



HAL
open science

Diplôme National d'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES de l'Université Paris-Sud 11

Denis Biard

► **To cite this version:**

Denis Biard. Diplôme National d'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES de l'Université Paris-Sud 11. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. tel-00352335

HAL Id: tel-00352335

<https://theses.hal.science/tel-00352335>

Submitted on 12 Jan 2009

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.

Mémoire présenté par

Denis BIARD

en vue de l'obtention du

**Diplôme National d'HABILITATION A DIRIGER DES
RECHERCHES de l'Université Paris-Sud 11**

Soutenue le **mardi 20 mai 2008** devant un jury composé de

Président :

Dr Alain Sarasin Directeur de recherche classe exceptionnelle CNRS ;
Docteur es Sciences et agrégé de l'Université. IGR (Villejuif)

Rapporteurs :

Prof Annelise Bennaceur-Griscelli Professeur des Universités et Praticien Hospitalier en
Hématologie, Université Paris-Sud 11

Dr Vincent Favaudon Directeur de recherche 2, Directeur de l'Inserm U612
Paris-Sud 11

Dr Jozo Délic Chercheur E5 CEA (Fontenay aux Roses)

Examineurs :

Dr Valérie Schreiber CR1, CNRS, Directrice du Département Intégrité du
Génome de l'UMR7175-LC1, CNRS (Strasbourg)

Dr Martine Defais Directrice scientifique adjointe, CNRS (Toulouse)

Dr Yvan Canitrot CR1, CNRS (Toulouse)

Je dédie ce manuscrit à ma femme, Ghislaine, ainsi qu'à mes enfants, Marine, Benoît, Nicolas et Alban, qui ont suivi mon travail pendant des années, souvent interloqués par mon regard d'enfant ...

A mes parents

Remerciements

Je remercie toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours de ces années passées dans différents laboratoires, que ce soit à l'ex-Rhône-Poulenc santé, au CNRS, au DKFZ ou au CEA. Je ne peux pas les remercier nominativement car j'aurai peur de faire des oublis, et je m'en voudrai car nombreuses sont ces personnes pour lesquelles je garde beaucoup d'estime et une profonde reconnaissance.

Cependant, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers le Dr Alain Sarasin qui me fait l'honneur et l'amitié de présider mon jury de HDR. Le Dr Alain Sarasin a suivi mon travail depuis ma thèse jusqu'à aujourd'hui ; il connaît tous les méandres de mon parcours et j'ai toujours autant de plaisir à travailler avec lui, 16 ans après avoir quitté son laboratoire.

Mes remerciements s'adressent à mes rapporteurs, le Prof Annelise Bennaceur-Griscelli, le Dr Vincent Favaudon et le Dr Jozo Délic, qui me font l'honneur d'évaluer mon travail et de parcourir rétrospectivement l'ensemble de ma démarche scientifique. Je les remercie pour leur compétence et pour la spontanéité avec laquelle ils ont accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

J'exprime ma reconnaissance à mes examinateurs, le Dr Valérie Schreiber, le Dr Martine Defais et le Dr Yvan Canitrot qui ont eu la gentillesse de bien vouloir apporter leurs regards pertinents à l'évaluation de mon travail.

Je remercie tout particulièrement le Dr Jaime Angulo de m'avoir accueilli dans son laboratoire en 1995, lors de sa création, et jusqu'à ce printemps de 2008 qui me verra partir pour d'autres horizons. Pendant toutes ces années, il m'a fait confiance et il m'a laissé la liberté de choisir mes orientations scientifiques. Tout au long de cette aventure, j'ai apprécié sa gentillesse et sa disponibilité.

Sommaire

SOMMAIRE	4
RESUME	6
CURRICULUM VITAE.....	7
<i>Etat Civil</i>	<i>7</i>
<i>Etudes.....</i>	<i>7</i>
<i>Stages de Recherche et Postes</i>	<i>7</i>
<i>Enseignements et formations donnés</i>	<i>8</i>
<i>Encadrement d'étudiants Universitaires.....</i>	<i>8</i>
<i>Publications</i>	<i>9</i>
<i>Brevets :</i>	<i>11</i>
CHAPITRE I : TRAVAUX DE RECHERCHE ANTERIEURS AU CEA.....	12
<i>Préambule.....</i>	<i>12</i>
<i>Test de réparation de l'ADN in vivo (UDS) (DEA).....</i>	<i>12</i>
<i>Etude des agents déméthylants de l'ADN (Thèse).....</i>	<i>13</i>
Contexte.....	13
L'outil biologique.....	14
Conclusions	17
<i>Modèle de la peau humaine reconstituée in vitro (stage post-doctoral).....</i>	<i>18</i>
CHAPITRE II : LA PROTEINE HUMAINE <small>HSA</small>KIN17	21
<i>Pourquoi la protéine kin17 ?</i>	<i>21</i>
<i>Résultats antérieurs à 2002.....</i>	<i>22</i>
Le gène <small>HSA</small> kin17 et son transcrit.....	22
La protéine <small>HSA</small> kin17 (1994-2000).....	22
La sur-expression de la protéine kin17 inhibe la prolifération des cellules (1999).....	24
Radiosensibilité, p53 et kin17 (1994-1997).....	24
<i>Derniers résultats sur la protéine <small>HSA</small>kin17 (après 2002-2005)</i>	<i>25</i>
Développement du système du baculovirus afin de sur-exprimer la protéine <small>HSA</small> kin17 (2000).....	25
La protéine <small>HSA</small> kin17 se fixe in vivo à la chromatine (2002)	26
La protéine <small>HSA</small> kin17 est sur-exprimée dans certaines lignées tumorales (2002-2003).....	26
Localisation ultrastructurale de la protéine <small>HSA</small> kin17 (2002-2005).....	28
<small>HSA</small> kin17 et le stress génotoxique (2002-2003).....	29
Induction de la protéine <small>HSA</small> kin17 associée à la chromatine après ré-initiation de la réplication de l'ADN	31
La protéine <small>HSA</small> kin17 se redistribue dans des complexes de hauts poids moléculaires après un arrêt en G1 / S (2003)	32
Etude des conséquences biologiques d'une sous-expression de la protéine <small>HSA</small> kin17 (stratégie antisens) (2002-2003)	33
<small>HSA</small> kin17 et la réplication de l'ADN (2002-2005)	34
CHAPITRE IV : TRAVAIL ACTUEL : L'INTERFERENCE ARN A TRES LONG TERME	37

<i>Objectif</i>	37
<i>L'Interférence ARN (RNAi)</i>	38
La découverte de l'Interférence ARN en bref :	38
Les microRNA :	39
Le mécanisme de l'Interférence ARN	39
Les structures siRNA dans les cellules de Mammifères.....	40
Les structures shRNA ou shRNA-mir.....	41
Le design des séquences siRNA	42
<i>Les vecteurs pEBVsiRNA</i>	43
Pourquoi le modèle de vecteurs EBV	43
<i>Avantage des vecteurs pEBVsiRNA sur l'art antérieur</i>	45
<i>Résultats obtenus (2004-2007)</i>	46
<i>Comparaison modèle « souris KO » versus modèle « clone HeLa KD »</i>	51
CHAPITRE V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	55
<i>Mon Projet</i>	55
<i>1^{ère} priorité : les cellules primaires humaines</i>	56
<i>2^{ème} priorité : Interférence ARN à long terme et Radiobiologie</i>	57
<i>3^{ème} priorité : Approche in vivo</i>	59
<i>4^{ème} priorité : Valorisation (relations avec les industriels)</i>	60
<i>Nouvelles orientations</i>	61
BIBLIOGRAPHIE	62

Résumé

Les travaux présentés dans ce document retracent mes activités de Recherche dans le domaine de la Biologie Cellulaire et Moléculaire, qui m'ont conduit de la Toxicologie Génétique à la Radiobiologie. L'action des génotoxiques sur le patrimoine héréditaire a toujours constitué le fil conducteur de mes activités. A chaque étape de mon parcours, j'ai développé des modèles biologiques destinés à répondre à des thématiques bien précises.

Mon travail de recherche a commencé pendant deux ans à Rhône-Poulenc (1985-1986) par le test de la réparation de l'ADN *in vitro* et *in vivo* (*UDS* ou ***unscheduled DNA synthesis***) sur hépatocytes de rats Sprague Dawley et Fischer 344. Ce test de « dommages primaires » permet de prédire l'activité génotoxique des xénobiotiques. Dans l'approche *in vivo*, mon étude mettait en évidence l'importance du métabolisme intestinal dans l'activation métabolique de certains agents génotoxiques indirects (dérivés dinitrotoluène). J'ai ensuite débuté une approche plus fondamentale au CNRS (1988-1992). En utilisant les outils de la Génétique Moléculaire, j'ai créé un nouveau modèle cellulaire exprimant un système de régulation génique qui permet de **détecter rapidement les agents modifiant le profil de méthylation de l'ADN au niveau des sites 5-CpG₃**. Ces xénobiotiques, à l'origine des « épimutations » et de la dérégulation de l'expression de certains gènes, ont une contribution importante et souvent sous-estimée dans la progression tumorale.

En 1992, je me suis orienté vers la Radiobiologie au DKFZ (*Deutsches Krebsforschungszentrum* ; Heidelberg, Allemagne) puis au CEA (LRA). Il s'agissait d'adapter à la Radiobiologie le **modèle de culture de la peau humaine reconstituée *in vitro***, destiné auparavant à étudier la physiologie des kératinocytes normaux ou pathologiques. L'objectif était (i) d'irradier les spécimens de peau et d'étudier les effets d'une irradiation sur les kératinocytes et les fibroblastes), et (ii) de mimer *in vitro* la fibrose radioinduite. Ce modèle de culture alternatif prend en compte les interactions entre cellules épithéliales et mésenchymateuses. Au cours de ce travail, je me suis intéressé à la **protéine humaine HSAkin17**. Mon activité s'est alors recentrée sur cette protéine. Le développement de nombreuses approches cellulaires et moléculaires au laboratoire (LGR) nous a permis de mettre en évidence l'implication de cette protéine dans la **réplication de l'ADN**, notamment lorsque la progression des fourches de réplication est bloquée par des **dommages non-réparés de l'ADN**. Nous avons démontré que cette protéine était un **composant nécessaire au complexe de réplication de l'ADN** et qu'elle avait une activité de **reconnaissance des origines de réplication endogènes**.

Depuis la fin 2003, j'ai développé et validé les vecteurs **pEBVsiRNA** pour une **interférence ARN (RNAi)** à **très long terme** (> 500 jours). Ce travail a été mené sur de nombreux gènes (110 gènes ciblés), essentiellement des **gènes de la réparation de l'ADN**. Un brevet a été déposé en 2005. Cette approche nous permet maintenant de travailler sur les interconnexions entre les mécanismes de réparation de l'ADN dans des lignées isogéniques. A ce jour, je suis le **seul à proposer un tel modèle cellulaire cohérent** avec un **aussi grand nombre de clones stables**, maintenus en culture **aussi longtemps**. La création de clones silencieux, stables à très long terme, m'a permis de participer à l'élaboration de nouveaux projets de Recherche dans le cadre de nombreuses collaborations, dont certaines seront énoncées dans ce rapport. Par ailleurs, ma démarche a abouti à une **valorisation industrielle**.

Curriculum vitae

Docteur de l'Université Paris VII en Toxicologie Fondamentale et Appliquée

Chercheur au Commissariat à l'Energie Atomique depuis 1992

Etat Civil

Nom – Prénom : BIARD Denis

Marié, 4 enfants.

Né le : 28 octobre 1962, Paris 13^{ème}

e-mail : denis.biard@cea.fr

Etudes

1991-1988 Doctorat. Université PARIS VII. Thèse soutenue le 9 décembre 1991, spécialité: Toxicologie Fondamentale et Appliquée (UFR: Biologie et Sciences de la Nature), Titre de Docteur- de l'Université Paris VII avec mention très honorable et les félicitations des membres du jury.

(1987-1986 Service Militaire. Service scientifique des armées ; Département de Chimie-Toxicologie du centre d'Etudes et de Recherches de la Médecine Aérospatiale, cité de l'air Paris-Balard).

1986-1985 Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en Toxicologie Fondamentale et Appliquée, Université PARIS VII, mention TB, Major.

1985-1983 Maîtrise de Sciences et Techniques Génie Biologique et Biochimique, université PARIS XII, mention B, Major.

1983-1981 DEUG Sciences de la Nature et de la Vie, université PARIS XII, mention B, Major.

Stages de Recherche et Postes

2007-1995 Chercheur au Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité du Dr J. Angulo, CEA-DSV-DRR, Fontenay aux Roses.

1995-1992 Chercheur au Laboratoire de Radiobiologie Appliquée du Dr F. Daburon, CEA-DSV, Jouy en Josas.

1992 Stage post-doctoral (6 mois) dans le laboratoire du Prof Dr N.E. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum. "Carcinogenese und Differenzierung *in vitro*". Heidelberg. Allemagne). Sujet : *Interaction between mesenchymal cells and human keratinocytes in organotypic cultures. Modification induced by ionizing radiations.*

1991-1988 Stage de Thèse d'Université au sein du laboratoire de Génétique Moléculaire du Dr A. Sarasin (CNRS-IRSC, Villejuif) subventionné par le département de Toxicologie de Rhône-Poulenc santé (3 ans) et par l'Association pour la Recherche sur le Cancer (un an). Sujet: *Détection rapide des agents modifiant le profil de méthylation de l'ADN au niveau des sites 5-CpG₃.*

1987-1986 Service Militaire effectué dans le cadre du service scientifique des armées au sein du département de Chimie-Toxicologie du centre d'Etudes et de Recherches de la Médecine Aérospatiale, cité de l'air Paris-Balard. Sujet : *Dosage de β -bloquants dans les urines par chromatographie en phase gazeuse et chromatographie liquide haute performance.*

1986 Contrat à durée déterminée d'Ingénieur / cadre au sein de l'unité de Toxicologie Génétique du Dr A. Cordier du Centre de Recherches de Rhône-Poulenc santé de Vitry sur Seine. Sujet : *Suivi du test de la réparation de l'ADN in vivo / in vitro sur hépatocytes de rats Sprague Dawley et Fischer 344.*

1986-1985 Stage de DEA au sein de l'unité de Toxicologie Génétique du Dr A. Cordier de Rhône-Poulenc santé (12 mois). Sujet : *Mise au point du test de la réparation de l'ADN in vivo sur hépatocytes de rats Sprague Dawley et Fischer 344.*

1985 Stage de Maîtrise de Sciences et Techniques au sein de l'unité de Toxicologie Génétique du Dr A. Cordier de Rhône-Poulenc santé (3 mois). Sujet : *Développement du test de la réparation de l'ADN in vitro sur hépatocytes de rats en primoculture.*

Enseignements et formations donnés

2007 Responsable de la formation « Interférence ARN », à l'INSTN (CEA Saclay).

2005-2007 **Enseignement** en Master Sciences/Technologie/Santé (6 heures/an) : « Interférence ARN / Démarche scientifique et modèles cellulaires / Qualité en recherche ». Faculté des Sciences et Technologie. Université Paris XII /Val de Marne.

20032005 **Enseignement** en DESS « cultures cellulaires in vitro » (8 heures/an). : « Stress génotoxique / Démarche scientifique ». Faculté des Sciences et Technologie. Université Paris XII /Val de Marne.

2005-2007 Correcteur à *Nucleic Acids Research Methods*.

2006 Intervenant dans la formation « Interférence ARN », à l'INSTN (CEA Saclay).

2002 Groupes de travail AFNOR x583 (déroulement des activités en recherche) et x584 (guide de lecture de l'ISO9001 :2000).

2002-2000 **Enseignement** en Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie Animale. « *Stress oxydatif* » (12 heures/an) dans le cadre du module du Prof. D. Mathé. Université Paris XII /Val de Marne.

2000-1998 **Responsable Qualité** du DRR. CEA-DSV-DRR, chargé de la mise en place de la démarche Qualité.

1998 **Enseignement** en Maîtrise de Sciences et Techniques *Génie Biologique et Biochimique*, 1^{ère} année, « *Stress oxydatif* » (10 heures/an) dans le cadre du module du Prof. D. Mathé. Université Paris XII /Val de Marne.

Encadrement d'étudiants Universitaires

Bac + 5 :

2002-2006 Emmanuelle Despras. Thèse de l'Université Paris V. Les protéines KIN17, XPC, DNAPK_{CS} et XRCC4 dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Etude des relations entre la réparation par excision de nucléotides et la recombinaison non homologue dans un modèle syngénique humain.

2002-2001 Emmanuelle Despras. DEA de Biologie de la Cellule Normale et Pathologique. Université Paris V. Caractérisation de la fraction de la protéine _{HSA}kin17 humaine associée à la chromatine. Implication dans la réponse aux rayonnements ionisants et dans la radiosensibilité.

2001-2000 Emmanuelle Despras. Ecole des Mines de Paris. Stage de fin d'étude. Etude de la protéine $_{HSA}kin17$ dans des cellules humaines tumorales : implication dans le déroulement du cycle cellulaire et dans la réponse à une irradiation ionisante.

2000-1999 Lucien Audibert. Ecole des Mines de Paris. Stage de fin d'étude. Etude des propriétés biologiques de la protéine $_{HSA}kin17$. Activité anti-proliférative et induction après un stress oxydatif dans des cellules tumorales en culture.

1999-1998 Alexio Campovilla. Etudiant en Thèse sud-africain du laboratoire du Dr P. Arbuthnot. Université de Johannesburg. Utilisation du baculovirus pour la sur-expression de la protéine X du virus HPV.

1998 Géraldine Legros. Ecole Normale Supérieure des Techniques Avancées.

1996-1995 Yannick Saintigny. DEA de Radiobiologie. Université Paris Sud. Caractérisation de la protéine $_{HSA}kin17$ lors d'une irradiation γ de peau humaine reconstituée *in vitro*.

1995-1994 Marie Catherine Vozenin. DEA. Co-tutorat. Modèle de la peau humaine et porcine reconstituée *in vitro*.

Bac + 4 :

1997 Charlotte Lannuzel-Drogou. Stage de Maîtrise de Biochimie. Université Paris VII. Utilisation de Baculovirus recombinants pour produire en grande quantité la protéine MMUkin17.

1995 Yannick Saintigny. Stage de Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie. Université d'Auvergne. Le modèle de la peau reconstituée *in vitro*. Etude de l'expression des gènes radio-induits.

Bac + 3 :

2000 Nathalie Beaufort. Stage de 10 semaines. Université Paris XII. 1ère année de Maîtrise de Sciences et Techniques Génie Biologique et Biochimique.

1999 Patricia Vieira. Stage de 10 semaines. Université Paris XII. 1ère année de Maîtrise de Sciences et Techniques Génie Biologique et Biochimique.

1998-1997 Vincent Brochard. Stage de 3ème année Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée. Utilisation des vecteurs EBV pour la caractérisation des effets biologiques de la protéine MMUkin17.

1997-1996 Laurent Peres. Stage de 3ème année Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée. Etude de l'expression ectopique de la protéine MMUkin17 dans des cellules humaines.

1995-1994 Rachel Rousseau. Stage de 3ème année Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée. Etude de la protéine kin17 au cours de la différenciation d'un épithélium : application du modèle de la peau humaine reconstituée *in vitro*.

1994-1993 Carine Strup. Stage de 3ème année Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée. Rôle de l'anti-oncogène p53 dans la résistance aux rayons ionisants.

Publications

Articles parus dans des revues à Comité de lecture :

- 1) Pennarun G, Granotier C, Hoffschir F, Mandine E, **Biard D**, Gauthier LR and Boussin FD (2008) ATM prevents inappropriate DNA repair induced by the G-quadruplex ligand 360A at telomeres. *Nucleic Acids Res.* 2008 Feb 7 [Epub ahead of print].
- 2) Wu P, Frit P, Malivert L, Revy1 P, **Biard D**, Salles B and Calsou P (2007). Interplay between Cernunnos-XLF

and NHEJ proteins at DNA ends in the cell. *J. Biol. Chem.*, **282**, 31937-31943

- 3) **Biard DSF** (2007). Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* **35**, 3535-50.
- 4) Despras E, Pfeiffer P, Salles B, Calsou P, Kuhfittig-Kulle S, Angulo JF, and **Biard DSF** (2007) Long-term XPC Silencing Reduces DNA Double-Strand Break Repair. *Cancer Res*, **67**: 2526-2534.
- 5) **Biard DSF**, Despras E, Sarasin A and Angulo J.F. (2005) Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol. Cancer Res.*, **3**, 519-529.
- 6) Miccoli L, Frouin I, Novac O, Di Paola D, Harper F, Zannis-Hadjolopoulos M, Maga G, **Biard DSF**, and Angulo JF (2005) The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates in vivo with mammalian replication origins. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 3814-3830
- 7) Angulo J.F, Mauffrey P., Pinon-Lataillade G., Miccoli L. and **Biard D.S.F.** (2005). Putative roles of kin17, a mammalian protein binding curved DNA, in transcription. *DNA Conformation and Transcription*, Landes Biosciences. Ed. Takashi Ohyama, Konan University. Pp 76-89.
- 8) Miccoli L., **Biard D.S.F.**, Harper F., Frouin I., Maga G., and Angulo J.F. (2003). Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell Cycle-regulated manner. *Nucleic Acid Res*, **31**, 4162-4175.
- 9) **Biard D.S.F.**, Miccoli L., Despras E., Harper F., Pichard E. Créminon C., and Angulo J.F. (2003) Participation of kin17 protein in replication factories and in other DNA transactions mediated by high molecular weight nuclear complexes. *Mol. Cancer Res.*, **1**, 519-531.
- 10) Despras E, Miccoli L, Créminon C, Rouillard D, Angulo JF, and **Biard DSF**. (2003) Depletion of kin17, a human DNA-replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. *Radiat. Res*, **159**, 748-758.
- 11) Miccoli L, **Biard DSF**, Créminon C, and Angulo JF (2002). Human kin17 Protein Directly Interacts with the SV40 Large T Antigen and Inhibits DNA Replication. *Cancer Res.*, **62**, 5425-5435.
- 12) **Biard DSF**, Miccoli L, Despras E, Frobert Y, Créminon C, and Angulo JF (2002) Ionizing radiation triggers chromatin-bound _{HS}Akin17 complex formation in human cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 19156-19165.
- 13) **Biard DSF**, Kannouche P, Lannuzel-Drogou C, Mauffrey P, Apiou F, and Angulo JF. (1999) Ectopic expression of _{Mm}kin17 protein inhibits cell proliferation and modifies cell morphology of human tumor-derived cells. *Exp. Cell Res.*, **250**, 499-509.
- 14) Vozenin MC, Lefaix J.L., Ridi R, **Biard D**, Daburon F, Martin M. (1998). The myofibroblasts markers a SM actin and β actin are differentially expressed in 2 and 3-D culture models of skin fibroblasts. *Cytotechnology*, **26**, 29-38.
- 15) **Biard DSF**, Saintigny Y, Maratrat M, Vozenin MC, Martin M, Daburon F, Angulo J. (1997) Differential Expression of the _{HS}Kin17 Protein during Differentiation of in vitro Reconstructed Human Skin. *Arch. Dermatol. Res.*, **289**, 448-456.
- 16) **Biard DSF**, Saintigny Y, Maratrat M, Paris F, Martin M, and Angulo JF. (1997) Enhanced expression of the Kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation. *Radiat. Res.*, **147**, 442-450.
- 17) Kannouche P, Pinon-Lataillade G, Mauffrey P, Faucher C, **Biard DSF**, Angulo JF. (1997) Overexpression of kin17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells. *Biochimie*, **79**, 599-606.
- 18) Kannouche P, Tissier A, Mauffrey P, **Biard DSF**, Pinon-Lataillade G, Angulo J. (1997) The γ -irradiation of cultured mouse cells does not affect Kin-17 RNA levels. *Radioprotection*, C1-151.
- 19) Tissier A, Kannouche P, **Biard D**, Timchenko T, Mazin A, Araneda S, Allemand I, Mauffrey P, Frelat G, Angulo JF. (1995). The mouse Kin-17 gene codes for a new protein involved in DNA transactions and is akin to the bacterial RecA protein. *Biochimie*, **77**, 854-860.

- 20) **Biard DSF**, Martin M, Le Rhun Y, Duthu A, Lefaix JL, May E and May P. Concomitant p53 gene mutation and increased radiosensitivity in rat lung embryo epithelial cells during neoplastic development. *Cancer Res.*, **54**, 3361-3364 (1994).
- 21) **Biard DSF**, Maratrat M, Thybaud V, Melcion C, and Sarasin A. (1992) Flow cytometric detection of drugs altering the DNA methylation pattern. *Cancer Res.*, **52**, 5213-5218.
- 22) **Biard DSF**, Cordier A, and Sarasin A. (1992) Establishment of a human cell line for the detection of demethylating agents. *Exp. Cell Res.*, **200**: 263-271.
- 23) **Biard DSF**, James MR, Cordier A, and Sarasin A. (1992) Regulation of the Escherichia coli lac operon expressed in human cells. *Biochimica Biophysica Acta.*, **1130**, 68-74.

Articles parus dans une revue sans Comité de lecture :

- 24) **Biard, DSF.**, and JF Angulo (2007). Long term RNA interference: Toward a set of isogenic human cells deficient in DNA repair genes, p. 191-217. In B. R. Landseer (ed.), *New research on DNA repair*, vol. Chapter VII. Nova Science Publishers, Inc.
- 25) **Biard DSF** (2000). Efficient transfection of Epstein Barr-derived vectors in human tumorigenic cells. *Focus* (Gibco BRL). 22.1.

Brevets :

2005 Biard D et Angulo-Mora JF. Brevet CEA n°0501483. "Vecteurs d'expression stable et de longue durée de siRNA et leurs applications". Déposé le 14 février 2005. Demande internationale PCT déposée le 14 février 2006 (n° PCT/FR2006/000330).

1997 Kannouche P, Mauffrey P, Pinon-Lataillade G, **Biard DSF**, et Angulo-Mora J.F Séquences codant pour la protéine kin17 et leurs applications. Brevet d'invention N° 97 155 36 du Commissariat à l'Energie Atomique.

Chapitre I : Travaux de Recherche antérieurs au CEA

Préambule

Mon parcours scientifique m'a conduit à développer dans différents laboratoires des modèles expérimentaux qui ont en commun de permettre l'étude des agents interagissant directement avec la structure primaire de l'ADN (agents génotoxiques) ou avec le contrôle épigénétique du génome (par exemple la méthylation de l'ADN). Cela a consisté dans la mise en place (i) du **test de réparation de l'ADN *in vitro*** puis *in vivo*, (ii) à la création d'une lignée cellulaire humaine permettant la **détection rapide des agents modifiant le profil de méthylation de l'ADN**, (iii) au développement du **Modèle de la peau humaine reconstituée *in vitro*** comme outil d'étude en Radiobiologie ou encore dernièrement (iv) au développement de **nouveaux vecteurs pour une expression stable et de longue durée de l'interférence ARN afin d'étudier l'interconnexion des mécanismes de réparation de l'ADN**. Au cours de mon parcours, je me suis également intéressé à une protéine de réponse au stress, la protéine humaine $_{HSA}kin17$.

J'ai inséré dans ce manuscrit des figures qui n'ont pour objectif que d'agrémenter mon propos.

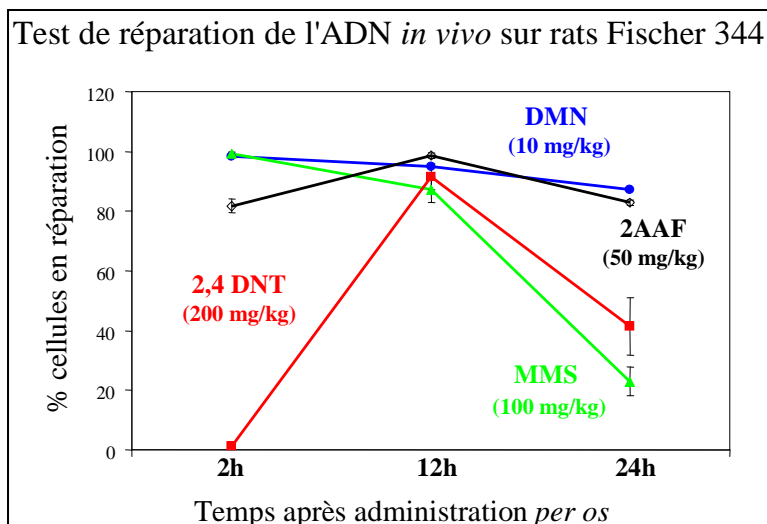
Test de réparation de l'ADN *in vivo* (UDS) (DEA)

De **juin 1985 à novembre 1986**, le Dr André Cordier (ex-Rhône Poulenc, Vitry/Seine) m'a donné l'opportunité de travailler dans son département. Au cours d'un premier stage de Maîtrise de Sciences et Techniques, j'ai travaillé sur le test de la réparation de l'ADN *in vitro* (**UDS ou *unscheduled DNA synthesis***) sur hépatocytes de rats en primoculture (*HPC*). Ce test UDS / HPC repose sur l'induction des systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN. Dans ce test, j'ai utilisé comme produits positifs la mitomycine C ou le benzo[a]pyrène et comme produits négatifs le pyrène. J'ai ensuite appliqué ce test à l'analyse de dérivés quinoliques connus et à celle de produits confidentiels de Rhône Poulenc.

Au cours de mon second stage (DEA), j'ai adapté le **test de la réparation de l'ADN** à une approche *in vivo*. Cette approche est essentielle car elle prend en compte le métabolisme de détoxification non seulement des hépatocytes (comme le test *in vitro*) mais également intestinal. Ainsi, des mutagènes indirects, négatifs dans l'approche *in vitro*, peuvent s'avérer positifs dans l'approche *in vivo*. Mon travail a été d'établir les conditions expérimentales de ce test et de l'appliquer à des génotoxiques directs comme le méthyl méthane sulfonate (*MMS*), à des génotoxiques indirects à effets précoces comme le diméthylnitrosamine (*DMN*) ou le diéthylnitrosamine (*DEN*), à des génotoxiques indirects à effets tardifs comme le 2 acétylaminofluorène (*2 AAF*) et à des génotoxiques indirects activés par la flore intestinale puis par le métabolisme hépatique comme le 2,4 dinitrotoluène (*2,4 DNT*). J'ai suivi les cinétiques de réparation de l'ADN après administration

per os et/ou intraveineuse des génotoxiques. J'ai également appliqué ce test à des produits Rhône Poulenc confidentiels en *screening* ; c'est pour cette raison que ce travail n'a pas pu donner lieu à publication.

Pour chaque produit j'ai comparé le test *in vitro* avec le test *in vivo*, ainsi que l'influence de la souche de rats utilisée (Sprague Dawley *versus* Fischer 344). Ces rats présentent des sensibilités très différentes aux génotoxiques ; un résultat très intéressant a été obtenu avec le **2,4 DNT** : ce génotoxique est un hépatocarcinogène très puissant chez le rat dont le métabolisme fait intervenir à la fois des bactéries de la flore intestinale



(des nitroréductases) et le métabolisme hépatique d'oxydo-réduction (*via* les monooxygénases à fonctions mixtes dépendant des cytochrome P450). Classiquement le *2,4 DNT* est négatif dans de nombreux tests de mutagenèse *in vitro*. J'ai mis en évidence que ce produit était négatif dans le test UDS / HPC *in vitro*, douteux dans le test UDS *in vivo* sur rats Sprague Dawley et fortement positif chez le rat F344. Cela peut s'expliquer par une composition différente des flores intestinales. Chez le rat F344, le profil d'induction de l'UDS par le *2,4 DNT* (200 mg/kg *per os*) est intéressant puisqu'il montre une cinétique lente (rien à 2h, maximale à 12h) qui s'explique par la complexité du métabolisme et sans doute par une résorption intestinale lente. A l'opposé le *MMS* (100 mg/kg *per os*) induit une UDS très rapide chez le rat F344, maximale à 2h. Le *DMN* (10 mg/kg *per os*) a été le produit le plus génotoxique que nous ayons étudié avec une UDS maximale à 2, 12 et 24h. Enfin, le *2 AAF* (50 mg/kg *per os*) est positif à tous les temps avec une induction maximale à 12h traduisant une cinétique plutôt lente ; cela peut être dû à la résorption intestinale.

A la suite de mon stage de DEA et dans le cadre d'un contrat à durée déterminée au sein de Rhône Poulenc, précédant mon départ au service militaire, j'ai transmis ce test à un autre responsable afin de le pérenniser.

Etude des agents déméthylants de l'ADN (*Thèse*)

Contexte

En **1988**, j'ai débuté ma thèse dans le laboratoire du Dr Alain Sarasin (CNRS Villejuif) sous la responsabilité conjointe du Dr André Cordier. Je me suis alors engagé dans la voie de la biologie moléculaire. Notre postulat était que certains xénobiotiques interagissent avec le profil de méthylation de l'ADN (5-CpG_3) et modifient l'expression des gènes ; il fallait donc mettre en place des tests biologiques simples pour détecter ce potentiel déméthylant.

On trouve dans le génome des organismes supérieurs 2 à 7% des résidus cytosine sous la forme de 5-méthylcytosine (5mC) groupés en îlots 5-CpG_3 . Ces structures sont souvent associées aux extrémités 5' et 3' de gènes ayant une spécificité tissulaire. Cette méthylation fait intervenir des ADN [cytosine-5]-méthyl transférases (ou ADN méthylases) qui reconnaissent préférentiellement des sites hémiméthylés. Ces enzymes permettent ainsi la méthylation rapide du second brin après la réplication de l'ADN. Cette fonction de "maintenance de la méthylation" permet de préserver le profil de méthylation de l'ADN d'une génération à une autre. Ces enzymes doivent aussi être impliquées dans la "méthylation *de novo*" de l'ADN responsable de la spécialisation de l'expression génétique en fonction du type cellulaire et de l'état de différenciation des cellules. La méthylation de la cytosine participe à la différenciation cellulaire, à l'expression spécifique d'un stage de développement, à l'inactivation des gènes portés par le chromosome X, à « l'empreinte » génétique, à l'induction rétrovirale ou encore à l'oncogenèse. Des taux de méthylation de l'ADN réduits peuvent être impliqués dans l'activation de l'expression de certains oncogènes et augmenter le taux de progression tumorale.

De nombreux analogues de la cytidine (5-azacytidine, 5-aza 2'-désoxycytidine), ou certains produits carcinogènes (N-éthyl nitroso urée *ENU*, N-acétoxy acétyl aminofluorène *N-AAAF*, N-méthyl N'-nitro N-nitroso guanidine *MNNG*, butyrate de sodium, ...) peuvent modifier de façon très importante le profil de méthylation de l'ADN et entraîner une hypo- ou une hyper-méthylation. D'autres agents modifiant le métabolisme de la L-méthionine ou de la balance S-adenosyl méthionine (SAM) / S-adenosyl homocystéine (SAH) altèrent aussi le profil de méthylation de l'ADN. Tous les traitements qui inhibent la synthèse de la SAM entraînent une perte des groupements méthyles. Ainsi, la L-éthionine, analogue de la méthionine, entre en compétition avec la L-méthionine pour le site actif de la SAM-synthétase dans les cellules hépatiques. La L-éthionine est un hépatocarcinogène non mutagène qui peut réactiver des gènes silencieux, dont des gènes embryonnaires, et induire la différenciation cellulaire. De même, l'adénosine ou l'homocystéine peuvent perturber le rapport SAM / SAH. Ainsi, la 2'-désoxyadénosine (2dAd) inactive la SAH-hydrolase et entraîne une accumulation de la SAH ; la 3'-désoxyadénosine (cordycépine) induit la formation de 3'-désoxyadénosyl méthionine ou 3'-désoxy-adénosyl homocystéine et diminue la méthylation de l'ADN de façon dépendante de la dose.

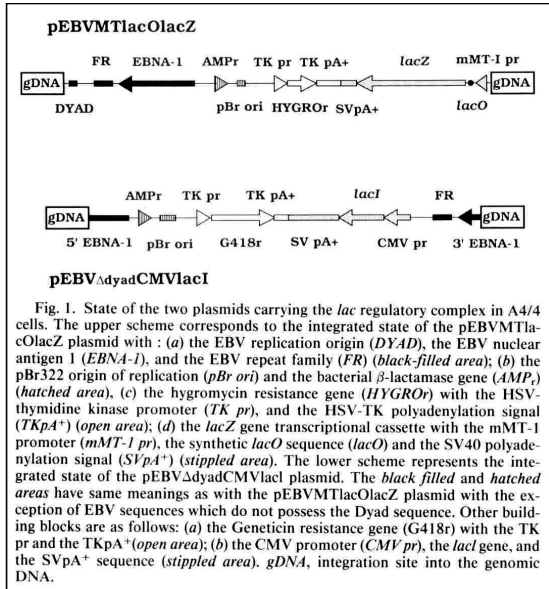
En conséquence, des xénobiotiques altérant le profil de méthylation de l'ADN, en agissant directement au niveau de la structure primaire de l'ADN ou en modifiant l'activité des ADN méthylases de maintenance, altèrent le programme génétique des cellules traitées. De ce fait, la détection du pouvoir déméthylant des agents de l'environnement (dont les médicaments) apparaissait comme nécessaire. Cependant, aucun test simple n'existait.

L'outil biologique

Mon objectif était de créer un nouvel outil cellulaire permettant la détection rapide des agents déméthylants de l'ADN par un simple dosage enzymatique. Pour atteindre ce but, il fallait modifier le génotype d'une

cellule cible afin d'introduire un élément de régulation pouvant répondre à un agent déméthylant ; si cet agent avait effectivement une potentiel déméthylant au niveau des îlots 5' CpG3' il devait permettre la dé-répression d'un gène « rapporteur » ayant une activité enzymatique.

Etude des agents déméthylants de l'ADN (1)



Biard et al. 1992. *Cancer Res.*

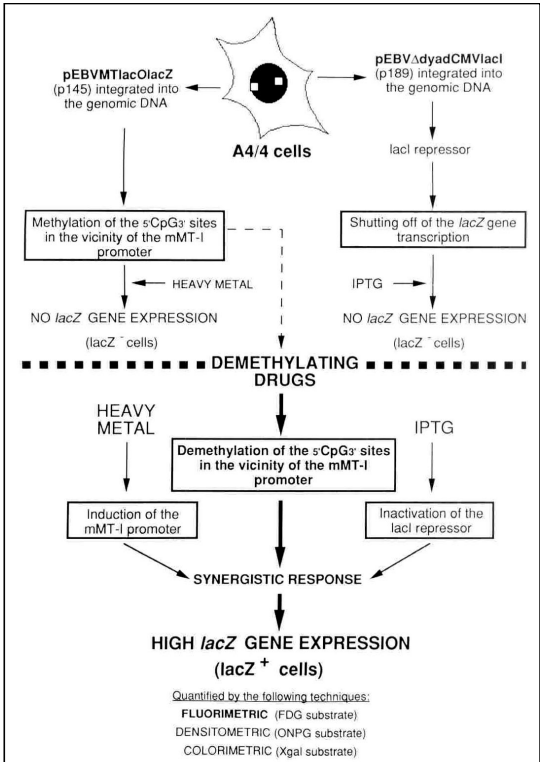
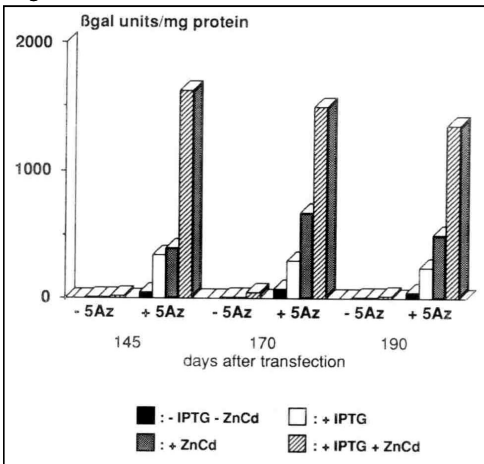


Fig. 2. Regulation of the *lacZ* gene expression in the A4/4 cells. The synergistic response of demethylating agents, IPTG, and heavy metal ions. Details are described in the text.

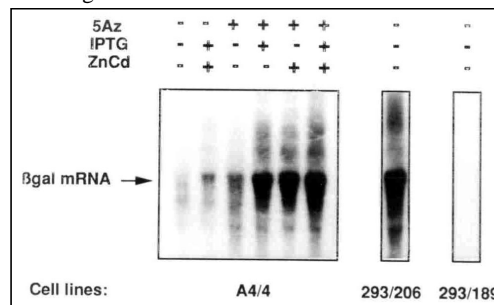
Biard et al. 1992. *Cancer Res.*

Figure 5A



Biard et al. 1992. *Exp. Cell Res.*

Figure 5B



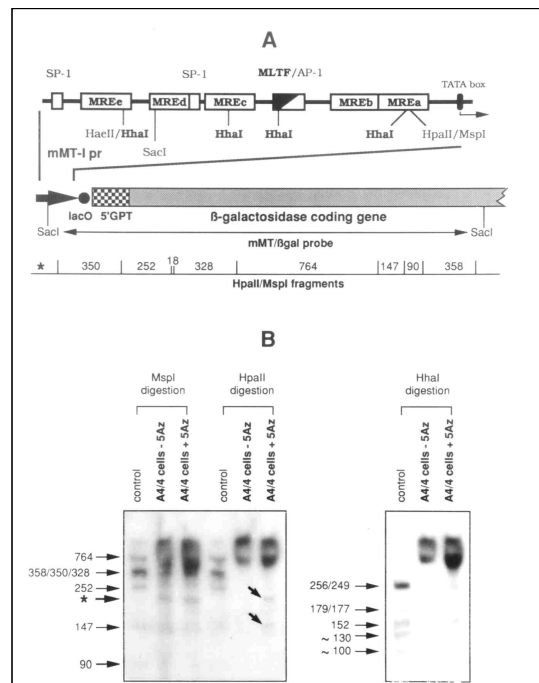
Biard et al. 1992. *Exp. Cell Res.*

Figure 5: *LacZ* expression in A4/4 cell line in the presence of 5-azacytidine, IPTG and heavy metals. (A) One hundred forty five, 170 and 190 days after transfection the cells were treated with or without 5-azacytidine (5Az; 1 μM) for 2 days, then medium was removed and 5Az (1 μM), IPTG (10 mM) and ZnCd (100 μM ZnCl₂ and 1 μM CdCl₂) were added for 2 other days. The cells were collected for βgal activities. (B) Northern blotting analysis was performed with 165-days-old cells treated as described above. Hybridization was performed with HindIII / AclI digested *lacZ* gene as probe. The positive control was the 293/206 cells carrying a pEBVDdyadCMVlacZ vector, and the negative counterpart was the 293/189 cells bearing the pEBVDdyadCMVlacI vector.

C'est la mise en place de ce système, sa caractérisation moléculaire et son exploitation qui ont accompagné mon travail de thèse. Il nous fallait un système très sensible afin d'atténuer les effets de dé-répression spontanée (bruit de fond). Notre choix s'est orienté sur l'opéron lactose d'*E. coli*. J'ai cloné les différents éléments de l'opéron lactose d'*E. coli* (l'ADNc du répresseur *LACI*, la séquence opératrice synthétique

LACO, et l'ADNc du gène de la β galactosidase (*LACZ*) dans des vecteurs d'expression dits « EBV » (portant l'origine de réplication latente OriP du virus d'Epstein-Barr ainsi que l'ADNc de l'antigène nucléaire viral EBNA-1). Le choix du promoteur conduisant l'expression du gène *LACZ* était essentiel pour atteindre nos objectifs car il devait être la cible des agents déméthylants. J'ai placé en amont de la séquence *LACO-LACZ* le promoteur du gène de la métallothionéine I de souris (mMT-I) qui est souvent trouvé hyperméthylé *in situ*. D'autre part, ce promoteur mMT-I conserve son inductibilité par les métaux lourds (mais pas celle pour les hormones glucocorticoïdes). A l'opposé nous avons choisi un promoteur ultra-puissant pour conduire la transcription du gène *LACI*: le promoteur / enhancer viral IE-CMV (*immediately early cytomegalovirus promoter*) qui est connu pour pouvoir passer outre la méthylation de l'ADN et continuer à être actif.

Etude des agents déméthylants de l'ADN (2)



Biard et al. 1992. *Exp. Cell Res.*

Figure 7: Methylation pattern at CpG sites in the mMT-I promoter and its flanking region in the A4/4 cells. (A) Scheme of the mMT-I promoter and the 5' part of the *lacZ* gene. The 5'GPT fragment stands for the 5' part of the bacterial Guanine Phosphorybosyl Transferase gene. The mMT/ β gal probe spanning the SacI sites is shown. "*" corresponds to the fragment of about 200 bp overlapping the mMT-I promoter. Numbers below the map represent the fragment sizes generated after HpaII/MspI cleavage of the pEBVMTlacO*lacZ*. We have not indicated the 24 HhaI sites within the screened region. (B) MspI/HpaII and HhaI restriction pattern of genomic DNA of A4/4 cells. 272 days after transfection, the A4/4 cells were treated or not with 1 μ M of 5-azacytidine (5Az) for 27 days, mediums were then changed every week and supplemented with 1 μ M of 5-azacytidine. Total DNA was extracted. 10 μ g of DNA were digested and fractionated in a 6% polyacrylamide gel. The amounts of DNA loaded onto gel were checked by staining the polyacrylamide gel with ethidium bromide. After electrotransfer, hybridization was performed with the mMT-I/ β gal probe. "control" corresponds to 100 pg of cesium chloride purified pEBVMTlacO*lacZ* vector digested with MspI, HpaII or HhaI enzyme. MspI is blocked by 5^mCCGG₃ sequence and HpaII is inhibited by 5^mCCGG₃ and 5^mC^mCGG₃ sequences. HhaI is blocked by 5^mG^mCGC₃ sequence. Arrows indicate the resumption of HpaII digested fragments located in the mMT-I promoter and the 5' part of the *lacZ* gene

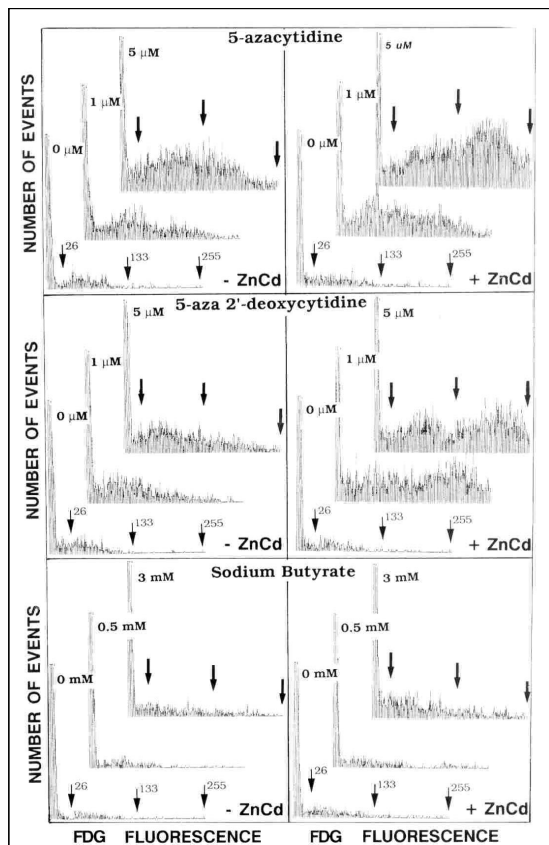


Fig. 3. Quantification of cells expressing β -galactosidase activity after 5-azacytidine, 5-aza 2'-deoxycytidine, and sodium butyrate treatments. After treatment with 5AzCyd, 5AzdCyd, or Btr at various concentrations with or without ZnCd (50 μ M ZnCl₂ and 0.5 μ M CdCl₂), cells were loaded with FDG substrate and analyzed by flow cytometry as described in "Materials and Methods". Ordinates, cell number. Abscissas, relative fluorescence units in a logarithmic scale. To quantitate *lacZ*⁺ cells, gates (vertical arrows) were set so that 99 to 100% of mock-treated cells were *lacZ*⁻ (between 133 and 255 fluorescence units). Cells with fluorescence intensity within these gates were considered *lacZ*⁺.

Biard et al. 1992. *Cancer Res.*

La sélection de nombreux clones cellulaires a permis d'isoler une lignée clonale appelée A4/4 portant les deux éléments de l'opéron lactose (pEBVCMVlacIADyad et pEBVMTlacOlacZ) intégré en mono-copie dans le génome et dont le promoteur mMT-I est méthylé au niveau des séquences 5'CpG3'.

En l'absence d'un agent déméthylant, l'isopropyl β D-thiogalactoside (IPTG, analogue non métabolisable du lactose et inducteur de l'opéron lactose) et les métaux lourds (Zn et Cd 100 μ M / 1 μ M) sont incapables d'induire de façon significative l'expression de l'enzyme β galactosidase. A l'opposé, en présence d'un produit déméthylant comme la 5-azacytidine (5Az), l'IPTG et les métaux lourds entraînent une augmentation de l'activité de la β galactosidase de 600 fois. Cette augmentation est corrélée avec l'hypométhylation des sites 5'CpG3' dans la région promotrice (mMT-I) et dans la partie 5' du gène *lacZ*, mise en évidence par l'analyse de l'ADN génomique par *Southern blot*. La spécificité de la réponse aux agents déméthylants et la très forte induction des activités β galactosidase en présence de ces produits permettent une détection rapide des agents entraînant une hypométhylation de l'ADN.

En utilisant un substrat fluorescent de la β galactosidase, j'ai adapté mon test à une approche quantitative des cellules *lacZ*⁺ par cytométrie en flux. La facilité de quantification des cellules *lacZ*⁺ au trieur de cellules accroît considérablement l'intérêt de notre modèle expérimental en permettant la détection d'événements rares en des temps courts et en offrant les bases d'une très bonne statistique compte tenu du grand nombre de cellules analysées (Biard et al., 1992a; Biard et al., 1992b; Biard et al., 1992c).

Conclusions

Ainsi, au cours de ce travail, j'ai établi les bases d'un nouveau test permettant la détection rapide des agents modifiant le profil de méthylation de l'ADN. Cette analyse a été réalisée par le simple dosage d'une activité enzymatique. L'approche qui a été choisie pour cette étude a consisté à utiliser les outils de la biologie moléculaire et à les appliquer à la toxicologie. Par ce moyen nous avons pu choisir la cible des événements épigénétiques, le gène *lacZ*, afin de permettre une analyse rapide par le trieur/analyseur de cellules (FACS). Notre test repose sur les propriétés des cellules A4/4 qui se caractérisent par (i) un très faible niveau d'expression de base, (ii) une spécificité de l'expression du gène *lacZ* en réponse aux agents déméthylants, et (iii) une très forte induction de la transcription du gène *lacZ* en présence de ces produits. De tels modèles d'analyse doivent nous permettre d'étendre la détection des agents génotoxiques et épigénétiques et d'approfondir les connaissances concernant leur mode d'action. Ils devraient prendre place dans les batteries de tests de *screening* aux côtés des tests déjà existants. Ils permettraient de mieux cerner les potentialités toxicologiques des produits chimiques dont les médicaments.

Modèle de la peau humaine reconstituée *in vitro* (stage post-doctoral)

En **1992**, en quittant le CNRS, j'ai changé de sujet et de modèle d'étude, mais l'objectif est resté le même, à savoir d'étudier la réponse cellulaire à des agents génotoxiques (les rayons ionisants) en développant le modèle biologique le plus approprié. Pour cela, j'ai intégré le laboratoire du Prof N. Fusenigⁱ (DKFZ, Allemagne) au sein duquel j'ai appris le modèle de la «peau humaine reconstituée *in vitro*». J'ai «rapatrié» ce modèle au sein du Laboratoire de Radiobiologie Appliquée (ex-DPTE/LRA du Dr F. Daburon) à Jouy-en-Josas afin de l'adapter à la Radiobiologie. La question que nous nous posions était de savoir si le développement d'un modèle de culture organotypique, qui prend en compte la différenciation cellulaire et les interactions entre cellules épithéliales et mésenchymateuses, pouvait apporter de meilleurs résultats pour l'extrapolation *in vivo* des effets à court terme d'une irradiation ionisante. De plus, la peau reconstituée permet d'étudier les relations entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses, qu'elles soient normales, pathologiques, tumorales, ou manipulées génétiquement.

Ce modèle de culture est constitué d'une couche épidermique (kératinocytes) reposant sur une matrice dermique (fibroblastes). Les kératinocytes humains normaux sont isolés à partir de peau abdominale obtenue par excision chirurgicale. Les fibroblastes, provenant des mêmes donneurs, sont mis en culture dans une matrice de collagène de queue de rat de type I. Les gels contenant les fibroblastes et les kératinocytes sont placés sur une grille de métal afin de créer une interface air-milieu. Les cellules mésenchymateuses et les kératinocytes sont nourris par diffusion au travers du gel alors que l'épithélium est directement exposé à l'air. Les interactions derme-épiderme assurent la balance homéostatique entre prolifération et différenciation terminale des kératinocytes. Les fibroblastes réorganisent la matrice de collagène (maturation du gel) et sécrètent des facteurs diffusibles indispensables au contrôle de la différenciation des kératinocytes. Le programme de différenciation de l'épiderme est suivi par l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation de l'épithélium (kératines, involucrine, filaggrine), des cellules mésenchymateuses (vimentine) et de la membrane basale (laminine, collagène de type IV).

Par cette approche j'ai pu comparer des biopsies normales de peau avec une peau reconstruite *in vitro* à partir de kératinocytes et de fibroblastes provenant du même donneur. Les résultats étaient tout à fait étonnants et ils soulignaient l'intérêt que l'on pouvait porter à ce modèle de culture. Dans nos conditions, les kératinocytes se différencient rapidement pour donner un épithélium d'environ 250 µm d'épaisseur en 12-14 jours de culture. Les profils d'expression des différents marqueurs de différenciation ressemblent à ceux

ⁱ Laboratoire du Pr Dr N. E. Fusenig. Carcinogénèse et Différenciation *in vitro*. Centre de Recherche sur le Cancer. P101949. 6900 Heidelberg (Allemagne).

observés *in vivo*. En particulier, la déposition régulière du collagène de type IV sous la couche basale, au niveau de la jonction dermo-épidermique, suggère une normalisation de l'homéostasie tissulaire. Dans notre modèle, les kératinocytes d'un épithélium mature (12-14 jours de culture) ne se divisent pratiquement plus même au niveau de la couche basale (mis en évidence par incorporation de BrdU). De plus, le programme de différenciation de kératinocytes conduit à la perte des noyaux dans la *stratum granulosum* (SG) et surtout dans la *stratum corneum* (SC).

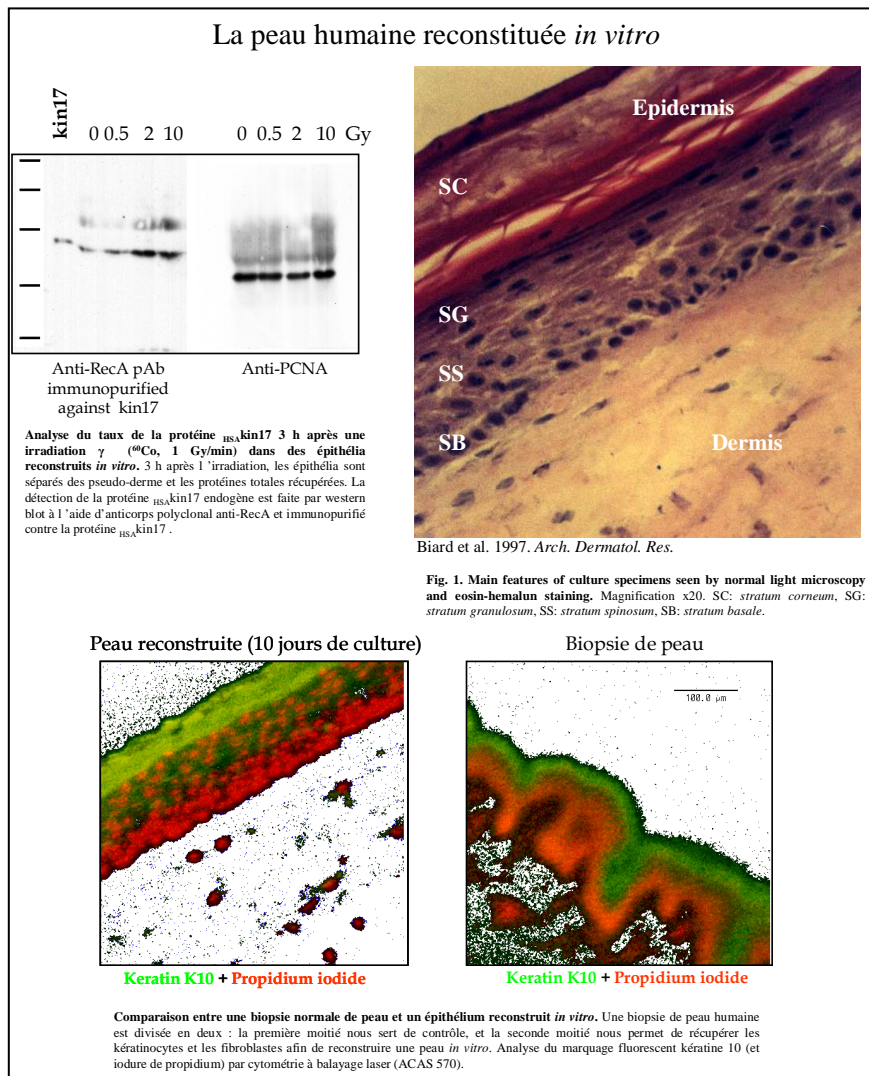
J'ai donc défini les conditions de culture pour obtenir des spécimens de peau reconstruite répondant à nos trois exigences :

- (1) des spécimens de petite taille (1 cm \varnothing) facilitant leur manipulation et en particulier leur irradiation,
- (2) un temps de culture réduit (10 à 14 jours),
- (3) une analyse rapide et sensible par cytométrie à balayage laser de l'expression des protéines (après marquages immunohistologiques).

J'ai appliqué pour la première fois cette approche à l'étude de la protéine humaine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ en

fonction de la maturation d'un épithélium en culture. Je reviendrai dans le chapitre II sur les caractéristiques de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$; cependant j'ai observé que cette protéine était sur-exprimée au cours des premiers stades du développement d'un épithélium humain, et que son taux chutait lorsqu'un épithélium reconstruit *in vitro* devenait entièrement différencié (Biard et al., 1997b). Ce résultat soulignait que la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ participait soit (i) au programme de différenciation des kératinocytes éventuellement en dérégulant certains gènes, soit (ii) à la réplication de l'ADN.

Des résultats préliminaires montraient également, et pour la première fois, l'accumulation de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ humaine dans le compartiment épithélial après des irradiations γ à faibles doses (dès 0.5 Gy).



Cependant l'absence, à cette époque, d'anticorps anti-^{hSA}kin17 de bonne qualité limitait considérablement notre approche.

En parallèle des cellules humaines, j'ai développé ce modèle de peau avec des cellules de porc. Dans ce dernier cas, l'objectif était de compléter et d'approfondir les travaux faits au LRA sur la fibrose radioinduite observée chez le porc après une irradiation locale cutanée à forte dose. Il s'agissait de reconstruire une peau avec des kératinocytes et des myofibroblastes provenant d'une biopsie de fibrose radioinduite chez le porc afin de comprendre les mécanismes moléculaires qui conduisent à la fibrose et à sa régression après un traitement par la Cu/Zn SOD (superoxyde dismutase). Avant mon départ du LRA en **1995**, j'ai formé M.C. Vozenin en DEA puis au début de sa Thèse pour pérenniser ce modèle de culture (Vozenin et al., 1998).

Chapitre II : La protéine humaine _{HSA}kin17

Pourquoi la protéine kin17 ?

Dans le cadre de la Radiobiologie et afin de caractériser de nouveaux gènes participant à la réponse cellulaire après une irradiation ionisante, j'ai été amené à porter un intérêt tout particulier au gène *HSAKIN17* humain. J'ai décidé en 1995 d'intégrer le laboratoire du Dr J. Angulo à Fontenay aux roses (LGR). Dans ce chapitre, je décris rapidement les derniers résultats que nous avons obtenus.

Ainsi, la protéine _{HSA}kin17 est :

1. directement impliquée dans la réplication de l'ADN et dans la reconnaissance de origines de réplication *in vivo*,
2. une protéine essentielle à la vie cellulaire (la délétion du gène est létale chez la levure *S. pombe*, Angulo J, résultat personnel),
3. étroitement associée *in vivo* à la chromatine et à la matrice nucléaire,
4. induite par des inhibiteurs de la réplication et des agents génotoxiques dont les rayons ionisants,
5. co-exprimée avec la protéine RPA70 (*replication protein A 70 kDa subunit*) en particulier après une atteinte génotoxique,
6. sur-exprimée dans certaines lignées tumorales en culture et potentiellement impliquée dans la radiosensibilité.
7. impliquée dans leur maturation des ARN,

D'autre part, l'origine même de la découverte de cette protéine (parentée immunologique avec RecA d'*E. coli*) et sa très forte conservation au cours de l'évolution plaident en faveur d'un rôle important.

On peut constater que les protéines kin17 ne présentent pas d'homologie de séquence avec d'autres protéines connues. De plus, à ce jour, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité enzymatique (ni ATPase, ni hélicase, ...) associée à cette protéine. Cependant à bien des égards, la protéine _{HSA}kin17 a un comportement proche de celui du PCNA ou de RPA70, deux autres protéines indispensables à la réplication et à la réparation de l'ADN.

J'ai divisé la présentation de mes résultats en deux parties : avant et après 2002 ; cela correspond à une époque charnière où nous avons obtenu des anticorps monoclonaux (obtenus en 2000).

Résultats antérieurs à 2002

Notre laboratoire travaille sur les protéines kin17 depuis la découverte en 1989 de l'homologue murin, *MMU*kin17, qui présente une homologie immunologique avec la protéine RecA d'*E. coli* (Angulo et al., 1989; Angulo et al., 1991). A proprement parler, kin17 n'est pas un homologue structural de la protéine RecA puisque la séquence homologue correspond à un petit domaine de 39 acides aminés. On a constaté que ce domaine (au centre de la protéine kin17 et en C-terminal de la protéine RecA) intervenait dans la régulation négative de la fixation à l'ADN (Kannouche *et al.*, 1997).

*Le gène *HSA*kin17 et son transcrit*

Les gènes *KIN17* murin et humain ont été clonés et séquencés au laboratoire (brevet CEA 1993 et 1997). Le gène *MMU*Kin17 de souris est un gène à copie unique, porté par le chromosome 2, d'une longueur de 8 *kpb* (Tissier *et al.*, 1995; Tissier *et al.*, 1996). La détermination et l'analyse des séquences régulatrices du gène *MMU*KIN17 ont montré qu'il possédait un promoteur du type "gène de ménage" (*house keeping gene*), ce qui conduit à une expression faible et ubiquitaire dans les différents tissus de souris adultes analysés (Tissier *et al.*, 1996). Le gène humain est porté par le bras court du **chromosome 10 (p15-p14)** en position télomérique chez l'homme. L'analyse par les programmes des bases de données montre qu'il s'agit d'un gène à copie unique (<http://harvester.embl.de/harvester/O608/O60870.htm>). L'ORF (*open reading frame*) fait **32,72 kbp** et contient **13 exons**.

Ce gène est exprimé dans tous les tissus analysés avec des taux plus élevés dans le cœur, les muscles squelettiques ou les testicules (Kannouche *et al.*, 2000). Dans une approche résultant de l'analyse des bases de données nous constatons que l'expression du transcrit *HSA*kin17 observée dans différents tissus est faible et homogène, confirmant nos résultats. Tout en restant prudent dans l'interprétation de ces résultats, il ressort que le niveau d'expression du gène *HSA*KIN17 est nettement inférieur à celui d'autres protéines du métabolisme de l'ADN comme PCNA, Ku70 ou RPA70 (analyse par puces Affymetrix). Dans cette approche il faut se rappeler qu'il s'agit de l'analyse de tissus et donc que ces résultats ne peuvent pas préjuger de ce que l'on peut obtenir avec des cellules en culture, et notamment des cellules tumorales qui ont un rythme de prolifération toujours important.

*La protéine *HSA*kin17 (1994-2000)*

Le gène *KIN17* code une protéine basique (**pI = 9.4**, similaire aux histones) de **45 373.58 Da** qui compte **393** acides aminés chez l'homme (*HSA*kin17). On retrouve les protéines kin17 dans tout le règne animal et végétal, depuis les levures (comme *S. pombe*, identité 38%), aux parasites (*P. falciparum*, 39%), aux plantes

(*A. taliana*, 39%), aux nématodes (*C. elegans*, 39%), jusqu'au eucaryotes supérieurs comme la souris (*M. musculus*, 92%) ou le cochon (*S. scrofa*, 97%)*. On constate par ailleurs que l'homologie entre les protéines kin17 est particulièrement importante dans l'extrémité N-terminal.

La protéine humaine $_{HSA}$ kin17 présente plusieurs motifs d'intérêt :

1. un **signal putatif d'adressage mitochondrial** en position 24-29, proche du doigt de zinc ;
2. un **motif à doigt de zinc** (*Zn-finger*, *C2H2 matrin type*) en position 26-50. Les domaines à "doigt de zinc" se composent de 25 à 30 acides aminés qui comportent 5 Cystéine et 2 Histidine. Ce motif est très conservé au cours de l'évolution.
3. le **domaine homologue à RecA** (en position 163-192). Ce motif diverge énormément dans les protéines kin17. L'homologie est correcte seulement dans 4 espèces.
4. un **signal de localisation nucléaire** en deux parties qui permet le relocalisation de la protéine dans le noyau après maturation cytoplasmique (en position 236-286).
5. un **domaine KOW** (Kyprides, Ouzounis, Woese) en position 337-372. Ce domaine a été déterminé par ailleurs (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR005824>).

On peut constater que le NLS et le doigt de zinc sont homologues à ceux de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP1).

La protéine de souris $_{MMU}$ kin17 se lie *in vitro* à des séquences d'ADN double brin présentant une topologie « courbe », comme celles rencontrées dans les jonctions de recombinaison illégitime (Mazin et al., 1994a; Mazin et al., 1994b). Un rôle dans le contrôle de la transcription des gènes a été proposé (Timchenko et al., 1996) ; cette hypothèse repose sur le fait que la protéine murine $_{MMU}$ kin17 peut remplacer le facteur de transcription H-NS (*histone-like nucleoid-structuring factor*) dans des bactéries déficientes et soit déclencher, soit réprimer la transcription des gènes appartenant à l'opéron *bgl*. On peut également observer que les protéines $_{HSA}$ kin17 et H-NS se fixent préférentiellement à des séquences courbes au niveau du promoteur *bgl*. Une augmentation du transcrit de $_{MMU}$ KIN17 a été observée dans des cellules de souris au cours de la transition G1/S suggérant un rôle de la protéine $_{MMU}$ kin17 dans le cycle cellulaire (au niveau du *checkpoint* G1/S) ou pendant la synthèse de l'ADN (Kannouche et al., 1998). L'expression des transcrits $_{MMU}$ KIN17 est induite dans les cellules de souris BALB/c 3T3 après exposition à un rayonnement UV-C (254 nm). On observe une augmentation des ARNm $_{MMU}$ KIN17 dès 6h avec un maximum vers 16h post-irradiation ; une concentration de la protéine dans des foyers intranucléaires est alors observée. L'accumulation de la protéine est due à une stabilisation des ARNm (Blattner et al., 2000). On retrouve également une augmentation des ARNm $_{HSA}$ KIN17 16h après irradiation aux UV-C (Kannouche et al., 2000).

La sur-expression de la protéine kin17 inhibe la prolifération des cellules (1999)

En insérant l'ADNc *MMU*KIN17 de souris dans des vecteurs d'expression EBV sous le contrôle d'un promoteur puissant (CMV) ou d'un promoteur inductible par les métaux lourds (mMT-I) j'ai montré qu'une sur-expression de la protéine *MMU*kin17 réduisait considérablement la prolifération des cellules tumorales transfectées (moins de 3% de formation de colonies dans les lignées RKO, H1299 et HCT116 en comparaison avec les différents contrôles). Seule la lignée humaine immortalisée mais non tumorale HEK 293 ("*transformed Human Embryonic Kidney cells HEK-Ad5*") tolère une expression ectopique la protéine *MMU*kin17 et nous permet d'isoler des clones exprimant des niveaux variables de cette protéine. Ces clones HEK 293 présentent une diminution de la prolifération cellulaire corrélée avec le niveau d'expression de la protéine *MMU*kin17 (Biard et al., 1999). En conclusion, une sur-expression constitutive de la protéine *MMU*kin17 provoque soit l'arrêt de la croissance de certaines cellules tumorales, soit une diminution très importante de leur prolifération avec des anomalies irréversibles.

Radiosensibilité, p53 et kin17 (1994-1997)

Au moment de cette étude, de nombreuses données, parfois controversées, mettaient en évidence le rôle du gène *p53* dans la radio-résistance. Après une exposition des cellules de mammifères à des agents endommageant l'ADN, l'activation de la protéine sauvage *p53* (*p53*^{wt}) est responsable d'un arrêt du cycle cellulaire (principalement en G1). Cet arrêt permet aux cellules de réparer leurs macromolécules endommagées, ou si ces dommages sont trop importants, de déclencher un mécanisme d'apoptose. Ce réglage fin entre réparation de l'ADN et apoptose est rendue possible par les propriétés de fixation à l'ADN de la protéine *p53* et ses fonctions de transactivation de la transcription. A l'opposé, des cellules ayant des allèles *p53* mutés ou délétés ne s'arrêtent que partiellement dans le cycle cellulaire après une atteinte génotoxique et de ce fait doivent présenter une radiosensibilité accrue. Cependant, la plupart des données disponibles alors suggéraient qu'après une irradiation ionisante les cellules ayant un génotype *p53* muté ou nul étaient radio-résistantes. En détaillant ces résultats il apparaissait que les cellules étudiées étaient principalement d'origine hématopoïétique et que le statut *p53* muté abrogeait la tendance inhérente à ces lignées à induire l'apoptose. Il était donc nécessaire d'utiliser d'autres modèles cellulaires.

Comme la plupart des cancers chez l'Homme sont d'origine épithéliale, j'ai porté mon attention sur le modèle de cellules de rat développé dans le laboratoire du Dr Pierre May (CNRS Villejuif puis CEA/CNRS Fontenay aux Roses) et qui mime le processus de « cancérogenèse chimique en plusieurs étapes » (Le Rhun et al., 1994). Ce modèle se compose de lignées cellulaires de poumons de rats embryonnaires obtenues au cours de leur immortalisation par le benzo[a]pyrène. Elles présentent un génotype soit sauvage soit muté vis à vis de l'anti-oncogène *p53*. Ce modèle nous permet donc d'étudier la radiosensibilité en fonction du génotype de *p53*. J'ai observé que des populations tumorales en prolifération (cellules BP-T ; génotype *p53*^{muté}) étaient beaucoup plus sensibles aux rayons γ par rapport aux cellules parentales (BP; *p53*^{sauvage}) (Biard et al., 1994). Ces résultats vérifiaient notre hypothèse de départ. De plus, les cellules BP présentaient

une induction rapide et transitoire des protéines p53 et p21^{Waf1} après une atteinte génotoxique alors que les cellules BP-T montraient une réponse anormale, souvent décalée dans le temps.

De façon intéressante, il apparaissait que la protéine kin17 endogène était sur-exprimée dans ces cellules tumorales BP-T (Biard et al., 1997a). La question qui se posait alors était de savoir si la dérégulation de l'expression du gène *KIN17* dans les cellules BP-T était un phénomène inhérent à leur radiosensibilité. A l'opposé, cela pouvait être rattaché à d'autres événements génétiques associés à la perte des fonctions de l'anti-oncogène *p53* (remaniements chromosomiques, amplification génique, instabilité génétique) ou à des événements de réparation liés à la réplication de l'ADN enclin à l'erreur. En utilisant ce modèle expérimental j'ai également mis en évidence pour la première fois l'accumulation de la protéine kin17 endogène 30 min après une irradiation γ à 2 et 6 Gy (sans modification du taux d'ARN *KIN17*) dans la lignée parentales BP. Cet effet n'était pas observé dans une lignée tumorale syngénique BP-T (génotype *p53*^{muté}) (Biard et al., 1997a). Ce modèle des cellules « BP » nous permettait de confirmer notre précédent résultat obtenu avec la peau humaine reconstituée *in vitro*, à savoir que la protéine kin17 était effectivement impliquée dans la réponse au rayonnement ionisant.

Derniers résultats sur la protéine _{HSA}kin17 (après 2002-2005)

Je ne présente pas ici l'intégralité des résultats concernant kin17, mes ceux auxquels j'ai participé et qui concerne la protéine humaine.

Développement du système du baculovirus afin de sur-exprimer la protéine _{HSA}kin17 (2000)

Fin 1999, j'ai développé au laboratoire la production de protéine recombinante [His]₆-_{HSA}kin17 dans le système baculovirus après l'infection de cellules d'insecte Sf9. Une fois la mise au point de la technique effectuée, nous avons produit et purifié de grandes quantités de protéine _{HSA}kin17. En collaboration avec l'équipe de J. Grassi (CEA-Saclay) nous avons obtenu les premiers anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine _{HSA}kin17. J'ai analysé les 80 anticorps monoclonaux obtenus en immunocytochimie, puis pour la plupart d'entre eux en western blot pour en retenir deux : le K36 et le K58. Des analyses sur des protéines tronquées montrent clairement que le K58 reconnaît un épitope dans la région homologue à RecA, tandis que le K36 reconnaît un épitope dans l'extrémité C-terminale des protéines _{MMU}kin17 et _{HSA}kin17 (domaine KOW). La qualité de ces anticorps nous a offert l'opportunité de développer de nouvelles approches tant cellulaires que biochimiques. Ces anticorps sont maintenant commercialisés par Santa Cruz Biotech.

Parallèlement à la purification de la protéine _{HSA}kin17, j'ai utilisé cette même approche du baculovirus pour permettre à d'autres laboratoires de développer leurs propres baculovirus recombinants comme hOgg1, srs2 ou encore la protéine X du virus de l'hépatite.

La protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ se fixe in vivo à la chromatine (2002)

La protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ existe dans toutes les cellules étudiées sous la forme de deux fractions distinctes et la balance entre ces deux états dépend de l'état physiologique des cellules. La fraction principale est extraite par des tampons isotoniques contenant 1% de détergent non-ionique (tampon NP40) et elle correspond aux « *protéines nucléaires labiles et / ou cytoplasmiques* ». La seconde fraction est insoluble dans le tampon NP40 mais soluble dans **le tampon RIPA et elle correspond aux « protéines associées à la chromatine ou aux structures nucléaires »** (Biard et al., 2002). Cette nomenclature va revenir tout au long de ce document. Des données identiques ont été obtenues pour d'autres protéines de la réplication comme RPA70 ou PCNA (Balajee and Geard, 2001 ; Treuner et al., 1998).

Nous avons mis en évidence que la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ était directement associée *in vivo* à la chromatine (Biard et al., 2002). $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ appartient donc à la famille des protéines étroitement liées à l'ADN comme les core histones ou le facteur SAF-A (*scaffold attachment factor A*). Avec toutes les précautions nécessaires, si l'on compare nos résultats avec d'autres études de *cross-link in vivo* effectuées dans les mêmes conditions, il apparaît que l'interaction de $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ avec l'ADN est plus forte et plus directe que celle des protéines RPA70, ORC2 (*origin recognition complex protein*) ou MCM2-7 (*mini-chromosome maintenance proteins*) (Biard et al., 2002; Ritzi et al., 1998; Treuner et al., 1998). Ainsi, la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ pourrait être associée directement à la chromatine très tôt avant la mise en place du complexe de réplication.

La protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ est sur-exprimée dans certaines lignées tumorales (2002-2003)

L'ARNm du gène *KIN17* est exprimé de façon faible et ubiquitaire dans tous les tissus murins et humains analysés (Kannouche et al., 2000). Il était intéressant de savoir ce qu'il en était de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ endogène. Je me suis alors intéressés à de nombreuses cellules humaines tumorales en culture. J'ai analysé une vingtaine de lignées tumorales par western blot, marquages immunocytochimiques et test ELISA. Nous avons observé que toutes les lignées cellulaires présentaient une protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ nucléaire (marquages immunocytochimiques avec l'Ig K36), ainsi qu'une bande de 45 kDa correspondant à la protéine *kin17* humaine intacte. Il ne semblait donc pas y avoir de formes tronquées de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans les différentes lignées tumorales testées, tout du moins détectables dans nos conditions expérimentales (Despras et al., 2003). Cependant, nous avons observé une très grande diversité du niveau d'expression endogène de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ parmi les différentes lignées tumorales. On peut remarquer que ces expériences ont été reproduites plusieurs fois avec des cellules mises en culture en même temps et dans les mêmes conditions.

Afin de quantifier le nombre de molécules $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ par cellule nous avons utilisé un test ELISA mis au point au laboratoire de J. Grassi et au LGR. La détection de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ par la méthode ELISA a été normalisée en utilisant la protéine recombinante $[\text{His}]_6\text{-}_{\text{HSA}}\text{kin17}$ purifiée pour réaliser les courbes de calibration. Parmi les 80 anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$, les anticorps mAb K3 et mAb K31 ont été sélectionnés pour la double détection immunologique, l'anticorps mAb K3 étant couplé

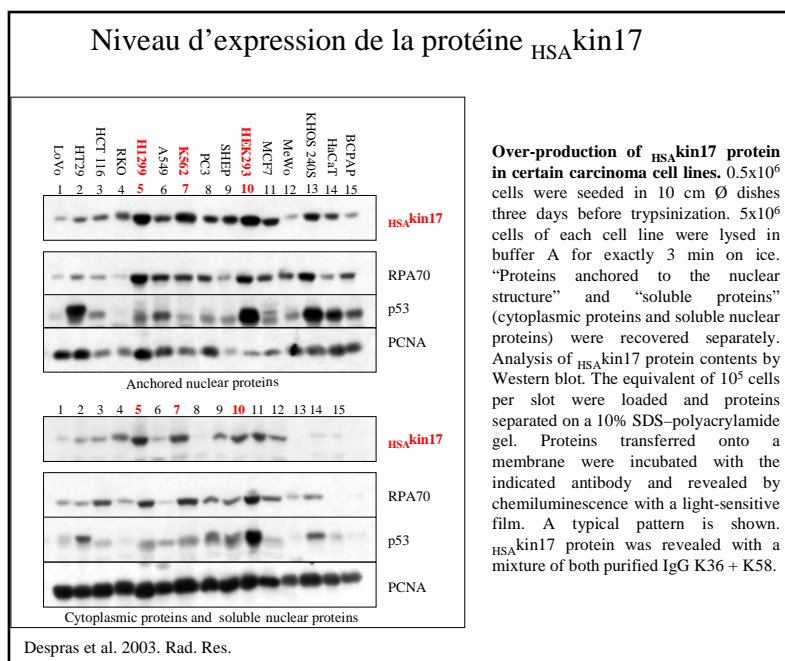
à l'acétylcholinestérase qui sert d'enzyme « rapporteur ». Les résultats ont été ramenés en nombre de molécules par cellule grâce à la courbe de calibration.

Lignées Cellulaires	Origine	Nombre moyen de molécules _{HSA} kin17 par cellule
H1299	Human non-small cell lung cancer	103930
K562	chronic myelogenous leukemia	100330
HEK 293	embryonic kidney cells transformed with adenovirus 5 DNA	91420
PC3	prostatic carcinoma	41050
HeLa	cervical carcinoma	35810
HaCaT	immortalized epidermal keratinocytes	29850
KHOS 240S	osteosarcoma	26670
BCPAP	thyroid carcinoma	29010
LoVo	colorectal adenocarcinoma	25070
HCT 116	colorectal carcinoma	20810
MCF7	adenocarcinoma; mammary gland; breast	16500
A549	lung carcinoma	16310
HL60	leukemia	13130
MeWo	melanoma	4640

Ainsi, des fibroblastes humains immortalisés par le virus SV40 présentaient une augmentation du nombre de molécules _{HSA}kin17 par cellule en comparaison avec des fibroblastes diploïdes normaux (Miccoli et al., 2002). D'autre part, nos résultats ont montré que la protéine _{HSA}kin17 était sur-exprimée dans les cellules H1299 (*non-small cell lung cancer*), K562 (*chronic myelogenous leukemia*) ou HEK 293 (*immortalized embryonic kidney cells*). A l'opposé, d'autres cellules exprimaient des taux extrêmement bas, comme les cellules de mélanome (MeWo) (Despras et al., 2003).

Les niveaux élevés de la protéine _{HSA}kin17 dans certaines populations pourraient être une conséquence du phénotype tumoral (par exemple une instabilité génétique) ou un élément clef dans le processus de cancérogenèse *per se*. Cependant, comme une sur-expression ectopique de la protéine kin17 (_{MMU}kin17 ou _{HSA}kin17) entraîne la mort cellulaire (Biard et al., 1999; Kannouche and Angulo, 1999), cela suggère également que l'expression du gène *HSAKIN17* doit être étroitement contrôlée pour assurer un effet positif sur la prolifération cellulaire.

Dans cette approche, nous n'avons pas observé de corrélation entre les différents niveaux d'expression des protéines _{HSA}kin17 et p53. En particulier, nous avons testé quatre lignées sur-exprimant p53 : HT29 (protéine p53 mutée ; (Bras-Goncalves et al., 2000)), HEK 293 (protéine p53 stabilisée et séquestrée à l'extérieur du noyau par le

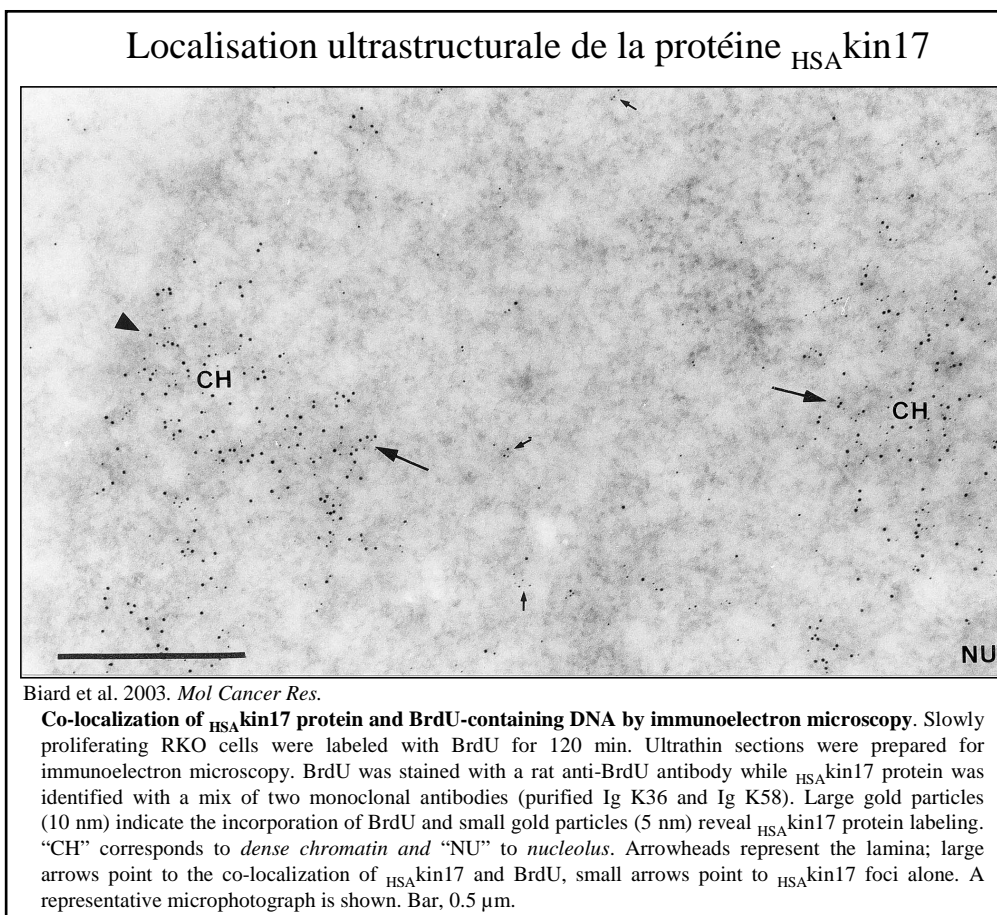


produit du gène *E1B* ; (Brown et al., 1994)), KHOS 240S (protéine p53 mutée ; (David-Pfeuty et al., 1996)) et HaCaT (mutations de type UV sur les deux allèles du gène *p53* ; (Wanner et al., 2002)). Or seules les cellules HEK 293 présentent un niveau élevé de protéine $HSAkin17$. *A contrario*, il semble y avoir une corrélation entre les niveaux d'expression des protéines $HSAkin17$ et RPA70. En effet, les trois lignées exprimant un taux élevé de la protéine $HSAkin17$ (H1299, HEK 293, K562), présentent également des niveaux élevés de la protéine RPA70.

Localisation ultrastructurale de la protéine $HSAkin17$ (2002-2005)

La protéine $HSAkin17$ présente un marquage immunocytochimique similaire à ceux observés pour les protéines de la réplication de l'ADN comme RPA70 (Biard et al., 2002; Miccoli et al., 2002). Afin de déterminer précisément la localisation de la protéine $HSAkin17$ à l'intérieur du noyau nous avons utilisé la microscopie électronique après marquage des cellules au BrdU (en collaboration avec Drs F. Harper et F. Dautry. CNRS. Villejuif). Tandis que l'identification de la protéine $HSAkin17$ est faite simultanément par les immunoglobulines purifiées K36 et K58 (avec un anticorps secondaire couplé à des particules d'or de 5 nm), la reconnaissance des sites de réplication est effectuée avec des anticorps de rat anti-BrdU (anticorps secondaire couplé à des particules d'or de 10 nm).

Après un marquage de 15 min des cellules RKO et MRC5-V2 au BrdU nous observons une accumulation de



la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans plus de 90% des foyers BrdU (Biard et al., 2003). Ces résultats sont très reproductibles. Dans des conditions identiques de fixation et de marquage, ces sites BrdU avaient été identifiés comme contenant le PCNA et la cycline A (Sobczak-Thepot et al., 1993). A l'évidence, ces sites BrdU correspondent aux domaines de réplication de l'ADN.

Ainsi, à l'échelle ultrastructurale, la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ se localise au niveau des sites de réplication de l'ADN (*replication factories*) dans des cellules en prolifération lente. Après un marquage au BrdU de 120 min, les foyers $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ chevauchent tous les foyers BrdU au niveau de l'ADN néo-synthétisé et / ou au niveau des nouvelles origines de réplication.

Nous avons approfondi notre approche en microscopie électronique en démontrant que la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ co-localisait également avec les protéines de réplifications RPA70, PCNA et la polymérase α (Miccoli et al., 2005).

$_{\text{HSA}}\text{kin17}$ et le stress génotoxique (2002-2003)

Les protéines $_{\text{kin17}}$ sont induites par des agents génotoxiques comme les irradiations UVC et ionisantes (γ) ou la bléomycine (Biard et al., 2002; Biard et al., 1997a; Kannouche et al., 2000; Kannouche et al., 1998; Masson et al., 2001).

Dans les cellules RKO ou HCT 116 non traitées, les marquages immunocytochimiques classiques montrent que la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ est dispersée dans le nucléoplasme sous la forme de foyers ponctuels couplés à un marquage faible, caractéristique des cellules en prolifération lente. Comme nous venons de le décrire, ces foyers doivent correspondre aux sites de réplication de l'ADN. 24h après une irradiation ionisante (6 Gy) la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ se re-localise au niveau de foyers intranucléaires larges et de forte intensité de fluorescence (Biard et al., 2002). D'autre part, la fraction de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ associée à la chromatine augmente de façon dose-dépendante.

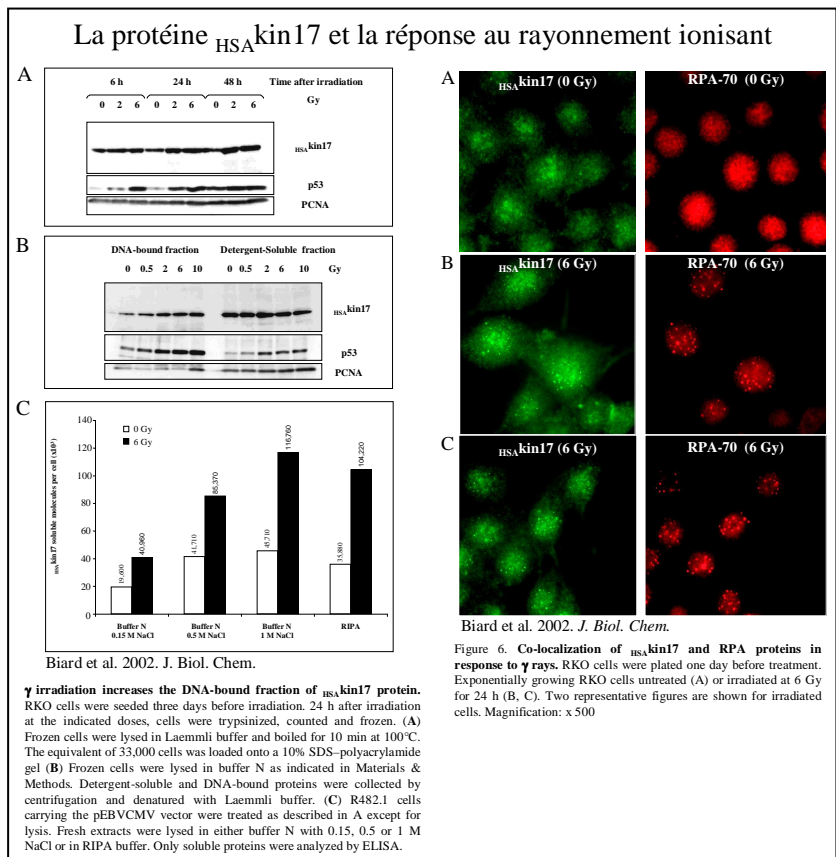
Il est intéressant de constater que 24 h après l'irradiation γ , la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ co-localise avec la protéine RPA70. La protéine RPA est une protéine multi-fonctionnelle se liant à l'ADN simple brin, formée de trois sous-unités (14, 32 et 70 kDa). Elle participe à la fois à la réplication de l'ADN et à différents mécanismes de réparation de l'ADN, en particulier à la réparation des cassures double brin (DSB) (Choudhary and Li, 2002). Le maintien de foyers RPA après l'achèvement de la réparation suggère que la protéine RPA reste associée avec des sites de dommages non réparés de l'ADN (MacPhail and Olive, 2001). De plus, la protéine RPA co-localise avec la protéine de recombinaison Rad51 (Golub et al., 1998). Cela indique que les protéines $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ et RPA peuvent être associées avec des dommages encore non réparés de l'ADN et/ou avec des sites incapables de se répliquer. Ainsi, les foyers $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ doivent correspondre aux lésions non réparés de l'ADN, là où les fourches de réplifications sont bloquées. On peut remarquer qu'une corrélation entre $_{\text{kin17}}$ et les dommages de l'ADN avait déjà été soulignée par Blattner *et al.* qui avaient démontré que

la présence de dommages induits par les UVC pouvait être responsable de la stabilisation de l'ARNm *MMU*KIN17 dans des fibroblastes de rongeurs ΔXPA (Blattner et al., 2000).

Un effort particulier a été entrepris afin d'analyser en cytométrie en flux l'expression de la protéine *HSA*kin17 endogène après une irradiation ionisante. La qualité de nos nouveaux anticorps monoclonaux permettait cette approche. Etant donné les difficultés d'analyser l'expression d'une protéine nucléaire par cytométrie en flux après une irradiation ionisante (modification de l'accessibilité des anticorps à leurs

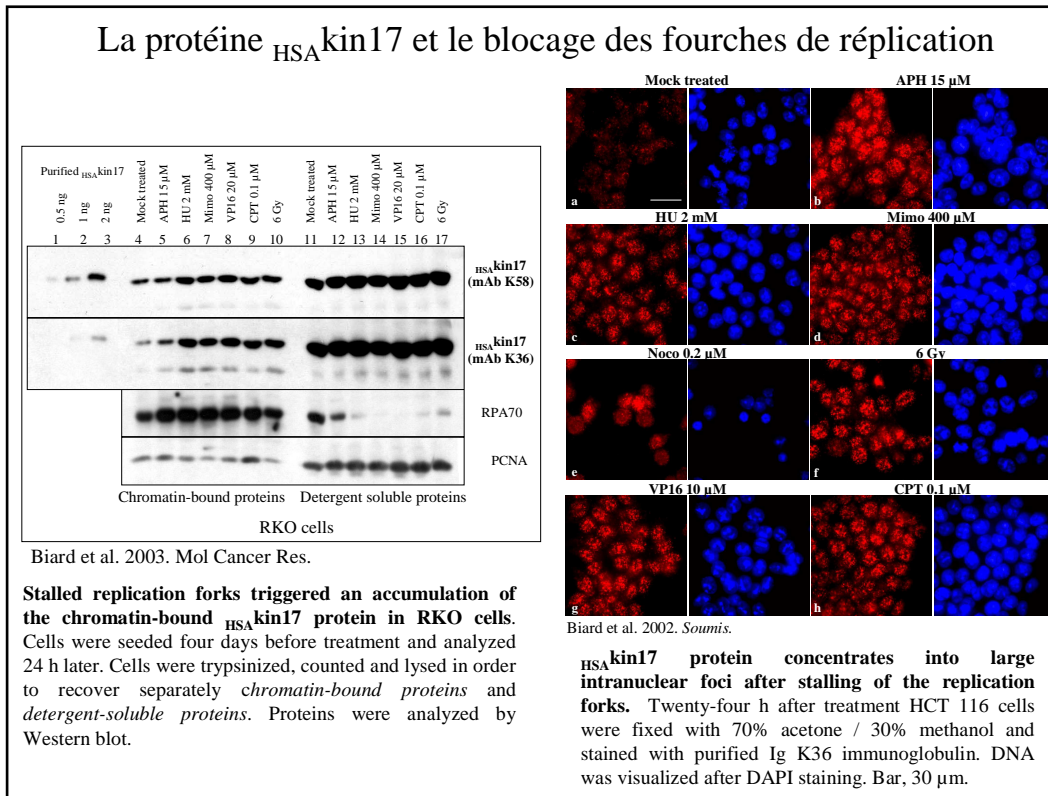
cibles après irradiation), nous avons reproduit ces expériences de très nombreuses fois et utilisé différents contrôles. Nos résultats montrent une augmentation du nombre de cellules HCT 116 ou RKO *HSA*kin17-positives 24 heures après une irradiation γ ; cette augmentation dépendant de la dose d'irradiation (0, 0.5, 6 et 10 Gy) (Despras et al., 2003). Cette augmentation est corrélée avec l'intensité du blocage en G2 radio-induit, le blocage en G1 étant plus difficilement détectable. Par ailleurs, nous constatons qu'au sein d'une population en prolifération lente et en l'absence de traitement, les cellules *HSA*kin17-positives sont présentes dans toutes les phases du cycle cellulaire.

De façon plus générale, nous avons montré que des traitements par différents inhibiteurs de la réplication entraînaient une augmentation de la fraction de la protéine *HSA*kin17 associée à la chromatine (Biard et al., 2003). Nous avons utilisé des inhibiteurs agissant pendant la phase d'initiation (L mimosine 400 μ M, hydroxyurée 2 mM) et / ou d'élongation de la réplication (L mimosine hydroxyurée, aphidicoline 15 μ M, étoposide 20 μ M, camptothécine 0.1 μ M) ; nous nous sommes intéressé à des temps tardifs (24h). Dans cette approche, nous avons constamment déterminé l'efficacité de ces traitements sur le blocage du cycle cellulaire par cytométrie en flux après marquage des cellules RKO et HCT 116 au BrdU (30 μ M pendant 15 min avant la fixation). Ainsi nous avons vérifié que des cellules traitées par la L mimosine étaient bloquées en fin de G1, par l'hydroxyurée (réduction du pool de dNTP) à la bordure G1/S, par l'aphidicoline (inhibiteur des DNA polymérase α and δ) en début de phase S, et par les inhibiteurs des topoisomérase I (camptothécine) et II (étoposide) en milieu et fin de phase S pour la camptothécine et fin de



phase S pour l'étoposide. Comme pour l'irradiation ionisante, tous ces traitements entraînent une relocalisation de la protéine HSA_{kin17} dans des foyers intranucléaires denses.

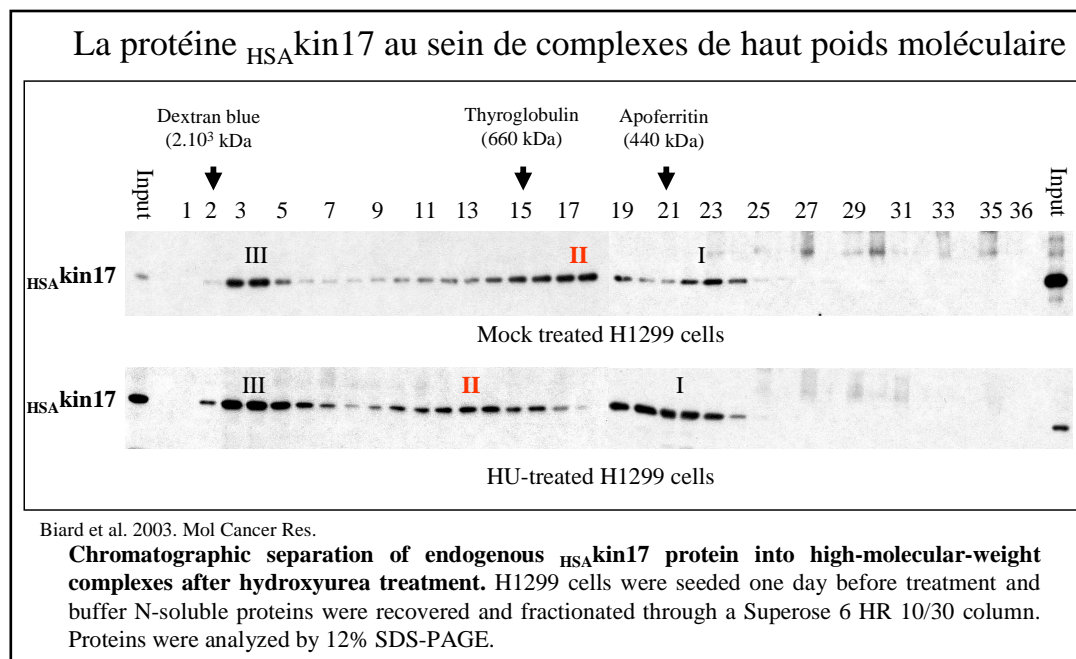
Il ressort qu'en l'absence de traitement, la protéine HSA_{kin17} se localise au niveau des sites de réplication de l'ADN. Elle s'accumule au niveau de ces sites lorsque les cellules sont (i) en phase de prolifération rapide ou (ii) lorsqu'elles sont soumises à une atteinte génotoxique.



Induction de la protéine HSA_{kin17} associée à la chromatine après ré-initiation de la réplication de l'ADN

Puisque la protéine HSA_{kin17} est étroitement associée avec les sites de réplication de l'ADN (microscopie électronique), j'ai voulu déterminer la relation qui existait entre l'expression de la protéine HSA_{kin17} et la progression (ou l'arrêt) des fourches de réplication. J'ai choisi de bloquer les cellules RKO avec de la L mimosine (400 μ M ; 24h) puis de réverser ce phénomène. T. Krude a montré que la L-mimosine induisait un arrêt du cycle en fin de G1 proche de la jonction G1 / S, avant l'établissement des fourches de réplication (Krude, 1999). Nous venons de vérifier cette observation par cytométrie en flux après un marquage au BrdU des cellules traitées. Après l'élimination de la L mimosine par un changement de milieu de culture, les cellules synchronisée en fin de G1 entrent rapidement dans la phase S (suivie par cytométrie en flux). 2h après ce changement de milieu, on observe une augmentation du taux de la protéine HSA_{kin17} associée à la chromatine sans doute au niveau des sites de ré-initiation de la réplication. Un marquage

immunocytochimique de l'ADN polymérase α montre sa disparition rapide après le traitement et sa complète réapparition 2h après le retrait de la L mimosine (non publié). A 4 et 6h après l'élimination de la L mimosine, les cellules RKO traversent la phase S de façon synchrone et on observe une diminution du taux des protéines HSA_{kin17} et RPA70, associée à une augmentation faible de celui du PCNA. A 10 et 24h, le taux des protéines HSA_{kin17} et RPA70 augmente lorsque les cellules entrent dans la phase G2 et finissent d'accomplir un cycle entier. Ce résultat semble



indiquer que la protéine HSA_{kin17} est étroitement associée avec les sites de réplication de l'ADN, sans doute lors de leur mise en place où lorsque ceux ci sont bloqués.

La protéine HSA_{kin17} se redistribue dans des complexes de hauts poids moléculaires après un arrêt en G1 / S (2003)

Nous avons cherché à savoir si le marquage immunocytochimique de la protéine HSA_{kin17} en foyers intranucléaires correspondait à une redistribution de la protéine HSA_{kin17} dans des complexes multi-protéiques de hauts poids moléculaires.

Dans un premier temps, nous avons analysé la masse moléculaire de la protéine recombinante $(His)_6$ - HSA_{kin17} purifiée par chromatographie d'affinité et colonne d'héparine. Il ressort que cette protéine est éluée principalement comme un monomère (chromatographie d'exclusion par la taille sur colonne Superdex 200 HR 10/30 ; *Smart System*).

Dans un deuxième temps, nous avons estimé le poids moléculaire de la protéine HSA_{kin17} endogène dans les cellules H1299 après traitement ou non par l'hydroxyurée (2 mM; 24 h). Les fractions « *protéines nucléaires labiles* » et « *protéines associées à la chromatine* » (comme définies précédemment) ont été récupérées et analysées par chromatographie d'exclusion par la taille sur colonne Superose 6 HR 10/30 column (*Smart*

System). Dans la fraction des « *protéines nucléaires labiles* » nous n'observons pas de protéine HSA_{kin17} à l'état monomérique en absence ou en présence de traitement. En fait, la protéine HSA_{kin17} est distribuée dans trois complexes de masse moléculaire d'environ 400, 600 et 2,000 kDa (complexes I, II et III) (Biard et al., 2003).

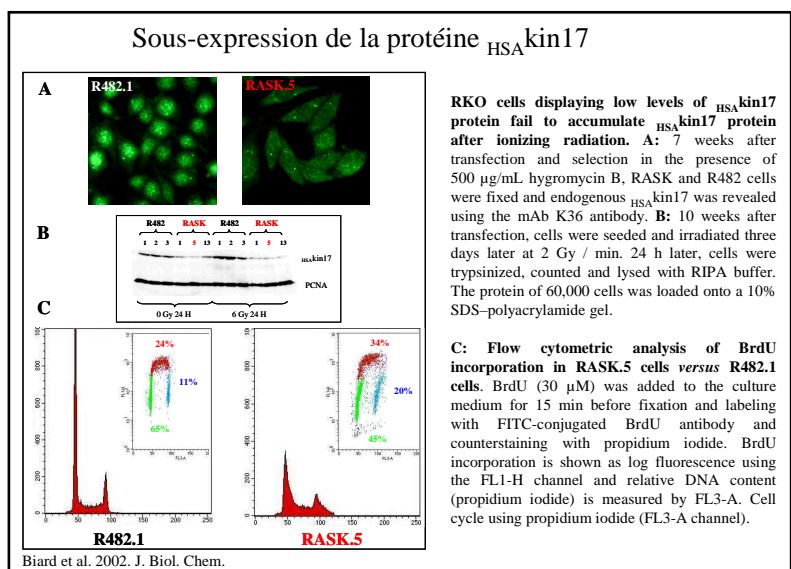
Il est intéressant de constater que dans les fractions correspondant au complexe II se trouve également les protéines PCNA et RPA70. Cependant, cela ne prouve pas que les protéines HSA_{kin17} , PCNA et RPA70 appartiennent au même complexe. D'autre part, RPA70 est également présent dans la fraction contenant le complexe III de 2.10^6 Da. Après un arrêt des cellules en G1 / S induit par l'hydroxyurée on observe un décalage des complexes I et II vers des poids moléculaires plus élevés et un enrichissement en protéines HSA_{kin17} et RPA70 du complexe III. Un résultat similaire a été obtenu avec l'analyse des « *protéines associées à la chromatine* ».

Etude des conséquences biologiques d'une sous-expression de la protéine HSA_{kin17} (stratégie antisens) (2002-2003)

Si la protéine HSA_{kin17} est impliquée dans la réplication de l'ADN et dans la réponse à une atteinte génotoxique, une sous-expression doit entraîner des défauts de la réplication (voire la létalité) et une hypersensibilité à des agents génotoxiques. Pour vérifier cela, j'ai établi, avec difficultés, des populations clonales portant un vecteur EBV contenant l'ADNc HSA_{KIN17} en position « antisens ». J'ai travaillé avec les cellules RKO humaines (carcinome colorectal) car celles-ci présentent un niveau élevé de la protéine HSA_{kin17} endogène. Cette approche m'a permis d'obtenir des clones sur-exprimant notre transcrit et appelés « cellules RASK » pour « RKO AntiSense HSA_{K in17 cDNA» (Biard et al., 2002).

Dans trois clones survivants, la sur-expression constitutive du transcrit HSA_{KIN17} *antisens* conduit à une diminution de 75% du niveau d'expression de la protéine HSA_{kin17} et à des défauts importants de la prolifération cellulaire. Dans les cellules RASK.5, nous n'observons pas de re-localisation de la protéine HSA_{kin17} après une irradiation ionisante ou un traitement par l'étoposide. Cela indique que les cellules RASK sont incapables de recruter la protéine HSA_{kin17} après induction de dommages dans l'ADN.

L'analyse par cytométrie en flux des clones RASK marquées au BrdU montrent une entrée prématurée des cellules en phase S et une diminution du nombre de cellules 7en phases G1 par rapport au contrôle. Cette



entrée prématurée en phase S pourrait conduire à l'accumulation de dommages dans l'ADN et expliquer l'augmentation du nombre de cellules en G2 qui est observé (Biard et al., 2002). Il est intéressant de noter que les cellules RASK **s'accumulent au début et au milieu de la phase S**.

Ce résultat indique pour la première fois que la protéine HSA_{kin17} peut être directement impliquée dans la réplication de l'ADN, et qu'elle y est indispensable. De plus ; les cellules RASK présentent une **baisse importante de la prolifération cellulaire**, avec une efficacité de clonage 15 fois plus faible que celle des clones contrôles.

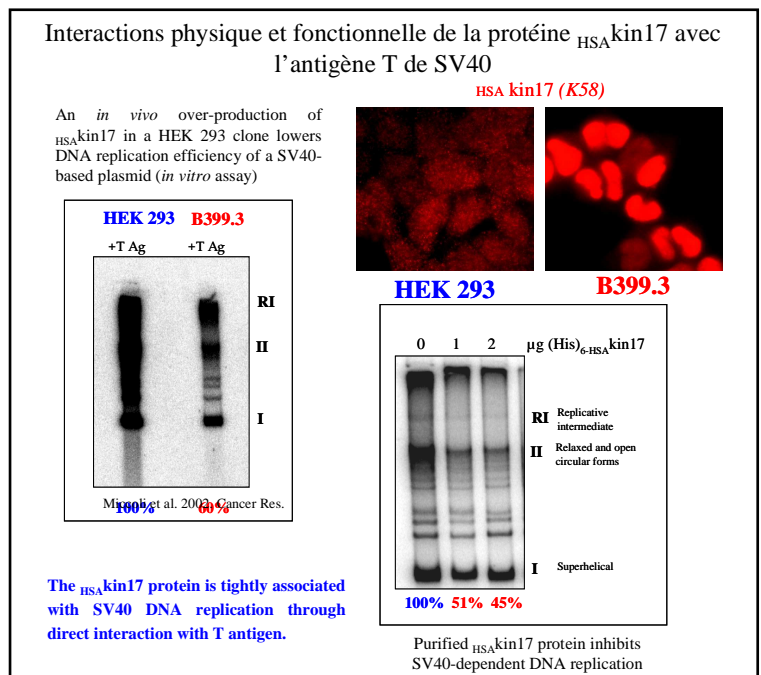
La sous-expression de la protéine HSA_{kin17} entraîne aussi une hypersensibilité aux rayons ionisants. En effet, après une irradiation à 1 Gy, les pourcentages de survie étaient respectivement de $64\% \pm 3$, $57\% \pm 3$ pour les cellules contrôles (RKO et R482.1) et de $39\% \pm 4$ et $21\% \pm 3$ pour clones RASK.13 et RASK.5. A 2 Gy, alors que les pourcentages de survie des clones RASK tombent à $9\% \pm 2$ pour RASK.13 et $5\% \pm 1$ pour RASK.5, les pourcentages dans les lignées contrôles se maintiennent à $33\% \pm 5$ pour RKO et $25\% \pm 1$ pour R482.1 (Despras et al., 2003).

HSA_{kin17} et la réplication de l'ADN (2002-2005)

Afin d'étudier l'implication de la protéine HSA_{kin17} dans la réplication de l'ADN, différents modèles expérimentaux ont été développés : le modèle de réplication SV40 dépendante de l'antigène T (Ag T), la purification du CMR (*complexe multiprotéiques de réplication*) et la fixation aux origines de réplication endogènes.

Le modèle SV40

Nous avons mis en évidence une interaction physique directe entre la protéine HSA_{kin17} et la séquence NH2-terminal de l'antigène grand T du virus SV40 (Miccoli et al., 2002). Cette séquence de Ag T (acides aminés 168-383 appelé T2) fait partie du domaine majeur de fixation à l'ADN et d'interaction avec p53 ou l'ADN polymérase α . Il est intéressant de constater que la fixation de la protéine HSA_{kin17} à l'Ag T est plus importante lorsque l'Ag T est déjà fixé sur l'origine de réplication de virus SV40, laquelle contient des séquences courbes.



Les activités de réplication de l'ADN *in vitro* avec le modèle SV40 ont été analysées. Une diminution de 40% de la réplication dépendant de l'Ag T est observé dans les extraits d'un clone sur-expression HSA_{kin17}

(B399.3) par rapport au contrôle (Miccoli et al., 2002). De même, afin de déterminer la capacité de la protéine purifiée recombinante $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ à interférer avec la synthèse de l'ADN, des quantités croissantes de cette protéine ont été ajoutées dans des extraits protéiques de cellules HeLa. Une diminution progressive de la synthèse de l'ADN (51 et 45% d'inhibition à 1 et 2 μg de protéine purifiée) est observée. A l'opposé, l'apport de 10 μg de $[\text{His}]_6\text{-}_{\text{HSA}}\text{kin17}$ au milieu réactionnel ne permettait pas d'affecter l'activité de l'ADN polymérase alors que 10 μM d'aphidicoline entraînait une réduction de 50% de cette activité (non publié). Ainsi, la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ inhibe la synthèse de l'ADN non pas en interagissant avec l'ADN polymérase mais directement avec l'Ag T ou avec son origine de réplication.

Des techniques de séparation des fractions post-microsomaux et nucléaires ont montré que la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ se trouvait dans la même fraction que l'Ag T, au niveau d'un complexe de haut poids moléculaire d'environ 17-19S qui pourrait être des complexes multiprotéiques de réplication (CMR).

$_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans le complexe de réplication de l'ADN

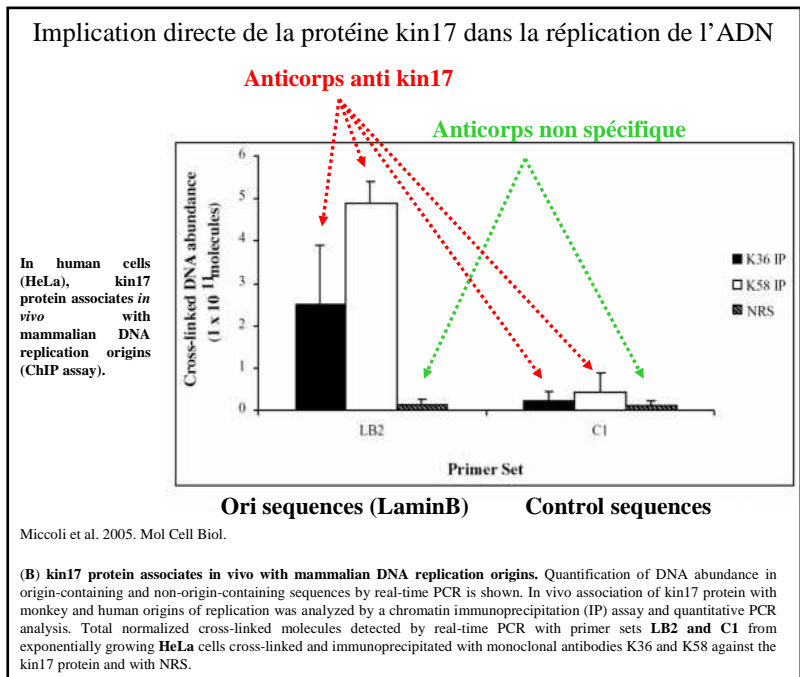
En effet, de nombreuses études ont montré que la synthèse de l'ADN avait lieu dans des CMR, également appelés *ADN synthésomes*. *In vitro*, ces complexes sont compétents pour conduire l'intégralité de la synthèse de l'ADN dans le modèle d'étude « SV40 » (Malkas et al., 1990). Des protéines essentielles participent à ces complexes comme les ADN polymérases α / primase, δ et ϵ , l'ADN ligase I, les topoisomérase I et II, le PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), RF-C (*replication factor C*), RPA, une ADN hélicase, et la PARP1 (Coll et al., 1997; Frouin et al., 2002). *In vivo*, la réplication de l'ADN par les CMR a lieu dans des compartiments nucléaires spécifiques appelés « *replication factories* » (Hozak et al., 1993; Montecucco et al., 1995).

Les CMR actifs ont été purifiés *in vitro* selon deux méthodes biochimiques distinctes ; celle du Dr Giovanni Maga et celle du Dr. Linda Malkas. Il apparaît que la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ appartient à un complexe d'environ 600 kDa qui est capable de supporter *in vitro* la réplication de l'ADN. Ce complexe pourrait être le complexe II décrit précédemment. De plus, l'immunodéplétion de $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ dans ces complexes réduit l'activité de réplication de l'ADN *in vitro* suggérant fortement une rôle direct de cette protéine.

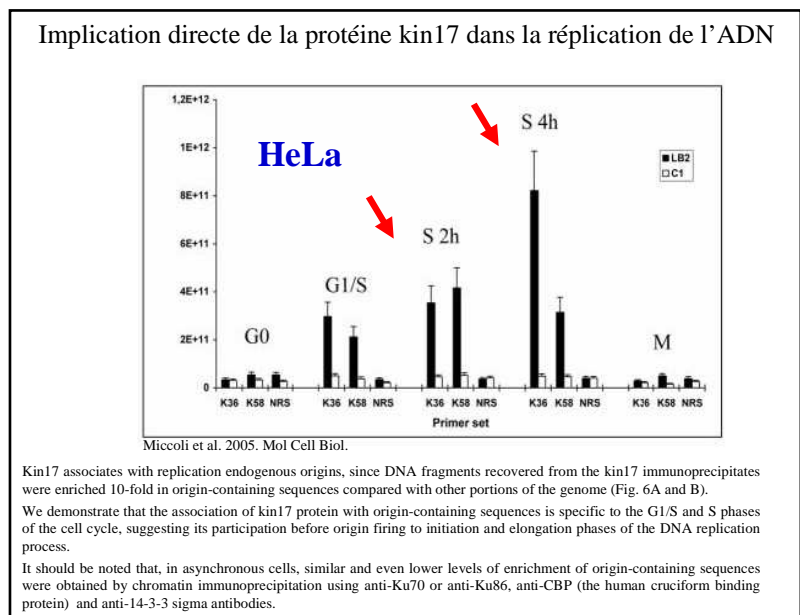
Interaction de la protéine $_{\text{HSA}}\text{kin17}$ avec les ors

Le laboratoire du Dr Maria Zannis-Hadjopoulos a isolé des séquences *ors* (*origin-enriched sequences*) à partir de cellules de rein de singe CV-1 qui sont capables de conférer une réplication autonome à des plasmides *in vivo* et *in vitro* (Zannis-Hadjopoulos and Price, 1999). Il a été démontré que l'ors12 agissait comme une origine de réplication chromosomique. Les ors8 (séquence minimale de 186 bp) et ors12 (séquence minimale de 215 bp) contiennent des séquences répétées inverses (IRs) et présentent une structure cruciforme. En utilisant des techniques de *cross-link in vivo* à la formaldéhyde suivies par des immunoprécipitations, Novac *et al.* ont montré que la protéine CBP (*cruciform binding protein*) se fixait spécifiquement aux ors8 et ors12 *in vivo* (Novac et al., 2002).

En utilisant les mêmes méthodes, le laboratoire de Maria Zannis-Hadjopoulos a démontré que kin17 était associée fortement *in vivo* avec des fragments d'ADN contenant des **origines de réplication**, à la fois dans les **cellules humaines** HeLa et dans les **cellules de singe CV-1** (Miccoli et al., 2005). Ainsi, l'association de la protéine kin17 endogène avec la séquence **ors8** dans des cellules CV-1 en croissance exponentielle, est de 12 à 18 fois supérieure à ce qui est observé avec un sérum non spécifique. De même, l'association de kin17 avec une région intronique CD4 ne contenant pas d'origine de réplication, est de 15 à 20 fois inférieure à ce qui est observé avec la région ors8.



Dans les cellules HeLa en prolifération, l'association de kin17 à la région **LB2** (contenant une origine de réplication) est 10 à 17 fois supérieure à ce qui est observé avec un sérum non spécifique. De même, l'association de kin17 avec la région C1 contrôle est de 8 à 10 fois plus faible que ce qui est observé avec la région LB2. Cette association est dépendante de la progression dans le cycle cellulaire ; elle est observée à la jonction G1 / S puis elle devient négligeable en G0 et M. Des anticorps monoclonaux dirigés contre kin17 entraînent une inhibition de 3-fois de la réplication de l'ADN *in vitro* d'un plasmide contenant une origine minimale de réplication (p186) ; cette inhibition peut être levée par l'addition de protéine kin17 recombinante (Miccoli et al., 2005).



Chapitre IV : Travail actuel : l'interférence ARN à très long terme

Objectif

Depuis ces quatre dernières années, l'interférence ARN (RNAi) a émergé comme une technologie prometteuse en génétique fonctionnelle et en particulier dans le domaine de la cancérologie. Brièvement, le RNAi est le processus par lequel l'introduction ou l'expression *in cellulo* d'un ARN double brin (dsRNA) dans une cellule va éteindre l'expression d'un gène cible en induisant la dégradation spécifique de l'ARNm complémentaire. Aujourd'hui, Le RNAi est devenu la méthode privilégiée par laquelle les chercheurs éteignent l'expression d'un gène cible afin de déterminer les fonctions biologiques du produit de ce gène.

Dans le domaine de la **Radiobiologie**, cette approche ouvre de nouvelles voies de recherche. En effet, jusqu'à présent l'étude des protéines impliquées dans la radiosensibilité peut être appréhendée par l'utilisation de lignées cellulaires déficientes dans l'une des voies de réparation de l'ADN. Chez l'homme, ces cellules proviennent habituellement de patients présentant une maladie génétique. Les difficultés d'obtenir de tels échantillons m'ont amené à créer des **lignées syngéniques** dans lesquelles un **gène de la réparation de l'ADN a été éteint** par la technique de **l'interférence ARN**. L'idée est également de créer des mutants qui n'existent pas dans la nature.

Pour atteindre cet objectif, j'ai développé et validé de nouveaux vecteurs non viraux, **pEBVsiRNA** (brevet CEA 2005, extension PCT en 2006) qui permettent une extinction de l'expression des gènes très efficace et à très long terme. Ainsi, j'ai créé une batterie de clones silencieux (*knock down* ou *KD*) pour un gène de réparation de l'ADN. En février 2008, j'avais créé plus de **500 vecteurs** dirigés contre **110 gènes** et établis des **clones « knock down » (KD) stables pour plus de 45 gènes** de la réparation de l'ADN. L'ensemble de ce travail, ses orientations et mes résultats ont été publiés dans 6 articles dont 5 en 2007 (Biard, 2007; Biard et al., 2005; Biard and Angulo, 2007; Despras et al., 2007 ; Pennarun et al., 2008; Wu et al., 2007). Un tel ensemble cellulaire, avec autant de gènes ciblés et des temps de culture aussi longs, est unique dans la littérature. Mes clones cellulaires les plus anciens ont dépassé 500 jours de culture (ex. DNAPKcs^{KD}) et ils présentent toujours la même extinction de l'expression du gène cible et les mêmes phénotypes qui s'y rattachent. De part leurs caractéristiques, mes vecteurs répliatifs pEBVsiRNA apportent une amélioration importante à l'approche RNAi, aussi bien à court, moyen et très long terme.

L'Interférence ARN (RNAi)

La découverte de l'Interférence ARN en bref :

Il ne s'agit pas ici de décrire de façon exhaustive l'interférence ARN (*RNA interference* ou *RNAi*) mais d'en donner les grandes caractéristiques pour comprendre mon approche.

Le RNAi permet l'extinction de l'expression d'un gène cible grâce à la présence de petites séquences d'ARN double chaîne (dsRNA) spécifiques. Il est à noter que les **ARN** non codant de **petite taille** jouent un rôle essentiel dans la **régulation épigénétique**, la **dynamique des chromosomes**, la **compensation génique** des gènes portés par les chromosomes sexuels («*dosage compensation*») ou les phénomènes interférant avec la **différenciation cellulaire** et le **développement des organismes**. Dans l'ensemble de ces mécanismes on inclut le «*gene silencing*» par l'interférence ARN.

La découverte de l'interférence ARN a été le fruit de résultats inattendus obtenus par différentes équipes travaillant sur la plante (pétunias), les moisissures (*Neurospora crassa*) ou le nématode (*C. elegans*). En 1990, des chercheurs voulant modifier la coloration de **pétunias transgéniques**, ont sur-exprimé le gène codant la chalcone synthase (CHS ; pigment violet profond) (Napoli et al., 1990 ; van der Krol et al., 1990). De façon très étonnante, ils se sont aperçus que cela bloquait la biosynthèse de l'anthocyanine et que 42% des plantes étaient blanches ou violet pâle ; il se produisait un phénomène de **co-suppression** de l'expression à la fois du transgène et du gène endogène. S'agissait-il d'un effet **PTGS** (*post transcriptional gene silencing*) ou **TGS** (*transcriptional gene silencing*) (pour revue voir (Hannon, 2002)).

En 1997, des essais pour stimuler la production d'un pigment orange (caroténoïde) ont été entrepris dans la moisissure de *Neurospora crassa*. Comme précédemment, au lieu d'observer une coloration orange vif, un tiers des moisissures apparaissaient jaunes voire blanches. Quelque chose supprimait l'expression des gènes des pigments. Ils appelèrent ce phénomène «*quelling*» ou «*gene silencing*» (Cogoni and Macino, 1997). Plus tard, il a été proposé que des ARN polymérases endogènes dirigés contre les ARN (*RdRPs* ou *RNA-directed RNA polymerases*) pouvaient reconnaître des «*transcrits aberrants*» provenant de loci fortement exprimés et les convertir en dsRNA, tout du moins chez *C. elegans*, les champignons ou les plantes (Dalmay et al., 2000).

La véritable histoire du RNAi commence vraiment en 1998 avec les travaux de Fire et collaborateurs sur *C. elegans* (Fire et al., 1998). Ces auteurs démontrent que l'injection d'ARN double brin était un agent plus efficace pour éteindre l'expression d'un gène que l'injection du brin sens ou antisens seul. De plus, quelques molécules seulement d'ARN double brin étaient suffisantes chez le nématode pour éteindre l'expression d'un gène dans une cellule. Cela mettait en évidence l'existence d'un **mécanisme spécifique d'extinction de l'expression des gènes par des fragments d'ARN double brin**. Ce phénomène a été appelé «**RNA**

interférence » (RNAi). Ce travail a été récompensé par le **prix Nobel de Médecine 2007**. Les effecteurs de ce mécanisme, les petites séquences d'ARN double chaîne ont été appelées **siRNA** (*small interfering RNA*).

L'importance de ce phénomène avait été souligné sans le savoir par différents laboratoires dès 1994, lesquels avaient montré que les plantes répondaient aux virus à ARN en déclenchant la dégradation des ARN viraux (Dougherty et al., 1994). Ainsi chez la plante, la présence de molécules d'ARN double chaîne déclenchent naturellement la réponse RNAi.

Chez l'homme, bien que la voie des siRNA ne soit plus active, les complexes enzymatiques sont toujours présents car ils participent à une voie parallèle, essentielle pour la vie cellulaire et qui prend en charge les **microRNA** (miRNA). Il suffira donc de ré-introduire dans les cellules humaines l'agent effecteur du RNAi, des **duplex d'ARN double brin** appelés **siRNA** (*small interfering RNA*).

Les microRNA :

Les **miRNA** représentent une grande famille d'ARN endogènes de petite taille, non codant, qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes. Ils sont impliqués dans la régulation de processus clefs comme le développement, la symétrie cellulaire, la prolifération ou dans certaines maladies. Ils sont codés par le génome d'un grand nombre d'organismes, depuis les virus, les plantes jusqu'au mammifères (He and Hannon, 2004 ; Pfeffer et al., 2004). Leur synthèse se fait en deux étapes à partir de longs miRNA primaires polyadénylés et « coiffés en 5' » (**pri-miRNA**) qui sont transcrits par l'ARN polymérase II (comme les ARNm). Ces pri-miRNA sont pris en charge par un complexe (*nuclear Microprocessor complex*) contenant l'**endonucléase de type III Drosha**, ce qui conduit à la formation des précurseurs des miRNA (**pre-miRNA**) de 70-90 nt portant 2 nt non appariés en 3', ce qui constitue un signal d'exportation cytoplasmique (**Exportin-5**) (Yi et al., 2003). Dans le cytoplasme, ces structures en épingles à cheveux sont clivées par une seconde **endonucléase de type III, Dicer** (*éminceuse*) qui va générer les miRNA. De façon intéressante, Dicer génère aussi les siRNA. Il y a donc une similitude des voies métaboliques miRNA et siRNA.

Le mécanisme de l'Interférence ARN

L'interférence ARN est donc un processus biologique par lequel l'introduction de dsRNA dans des cellules entraîne une extinction (réduction) de l'expression d'un gène cible. Il s'agit d'un mécanisme essentiellement post-transcriptionnel de régulation des gènes, hautement coordonné et spécifique d'une séquence nucléotidique.

In cellulo, les pré-miRNA ou du dsRNA exogène, sont pris en charge par un complexe nucléoprotéique appelé **RISC** (*RNA-induced silencing complex*). Le complexe RISC minimal est constitué chez l'homme des protéines **Dicer** (*Dcr* ou l'éminceuse), **TRBP** (de fixation au dsRNA) et **Argonaute2** (nucléase Ago2) (Gregory et al., 2005). Ces ARN sont clivés par l'**endonucléase de type III Dicer** en fragments d'environ

21-23 nt correspondant aux **siRNA** ou aux **miRNA matures**. Du fait qu'ils sont générés par une RNase III, ces petits dsRNA ont en moyenne deux nucléotides non appariés sur chaque extrémité 3'. Les siRNA et les miRNA vont être désappariés en deux brins d'ARN par la fonction hélicase du complexe RISC, donnant lieu à des brins antisens appelés « *guides* » et des brins sens appelés « *passagers* ». Les brins « passagers », inactifs, seront dégradés. Les complexes RISC portant les brins « *guides* » pourront reconnaître l'ARNm cible (par complémentarité des bases). A ce niveau, les modes d'action des siRNA et des miRNA divergent (Kim and Rossi, 2007) :

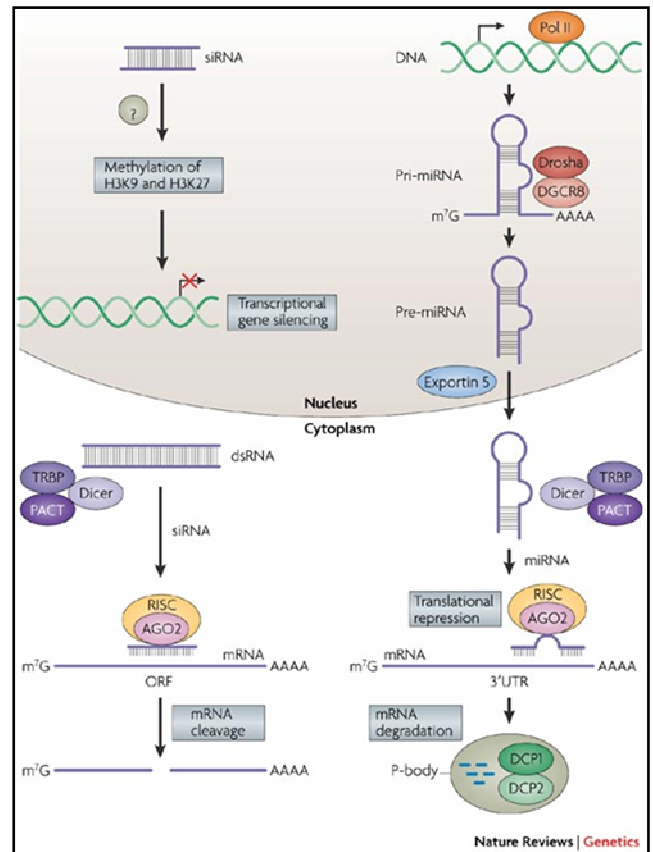
siRNA

Le brin « guide » du siRNA reconnaît parfaitement la séquence cible sur l'ARNm (1 siRNA = 1 cible). Cela entraîne la coupure de cet ARNm par l'endonucléase Ago2 ; les fragments d'ARNm seront ensuite dégradés par des exonucléases. Ainsi, la dégradation continue des ARNm ciblés conduira à la diminution très importante de la protéine codée.

Un second mode d'action a été envisagé : la complémentarité des **siRNAs** avec des **régions promotrices** entraînerait l'extinction transcriptionnelle des gènes dans le noyau au travers de **changements de la chromatine** impliquant la **méthylation des histones**. Le processus moléculaire exact n'est pas encore élucidé.

miRNA

Le brin « guide » des miRNA reconnaît les sites cibles dans les régions **3' UTR** des ARNm et entraînent une **inhibition traductionnelle directe** suivie de la **dégradation des ARNm** dans des *Processing (P)-bodies* qui contiennent des enzymes de *decapping*



Les structures siRNA dans les cellules de Mammifères

Les premiers essais pour ré-activer la voie RNAi dans les cellules de Mammifères ont été des échecs. L'introduction de dsRNA de plus de 30 nt activait une **réponse antivirale** qui menait à la **dégradation non spécifique des transcrits d'ARN** et à une **extinction générale de la traduction** dans les cellules hôtes. Les effets non spécifiques sont dus à l'activation de 2 enzymes de la réponse antivirale à l'interféron : (1) la PKR (dsRNA dependent PK), laquelle sous sa forme active phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2a et arrête toutes les synthèses protéiques, et (2) la 2', 5' oligoadénylate synthétase (OAS) qui synthétise une molécule activant la RNase L, une enzyme non spécifique qui dégrade tous les ARNm.

En 2001, Tuschl et collaborateurs (Elbashir et al., 2001) démontrent que des fragments de **21–23 nt** de duplex d'ARN **activent efficacement le RNAi *in vitro*** (lysats de drosophile). Ils démontrent que la synthèse chimique de duplex **siRNA de 21 nt supprime spécifiquement l'expression de gènes endogènes et exogènes** dans différentes lignées cellulaires humaines, comme HEK293 et les cellules HeLa. Ces auteurs décrivent pour la première fois des critères de *design* pour la synthèse *in vitro* des siRNA de 21 nt. Ces siRNA sont effectivement pris en charge par la machinerie cellulaire et permettent la suppression très efficace de l'expression d'un gène cible, sans autant induire la réponse cellulaire à l'interféron (Elbashir et al., 2001). D'autres auteurs confirment et étendent ces travaux en démontrant que des **siRNA synthétiques et identiques en taille pouvaient induire une extinction spécifique d'un gène aussi bien chez l'homme, la souris ou *C. elegans*** (Caplen et al., 2001). C'était le commencement de l'extraordinaire développement du RNAi dans les domaines de la génétique réverse, de la biologie moléculaire ou de la recherche sur le cancer.

Les structures shRNA ou shRNA-mir

Cependant la **nature transitoire** des siRNA dans la cellule de Mammifère constitue un handicap majeur. Pour le contourner, l'équipe de Brummelkamp et d'Agami a développé en 2002 le premier vecteur d'expression permettant de produire *in situ* des séquences siRNA (Brummelkamp et al., 2002).

Le vecteur pSUPER s'est avéré efficace dans l'extinction à court terme d'un gène endogène (p53) et d'un transgène (GFP). Ce plasmide porte le promoteur H1 reconnu par l'ARN polymérase III qui va conduire la transcription d'une courte séquence dite **shRNA** (*short hairpin RNA*) qui génèrera *in situ* des molécules siRNA grâce à l'enzyme Dicer. En effet, *in vivo* la structure en épingle à cheveux des shRNA s'avère être un très bon substrat pour Dicer.

Le choix d'un **promoteur de l'ARN polymérase III** s'explique car cette enzyme permet de transcrire des **petits ARN sans séquence pA+** en 3'; de plus cette enzyme a des **sites de départ** et de **terminaison** de la transcription **très bien définis**. Dans différentes études de comparaison, certains auteurs utilisant l'approche shRNA ou shRNA-mir ont démontré peu ou pas de différences dans le choix des promoteurs dépendant de l'ARN polymérase de type III (tRNA-val ; U6 ou H1) ou dépendant de l'ARN polymérase de type II pour l'approche shRNA-mir (MSCV-LTR ; CMV) (Silva et al., 2005). Une différence peut se faire sentir lorsque la séquence shRNA est peu efficace.

En parallèle des vecteurs viraux, essentiellement dérivés de l'adénovirus ou des lentivirus (rétrovirus provenant du HIV1) se sont développés pour imposer une interférence ARN dans des cellules difficilement transfectables ou dans des approches chez l'animal. Cependant, des considérations de sécurité et d'éthique peuvent limiter cette approche pour de très nombreux chercheurs (Romano et al., 2003). L'utilisation de ces virus recombinants dans des locaux L2 ou L3 reste en débat.

L'une des variantes dans le domaine des vecteurs (plasmidiques ou viraux) a été faite par Cullen et al. en 2005 (Zeng et al., 2005). Ces auteurs sont partis du postulat que les structures miRNA étaient les substrats naturels pour le complexe RISC. Ils ont substitué dans la séquence de l'ARN précurseur de miR-30, une structure en tige pour la remplacer par une séquence shRNA. Ces auteurs démontrent l'efficacité de cette approche en transitoire, *a priori* plus efficace que l'approche classique. L'utilisation de séquences shRNA-mir permet d'utiliser des promoteurs dépendant de l'ARN polymérase de type II (comme des promoteurs tissu-spécifiques). Ces travaux ont conduit à l'élaboration de bibliothèque criblant une grande partie du génome (RNAi codex ; environ 28,000 gènes humains ciblés et 25,000 de souris) (Olson et al., 2006).

Le design des séquences siRNA

Dans toute approche d'interférence ARN, l'un des problèmes à résoudre est le choix et la spécificité de la séquence siRNA.

Le premier *design* très empirique des séquences siRNA a été formulé par Tuschl et al. (Elbashir et al., 2001). L'une des avancées dans ce domaine a été de démontrer l'importance d'une **asymétrie thermodynamique des siRNA** et miRNA (Schwarz et al., 2003). Ces règles montrent que l'**extrémité 5' du brin « guide » doit avoir une plus faible énergie par rapport à son extrémité 3' pour pouvoir être plus incorporé préférentiellement dans le complexe RISC** ($\Delta G 5' < \Delta G 3'$ d'au moins 1 kcal/mol) (Khvorova et al., 2003).

En compilant de nombreux résultats expérimentaux *Ui-Tei et al* ont étoffé ces règles (Ui-Tei et al., 2004) : (1) un A ou un U à l'extrémité 5' du brin antisens ; (2) un G ou un C à l'extrémité 5' du brin sens ; (3) une région riche en AU (5 A/U sur 7 Nu par exemple) dans l'extrémité 5' du brin antisense. (4) l'absence de fragment riche en GC supérieur à 9 Nu de long. De plus, les auteurs trouvent que la séquence cible est plus importante que la structure secondaire de l'ARNm. On détermine ainsi des siRNA de type Ia/Ib, II, et III. Les siRNA de type III ne répondent pas aux 3 premières règles et sont inefficaces. Il faut privilégier les **types Ia** et éventuellement Ib. Depuis, un très grand nombre d'algorithmes sont disponibles, certain en libre d'accès comme celui de Chalk et collaborateurs (<http://sirna.cgb.ki.se/>) que j'utilise depuis 4 ans (Chalk et al., 2004). Dans tous les cas, on doit faire une recherche d'homologie dans les banques d'ADNc (BLAST), même si celle-ci est imparfaite pour les petites séquences (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Cependant, de nouveaux algorithmes se développent pour déterminer les effets non spécifiques des siRNA. Dans le site siSearch, cet algorithme est appelé « Specificity Server ». Dans le cadre du CEA, un algorithme (DSIR ; <http://cbio.enscm.fr/dsir/>) a été développé par Y. Vandenbourk du CEA-Grenoble, intégrant la problématique des « off-targets » (Vert et al., 2006). J'ai commencé d'évaluer l'algorithme DSIR sur une trentaine de gènes cibles comme DNA PKcs, Ligase III, ATM, p53 ou encore BLM avec d'excellents résultats plusieurs semaines après la transfection.

Pour créer la séquence shRNA il suffit d'introduire une séquence en boucle (celle d'Agami par exemple : TTCAAGAGA) et de mettre des extrémités BamH I en 5' (ligation avec Bgl II du vecteur) et Hind III en 3'. On utilise des oligonucléotides de 64/65 nt. De plus, j'ai introduit deux variations par rapport à la structure canonique décrite dans la littérature.

Les vecteurs pEBVsiRNA

De façon intéressante, tous les vecteurs plasmidiques trouvés dans la littérature (ou vendus) sont des vecteurs dit "d'intégration" possédant ou non un marqueur de sélection. Ces vecteurs ont comme seul devenir de s'intégrer au génome de la cellule hôte. De ce fait, ces vecteurs vont perdre majoritairement l'expression du transgène lors de leur intégration, réduisant ainsi l'efficacité du RNAi même à court terme (ex. à J14). Par ailleurs, ces vecteurs seront présents dans les cellules transfectées en **grand nombre de copies**. Cela va entraîner des **effets non désirés** très importants dus à la saturation de la machinerie cellulaire du RNAi (saturation du complexe RISC par exemple) (Anonymous, 2003). Cet effet peut être amplifié avec l'utilisation des lentivirus lorsqu'ils seront utilisés avec des titres trop élevés (Fish and Kruithof, 2004). Ce dernier point vient d'être souligné par l'équipe d'Elledge lorsqu'il écrit "*Upon closer inspection, it becomes apparent that these systems relied either on transient expression of the vectors or the integration of multiple copies of the regulatable shRNA construct*" (Stegmeier et al., 2005). Ainsi, il vient d'être démontré qu'une toxicité induite par les siRNA (*via* l'induction de l'apoptose) se produisait d'une façon dose-dépendante et indépendamment du gène ciblé (Fedorov et al., 2006). Par conséquent, la sur-expression de siRNA par des duplex de siRNA ou des vecteurs intégratifs (viraux ou non) peut mener à des conclusions incorrectes dans des expériences transitoires, par saturation de la machinerie enzymatique.

De ce fait, dans l'abondante littérature sur le RNAi, on trouve très peu de clones stables référencés ; cette période de stabilité est généralement de quelques jours, rarement quelques semaines (Butz et al., 2003; Laposa et al., 2003; Paddison et al., 2002).

Afin d'éliminer ces inconvénients j'ai donc combiné **l'efficacité des vecteurs d'expression EBV** (Epstein Barr virus) sur lesquels je travaille depuis 1988 (Biard et al., 1992a; Calos, 1996) avec le potentiel de l'approche **shRNA**. Ainsi, j'ai développé de vecteurs pEBVsiRNA qui permettent d'imposer une interférence ARN très efficace, stable et à très long terme (> 500 jours). C'est tout mon travail antérieur, depuis ma thèse, qui m'a conduit à cette démarche simple.

Pourquoi le modèle de vecteurs EBV

Le virus d'Epstein Barr (EBV) est un virus à ADN double brin de 162 kb de la famille des virus herpétique qui se réplique comme un épisome pendant la phase d'infection latente. Une région de 1.7 kb du chromosome EBV, appelée OriP, supporte la réplication et la maintenance des plasmides recombinants dans des cellules humaines en culture en présence exclusivement d'une seule protéine virale, l'antigène nucléaire

EBNA-1 (Yates et al., 1985). Puisque la protéine EBNA-1 ne présente aucune activité enzymatique, l'initiation de la réplication est entièrement dépendante des protéines cellulaires. En effet, les protéines de la cellule hôte comme Orc2, Orc3, Orc4 ainsi que les Mcm s'associent à l'OriP (Dhar et al., 2001). Orc2 se fixe à l'OriP probablement par l'intermédiaire de son interaction avec EBNA-1.

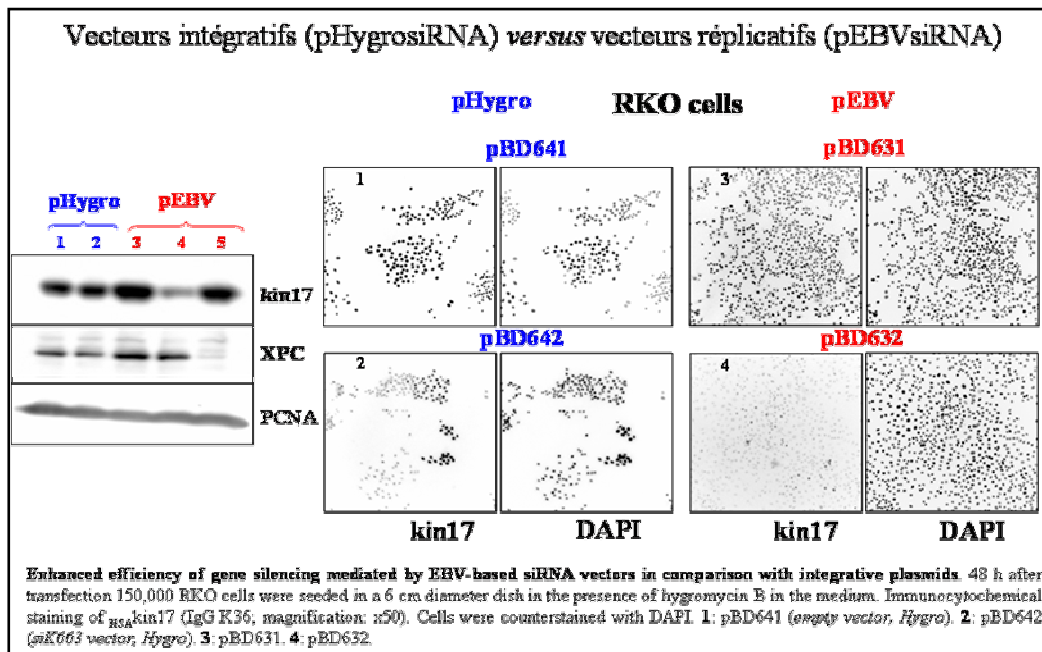
Ainsi, **les vecteurs EBV se répliquent de façon semi-conservative pendant la phase S** et la synthèse de l'ADN à partir de l'OriP se produit une seule fois par cycle cellulaire tout comme les réplicons des cellules humaines (Aiyar et al., 1998). Les vecteurs EBV peuvent servir de modèle d'étude des réplicons chromosomiques humains (Haase and Calos, 1991). En conséquence, on peut constater qu'à la différence de la réplication SV40, la réplication EBV donne lieu à un **nombre faible de vecteurs** dans les cellules humaines. L'OriP contient deux éléments : la séquence FR (*family repeat*) et la séquence DYAD (Lupton and Levine, 1985; Reisman et al., 1985). La réplication de l'ADN est initiée au niveau ou près du DYAD. EBNA-1 se dimérise et se fixe sur ses 4 sites dans le DS et ses 20 sites dans le FR en formant une boucle (Frappier et al., 1994). Nanbo et al. ont montré que tous les plasmides répliqués co-localisent par paire selon une partition qui n'est pas le fruit du hasard (Nanbo et al., 2007). De plus, chaque clone cellulaire maintient un nombre seuil de plasmides par cellule pour avoir les conditions optimales de croissance sous sélection.

EBNA-1 permet **l'ancrage des vecteurs d'expression EBV (ou des virus EBV) sur les chromosomes** au cours de la métaphase assurant une ségrégation de « un pour un » dans les cellules filles (Hung et al., 2001; Marechal et al., 1999). EBNA-1 et FR assurent le maintien des plasmides EBV (**rétenion nucléaire**) dans les cellules humaines mais pas leur réplication; il faut la séquence **DYAD** (Aiyar et al., 1998; Haase and Calos, 1991).

Parce que la fonction de trans-activation de la transcription du complexe OriP / EBNA1 est essentielle à l'activation des promoteurs portés par le vecteur, j'ai orienté en position « directe » ou « réverse » rapport à la cassette EBV, notre cassette « shRNA » pour obtenir l'expression la plus stable de ces shRNA. J'ai retenu l'orientation réverse (Biard et al., 2005). Cette activité de trans-activation de la transcription implique que la protéine EBNA1 puisse entraîner des changements dans la structure de type chromatine du vecteur et en particulier en créant des boucles et une déstabilisation des nucléosomes (Zetterberg et al., 2004). De façon intéressante, EBNA1 perd sa fonction de transactivation lorsque la séquence OriP s'intègre au génome cellulaire ; de plus, il n'affecte pas la croissance cellulaire ou l'expression des gènes au travers d'interactions avec d'autres séquences d'ADN chromosomique (Kang et al., 2001).

Dans ces conditions, 14 jours après la transfection de nos vecteurs pEBVsiRNA (suivie de la sélection des cellules avec l'hygromycine B), plus de 95% des cellules HeLa ou RKO transfectées sont silencieuses. C'est le cas pour les gènes *XPA*, *hHR23A*, *MRE11 Lig III*, *Lig IV* or *Rad50* et bien d'autres. En conséquence, les populations ainsi établies peuvent être cultivées et analysées pendant 30-40 jours. Ensuite, il est malgré tout préférable de travailler sur des clones. Ceci est à comparer avec des vecteurs *intégratifs* (appelé ici pHygro) où moins de 20 à 30% de cellules sont silencieuses deux semaines après la transfection et donc où il sera

impossible de perpétuer la population (figure ci-dessous). De façon étonnante, nos clones restent stables même après des étapes de congélation / décongélation.

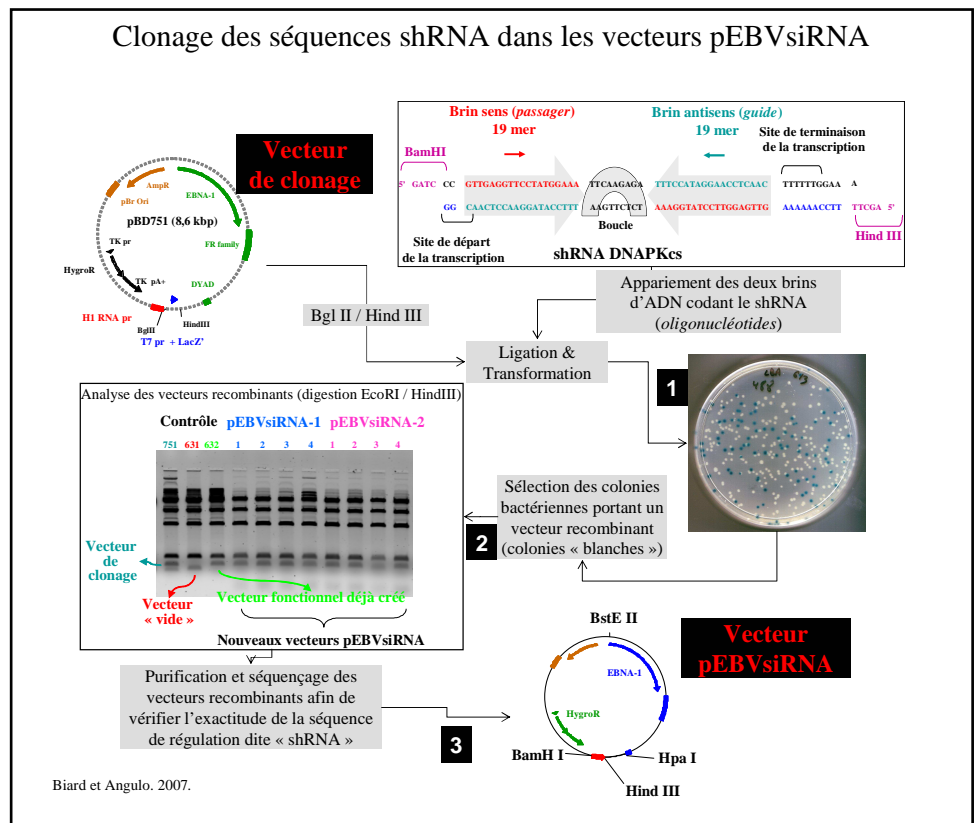


Avantage des vecteurs pEBVsiRNA sur l'art antérieur

Les propriétés intrinsèques des vecteurs **pEBVsiRNA**, telles que leur rétention nucléaire, leur très grande stabilité ou leur accrochage aux chromosomes, améliorent considérablement le RNAi à court et long terme. C'est ce que j'ai démontré depuis deux ans (Biard, 2007; Biard and Angulo, 2007).

Par ce travail, j'ai :

1. optimiser l'efficacité de clonage des séquences shRNA



dans les vecteurs pEBVsiRNA, en atteignant 100% d'efficacité grâce à une séquence T7 pr-LacZ' entre les sites de clonage (coloration bleue *versus* blanche des clones bactériens). Le clonage est donc extrêmement efficace et rapide (schéma ci-dessous).

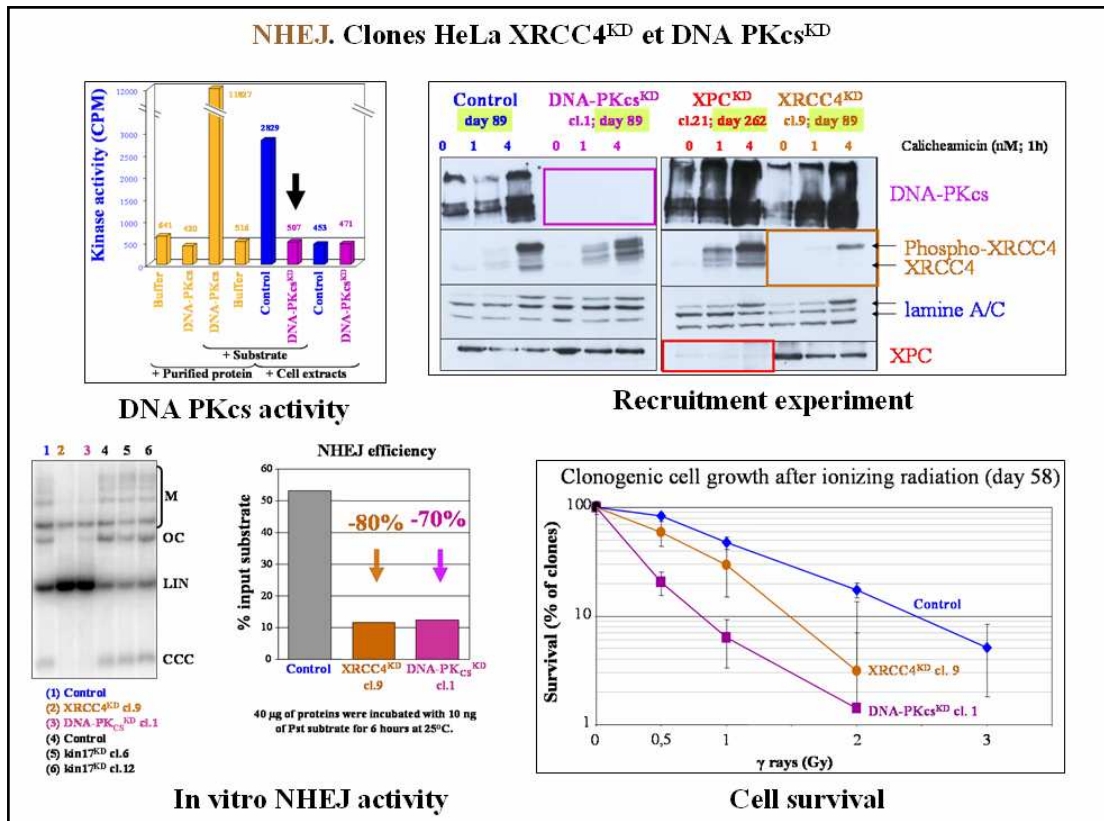
2. **valider le potentiel des vecteurs pEBVsiRNA** (en comparaison avec les autres vecteurs disponibles) sur de très nombreuses séquences shRNA et en ciblant un très grand nombre de gènes,
3. démontrer l'étonnante stabilité sur le **très long terme** du RNAi ainsi imposé,
4. **réverser** le phénotype après retrait de la pression de sélection du milieu de culture,
5. valider ces vecteurs sur **différents types cellulaires** (HeLa, MRC5-V2, MCF7, U2OS, RKO, HCT116, Caco2, HepaRG, Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y et Lymphocytes immortalisés C3ABR).

Résultats obtenus (2004-2007)

Je ne vais pas décrire ici l'ensemble de mes résultats, car environ 500 vecteurs pEBVsiRNA construits, ciblant plus de 110 gènes humains cela nous emmènerait sur de trop nombreuses voies de réflexion. Pour résumer, j'ai donc établi des clones stables « *knock down* » (KD) pour des gènes dont les protéines agissent en tant que senseurs / médiateurs de la présence de dommages à l'ADN (*BRCA1, BRCA2, ATM, ATR, BLM, FancD2, PARG, PARP1, PARP2, Rad50, NBS1, MRE11*) ou participent aux voies de réparation de l'ADN (*XPA, XPC, hHR23A, hHR23B, CSA, CSB, ERCC1, XPF, MSH2, DNA-PKcs, XRCC4, Ligase IV, Rad54, Ogg1, XRCC1, Ligase III* et d'autres).

Ce travail a donné lieu à 6 articles qui décrivent :

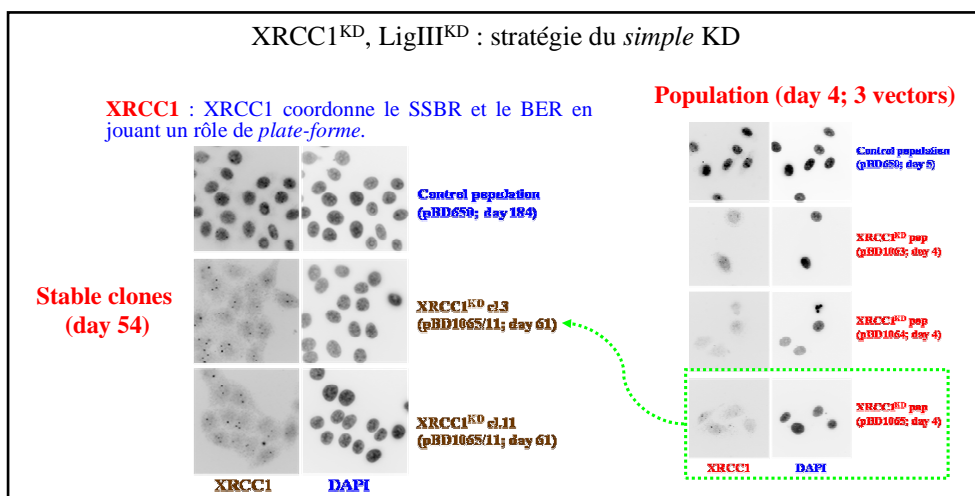
1. Des clones KD de la voie de réparation NER (Biard et al., 2005),
2. Mon système de vecteurs et 20 clones stables à très long terme (Biard, 2007; Biard and Angulo, 2007),
3. Des clones KD de la voie de réparation du NHEJ ($XRCC4^{KD}$; $DNAPKcs^{KD}$) et les relations croisées entre 2 voies (Despras et al., 2007). L'image ci-dessous illustre mes clones $DNAPKcs^{KD}$ et $XRCC^{KD}$,
4. Des clones KD de la voie de réparation du NHEJ ($XRCC4^{KD}$; $LigaseIV^{KD}$; $DNAPKcs^{KD}$) et les relations avec Cernunnos (Wu et al., 2007).
5. Un clone ATM^{KD} afin d'étudier les effets du ligand des G-quadruplex 360A (Pennarun et al., 2008).



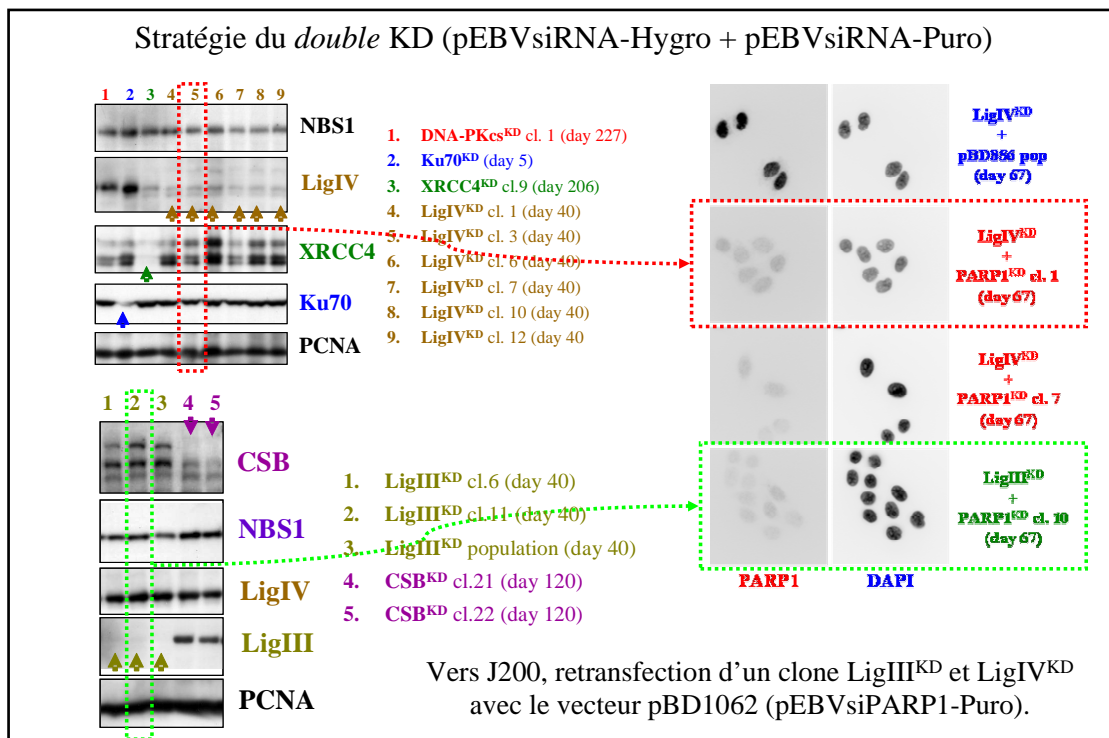
A ce jour, nous sommes les seuls à proposer un tel système cellulaire cohérent (isogénique) avec un aussi grand nombre de clones stables, maintenus en culture aussi longtemps. Les clones les plus anciens ont dépassé les 500 jours de culture.

Dans ma stratégie de créer des clones silencieux, j'ai suivi deux stratégies : celle de faire des *simple KD* (un gène éteint) ou celle de faire des *double KD* (deux gènes éteints).

1 Simple KD (exemple ci-dessus) : pour chaque gène, je construis 3 vecteurs différents ; après analyse des phénotypes obtenus sur plusieurs jours (voire semaines), je choisis le meilleur vecteur pour établir des clones stables.



2 Double KD (exemple ci-dessous) : il me semble plus cohérent d'établir tout d'abord des clones *simples* KD, d'analyser leur phénotype et la perte de fonction associée à l'extinction d'un gène, avant d'envisager d'éteindre un second gène.



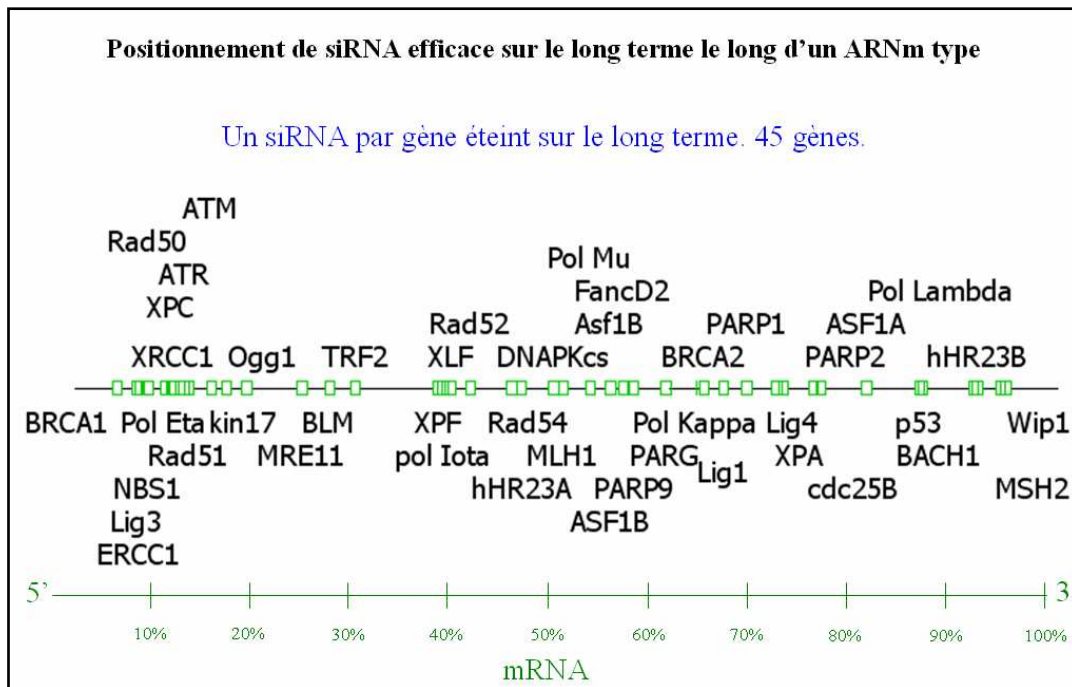
L'ensemble de mes résultats montre que les vecteurs pEBVsiRNA apportent un **gain de temps et une efficacité considérable** dans l'établissement de clones cellulaires « silencieux » pour l'expression d'un ou plusieurs gènes (*simple* KD versus *double* KD). Ils permettent de **valider** sur le court, moyen et long terme le choix des **cibles biologiques (gènes)** et des **effecteurs efficaces et spécifiques du RNAi**. Cela permet d'envisager sereinement d'autres approches plus délicates comme des approches *in vivo* ou des approches sur des cellules souches.

Ces vecteurs présentent l'énorme avantage de pouvoir être manipulés **sans aucune précaution particulière**, à l'exception des règles classiques de la culture cellulaire. L'efficacité de clonage des séquences shRNA (100%) dans ces vecteurs augmente leur potentiel car de nombreux vecteurs peuvent être obtenus très rapidement. Cela concourt à leur coût très faible.

Le travail que j'ai effectué sur tous ces gènes, m'a permis de tirer quelques conclusions simples sur le RNAi à long terme :

1. Le choix de la **cellule « récepteur »** est essentiel ; en premier lieu, il faut utiliser des cellules facilement transfectables (HeLa) et ensuite passer à des cellules plus délicates.
2. L'efficacité du RNAi dépend du **gène cible**, du **siRNA** et du **marqueur de sélection** (hygromycine B > puromycine >>> généticine).

3. L'algorithme de design est essentiel. Ensuite, le positionnement de la séquence siRNA le long de l'ARNm ne semble pas être un facteur déterminant dans l'efficacité à très long terme du *gene silencing*. En compilant mes données sur 45 gènes dont les clones silencieux ont été propagés en culture pendant plusieurs mois, on constate qu'il n'y a pas de règle (figure ci-dessous).



4. L'expression des siRNA via les vecteurs pEBVsiRNA est **efficace dès 48h** après la transfection, comme pour les duplex siRNA (après optimisation des conditions de transfection).
5. L'établissement de clones stables à long terme permet de **valider le choix de la cible** (le gène d'intérêt que l'on veut éteindre) et le **choix de la séquence siRNA** (via l'effecteur shRNA).
6. Le choix d'un **promoteur de type II** (ex. CMV) n'est pas approprié pour une expression efficace des siRNA à court, moyen ou très long terme sauf si l'on a besoin d'une expression tissu dépendante (dans ce cas, on utilisera des séquences hybride shRNA-miR).
7. **Problème des contrôles** : il n'y a pas de réels contrôles en RNAi ! Il faut faire : (i) des shRNA non spécifiques, (ii) réverser les phénotypes avec les vecteurs pEBVsiRNA, (iii), ré-introduire la protéine *in vivo* & *in vitro*, (iv) mimer l'action attendue du *gene silencing* avec des drogues dans des tests *in vitro*, (v) comparer les effets à court & long termes, (vi) utiliser au moins 2 vecteurs, (vii) reproduire les expériences, et (viii) utiliser éventuellement différentes lignées.
8. Généralement, après 30-50 jours de culture, les clones KD sont très stables même après congélation / décongélation (> 500 jours pour XPA, XPC, DNAPKcs). Mais il semble satisfaisant de travailler entre **100-200 jours**.

9. Un point délicat du RNAi est de sous-estimer le rôle biologique d'une protéine parce qu'il reste toujours une **quantité résiduelle**. Cela soulève 2 questions : (i) est-ce que cette quantité résiduelle est suffisante pour assurer les fonctions biologiques, et donc (ii) peut-on détecter une perte de fonction dans nos clones ?
10. La **redondance** de l'information génétique chez les mammifères peut masquer une perte de fonction.
11. Parce que notre approche repose sur des cultures à long terme, nous devons prendre en compte la possibilité de mécanismes **cellulaires de compensation**. Il est à noter que ces phases d'adaptation sont aussi présentes dans les autres stratégies d'extinction de l'expression des gènes (souris knock-out). Il est donc nécessaire de **comparer les effets à court, moyen et long terme**. C'est ce que nous avons entrepris dans les études de cytogénétique (avec L. Sabatier).

En ce qui concerne l'efficacité du *gene silencing*, j'ai pu constater 5 cas :

1. Pour certains gènes, le *silencing* est extrêmement efficace, près de 100% des clones sont éteints, aucun désavantage sélectif. Les populations sont rapidement stables (**dès 30 jours**). Le niveau d'extinction est extrêmement élevé (souvent indétectable en IF). Dans HeLa, c'est le cas des gènes **p53, XPA, hHR23A, LigIII, XPF, XLF (Cernunnos)**. Les cellules peuvent présenter un avantage sélectif pendant les premières semaines qui suivent la sélection (XPA dans HeLa).
2. Le gène est important, la sélection est parfois délicate mais l'extinction est très forte. Les clones maintiennent le phénotype attendu à très long terme: **DNAPKcs, LigIV, ATR, XPC, hHR23B, MRE11, Rad50, NBS1, PARG, PARP1, PARP2, BRCA1 & 2, BLM** ou **KIN17** ... Ce groupe représente l'essentiel des cas.
3. Le gène est essentiel, des clones arrivent à se propager avec un niveau résiduel de la protéine qui permet la survie cellulaire: **XRCC4** (il reste environ 10-20% de la protéine mais aucune activité NHEJ n'est détectée), **CSA** ou **CSB**.
4. L'extinction est très importante pendant plus de 20 jours; de nombreux clones poussent puis la culture ralentit considérablement et devient très difficile en milieu aérobie (*stress oxydatif*). C'est le cas de **FancD2** ou **MSH2**, mais à long terme les clones deviennent stables (extinction >90%). Pour d'autres clones, **le long terme n'est pas une certitude (Rad51 ou MLH1)**.
5. Le gène est vital, il y a mort cellulaire. C'est le cas de **SAF-A, Ku70, Ku80, hTERT**. Il faut un système inductible. Les résultats à moyen terme doit être pris avec précaution.

Dans le cas n°3 on soulève l'un des avantages de l'approche KD par rapport à une approche KO, car on arrive à obtenir des mutants là où une perte totale de l'expression d'un gène (KO) aurait conduit à la mort cellulaire.

La rapidité de clonage et de validation des vecteurs pEBVsiRNA, permet d'obtenir de nombreux clones KD. Il devient maintenant possible d'établir des comparatifs entre KD humains et KO murin. Je suis en train de compiler ces données.

Comparaison modèle « souris KO » versus modèle « clone HeLa KD »

Il est hasardeux de vouloir comparer des lignées « KD » avec le modèle traditionnel des souris « KO ». Cependant, on peut tirer certaines conclusions intéressantes. Dans le tableau ci-dessous, j'ai repris les données de l'article de E. Friedberg concernant les souris KO (Friedberg and Meira, 2006) et j'ai inséré mes propres commentaires sur mes clones.

Dans cette comparaison, il faut être extrêmement prudent car les deux modèles sont très différents. En particulier, il faut rappeler (i) que dans l'approche KD il reste toujours un niveau résiduel de la protéine dont l'importance dépend du gène ciblé, (ii) que l'obtention des clones est parfois délicate et qu'il se produit des mécanismes de compensation, (iii) que la redondance de l'information génétique chez les mammifères peut masquer certains phénotypes et (iv) qu'il s'agit à l'origine d'une lignée tumorale (cellules HeLa)

Dans ce tableau et en ce qui concerne mes clones, lorsque je parle de sensibilité aux génotoxiques je fais référence à mes expériences de survies clonogéniques après UVC (4 J/m²), rayons gamma (1 Gy) et étoposide (1 µM pendant 1h30 dans le milieu de culture).

BER / SSBR

Gene(s) Mutation	Gene product(s)	Repair pathway	Relevant phenotype	Reference
PARP1 KO	Poly(ADP) ribose polymerase	SSBR	Mice are viable, grow normally and are fertile ; about 30% of -/- mice develop skin lesions at 5-6 months; mutant cells grow more slowly than +/- cells; no defects in DNA repair after exposure to UV light or MNNG. After ionizing radiation, mice die rapidly from acute radiation toxicity to small intestine. Following exposure to MNU cells accumulate in G2/M and show rapid apoptotic response; high levels of chromosome instability following exposure of cells to MNU or ionizing radiation.	Wang et al, 1995. de Murcia et al, 1997
PARP1^{KD} (HeLa ; vecteur pBD1011) : très forte extinction dans les clones stables (>90% en IF ou WB) avec une perte totale de fonction (activité de synthèse des polyADP(ribose) nulle). Sensibilité aux rayons gamma.				
PARP2 KO	Poly(ADP) ribose polymerase	SSBR	Mice are viable ; mice are sensitive to exposure to ionizing radiation; high levels of chromosome instability following exposure of cells to alkylating agents.	Menissier de Murcia et al., 2003
PARP2^{KD} (HeLa ; vecteur pBD1002) : forte mortalité à court terme avec une phase d'adaptation longue ; ensuite les clones poussent très bien à long terme. Sensibilité aux rayons gamma faible. Niveau d'extinction >80% en IF et WB.				
PARG KO PARG(110)-	poly(ADP-ribose) glycohydrolase	SSBR	One mouse PARG gene but two PARG isoforms (110 and 60 kDa). Complete suppression of PARG gene causes early embryonic lethality. PARG(110)-deficient mice were viable and fertile, but these mice were hypersensitive to alkylating agents and ionizing radiation.	Cortes et al, 2004 Koh et al, 2004 Cozzi et al, 2006
PARG^{KD} (HeLa ; vecteur pBD813) : forte mortalité à court terme puis très bonne croissance. Sensibilité aux rayons gamma. Perte de fonction.				
Ogg1 KO	8-Oxoguanine-DNA glycosylase	BER	Mice are viable ; they accumulate increased levels of 8-oxoG in DNA but can still remove lesions slowly in proliferating cells in vivo; cell-free extracts defective in removal of 8-oxoG; moderately elevated spontaneous mutation	Klungland et al, 1999.

			rate in non-proliferative tissues; no evidence of spontaneous cancer.	
Ogg1^{KD} (HeLa ; vecteur pBD784) : très bonne croissance, aucune sensibilité aux UVC, rayons gamma et étoposide. Aucun problème de croissance à long terme. Réduction de 80% de l'activité Ogg1 endogène.				
XRCC1 KO	Xrcc1 (X-ray cross-complementing) protein	SSBR, BER	Embryonic development ceases at E6.5 ; embryos grossly abnormal at E7.5; embryos show increased SCE and strand-breaks in egg cylinders.	Tebbs et al, 1999
XRCC1^{KD} (HeLa ; vecteur pBD1065) : stress modéré à court terme, aucun problème pour obtenir des clones. A long terme, la croissance est plus faible que celle des contrôles. Niveau d'extinction >90% en IF et WB. Diminution du taux protéique du partenaire Lig3.				
LigIII				
Ligase III^{KD} (HeLa ; vecteur pBD941) : peu de stress à court terme avec un avantage sélectif à long terme. Clones très faciles à obtenir. Niveau d'extinction >90% en IF et WB. Aucune sensibilité aux UVC, rayons gamma ou à l'étoposide. Diminution du taux protéique du partenaire XRCC1.				

NER

XPA KO	XPA protein; involved in the recognition of base damage during NER	NER	Mice are viable and develop normally; mice are extremely photosensitive in skin and eyes; cells are sensitive to UV light and DMBA; cells are totally defective in NER; skin cancer predisposition after exposure to UV radiation or DMBA.	de Vries et al, 1998 Nakaneet al, 1995
XPA^{KD} (HeLa ; vecteur pBD695) : très forte croissance, avantage sélectif dans HeLa à court terme. Hypersensibilité aux UVC. Clones obtenus très rapidement. Niveau d'extinction >90% en IF et WB, perte de fonction spécifique (NER).				
XPC KO	XPC protein; involved in the recognition of base damage during NER	NER (TCR+)	Mice are viable and grow normally; cells sensitive to UV light but not to 4-NQO; skin and eyes show sensitivity to UV light; skin cancer predisposition after UV light exposure.	Sands et al, 1995 Cheo et al, 1997
XPC^{KD} (HeLa ; vecteur pBD634) : très fort désavantage dans HeLa à court et moyen terme. Changement de forme des cellules (plus fusiformes). Hypersensibilité aux UVC, aux rayons gamma et à l'étoposide. Niveau d'extinction >90% en IF, WB et qPCR. Perte de fonction spécifique (NER).				
Rad23A KO (Δ exons 3-6 and parts of exons 2 and 7)	Homolog of <i>S. cerevisiae</i> Rad23A; complexes with a <u>minority</u> of XPC protein	NER	Mice are viable and develop normally; cells show normal UV sensitivity.	Ng et al, 2002
hHR23A^{KD} (HeLa ; vecteur pBD805) : très bonne croissance, avantage sélectif dans HeLa à court et moyen terme, clones obtenus rapidement. Aucune sensibilité aux UVC, rayons gamma et à l'étoposide. Niveau d'extinction >80% (en WB) et >85% en qPCR.				
Rad23B KO (Δ exon 3)	Homolog of <i>S. cerevisiae</i> Rad23B; complexes with the <u>majority</u> of XPC protein	NER	Mice are viable but are severely runted at birth; pre-natal and early post-natal death observed; impaired testicular development; cells show normal UV sensitivity. Rad23A/B double mutant are lethal before E.13.5; cells are UV sensitive.	van der Horst et al, 2002 Ng et al, 2002
hHR23B^{KD} (HeLa ; vecteur pBD804) : phénotype proche des clones XPC ^{KD} : désavantage dans HeLa à court et moyen terme, stress important. Hypersensibilité aux UVC, aux rayons gamma et à l'étoposide. Niveau d'extinction >80% (en WB) et >85% en qPCR.				
ERCC1 KO	ERCC1 protein required for 5' endonuclease activity during NER	NER Recombination	Mice are viable but are severely runted and die before weaning ; abnormal nuclear morphology and aneuploidy in liver cells; abnormal liver function; increased levels of Trp53 protein in liver, kidney and brain.	Weeda et al, 1997
ERCC1^{KD} (HeLa ; vecteurs pBD984) : croissance très réduite à court et moyen terme. Niveau d'extinction >90% en IF et WB. Diminution du taux protéique du partenaire XPF. Sensibilité aux UVC et aux rayons gamma.				
XPF KO	Subunit of XPF/ERCC1 endonuclease complex	NER Cross-link repair	Severe post-natal growth defect with death ~ 3 weeks after birth ; liver contains abnormal cells with large nuclei; embryonic fibroblasts are hypersensitive to UV radiation and to mitomycin C.	Tian et al, 2004
XPF^{KD} (HeLa ; vecteur pBD1091) : bonne croissance, peu de stress, clones obtenus rapidement. Niveau d'extinction >90% en IF et WB. Diminution du taux protéique du partenaire ERCC1.				
CSA KO	Cockayne syndrome group A gene product	TCR	Mice are viable ; minor growth retardation and neurological defects; mice are photosensitive; cells are UV radiation and DMBA sensitive; normal global NER capacity, but defective transcription-dependent NER; increased predisposition to UVB radiation-induced skin cancer; spontaneous loss of retinal photoreceptors. CSA(-/-) MEFs are not hypersensitive to gamma-ray or paraquat treatment. CSA(-/-) embryonic stem cells show slight gamma-ray sensitivity.	van der Horst et al, 2002 de Waard et al, 2004
CSA^{KD} (HeLa ; vecteur pBD918) : forte mortalité à moyen terme ; croissance réduite des clones. Hypersensibilité aux UVC et aux rayons ionisant. Niveau d'extinction >75% en RT PCR. Ressemble à CSB.				
CSB KO	Cockayne syndrome group B gene product	TCR	Mice are viable ; minor growth retardation and neurological defects; mice are photosensitive; cells are UV radiation and DMBA sensitive; normal global NER capacity, but defective transcription-dependent NER; skin cancer predisposition after UV or DMBA exposure; spontaneous loss of retinal photoreceptors. CSB(-/-) MEFs and keratinocytes are hypersensitive to gamma-ray or paraquat treatment. CSB(-/-) embryonic stem cells show slight gamma-ray sensitivity	van der Horst et al, 1997 de Waard et al, 2004
CSB^{KD} (HeLa ; vecteur pBD921) : forte mortalité à moyen terme ; croissance réduite des clones. Hypersensibilité aux UVC et aux rayons ionisant. Niveau d'extinction >75% en IF et WB. Ressemble à CSA.				

MMR

MSH2	Mismatch repair protein	MMR	Mice are viable and fertile and breed through at least two generations; cells	de Wind et al,
-------------	-------------------------	-----	--	----------------

KO	MSH2 (MutS homolog)		show microsatellite instability (RER+); mice develop lymphoid tumors at 12 months; cells are alkylation-tolerant; cells lose heterology-dependent suppression of recombination; cells have a mutator phenotype.	1995 Reitmair et al, 1995 Lin et al, 2004
----	---------------------	--	---	---

MSH2^{KD} (HeLa ; vecteur pBD1120) : Beaucoup de morts à court et long terme. Très peu de cellules survivantes. Niveau d'extinction >90% en IF et WB.

MLH1 KO	Mismatch repair protein MLH1 (MutL homolog)	MMR	Mice are viable but sterile ; cells show microsatellite instability (RER+); spermatocytes show prematurely separated chromosomes and arrest in first meiosis. MMR-defective in vitro, Mlh1 ^{-/-} and Mlh1 ^{+/-} mice have increased morbidity and develop lymphomas and tumors of the GI tract and other organs.	Prolla et al., 1998 Baker et al, 1996 Edelmann et al, 1996 et 1999
------------	--	-----	---	--

MLH1^{KD} (HeLa ; vecteur pBD1122) : énormément de cellules en croissance à court et long terme ; bonne prolifération puis mort cellulaire vers J80. Niveau d'extinction >90% en IF et WB. Impossible d'établir des clones sur le très long terme.

NHEJ

XRCC4 KO	Xrcc4 protein	NHEJ	Late embryo lethality ; defective lymphogenesis and defective neurogenesis; extensive apoptosis of new post-mitotic neuronal cells	Gao et al, 1998
-------------	---------------	------	---	-----------------

XRCC4^{KD} (HeLa ; vecteur pBD1065) : souffrance cellulaire très importante à court et long terme. Tous les clones présentent un niveau résiduel d'environ 20% (sinon mort cellulaire). Hypersensibilité aux rayons gamma, aux UVC et à l'étoposide. Perte de fonction (réduction de 80% de l'activité NHEJ). Niveau d'extinction >75% (IF). Baisse du niveau protéique du partenaire LigIV.

Ku70 (XRCC6) KO	Ku70 protein	NHEJ V(D)J	Ku70 ^{-/-} mice show growth retardation and a profound defect in the repair of DSB; mice have reduced growth (dwarfed); normal T cell development, but B cell development arrested. MEF are sensitive to ionizing radiation and they display premature senescence associated with an accumulation of non-dividing cells; lack mature B cells or serum immunoglobulin; significant incidence of thymic lymphomas; severely impaired for V(D)J recombination.	Ouyang et al, 1997 Gu et al, 1997
-----------------------	--------------	---------------	---	--------------------------------------

Ku70^{KD} (HeLa ; vecteur pBD699) : souffrance cellulaire très importante ; mort de toutes les cellules vers J10-J12. Niveau d'extinction >90% (IF).

LigIV KO	<i>DNA ligase IV</i>	NHEJ V(D)J	Late embryonic lethal ; no V(D)J recombination; blocked lymphopoiesis; MEF are sensitive to ionizing radiation.	Barnes et al, 1998 Frank et al, 2000
-------------	----------------------	---------------	--	---

LigIV^{KD} (HeLa ; vecteur pBD940) : souffrance cellulaire plus faible que XRCC4 à court et long terme. Hypersensibilité aux rayons gamma et à l'étoposide. Perte de fonction (réduction de 50% de l'activité NHEJ). Niveau d'extinction >85% en IF et WB. Pas de diminution du taux protéique du partenaire XRCC4.

DNA-PKcs (Scid) KO	DNA-PK catalytic subunit	NHEJ V(D)J	No growth retardation ; severely immunodeficient; blocked for V(D)J rejoining, but retain normal signal end-joining; ES cells have normal ionizing radiation sensitivity. T and B cell lymphocyte development arrested; deficient V(D)J coding-end rearrangement, but normal signal-end joining; hyperplasia of intestinal mucosa and production of aberrant crypt foci	Gao et al, 1998 Taccioli et al, 1998 Kurimasa et al, 1999
--------------------------	--------------------------	---------------	--	---

DNA-PKcs^{KD} (HeLa ; vecteur pBD743) : très forte mortalité à court et moyen terme, très peu de clones subsistent. Ensuite, bonne prolifération des cellules KD. Hypersensibilité aux rayons gamma et à l'étoposide. Perte de fonction (réduction de 70% de l'activité NHEJ). Niveau d'extinction >95% (IF).

HR

RAD51 KO	Rad51 protein	HR	Embryonic lethal at early stage of embryogenesis.	Tsuzuki et al, 1996
-------------	---------------	----	--	---------------------

Rad51^{KD} (HeLa ; vecteur pBD864) : très forte extinction (>90% en IF et WB) associée à une mortalité modérée et une croissance réduite pendant plusieurs semaines. Mais les populations ne se maintiennent pas après J60-80 de culture. Sensibilité modérée aux rayons gamma sur les clones présentant un niveau d'extinction modéré (>50%).

RAD52 KO	Mouse homolog of yeast Rad52 protein	HR	Mice are viable ; no abnormalities in fertility, the immune system, or responses to DNA-damaging agents	Rijkers, et al, 1998
-------------	--------------------------------------	----	--	----------------------

Rad52^{KD} (HeLa ; vecteur pBD866) : avantage sélectif dès le court terme avec très peu de morts au début de la sélection. Très bonne croissance ensuite. Aucune sensibilité aux génotoxiques. Niveau d'extinction >80% (IF).

RAD54 KO	Mouse homolog of yeast Rad54 protein	HR	Mice are viable ; ES cells are hypersensitive to ionizing radiation, mitomycin C and MMS, but not to UV radiation; homologous recombination reduced; cells have normal V(D)J recombination.	Essers, et al, 1997
-------------	--------------------------------------	----	--	---------------------

Rad54^{KD} (HeLa ; vecteur pBD864) : très forte mortalité à court terme, difficile d'obtenir des clones ; ensuite croissance normale. Niveau d'extinction >85% en qPCR. Sensibilité modérée aux rayons gamma. Basculé vers la voie du NHEJ.

SIGNALLING

RAD50 KO	Rad50	MRN Signalling	Embryo lethal at ~ E6.0; early embryonic cells hypersensitive to ionizing radiation	Luo et al, 1999
-------------	-------	-------------------	--	-----------------

Rad50^{KD} (HeLa ; vecteur pBD872) : stress important à court terme puis bonne prolifération. Clones faciles à obtenir. Sensibilité aux rayons gamma et aux UVC. Niveau d'extinction >90% en IF et WB. Diminution du taux protéique de ses partenaires (NBS1 et MRE11).

MRE11				
-------	--	--	--	--

MRE11^{KD} (HeLa ; vecteur pBD930) : mortalité très importante à court terme. Difficulté pour établir des clones. Ensuite assez bonne prolifération à long terme. Changement de forme des cellules (plus fusiforme). Niveau d'extinction >85% (IF). Sensibilité aux rayons gamma et aux UVC. Diminution du taux protéique de ses partenaires (NBS1 et Rad50).

NBS1 KO	homolog of human NBS (Nijmegen breakage syndrome) protein	MRN Signalling	Early embryonic lethal	Zhu et al, 2001
------------	---	-------------------	-------------------------------	-----------------

KO (N-terminal)			Mice are viable with growth retardation; mice are hypersensitive to ionizing radiation; mice rapidly develop thymic lymphomas; female mice are sterile,	Kang et al, 2002
-----------------	--	--	---	------------------

exons 2 and 3) KO			but spermatogenesis in males is normal	
NBS1^{KD} (HeLa ; vecteur pBD932) : très forte mortalité à court terme, stress important à moyen terme puis croissance normale à long terme. Niveau d'extinction >85% (IF). Sensibilité aux rayons gamma et aux UVC. Exclusion nucléaire des deux partenaires Rad50 et MRE11.				
BRCA1 KO	Breast cancer protein 1	Signalling	Embryonic lethality at E10-13; neural tube defects in many embryos. Homozygous mutation results in embryonic lethality at E4.5; Brca+/- mice are normal	Gowen et al, 1996 Shen et al, 1998 Liu et al, 1996
BRCA1^{KD} (HeLa ; vecteur pBD1030) : mortalité à court terme plutôt modérée qui augmente avec le temps de culture ; stress important même à long terme avec une croissance réduite. Niveau d'extinction >85% en IF.				
ATM KO	Ataxia telangiectasia gene product Cell cycle checkpoint control	Cell cycle checkpoint control	Mice are viable but growth-retarded and infertile; neurological abnormalities consistent with cerebellar dysfunction; reduction in mature T lymphocytes; mice develop thymic lymphomas at ~ 2-4 months; mice sensitive to X-rays; cells show radio-resistant DNA synthesis.	Barlow et al, 1996 Xu et al, 1996
ATM^{KD} (HeLa ; vecteur pBD935) : forte mortalité à court terme puis croissance correcte. Niveau d'extinction >85% en IF et WB.				
ATR KO	<i>Atr</i> Product of the <i>Atr</i> (ataxia telangiectasia and Rad3-related) gene; protein kinase	Cell cycle checkpoint control	Early embryonic lethal.	Brown et al, 2000
ATR^{KD} (HeLa ; vecteur pBD962) : forte prolifération à court terme puis mortalité très importante à moyen terme. Croissance réduite et stress important par la suite. Niveau d'extinction >85% en IF. Très forte sensibilité aux UVC et faible aux rayons gamma.				
FancD2				
FancD2^{KD} (HeLa ; vecteur pBD962) : stress important en culture, mais population KD stable très longtemps. Niveau d'extinction >90% en IF et WB.				
KIN17				
Kin17^{KD} (HeLa ; vecteur pBD967) : stress important en culture à court et moyen terme, puis après adaptation la croissance est correcte. Niveau d'extinction >85% en IF et WB. Sensibilité modérée aux UVC.				

Dans ce tableau, le « niveaux d'extinction » de l'expression des gènes ciblés sont estimé au regard des marquages en immunofluorescence (IF), en Western blot (WB) ou de l'analyse par qPCR.

Pour les clones que j'ai déjà pu évaluer, si l'on se base sur le comportement des cellules en culture et sur leur réponse aux agents génotoxiques, on constate une bonne corrélation entre les phénotypes des cellules de rongeur « KO » déjà décrits dans la littérature et mes clones « KD ». C'est le cas pour PARP1, PARP2, PARG, Ogg1, XPA, ERCC1, Rad52, XRCC4, LigIV, DNA PKcs, MRE11, Rad50 ou encore NBS1. En particulier, les études de « perte de fonction » indiquent d'excellents résultats pour les clones XPA, XPC, XRCC4, LigIV, DNA-PKcs, PARP1 ou PARG. Les autres clones sont encore en évaluation.

On remarque aussi que l'approche KD, qui maintient dans tous les cas un niveau résiduel des protéines ciblées, permet d'obtenir des clones mutants rapidement pour des gènes dont la perte entraîne chez la souris un phénotype léthal, comme XRCC4, XRCC1, LigIV, Rad50, NBS1, BRCA1 ou ATR. De plus, on obtient des clones mutants pour 4 gènes pour lesquels je n'ai pas trouvé d'équivalent souris « KO » dans la littérature : LigIII, MRE11, KIN17 et FancD2.

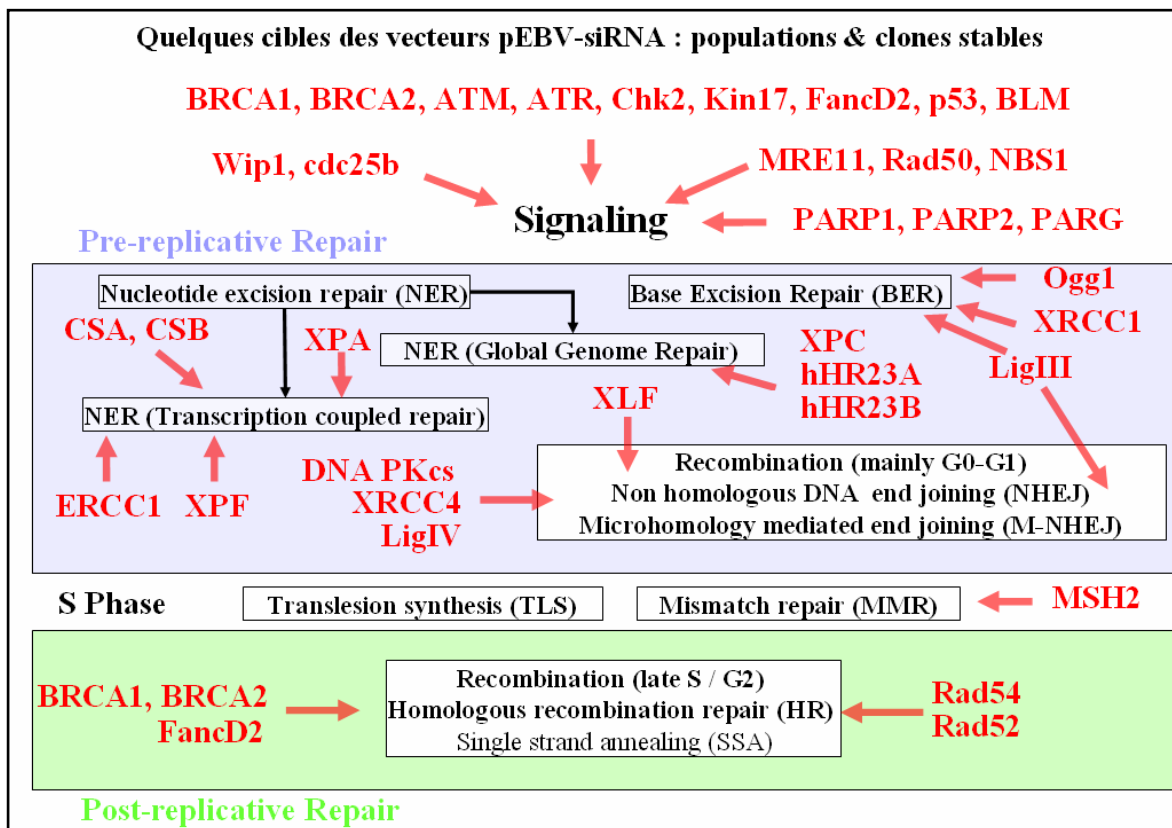
On constate aussi certaines différences, dont la plus frappante est sans doute Ku70. Tandis que les souris KO sont viables, il nous est impossible d'établir des clones humains silencieux pour ce gène. L'hypothèse la plus probable est que la perte de cette protéine entraîne un raccourcissement accéléré de la taille des télomères dans les cellules humaines (*télomères courts*) qui est incompatible avec la survie cellulaire après une dizaine de divisions. A l'opposé, chez la souris, les télomères sont longs et peut être moins dépendant de la présence de Ku70. Une seconde différence concerne la protéine XPC que nous avons argumentée dans un article récent (Despras et al., 2007).

Chapitre V : Conclusions et Perspectives

Mon Projet

J'ai démontré l'efficacité des vecteurs pEBVsiRNA pour l'extinction stable et à très long terme de l'expression de gènes dans différentes lignées cellulaires d'origine tumorale (HeLa, MRC5-V2, MCF7, U2OS, RKO, HCT116, Caco2, HepaRG, Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y). Certains de mes résultats ont été reproduits dans d'autres laboratoires, et souvent avec des types cellulaires différents. Par exemple, O. Becherel (laboratoire de M Lavin ; Australie) a utilisé avec succès mes vecteurs contre les gènes Rad50 et ATR dans un modèle de cellules lymphoblastoïdes provenant de patients (Lymphocytes immortalisés C3ABR), immortalisés par le virus EBV puis transfectées avec les vecteurs pEBVsiRNA. Il a établi des populations stables à 4 semaines.

Actuellement, mon approche est focalisée sur les gènes de la réparation de l'ADN comme le montre la figure ci-dessous (*qui est volontairement non exhaustive*) et sur laquelle on peut voir certains des clones cellulaires stables que j'ai établis dans la lignée cellulaire HeLa.



Nous avons déjà mis en évidence des relations très intéressantes entre le caractère silencieux de certains gènes de réparation de l'ADN (voies NHEJ *versus* HR) et la stabilité chromosomiques et télomérique de mes clones (A. Ayoub et L. Sabatier ; papiers en préparation). Cela confirme les relations étroites entre les mécanismes de la réparation de l'ADN et ceux de la maintenance des télomères. Nous avons aussi mis en évidence des interrelations entre différentes voies de réparation de l'ADN et ce travail doit être étoffé.

En parallèle, j'ai aussi ciblé un grand nombre de gènes participant à d'autres voies métaboliques : métabolisme oxydatif, sénescence, contrôle du cycle cellulaire, récepteurs membranaires, protéines de l'apoptose ... Ce travail s'inscrit dans le cadre de nombreuses collaborations.

A cette étape de mon travail, il semblait intéressant d'établir un **nouveau projet scientifique** qui m'amène à quitter le laboratoire dans lequel je suis depuis 1995 et à rejoindre un nouveau groupe. Dans le cadre de ce projet, mes priorités seront les suivantes : **(1)** Interférence ARN à long terme dans les cellules primaires humaines (en particulier les cellules souches) via les vecteurs pEBVsiRNA, **(2)** Application à la Radiobiologie, **(3)** Approche *in vivo* chez le rongeur et **(4)** Valorisation (relations avec les industriels). D'autres axes de recherche importants doivent encore restés confidentiels. Ainsi, je présente brièvement ci-dessous les 4 premiers axes.

1^{ère} priorité : les cellules primaires humaines

Le modèle HeLa, et de façon plus général, la plupart des types cellulaires immortels que nous avons utilisés, offrent de nombreux avantages pour le biologiste mais ils apportent aussi un biais très important dû à leur origine cancéreuse ou immortalisée. C'est pour s'affranchir de cela que je propose de créer de nouveaux modèles cellulaires. Différents axes sont actuellement développés dont les **kératinocytes primaires (souches ou progéniteurs)** et les **cellules souches embryonnaires humaines**.

Cette nouvelle approche se fera avec **M. Martin** (CEA, Evry, Génopole) pour les kératinocytes primaires (progéniteurs, souches), et **AL Bennaceur** (INSERM, hôpital P. Brousse ; Villejuif) pour les cellules embryonnaires humaines (hES). D'autres modèles seront également en évaluation comme les cellules humaines musculaires lisses avec **MC Vozenin** (IRSN, IGR), ainsi que les cellules endothéliales avec **E Tillet** (CEA Grenoble) et **F Raynaud** (INSERM, Paris).

L'utilisation de ces nouveaux modèles cellulaires est essentielle, d'une part pour corroborer les résultats que j'ai obtenus dans le modèle HeLa (dans le cadre de mes études sur la réparation de l'ADN), et d'autre part pour étudier des pathologies et les traitements associés, les voies de différenciation (cellules souches) ou la radiosensibilité des cellules souches ...

Ainsi, mes nouvelles collaborations dans le domaine des cellules *normales* sont :

Collaboration au CEA : cellules primaires

Martin M (CEA; Evry) : NHEJ (kératinocytes progéniteurs ou souches humains). **Tillet S, Gulino D** (INSERM, CEA Grenoble) : HUVEC.

Collaboration en France : cellules primaires

Bennaceur-Griscelli AL (INSERM, P. Brousse) : Cellules embryonnaires humaines (hES). **Magnaldo T** (CNRS; IGR) : PATCHED (kératinocytes primaires humains). **Raynaud F** (INSERM, Paris) : HUVEC. **Vozenin MC** (IRSN, IGR) : Cellules musculaires lisses humaines

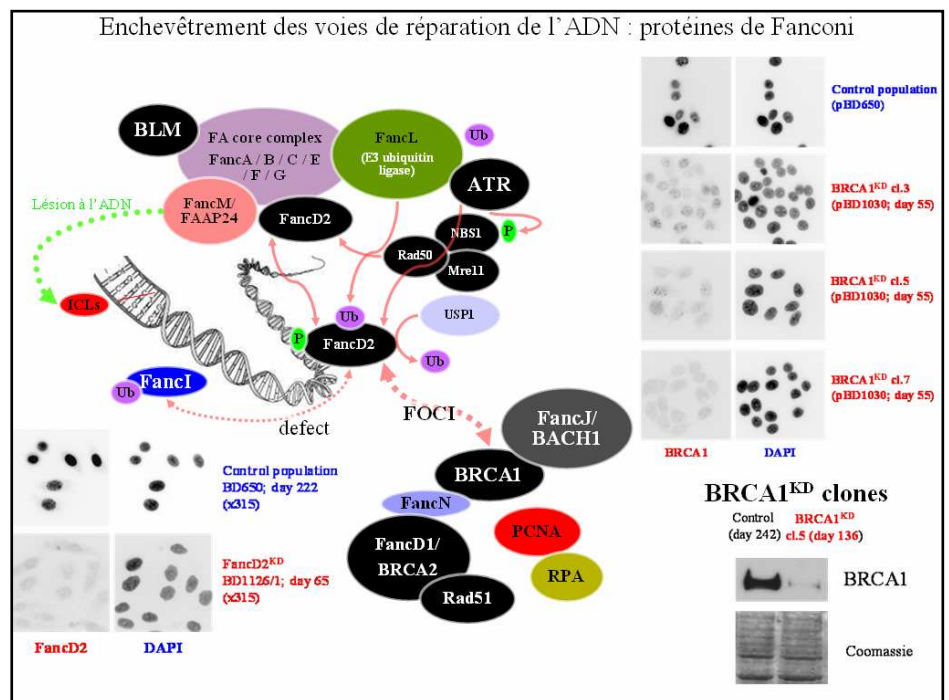
Dans un premier temps, ces approches consisteront pour l'essentiel de mon activité. Il faudra adapter et améliorer les vecteurs actuels, notamment pour obtenir des vecteurs inductibles.

Il faudra aussi améliorer les conditions de pénétration des vecteurs pEBV dans un certain nombre de cellules difficilement transfectables (cellules neuronales ...). Un travail va débiter avec l'institut des Neurosciences de Grenoble pour essayer de greffer ces vecteurs sur différentes molécules afin de s'affranchir des techniques classiques de lipofection ou d'électroporation (collaboration avec **M. de Waard**, INSERM).

2^{ème} priorité : Interférence ARN à long terme et Radiobiologie

Le modèle des cellules HeLa silencieuses que j'ai établi répond à un grand nombre de besoins et il faudra toujours l'améliorer. Ainsi, il est intéressant de poursuivre ce travail en nous focalisant sur un certain nombre de gènes cibles comme :

- le complexe **MRN** (Mre11/Rad50/Nbs1) et son implication dans les voies de la recombinaison (NHEJ *versus* HR) et de la **stabilité chromosomique et télomérique**,
- l'implication de la **Ligase III** en relation avec **PARP1** ou **FANCD2** dans les voies de la réparation



de l'ADN (en ciblant les voies NHEJ *versus* b-NHEJ),

Dans ce cadre là, j'ai déjà construit des cellules *simples* KD et les premières cellules *double* KD qui vont nous aider à répondre à certaines questions sur le rôle de la Ligase III dans la recombinaison NHEJ *versus* b-NHEJ (clones Ligase III / PARP1 ; Ligase III / PARP2...), en parallèle de son rôle dans le BER. De plus, nous suspectons une implication de la Ligase III dans une autre voie impliquant des protéines de Fanconi. Sur le schéma ci-dessus, on peut observer les partenaires que j'ai déjà ciblés (*noirs*) afin de décortiquer cette voie, avec comme régulateur central la protéine FancD2 qui est monoubiquitinisée après une atteinte génotoxique.

Les autres clones (ainsi que ceux à venir) seront valorisés au travers de nombreuses collaborations qui ont débuté depuis plusieurs mois, et dont je rappelle ici les principales. L'ensemble de ces projets convergent vers la réparation de l'ADN.

Collaborations au CEA : cellules immortelles

Sabatier L, Ayouaz A (CEA, Fontenay aux Roses) : instabilité. **Delic J, Bouley J** (CEA, Fontenay aux Roses) : Ku70, BRCA1. **Pennaneach V** (CEA, Fontenay aux Roses) : Ligase I. **Sauvaigo S, Raffin AL** (CEA, Grenoble) : puces à dommages de l'ADN. **Moulliss JM** (CEA, Grenoble) : métabolisme oxydatif. **Gauthier L, Boussin F V** (CEA, Fontenay aux Roses) : ATM, Rad51, HR / NHEJ. **Chevillard S, Lebeau J** (CEA, Fontenay aux Roses) : récepteurs membranaires. **Mann C, Thuret JY** (CEA Saclay) : gènes de la sénescence. **Leteutre F** (CEA Saclay) : phosphatases et cycle cellulaire. **Tavitian B** (CEA Curie-Orsay) : métastase. **Toledano M** (CEA Saclay) : métabolisme oxydatif.

Collaborations hors CEA en France : cellules immortelles

Salles B, Calsou P, Frit F (CNRS, Toulouse) : NHEJ. **Schreiber V, Dantzer F et Amé JC** (CNRS, Strasbourg) famille PARP. **Cordonnier A** (CNRS, Strasbourg) : réparation post-répllicative. **Revy P, de Villartay JP** (INSERM, Paris) : NHEJ. **Sarasin A, Stary A** (CNRS-IGR) : XP. **Canitrot Y, Trouche D** (CNRS, Toulouse) : signalisation des dommages. **Cazaux P, Hoffman JS, Gomez D, Puget N** (CNRS, Toulouse) : polymérase trans-lésionnelles. **Bugler B, Larmina F** (CNRS, Toulouse) : phosphatases et cycle cellulaire. **Favaudon V, Hall J** (Curie-Orsay) : SDR, DSBR, BER, NER. **Fuchs R, Coulon S** (CNRS, Marseille) : NER, MMR. **Turhan A** (INSERM, Villejuif-P. Brousse) : réparation de l'ADN et BCR-ABL.

Collaborations hors CEA en France : approche pharmaceutique ou de diagnostic

Lacasa M (INSERM, Paris) : modèle cellule Caco2. **Ogier-Denis E, Fasseu M** (INSERM, Bichat)

Collaborations à l'étranger :

Becherel O, Lavin M (Brisbane, Australie) : signalisation des dommages (cellules hématopoïétiques). **Masson JY** (Canada) : MRN, Rad51. **Kuhfittig-Kulle S** (Allemagne) : NHEJ. **Dogliotti E** (Italie) : XPC, Ogg1

3^{ème} priorité : Approche *in vivo*

Cette approche se fera en collaboration avec le laboratoire de **B. Tavitian** (CEA SHFJ) ; elle sera axée sur le modèle rongeur (rat de préférence) avec une administration *in vivo* des vecteurs pEBVsiRNA.

Cette approche pose un certain nombre de questionnements :

1. Comment se comportent les vecteurs pEBV dans le modèle rongeur alors qu'ils ont un tropisme pour les cellules de primates et que leur réplication est strictement dépendante des protéines de l'hôte (association EBNA1 / Orc2 endogène) ? La littérature est floue dans ce domaine. Les premiers articles faisaient apparaître que ces vecteurs ne pouvaient pas se répliquer dans les cellules de rongeurs ; cependant ils pourraient maintenir une rétention nucléaire et une activité de transactivation de la transcription via EBNA1 (Krysan and Calos, 1993; Yates et al., 1985). D'autres papiers ont ensuite montré que ces vecteurs se répliquaient dans certaines cellules de rongeurs, mais pas dans les MEF BALB/c3T3 ou les CHO (Mizuguchi et al., 2000). Plus récemment, d'autres auteurs nous informent que ces vecteurs se comportent comme des vecteurs réplicatifs dans des cellules de souris, en particulier des MEF comme les cellules 2TGOR ou NIH3T3 (Einav et al., 2003; Zhang et al., 2003). Dans ces cellules, les vecteurs EBV sont présents en 1 ou 2 copies, alors qu'ils sont présents en 5-10 copies dans des fibroblastes humains transformés par SV40 comme les cellules 46BR.1G1. En absence de la sélection, les vecteurs sont perdus en 7-14 jours, comme ce qui est observé dans les cellules humaines. A l'opposé, les vecteurs basés sur le polyoma virus ne se répliquent pas.
2. Sous quelle forme administrer les vecteurs ? Faut-il les linéariser et les coupler à des aptamères ou les injecter sous forme circulaire ? Faut-il ajouter des lipides cationiques pour les administrer par voies vasculaire ou nasale (He et al., 2006; Zhang et al., 2003) ?
3. Quelle voie choisir pour les administrer ? Peut-on privilégier la voie intra-cranienne parce que les activités nucléasiques y sont très faibles ?

Les techniques utilisées, en plus de ceux de la biologie moléculaire, seront celles de l'imagerie médicale développée depuis de nombreuses années par B. Tavitian. Cette approche s'inscrira dans la perspective de créer des modèles animaux mimant certaines pathologies.

Collaboration au CEA : cellules de rongeur

Tavitian B (CEA; Orsay). **Allemand I, Lepage F** (CEA, Fontenay aux Roses) : cellules souches murines.

4^{ème} priorité : Valorisation (relations avec les industriels)

Ma dernière priorité va être de répondre aux **exigences des industriels** qui souhaitent commercialiser les clones existant et en créer de nouveaux. Le premier contrat a été signé à l'été 2007 avec la société Tébu-Bio et les premiers clones sont commercialisés dès octobre 2007.

J'ai donc effectué la **mise à disposition d'un grand nombre de lignées HeLa knock down que j'ai créées** selon une procédure précise comprenant la décongélation des cellules, la vérification des phénotypes (marquages immunocytochimiques, western blot ou qPCR), la vérification de la qualité des cellules (*mycoplasmes free...*), la préparation des envois et le suivi en culture des lignées.

A l'automne 2007, j'ai procédé au transfert des 28 premiers clones à la société Tébu-Bio :

n°	Gènes ciblés	n° accession	nom générique	Caractérisation
1.	ERCC1	NM_001983	BD984 clone 7	Santa Cruz (D-10) sc-17809
2.	XPF	NM_005236	BD1091 clone 3	Neomarkers (MS1381-P0)
3.	DNA-PKcs	NM_006904	BD743 clone 1	LabVision Neomarker (MS-423-PABX)
4.	KIN17	NM_012311	BD674 clone 2	Santa Cruz (K36): sc-32768 + (K58): sc-32769
5.	LigIII	NM_013975	BD941 clone 3	BD transduction Laboratories (# 611876)
6.	LigIV	NM_002312	BD940 clone 4	Serotec (AHP554)
7.	NBS1	NM_002485	BD932 clone 11	Novus (NB100-143C4)
8.	Rad50	NM_005732	BD872 clone 1	Calbiochem (2C6 552140)
9.	Ogg1	NM_016819	BD784 clone 27	Test fonctionnel
10.	XPA	NM_000380	BD695 clone 6	don (Dr Yue Zou)
11.	XPC	NM_004628	BD634 clone 21	CEA/LGR
12.	XRCC1	NM_006297	BD1065 clone 3	NeoMarkers (MS-434-P)
13.	XRCC4	NM_022550	BD694 clone 9	Abcam (ab145)
14.	PARP1	NM_001618	BD1011 clone 11	don (Dr F Dantzer)
15.	PARP2	NM_005484	BD1002 clone 3	don (Dr F Dantzer)
16.	MRE11	NM_005590	BD930 clone 32	Novus (NB100-142C2)
17.	XLF	NM_B024782	BD1151/ clone 2	Bethyl (A300-730A)
18.	MSH2	NM_000251	BD1120clone 4	Santa Cruz (H-300) sc-22771
19.	FancD2	NM_033084	BD1126 clone 2	Abcam (ab2187)
20.	ATR	NM_001184	BD962 clone 9	Santa Cruz (N-19) sc-1887
21.	BLM	NM_000057	BD1163 clone 1	don (Dr Amor-Gueret)
22.	p53	NM_000546	BD1167 clone 9	Novocastra (DO-7)
23.	Rad54	NM_003579	BD912 clone 5	qPCR.
24.	hHR23A	NM_005053	BD805 clone 6	qPCR
25.	hHR23B	NM_002874	BD804 clone 9	qPCR
26.	BRCA2	(NM_000059)	BD1035 clone 5	qPCR
27.	BRCA1	NM_007295	BD1030 clone 5	don (Dr Chen Junjie)
28.	ATM	NM_000051	BD1177 clone 10	Abcam ab32420

Le site Internet de Tébu-Bio annonce la vente de ces premiers clones (<http://www.tebu-bio.com/file/thematic/92/>).

Maintenant, il faudra continuer ce travail en :

1. **créant de nouvelles lignées HeLa déficientes** susceptibles d'être valoriser d'un point de vue scientifique et d'être ensuite transférées aux industriels.
2. faisant éventuellement des **études de faisabilité** sur d'autres types cellulaires.

De plus, j'ai inscrit ce travail dans le cadre d'une **démarche Qualité** qui respecte une chronologie précise (déjà déterminée) ainsi que les protocoles expérimentaux déjà établis afin de garantir la meilleure prestation.

D'autre part, afin de s'affranchir des algorithmes de design des séquences siRNA que l'on peut trouver sur Internet, j'utilise depuis juin 2007 le programme DSIR et j'apporte mon expérience sur la validation à long terme de l'efficacité des séquences shRNA obtenues avec ce programme.

Collaborations au CEA :

Vandenbrouk Y (CEA, Grenoble) : optimisation du programme de design DSIR

Nouvelles orientations

Mon projet forme un ensemble cohérent, entre **recherche fondamentale et valorisation**. La poursuite de ce travail se fera dans un autre laboratoire et pourra s'accompagner de la création d'une petite équipe constituée de 3 à 4 personnes :

Un **post-doctorant** : Il étudiera la réparation de l'ADN dans les cellules souches embryonnaires humaines. En particulier, il pourra s'intéresser à la Ligase III et à son rôle dans le BER et le b-NHEJ (*back up*) en relation avec d'autres protéines comme PARP1, PARP2, XRCC1, pol béta et les protéines FAN.

Une **technicienne** : un apport technique serait souhaitable tant la demande est importante. Elle pourrait être financée en partie par les retombées de la valorisation. Elle aura en charge d'assurer le **lien avec les industriels** comme décrit précédemment. De plus, elle s'intéressera à nos autres projets.

Et **moi-même**, responsable du projet et expérimentateur. Au moins 60% de mon temps devra être passé à la recherche et à l'expérimentation.

Un **thésard**, éventuellement co-dirigé avec une autre équipe, en particulier dans le domaine des cellules embryonnaires humaines.

Bibliographie

- Aiyar, A., Tyree, C. and Sugden, B. (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple *cis*-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J.*, **17**, 6394-6403.
- Angulo, J.F., Moreau, P.L., Maunoury, R., Laporte, J., Hill, A.M., Bertolotti, R. and Devoret, R. (1989) Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to E. coli RecA protein. *Mutat. Res.*, **217**, 123-134.
- Angulo, J.F., Rouer, E., Mazin, A., Mattei, M.C., Tissier, A., Horellou, P., Benarous, R. and Devoret, R. (1991) Identification and expression of the cDNA of Kin17, a zinc finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5117-5123.
- Anonymous. (2003) Whither RNAi ? *Nat Cell Biol.*, **5**, 489-490.
- Balajee, A.S. and Geard, C.R. (2001) Chromatin-bound PCNA complex formation triggered by DNA damage occurs independent of the ATM gene product in human cells. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1341-1351.
- Biard, D.S. (2007) Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3535-3550.
- Biard, D.S., Cordier, A. and Sarasin, A. (1992a) Establishment of a human cell line for the detection of demethylating agents. *Exp Cell Res.*, **200**, 263-271.
- Biard, D.S., Despras, E., Sarasin, A. and Angulo, J.F. (2005) Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res.*, **3**, 519-529.
- Biard, D.S., James, M.R., Cordier, A. and Sarasin, A. (1992b) Regulation of the Escherichia coli lac operon expressed in human cells. *Biochim Biophys Acta*, **1130**, 68-74.
- Biard, D.S., Kannouche, P., Lannuzel-Drogou, C., Mauffrey, P., Apiou, F. and Angulo, J.F. (1999) Ectopic expression of (Mm)Kin17 protein inhibits cell proliferation of human tumor-derived cells. *Exp Cell Res.*, **250**, 499-509.
- Biard, D.S., Maratrat, M., Thybaud, V., Melcion, C. and Sarasin, A. (1992c) Flow cytometric detection of drugs altering the DNA methylation pattern. *Cancer Res.*, **52**, 5213-5218.
- Biard, D.S., Martin, M., Rhun, Y.L., Duthu, A., Lefaix, J.L., May, E. and May, P. (1994) Concomitant p53 gene mutation and increased radiosensitivity in rat lung embryo epithelial cells during neoplastic development. *Cancer Res.*, **54**, 3361-3364.
- Biard, D.S., Miccoli, L., Despras, E., Frobert, Y., Creminon, C. and Angulo, J.F. (2002) Ionizing radiation triggers chromatin-bound kin17 complex formation in human cells. *J Biol Chem.*, **277**, 19156-19165.
- Biard, D.S., Miccoli, L., Despras, E., Harper, F., Pichard, E., Creminon, C. and Angulo, J.F. (2003) Participation of kin17 protein in replication factories and in other DNA transactions mediated by high molecular weight nuclear complexes. *Mol Cancer Res.*, **1**, 519-531.
- Biard, D.S., Saintigny, Y., Maratrat, M., Paris, F., Martin, M. and Angulo, J.F. (1997a) Enhanced expression of the Kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation. *Radiat Res.*, **147**, 442-450.
- Biard, D.S., Saintigny, Y., Maratrat, M., Vozenin, M.C., Martin, M., Daburon, F. and Angulo, J.F. (1997b) Differential expression of the HsKin17 protein during differentiation of in vitro reconstructed human skin. *Arch Dermatol Res.*, **289**, 448-456.
- Biard, D.S.F. and Angulo, J.F. (2007) Long term RNA interference: Toward a set of isogenic human cells deficient in DNA repair genes. In Landseer, B.R. (ed.), *New research on DNA repair*. Nova Science Publishers, Inc., Vol. Chapter VII, pp. 191-217.
- Blattner, C., Kannouche, P., Litfin, M., Bender, K., Rahmsdorf, H.J., Angulo, J.F. and Herrlich, P. (2000) UV-induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 3616-3625.
- Bras-Goncalves, R.A., Rosty, C., Laurent-Puig, P., Soulie, P., Dutrillaux, B. and Poupon, M.F. (2000) Sensitivity to CPT-11 of xenografted human colorectal cancers as a function of microsatellite instability and p53 status. *Br. J. Cancer.*, **82**, 913-923.
- Brown, C.R., Doxsey, S.J., White, E. and Welch, W.J. (1994) Both viral (adenovirus E1B) and cellular (hsp 70, p53) components interact with centrosomes. *J. Cell Physiol.*, **160**, 47-60.

- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M. and Hoppe-Seyler, F. (2003) siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*, **22**, 5938-5945.
- Calos, M.P. (1996) The potential of extrachromosomal replicating vectors for gene therapy. *Trends Genet*, **12**, 463-466.
- Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. and Morgan, R.A. (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9742-9747.
- Chalk, A.M., Wahlestedt, C. and Sonnhammer, E.L. (2004) Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 264-274.
- Choudhary, S.K. and Li, R. (2002) BRCA1 modulates ionizing radiation-induced nuclear focus formation by the replication protein A p34 subunit. *J. Cell Biochem.*, **86**, 666-674.
- Cogoni, C. and Macino, G. (1997) Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10233-10238.
- Coll, J.M., Hickey, R.J., Cronkey, E.A., Jiang, H.Y., Schnaper, L., Lee, M.Y., Uitto, L., Syvaioja, J.E. and Malkas, L.H. (1997) Mapping specific protein-protein interactions within the core component of the breast cell DNA synthesome. *Oncol Res*, **9**, 629-639.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.
- David-Pfeuty, T., Chakrani, F., Ory, K. and Nouvian-Dooche, Y. (1996) Cell cycle-dependent regulation of nuclear p53 traffic occurs in one subclass of human tumor cells and in untransformed cells. *Cell Growth Differ.*, **7**, 1211-1225.
- Despras, E., Miccoli, L., Creminon, C., Rouillard, D., Angulo, J.F. and Biard, D.S. (2003) Depletion of KIN17, a human DNA replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. *Radiat Res*, **159**, 748-758.
- Despras, E., Pfeiffer, P., Salles, B., Calsou, P., Kulle, S.K., Angulon, J.F. and Biard, D.S.F. (2007) Long-term XPC silencing affects DNA double-strand break repair in HeLa cells. *Cancer Res*, **67**, 2526-2534.
- Dhar, S.K., Yoshida, K., Machida, Y., Khaira, P., Chaudhuri, B., Wohlschlegel, J.A., Leffak, M., Yates, J. and Dutta, A. (2001) Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell*, **106**, 287-296.
- Dougherty, W.G., Lindbo, J.A., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S. and Proebsting, W.M. (1994) RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact*, **7**, 544-552.
- Einav, Y., Shistik, E., Shenfeld, M., Simons, A.H., Melton, D.W. and Canaani, D. (2003) Replication and episomal maintenance of Epstein-Barr virus-based vectors in mouse embryonal fibroblasts enable synthetic lethality screens. *Mol Cancer Ther*, **2**, 1121-1128.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Fedorov, Y., Anderson, E.M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W.S. and Khvorova, A. (2006) Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *Rna*, **12**, 1188-1196.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fish, R.J. and Kruithof, E.K. (2004) Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Mol Biol*, **5**, 9.
- Frappier, L., Goldsmith, K. and Bendell, L. (1994) Stabilization of the EBNA1 protein on the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication by a DNA looping mechanism. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1057-1062.
- Friedberg, E.C. and Meira, L.B. (2006) Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 189-209.
- Frouin, I., Montecucco, A., Biamonti, G., Hubscher, U., Spadari, S. and Maga, G. (2002) Cell cycle-dependent dynamic association of cyclin/Cdk complexes with human DNA replication proteins. *EMBO J.*, **21**, 2485-2495.

- Golub, E.I., Gupta, R.C., Haaf, T., Wold, M.S. and Radding, C.M. (1998) Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5388-5393.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **123**, 631-640.
- Haase, S.B. and Calos, M.P. (1991) Replication control of autonomously replicating human sequences. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5053-5058.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- He, J., Wang, T., Yao, L., Chen, A., Zhou, B., Yu, H., Jia, R., Cheng, C., Huan, L. and Zhang, Z. (2006) Construction and delivery of gene therapy vector containing soluble TNFalpha receptor-IgGFc fusion gene for the treatment of allergic rhinitis. *Cytokine*, **36**, 296-304.
- He, L. and Hannon, G.J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, **5**, 522-531.
- Hozak, P., Hassan, A.B., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell*, **73**, 361-373.
- Hung, S.C., Kang, M.S. and Kieff, E. (2001) Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1865-1870.
- Kang, M.S., Hung, S.C. and Kieff, E. (2001) Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 activates transcription from episomal but not integrated DNA and does not alter lymphocyte growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15233-15238.
- Kannouche, P. and Angulo, J.F. (1999) Overexpression of kin17 protein disrupts nuclear morphology and inhibits the growth of mammalian cells. *J. Cell Sci.*, **112**, 3215-3224.
- Kannouche, P., Mauffrey, P., Pinon-lataillade, G., Mattei, M.G., Sarasin, A., Daya-Grosjean, L. and Angulo, J.F. (2000) Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. *Carcinogenesis*, **21**, 1701-1710.
- Kannouche, P., Pinon-Lataillade, G., Tissier, A., Chevalier-Lagente, O., Sarasin, A., Mezzina, M. and Angulo, J.F. (1998) The nuclear concentration of kin17, a mouse protein which binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation. *Carcinogenesis*, **19**, 781-789.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209-216.
- Kim, D.H. and Rossi, J.J. (2007) Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*, **8**, 173-184.
- Krude, T. (1999) Mimosine Arrests Proliferating Human Cells before Onset of DNA Replication in a Dose-Dependent Manner. *Exp. Cell Res.*, **247**, 148-159.
- Krysan, P.J. and Calos, M.P. (1993) Epstein-Barr virus-based vectors that replicate in rodent cells. *Gene*, **136**, 137-143.
- Laposa, R.R., Feeney, L. and Cleaver, J.E. (2003) Recapitulation of the cellular xeroderma pigmentosum-variant phenotypes using short interfering RNA for DNA polymerase H. *Cancer Res*, **63**, 3909-3912.
- Le Rhun, Y., Duthu, A., Ehrhart, J.C., Michiels, F., May, E. and May, P. (1994) Directional selection associated with clonal expansion of p53 mutant cells during neoplastic development of carcinogen-treated rat embryo lung epithelial cells. *Oncogene*, **9**, 263-271.
- Lupton, S. and Levine, A.J. (1985) Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 2533-2542.
- MacPhail, S.H. and Olive, P.L. (2001) RPA foci are associated with cell death after irradiation. *Radiat. Res.*, **155**, 672-679.
- Malkas, L.H., Hickey, R.J., Li, C., Pedersen, N. and Baril, E.F. (1990) A 21S enzyme complex from HeLa cells that functions in simian virus 40 DNA replication in vitro. *Biochemistry*, **29**, 6362-6374.
- Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M. and Nicolas, J.C. (1999) Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol*, **73**, 4385-4392.
- Masson, C., Mena, F., Pinon-Lataillade, G., Frobert, Y., Radicella, J.P. and Angulo, J.F. (2001) Identification of KIN (KIN17), a human gene encoding a nuclear DNA-binding protein, as a novel component of the TP53-independent response to ionizing radiation. *Radiat Res.*, **156**, 535-544.

- Mazin, A., Milot, E., Devoret, R. and Chartrand, P. (1994a) Kin17, a mouse nuclear protein, binds to bent DNA fragments that are found at illegitimate recombination junctions in mammalian cells. *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 435-438.
- Mazin, A., Timchenko, T., Mènissier-de Murcia, J., Schreiber, V., Angulo, J.F., de Murcia, G. and Devoret, R. (1994b) Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4335-4341.
- Miccoli, L., Biard, D.S., Creminon, C. and Angulo, J.F. (2002) Human kin17 protein directly interacts with the simian virus 40 large T antigen and inhibits DNA replication. *Cancer Res*, **62**, 5425-5435.
- Miccoli, L., Frouin, I., Novac, O., Di Paola, D., Harper, F., Zannis-Hadjopoulos, M., Maga, G., Biard, D.S. and Angulo, J.F. (2005) The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates in vivo with mammalian replication origins. *Mol Cell Biol*, **25**, 3814-3830.
- Mizuguchi, H., Hosono, T. and Hayakawa, T. (2000) Long-term replication of Epstein-Barr virus-derived episomal vectors in the rodent cells. *FEBS Lett*, **472**, 173-178.
- Montecucco, A., Savini, E., Weighardt, F., Rossi, R., Ciarrocchi, G., Villa, A. and Biamonti, G. (1995) The N-terminal domain of human DNA ligase I contains the nuclear localization signal and directs the enzyme to sites of DNA replication. *EMBO J*, **14**, 5379-5386.
- Nambo, A., Sugden, A. and Sugden, B. (2007) The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *Embo J*, **26**, 4252-4262.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
- Novac, O., Alvarez, D., Pearson, C.E., Price, G.B. and Zannis-Hadjopoulos, M. (2002) The human cruciform-binding protein, CBP, is involved in DNA replication and associates in vivo with mammalian replication origins. *J. Biol. Chem.*, **277**, 11174-11183.
- Olson, A., Sheth, N., Lee, J.S., Hannon, G. and Sachidanandam, R. (2006) RNAi Codex: a portal/database for short-hairpin RNA (shRNA) gene-silencing constructs. *Nucleic Acids Res*, **34**, D153-157.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. and Conklin, D.S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, **16**, 948-958.
- Pennarun, G., Granotier, C., Hoffschir, F., Mandine, E., Biard, D., Gauthier, L.R. and Boussin, F.D. (2008) Role of ATM in the telomere response to the G-quadruplex ligand 360A. *Nucleic Acids Res*.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C. and Tuschl, T. (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, **304**, 734-736.
- Reisman, D., Yates, J. and Sugden, B. (1985) A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1822-1832.
- Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R.A. and Knippers, R. (1998) Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24543-24549.
- Romano, G., Claudio, P.P., Tonini, T. and Giordano, A. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derived vectors: safety considerations and controversy over therapeutic applications. *Eur J Dermatol*, **13**, 424-429.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199-208.
- Silva, J.M., Li, M.Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M.C., Rickles, R.J., Siolas, D., Hu, G., Paddison, P.J., Schlabach, M.R., Sheth, N., Bradshaw, J., Burchard, J., Kulkarni, A., Cavet, G., Sachidanandam, R., McCombie, W.R., Cleary, M.A., Elledge, S.J. and Hannon, G.J. (2005) Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet*, **37**, 1281-1288.
- Sobczak-Thepot, J., Harper, F., Florentin, Y., Zindy, F., Brechot, C. and Puvion, E. (1993) Localization of cyclin A at the sites of cellular DNA replication. *Exp. Cell Res.*, **206**, 43-48.
- Stegmeier, F., Hu, G., Rickles, R.J., Hannon, G.J. and Elledge, S.J. (2005) A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13212-13217.
- Timchenko, T., Bailone, A. and Devoret, R. (1996) Btdc, a mouse protein that binds to curved DNA, can substitute in *Escherichia coli* for H-NS, a bacterial nucleoid protein. *EMBO J.*, **15**, 3986-3992.

- Tissier, A., Kannouche, P., Biard, D.S., Timchenko, T., Mazin, A., Araneda, S., Allemand, I., Mauffrey, P., Frelat, G. and Angulo, J.F. (1995) The mouse Kin-17 gene codes for a new protein involved in DNA transactions and is akin to the bacterial RecA protein. *Biochimie*, **77**, 854-860.
- Tissier, A., Kannouche, P., Mauffrey, P., Allemand, I., Frelat, G., Devoret, R. and Angulo, J.F. (1996) Molecular cloning and characterization of the mouse Kin17 gene coding for a Zn-finger protein that preferentially recognizes bent DNA. *Genomics*, **38**, 238-242.
- Treuner, K., Eckerich, C. and Knippers, R. (1998) Chromatin Association of Replication Protein A. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31744-31750.
- Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R. and Saigo, K. (2004) Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res*, **32**, 936-948.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., de Lange, P., Mol, J.N. and Stuitje, A.R. (1990) Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol Biol*, **14**, 457-466.
- Vert, J.P., Foveau, N., Lajaunie, C. and Vandenbrouck, Y. (2006) An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics*, **7**, 520.
- Vozenin, M.C., Lefaix, J.L., Ridi, R., Biard, D., Daburon, F. and Martin, M. (1998) The myofibroblasts markers a SM actin and b actin are differentially expressed in 2 and 3-D culture models of skin fibroblasts. *Cytotechnology*, **26**, 29-38.
- Wanner, R., Henseleit-Walter, U., Wittig, B. and Kolde, G. (2002) Proliferation-dependent induction of apoptosis by the retinoid CD437 in p53-mutated keratinocytes. *J. Mol. Med.*, **80**, 61-67.
- Wu, P.Y., Frit, P., Malivert, L., Revy, P., Biard, D., Salles, B. and Calsou, P. (2007) Interplay between Cernunnos-XLF and Nonhomologous End-joining Proteins at DNA Ends in the Cell. *J Biol Chem*, **282**, 31937-31943.
- Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B. (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, **313**, 812-815.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, **17**, 3011-3016.
- Zannis-Hadjopoulos, M. and Price, G.B. (1999) Eukaryotic DNA replication. *J. Cell. Biochem.*, **32/33**, (suppl.) 1-14.
- Zeng, Y., Cai, X. and Cullen, B.R. (2005) Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs. *Methods Enzymol*, **392**, 371-380.
- Zetterberg, H., Borestrom, C., Nilsson, T. and Rymo, L. (2004) Multiple EBNA1-binding sites within oriPI are required for EBNA1-dependent transactivation of the Epstein-Barr virus C promoter. *Int J Oncol*, **25**, 693-696.
- Zhang, J., Wilson, A., Alber, S., Ma, Z., Tang, Z.L., Satoh, E., Mazda, O., Watkins, S., Huang, L., Pitt, B. and Li, S. (2003) Prolonged gene expression in mouse lung endothelial cells following transfection with Epstein-Barr virus-based episomal plasmid. *Gene Ther*, **10**, 822-826.