, J.E., Tian, J., Cullinan-Ammann, N., Lambertz, I., Conti, C.J., and Fuchs-Young, R. (2009). Transcriptional regulation of estrogen receptor-alpha by p53 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 69, 3405–3414.

Siehler, S.Y., Schrauder, M., Gerischer, U., Cantor, S., Marra, G., and Wiesmüller, L. (2009). Human MutL-complexes monitor homologous recombination independently of mismatch repair. *DNA Repair* 8, 242–252.

Sinicrope, F.A., and Sargent, D.J. (2012). Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 1506–1512.

Sinicrope, F.A., Mahoney, M.R., Smyrk, T.C., Thibodeau, S.N., Warren, R.S., Bertagnolli, M.M., Nelson, G.D., Goldberg, R.M., Sargent, D.J., and Alberts, S.R. (2013). Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 3664–3672.

Song, G.G., Kim, J.-H., and Lee, Y.H. (2013). Genome-wide pathway analysis in major depressive disorder. *J. Mol. Neurosci.* MN 51, 428–436.

Song, J.-H., Huels, D.J., Ridgway, R.A., Sansom, O.J., Kholodenko, B.N., Kolch, W., and Cho, K.-H. (2014). The APC Network Regulates the Removal of Mutated Cells from Colonic Crypts. *Cell Rep.* 7, 94–103.

Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and de Villartay, J.-P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26, 7780–7791.

Sourrouille, I., Coulet, F., Lefevre, J.H., Colas, C., Eyries, M., Svrcek, M., Bardier-Dupas, A., Parc, Y., and Soubrier, F. (2013). Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam. Cancer* 12, 27–33.

- Spaepen, M., Neven, E., Sagaert, X., De Hertogh, G., Beert, E., Wimmer, K., Matthijs, G., Legius, E., and Brems, H. (2013). EPCAM germline and somatic rearrangements in Lynch syndrome: identification of a novel 3'EPCAM deletion. *Genes. Chromosomes Cancer* 52, 845–854.
- Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 1130–1134.
- Spies, M., and Fishel, R. (2015). Mismatch Repair during Homologous and Homeologous Recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a022657.
- Stern, J.H., Rutkowski, J.M., and Scherer, P.E. (2016). Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab.* 23, 770–784.
- Stracker, T.H., and Petrini, J.H.J. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 90–103.
- Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., and Petes, T.D. (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365, 274–276.
- Suzuki, N., Ohashi, E., Kolbanovskiy, A., Geacintov, N.E., Grollman, A.P., Ohmori, H., and Shibutani, S. (2002). Translesion synthesis by human DNA polymerase kappa on a DNA template containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-anti-N(2)-BPDE (7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene). *Biochemistry (Mosc.)* 41, 6100–6106.
- Tabernero, J., Yoshino, T., Cohn, A.L., Obermannova, R., Bodoky, G., Garcia-Carbonero, R., Ciuleanu, T.-E., Portnoy, D.C., Van Cutsem, E., Grothey, A., et al. (2015). Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 16, 499–508.
- Takata, A., Otsuka, M., Kojima, K., Yoshikawa, T., Kishikawa, T., Yoshida, H., and Koike, K. (2011). MicroRNA-22 and microRNA-140 suppress NF- $\kappa$ B activity by regulating the expression of NF- $\kappa$ B coactivators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 826–831.
- Teyssier, C., Belguise, K., Galtier, F., Cavailles, V., and Chabos, D. (2003). Receptor-interacting protein 140 binds c-Jun and inhibits estradiol-induced activator protein-1 activity by reversing glucocorticoid receptor-interacting protein 1 effect. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 287–299.
- Therkildsen, C., Bergmann, T.K., Henrichsen-Schnack, T., Ladelund, S., and Nilbert, M. (2014). The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 53, 852–864.
- Thibodeau, S.N., Bren, G., and Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260, 816–819.



- Thompson, B.A., Spurdle, A.B., Plazzer, J.-P., Greenblatt, M.S., Akagi, K., Al-Mulla, F., Bapat, B., Bernstein, I., Capellá, G., den Dunnen, J.T., et al. (2014). Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat. Genet.* *46*, 107–115.
- Tomasetti, C., and Vogelstein, B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* *347*, 78–81.
- Topping, R.P., Wilkinson, J.C., and Scarpinato, K.D. (2009). Mismatch repair protein deficiency compromises cisplatin-induced apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* *284*, 14029–14039.
- Tougeron, D., Fauquembergue, E., Rouquette, A., Le Pessot, F., Sesboué, R., Laurent, M., Berthet, P., Mauillon, J., Di Fiore, F., Sabourin, J.-C., et al. (2009). Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *22*, 1186–1195.
- Tougeron, D., Mouillet, G., Trouilloud, I., Lecomte, T., Coriat, R., Aparicio, T., Des Guetz, G., Lécaille, C., Artru, P., Sickersen, G., et al. (2016). Efficacy of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer With Microsatellite Instability: A Large Multicenter AGEO Study. *J. Natl. Cancer Inst.* *108*.
- Triki, M., Lapierre, M., Cavailles, V., and Mokdad-Gargouri, R. (2017). Expression and role of nuclear receptor coregulators in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* *23*, 4480–4490.
- Tsaalbi-Shtylik, A., Ferrás, C., Pauw, B., Hendriks, G., Temviriyankul, P., Carlée, L., Calléja, F., van Hees, S., Akagi, J.-I., Iwai, S., et al. (2015). Excision of translesion synthesis errors orchestrates responses to helix-distorting DNA lesions. *J. Cell Biol.* *209*, 33–46.
- Tubbs, A., and Nussenzweig, A. (2017). Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* *168*, 644–656.
- Tullet, J.M.A., Pocock, V., Steel, J.H., White, R., Milligan, S., and Parker, M.G. (2005). Multiple signaling defects in the absence of RIP140 impair both cumulus expansion and follicle rupture. *Endocrinology* *146*, 4127–4137.
- Umar, A., Boland, C.R., Terdiman, J.P., Syngal, S., Chapelle, A. de la, Rüschoff, J., Fishel, R., Lindor, N.M., Burgart, L.J., Hamelin, R., et al. (2004). Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 261–268.
- Union internationale contre le cancer, Sobin, L.H., Gospodarowicz, Mary K., Wittekind, C., and Sauvage, M. (2010). TNM classification des tumeurs malignes (Paris: Cassini).
- Vaisman, A., and Woodgate, R. (2001). Unique misinsertion specificity of poliota may decrease the mutagenic potential of deaminated cytosines. *EMBO J.* *20*, 6520–6529.
- Vaisman, A., and Woodgate, R. (2017). Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *52*, 274–303.

Vaisman, A., Masutani, C., Hanaoka, F., and Chaney, S.G. (2000). Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase  $\epsilon$ . *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 4575–4580.

Valeri, N., Gasparini, P., Braconi, C., Paone, A., Lovat, F., Fabbri, M., Sumani, K.M., Alder, H., Amadori, D., Patel, T., et al. (2010a). MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 21098–21103.

Valeri, N., Gasparini, P., Fabbri, M., Braconi, C., Veronese, A., Lovat, F., Adair, B., Vannini, I., Fanini, F., Bottoni, A., et al. (2010b). Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 6982–6987.

Valo, S., Kaur, S., Ristimäki, A., Renkonen-Sinisalo, L., Järvinen, H., Mecklin, J.-P., Nyström, M., and Peltomäki, P. (2015). DNA hypermethylation appears early and shows increased frequency with dysplasia in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas and carcinomas. *Clin. Epigenetics* *7*, 71.

Van Cutsem, E., Labianca, R., Bodoky, G., Barone, C., Aranda, E., Nordlinger, B., Topham, C., Tabernero, J., André, T., Sobrero, A.F., et al. (2009). Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 3117–3125.

Van Cutsem, E., Köhne, C.-H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M.P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S., et al. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 2011–2019.

Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausová, J., Macarulla, T., Ruff, P., van Hazel, G.A., Moiseyenko, V., Ferry, D., et al. (2012). Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 3499–3506.

Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D., and ESMO Guidelines Working Group (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *25 Suppl 3*, iii1-9.

Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J.H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., et al. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *27*, 1386–1422.

Vargas-Parra, G.M., González-Acosta, M., Thompson, B.A., Gómez, C., Fernández, A., Dámaso, E., Pons, T., Morak, M., Del Valle, J., Iglesias, S., et al. (2017). Elucidating the molecular basis of msh2-deficient tumors by combined germline and somatic analysis. *Int. J. Cancer.*

Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Khan, P.M., and Lynch, H.T. (1991). The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum* 34, 424–425.

Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P., and Lynch, H.T. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116, 1453–1456.

Vasen, H.F.A., Blanco, I., Aktan-Collan, K., Gopie, J.P., Alonso, A., Aretz, S., Bernstein, I., Bertario, L., Burn, J., Capella, G., et al. (2013). Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 62, 812–823.

van't Veer, M.B., Brooijmans, A.M., Langerak, A.W., Verhaaf, B., Goudswaard, C.S., Graveland, W.J., van Lom, K., and Valk, P.J.M. (2006). The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 91, 56–63.

Velasco-Miguel, S., Richardson, J.A., Gerlach, V.L., Lai, W.C., Gao, T., Russell, L.D., Hladik, C.L., White, C.L., and Friedberg, E.C. (2003). Constitutive and regulated expression of the mouse Dinb (Polkappa) gene encoding DNA polymerase kappa. *DNA Repair* 2, 91–106.

Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484–487.

Vilar, E., Scaltriti, M., Balmaña, J., Saura, C., Guzman, M., Arribas, J., Baselga, J., and Tabernero, J. (2008). Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 99, 1607–1612.

Vivante, A., Mann, N., Yonath, H., Weiss, A.-C., Getwan, M., Kaminski, M.M., Bohnenpoll, T., Teyssier, C., Chen, J., Shril, S., et al. (2017). A Dominant Mutation in Nuclear Receptor Interacting Protein 1 Causes Urinary Tract Malformations via Dysregulation of Retinoic Acid Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 28, 2364–2376.

Vo, N., Fjeld, C., and Goodman, R.H. (2001a). Acetylation of nuclear hormone receptor-interacting protein RIP140 regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6181–6188.

Vo, N., Fjeld, C., and Goodman, R.H. (2001b). Acetylation of nuclear hormone receptor-interacting protein RIP140 regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6181–6188.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013a). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013b). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558.

Wada-Hiraike, O., Yano, T., Nei, T., Matsumoto, Y., Nagasaka, K., Takizawa, S., Oishi, H., Arimoto, T., Nakagawa, S., Yasugi, T., et al. (2005). The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator of oestrogen receptor alpha. *Br. J. Cancer* 92, 2286–2291.

- Walsh, M.D., Buchanan, D.D., Cummings, M.C., Pearson, S.-A., Arnold, S.T., Clendenning, M., Walters, R., McKeone, D.M., Spurdle, A.B., Hopper, J.L., et al. (2010). Lynch syndrome-associated breast cancers: clinicopathologic characteristics of a case series from the colon cancer family registry. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 2214–2224.
- Wang, Y., Seimiya, M., Kawamura, K., Yu, L., Ogi, T., Takenaga, K., Shishikura, T., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Tagawa, M., et al. (2004). Elevated expression of DNA polymerase kappa in human lung cancer is associated with p53 inactivation: Negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.* *25*, 161–165.
- Warnick, C.T., Dabbas, B., Ford, C.D., and Strait, K.A. (2001). Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 27363–27370.
- Watson, P., Lin, K.M., Rodriguez-Bigas, M.A., Smyrk, T., Lemon, S., Shashidharan, M., Franklin, B., Karr, B., Thorson, A., and Lynch, H.T. (1998). Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. *Cancer* *83*, 259–266.
- Watson, P., Vasen, H.F.A., Mecklin, J.-P., Bernstein, I., Aarnio, M., Järvinen, H.J., Myrhøj, T., Sunde, L., Wijnen, J.T., and Lynch, H.T. (2008). The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *123*, 444–449.
- Wei, L.N., Hu, X., Chandra, D., Seto, E., and Farooqui, M. (2000). Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J. Biol. Chem.* *275*, 40782–40787.
- Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., et al. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* *38*, 787–793.
- White, R., Leonardsson, G., Rosewell, I., Ann Jacobs, M., Milligan, S., and Parker, M. (2000). The nuclear receptor co-repressor nr1p (RIP140) is essential for female fertility. *Nat. Med.* *6*, 1368–1374.
- Williams, H.L., Gottesman, M.E., and Gautier, J. (2012). Replication-independent repair of DNA interstrand crosslinks. *Mol. Cell* *47*, 140–147.
- Wilson, R.C., Jackson, M.A., and Pata, J.D. (2013). Y-family polymerase conformation is a major determinant of fidelity and translesion specificity. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *21*, 20–31.
- Wilson, T.M., Vaisman, A., Martomo, S.A., Sullivan, P., Lan, L., Hanaoka, F., Yasui, A., Woodgate, R., and Gearhart, P.J. (2005). MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase eta, suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *J. Exp. Med.* *201*, 637–645.
- Win, A.K., Young, J.P., Lindor, N.M., Tucker, K.M., Ahnen, D.J., Young, G.P., Buchanan, D.D., Clendenning, M., Giles, G.G., Winship, I., et al. (2012). Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 958–964.
- Win, A.K., Lindor, N.M., and Jenkins, M.A. (2013). Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review. *Breast Cancer Res. BCR* *15*, R27.

- Win, A.K., Dowty, J.G., Cleary, S.P., Kim, H., Buchanan, D.D., Young, J.P., Clendenning, M., Rosty, C., MacInnis, R.J., Giles, G.G., et al. (2014). Risk of colorectal cancer for carriers of mutations in MUTYH, with and without a family history of cancer. *Gastroenterology* *146*, 1208-1211.e1-5.
- Wit, N., Buoninfante, O.A., van den Berk, P.C.M., Jansen, J.G., Hogenbirk, M.A., de Wind, N., and Jacobs, H. (2015). Roles of PCNA ubiquitination and TLS polymerases  $\kappa$  and  $\eta$  in the bypass of methyl methanesulfonate-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res.* *43*, 282–294.
- Woerner, S.M., Tosti, E., Yuan, Y.P., Kloor, M., Bork, P., Edelmann, W., and Gebert, J. (2015). Detection of coding microsatellite frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient mouse intestinal tumors. *Mol. Carcinog.* *54*, 1376–1386.
- Wu, J., Li, L., Wang, P., You, C., Williams, N.L., and Wang, Y. (2016). Translesion synthesis of O4-alkylthymidine lesions in human cells. *Nucleic Acids Res.*
- Wu, Z., Zheng, S., and Yu, Q. (2009). The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 2389–2397.
- Xie, K., Doles, J., Hemann, M.T., and Walker, G.C. (2010). Error-prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 20792–20797.
- York, S.J., and Modrich, P. (2006). Mismatch repair-dependent iterative excision at irreparable O6-methylguanine lesions in human nuclear extracts. *J. Biol. Chem.* *281*, 22674–22683.
- Yu, Y., Yang, J., Zhu, F., and Xu, F. (2004). Response of REV3 promoter to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat. Res.* *550*, 49–58.
- Yuan, R., Meng, Q., Nautiyal, J., Flurkey, K., Tsaih, S.-W., Krier, R., Parker, M.G., Harrison, D.E., and Paigen, B. (2012). Genetic coregulation of age of female sexual maturation and lifespan through circulating IGF1 among inbred mouse strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 8224–8229.
- Yurgelun, M.B., Goel, A., Hornick, J.L., Sen, A., Turgeon, D.K., Ruffin, M.T., Marcon, N.E., Baron, J.A., Bresalier, R.S., Syngal, S., et al. (2012). Microsatellite Instability and DNA Mismatch Repair Protein Deficiency in Lynch Syndrome Colorectal Polyps. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* *5*, 574–582.
- Zaanan, A., Cuilliere-Dartigues, P., Guilloux, A., Parc, Y., Louvet, C., de Gramont, A., Tiret, E., Dumont, S., Gayet, B., Validire, P., et al. (2010). Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *21*, 772–780.
- Zaanan, A., Fléjou, J.-F., Emile, J.-F., Des, G.G., Cuilliere-Dartigues, P., Malka, D., Lecaille, C., Validire, P., Louvet, C., Rougier, P., et al. (2011). Defective mismatch repair status as a prognostic biomarker of disease-free survival in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 7470–7478.



Zafar, M.K., and Eoff, R.L. (2017). Translesion DNA synthesis in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Chem. Res. Toxicol.*

Zeichner, S.B., Raj, N., Cusnir, M., Francavilla, M., and Hirzel, A. (2012). A De Novo Germline APC Mutation (3927del5) in a Patient with Familial Adenomatous Polyposis: Case Report and Literature Review. *Clin. Med. Insights Oncol.* 6, 315–323.

Zhang, J., and Walter, J.C. (2014). Mechanism and regulation of incisions during DNA interstrand cross-link repair. *DNA Repair* 19, 135–142.

Zhang, D., Wang, Y., Dai, Y., Wang, J., Suo, T., Pan, H., Liu, H., Shen, S., and Liu, H. (2015). Downregulation of RIP140 in hepatocellular carcinoma promoted the growth and migration of the cancer cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36, 2077–2085.

Zhang, D.-G., Zheng, J.-N., and Pei, D.-S. (2014a). P53/microRNA-34-induced metabolic regulation: new opportunities in anticancer therapy. *Mol. Cancer* 13, 115.

Zhang, M., Xiang, S., Joo, H.-Y., Wang, L., Williams, K.A., Liu, W., Hu, C., Tong, D., Haakenson, J., Wang, C., et al. (2014b). HDAC6 deacetylates and ubiquitinates MSH2 to maintain proper levels of MutS $\alpha$ . *Mol. Cell* 55, 31–46.

Zhang, X., Lv, L., Chen, Q., Yuan, F., Zhang, T., Yang, Y., Zhang, H., Wang, Y., Jia, Y., Qian, L., et al. (2013). Mouse DNA polymerase kappa has a functional role in the repair of DNA strand breaks. *DNA Repair* 12, 377–388.

Zhao, Y., Biertümpfel, C., Gregory, M.T., Hua, Y.-J., Hanaoka, F., and Yang, W. (2012). Structural basis of human DNA polymerase  $\eta$ -mediated chemoresistance to cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 7269–7274.

Zhou, B., Huang, C., Yang, J., Lu, J., Dong, Q., and Sun, L.-Z. (2009). Preparation of heteroduplex enhanced green fluorescent protein plasmid for in vivo mismatch repair activity assay. *Anal. Biochem.* 388, 167–169.

Zhou, J., Zhang, S., Xie, L., Liu, P., Xie, F., Wu, J., Cao, J., and Ding, W.-Q. (2012). Overexpression of DNA polymerase iota (Pol $\iota$ ) in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 103, 1574–1579.

Zhu, H., Fan, Y., Jiang, H., Shen, J., Qi, H., Mei, R., and Shao, J. (2010). Response of human DNA polymerase  $\iota$  promoter to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29, 79–86.

Zhu, H., Fan, Y., Shen, J., Qi, H., and Shao, J. (2012). Characterization of human DNA polymerase  $\kappa$  promoter in response to benzo[a]pyrene diol epoxide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 205–211.

Zhuo, M., Gorgun, M.F., and Englander, E.W. (2017). Translesion Synthesis DNA Polymerase Kappa Is Indispensable for DNA Repair Synthesis in Cisplatin Exposed Dorsal Root Ganglion Neurons. *Mol. Neurobiol.*

Zlatanou, A., Despras, E., Braz-Petta, T., Boubakour-Azzouz, I., Pouvelle, C., Stewart, G.S., Nakajima, S., Yasui, A., Ishchenko, A.A., and Kannouche, P.L. (2011). The hMsh2-hMsh6

complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol  $\eta$  in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol. Cell* 43, 649–662.

Zoratto, F., Rossi, L., Verrico, M., Papa, A., Basso, E., Zullo, A., Tomao, L., Romiti, A., Lo Russo, G., and Tomao, S. (2014). Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 35, 6195–6206.

Zschiedrich, I., Hardeland, U., Krones-Herzig, A., Berriel Diaz, M., Vegiopoulos, A., Müggenburg, J., Sombroek, D., Hofmann, T.G., Zawatzky, R., Yu, X., et al. (2008). Coactivator function of RIP140 for NFkappaB/RelA-dependent cytokine gene expression. *Blood* 112, 264–276.

## ETUDE DU ROLE DU COREGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL RIP140 DANS LE CONTROLE DE L'INSTABILITE MICROSATELLITAIRE DES CANCERS COLORECTAUX HEREDITAIRES

Le corégulateur transcriptionnel RIP140 est un facteur ubiquitaire majeur impliqué dans la régulation de nombreux processus physiopathologiques, qui possède la capacité d'être un coactivateur ou un corépresseur des voies de signalisation selon son recrutement sur les gènes cible. Des résultats du laboratoire ont montré que RIP140 est un facteur de bon pronostic de la tumorigenèse intestinale sporadique. Ce travail s'intéresse à l'implication de ce facteur de transcription dans les cancers colorectaux familiaux et, plus particulièrement, en lien avec le syndrome de Lynch (LS). Le syndrome de Lynch est une prédisposition héréditaire aux cancers, majoritairement colorectaux, caractérisés par un défaut du système de réparation des mésappariements de l'ADN (*Mismatch Repair*, MMR), dû à une première mutation germinale d'un des gènes de ce système. La perte de fonctionnalité MMR est responsable du phénotype d'instabilité microsatellitaire (MSI). Cependant, il existe des formes familiales de cancers colorectaux, avec MSI, où il n'est pas retrouvé d'atteinte germinale ou somatique de l'un des gènes du système MMR. Ce sont les syndromes apparentés au syndrome de Lynch (*Lynch Like Syndrome*, LLS) dont la prise en charge est identique à celle du LS. L'utilisation de modèles murins et de lignées cellulaires colorectales, présentant des modulations d'expression de RIP140 ont permis de mettre en évidence l'effet positif de ce corégulateur sur la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes du système MMR, *MSH2* et *MSH6*. La validité fonctionnelle de cette régulation a été explorée par des analyses d'instabilité microsatellitaire et de sensibilité à différentes molécules cytotoxiques. Des cohortes de tumeurs ont permis de confirmer la corrélation d'expression entre RIP140 et les gènes *MSH2* et *MSH6* chez les patients. En outre, la régulation de l'expression par RIP140 d'une polymérase translésionnelle particulière, la polymérase Polk, a été étudiée. Cette polymérase assure la réplication des séquences microsatellitaires du génome. Nous avons démontré que RIP140 stimule l'expression du gène *POLK* dans nos modèles cellulaires et que son expression est corrélée à celle de RIP140 au sein des tumeurs colorectales humaines. Enfin, par séquençage de différentes lignées cellulaires, nous avons mis en évidence une mutation de RIP140 qui entraîne un décalage du cadre de lecture et génère une protéine tronquée avec perte de deux domaines répresseurs de la protéine. Un séquençage à très haut débit nous a permis de rechercher cette mutation parmi des échantillons de tumeurs colorectales avec MSI. Cette mutation est retrouvée dans 19% des tumeurs, notamment LLS (16,2%), où elle est associée à une moins bonne survie globale. Elle affecte les propriétés antiprolifératives et transrépressives de RIP140 ainsi que les régulations positives des gènes *MSH2*, *MSH6* et *POLK*. Le développement d'un outil anticorps spécifique de cette mutation serait extrêmement utile pour suivre l'expression de la forme mutée au sein des tumeurs et des premiers essais ont été réalisés en ce sens. En conclusion de ce travail, RIP140 contrôle l'expression de gènes majeurs impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome et une mutation de ce corégulateur transcriptionnel pourrait être responsable de l'instabilité microsatellitaire de certaines tumeurs où des altérations des gènes MMR ne sont pas retrouvées. Des études cliniques sur des cohortes plus conséquentes seront nécessaires pour valider son intérêt en tant que marqueur utilisable dans la prise en charge des patients.

Mots clés : Cancer colorectal, RIP140, régulation transcriptionnelle, réparation de l'ADN, instabilité microsatellitaire

### ROLE OF THE TRANSCRIPTIONAL COREGULATOR RIP140 IN THE CONTROL OF MICROSATELLITE INSTABILITY IN HEREDITARY COLORECTAL CANCER

The transcriptional coregulator RIP140 is an ubiquitous cofactor playing a major role in the regulation of many physiopathological processes. It can either act as a coactivator or as a corepressor of signaling pathways depending on its recruitment on target genes. It has been shown that RIP140 is a good prognostic marker in sporadic intestinal tumorigenesis. This work focuses on its role in familial colorectal cancers and particularly in relation to the Lynch syndrome (LS). Lynch syndrome is a hereditary cancer predisposition, mostly colorectal, characterized by a defect in the Mismatch Repair (MMR) system, due to a first germline mutation of one gene of this system. Loss of MMR function induces a microsatellite instability (MSI) phenotype. However, there are some MSI familial colorectal cancers, where neither germinal nor somatic alteration of one MMR gene is found. They are referred to as Lynch like Syndrome (LLS) and their overall management is identical to that of LS. Murine models and colorectal cell lines, harboring modulations of RIP140 expression, allowed us to demonstrate the positive transcriptional regulation of the MMR genes, *MSH2* and *MSH6* by RIP140. Functional validation of this regulation was explored by microsatellite instability and sensitivity to various cytotoxic drugs analyses. A positive correlation has been confirmed between *RIP140* and *MSH2* and *MSH6* gene expression in a cohort of 396 patients. Moreover, the transcriptional regulation by RIP140 of a specialized translesional DNA polymerase, the Polk polymerase, has been investigated. Polk ensures microsatellite sequences replication. We have demonstrated that RIP140 positively stimulates the expression of the *POLK* gene in our cell models and which appears correlated with that of RIP140 in human colorectal tumors. Finally, by sequencing different cell lines, we found a frameshift mutation of RIP140, generating a truncated protein with loss of the last two repression domains. High-throughput sequencing allowed us to look for this mutation in patient MSI colorectal tumor samples. This mutation was found in 19% of these tumors, especially LLS (16.2%), where it has been associated with lower overall survival. This mutation affects the antiproliferative and transrepressive properties of RIP140, as well as the positive regulation of the *MSH2*, *MSH6* and *POLK* gene. Development of a specific antibody for this mutation would be extremely useful in following the expression of this mutated form within tumors and first tests have been already carried out. In conclusion, RIP140 controls expression of major genes involved in genome integrity maintenance and a mutation of this transcriptional coregulator could be responsible for microsatellite instability of some tumors where alterations of MMR genes are not found. Clinical studies on larger cohorts will be necessary to validate its interest as a marker usable in patient management.

Keywords: Colorectal cancer, RIP140, transcriptional regulation, DNA repair, microsatellite instability