



Analyses globales et nouveaux indicateurs d'exposition dans les cellules de l'épiderme humain

**Service de Génomique Fonctionnelle
CEA, Evry**

Accidents d'irradiation

1. Identifier les personnes exposées dans une population ?

2. Estimer une dose reçue ?

**Tests classiques : un gène, une
protéine marqueur**

**Génomique fonctionnelle : puces à ADN
ensemble des gènes humains**

**Première application à la dosimétrie biologique :
S Amundson, Rad Res, 2000
human lymphocytes**



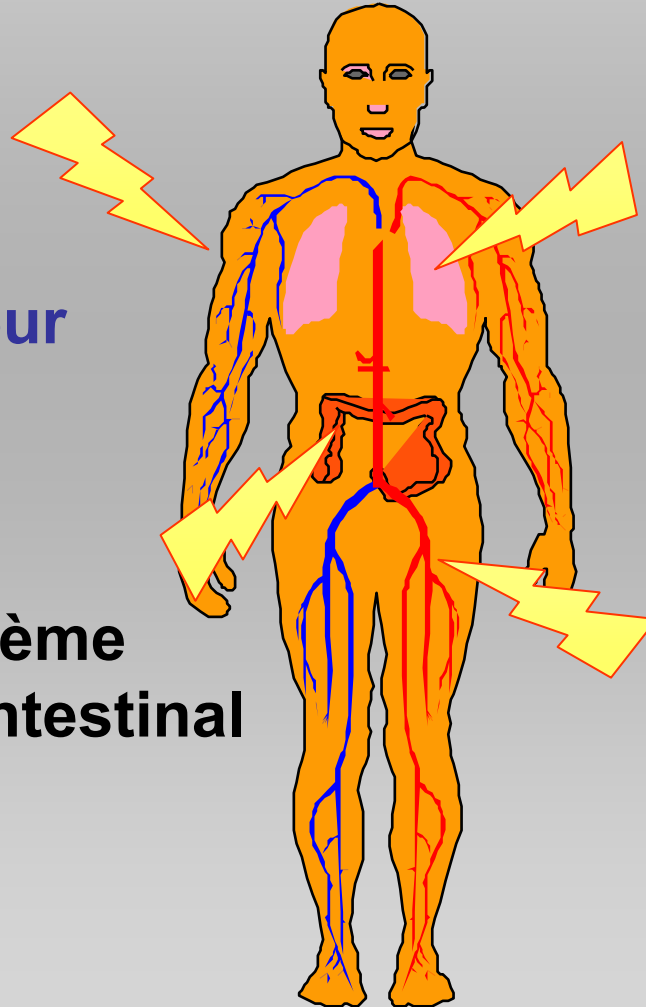
Exposition humaine après accidents ou radiothérapie

peau



première
cible

indicateur



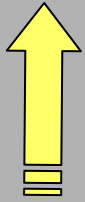
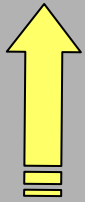
poumon

système
gastrointestinal

système
hématopoïétique

Organisation de l'épiderme humain

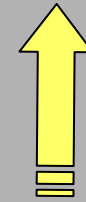
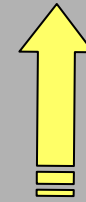
couche cornée



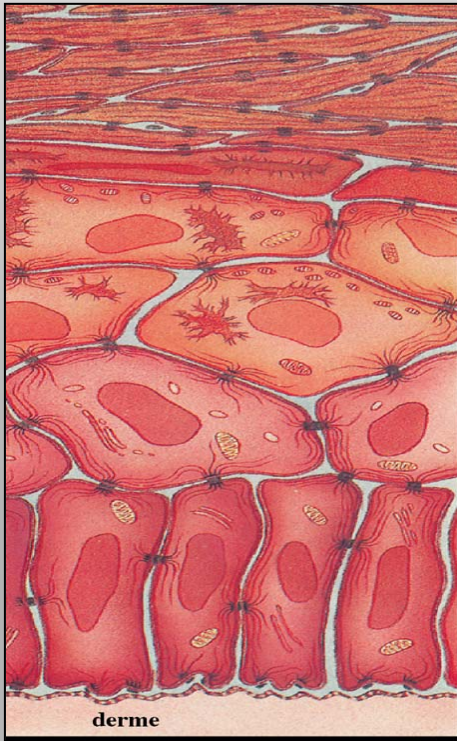
Couche basale
cellules
souches



**différenciation
terminale**



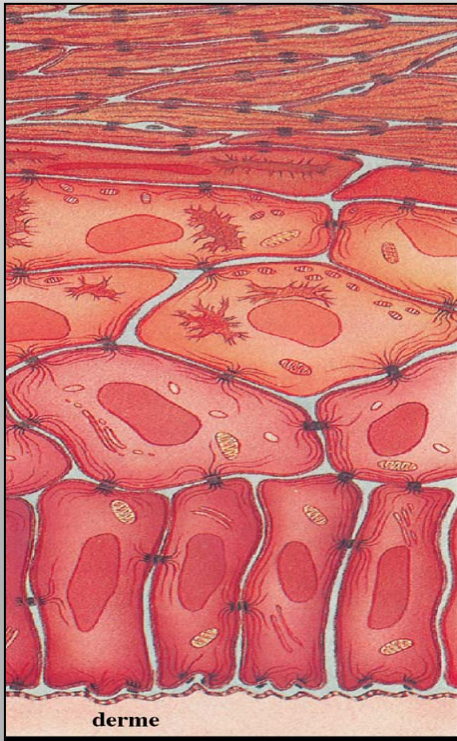
prolifération



Irradiation externe

Dosimétrie biologique

- . **décollement des couches supérieures « stripping »**
 - . **peu invasif**
- . **possible à plusieurs endroits et plusieurs temps**



Modèle :
keratinocytes humains
primaires, différenciés
en culture

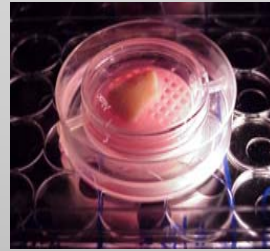
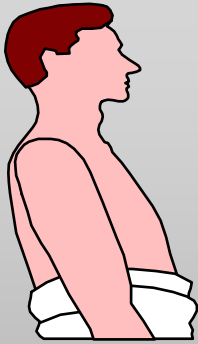
Technique :
puces à ADN
pour faire un screening le plus
ouvert possible

Buts :

1. Fondamental : Mécanismes de la réponse globale du kératinocyte à l'irradiation

2. Appliqué : recherche de nouveaux marqueurs d'exposition





**chirurgie
plastique**

trypsine



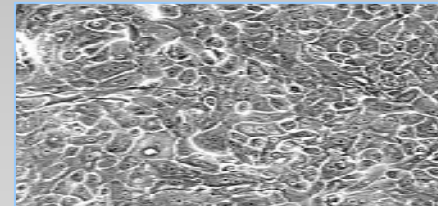
**kératinocytes
normaux**



calcium, confluence



**keratinocytes
différenciés**



Objectifs de l'étude

**Caractérisation de la réponse des
kératinocytes humains primaires spécifiques à
une faible dose d'irradiation ionisante**

10 mGy versus 2 Gy

**Recherche des gènes et des profils
temporels d'expression spécifiques**

Dispositif d'irradiation

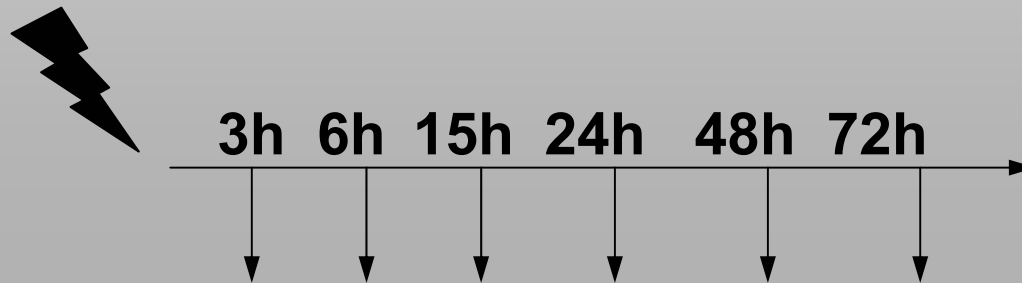
Laboratoire LREG (CEA INRA, Jouy-en-Josas)

Dosimétrie par Fli : SPR du CEA Saclay

- 10 mGy** Une source de ^{60}Co , 550 KeV d'énergie moyenne
Débit de dose : 3 mGy / min
Durée de l'irradiation : 4 minutes
- 2 Gy** 8 sources de ^{60}Co
Débit de dose : 300 mGy / min
Durée de l'irradiation : 8 minutes

1ère analyse : déterminer des GENES MARQUEURS des deux doses

Irradiation 2 Gy et 10 mGy, témoins



RNA (t)

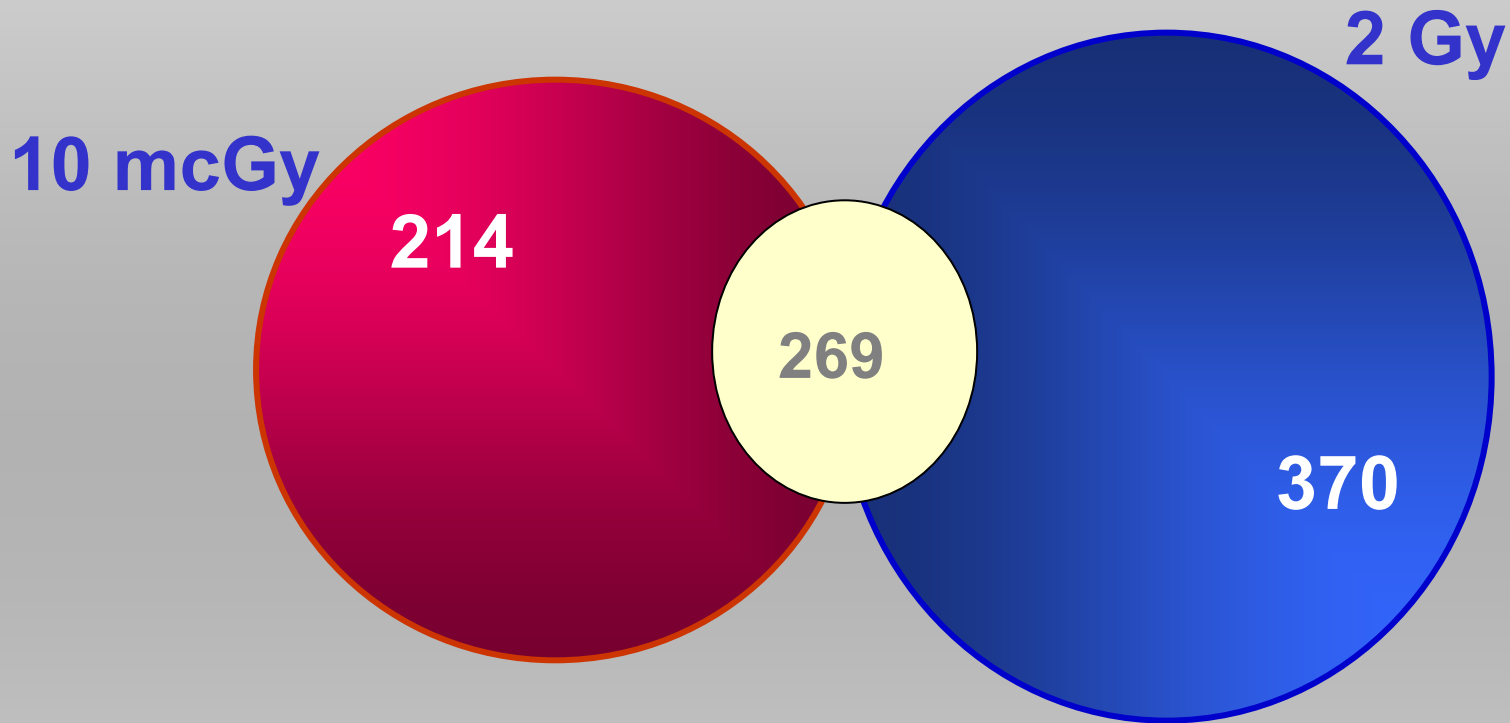


Hybridation irradié (t) / non irradié (t)



Analyse temps par temps

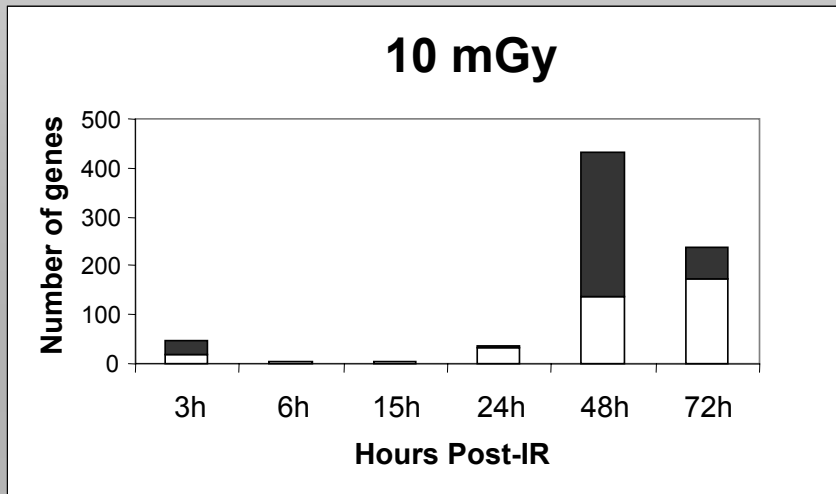
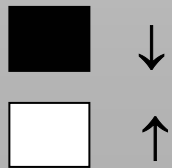
Réponses dose-spécifiques



2 Gy : 6 % des sondes, dont 370 spécifiques

10 mGy : 5 % des sondes, dont 214 spécifiques

Analyse temps par temps : profils spécifiques



Gènes spécifiques 10 mGy :

↑ ↓ 48h

Gènes communs :

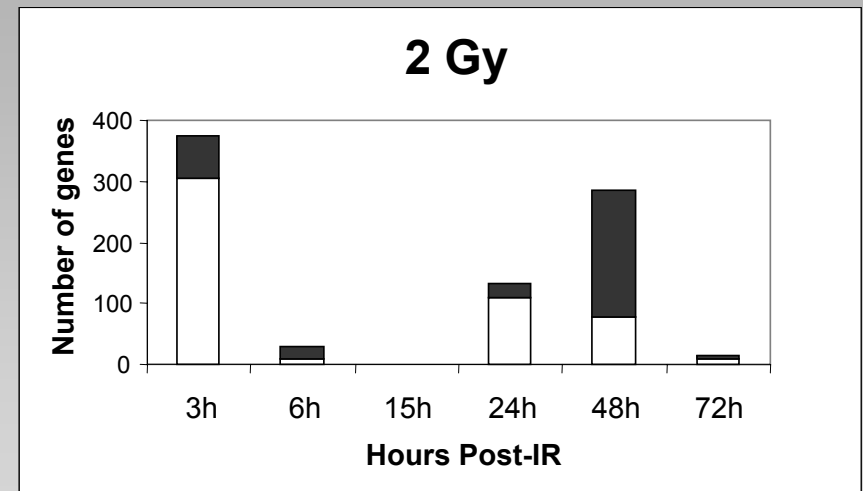
↓ 48h et ↑ 72h

Gènes spécifiques 2 Gy :

↑ 3h

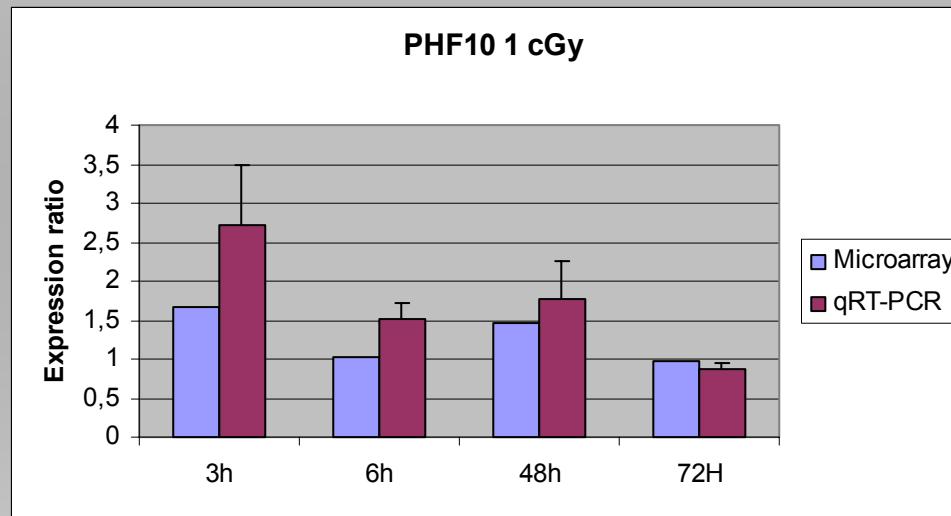
Gènes communs :

↑ 24h et ↓ 48h



Qui sont ces gènes ?

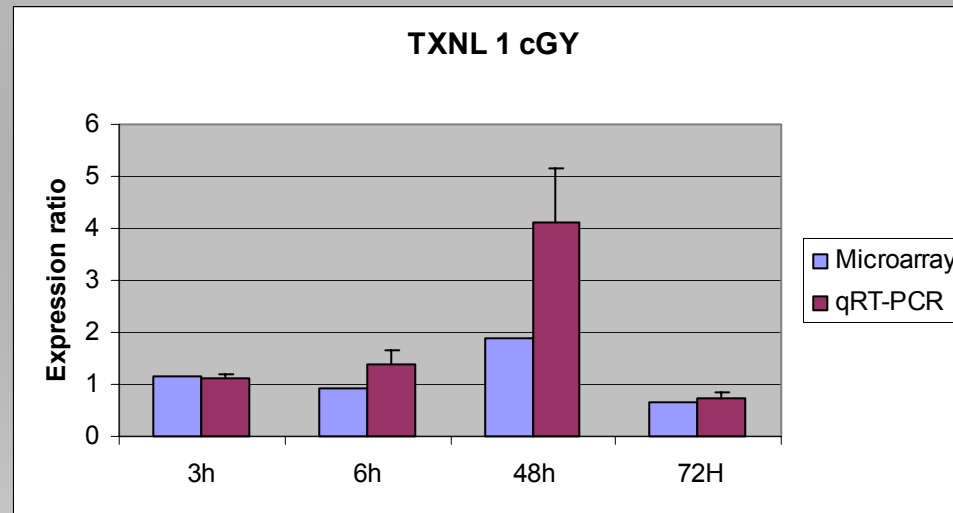
des facteurs de transcription, comme
PHD finger



Signature moléculaire faible dose précoce

Qui sont ces gènes ?

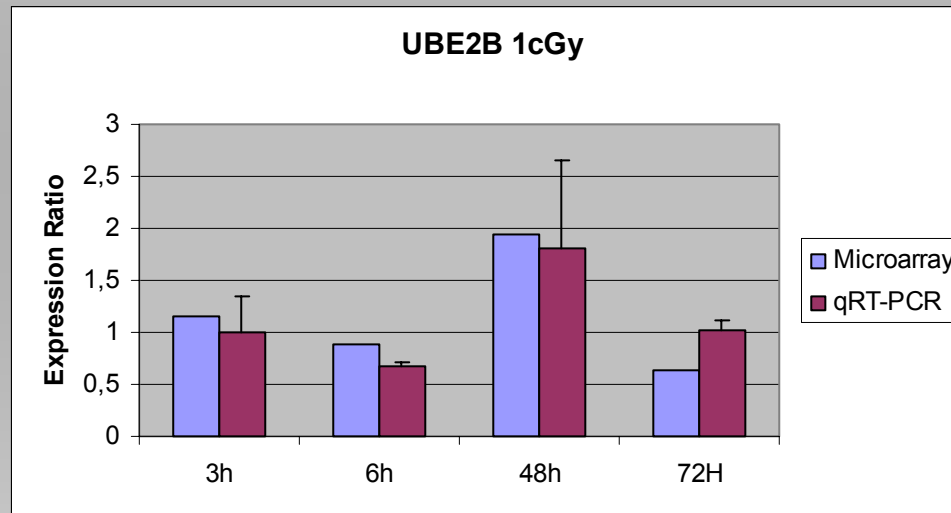
des gènes du stress oxydatif, comme la
thioredoxine



Signature moléculaire fd tardive

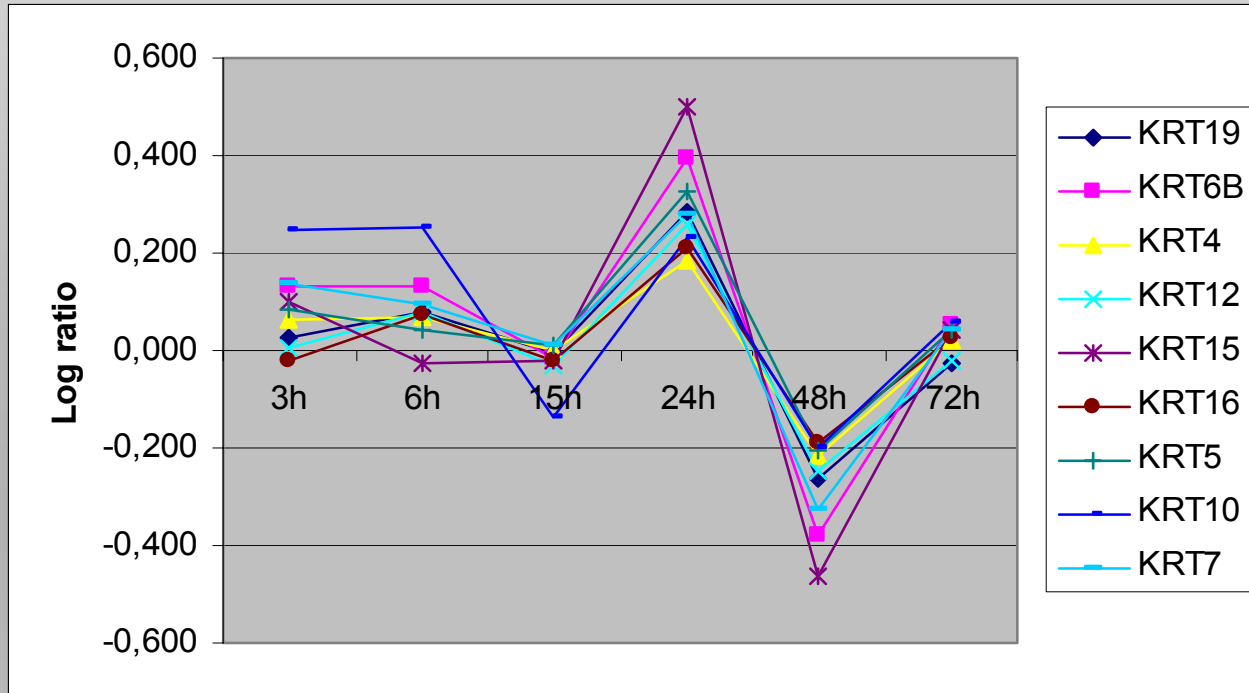
Qui sont ces gènes ?

des gènes du catabolisme cellulaire,
comme l'ubiquitine 2Br



Signature moléculaire fd tardive

Familles de gènes kératines



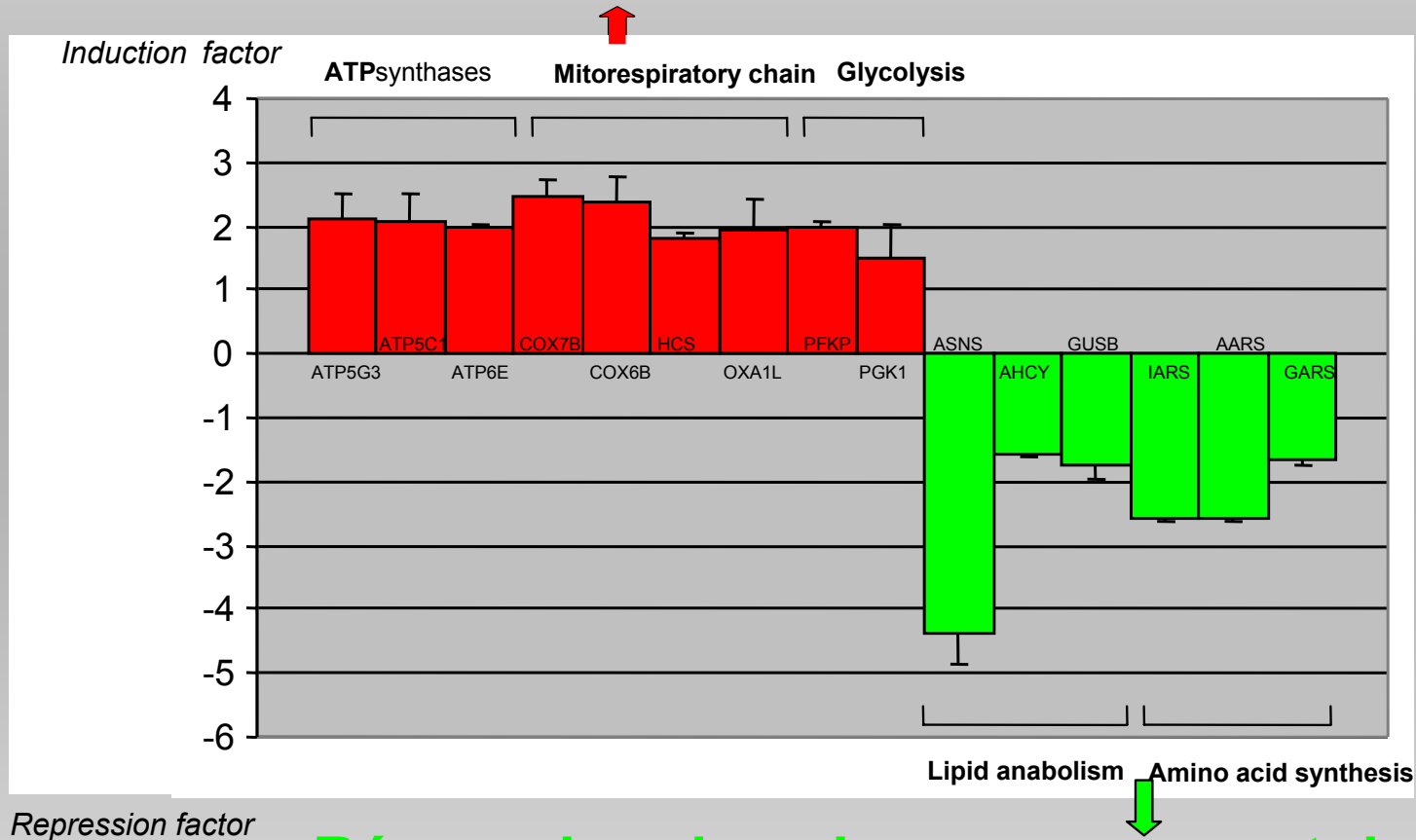
**2 Gy, 9 gènes
induits à 24 h
réprimés à 48 h**

**1 cGy, 2 gènes
réprimés à 48 h
différents**

Signature 2 Gy tardive

Voies énergétiques : ATP

Induction de voies produisant de l'énergie

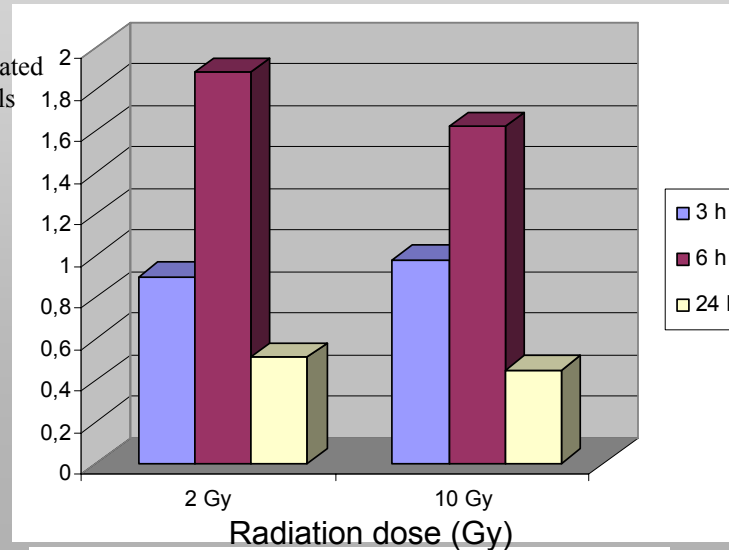


Répression de voies consommant de l'énergie

Mesures d'ATP intracellulaire

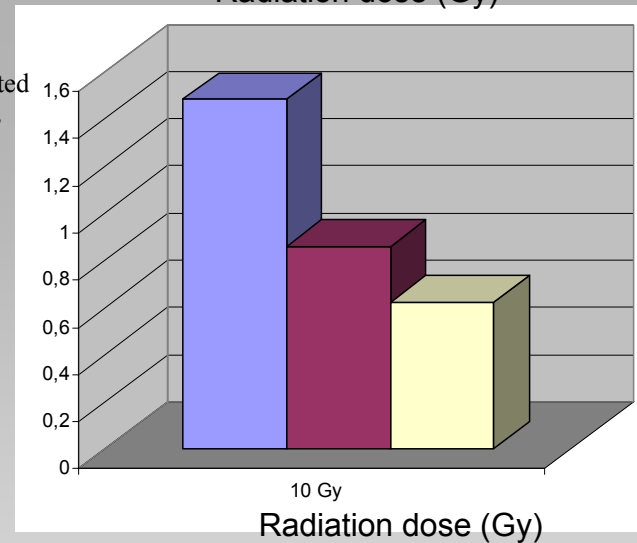
**kératinocytes
différenciés**

Ratio ATP irradiated
vs control cells



**kératinocytes
proliférants**

Ratio ATP irradiated
vs control cells



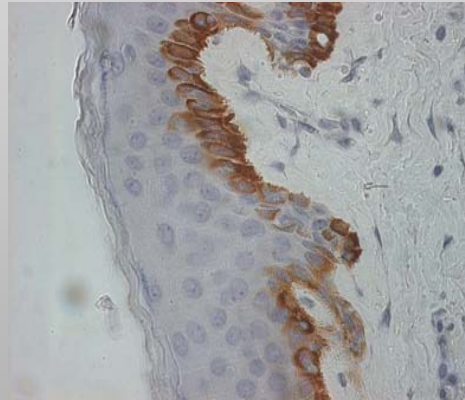
signature précoce et tardive forte dose

Confirmation dans la peau humaine ?

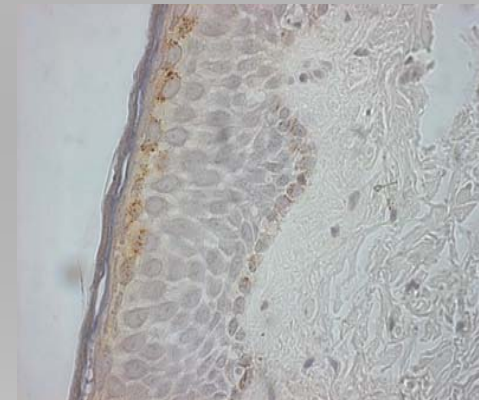
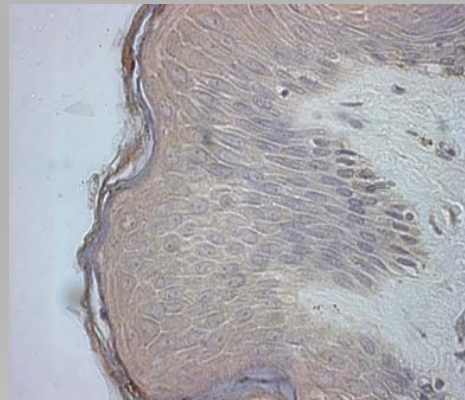
Normal epidermis

Irradiated epidermis (2 Gy 6h)

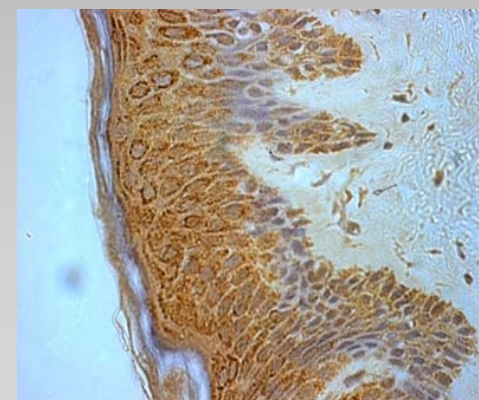
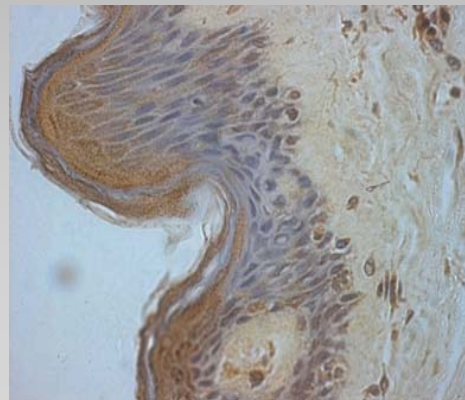
K14



ATP1a1



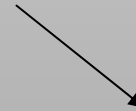
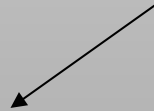
Cyt c



Analyse temps par temps

Conclusions et Perspectives

Liste de gènes spécifiques à chaque dose

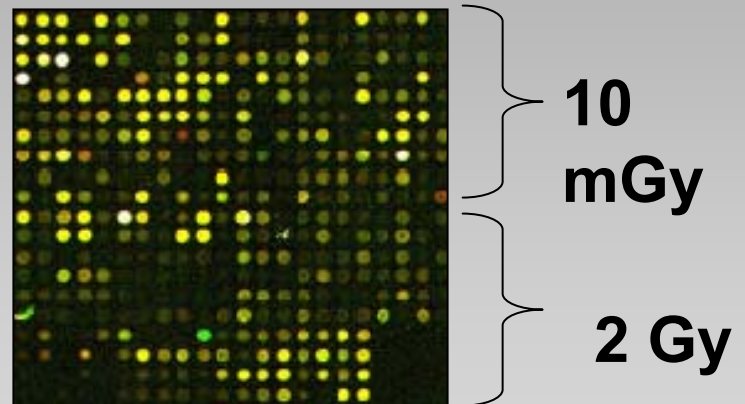


Recherche fondamentale

élucider les différences
entre les mécanismes de
régulation des faibles
doses et des doses
modérées

Applications dosimétriques

Puce de pronostic



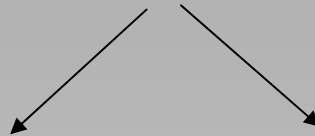
Analyse temps par temps

Conclusions et Perspectives

Liste de gènes spécifiques à chaque dose



**Applications
dosimétriques**



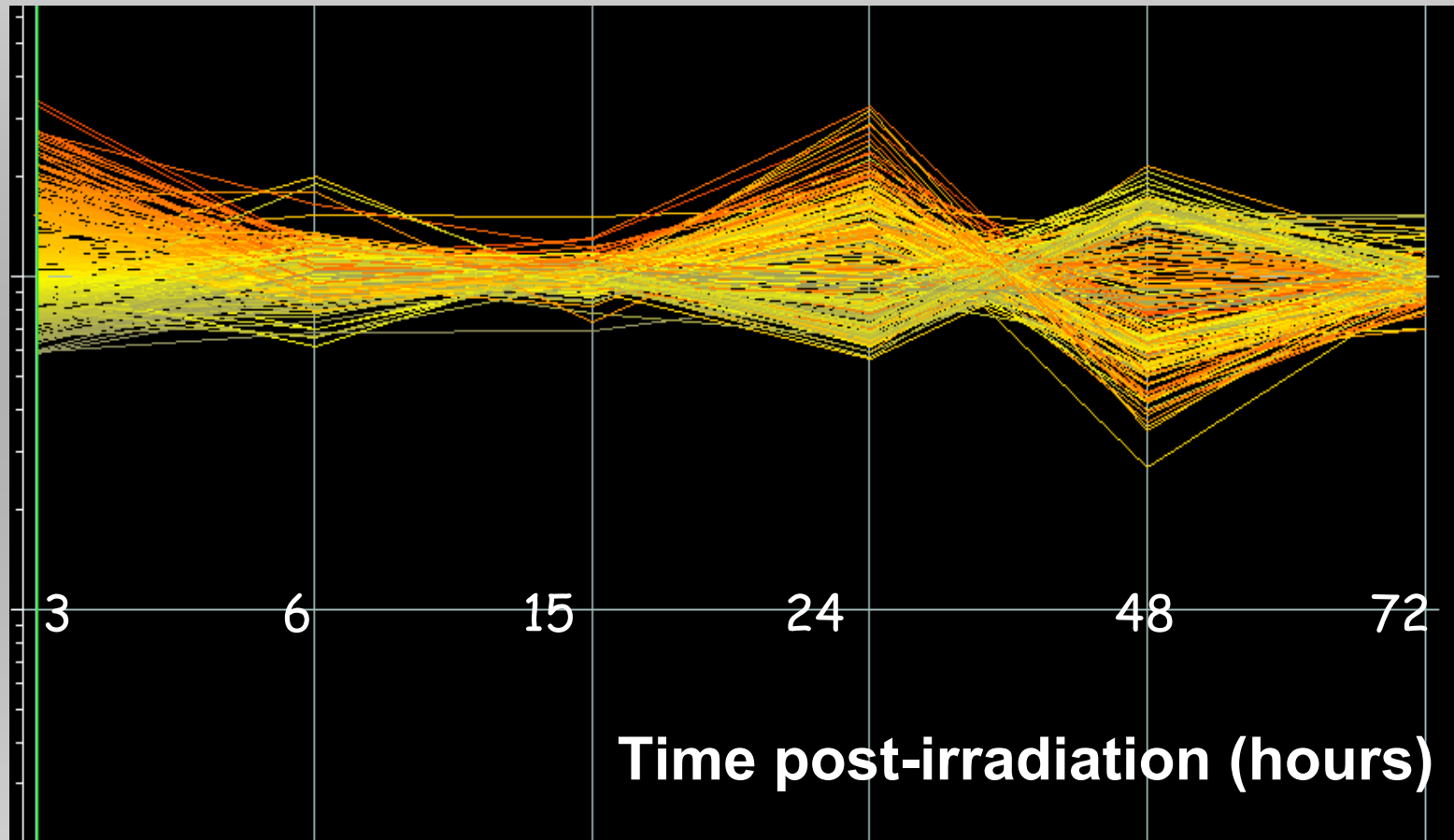
test fonctionnel ATP

**kits de PCR spécifiques
kératines**

2ème analyse : déterminer des PROFILS temporels d'expression spécifiques

- Nécessite d'avoir un témoin commun à tous les temps pour effectuer une étude cinétique**
- Etude basée sur les gènes modulés par l'irradiation : 850 gènes de l'étude « temps par temps »**

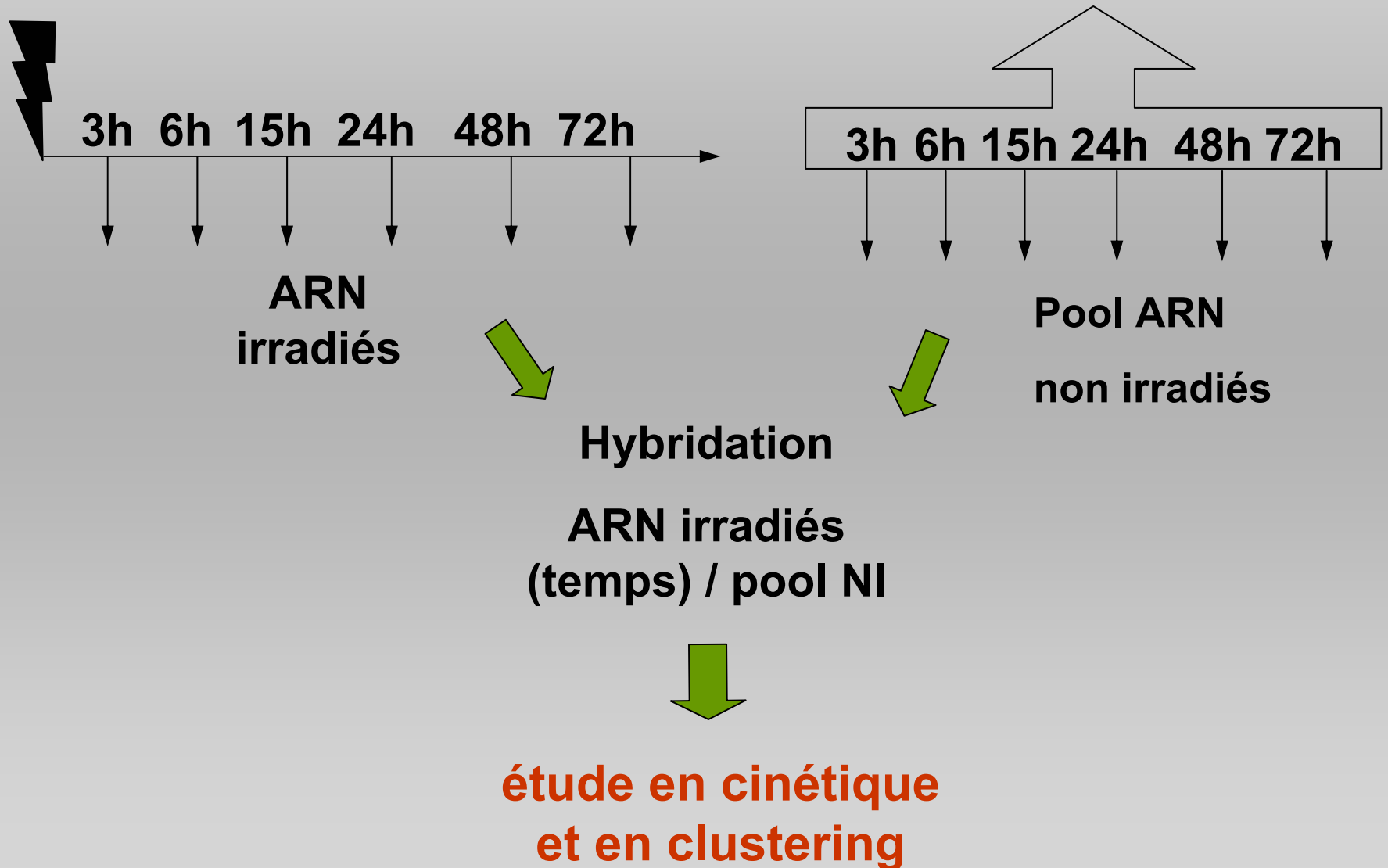
Profils d'expression à 2 Gy



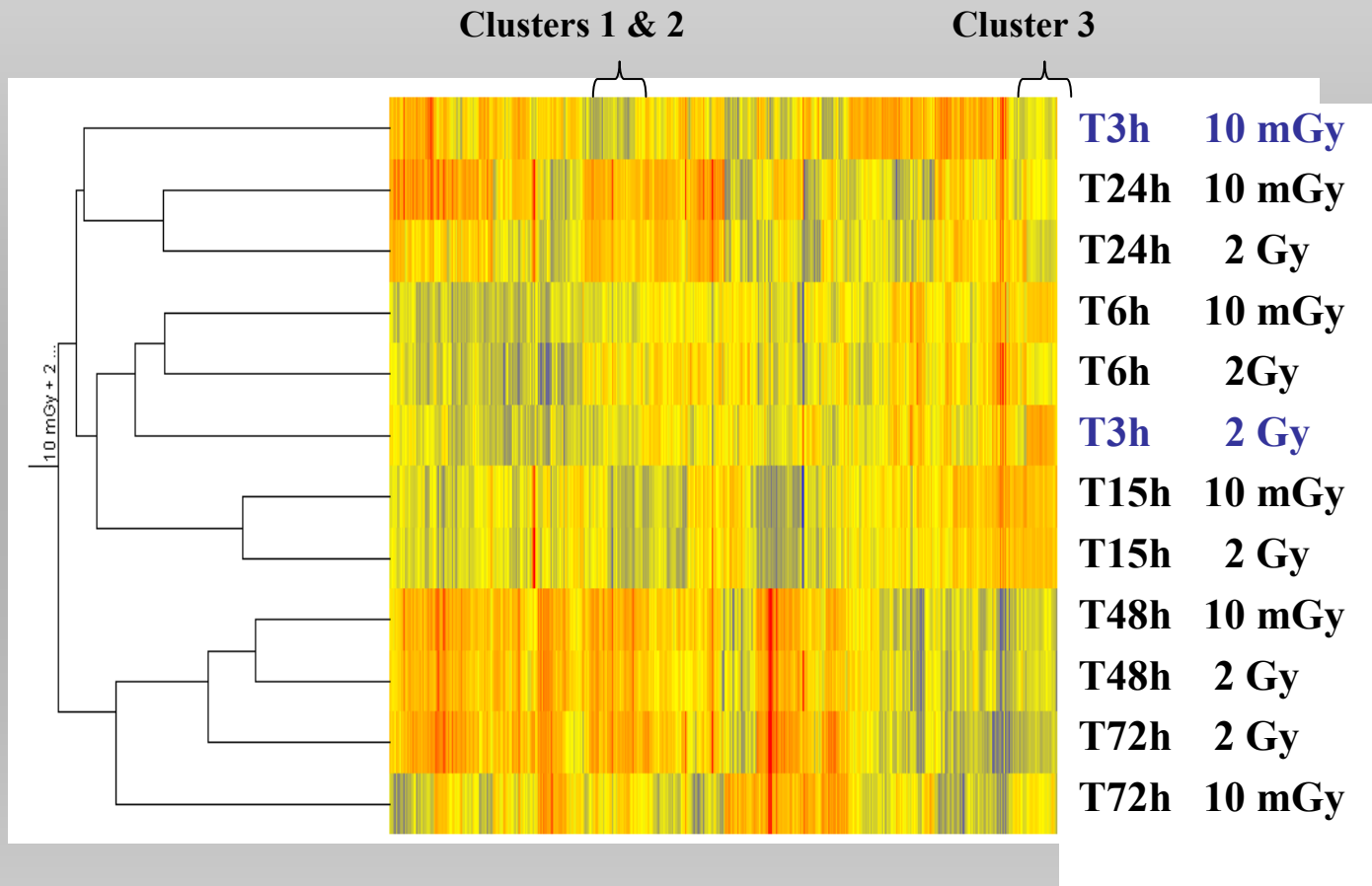
Vagues de réponse géniques !

2ème stratégie d'hybridation

Irradiés 2 Gy et 10 mGy

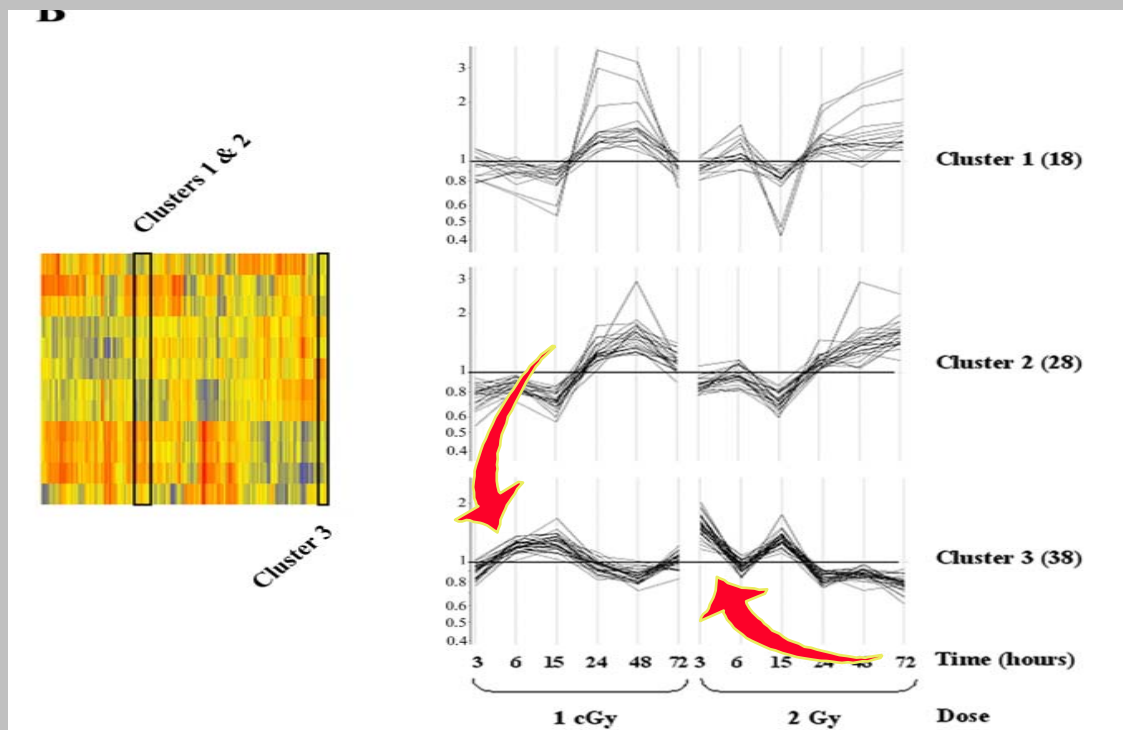


Analyse Cinétique



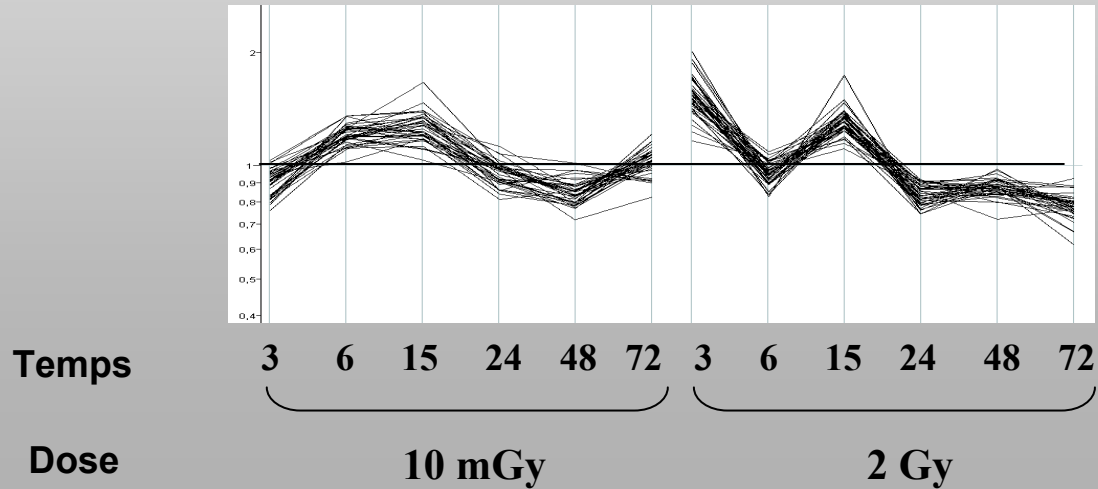
Construction d'un arbre de regroupement

Analyse en clustering

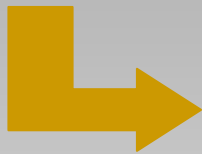


Groupes de gènes (clusters) ayant la même cinétique de réponse sur 3 jours

Analyse de clusters



profil spécifique de régulation de **38 gènes** dans le temps

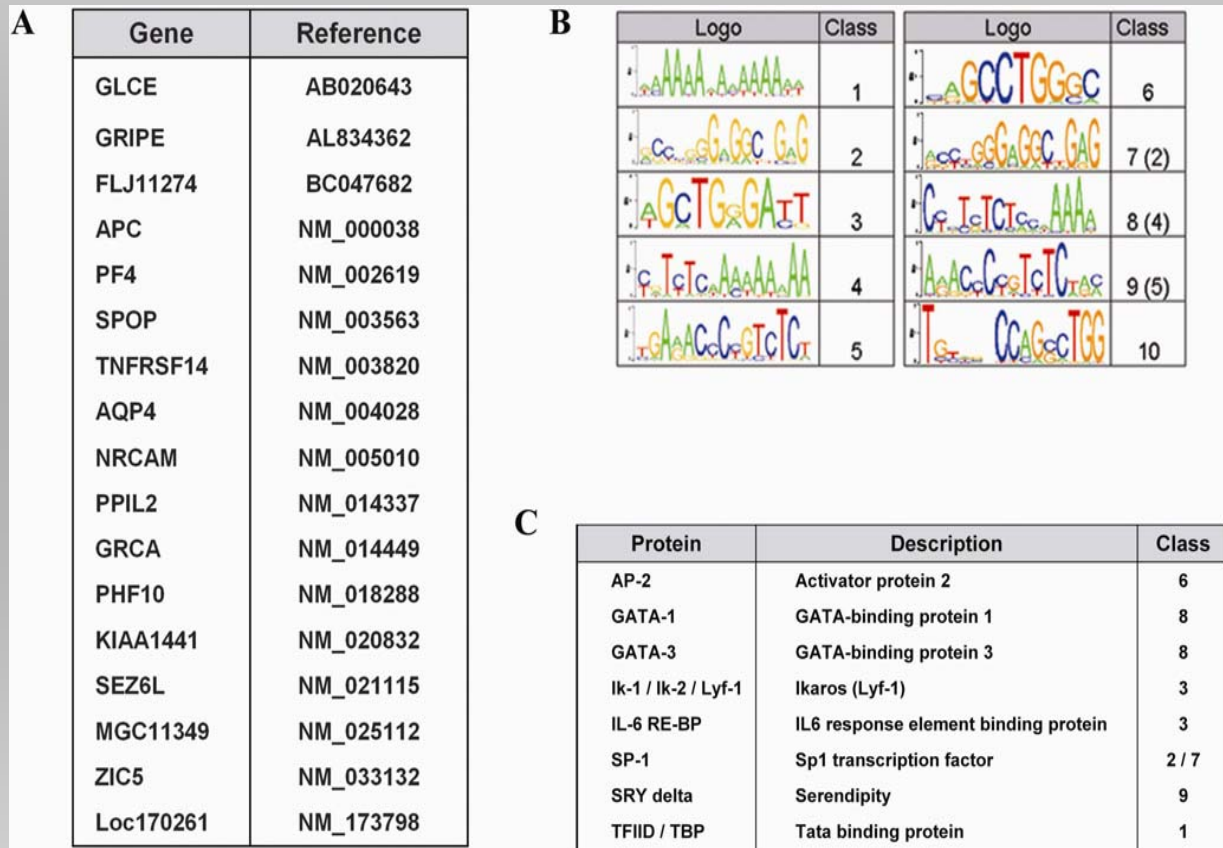


Co-régulation de ces 38 gènes par des séquences promotrices communes ?



Etude des promoteurs avec le logiciel APEX

Recherche sur ordinateur (in silico) de séquences régulatrices



Identification de sites de liaison de facteurs de transcription

Identification de 8 sites de liaison de facteurs de transcription

Régulateurs potentiels des réponses
10 mGy/2 Gy

En test par des expériences d'immuno précipitation de
chromatine , GATA-3



Résumé

- ⌘ **La faible dose induit une reprogrammation génétique des kératinocytes 6 % des sondes**
- ⌘ **Etude « temps par temps » : gènes spécifiques de chaque dose**
- ⌘ **Etude « clustering » : profils temporels spécifiques de chaque dose**

Lamartine, J Cell Biochem, 2004

Franco et al., Radiation Research, in press

Génomique fonctionnelle et radioprotection

- W Park, Oncogene, 2002, lignée Jurkat et PBMC puces à 2400 gènes
 - 384 régulés par rayons γ
- relation doses et temps-dépendantes
 - concept de « **Radchip** », puces dédiées portant des gènes biomarqueurs de l'exposition

Génomique fonctionnelle et radioprotection

- S Amundson, NIH, biomarqueurs des lymphocytes humains périphériques

- 2000, Rad Res, 6 500 sondes
20 cGy à 20 Gy, 3 gènes (DDB2, Waf1)
induction linéaire à 24 et 48 h

- 2004, Cancer Res, 6 500 sondes
sang de patients TBI, fractions 1,5 et 3 Gy
DDB2, Waf1, GADD45
6 h, biomarqueurs confirmés in vivo

Génomique fonctionnelle et radioprotection

- **2003, Grace M, Clin Chem (AFFRI)**
dosimétrie lymphocytes humains
 - **kit de multi PCR de terrain**
pour quantifier les ARNs de 4 gènes

GADD45, DDB2, BAX, MnSOD
inductions dose-dépendantes

Génomique fonctionnelle et dosimétrie

- **points forts :**
 - . faible quantité de matériel nécessaire
ARN de 5000 cellules
 - . reproductibilité des résultats
 - . technique très robuste
 - . bientôt génome humain complet
- **l'analyse globale est une technique d'avenir pour le screening et le diagnostic**

Mais

- l'analyse globale est une technique d'avenir qui dérange...
 - nouvelle manière de faire de la biologie
- demande de nouveaux outils très spécifiques, collaboration avec les bio-informaticiens
 - développement (génomome complet) et validation nécessaires
 - Comparaisons inter-plate-formes



