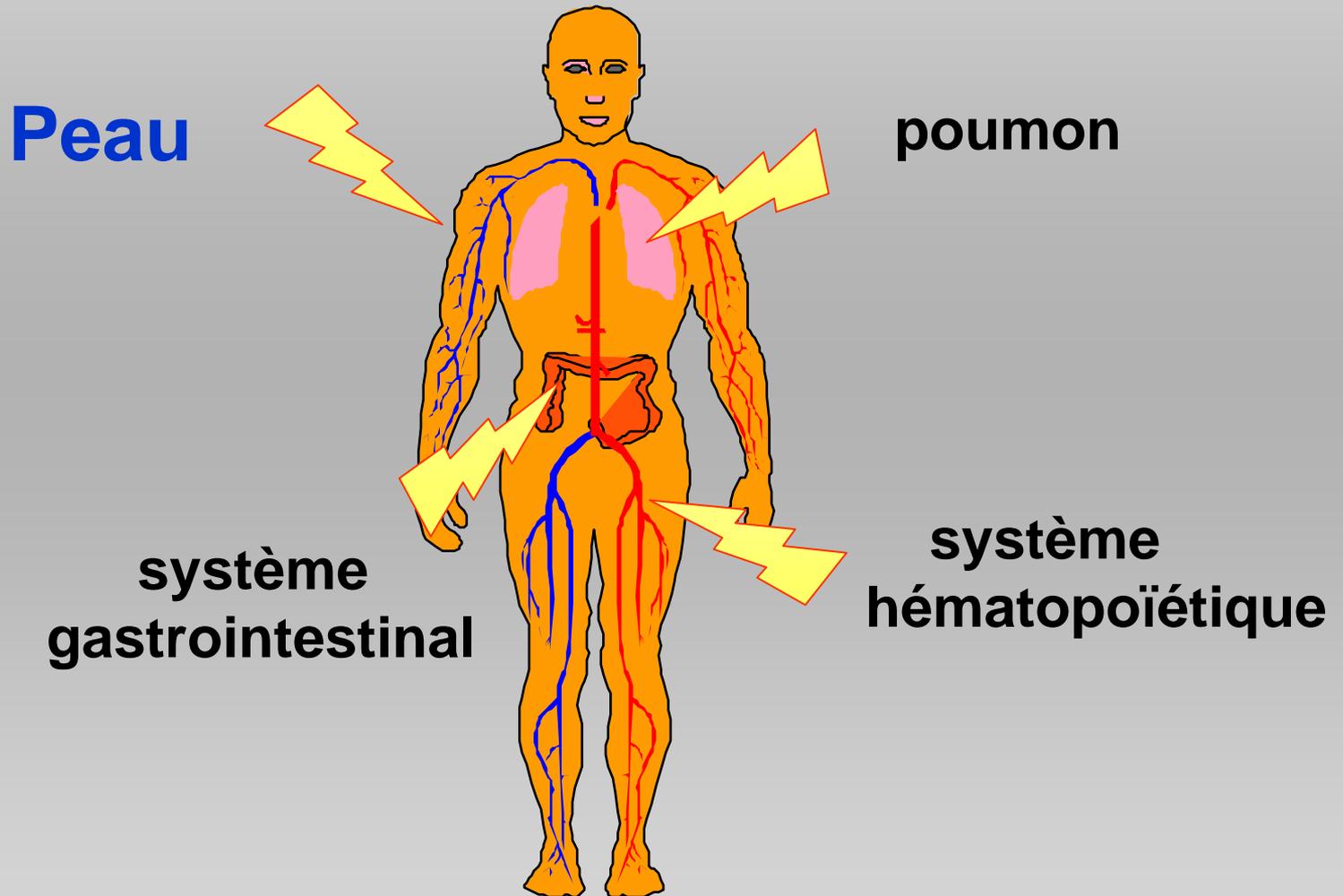




Analyses globales et nouveaux indicateurs d'exposition dans les cellules de l'épiderme humain

Laboratoire de Génomique et Radiobiologie
de la Kératinopoïèse
CEA, Evry

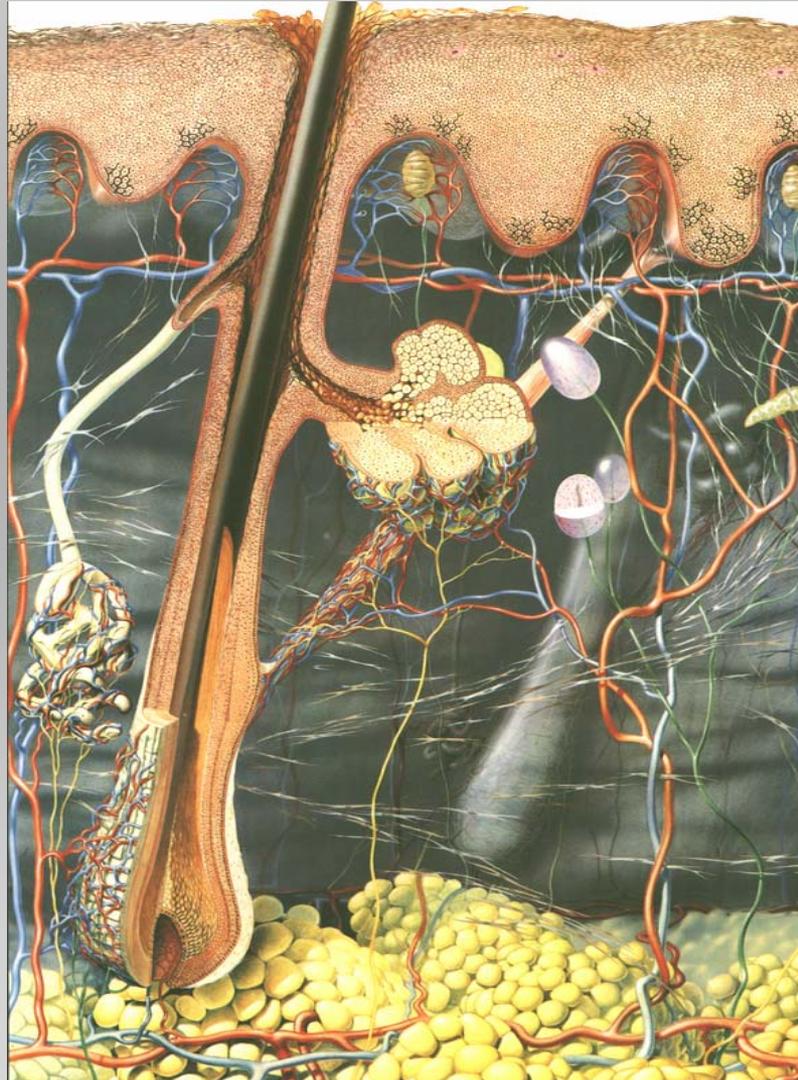
Exposition humaine après diagnostic, radiothérapie accidents



Peau humaine

→ première cible

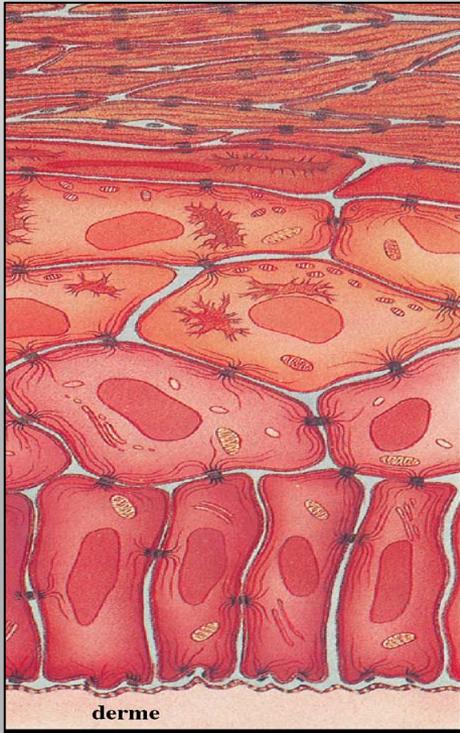
→ indicateur



épiderme

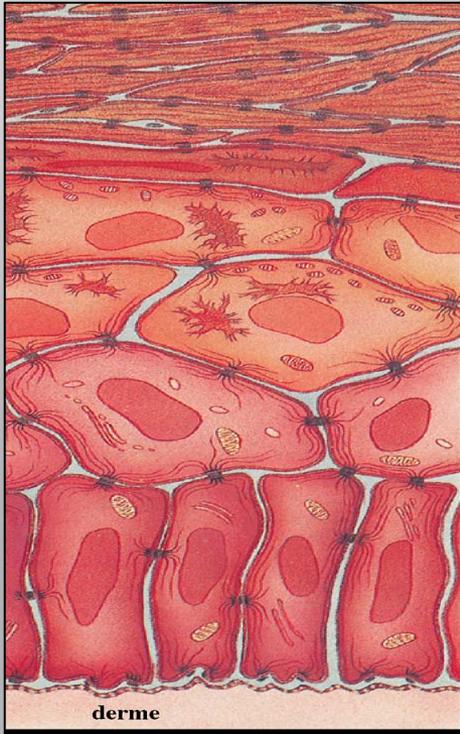
derme

tissu adipeux

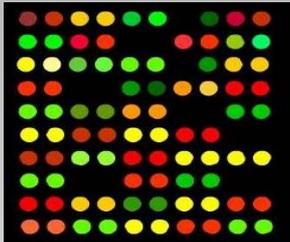


Irradiation externe

- . Dosimétrie biologique :
- . décollement des couches supérieures « stripping » différenciées
 - . 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

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

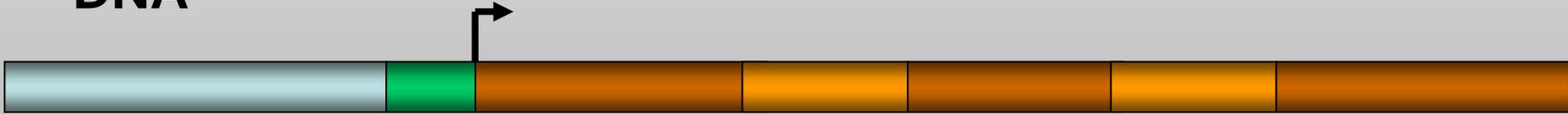
**Génomique fonctionnelle : puces à ADN
ensemble des gènes humains**

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



Gene expression

DNA



Coding sequences: Exon 1

Exon 2

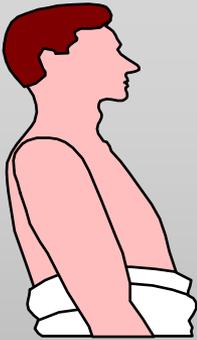
Exon 3



Transcription : DNA → ARN



Traduction : proteins



**chirurgie
plastique**

trypsine



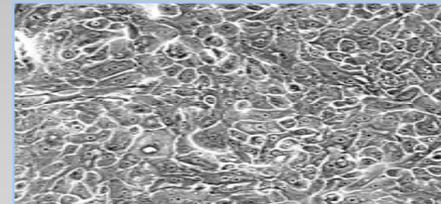
**kératinocytes
normaux
primaires**



calcium, confluence



**keratinocytes
différenciés**



Dose :

**2 Gy, standard dose
dose per fraction / radiotherapy**

Radiosensitivity

2 Gy induced death

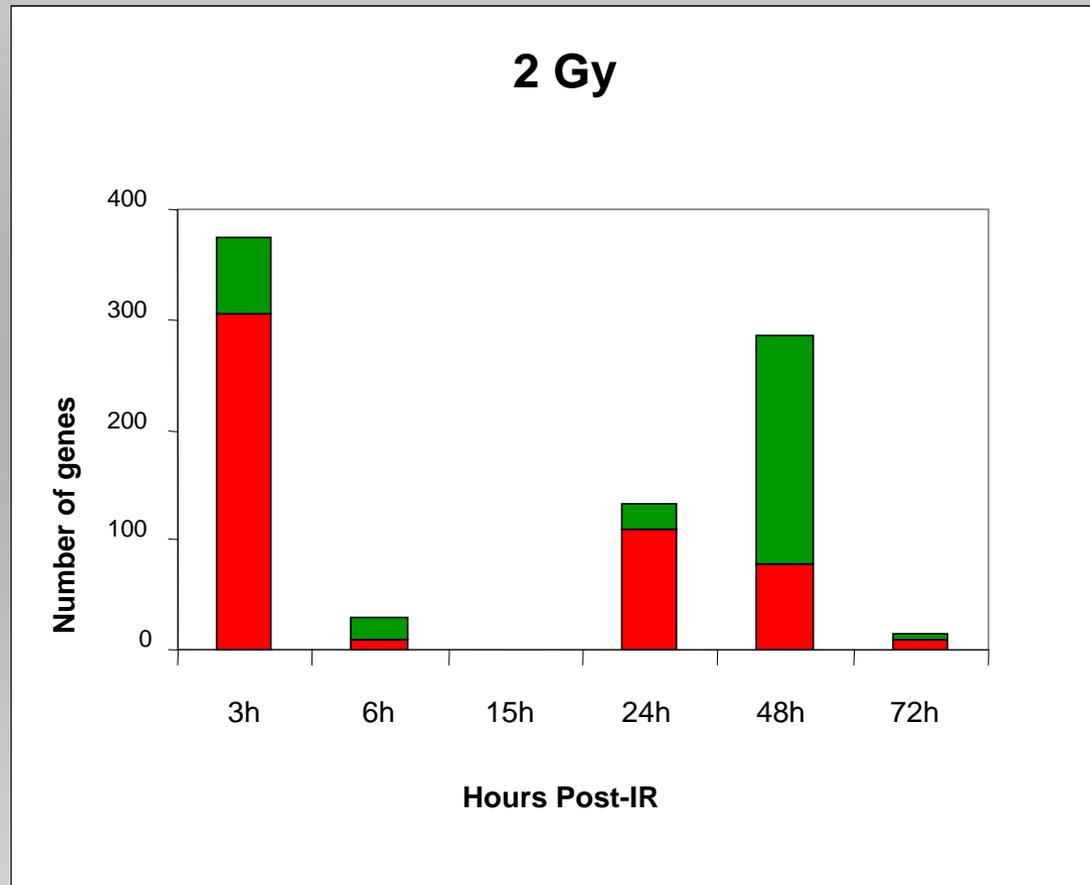
in 25 % of cells

radioresistant, out of cell cycle

Deux vagues de réponse

6 % des gènes modifiés

■ Inductions
■ Repressions

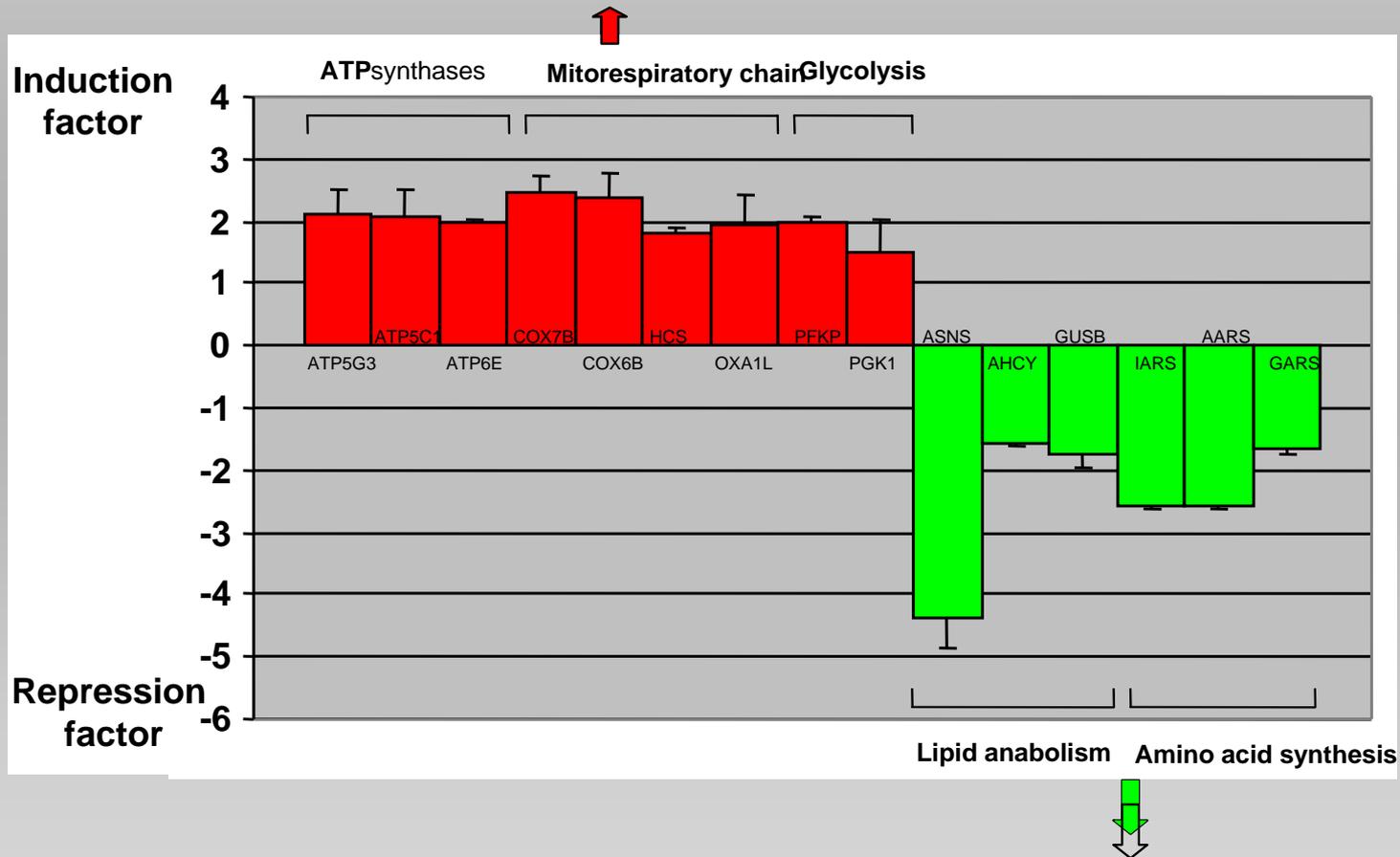


Franco et al. , Rad Res, 2005

Quels gènes?

3h : production d'énergie

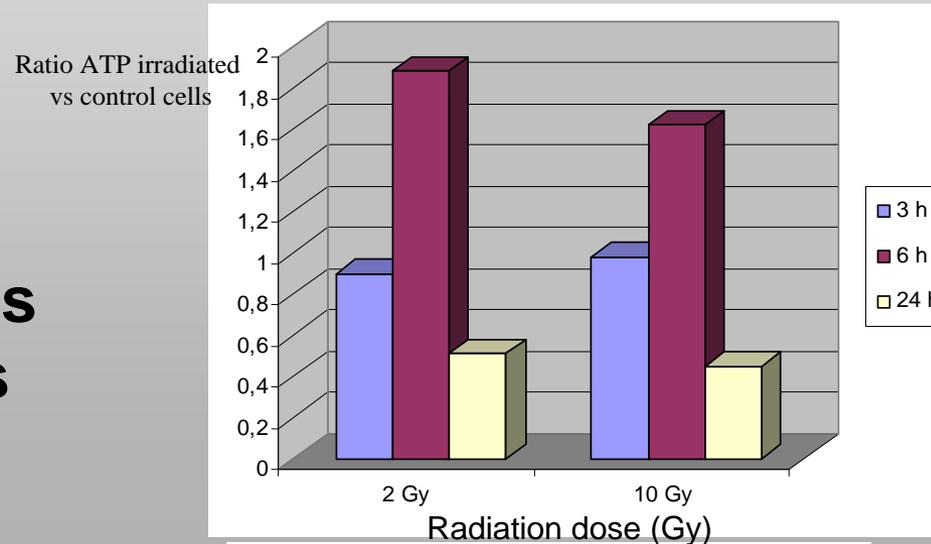
Induction of energy producing pathways



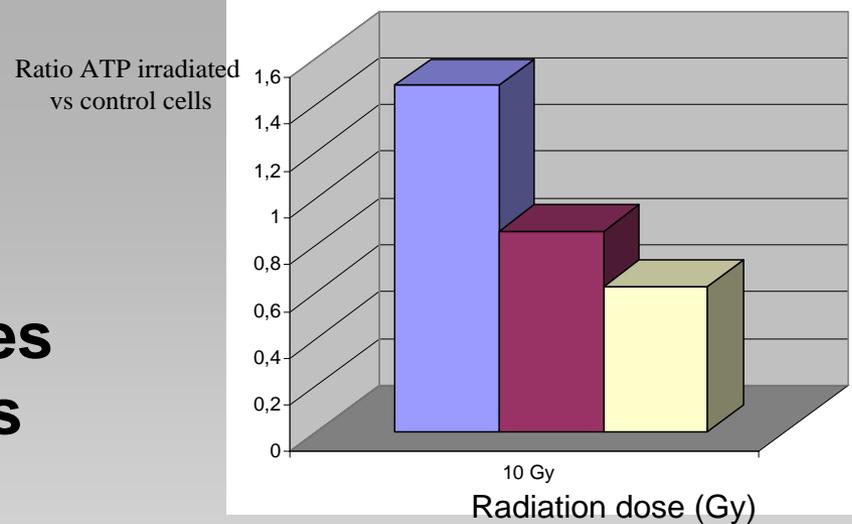
Repression of energy consuming pathways

Mesures d'ATP intracellulaire

**kératinocytes
différenciés**



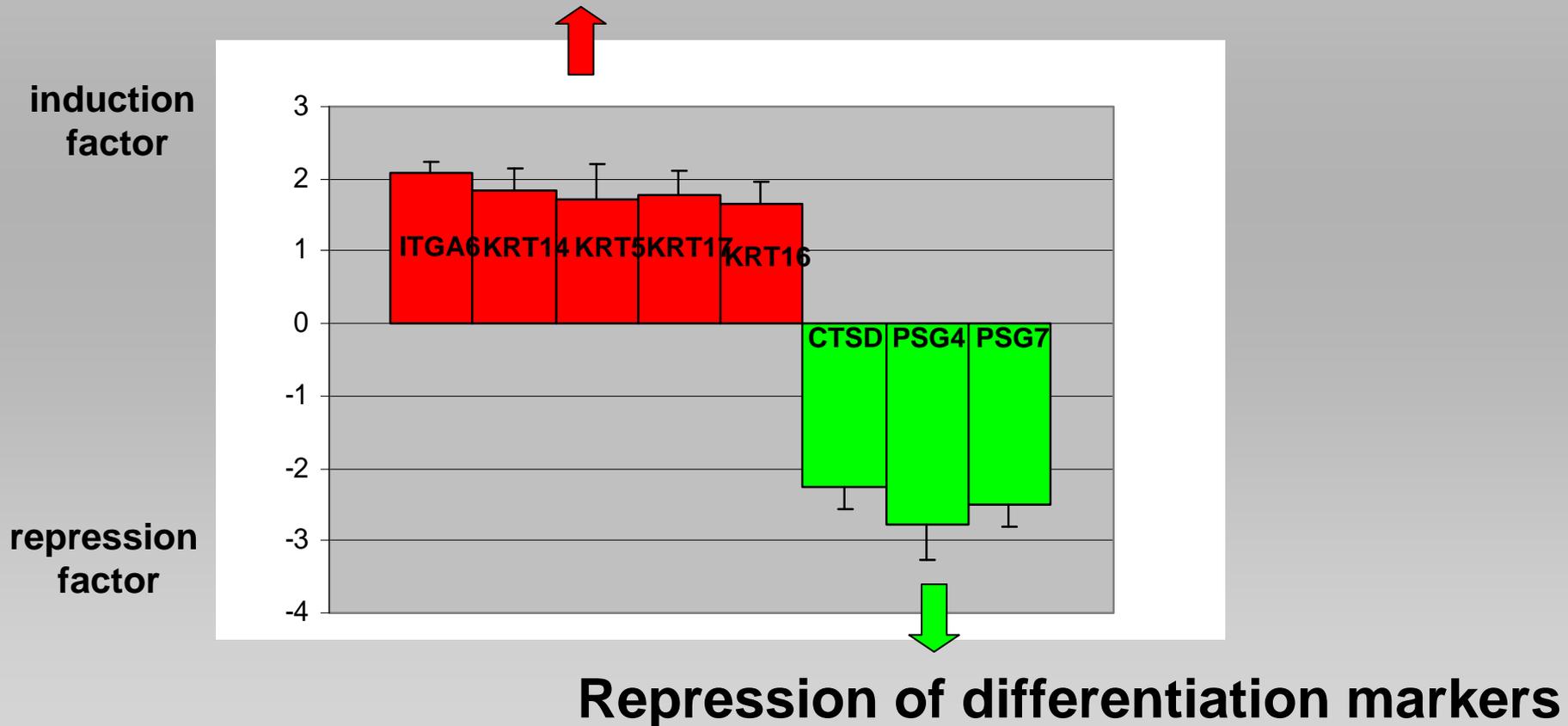
**kératinocytes
proliférants**



ATP: signature précoce et tardive forte dose

Quels gènes? 3h : différenciation

Induction of basal markers



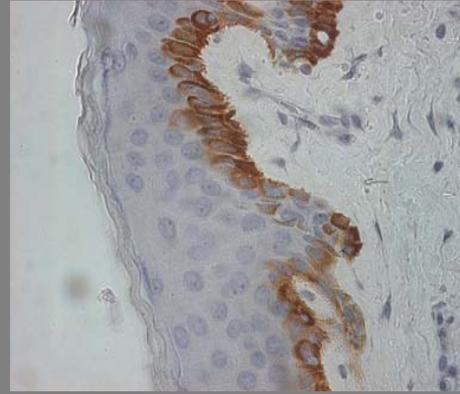
Marqueurs dans la peau humaine?

Biopsies irradiées 2 Gy
6 h

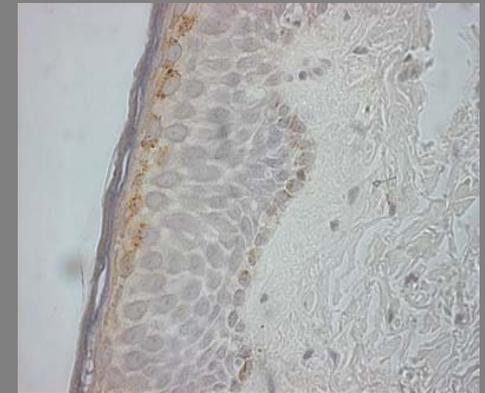
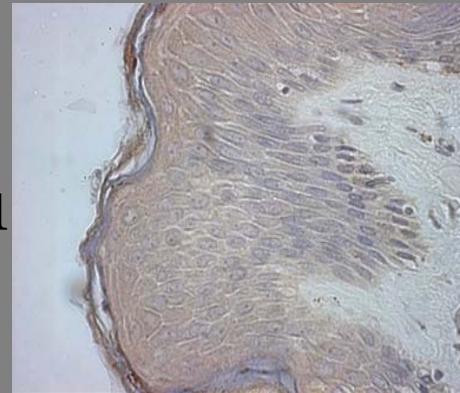
Normal epidermis

Irradiated epidermis

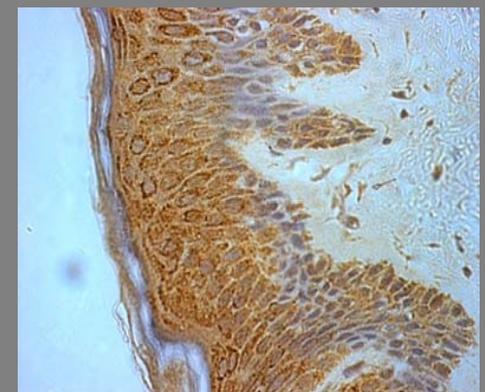
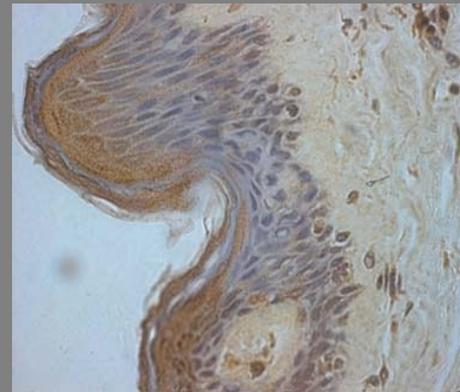
K14



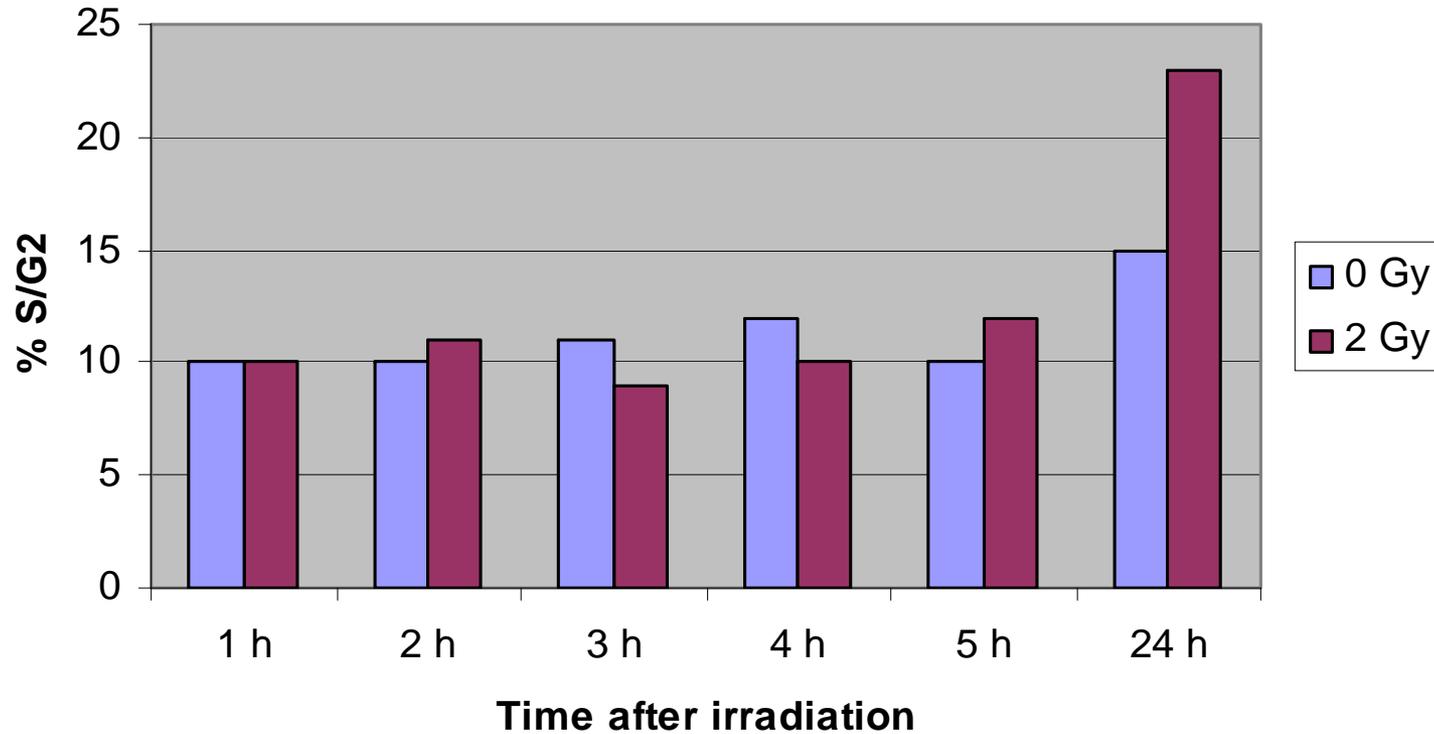
ATP1a1



Cyt c



Retour au cycle cellulaire



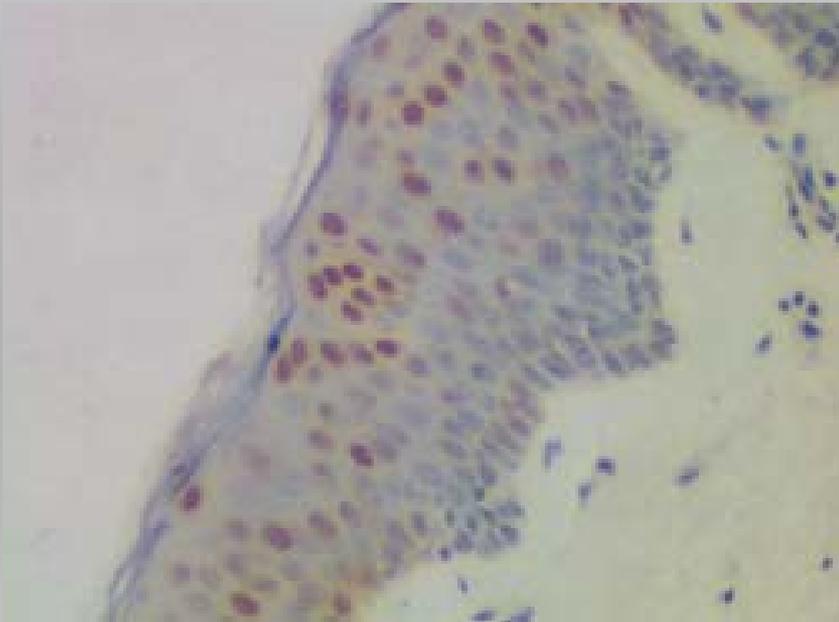
Analyse du cycle cellulaire des cellules HaCaT après marquage à l'iodure de propidium

Activated phenotype !

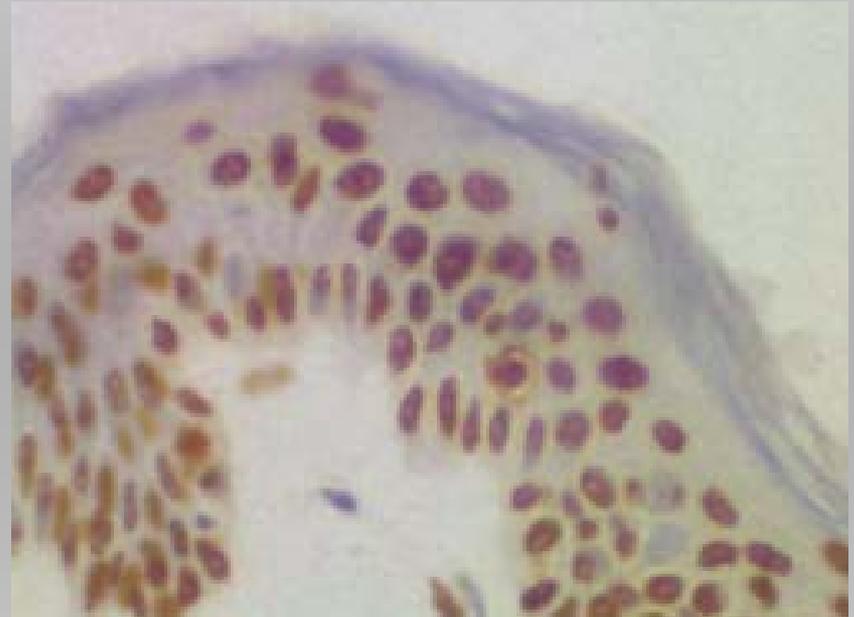
Modifications de la chromatine

Induction de l'histone H1

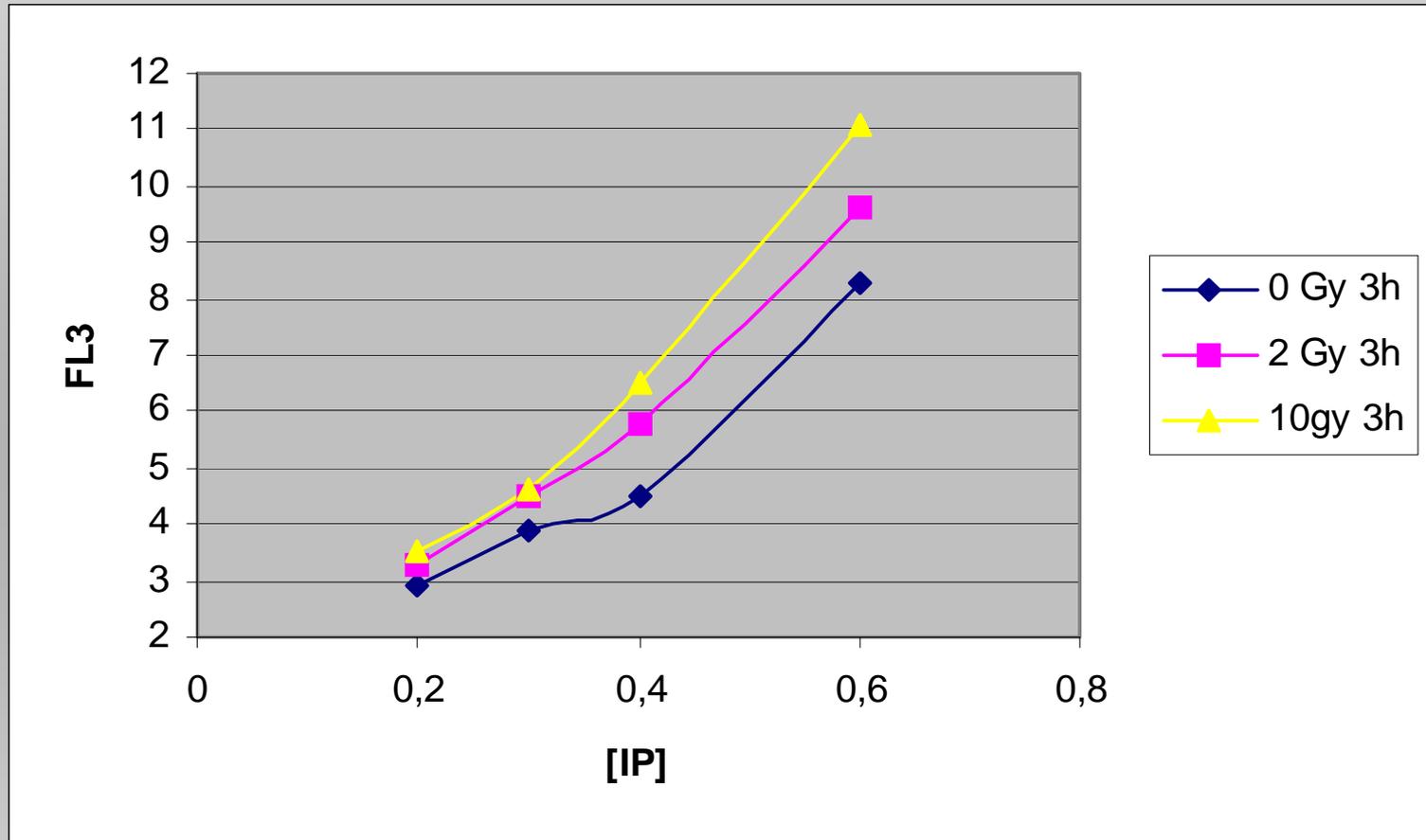
Normal epidermis



2 Gy 6h

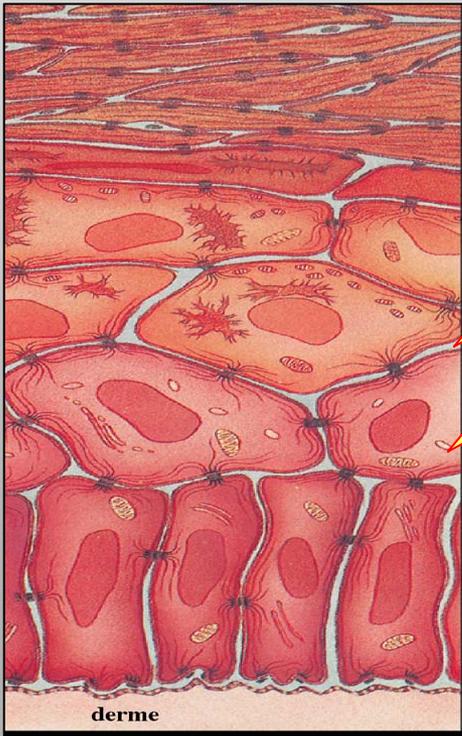


Décompaction de la chromatine



decompaction at 3h

Decompaction → transcription activation



derme

Conclusion Kératinocytes différenciés

**radiorésistants
quiescents**

**marqueurs 2 Gy à 3 heures:
activation cellulaire
production d'énergie (ATP)
perte de différenciation (kératines, H1)**

*Lamartine J 2004
Franco N 2005*

Marqueurs de faibles doses ?

Réponse des kératinocytes humains
différenciés

à une très faible dose d'irradiation ionisante

10 mGy

Une source de ^{60}Co , 550 KeV

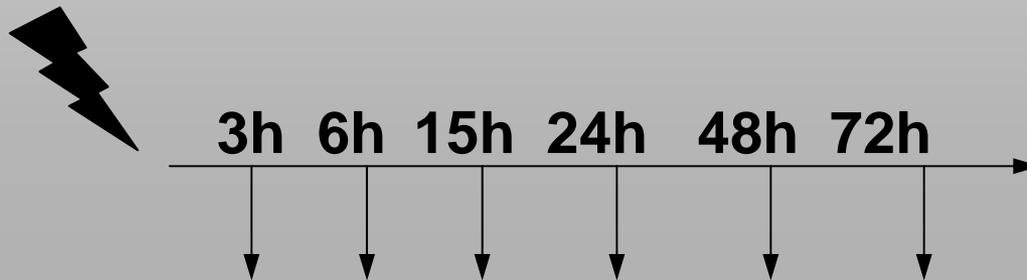
Débit de dose : 3 mGy / min

Durée de l'irradiation : 4 minutes



1ère analyse : déterminer des GENES MARQUEURS des deux doses

Irradiation 2 Gy et 10 mGy, témoins



RNA (t)

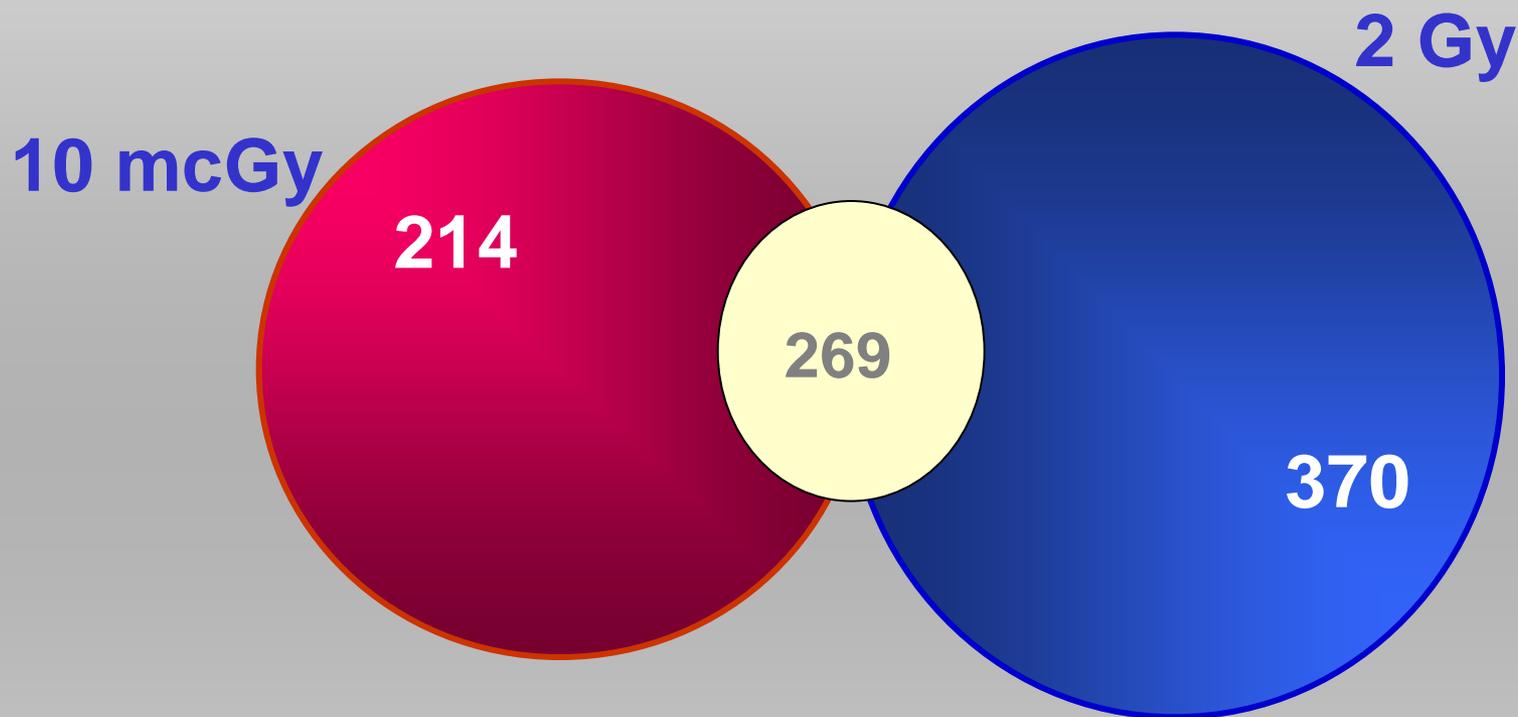


Hybridation irradié (t) / non
irradié (t)



Analyse temps par temps

Réponses dose-spécifiques



2 Gy : 6 % des sondes, dont 370 spécifiques

10 mGy : 5 % des sondes, dont 214 spécifiques

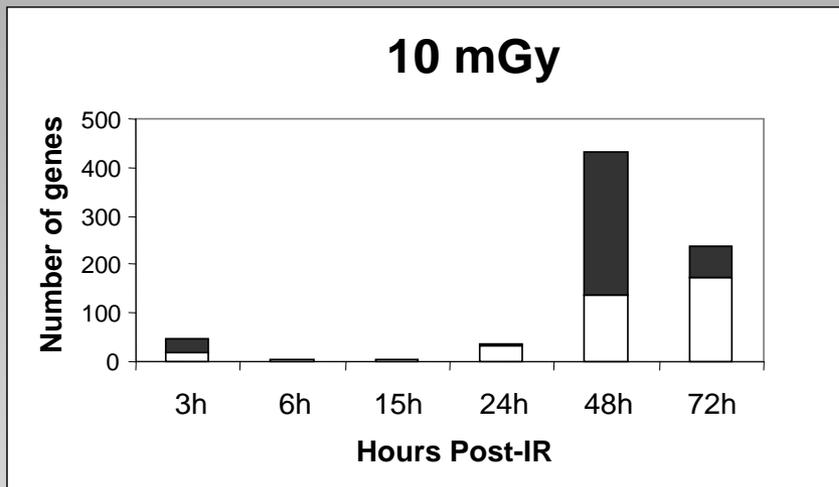
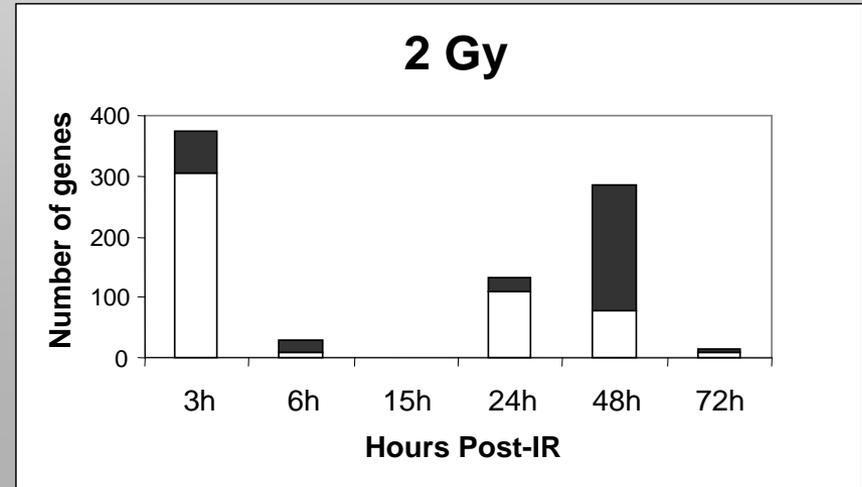
Analyse temps par temps : profils spécifiques

Gènes spécifiques 2 Gy :

↑ 3h

Gènes communs :

↑ 24h et ↓ 48h

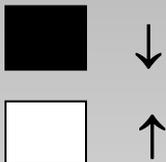


Gènes spécifiques 10 mGy :

↑ ↓ 48h

Gènes communs :

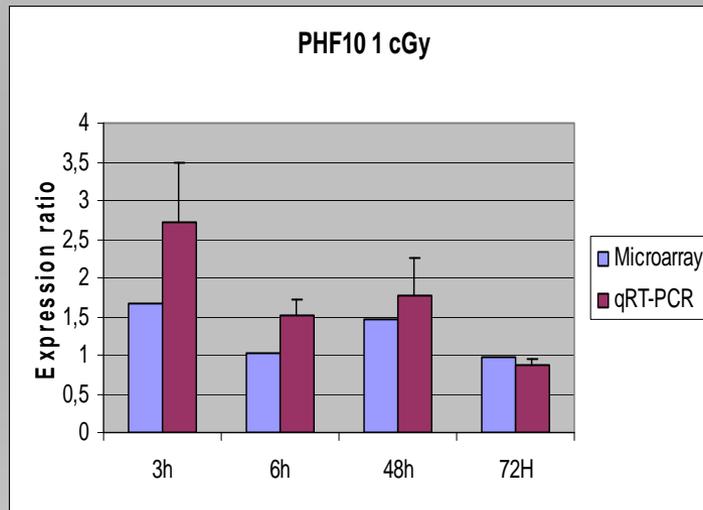
↓ 48h et ↑ 72h



Qui sont ces gènes ?

des facteurs de transcription
comme PHD finger ou GATA3

PHD finger



GATA3

Chef d'orchestre
de la réponse à 10 mGy

Franco, 2005

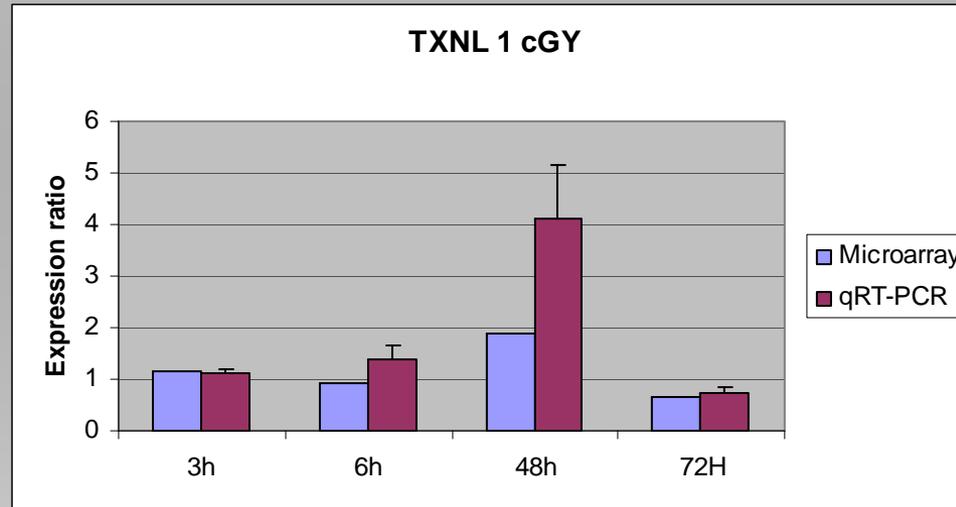
Bonin et al,

BMC Genomics 2009

Signature moléculaire faible dose précoce

Qui sont ces gènes ?

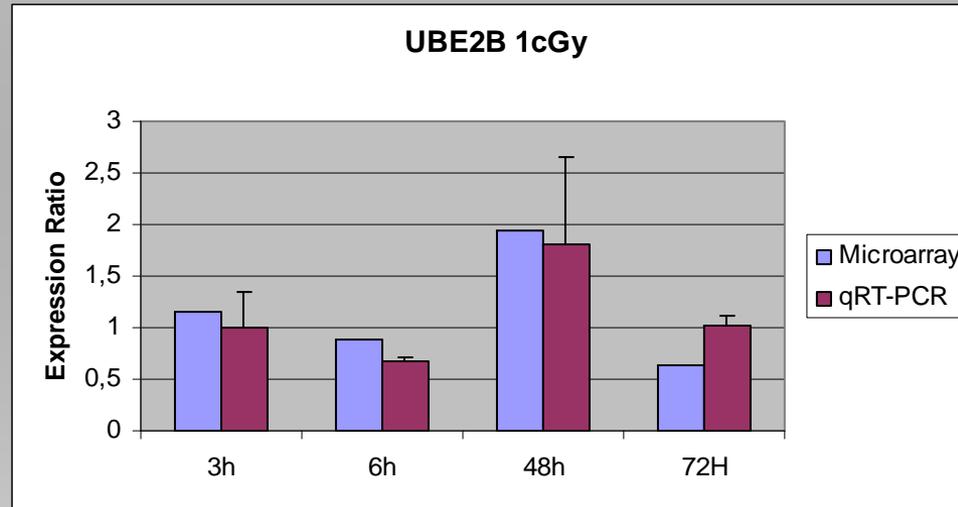
des gènes du stress oxydatif, comme la
thioredoxine



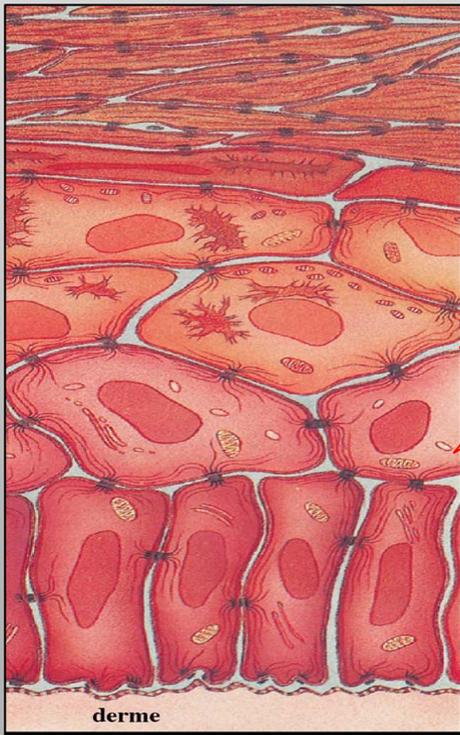
Signature moléculaire fd tardive

Qui sont ces gènes ?

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



Signature moléculaire fd tardive



Conclusion

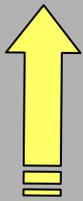
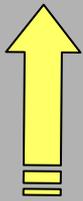
kératinocytes différenciés

marqueurs 10 mGy
précoces:
facteurs de transcription
stress oxydatif
catabolisme

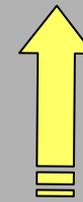
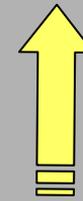
Franco N 2005
Bonin F 2009

Organisation hiérarchique de l'épiderme humain

couche cornée



différenciation terminale



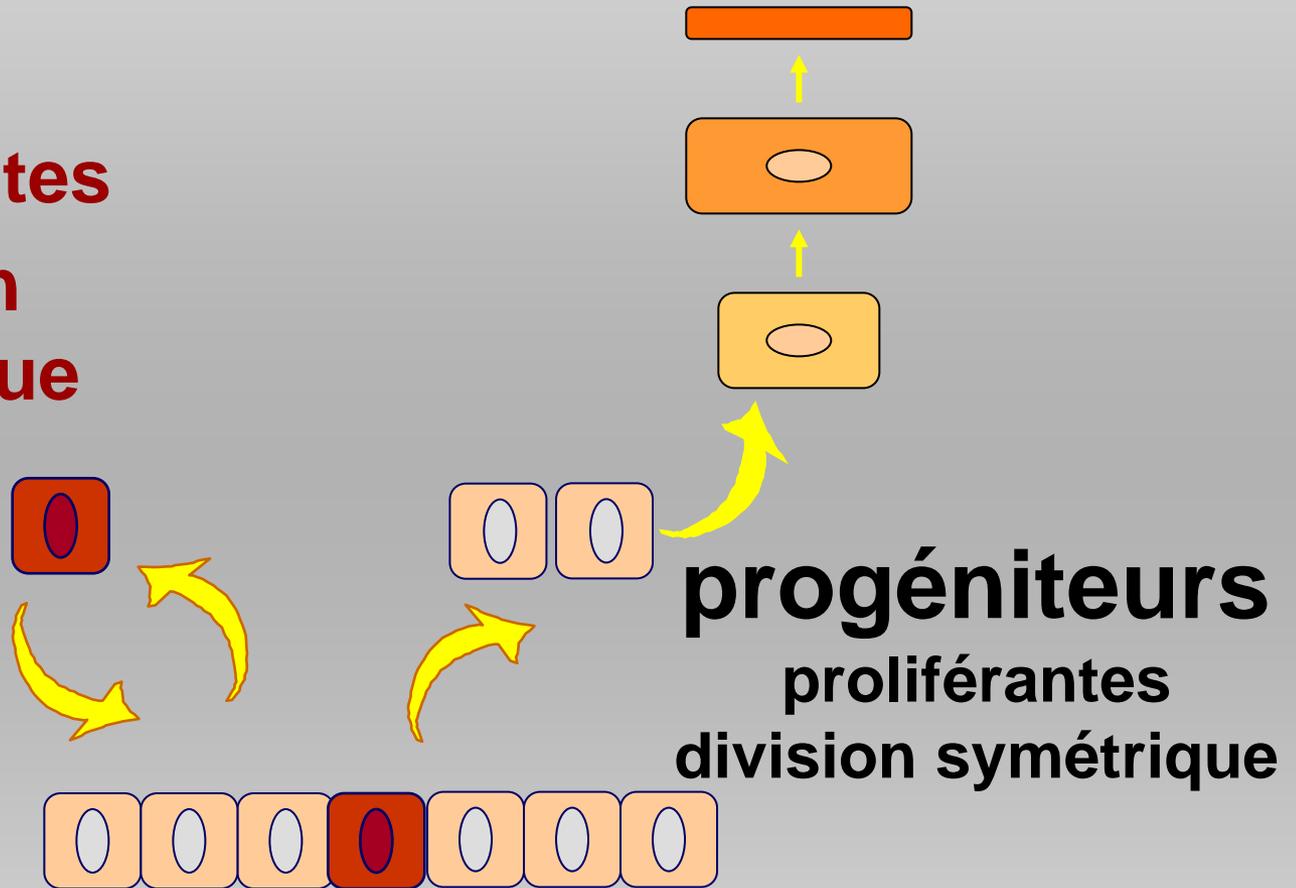
**Couche basale
cellules
souches**

prolifération

Cellules souches

- . quiescentes
- . division asymétrique

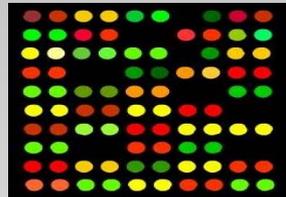
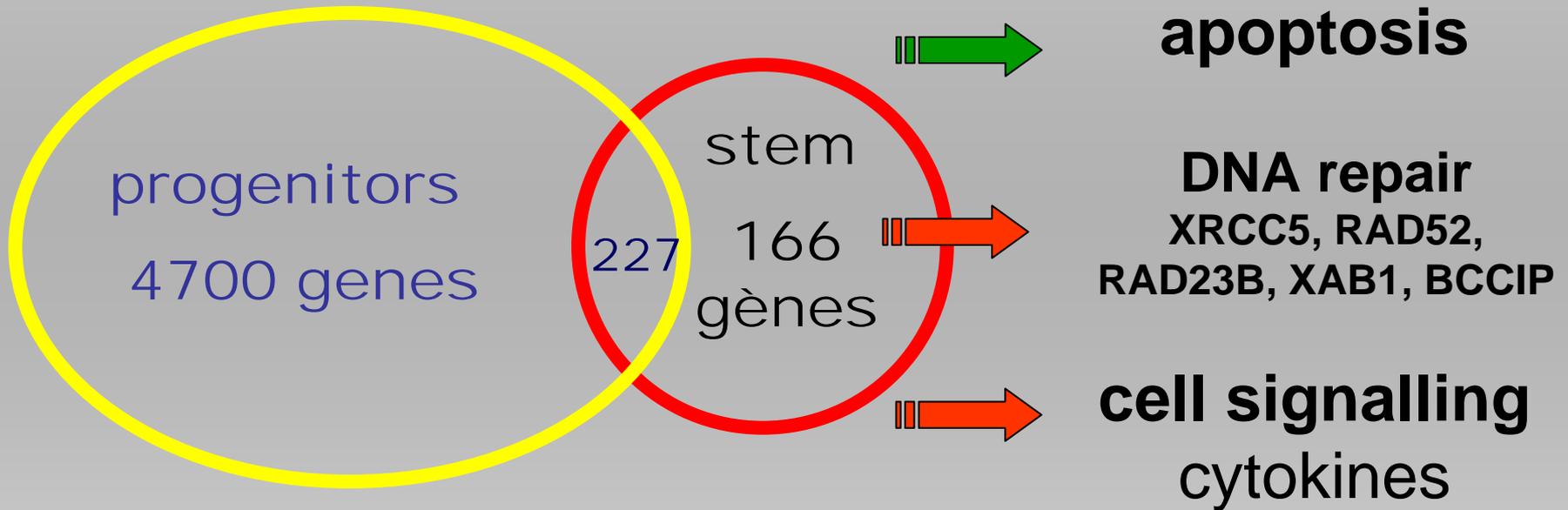
Cellules différenciées



Microarrays : 2 Gy response

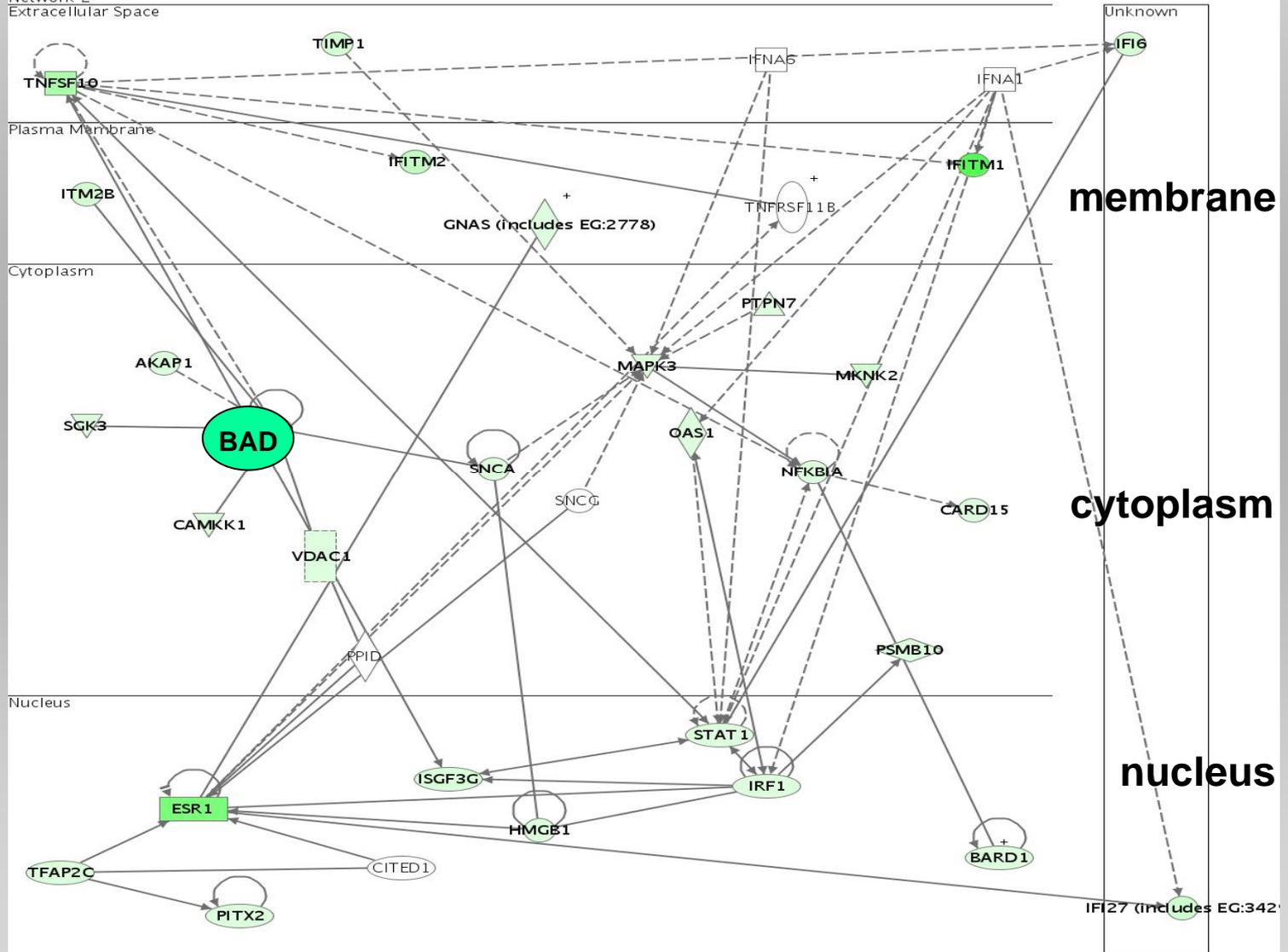
Gene response at 3 hours

Stem/progenitors



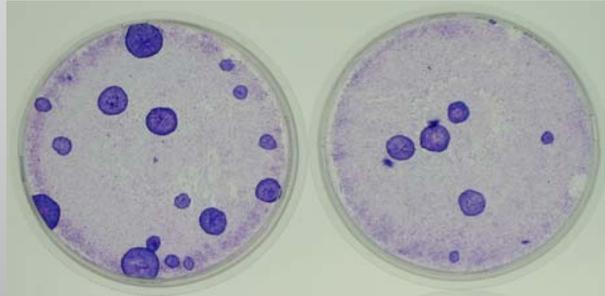
Most significant network in irradiated stem cells : **apoptosis-inducing genes**

Gènes reprimés stem 2 Gy vs - 2007-04-02 09:38 AM: Gènes reprimés stem 2 Gy vs 0Gy.xls
Network 2
Extracellular Space

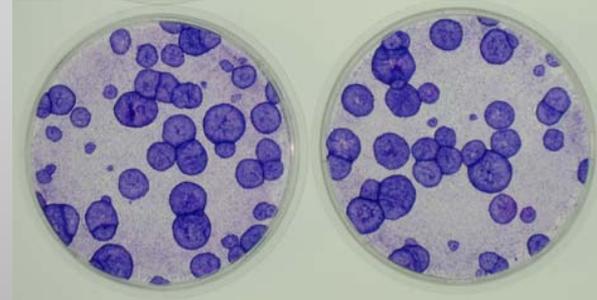


Ingenuity
down-
regulated
genes

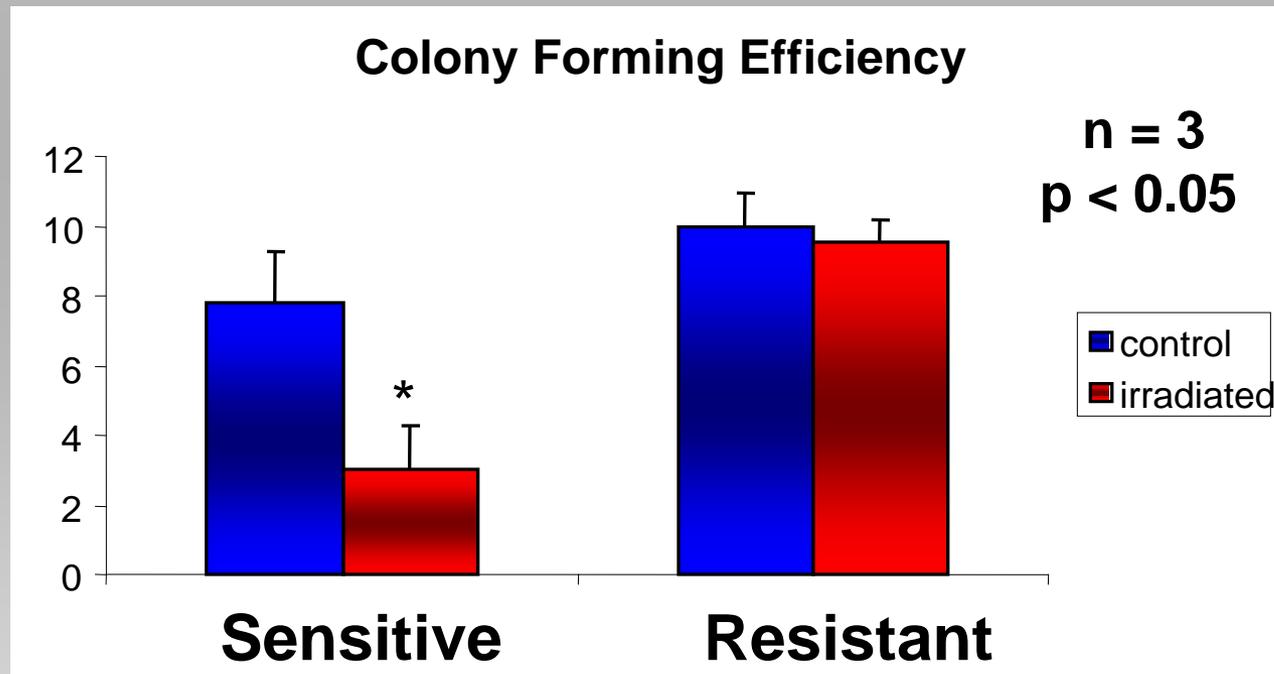
Long-term toxicity: survival at 15 days after 2 Gy



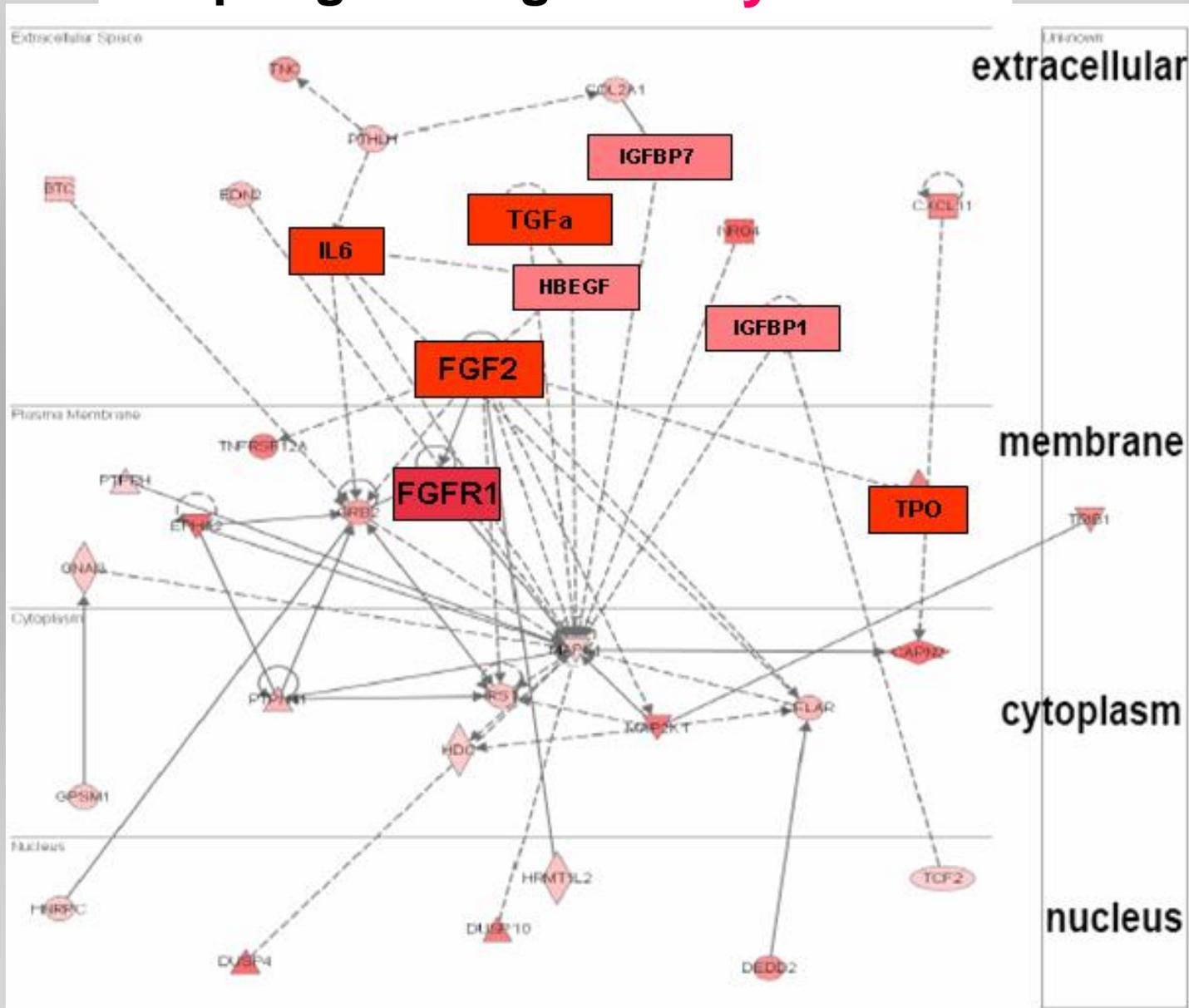
progenitors



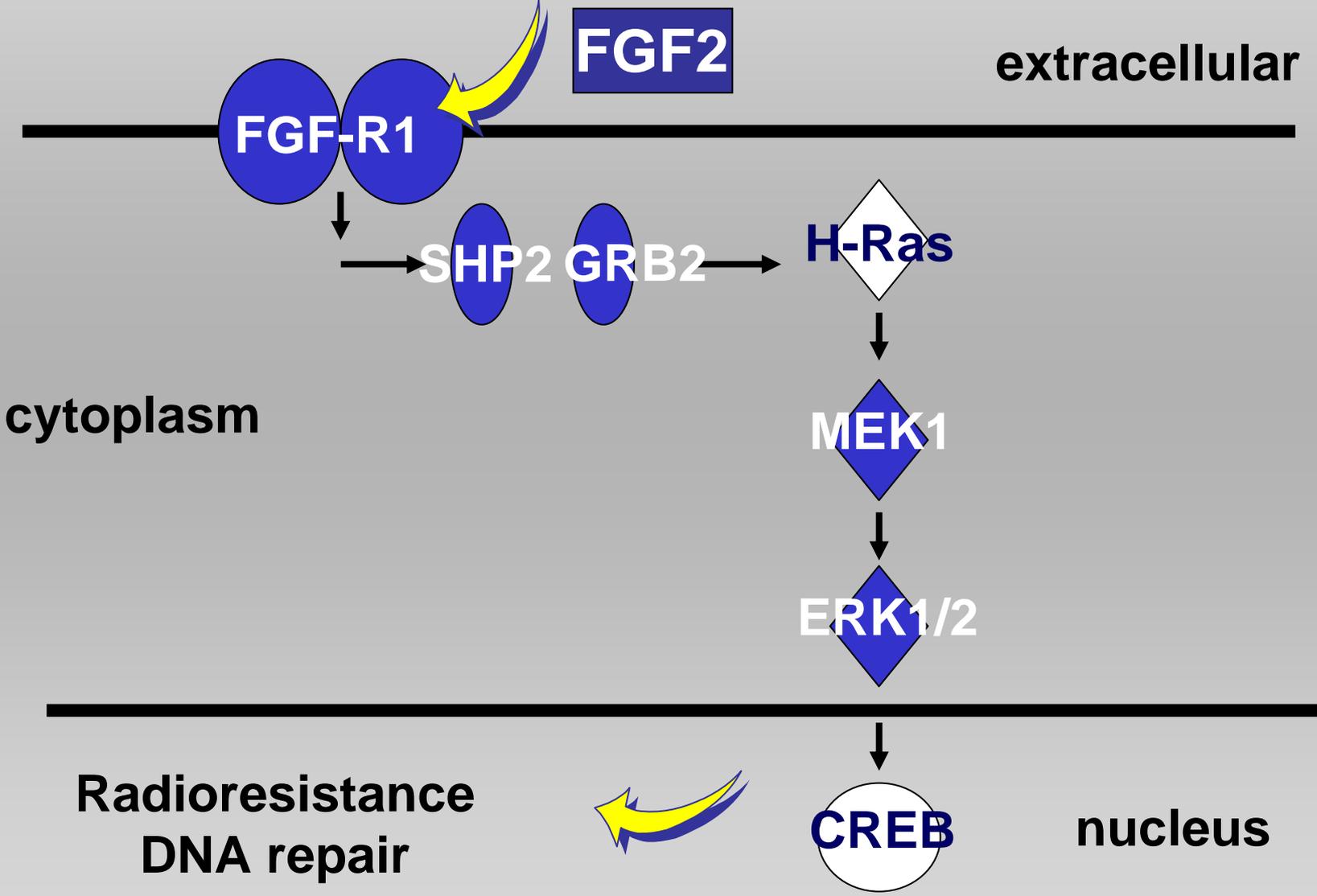
stem cells

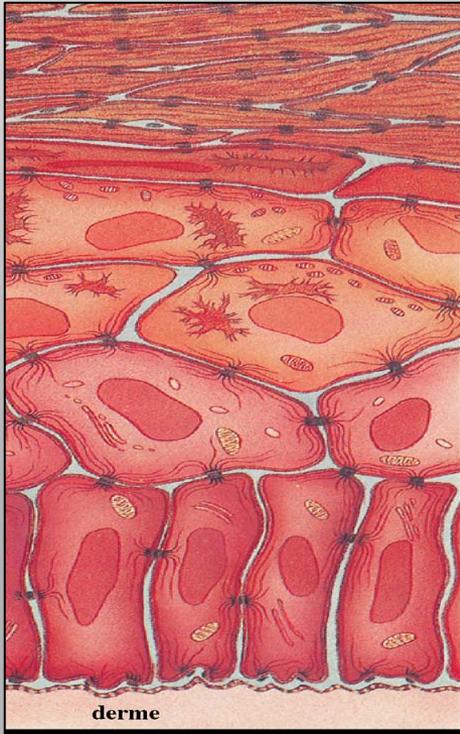


The most significant network of up-regulated genes: **cytokines**



FGF2 pathway

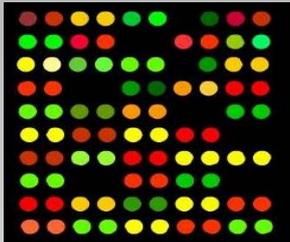




**Marqueurs 2 Gy
Cellules souches
et progéniteurs:**



**Cytokines
et facteurs de croissance**

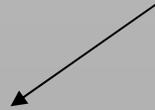


Applications dosimétriques

Liste de gènes spécifiques:

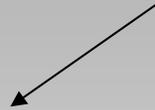
. à un état de différenciation

. à une dose

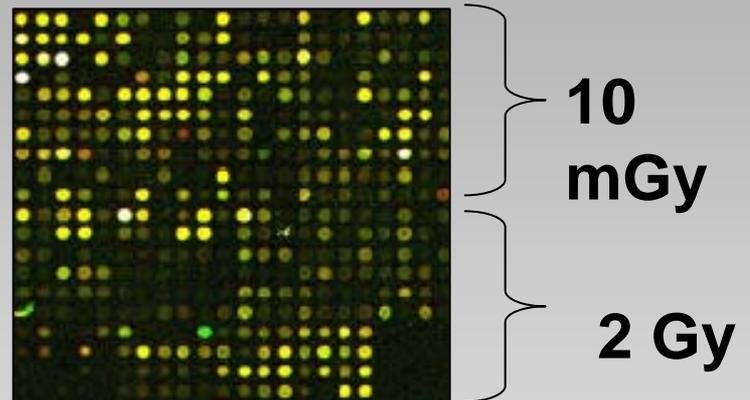


kits de PCR spécifiques

Puces de pronostic



test fonctionnel ATP



Génomique fonctionnelle et dosimétrie

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