



Activation de la protéine p53 par l'irradiation laser dans l'ultraviolet lointain

Catherine Chapel¹, Evelyne May², Monique Vacher³
et D. Courant¹

¹ DSV/DRR/SRBF, CEA, Fontenay aux Roses

²CNRS UPR 9045, Institut André Lwoff, Villejuif

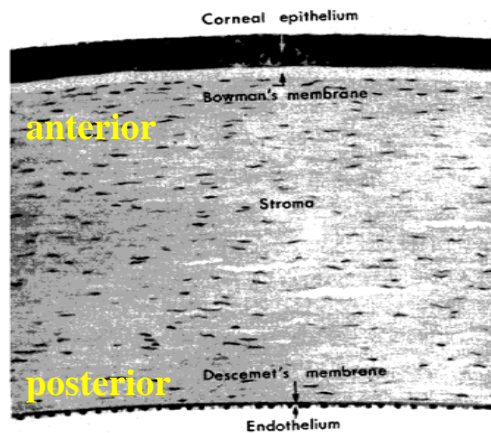
³Laboratoire de Radiobiologie de l'ADN, DSV/DRR, CEA, Fontenay aux Roses,

- Le rayonnement à 193 nm émis par le laser à excimères ArF est utilisé en ophtalmologie pour la chirurgie de la réfraction (PKR, et LASIK).
- La photoablation élimine ou endommage :
 - L'épithélium cornéen et la membrane basale
 - Le stroma cornéen et les kératocytes
 - Les cellules endothéliales
- Données partielles voire contradictoires



Coupe histologique de cornée humaine

keratocytes



← Epithelium

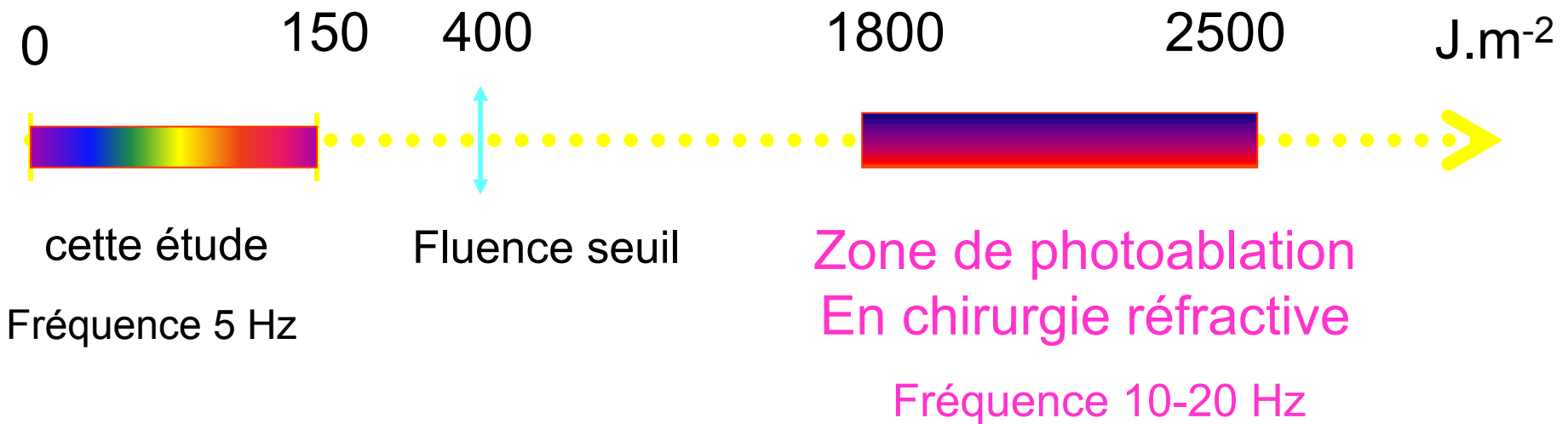
← Stroma

← Endothelium

Objectif



- La photoablation par laser UV 193 nm expose les cellules viables, autour de la zone traitée, à des doses sub-ablatives d'un rayonnement constitué de photons de haute énergie (6.4 eV)

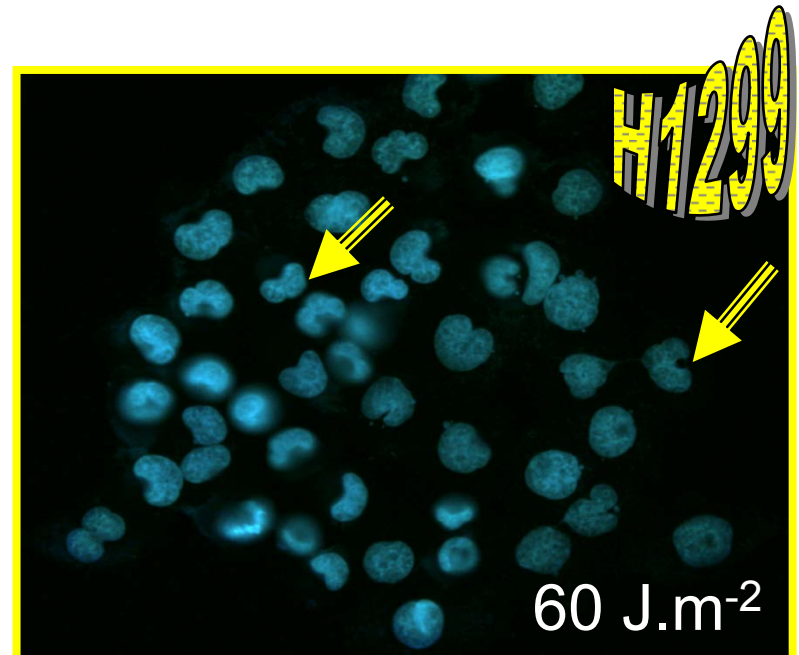


L'absence de p53 augmente la sensibilité à l'irradiation Laser



Cellular Type	D37 Laser 193 nm	D37 254 nm	p53 statut
H1299	62,1 J. m ⁻²	12,6 J. m ⁻²	absence
RKO	174,5 J. m ⁻²	28,1 J. m ⁻²	Wild type

L'absence de p53 induit une réduction de la capacité à former des colonies après irradiation. Observé après UVC 254 nm, corrélé à une diminution des mécanismes de réparation. Smith *et al.*, 2000

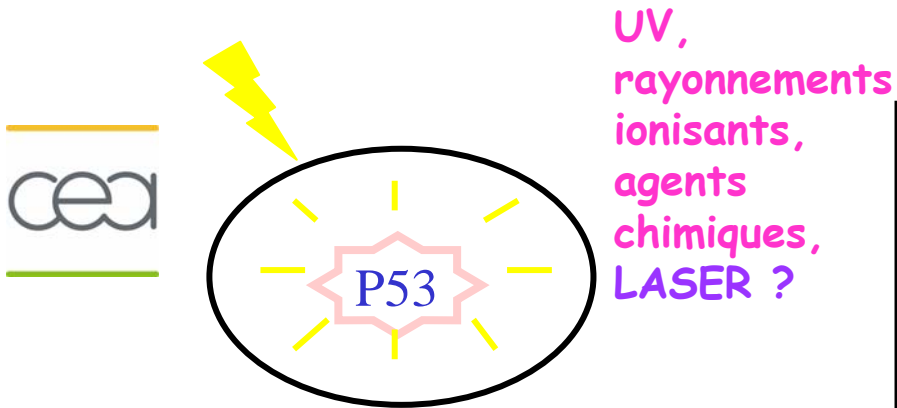


D37 : Dose at which 37% of surviving cells

H1299 : Human non-small lung carcinoma cells

RKO: Human colorectal carcinoma cells

La protéine P53

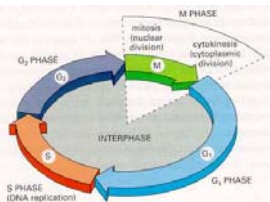


Arrêt du cycle cellulaire
G1 ou G2/M

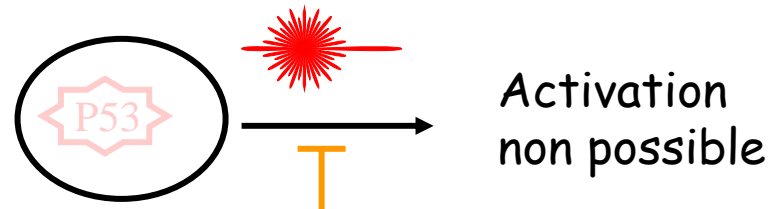
Réparations

cycle

Apoptose

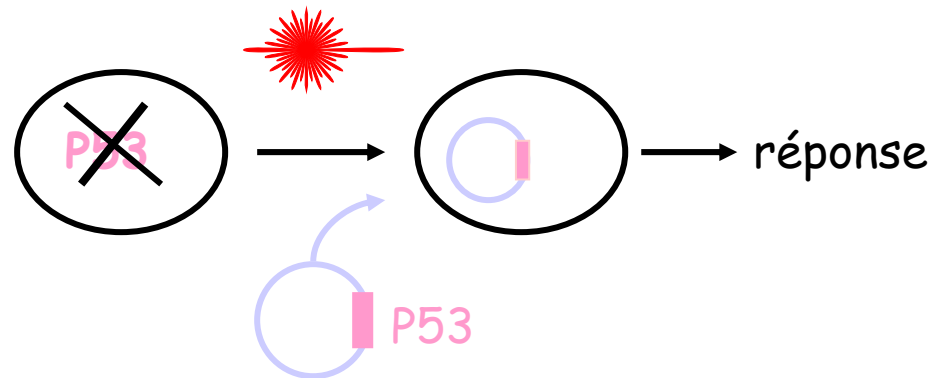


Stratégies possibles

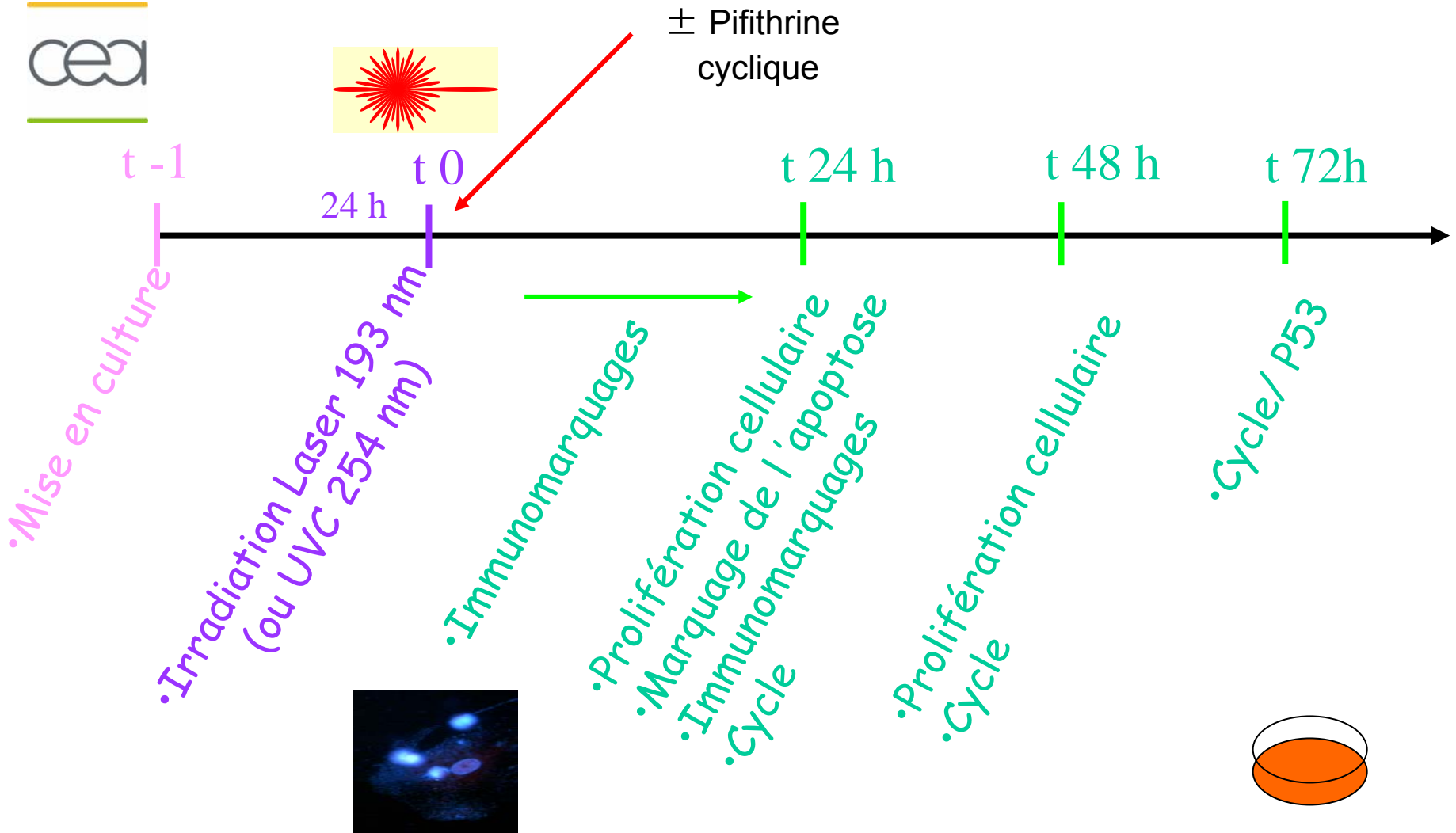


- Antisens
- inhibiteur (PFT)

ou

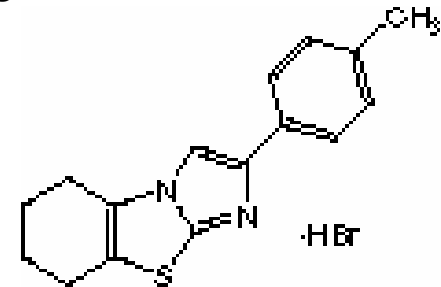


Approche expérimentale



La pifithrine : un inhibiteur réversible de p53

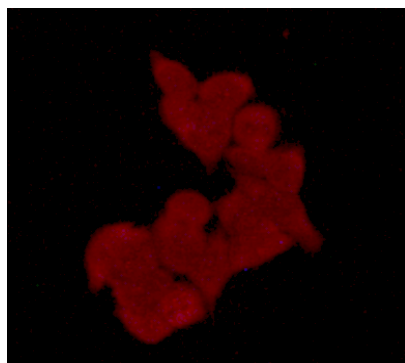
- La pifithrine est un inhibiteur réversible de la p53. Komarov et al., 1999
- Pifithrin- α permet de démontrer l'implication de p53 suite à un stress
- Gammes utilisées : 10-50 μ M
- Forme cyclique utilisée plus stable
- Dans notre étude : Non toxique pour les cellules (WST-1 et BrdU)



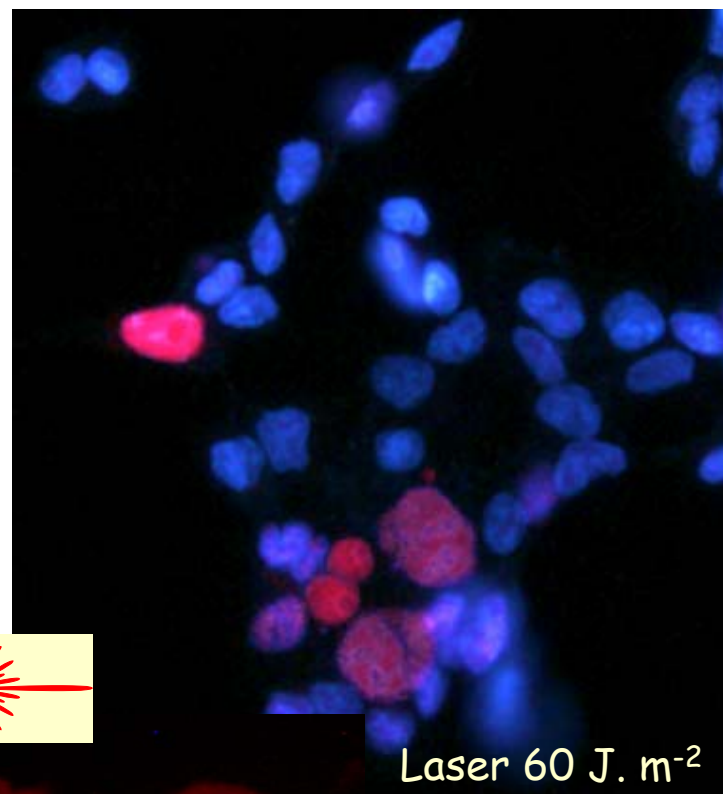
•Pifithrin cyclique

2-(4-methylphenyl)imidazo[2,1-b]-5,6,7,8-tetrahydrobenzothiazole, HBr
Calbiochem

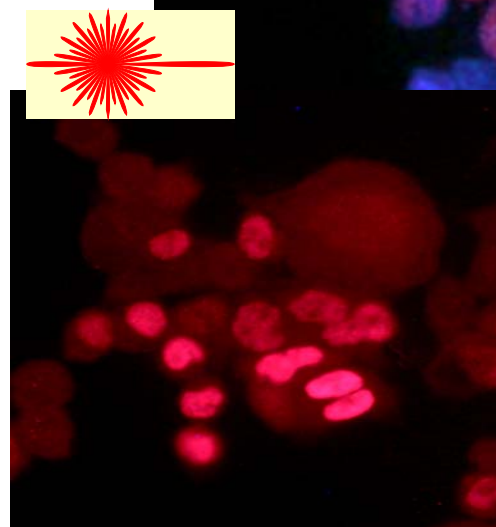
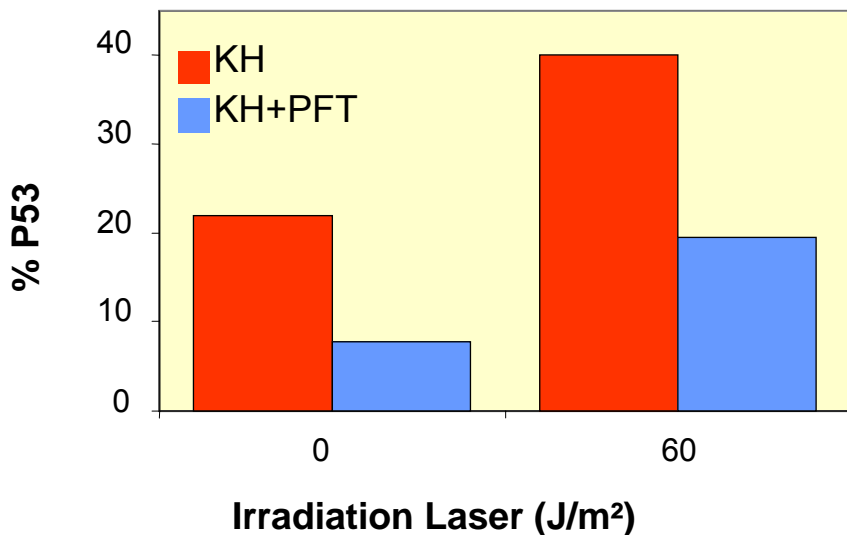
Activation de la P53 après irradiation Laser 1/2



Non irradiées



Laser 60 J. m⁻²



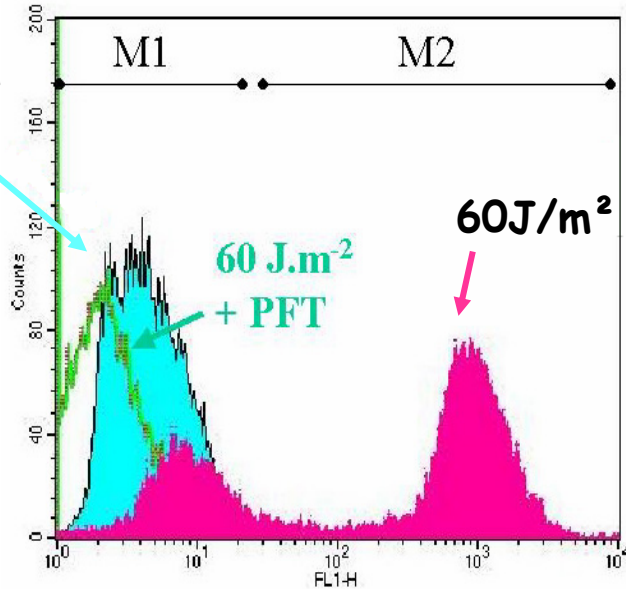
Ac: Anti p53 DO7
Gift from E. May

Marquage P53
24 heures après irradiation Laser (n=500)

Activation de la P53 après irradiation Laser 2/2

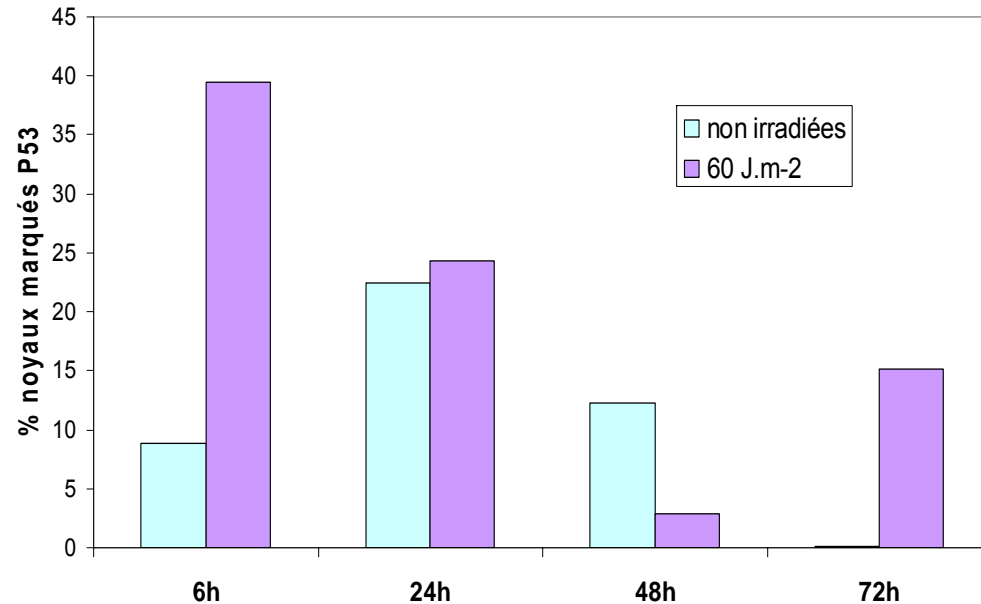


Non irradiées
avec ou sans
PFT



Marquage P53
72 heures après irradiation Laser
Protocole selon Bassi et al., 2002

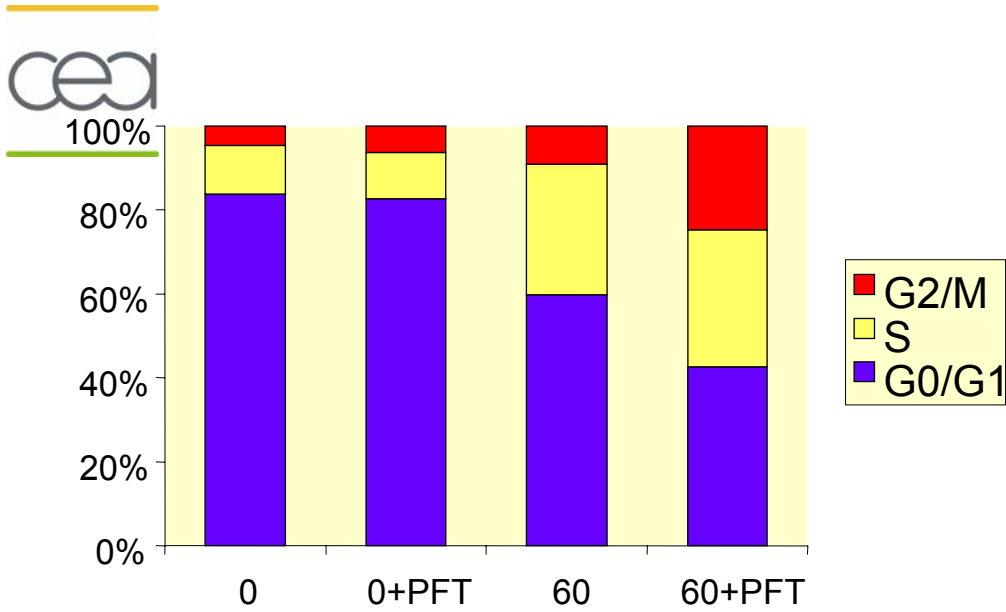
Mesure de l'activation par cytométrie de flux



Cinétique d'expression de p53
après irradiation Laser
Immunofluorescence

300 < Nb noyaux analysés < 1000

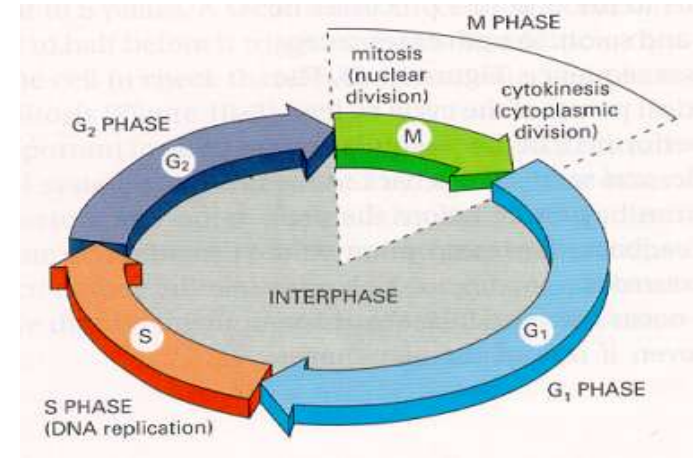
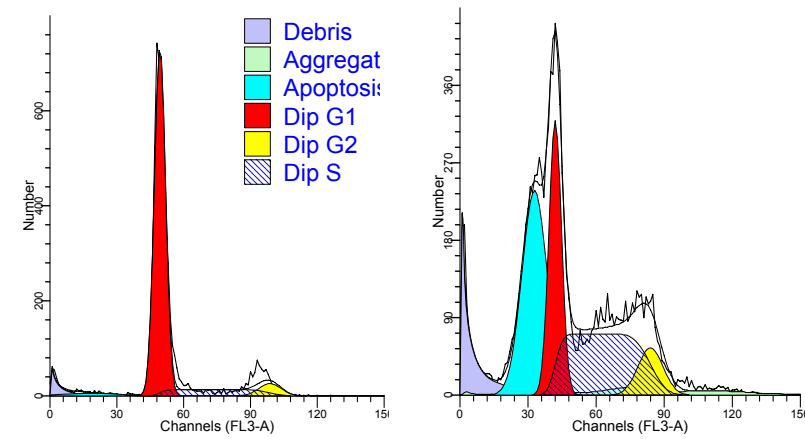
L'irradiation Laser entraîne une augmentation des phases S et G2



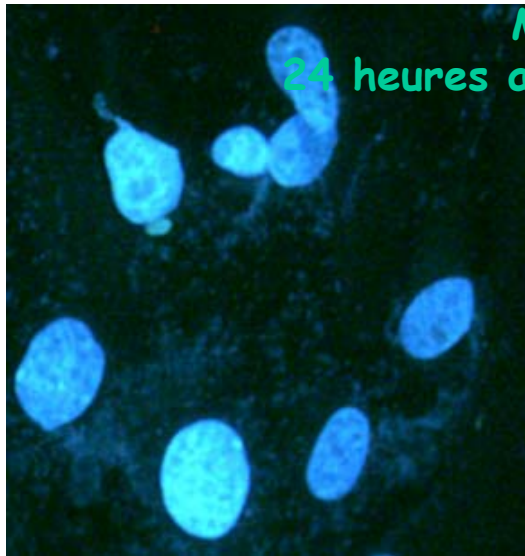
Irradiation Laser (J/m²)

Pourcentage des différentes phases du cycle cellulaire des kératocytes humains 72h après irradiation Laser

Non irradié 60 J/m²

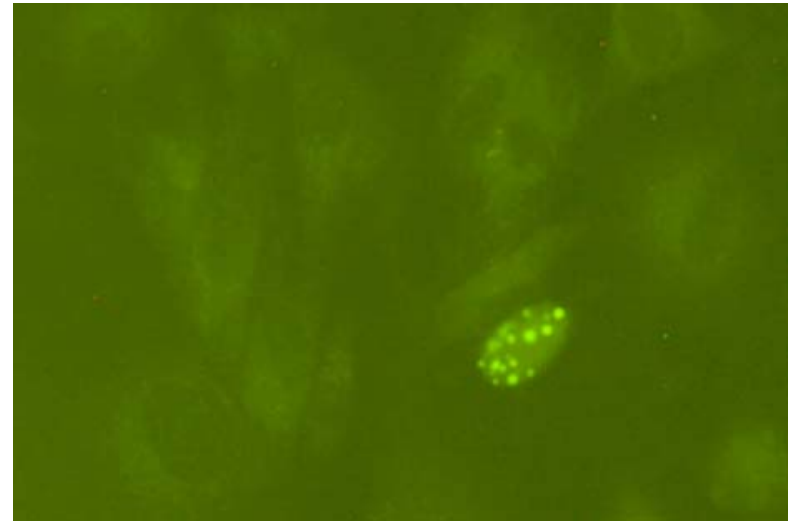
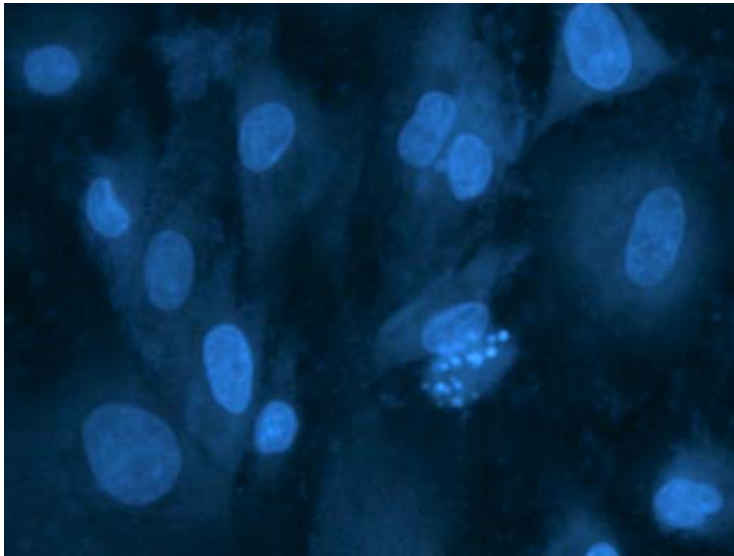


L'irradiation Laser à 193 nm déclenche la mort cellulaire



Marquage TUNEL

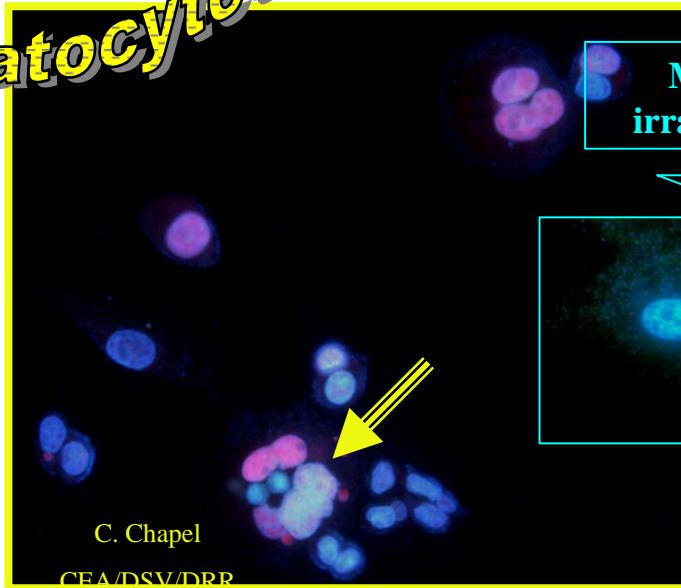
24 heures après irradiation Laser (n=500)



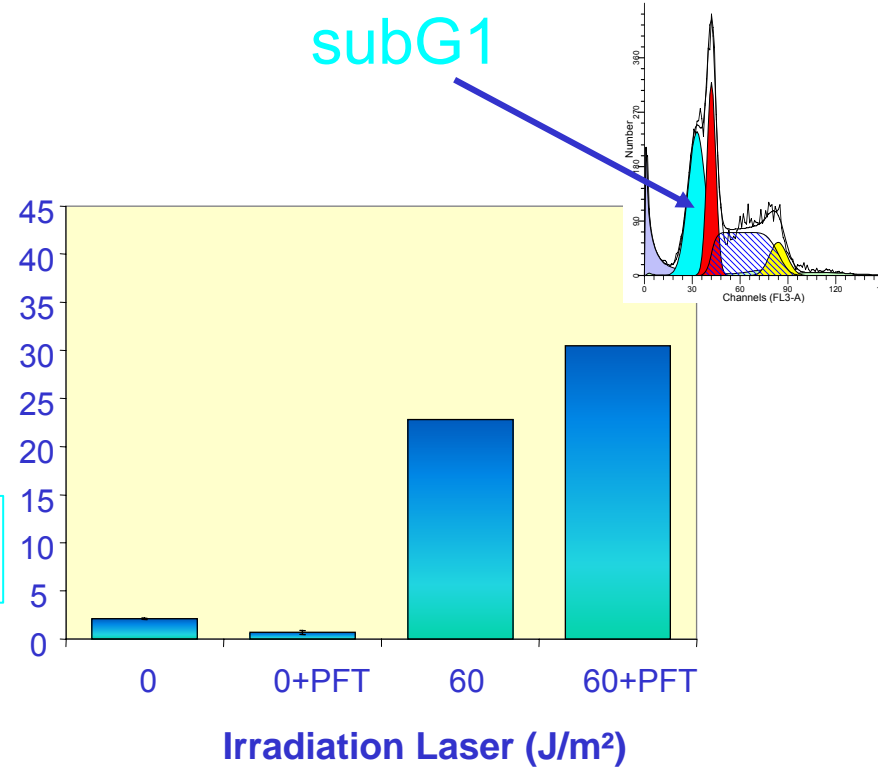
Cytotoxicité du rayonnement Laser : Apoptose



Human Keratocytes



% subG1



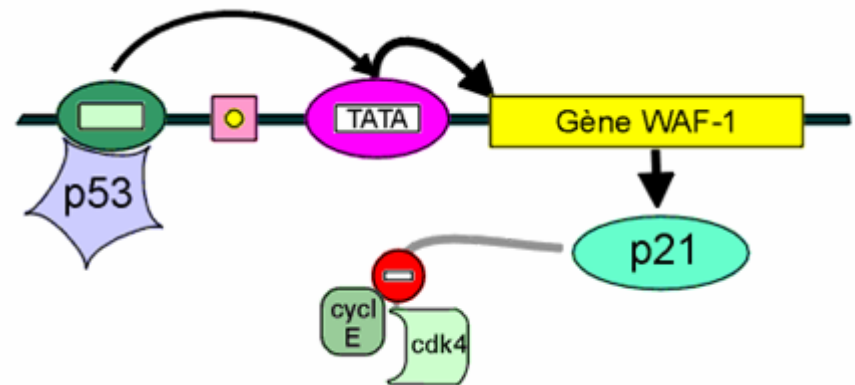
Pourcentage de sub-G1 72h après irradiation Laser
Cytométrie de flux

La protéine p21

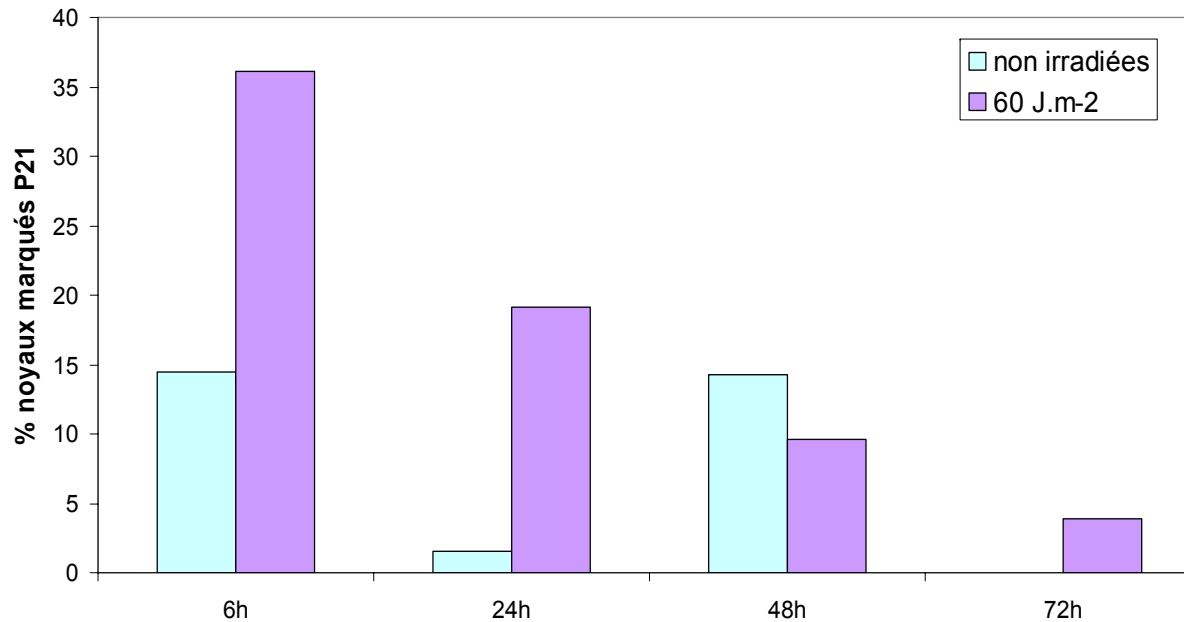
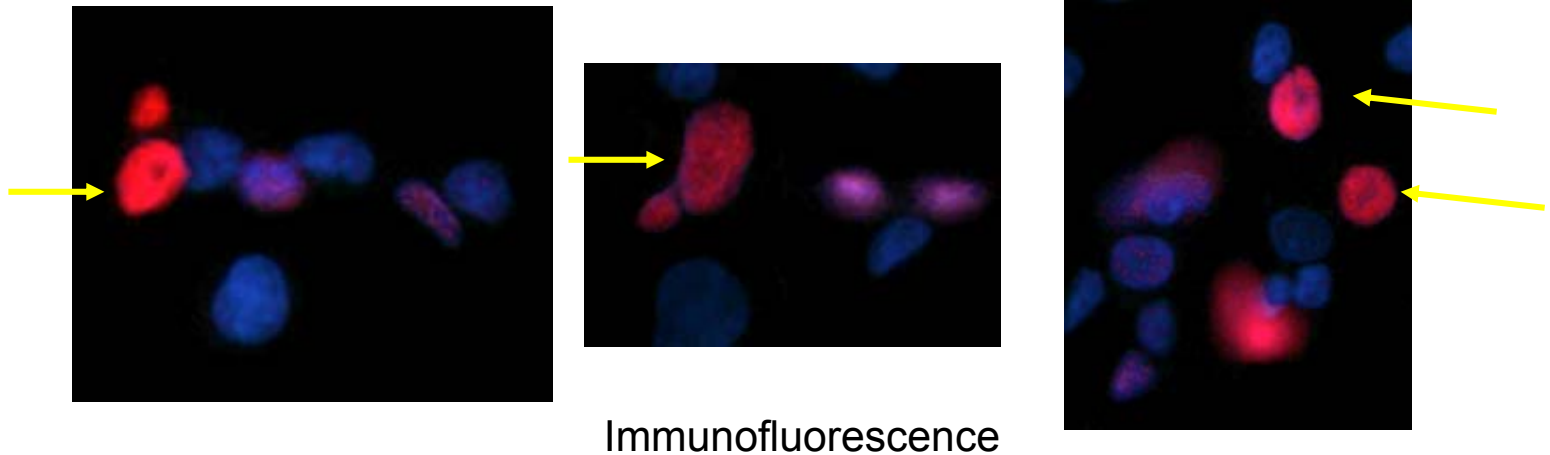
- La protéine p53 se lie avec le promoteur du gène WAF1 / Cip1 (pour Wild Type p53-activated fragment et cdk2 inhibiting protein) codant pour la protéine p21

- La liaison de la protéine p21 aux kinases cdk2, inhibe leur activité et bloque le cycle cellulaire

- Rôles clé dans la croissance et la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN



Cinétique d'expression de p21 après irradiation Laser



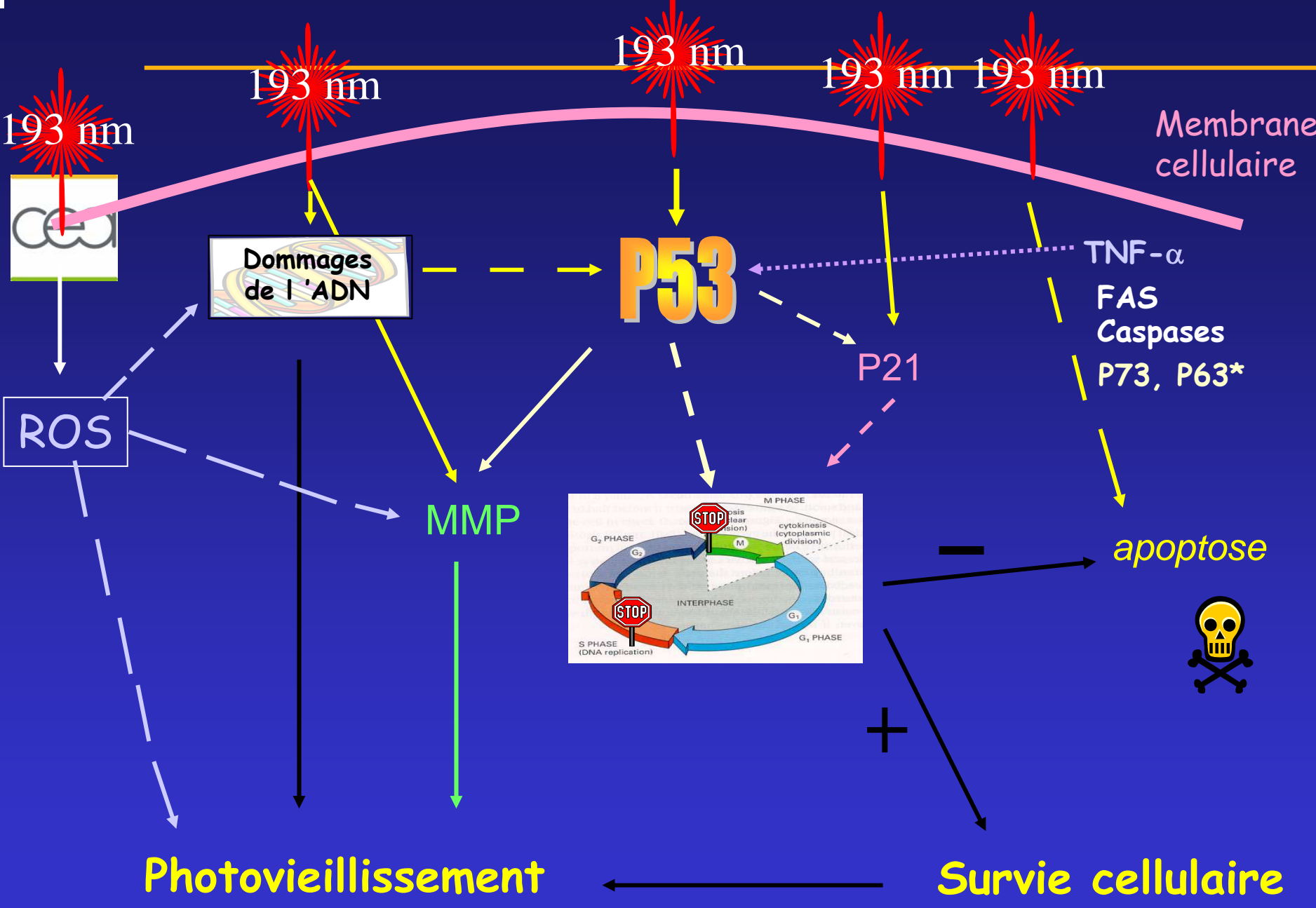
Nb noyaux analysés > 1000
Ac: Anti WAF1 (Ab6)

LASER UV-C 193 nm

- Accumulation de P53.
- Arrêt en phases S et G2/M.
- Augmentation de l'apoptose.
- Accumulation de P21.

LASER 193 nm + Inhibition de p53

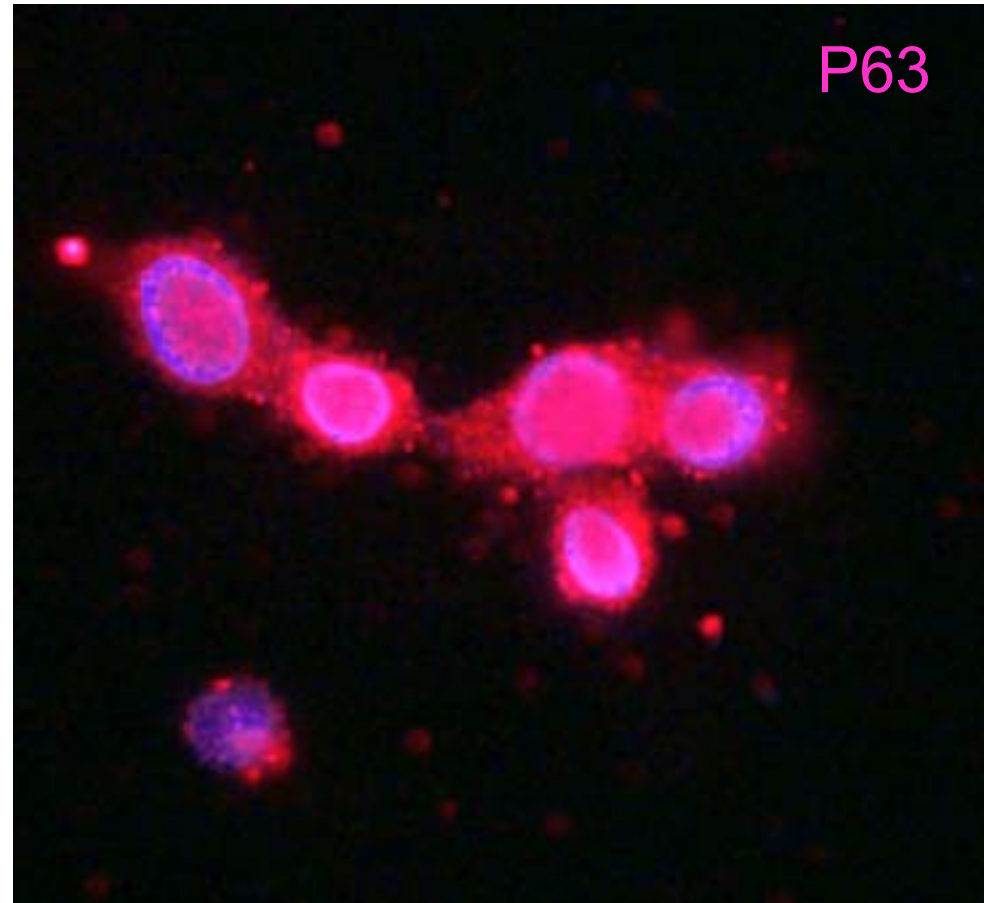
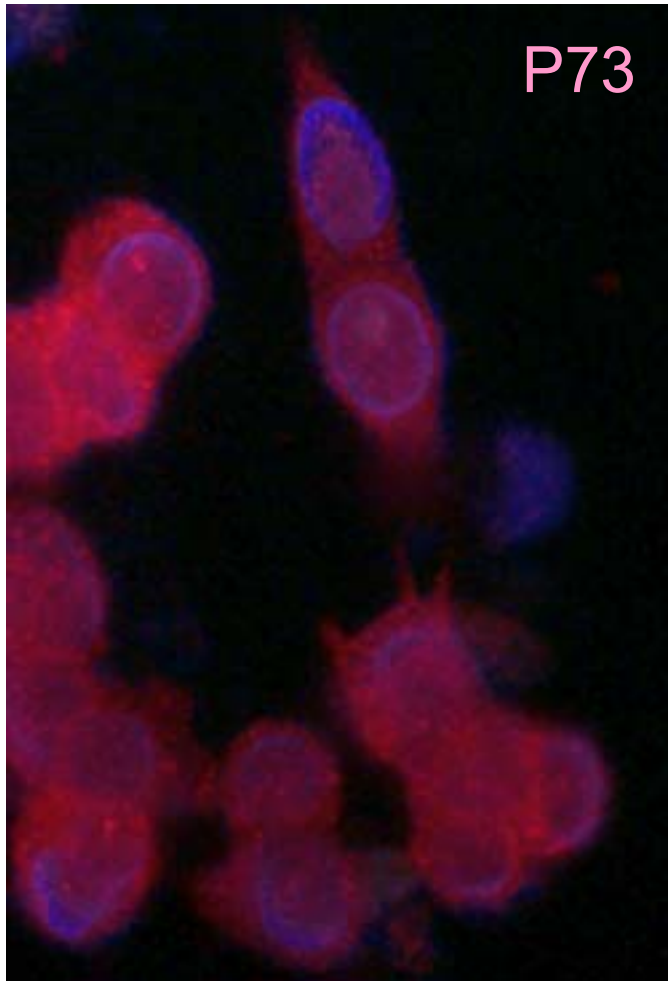
- Augmentation plus importante de l'arrêt en phase G2/M.
- Apoptose plus élevée.
- Accumulation de P21 ⇒ autres voies d'activation ?



Photovieillissement

Survie cellulaire

Présence des protéines de la famille P53



Activation après irradiation à 30 J.m^{-2} UV-C 254 nm