



**HAL**  
open science

# Étude de l'influence du polymorphisme de gènes de réparation de l'ADN par excision de nucléotides sur l'activité des agents anticancéreux

François Moisan

► **To cite this version:**

François Moisan. Étude de l'influence du polymorphisme de gènes de réparation de l'ADN par excision de nucléotides sur l'activité des agents anticancéreux. Sciences pharmaceutiques. Université d'Angers, 2009. Français. NNT: . tel-00455178

**HAL Id: tel-00455178**

**<https://theses.hal.science/tel-00455178>**

Submitted on 9 Feb 2010

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

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

# THÈSE

Présentée par

**François MOISAN**

Pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ d'ANGERS**  
École Doctorale Biologie Santé  
Discipline : Pharmacologie expérimentale

**Étude de l'influence du polymorphisme de gènes  
de réparation de l'ADN par excision de nucléotides  
sur l'activité des agents anticancéreux**

**Directeur de thèse : Pr. Jacques ROBERT**

Soutenue publiquement le 23 juin 2009

**Jury :**

**M. Alain MOREL**

Professeur à l'Université d'Angers (Président)

**Mme Sylvie SAUVAIGO**

Directeur de recherche CEA, Grenoble (Rapporteur)

**Mme Florence LARMINAT**

Chargé de recherche CNRS, Toulouse (Rapporteur)

**M. Christophe CULLIN**

Professeur à l'Université de Bordeaux 2 (Examinateur)

**M. Jacques ROBERT**

Professeur à l'Université de Bordeaux 2 (Directeur)

Thèse préparée au sein du laboratoire de Pharmacologie des agents anticancéreux,  
Unité Inserm U916, Institut Bergonié, Bordeaux.

# Remerciements

---

Je tiens avant tout à remercier Mme Sylvie Sauvaigo, Mme Florence Larminat et M. Christophe Cullin d'avoir bien voulu évaluer mon travail de thèse.

Je remercie Jacques Robert de m'avoir accueilli dans son laboratoire durant ces années de recherche, d'avoir cru en moi et de m'avoir transmis un peu de son savoir. Je le remercie également de m'avoir aidé dans mes demandes de financements.

Je remercie Valérie Le Morvan de m'avoir encadré durant mes travaux, depuis le Master 2. Sa gentillesse et sa disponibilité m'auront aidé tout au long de ces années.

Je remercie également M. Alain Morel de m'avoir accepté à l'Ecole Doctorale d'Angers et de m'avoir fait l'honneur d'être mon co-encadrant de thèse.

Je remercie tous les anciens membres et les membres actuels de l'équipe et de l'institut, et en particulier : Jacques Bonnet qui est toujours prêt à partager avec bonne humeur ses connaissances sur l'hélice droite, Audrey, toujours prête à donner un coup de main ou un coup de gueule, Armelle, pour sa douceur dans ce monde de brutes, Ricardo, pour sa gentillesse venue des hauts plateaux, Philippe, pour la jeunesse de son esprit et pour les nombreux débats scientifiques ou non que nous avons eus, Dany, pour sa générosité, Saloua, pour sa bonne humeur, Chantal et ses abeilles pour leur miel, Jean-Pierre, qui a toujours le mot pour rire, Marthe, qui partage aussi facilement sa science qu'un verre entre amis, Vincent, pour ses connaissances en matière de musique et de bières, Céline, pour sa gentillesse, Camille et Laetitia, pour leur pugnacité, Laurence, pour ses conseils avisés, Brigitte, Anne-Marie et Pierre pour leur sympathie, Richard pour son humour so british, François et Francesca, pour leurs sourires fluorescents.

Un grand merci à tous les étudiants du laboratoire pour leur amitié et avec qui ce fut un réel plaisir de travailler : Stéphane, Christophe, Anne-Lise, Alban, Pascal, Marion, Michel, Julie et Juliette. Merci également à tous ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler ou de discuter : Pauline, Audrey, Delphine, Nadège, Nicolas, Jean Pierre.

Je remercie la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) et l'Institut Bergonié et son directeur M. Josy Reiffers pour avoir accepté de financer mes années de thèse.

Un remerciement particulier à mes parents qui m'ont soutenu durant mon cursus universitaire, même lorsque je prenais le chemin des écoliers. Je dois dire qu'ils constituent l'organisation caritative qui m'a demandé le plus petit dossier lorsque j'avais besoin de financer ma première année de thèse, « merci ».

Merci aussi à ma sœur Aurélie, à mon frère Philippe, à Marie-Caroline, à mes amis Dums, Dams, Matt et les autres, pour m'avoir aidé à faire échapper la pression autour d'un verre, d'une côte de bœuf, d'une piscine ou sur une planche de kite. Merci d'ailleurs au kitesurf et tout ce qui va avec pour m'avoir permis de garder un peu de ma funnytude.

Ma femme, Elisa, je voudrais te signifier à quel point ton aide m'a été précieuse, l'intelligence avec laquelle tu gères chaque situation et l'importance que tu tiens dans ma vie. Merci, pour ton soutien sans faille face à l'autisme parfois du chercheur déçu.

# Sommaire

## Introduction

Avant propos	9
Orientations du Laboratoire de Pharmacologie des Agents Anticancéreux	12
Objectif de l'étude	13

## Introduction bibliographique

<b>1. Le mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER)</b>	<b>14</b>
1.1. Les enzymes intervenant dans le NER	14
1.2. La réparation de l'ADN par le mécanisme de NER	17
1.3. Le complexe TFIIH	19
1.3.1. Complexe d'initiation de la transcription	19
1.3.2. Complexe de réparation de l'ADN par excision de nucléotides	20
1.3.3. Complexe de régulation de la promotion de la mitose	20
1.3.4. Complexe de régulation de l'apoptose	21
1.4. Le sous-complexe CDK-activating kinase (CAK)	21
1.5. Les protéines dont l'activité est régulée par TFIIH	22
<b>2. Les maladies impliquant les systèmes de réparation de l'ADN</b>	<b>24</b>
2.1. Rôle cancérogène des altérations de la réparation de l'ADN	24
2.2. Les maladies associées à la déficience de ces protéines	25
2.3. Les agents anticancéreux ciblant les mécanismes de la réparation, de la transcription et du cycle cellulaire.	27
<b>3. Les polymorphismes des gènes du NER</b>	<b>28</b>
<b>4. Présentation du travail expérimental</b>	<b>31</b>

## Matériel et Méthodes

<b>1. Outils et matériels biologiques</b>	<b>32</b>
1.1. Souches bactériennes	32
1.2. Vecteurs de clonage et d'expression	32

---

<b>2. Méthodes de culture bactérienne</b>	<b>34</b>
2.1. Milieux de culture bactérienne	34
2.2. Conditions de culture	34
2.3. Transformation des bactéries par méthode chimique	34
<b>3. Extraction des acides nucléiques</b>	<b>35</b>
3.1. Extraction des ARN totaux	35
3.2. Extraction d'ADN génomiques	35
3.2.1. À partir de lignées cellulaires	35
3.2.2. À partir de coupes en paraffine	35
3.3. Extraction d'ADN plasmidiques	36
3.4. Purification d'acides nucléiques	36
3.4.1. Précipitation des réactions de séquençage	36
3.4.2. Purification de fragments d'ADN sur colonne de silice	36
3.4.3. Purification des acides nucléiques par extraction organique	36
3.4.4. Concentration des acides nucléiques	37
<b>4. Manipulations et analyse de l'ADN</b>	<b>37</b>
4.1. Électrophorèse des ADN sur gel d'agarose	37
4.2. Estimation de la quantité d'ADN	37
4.3. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	38
4.4. Déphosphorylation des extrémités 5' phosphate du vecteur	38
4.5. Séparation et purification de fragments d'intérêt	38
4.6. Ligation	39
4.7. Amplification par PCR « Polymerase Chain Reaction »	40
4.8. Mutagenèse dirigée	42
4.9. Génotypage	42
4.9.1. PCR-RFLP	42
4.9.2. Séquençage	42
4.9.3. Pyroséquençage	43
<b>5. Culture cellulaire</b>	<b>44</b>
5.1. Lignées cellulaires utilisées	44
5.2. Principes généraux de culture	44
5.2.1. Conditions de culture	44
5.2.2. Milieu de congélation	45
5.2.3. Dissociation des cellules à la trypsine-EDTA	45

---

5.2.4. Comptage des cellules	45
5.3. Courbes de croissance	45
5.4. Les médicaments anticancéreux utilisés	46
<b>6. Les tests de cytotoxicité</b>	<b>46</b>
6.1. Test d'inhibition de croissance	46
6.1.1. Principe	46
6.1.2. Détermination de la concentration optimale d'ensemencement.	47
6.1.3. Mesure de l'inhibition de croissance	47
6.2. Mesure de l'efficacité de clonage	47
6.3. Test de survie aux irradiations	48
<b>7. Transfection cellulaire</b>	<b>48</b>
7.1. Transfection de vecteurs plasmidiques	48
7.1.1. Technique de transfection	48
7.1.2. Mise en évidence du taux de transfection	49
7.1.3. Obtention de transfectants stables	49
7.2. Transfection d'ARN interférents	50
7.2.1. Les siRNA XPD	50
7.2.2. Les agents de transfection	50
<b>8. Cytométrie en flux</b>	<b>51</b>
8.1. Analyse du cycle cellulaire	51
8.2. Analyse de la fluorescence	51
8.3. Tri cellulaire et clonage	52
<b>9. Préparation et analyse des protéines</b>	<b>52</b>
9.1. Protocole d'extraction pour le western-blot	52
9.2. Dosage des protéines	52
9.3. Migration sur gel et transfert	53
9.4. Immunodétection	54
9.5. Mesure de l'activité kinase du CDK1	55
<b>10. Analyse des ARN</b>	<b>55</b>
10.1. Extraction des ARN	55
10.2. Rétrotranscription des ARN	55
10.3. PCR quantitative	56

10.4. Étude de la stabilité des ARN messagers	56
<b>11. Études sur les collections cellulaires tumorales</b>	<b>57</b>
11.1. Études <i>in silico</i>	57
11.1.1. La collection du NCI-60 et la base de données correspondante	57
11.1.2. La collection du JFCR-45 et les données correspondantes	57
11.1.3. La collection de la société Oncotest	57
11.1.4. Analyses statistiques sur les données expérimentales	57
11.2. Étude clinique rétrospective	58

## Résultats et discussion

<b>1. Étude de l'association des polymorphismes de gènes du NER avec la réponse cellulaire aux agents anticancéreux dans le panel du NCI-60</b>	<b>60</b>
1.1. Choix du modèle : le panel du NCI-60	60
1.2. Génotypage des SNPs sélectionnés	60
1.3. Validation sur un autre modèle cellulaire <i>in vitro</i>	65
1.4. Analyse de l'expression des gènes <i>ERCC2</i> et <i>ERCC5</i>	66
1.4.1. Expression des gènes <i>ERCC2</i> et <i>ERCC5</i> dans le panel du NCI-60	66
1.4.2. Validation dans une population de tumeurs humaines xénotransplantées chez la souris	68
1.5. Discussion de la première partie	69
<b>2. Étude de l'effet des polymorphismes <i>ERCC2</i> lys751gln et <i>ERCC5</i> asp1104his sur la réponse cellulaire aux agents cytotoxiques : construction de clones cellulaires isogéniques stables</b>	<b>71</b>
2.1. Construction des vecteurs d'expression	74
2.1.1. Obtention des différents vecteurs	74
2.1.2. Analyse moléculaire de vecteurs construits	76
2.2. Établissement de clones isogéniques stables complémentés XPD et XPG	78
2.2.1. Transfection des différentes lignées	78
2.2.2. Établissement de clones cellulaires	79
2.3. Caractérisation moléculaire des clones cellulaires	80
2.3.1. Vérification de l'intégration du transgène par PCR sur ADN génomique	80
2.3.2. Comparaison de l'expression du transgène par RT-PCR en temps réel	81

2.3.3. Comparaison de l'expression de la protéine transduite par Western blot	81
2.3.4. Vérification de la localisation par microscopie confocale	82
2.3.5. Tests fonctionnels	83
<b>2.4. Étude de l'effet des polymorphismes XPD lys751gln et XPG asp1104his sur la réponse cellulaire aux agents cytotoxiques</b>	<b>85</b>
2.4.1. Test de cytotoxicité par mesure de l'inhibition de croissance (MTT) des clones XPG	85
2.4.2. Test de cytotoxicité par mesure de l'inhibition de croissance (MTT) des clones XPD	88
<b>2.5. Étude des messagers commun et variant du gène <i>ERCC2</i> (XPD)</b>	<b>90</b>
2.5.1. Étude de la structure secondaire de l'ARNm de <i>ERCC2</i>	90
2.5.2. Étude de la stabilité des ARNm de <i>ERCC2</i>	92
<b>2.6. Étude du rôle cellulaire de la variation du niveau de la protéine XPD</b>	<b>93</b>
2.6.1. Choix de la méthode d'extinction - Mise au point de l'extinction	93
2.6.2. Cinétique d'extinction de la protéine	94
2.6.3. Étude du cycle cellulaire en fonction de l'extinction de XPD	94
2.6.4. Étude de l'activité de CDK1 ( <i>cdc2</i> ) en fonction de l'extinction de XPD	94
2.6.5. Tests d'inhibition de croissance (MTT) des lignées MCF7et XP6BE	96
<b>3. Étude clinique rétrospective du rôle des polymorphismes XPD lys751gln et XPG asp1104his sur la réponse pathologique au docetaxel</b>	<b>100</b>
3.1. Choix de l'étude	100
3.2. Description de l'étude clinique	100
3.3. Étude statistique	100
<b>Conclusion</b>	<b>104</b>
<b>Références</b>	<b>107</b>
<b>Publications et communications</b>	<b>116</b>
Publications dans des journaux à comité de lecture	116
Communications à des congrès scientifiques	116



# Liste des figures et tableaux

## Introduction bibliographique

Tableau 1. Les différents facteurs protéiques intervenant dans le GG et le TC-NER	16
Figure 1. La réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER)	18
Figure 2. Le complexe TFIIH	19
Figure 3. Équilibre de la disponibilité du sous complexe CAK	23
Tableau 2. A. Tableau de complémentation B. Groupes de complémentation	25
Figure 4. Représentation schématique des gènes associés aux maladies liées au NER	27
Figure 5. Impact possible des polymorphismes (SNPs) des gènes du NER	29

## Matériel et Méthodes

Figure 6. Carte des plasmides	33
Tableau 3. Liste des oligonucléotides	41
Figure 7. Principe du pyroséquençage	43
Tableau 4. Liste des médicaments anticancéreux utilisés	46
Tableau 5. Protocole adapté de transfection des siRNA	51
Figure 8. Transfert des protéines du gel vers la membrane	54
Tableau 6. Liste des anticorps utilisés	54

## Résultats et discussion

Tableau 7. Distribution des lignées du NCI selon les polymorphismes étudiés	61
Figure 9. Exemples de profils électrophorétiques de restriction (RFLP)	61
Figure 10. Représentation schématique des IC <sub>50</sub> du paclitaxel	63
Figure 11. Représentation schématique des IC <sub>50</sub> selon le SNP de <i>ERCC2</i> et <i>ERCC5</i>	64
Figure 12. Représentation schématique des IC <sub>50</sub> du docetaxel	66
Figure 13. Représentation schématique des niveaux d'expression de la protéine XPD	67
Figure 14. Représentation schématique des niveaux d'expression de <i>ERCC2</i> et <i>ERCC5</i>	67
Figure 15. Relation entre l'expression des gènes et la chimio-sensibilité	68
Figure 16. Expression des gènes <i>ERCC2</i> et <i>ERCC5</i> dans les tumeurs transplantées	69
Figure 17. Schéma montrant le rôle régulateur du complexe CAK	72
Figure 18. Coloration au X-gal des colonies bactériennes transformées	75
Tableau 8. Carte de restriction des plasmides pTRACER	76
Figure 19. Représentation schématique de pTRACER- <i>ERCC2</i>	76

Figure 20. Génotypage par PCR-RFLP des ADNc des deux allèles de ERCC2 clonés	77
Figure 21. Vérification par séquençage du sous-clonage	77
Figure 22. Photo des cellules 94RD27 coloré au X-gal	78
Figure 23. La gamme de concentrations de blasticidine testées	79
Figure 24. Quantification relative de l'expression des gènes plasmidiques	81
Figure 25. Western-blot anti-XPG.	81
Figure 26. Microscopie confocale des fibroblastes 94RD27 transfectés	82
Figure 27. Microscopie confocale du clone 17GW1	83
Figure 28. Courbe d'inhibition de croissance par les U.V. des clones XPD	84
Figure 29. Courbe d'inhibition de croissance par les UV des clones XPG	85
Figure 30. Courbe d'inhibition de croissance par les UV de 4 clones XPG	85
Figure 31. Courbe d'inhibition de croissance par le paclitaxel	87
Figure 32. Courbe d'inhibition de croissance par la trabectédine des clones XPG	88
Figure 33. Courbe d'inhibition de croissance du cisplatine	88
Figure 34. Courbe d'inhibition de croissance par le paclitaxel des clones XPD	89
Figure 35. Structure secondaire théorique des ARN messagers du gène <i>ERCC2</i>	91
Figure 36. Effet des polymorphismes des codons 156, 312 et 751	92
Figure 37. Quantification par qRT-PCR en temps réel de la dégradation de l'ARNm de XPD	93
Figure 38. Western blot montrant une cinétique d'extinction de la protéine	95
Figure 39. Pourcentage de cellules MCF7 dans les différentes phases du cycle cellulaire	95
Figure 40. Activité CDK1 dans la lignée MCF7	96
Figure 41. Activité CDK1 dans la lignée XP6BE	97
Figure 42. Extinction de la protéine XPD par transfection à haut débit de siRNA-	98
Figure 43. Courbe d'inhibition de croissance du cisplatine sur la lignée MCF7	98
Figure 44. Courbe d'inhibition de croissance du cisplatine sur la lignée XP6BE	99
Figure 45. Courbe d'inhibition de croissance du paclitaxel sur la lignée MCF7	100
Figure 46. Courbe d'inhibition de croissance du paclitaxel sur la lignée XP6BE	100
Tableau 9. Distribution des patientes de l'étude EORTC 10994	103

# Abréviations

---

ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ARNr : ARN ribosomique  
ARN Pol II : ARN polymérase de classe II  
ATP : adénosine triphosphate  
BER : réparation par excision de bases  
BRCA1 : BReast Cancer 1  
CAK : kinase activant les cdk  
CDK: kinase dépendante des cyclines  
CS : syndrome de Cockayne  
CSA/B : Cockayne Syndrom A/B protein  
CTD : domaine carboxy-terminal de la grande sous-unité de l'ARN Pol II  
DDB1/2 : DNA Damage Binding protein 1/2  
DMSO : DiMéthylSulfOxyde  
DTT : DiThio-1,4-Threitol  
EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid  
ERCC1 : Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 1  
GFP: protéine fluorescente verte (green fluorescent protein)  
GGR ou GG-NER : réparation globale du génome  
hHR23B : Human Homolog Rad23 B  
HR : Recombinaison Homologue  
IP : Immunoprécipitation  
kDa : kiloDalton  
MAT1 : « ménage à trois 1 »  
NER : réparation par excision de nucléotides  
NHEJ : Non Homologous End Joining  
ORF : cadre ouvert de lecture  
pb : paires de bases  
PBS : Phosphate-Buffered Saline  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
RPA : protéine de la réplication A  
RT : rétrotranscription ou Real Time  
siRNA : small interfering RNA  
SNP : Polymorphisme nucléotidique simple  
SVF : Sérum de Veau Foetal  
TCR ou TC-NER : réparation couplée à la transcription  
TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine  
TFIIH : facteur de transcription de classe II, H  
TTD : trichothiodystrophie  
UV : ultra-violet  
XP : Xeroderma pigmentosum

---

# Introduction

---

## Avant propos

Les progrès médicaux en cancérologie ont été très nombreux ces cinquante dernières années dans les domaines de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie. Ils ont été permis grâce à une meilleure compréhension du développement des cancers. La découverte des oncogènes en 1975 a été l'événement initiateur des travaux fondamentaux qui ont ouvert la dimension génomique de la maladie. Même si la chirurgie reste aujourd'hui la principale thérapie à visée curative, 50 % des patients atteints de cancer recevront une chimiothérapie, et 70 % une radiothérapie (Martin et al., 2001). Parmi les nombreux défis que doit relever la thérapie des cancers, on peut définir deux axes : identifier des agents anticancéreux moins toxiques que les irradiations et les médicaments utilisés aujourd'hui, et augmenter l'efficacité des thérapies en sélectionnant les patients les plus susceptibles d'y répondre. La compréhension des mécanismes de réparation des lésions de l'ADN induites par ces thérapies ainsi que l'identification de facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique sont des voies qui permettront d'avancer vers ces objectifs.

Il existe une demande croissante de la part des cliniciens de méthodes objectives permettant de prédire la réponse des cancers au traitement afin d'améliorer la prise en charge des patients en termes de réponse objective et d'effets secondaires. En effet, aujourd'hui, les chimiothérapies en cancérologie sont basées sur des critères anatomopathologiques pour ce qui est du choix du médicament, et sur le calcul de la surface corporelle pour ce qui est du choix de la dose à délivrer. D'autres critères objectifs permettraient de compléter les méthodes « classiques ». L'individualisation des traitements est un objectif qui n'est pas encore atteint en cancérologie. L'activité des agents anticancéreux est conditionnée, au moins en partie, par l'activité de protéines impliquées dans leur transport, leur métabolisme, ou dans la réparation des lésions qu'ils provoquent au niveau de l'ADN. Les tumeurs présentent des anomalies génétiques qui vont conditionner l'activité des médicaments. Il est connu depuis longtemps que la présence de récepteurs hormonaux fonctionnels dans les tumeurs mammaires conditionne l'activité des composés antihormonaux comme le tamoxifène (Agrawal et al., 2005). Plus récemment, il a été montré, par exemple, que les mutations du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) conditionnaient la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'erlotinib (Agrawal et al., 2005) ou que les mutations du gène KRAS conditionnaient la réponse aux anticorps anti-EGFR (Garcia et al., 2008).

Alors que le génome tumoral est profondément altéré à de multiples niveaux, le génome constitutionnel est étonnamment stable et similaire d'une personne à l'autre. Si l'on compare les chromosomes de deux êtres humains, on constate que leur séquence d'ADN peut être identique sur des centaines de nucléotides. Mais on estime qu'un nucléotide sur 300, en moyenne, diffère d'une personne à l'autre. L'ensemble des allèles du génome d'une personne constitue son génotype.

Les différences d'un seul nucléotide sont, de loin, le type de variation génétique le plus fréquent. Elles sont connues sous le nom de polymorphismes nucléotidiques simples, ou SNP. On considère comme SNP une variation allélique concernant un seul nucléotide et retrouvée à l'état hétérozygote dans au moins 1 % de la population. En identifiant progressivement les quelque 10 millions de SNP que l'on estime exister dans le génome humain, le projet international HapMap est en voie de cartographier une grande partie de la diversité génétique de l'espèce humaine ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Ces variations interindividuelles qui représentent seulement 0,3% de notre génome sont responsables de notre génotype, elles sont suffisantes à expliquer, lorsqu'elles concernent des gènes, l'ensemble des différences physiques ou non (phénotype) qui existe entre les individus de notre espèce.

Des maladies comme le cancer, les accidents cérébro-vasculaires, les maladies du cœur, le diabète, la dépression et l'asthme résultent souvent de l'effet combiné de variations génétiques et de facteurs environnementaux (Hirschhorn et al., 2002). Selon une hypothèse qui associe une maladie courante à une variation génétique courante, le risque de contracter une de ces maladies est associé à des variations génétiques qui sont relativement fréquentes dans les populations (Cargill et Daley, 2000 ; Mayeux, 2005).

De la même manière, la réponse à un traitement dépend de la pharmacodynamie et de la pharmacocinétique du médicament, et ces deux paramètres sont eux-mêmes conditionnés par des facteurs environnementaux et par l'expression ou l'activité intrinsèque de protéines, qui dépendent de polymorphismes génétiques. Récemment, de nombreux polymorphismes ont été reconnus comme pouvant jouer un rôle au niveau de l'activité d'agents anticancéreux (Relling et al., 2001 ; Ulrich et al., 2003). On peut citer le polymorphisme du promoteur de la thymidylate synthase, enzyme-cible de la forme active du 5-fluorouracile (Pullarkart et al., 2001) ou celui de la glutathion S-transférase P1, qui détoxique entre autres les sels de platine (Stoehlmacher et al., 2002). L'activité du 5-fluorouracile ou celle de l'oxaliplatine peut être différente d'un patient à l'autre en fonction de ces polymorphismes : dans le premier cas, le polymorphisme conduit à une diminution d'expression de la thymidylate synthase et à une meilleure efficacité du 5-fluorouracile ; dans le second cas, le polymorphisme conduit à une diminution de l'activité intrinsèque de la glutathion S-transférase P1 et à une meilleure efficacité de l'oxaliplatine.

En pharmacogénétique, deux approches sont utilisées pour l'identification de polymorphismes associés à la réponse aux thérapies (Huang et al., 2008). Ces deux approches, appelées « génome entier » ou « gène candidat » diffèrent par leur façon d'aborder la question.

- Dans l'approche « génome entier », l'objectif est de découvrir, sans *a priori* et sur l'ensemble du génome, des polymorphismes génétiques associés au phénotype étudié. Leur position (région codante ou non) ou la fonction du gène concerné par le polymorphisme ne sont pas pris en considération. Il est nécessaire pour cela d'avoir accès à une quantité importante de SNPs génotypés dans la population étudiée (base de données HapMap par exemple). Une fois une association établie, la fonction du ou des gènes concernés par des polymorphismes d'intérêt et la fonction des protéines pour lesquelles codent ces gènes sont recherchés. On ne sait donc pas au départ quels sont les gènes qui peuvent jouer

un rôle dans la réponse au médicament, mais en utilisant cette approche systématique, on met en évidence tous ceux pour lesquels il peut exister un lien pharmacogénétique. Ainsi il est possible d'identifier des polymorphismes de gènes n'ayant pas de relation connue avec la réponse à un traitement, mais qui se trouvent tout de même associés à la réponse à un médicament.

- Dans l'approche « gène candidat », on s'intéresse aux polymorphismes de gènes codant pour des protéines connues pour avoir un effet sur l'action, le transport ou le métabolisme du médicament. On sélectionne, en particulier, ceux qui se trouvent dans les séquences exoniques et qui peuvent entraîner une variation de l'acide aminé de la protéine traduite et dans les séquences promotrices qui peuvent faire varier le niveau de transcription des ARN messagers ; on peut sélectionner également les séquences introniques qui sont impliquées dans l'épissage des ARN pré-messagers. On s'intéresse donc aux polymorphismes génétiques qui, d'un point de vue biologique, en jouant sur la structure, l'expression ou l'activité des protéines, peuvent être impliqués dans la réponse à un médicament. On peut dans cette approche partir du gène et rechercher les agents dont l'activité ou la toxicité peut être corrélée avec un polymorphisme de ce gène.

Pour chacune de ces approches, qu'elles soient destinées à une étude clinique ou à une étude expérimentale, il est nécessaire d'avoir accès à l'ADN génomique afin de déterminer le statut des polymorphismes choisis dans les échantillons inclus dans l'étude. Il est ensuite nécessaire d'évaluer les paramètres de la réponse et de la toxicité aux médicaments dans cet échantillonnage. Les paramètres de réponse sont, par exemple, pour les études expérimentales : l'inhibition de la croissance cellulaire, la mort cellulaire ou la survie clonogénique, et pour les études cliniques : la réponse clinique ou anatomopathologique, la survie sans progression tumorale, ou la survie globale.

Un travail important est mené dans ce domaine par l'équipe du Dr M.E. Dolan de l'Université de Chicago (É.-U.), qui utilise l'approche « génome entier ». Elle s'intéresse en particulier au rôle des SNPs dans la variation interindividuelle des effets agents anticancéreux. Pour cela, cette équipe a mis en place un modèle cellulaire, qui consiste en un panel de lignées lymphoblastoïdes issues de familles d'origines caucasienne et africaine. La base de données de plus de 3 millions de SNPs les concernant est mise à disposition par le projet international HapMap. Ainsi, après avoir réalisé des tests de cytotoxicité sur ces lignées, le travail de cette équipe consiste à découvrir les polymorphismes qui sont associés à la variation de la réponse cellulaire au traitement.

L'approche « gène candidat » suivie par plusieurs laboratoires, comme celui dans lequel je travaille, est complémentaire de l'approche « génome entier ». Partant de gènes susceptibles d'être impliqués dans l'activité d'agents anticancéreux, le laboratoire a en particulier étudié leurs polymorphismes dans des populations de patients traités et également dans des collections de lignées tumorales.

## Orientations du Laboratoire de Pharmacologie des Agents Anticancéreux

Ces deux approches pharmacogénétiques (« génome entier » et « gène candidat ») comportent des avantages et des inconvénients, mais d'une manière générale, il existe peu de modèles expérimentaux pour étudier les polymorphismes génétiques en dehors de l'approche clinique. De tels modèles seraient pourtant utiles afin de distinguer le rôle d'un polymorphisme dans l'efficacité des agents anticancéreux, de son rôle dans le pronostic global de la maladie. Depuis 2004, le laboratoire s'intéresse au modèle constitué par le panel de 60 lignées tumorales humaines du *National Cancer Institute* (NCI) afin de disposer d'un outil préalable aux études cliniques. Ce modèle est constitué de 60 lignées tumorales humaines cultivées *in vitro*, provenant de cancers de diverses localisations, et avait été mis en place originalement pour tester un grand nombre de composés chimiques d'origine naturelle ou synthétique (Monks et al., 1991), avec l'hypothèse que des molécules actives *in vitro* pourraient devenir des médicaments actifs en clinique. Ce panel constitue un outil de recherche très précieux pour au moins trois raisons : (1) des milliers de molécules ont été testées sur l'ensemble du panel et représentent une masse de données permettant de comparer des nouvelles molécules aux anciennes et d'inférer ainsi leur mécanisme d'action potentiel ; (2) plusieurs études évaluant le niveau d'expression des gènes dans les 60 lignées du panel ont été réalisées, tout particulièrement grâce à des microarrays Affymetrix, permettant de rechercher des liens entre chimio-sensibilité *in vitro* et expression des gènes cellulaires (Ulrich et al., 2001 ; Scherf et al., 2000) ; (3) l'ensemble des données, tant pharmacologiques que moléculaires, sont disponibles librement sur le site du NCI (<http://dtp.nci.nih.gov>), ce qui en fait un outil commun à l'ensemble des chercheurs intéressés par les mécanismes moléculaires de chimio-sensibilité et de chimiorésistance. Un très grand nombre de marqueurs moléculaires potentiels de l'activité d'agents anticancéreux sont maintenant disponibles ; l'équipe dans laquelle je travaille a déjà puisé dans cette base de données pour identifier des déterminants moléculaires de l'activité cytotoxique de l'oxaliplatine et du cisplatine (Vekris et al., 2004) En revanche, peu de travaux ont été réalisés en ce qui concerne les polymorphismes génétiques des 60 lignées du NCI et leurs liens éventuels avec la cytotoxicité d'agents anticancéreux. L'approche choisie à l'aide du modèle du NCI-60 est celle du « gène candidat ». Le potentiel du NCI-60 dans cette approche est aujourd'hui reconnue (Yarosh et al., 2005 ; Le Morvan et al., 2006 ; Moisan et al., 2006 ; Nief et al. 2007 ; Puyo et al 2008)

La limitation de ce modèle peut provenir du fait que de nombreux événements génétiques ont eu lieu entre le génome constitutionnel de l'individu et le génotype de la tumeur survenant chez cet individu, en particulier des pertes d'hétérozygotie. Toutefois, il a été montré que des gènes codant pour des protéines très conservées comme l'ADN topoisomérase I pouvaient se retrouver « protégés » de toutes mutations dans des lignées tumorales (Moisan et al., 2006). Le panel des lignées oriente vers des pistes permettant d'établir des liens entre l'activité cytotoxique d'une molécule et des variations génétiques fréquentes. À partir des relations ainsi établies à l'aide du modèle, il est possible de concevoir des études cliniques, rétrospectives puis prospectives, permettant de préciser, sur des pathologies définies, l'impact clinique de



ces variations et leur éventuelle utilité pour prédire la réponse aux agents thérapeutiques. Nous avons donc utilisé le panel des 60 lignées du NCI pour rechercher celles présentant des SNPs au niveau de gènes de réparation de l'ADN afin d'identifier s'il existe des associations de ces SNPs avec l'efficacité d'agents anticancéreux.

Le cas des enzymes de réparation de l'ADN est complexe, d'abord parce qu'il existe, pour chaque voie de réparation, un grand nombre de protéines intervenant successivement ou simultanément pour reconnaître et réparer la lésion ; ensuite, parce que les variations d'activité ou d'expression de ces protéines, liées ou non à des polymorphismes génétiques, auront un effet à la fois sur le risque cancérigène et sur l'activité de médicaments anticancéreux. En effet, la cible que constitue l'ADN est susceptible d'être endommagée par des agents cancérigènes et par des médicaments anticancéreux : un défaut de réparation aura pour conséquence, dans le premier cas une augmentation du risque de cancer, et dans le second cas une augmentation de l'efficacité de l'agent thérapeutique. Il est a priori difficile de discerner le rôle fonctionnel des polymorphismes identifiés au niveau des protéines de réparation de l'ADN. En outre, il existe, à côté des polymorphismes proprement dits, des mutations rares correspondant à des syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers, accompagnés de pathologies variées, en particulier dermatologiques comme le Xeroderma Pigmentosum (XP) (Stary et al., 2002) associé à des phénotypes multiples nommés XP-A, B, C, D, E, F, G qui ont été ensuite reliés à des mutations de gènes codant pour des protéines intervenant dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER).

## **Objectif de l'étude**

Dans cette étude qui fait l'objet de ma thèse de doctorat, nous nous sommes proposé d'étudier l'influence de polymorphismes de gènes de réparation de l'ADN par excision de nucléotides sur l'activité des agents anticancéreux. Les objectifs de ce travail de thèse ont été : (1) de rechercher les associations entre polymorphismes de gènes du NER et sensibilité aux agents anticancéreux dans le modèle cellulaire du NCI ; (2) d'étudier le rôle potentiel des protéines du NER dans la sensibilité cellulaire à certains agents anticancéreux identifiés à l'étape précédente ; et (3) de rechercher des associations entre les polymorphismes fonctionnels de gènes du NER avec la réponse clinique à la chimiothérapie.

Avant d'aborder les résultats obtenus, je décrirai, dans cette étude bibliographique, le système humain de réparation de l'ADN par excision de nucléotides ainsi que les protéines et les mécanismes qui lui sont associés. Je détaillerai ensuite les maladies dans lesquelles ce système est impliqué et comment l'étude de ces pathologies permet de mieux comprendre l'importance de ces mécanismes et leurs liaisons avec les autres mécanismes cellulaires. Enfin je présenterai les différents polymorphismes des gènes du NER, et les études réalisés sur leur association avec le risque de développement de cancer et avec la réponse aux agents anticancéreux.



---

# Introduction bibliographique

---

## 1. Le mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER)

L'intégrité structurale de l'ADN est nécessaire au bon déroulement de la transcription et de la réplication de l'ADN. Comme les autres mécanismes de réparation de l'ADN, le NER est nécessaire à la vie de la cellule mais aussi à la division cellulaire, c'est donc naturellement qu'il existe des interactions moléculaires entre le NER et les mécanismes de la transcription et du cycle cellulaire.

### 1.1. Les enzymes intervenant dans le NER

Différentes protéines interviennent de manière séquentielle dans ce mécanisme. Leurs propriétés sont résumées dans le tableau 1.

Le gène *XPA* code pour une protéine de 31 kDa et de 273 acides aminés qui intervient dans la reconnaissance du dommage de l'ADN et qui a la fonction de maintenir la région à réparer à l'état simple brin (Yang et al., 2006).

Le gène *ERCC3* code pour une 3'-5' ADN hélicase (*XPB*) de 89 kDa et de 782 acides aminés qui permet de dérouler l'ADN. La protéine XPB, qui fait partie d'un complexe multi-protéique nommé TFIIF, est impliquée aussi bien dans la régulation de la transcription basale des ARNm, que dans le NER (Hall et al., 2006)

La protéine *XPC* a un poids moléculaire de 105 kDa et est composée de 940 acides aminés. Elle forme un hétéro-dimère avec la protéine hHR23B qui est impliqué dans la reconnaissance du dommage de l'ADN (Wood, 1999).

*XPB* est un polypeptide de 760 acides aminés ayant un poids moléculaire de 80 kDa codé par le gène *ERCC2*. Comme XPB, XPD fait partie des hélicases de la superfamille SF2 (Eisen et al., 1995). Cette protéine, composée de 7 motifs hélicases, possède une activité ADN hélicase, de polarité 5'-3', dépendante de l'ATP (Sung et al., 1993). L'activité hélicase de XPD peut être modulée par son association à une sous-unité du complexe TFIIF appelée p44. Un défaut d'interaction entre ces protéines pourrait expliquer certains phénotypes XP observés (Coin et al., 1998). L'activité de XPD semble moins cruciale que celle de XPB dans l'initiation de transcription (Moreland et al., 1999). En effet, des mutations dans XPD inhibent l'activité de réparation, mais pas de transcription de TFIIF ; cela pourrait expliquer, en partie, le nombre plus important de patients portant des mutations de XPD que de XPB (Tirode et al., 1999 ; Winkler et al., 2000). La présence, plus que l'activité, de XPD serait importante pour la transcription (Bradsher et al., 2000). L'ancrage du sous-complexe *CDK activating kinase* (CAK) au cœur de TFIIF semble être une fonction importante de XPD (Coin et al., 2008).

Les gènes ***DDB1*** et ***DDB2*** (*Damage-specific DNA Binding protein*) codent respectivement pour la grande sous-unité de 127 kDa et pour la petite sous-unité **XPE** de 48 kDa de l'hétérodimère (Nichols et al., 2000 ; Kulaksiz et al., 2005) qui forme le complexe nommé UV-DDB (*UV-damaged DNA-binding protein complex*). XPE (*DDB2*), comme XPC, est impliquée dans la reconnaissance initiale des dommages induits par les UV dans les régions non transcrites du génome (Kapetanaki et al., 2006).

Le gène ***ERCC4*** code pour la protéine **XPF** de 103 kDa et de 905 acides aminés. En s'associant avec la protéine ERCC1, elle forme un complexe ADN endonucléase en 5' de la lésion (Ciccia et al., 2008).

**XPG (*ERCC5*)** est une 3' endonucléase de 1186 acides aminés ayant un poids moléculaire de 133 kDa. Comme le complexe ERCC1/XPF (5' endonucléase), XPG est une enzyme indispensable à l'excision du brin lésé, durant la réparation par NER. Mais la protéine XPG a aussi été décrite pour son rôle primordial dans la stabilité de l'ancrage du CAK sur le cœur de TFIIF (Ito et al., 2007). La perte de cette « seconde » fonction semble être associée au syndrome de Cockayne.

Le gène ***ERCC8*** code pour la protéine **CSA** (44 kDa, 396 acides aminés). CSA intervient dans la reconnaissance du dommage durant le NER couplé à la transcription, elle a été décrite dans des interactions avec une E3-ubiquitine ligase (Fousteri et al., 2008), mais aussi avec p44, une sous-unité du complexe TFIIF.

Le gène ***ERCC6*** code pour la protéine **CSB** (168 kDa, 1493 acides aminés). CSB intervient, durant la transcription, dans le recrutement des protéines du NER (Fousteri et al., 2008), avec une fonction présumée de type ADN ou ARN hélicase et hydrolase (Pazin and Kadonaga, 1997).

**RPA (*replication protein A*)** est un hétéro-trimère stable composé de sous-unités de 70 kDa, 32 kDa et 14 kDa (respectivement RPA70, RPA32, RPA14) (Cai et al., 2007) ; ce complexe intervient dans la réplication, la réparation et la recombinaison (Sakaguchi et al., 2009).

La protéine **hHR23B** (58 kDa, 409 acides aminés) encodée par ce gène est une des deux protéines homologues humaines de Rad23 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette protéine intervient dans la phase de reconnaissance du dommage du NER en formant un complexe avec la protéine XPC (Wood, 1999 ; Lainé et al., 2006).

Facteur protéique du NER	sous-unités/interactions	Activité(s)	modification post-traductionnelle
XPA	p36	vérification du dommage	phosphorylation
XPB	TFIIH	hélicase	
XPC	hHR23B centrin-2	reconnaissance du dommage (GG-NER)	ubiquitination sumoylation
XPD	TFIIH	hélicase	
XPE	DDB1, DBB2	reconnaissance du dommage (GG-NER) E3-ligase	ubiquitination
XPF	ERCC1	incision	
XPG	TFIIH	incision	
RPA	p70/p34/p14	reconnaissance du dommage (GG-NER) resynthèse	phosphorylation
CSA	E3-ubiquitine ligase	reconnaissance du dommage (TC-NER)	
CSB		reconnaissance du dommage (TC-NER)	
Pol $\epsilon$ /DNA ligase I		ligation	
Pol $\delta\epsilon$ /XRCC1-DNA ligase III $\alpha$		ligation	

**Tableau 1.** Les différents facteurs protéiques intervenant dans le GG et le TC-NER  
(Shuck et al., 2008 ; Fousteri et al., 2008).

## 1.2. La réparation de l'ADN par le mécanisme de NER

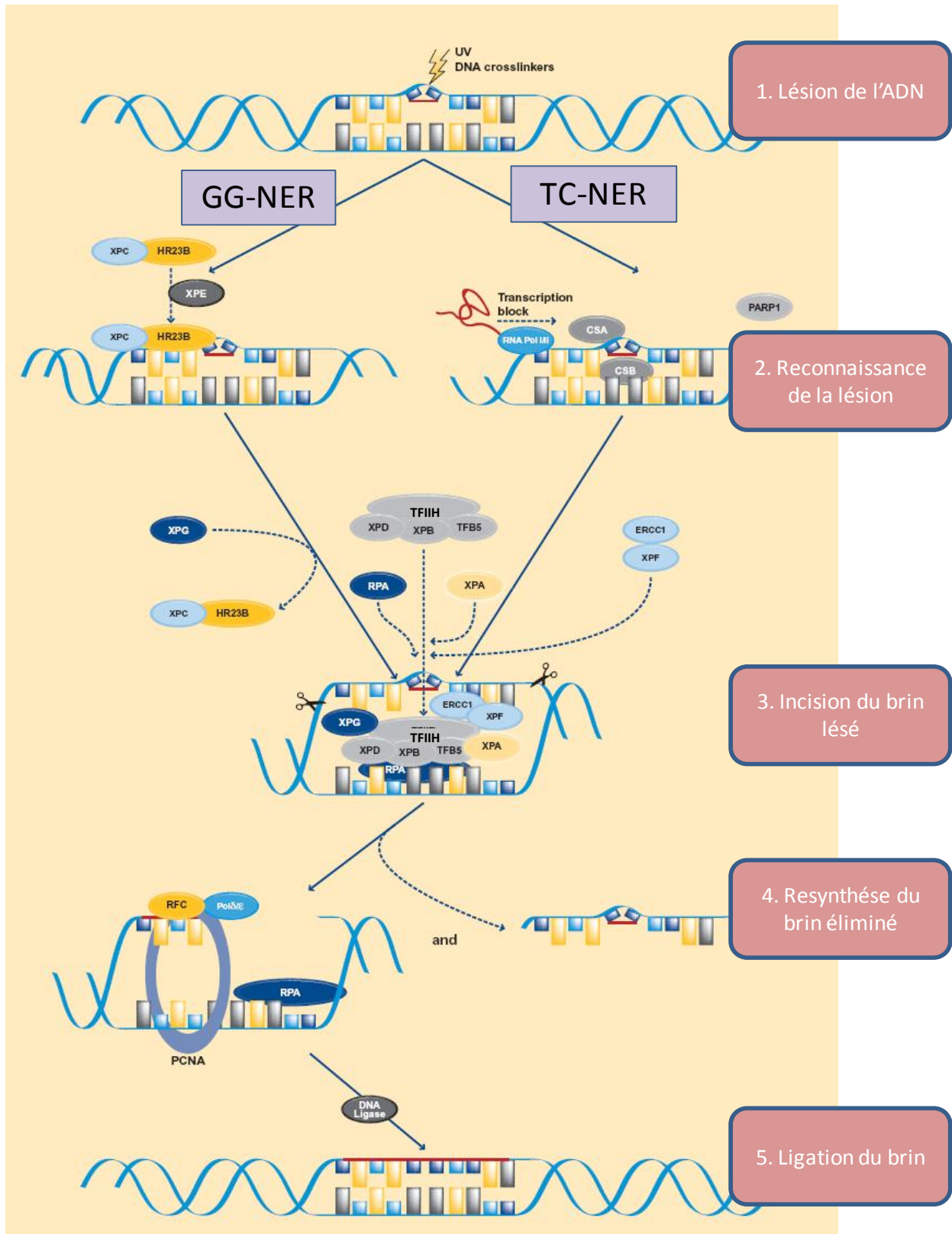
Le mécanisme de réparation appelé *Nucleotide Excision Repair* (NER) est responsable de l'élimination de lésions de l'ADN provoquées par les rayons UV et par des agents chimiques génotoxiques comme le cisplatine (de Laat et al., 1999) (Figure 1). Ce mécanisme reconnaît et répare les dommages suivants : les dimères de pyrimidine, les pontages intra-brin, les gros adduits de l'ADN comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Deux mécanismes ont été décrits ; ils diffèrent dans leur principe de reconnaissance de la lésion. La réparation couplée à la transcription (TC-NER) concerne les lésions survenant sur les gènes actifs (Fousteri et al., 2008), et la réparation globale du génome (GG-NER) répare également les lésions des séquences non géniques (Shuck et al., 2008).

Avant d'être réparée, la lésion doit être reconnue. Cette étape de reconnaissance est différente dans les deux systèmes. Dans la TC-NER, c'est le blocage de l'ARN polymérase au niveau du site lésé qui permet de recruter le complexe d'incision en faisant intervenir les protéines CSA et CSB. Dans la GG-NER, la reconnaissance se fait grâce à l'affinité du complexe XPC/hHR23B envers les dommages de l'ADN réparables par NER et fait aussi intervenir la protéine XPE qui a une affinité pour les dimères de pyrimidine (Wood, 1999).

Lorsqu'un dommage de l'ADN est reconnu, les protéines XPA et RPA, puis le facteur TFIIH, sont recrutés (Shuck et al., 2008) ; TFIIH est constitué d'un grand nombre de sous-unités protéiques, dont les deux hélicases XPB et XPD (Evans et al., 1997). Deux endonucléases, ERCC1/XPF puis XPG, peuvent alors réaliser l'incision de l'ADN de part et d'autre de la lésion (Tapias et al., 2004 ; Staresincic et al., 2009), ce qui aboutit à l'élimination d'une trentaine de nucléotides. La resynthèse de la partie excisée est alors réalisée par les polymérases  $\delta$  et  $\epsilon$  qui possèdent une processivité et une fidélité élevées (Shivji et al., 1998). Ce système de réparation a donc un faible niveau mutagène (mutations ou insertions/délétions), ce qui n'est pas le cas de tous les systèmes de réparation eucaryotes pour lesquels la conservation de la séquence d'origine de l'ADN ne peut être assurée, comme le *Non Homologous End Joining* (NHEJ) par exemple. La réparation par NER s'achève par la ligation du brin néo-synthétisé avec l'extrémité 5' libre de l'ADN (Shuck et al., 2008).

De nombreuses protéines sont impliquées dans le NER et il existe des mutations conduisant à des pathologies neurologiques et dermatologiques comme le Xeroderma Pigmentosum (XP) (Cleaver et al., 1975), le syndrome de Cockayne (CS) (Bregman et al. 1996) ou la Trichothiodystrophie (TTD) (Bregman et al., 2001). Ces maladies s'accompagnent d'un risque élevé de survenue de cancers de la peau et sont héréditaires. Il existe pour ces gènes des polymorphismes fréquents qui ont pu être associés à une augmentation du risque de cancer (Goode et al., 2002), évidemment beaucoup plus faible que les mutations conduisant aux pathologies XP, CS et TTD (Schärer, 2008).

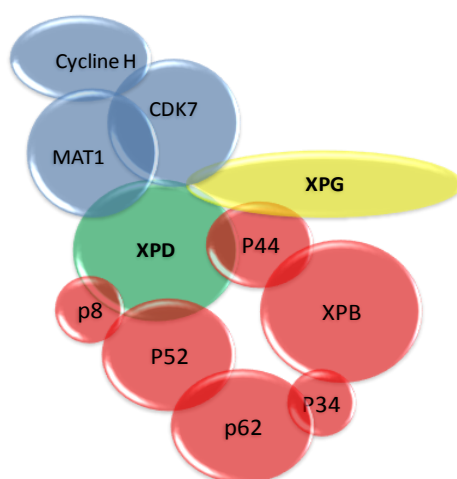


**Figure 1.** La réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER), extrait du poster « DNA repair pathways » de la société Abcam réalisé avec la collaboration de James Haber et Farokh Dotiwala.

### 1.3. Le complexe TFIIH

Le complexe TFIIH (Figure 2), l'un des six facteurs généraux de transcription eucaryotes de classe II, regroupe dix entités protéiques distinctes, dont les deux hélicases XPB et XPD, mais aussi le sous-complexe CAK (*CDK-activating kinase*), qui est fait de l'association entre CDK7, la protéine MAT1 (*ménage à trois 1*) (Tassan et al., 1995) et la cycline H (Coin et al., 2008). On pourrait rajouter XPG qui est indispensable à l'ancrage de CAK sur le cœur de TFIIH par l'intermédiaire de XPD (Ito et al., 2007).

Ainsi, en plus de son rôle dans le NER, TFIIH est impliqué dans l'initiation de la transcription des gènes de classe II et dans le cycle cellulaire grâce à son activité kinase portée par CDK7, lui-même capable d'activer d'autres CDK (Iben et al., 2002 ; Roy et al., 1994). De plus, TFIIH pourrait être aussi impliqué dans l'apoptose par l'intermédiaire de son interaction avec p53 (Xiao et al., 1994).



**Figure 2.** Le complexe TFIIH. En rouge : le cœur du complexe ; en bleu : le sous complexe CAK ; en vert : la protéine d'ancrage XPD ; en jaune : XPG indispensable à la stabilité de l'ancrage de CAK.

#### 1.3.1. Complexe d'initiation de la transcription

Durant l'initiation de la transcription, l'hélicase XPB ouvre la double hélice d'ADN et permet l'accès de l'ARN polymérase II. L'activité de XPD n'est pas requise dans ces deux étapes mais sa présence l'est, ce qui implique un rôle structural de XPD (Bradsher et al., 2000 ; Moreland et al., 1999). CDK7 est la kinase responsable de la phosphorylation du domaine carboxy-terminal (CTD) de la grosse sous-unité Rbp1 de l'ARN polymérase II (ARN pol II). Des mutations dans XPD peuvent altérer l'activité kinase de CDK7 (Keriel et al., 2002). L'effet de ces mutants de XPD sur l'activité des récepteurs nucléaires permet d'expliquer certains phénotypes observés chez les patients XP (Keriel et al., 2002). Il a récemment été montré que MAT1 pouvait interagir avec la protéine MTA1 qui en retour inhiberait l'activité kinase de TFIIH nécessaire à l'expression de gènes dépendant des récepteurs aux œstrogènes (Talakder et al.,

2003). Il apparaît donc que TFIIH est un facteur clef pour les différentes étapes de la transcription, en raison de son interaction avec de nombreux facteurs transcriptionnels. TFIIH pourrait ainsi réguler l'expression de certains gènes de manière spatio-temporelle. Il a aussi été avancé que TFIIH participait à la transcription des gènes de classe I (Hoogstraten et al., 2002 ; Iben et al., 2002). Certains phénotypes observés chez les patients atteints de CS peuvent être dûs à un défaut de transcription des ARN ribosomiaux puisque la protéine CSB est impliquée dans ce mécanisme (Bradsher et al., 2002). Mais le rôle précis de TFIIH dans la transcription des gènes de classe I reste à déterminer.

### 1.3.2. Complexe de réparation de l'ADN par excision de nucléotides

Les deux hélicases de TFIIH déroulent l'ADN autour de la lésion lors du processus du NER. Pour autant, l'implication de TFIIH dans le NER ne se limite pas à la fonction de ses hélicases, puisque la réparation d'un substrat pré-ouvert ne s'effectue pas en son absence (Mu et al., 1997). TFIIH établit de multiples contacts avec les protéines du NER (XPA, XPC, XPF-ERCC1 et XPG) et jouerait un rôle dans la formation du complexe de réparation (Riedl et al., 2003). De plus, il régule les activités des endonucléases XPG et XPF-ERCC1 (Winkler et al., 2001). La réaction de NER reconstituée *in vitro* est inhibée par le CAK, et l'ajout d'un inhibiteur de CDK7 compense cette inhibition. Le CAK pourrait donc réguler négativement certains facteurs du NER en les phosphorylant (Araujo et al., 2000). L'exposition de cellules humaines aux rayons UV réduit l'activité kinase de CDK7 et les facteurs du NER retrouvent leur activité, ce qui conforte l'hypothèse précédente (Adamczewski et al., 1996). De plus, il a été montré récemment que XPA catalyse la dissociation de CAK du cœur de TFIIH, entraînant la promotion du mécanisme de réparation (Coin et al., 2008). La composition de TFIIH est donc dynamique, afin d'adapter sa fonction dans différents processus cellulaires.

### 1.3.3. Complexe de régulation de la promotion de la mitose

Outre son implication dans la réparation et la transcription, ce complexe est responsable de la phosphorylation et de l'activation de CDK1, lui-même responsable, après conjugaison à la cycline B, de l'entrée en mitose (Lee et al., 2005 ; Lolli et al., 2005 ; Fisher, 2005 ; Matsuno et al., 2007). Ce n'est que lors de la libération de CAK du complexe TFIIH qu'il peut exercer son activité pro-mitotique. Cet équilibre permet une régulation réciproque entre les phases de transcription et la mitose. La stabilité du complexe TFIIH dépend, entre autres, de la présence des protéines XPD et XPG. Chez la drosophile, la diminution de l'expression de XPD par méthode antisens *in vitro* provoque une augmentation de la croissance cellulaire. Il a même été montré qu'une régulation de la protéine XPD pouvait exister en fonction du cycle cellulaire et que cette régulation était nécessaire au bon déroulement de la mitose (Chen et al., 2003). On ne sait pas aujourd'hui si ce mécanisme est applicable aux mammifères. Il a aussi été décrit que certaines mutations de XPD (associées à la trichothiodystrophie) et de XPG (associées au syndrome de Cockayne), ou l'absence d'une de ces deux protéines, déstabilisait *in vitro* le complexe TFIIH, ce qui se traduit par la libération du sous-complexe CAK (Coin et al., 2008). Un déficit quantitatif



et/ou qualitatif de l'une ou l'autre de ces protéines aura ainsi pour conséquence la déstabilisation de TFIIH, la libération de CAK et la promotion de la mitose par rapport à la transcription. Les polymorphismes des gènes *ERCC2* et *ERCC5* peuvent donc avoir un rôle dans la réparation de l'ADN, mais aussi dans la régulation de la transcription et de la mitose.

#### 1.3.4. Complexe de régulation de l'apoptose

L'hypothèse selon laquelle TFIIH est impliqué dans le mécanisme d'apoptose est née de la découverte d'une interaction entre cinq sous-unités de TFIIH et la protéine p53. En effet, XPB, XPD, p62, la cycline H et MAT1 interagissent avec p53 (Xiao et al., 1994). Ces interactions inhibent les activités enzymatiques de TFIIH. En effet, l'interaction entre p53 et XPB/XPD conduit à une inhibition de leur activité hélicase et l'interaction entre p53 et la cycline H résulte en une diminution significative de l'activité kinase de CDK7 (Leveillard et al., 1996 ; Schneider et al., 1998). D'autre part, CDK7 phosphoryle p53, ce qui a pour effet d'augmenter son activité de liaison à des séquences spécifiques d'ADN (Lu et al., 1997). Cette activation de p53 pourrait, par conséquent, stimuler l'expression du gène codant pour l'inhibiteur de CDK, p21<sup>CIP1</sup>, conduisant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire (Ko et Prives, 1996). Après un choc génotoxique, de même qu'une irradiation aux UV, on observe une accumulation de p53, qui coïncide avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, permettant la réparation de l'ADN (Agarwal et al., 1998). Par ailleurs, il n'est pas possible d'induire l'apoptose médiée par p53 dans des cellules dont les gènes XPB ou XPD sont mutés, mais la transfection de ces cellules par des vecteurs contenant ces 2 gènes permet l'induction de l'apoptose (Wang et al., 1996). L'inhibition des activités hélicases de TFIIH par p53 retarderait le NER et pourrait ainsi entraîner l'apoptose.

#### 1.4. Le sous-complexe *CDK-activating kinase (CAK)*

Ce complexe est composé de trois sous-unités (CDK7, cycline H et MAT1) et peut exister sous forme libre dans la cellule ou associée, soit à XPD, soit au cœur TFIIH/XPD pour former TFIIH (Drapkin et al., 1996 ; Reardon et al., 1996). La spécificité de substrat de CAK diffère selon qu'il est associé à TFIIH ou non (Rossignol et al., 1997 ; Yankulov et Bentley, 1997). En effet, associé à TFIIH, CAK phosphoryle préférentiellement le CTD de l'ARN pol II et certains facteurs de transcription tel que TBP, TFIIE, TFIIF et RAR (Bastien et al., 2000 ; Rossignol et al., 1997 ; Roy et al., 1994 ; Yankulov et Bentley, 1997). Sous forme libre, CAK phosphoryle préférentiellement les CDK impliquées dans le cycle cellulaire tel que CDK1, 2, 4 et 6 (Nigg, 1996).

- **CDK7** est une protéine de 346 acides aminés ayant un poids moléculaire de 40 kDa. Initialement clonée chez le xénope et nommée MO15, cette protéine fut renommée CDK7 après l'identification de son partenaire, la cycline H (Makela et al., 1994 ; Shuttleworth et al., 1990). CDK7 possède, comme la plupart des kinases, un domaine de liaison à l'ATP de type GXGKT, une boucle T contenant les résidus phosphorylables, une séquence PSTAIRE permettant son interaction avec la cycline H et un site catalytique (Nigg, 1996). CDK7 se distingue des autres



associations CDK-cycline, d'une part par son activation en l'absence de phosphorylation de sa boucle T, due à son association à MAT1, et d'autre part par son activité kinase constitutive tout au long du cycle cellulaire (Poon et al., 1994 ; Tassan et al., 1994).

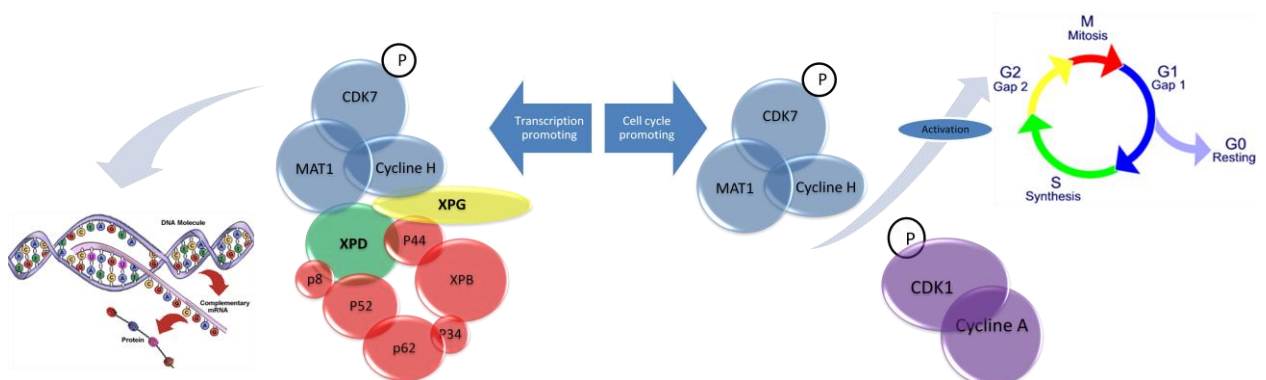
- **La cycline H** est une protéine de 38 kDa composée de 323 acides aminés dont la protéine homologue chez la levure est CCL1 (Valay et al., 1993). La partie centrale de la cycline H contient 2 répétitions directes d'une centaine d'acides aminés qui forment deux séries symétriques de cinq hélices  $\alpha$ . Ce motif constitue la « boîte » cycline caractéristique de toutes les cyclines et permet l'interaction avec CDK7. De plus, sa structure cristallographique montre de grandes similitudes avec celle de la cycline A (Andersen et al., 1996). La cycline A est ainsi capable de remplacer la cycline H au sein du CAK permettant la phosphorylation *in vitro* d'un oligonucléotide mimant le CTD de l'ARN pol II (Andersen et al., 1997). Malgré ces caractéristiques qui justifient son appartenance à la famille des cyclines, la concentration de cycline H ne varie pas en fonction du cycle cellulaire, de même que ces partenaires CDK7 et MAT1 (Brown et al., 1994; Poon et al., 1994; Tassan et al., 1994). Il faut noter que la cycline H peut être phosphorylée par le complexe CDK8/cycline C ce qui aurait pour effet d'inhiber CDK7 ainsi que la transcription (Akoulitchev et al., 2000). Un effet similaire a été obtenu par l'intermédiaire de la caséine kinase 2 (CK2) (Schneider et al., 2002).
- **MAT1** est un polypeptide de 312 acides aminés ayant un poids moléculaire de 32 kDa. MAT1 possède dans sa partie amino-terminale un motif structural de liaison au zinc de type *ring finger* ainsi qu'un domaine *coiled-coil* dans sa partie centrale. Le motif *ring finger* lie le complexe CDK7-cycline H et est essentiel à l'activation de CDK7 ainsi qu'à l'activité de transcription de TFIIH. Le domaine *coiled coil*, quant à lui, permet l'intégration du CAK au cœur de TFIIH via les sous-unités XPB et XPD (Busso et al., 2000). MAT1 stimule la phosphorylation d'un oligopeptide mimant le CTD de l'ARN polymérase II par CDK7 et est essentiel à la phosphorylation *in vitro* de p53 par CDK7 (Ko et al., 1997 ; Yankulov et Bentley, 1997). De même que CDK7 et cycline H, MAT1 est une cible potentielle pour l'inactivation de l'initiation de la transcription de TFIIH durant la mitose de par sa phosphorylation par le couple CDK1-cycline B (Long et al., 1998).

### 1.5. Les protéines dont l'activité est régulée par TFIIH

- Il existe trois isoformes de la **cycline B** (B1, B2, B3). Les cyclines sont des protéines présentes à des taux variables dans la cellule selon les étapes du cycle cellulaire. Elles constituent la partie régulatrice du couple cycline CDK. Elles sont synthétisées à des moments différents du cycle cellulaire, se lient à des kinases spécifiques et permettent ainsi la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Elles sont dégradées de façon abrupte par le système de l'ubiquitine-protéasome. La cycline B (62 kDa) est la plus volumineuse sous-unité du *mitosis promoting factor* (MPF) (Petri et al., 2007). On décrit ainsi la cycline B en phase S, M, et G2. La phosphorylation de la

cycline B permet la translocation du complexe dans le noyau où se trouvent ses substrats (Hagting et al., 1999). La cycline B, en se liant à CDK1, rend accessible une thréonine en position 161 qui peut ainsi être phosphorylée par le complexe CAK (Tassan et al., 1994).

- L'étude de la division des levures a permis de mettre en évidence un gène appelé **CDC2**, dont l'homologue humain code pour **CDK1** qui contrôle la division cellulaire : l'absence (ou la non expression) de ce gène entraîne un blocage du cycle cellulaire, soit à l'étape G2/M, soit à l'étape G1/S. Ce gène code pour une protéine kinase de 34 kDa phosphorylant les protéines sur la sérine et la thréonine. Cette kinase possède trois acides aminés essentiels pour la fonction : la thréonine 161 (chez l'homme), la tyrosine 15 et la thréonine 14 (Ohi et Gould, 1999). La molécule de cycline B s'associe à CDK1, qui est phosphorylée sur les trois sites. La déphosphorylation de Y15 et T14 par CDC25 active l'ensemble qui va promouvoir la division cellulaire. Par la suite, la T161 est déphosphorylée par WEE1 (Potapova et al., 2009), l'ensemble CDK1-cycline B est inactivé, et les deux molécules se séparent : CDK1 peut être à nouveau utilisée, la cycline B est dégradée par le système de l'ubiquitine-protéasome. La présence d'anomalies de l'ADN bloque les cellules en phase G2 par inactivation de la déphosphorylation de CDK1 (Fisher, 2005), soit par suppression de l'activité CDC25, soit par le maintien de l'activité WEE1 qui phosphoryle CDK1 en Y15 et T14 (Potapova et al., 2009). L'arrêt ou le ralentissement du passage de G2 à M donne à la cellule la possibilité de corriger des erreurs de l'ADN.
- **La RNA-binding protein 1 (RBP1)** est la plus volumineuse des sous-unités (220 kDa) de l'ARN polymérase II ; elle fait partie du centre catalytique de l'enzyme, son domaine carboxy-terminal (CTD) interagit avec TFIIH par l'intermédiaire du CAK qui l'active par phosphorylation d'un motif YSPTSPS répété 52 fois (les phosphorylations activatrices se situent au niveau des sérines 2 et 5 du motif) (Lolli, 2009).



**Figure 3.** Équilibre de la disponibilité du sous complexe CAK activant soit la transcription, soit le MPF.

## 2. Les maladies impliquant les systèmes de réparation de l'ADN

Il existe de nombreux systèmes de réparation eucaryotes : le MMR (*MisMatch Repair*), le NER (*Nucleotide Excision Repair*), le BER (*Base Excision Repair*), la TS (*Translesion Synthesis*), et le DSBR (*Double Strand Break Repair*) qui comprend le HR (*Homologous Repair*) et le NHEJ (*Non Homologous End Joining*).

### 2.1. Rôle cancérigène des altérations de la réparation de l'ADN

La maladie cancéreuse résulte d'une perturbation génétique, généralement acquise, de certains des mécanismes de contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire, ainsi que de l'adhésion et de la migration cellulaires. La prolifération cellulaire peut être contrôlée par deux types de gènes régulateurs : ceux dont les produits la stimulent et ceux dont les produits l'inhibent. Il existe donc deux classes de mutations qui conduisent à la prolifération cellulaire incontrôlée caractérisant le cancer.

- La première résulte de l'activation d'un gène stimulateur, par mutation, amplification ou translocation chromosomique (Bishop, 1991). Ce type d'altération a un effet dominant : il suffit qu'un seul des deux allèles de la cellule soit altéré. C'est le cas de l'activation des proto-oncogènes en **oncogènes**.
- La seconde consiste à inactiver un gène inhibiteur de la prolifération cellulaire par mutation ou perte chromosomique (Lasko, 1991). Ce type d'altération a un effet récessif : les deux allèles doivent être inactivés ou éliminés pour lever l'inhibition sur la prolifération cellulaire. C'est le cas des **gènes suppresseurs de tumeur**, autrefois appelé anti-oncogènes.

L'identification de gènes impliqués dans l'une ou l'autre de ces deux voies est fondamentale dans la compréhension du phénomène néoplasique. Les altérations peuvent survenir dans des gènes liés à la prolifération et à la migration cellulaire, certains étant activateurs (gain de fonction) et d'autres inhibiteurs (perte de fonction). C'est par l'accumulation d'altérations au niveau de ces deux classes de gènes que la cellule acquiert progressivement un phénotype tumoral ; ces altérations se produisent en grand nombre du fait de l'instabilité génétique, qui apparaît ainsi comme le moteur du développement tumoral. Ces perturbations s'opèrent parfois sur un terrain cellulaire déjà fragilisé du fait de l'existence de gènes de prédisposition au cancer ou d'une fragilité du matériel génétique par défaut de réparation de l'ADN. L'équilibre entre la survenue de lésions de l'ADN et leur réparation est déterminant pour le risque de développement d'un cancer. Une diminution de l'efficacité des systèmes de réparation favorisera l'accumulation de mutations ; de ce point de vue, les gènes du NER se comportent comme des gènes suppresseurs de tumeur. Il a été montré que les mutations de gènes du NER entraînent une prédisposition majeure à la survenue de cancers, mais aussi que des polymorphismes de gènes de réparation de l'ADN entraînent une variation de ce risque, qui est mineure mais significative.

## 2.2. Les maladies associées à la déficience de ces protéines

Historiquement, différents gènes codant pour des protéines intervenant dans le NER ont été nommés grâce à des groupes de complémentation réalisés en fusionnant des lignées fibroblastiques issues de patients atteints de Xeroderma Pigmentosum (XP) (De Weerd-Kastelein et al., 1974 ; Kraemer et al., 1975), suivie d'une irradiation aux UV des hybrides tétraploïdes (De Weerd-Kastelein et al., 1972). Les lignées fusionnées qui conservent le phénotype hypersensible aux UV sont dites appartenir au même groupe de complémentation. Les lignées de patients appartenant à un même groupe de complémentation portent en principe des mutations dans le même gène (Tableau 2).

### A

cellule 2n	1BE	2 BE	3 BE	5 BE	6 BE	7 BE	8 BE	10 BE	11 BE	12 BE	1LO	KMSF
Référence	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 BE	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
2 BE		-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
3 BE			-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
5 BE				-	-	-	+	+	+	+	+	+
6 BE					-	-	+	+	+	+	+	+
7 BE						-	+	+	+	+	+	+
8 BE							-	-	+	+	+	+
10 BE								-	+	+	+	+
11 BE									-	+	+	+
12 BE										-	-	-
1LO											-	-
KMSF												-

### B

Groupes	XPA	XPB	XPC	XPD
Lignées cellulaires	XP12BE	XP11BE	XP1BE	XP5BE
	XP1LO		XP2BE	XP6BE
	XPKMSF		XP3BE	XP7BE
			XP8BE	
			XP10BE	

**Tableau 2. A.** Tableau de complémentation des cellules fusionnées ; on note + si l'hybride tétraploïde est capable de réparer son ADN et – dans le cas contraire.

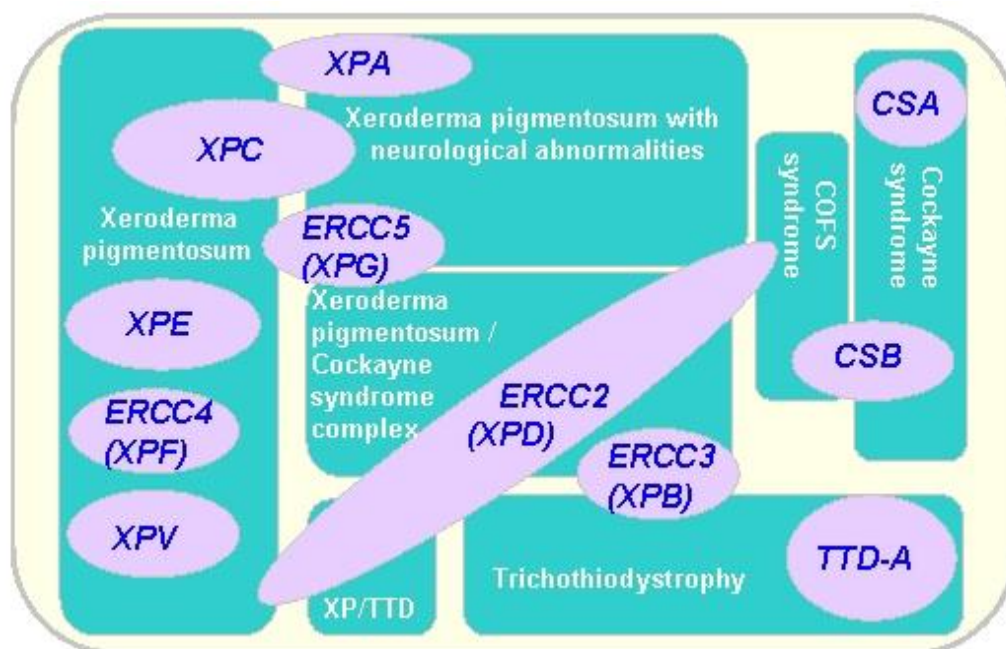
**B.** Lignées cellulaires disponibles, issues de patients, appartenant à différents groupes de complémentation (Kraemer et al., 1975). Au départ, 4 groupes de complémentation avaient été identifiés, on compte aujourd'hui huit groupes pour la seule maladie XP.

---

Les déficiences de protéines du NER peuvent être associées principalement à trois pathologies : le Xeroderma Pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS), et la Trichothiodystrophie (TTD). Ce sont des maladies génétiques autosomiques récessives.

- Le **Xeroderma Pigmentosum** (XP) est une maladie multigénique (Cleaver et al., 1975 ; Stary et al., 2002) et multiallélique qui a comme principale caractéristique une hypersensibilité des patients aux ultraviolets associée à un risque accru (multiplié par 2000) de cancer de la peau (Kraemer et al., 1994). Les gènes qui sont mutés dans cette maladie sont au nombre de 7, nommés de *XP-A* à *G*. Ces gènes codent pour des protéines du mécanisme de réparation par excision de nucléotides NER. Un autre gène pouvant être muté dans cette maladie a été découvert : le gène *XP-V* (XP-Variant) code pour une ADN polymérase qui n'est pas impliquée dans le NER, mais qui intervient dans la réponse cellulaire aux UV (Tissier et al. 2000).
- Le **syndrome de Cockayne** (CS) est une maladie rare (Lehmann, 1982), parfois associée aux formes sévères de Xeroderma Pigmentosum. Ce syndrome combine l'hypersensibilité aux UV caractéristique du XP, aggravée par des malformations et un retard mental. Des groupes de complémentation ont, ici aussi, permis de découvrir deux gènes dont les mutations sont caractéristiques de cette maladie : *CSA* (*ERCC8*) et *CSB* (*ERCC6*) (Christians et Hanawalt, 1992 ; Henning et al., 1995) dont la déficience entraîne une hypersensibilité aux UV, mais sans s'accompagner du risque accru de cancers de la peau (Bregman et al., 1996). Certaines mutations de ces trois gènes du NER, *XPD*, *XPB* et *XPG*, ont aussi été décrites dans des cas de XP-CS (Weeda et al. 1990 ; Arenas-Sordo et al., 2006).
- La **Trichothiodystrophie** (TTD), maladie qui s'accompagne de différentes manifestations comme les cheveux cassants (Lehmann et al., 1988), se présente différemment des deux premières car, parmi ses symptômes (malformations, retards mentaux) on ne retrouve pas ou peu d'hypersensibilité aux ultraviolets des patients, ni de cancers de la peau. Les gènes concernés par des mutations codent pourtant pour des sous-unités de TFIIH (*XPB*, *XPD*, *P8/TTD-A*) (Coin et al., 2006) ; le mécanisme moléculaire déficient semble plutôt se situer au niveau de l'activité de TFIIH dans l'initiation de la transcription (Bergmann et al., 2001).
- Les syndromes **XP-CS** et **XP-TTD** ont été diagnostiqués sur des patients atteints de sévères symptômes associés du XP et du CS ou de la TTD. Il a généralement été trouvé des mutations dans les gènes *ERCC2* (*XPD*), *ERCC3* (*XPB*) ou *ERCC5* (*XPG*) (Weeda et al. 1990 ; Arenas-Sordo et al., 2006).
- Le **syndrome cérébro-oculo-facio-squelettique** (COFS) est aussi une maladie génétique autosomique récessive associée à une déficience du NER. Le syndrome COFS constitue un phénotype particulièrement sévère de mutation des gènes *ERCC6* (*CSB*), *ERCC2* et *ERCC5* (Graham et al., 2001).

Il existe de nombreuses variantes de ces maladies, partiellement en raison du fait qu'un seul gène comme ERCC2 peut être impliqué dans les quatre pathologies que nous venons de citer. La figure 4 présente les multiples phénotypes associés à la déficience de gènes du NER.



**Figure 4.** Représentation schématisée des gènes associés aux maladies génétiques liées au NER (University of Washington, Seattle, USA).

### 2.3. Les agents anticancéreux ciblant les mécanismes de la réparation, de la transcription et du cycle cellulaire.

En principe, quand l'ADN d'une cellule est trop endommagé et qu'elle ne peut le réparer, sa division cellulaire est arrêtée et elle peut alors mourir par apoptose. De nombreux agents anticancéreux sont actifs sur les cellules tumorales selon ce mécanisme.

Les agents anticancéreux ont été classés par familles, en fonction de leur mécanisme d'action (alkylants) puis en sous familles en fonction de leur structure chimique (dérivés de platine, taxanes). Nous évoquerons seulement les familles de molécules auxquelles nous nous sommes particulièrement intéressés pour cette étude.

- **Les alkylants.** Les alkylants sont des molécules qui forment des liaisons covalentes avec des atomes riches en électrons (dits nucléophiles), comme certains azotes des bases de l'ADN. Actuellement, de nombreuses molécules sont utilisées en clinique, comme la méchloréthamine, le cyclophosphamide, l'ifosfamide, le melphalan ou le chlorambucil. Il existe aujourd'hui de



nouveaux alkylants comme la trabectédine. Ces produits peuvent se lier chimiquement avec de nombreuses protéines cellulaires, mais ce sont les liaisons avec l'ARN et surtout l'ADN qui expliquent leur action antimétabolique. Ils forment des ponts stables à l'intérieur d'un brin d'ADN ou entre les brins. Il existe une corrélation entre leur fixation et leur activité cytotoxique.

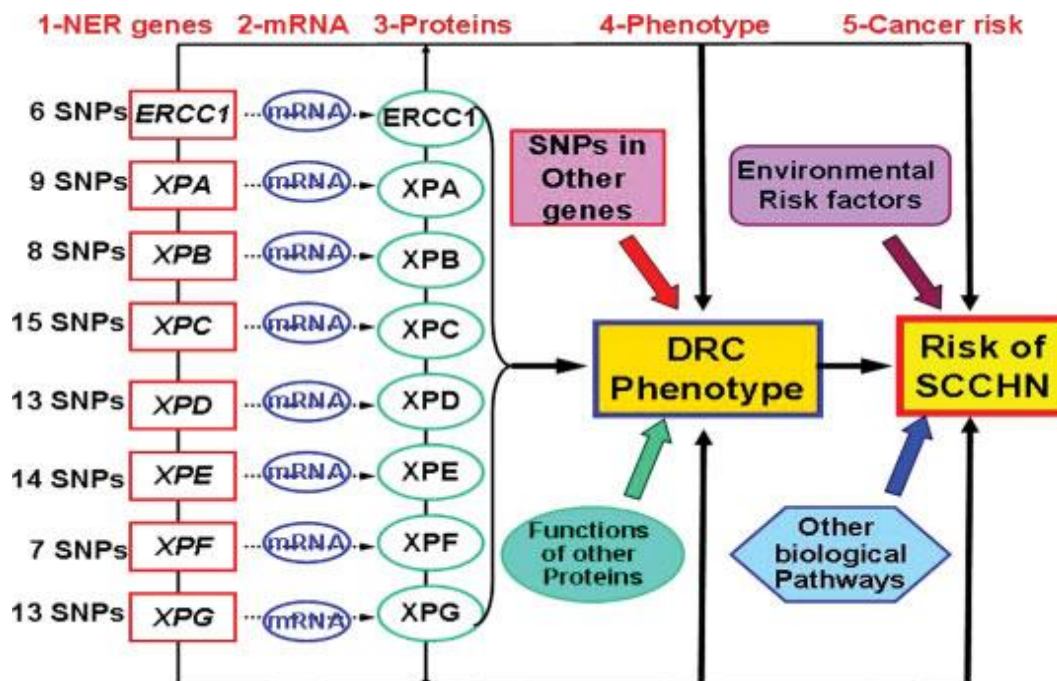
- **Les dérivés de platine** : cisplatine, carboplatine et oxaliplatine. Ces médicaments, voisins des alkylants, sont également capables de former des adduits à l'ADN, en particulier sur l'azote 7 de la guanine. Ils sont donc des candidats idéaux pour mettre en jeu les mécanismes de réparation de l'ADN par excision de nucléotides. Une variation de l'efficacité du NER aura *à priori* un effet majeur sur la réponse à ces composés.
- **Les taxanes**. Dérivés de l'if, le paclitaxel (Taxol) et le docetaxel (Taxotère) empêchent la dépolymérisation des microtubules. La cellule perd toutes les possibilités du dynamisme des microtubules, pour des processus aussi importants que la mitose, le maintien de la morphologie cellulaire, et les transports intracellulaires. Ces composés n'interagissent pas, à notre connaissance, avec le NER, mais comme nous l'avons rappelé plus haut, l'équilibre de la forme libre ou complexée du CAK est décrit comme un « senseur » du cycle cellulaire. À ce titre, des protéines comme XPD, qui fait le pont entre le cœur de TFIIH et le CAK, et comme XPG qui stabilise cette interaction, peuvent jouer un rôle important dans la réponse cellulaire aux taxanes. En effet, l'engagement des cellules en phase G2/M est susceptible de les rendre plus accessibles aux poisons du fuseau.

### 3. Les polymorphismes des gènes du NER

Un grand nombre de polymorphismes communs ont été identifiés dans les gènes codant pour des protéines intervenant dans le NER (Shen et al., 1998). Certains d'entre eux ont pu être associés à une variation du risque de cancer (Li et al., 2009) (figure 5).

Parmi ces SNPs, certains ont été directement corrélés à une variation du risque de survenue de cancers et/ou à une variation de la réponse aux traitements.

- Récemment un SNP (rs1800975, 23A>G) a été identifié dans la partie 5' non traduite du gène *XPA*. Il a été montré que la présence à l'état homozygote de l'allèle G était associée à une réduction du risque de survenue d'un cancer du poumon chez les Caucasiens, en particulier chez les fumeurs. (Wu et al., 2003). Il a aussi été montré que ce SNP jouait un rôle pronostique dans la réponse à l'association oxaliplatine/fluoropyrimidine dans les cancers colorectaux (Monzo et al., 2007)
- Il existe plusieurs polymorphismes du gène *XPB (ERCC3)*, mais ils n'ont pas été associés de manière significative avec un éventuel risque de cancer (Hu et al., 2006).



**Figure 5.** Impact possible des polymorphismes (SNPs) des gènes du NER dans le risque de survenue de cancers, et autres critères intervenant dans ce risque (DRC = *DNA repair capacity* ; SCCHN = *squamous cell carcinoma of the head and neck*) (Li et al., 2009).

- Le gène *XPC* présente un polymorphisme particulier qui a été découvert en 2000. Celui-ci est de type DIP (*deletion/insertion polymorphism*) et concerne une répétition d'un dinucléotide AT (PAT) (Khan et al., 2000). Lors d'une étude, il est apparu que les personnes homozygotes XPC-PAT+/XPC-PAT+ ont un risque significativement plus élevé de développer des cancers de la tête et du cou (Shen et al., 2001). Deux autres polymorphismes ont été décrits, il s'agit de SNPs qui sont situés dans la région codante du gène et qui sont non-synonymes : rs2228000 (A499V), rs2228001 (K939Q).
- Plusieurs polymorphismes du gène *ERCC2* (XPD) ont été identifiés, parmi lesquels deux mutations faux-sens au niveau des exons 10 et 23 (Asp312Asn, rs1799793 et lys751gln, rs13181), associées par déséquilibre de liaison, avec une fréquence allélique d'environ 30 % (Shen et al., 1998). Le polymorphisme de *ERCC2* semble associé à une augmentation du risque de cancer (Hou et al., 2002 ; Vogel et al., 2001) mais ces résultats ont été controversés (Benhamou et al., 2005) ; par ailleurs, deux études cliniques ont montré un effet des polymorphismes de *ERCC2* sur la survie de patients traités : la première (Park et al., 2001 ; Stoeckl et al., 2004) a montré que les homozygotes variants pour le codon 751, traités en 3<sup>e</sup> ligne pour un cancer colorectal métastatique par une association 5-fluorouracile – oxaliplatine, avaient une survie médiane plus brève (3,3 mois) que les hétérozygotes (12,8 mois)



et que les homozygotes sauvages (17,4 mois), et ce résultat a été confirmé dans notre équipe (Le Morvan et al., 2007). La seconde étude (Gurubhagavatula et al., 2004) a montré que les homozygotes variants pour le codon 312 et traités pour un cancer du poumon non à petites cellules avaient eux aussi une survie diminuée par rapport aux hétérozygotes et aux homozygotes communs. Ces résultats sont paradoxaux, car on s'attendrait à ce que les patients porteurs du polymorphisme, ayant une protéine *à priori* moins efficace que la protéine sauvage (puisque le risque de cancer est plus élevé chez les sujets variants), soient plus sensibles au traitement par un agent endommageant l'ADN que les patients de génotype commun. Une étude plus récente réalisée *in vitro* n'a détecté aucune différence entre les différents variants de la protéine XPD, en termes d'activité de transcription et de réparation (Lainé et al., 2007). De nombreuses études continuent pourtant d'être publiées au sujet du lien entre les polymorphismes du gène *ERCC2* et le risque de cancers.

- Plusieurs polymorphismes fréquents ont été identifiés pour le gène *XPE (DDB1)*, mais aucun n'a été rapporté comme associé à un risque de cancers. En revanche, le gène codant pour la petite sous-unité *DDB2* a été décrit comme possédant deux SNPs introniques (rs830083 et rs3781620) associés à un risque augmenté de cancers du poumon (Hu et al., 2006).
- Il a été décrit que le polymorphisme Arg415Gln (rs1800067) du gène *ERCC4 (XPF)* était associé au risque de survenue de cancers du sein (Jorgensen et al., 2009).
- Un polymorphisme du gène *ERCC5 (XPG)* a été découvert au niveau de l'exon 15 (asp1104his, rs17655), avec une fréquence allélique d'environ 30 % (Kumar et al., 2003). Le polymorphisme de *ERCC5* a été parfois associé à une diminution de risque de cancer (Jeon et al., 2003) mais parfois à une augmentation (Kumar et al., 2003). Par ailleurs, une déficience de la protéine XPG a été observée dans une lignée cellulaire résistante à un nouvel agent alkylant, la trabectédine (ET-743) (Takebayashi et al., 2001).
- Un polymorphisme synonyme du gène *ERCC1* (asn118asn, rs11615) semble affecter l'expression de son ARN messager ; ce SNP est en outre associé à la réponse clinique aux agents anticancéreux platinants (Park et al., 2003)
- Un haplotype du gène *ERCC6 (CSB)* a été décrit comme associé à un risque accru de cancer du poumon (Ma et al., 2009).

Il existe de très nombreuses études cliniques s'efforçant d'associer des polymorphismes génétiques de gènes du NER avec le risque de survenue de cancers ou avec la réponse aux agents anticancéreux ; en revanche, peu de travaux ont été entrepris pour décrypter le mécanisme qui peut expliquer cette association. C'est dans cette optique que nous avons voulu concentrer une partie de notre travail.

## 4. Présentation du travail expérimental

L'objectif de ce travail a été de déterminer de nouveaux marqueurs génétiques de la réponse aux agents anticancéreux.

1. Nous avons utilisé le modèle du panel du NCI afin d'établir les pistes à suivre pour ce travail de recherche. Ainsi, nous avons mis en œuvre un génotypage des 60 lignées du NCI par PCR-RFLP et pyroséquençage, pour les polymorphismes des gènes *XPA*, *XPC*, *ERCC1*, *ERCC2* (Asp312Asn et lys751gln) et *ERCC5* (asp1104his). Nous avons ensuite recherché les corrélations significatives pouvant exister entre l'un de ces polymorphismes et la sensibilité des lignées à un médicament anticancéreux. Nous avons également étudié la relation entre le polymorphisme du gène et son niveau d'expression afin de savoir si les polymorphismes étudiés avaient un impact sur le niveau d'expression des gènes concernés. Enfin, nous avons tenté de prédire l'impact du polymorphisme entraînant le changement d'un acide aminé sur la protéine par analyse *in silico* de la structure de celle-ci.
2. Afin d'étudier le rôle, dans la réponse cellulaire aux agents anticancéreux, des polymorphismes de gènes pour lesquels une association avait été identifiée à l'étape précédente, nous avons choisi d'établir des clones cellulaires stables, exprimant l'un ou l'autre des variants des gènes codant pour ces protéines et de tester comparativement différents paramètres, dont la réponse à des médicaments anticancéreux (génotoxiques ou non) et à une irradiation UV. Pour cela, il a fallu identifier des lignées cellulaires humaines immortalisées n'exprimant pas la protéine à étudier de manière fonctionnelle, afin qu'il n'y ait pas de confusion avec l'activité et/ou l'« interactome » de la protéine endogène. Nous avons choisi d'utiliser des lignées fibroblastiques humaines immortalisées, issues de patients XP ayant une déficience sévère de la réparation par NER, c'est-à-dire possédant une mutation inactivatrice des deux allèles du gène à étudier, afin que ne subsiste pas d'activité enzymatique de la protéine concernée dans ces lignées. Lorsqu'une association entre un polymorphisme et l'expression du gène correspondant a été identifiée, nous avons entrepris des études fonctionnelles de l'extinction de la protéine par méthode anti-sens.
3. Enfin, le but de ce travail étant de contribuer à l'avancement de l'individualisation des traitements anticancéreux par chimiothérapie, nous avons mis en œuvre une étude clinique rétrospective, basée sur le génotypage du tissu sain et l'étude de la réponse aux patients traités ou non par l'agent anticancéreux qui nous intéresse.

---

# Matériel et Méthodes

---

## 1. Outils et matériels biologiques

### 1.1. Souches bactériennes

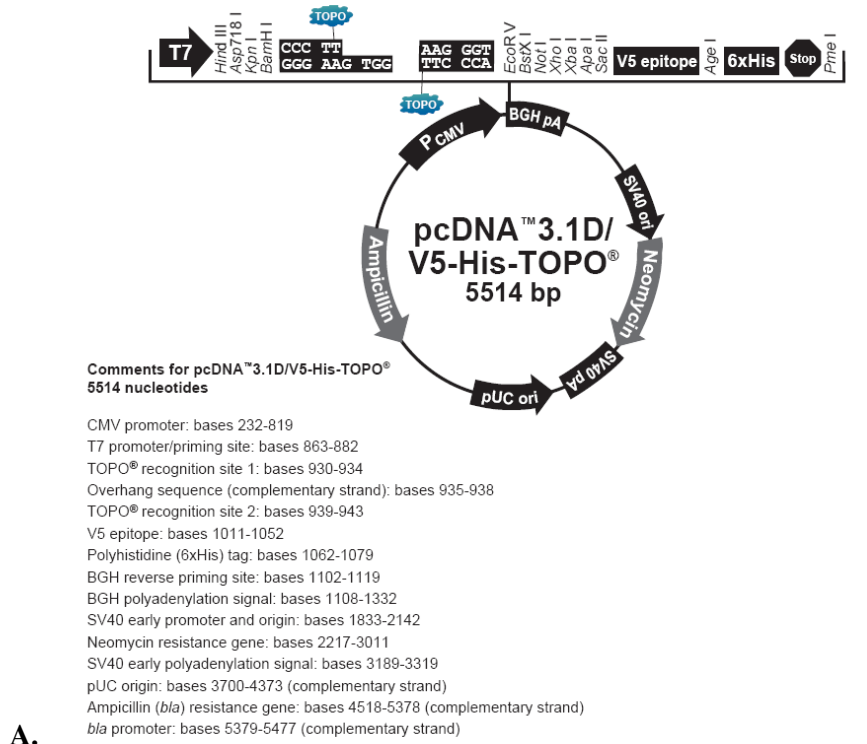
Nous avons utilisé les souches bactériennes suivantes :

- TOP10 : F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1  $\lambda$ - (Invitrogen). Cette souche a été utilisée dans les étapes de clonage.
- XL10-Gold : Tetr,  $\Delta$ (mcrA)183,  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac Hte, [F', proAB, lacIqZ $\Delta$ M15, Tn10(tetr) Amy Camr]a (Stratagene). Cette souche a été utilisée dans les étapes d'amplification de vecteurs issus de mutagenèse dirigée.
- DH10B : F-, mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139,  $\Delta$ (ara, leu)7697, galU, galK,  $\lambda$ -, rpsL(strr), nupG (Ozyme). Cette souche a été utilisée dans les étapes de clonage.
- STBL2 : F- mcrA  $\Delta$ (mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1lon gyrA96 thi supE44 relA1  $\lambda$ -  $\Delta$ (lac-proAB) (Invitrogen). Cette souche a été utilisée dans les étapes de clonage de séquences instables, afin d'éviter les recombinaisons.

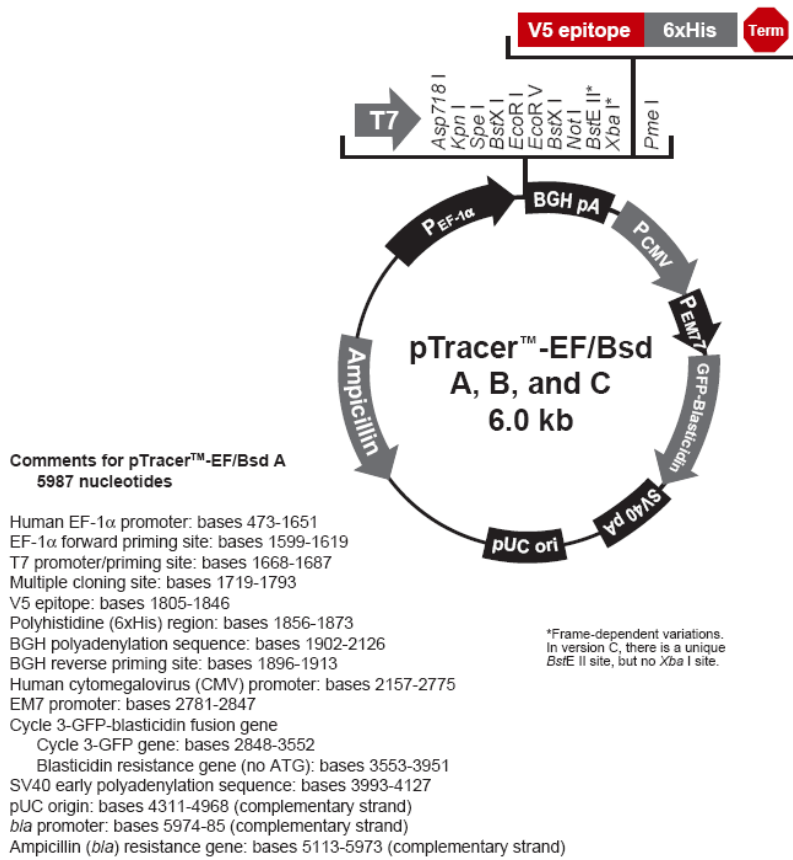
### 1.2. Vecteurs de clonage et d'expression

Les vecteurs plasmidiques qui ont été utilisés sont pcDNA3.1 pour lequel le gène d'intérêt est sous la dépendance d'un promoteur « fort » de type CMV et pTRACER qui possède la séquence promotrice du facteur d'élongation EF1 $\alpha$  devant le site multiple de clonage.

Les vecteurs d'expression de type pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> TA (Invitrogen) et pTracer<sup>TM</sup>-EF/Bsd -B (Invitrogen) permettent tous deux, la production de protéines fusionnées à un épitope V5 et à un polypeptide hexahistidine à leur extrémité C-terminale (Figure 6).



A.



B.

**Figure 6.** Carte des plasmides. A. pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen)

B. pTracer™-EF/Bsd -B (Invitrogen).

## 2. Méthodes de culture bactérienne

### 2.1. Milieux de culture bactérienne

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Les milieux solides sont obtenus par l'addition de 2% d'agar (Sigma) avant la stérilisation.

Les antibiotiques (Ampicilline, Blastocidine) sont ajoutés aux milieux refroidis après la stérilisation.

Nous avons cultivé nos souches bactériennes dans du milieu LB (Milieu de Luria et Bertani modifié) : 1 % bactotryptone (Sigma) ; 0,5 % extrait de levure (Sigma); 1 % NaCl (Sigma). Le pH du milieu est ajusté à 7,5 avec de la soude. Ce milieu est utilisé avec un agent de sélection comme l'ampicilline (Sigma) à une concentration finale de 50 à 100 µg/ml. Seules les bactéries ayant intégré un plasmide qui leur apporte une résistance à l'ampicilline pourront se développer sur ce milieu sélectif. Ce milieu minimum est utilisé lors de la culture de bactéries.

Les antibiotiques et solutions pour milieux de culture sont réalisés aux concentrations suivantes : Solution d'ampicilline à 100 mg/ml dans l'eau ; Solution de blastocidine à 50 mg/ml dans l'eau ; Solution d'IPTG à 0,8 mol/l dans l'eau. Elles sont stérilisées par filtration sur membrane de porosité 0,22µm et stockées à -20°C à l'abri de la lumière.

### 2.2. Conditions de culture

Les cultures bactériennes sont réalisées à 37°C (ou 30°C pour la souche STBL2). Les cultures en milieu liquide sont soumises à une agitation constante d'environ 250 rpm dans un Erlenmeyer de capacité cinq fois supérieure au volume du milieu pour permettre une bonne oxygénation des bactéries.

### 2.3. Transformation des bactéries par méthode chimique

Cette technique a été utilisée pour l'amplification des produits de clonages. En présence de certains cations métalliques tels  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et de certaines molécules organiques telles que le DMSO et le PEG, les parois et les membranes bactériennes deviennent perméables par la formation de pores autorisant la pénétration de l'ADN.

Toutes les étapes sont effectuées stérilement : 10 à 30 ng de plasmides sont ajoutés à 50 µl de bactéries chimio-compétentes TOP10 (Invitrogen) préalablement décongelées sur la glace, le tout est incubé de 30 à 60 minutes dans la glace. La transformation est induite par un choc thermique d'une minute à 42°C. Après une nouvelle incubation de 5 minutes sur glace, on ajoute 250 µl de milieu SOC, puis les bactéries sont incubées 1 heure à 37°C avant d'être étalées sur le milieu gélosé. Les boîtes de Pétri sont mises à 37°C toute la nuit.

## 3. Extraction des acides nucléiques

### 3.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide du kit RNeasy (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur. Les ARN sont élués dans de l'eau exempt de RNase, puis ils sont dosés sur spectromètre Nanodrop (Labtech). Le spectre de 230 nm à 320 nm permet d'estimer la pureté des ARN alors qu'une électrophorèse sur gel d'agarose permet de vérifier leur intégrité.

### 3.2. Extraction des ADN génomiques

#### 3.2.1. À partir de lignées cellulaires

L'extraction des ADN génomiques à partir de lignées cellulaires en culture ou en culot a été réalisée à l'aide du kit DNeasy (Qiagen) ; ces ADN ont été dosés sur un spectromètre à plaque PowerWave (Bio Tek).

#### 3.2.2. À partir de coupes en paraffine

L'extraction des ADN à partir de coupe en paraffine nécessite une attention particulière en fonction du fixateur utilisé par les anatomo-pathologistes (formol ou Bouin de Hollande).

Le protocole d'extraction d'ADN génomique présenté a été adapté pour l'élimination du Bouin de Hollande.

Cette extraction d'ADN génomique à partir de blocs de tissu fixés et inclus en paraffine nécessite dans un premier temps de réaliser des coupes de 10 µm d'épaisseur au microtome.

*Déparaffinage* : Chaque lot de 5 à 10 coupes de tissu en paraffine est traité avec du xylène, au bain-marie à 65°C, sous agitation. Les coupes sont ensuite lavées deux fois par de l'éthanol absolu, puis traitées par deux lavages avec du carbonate de lithium afin d'éliminer le liquide de Bouin de Hollande. Avant d'être digérées, les coupes ainsi traitées sont lavées par du tampon TNE 1×, pour être au final reprises dans 500 µl de TNE 1×.

*Extraction de l'ADN génomique des coupes déparaffinées* : La digestion du tissu est alors réalisée en ajoutant 20 µl de protéinase K à 20 mg/ml aux 500 µl de TNE 1× contenant les coupes déparaffinées. L'ensemble est alors incubé à 55°C, sous agitation rotative jusqu'à complète digestion. L'ADN est alors précipité par 2,5 volumes d'éthanol absolu et 0,1 volume final d'acétate d'ammonium 3 M et le culot d'ADN génomique est repris par 100 µl de TE 1×. L'ADN génomique extrait est alors purifié sur colonne GFX (Amersham, GE Healthcare) selon le protocole préconisé par le fournisseur. La purification de l'ADN génomique repose sur le principe d'une colonne échangeuse d'anions de type GFX qui fixe l'ADN. L'ADN est ensuite lavé puis élué avec de l'eau Millipore par centrifugation.

*Contrôle* : La qualité de l'ADN génomique élué est contrôlée sur un gel d'agarose en présence de BET.

Suivant les applications qui suivent l'extraction, il faut tenir compte du fait que ces ADN sont très fragmentés (dû au fixateur utilisé) et qu'il est quasiment impossible d'obtenir une pureté compatible avec une conservation à long terme. Dans ces conditions, il faudra tenir compte, par exemple pour une PCR que les fragments amplifiables pourront difficilement faire plus de 200 pb et que des inhibiteurs, comme le cuivre, pourront diminuer le rendement de la PCR.

### **3.3. Extraction des ADN plasmidiques**

L'extraction des ADN plasmidiques est réalisée à l'aide des kits Mini-, Midi-, ou Maxi-prep (Qiagen) en fonction du volume de la culture selon les recommandations préconisées par le fournisseur.

### **3.4. Purification d'acides nucléiques**

#### **3.4.1. Précipitation des réactions de séquençage**

La précipitation des produits de séquençage se fait par l'acétate de sodium (stock de sodium acétate 3,3 mol/l pH 5) en présence d'éthanol froid à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pour un volume de solution d'ADN à précipiter, on ajoute 0,1 volume d'acétate de sodium stock et 2 volumes d'éthanol absolu. On centrifuge le mélange à 14 000 rpm, 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ , on élimine le surnageant, puis le culot est lavé par 3 volumes d'éthanol à 70 % préparée extemporanément. On centrifuge de nouveau le mélange à 14 000 rpm, 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  et on élimine le surnageant. Le culot est séché sous vide à l'abri de la lumière.

#### **3.4.2. Purification de fragments d'ADN sur colonne de silice**

La purification des fragments d'ADN inclus dans de l'agarose est réalisée sur colonne GFX (GE Healthcare) après découpage de la bande sous UV. L'ADN est ensuite élué avec de l'eau Millipore.

#### **3.4.3. Purification des acides nucléiques par extraction organique**

Cette opération inactive toutes les enzymes résiduelles et élimine les protéines qui précipitent à l'interphase. Un volume de phénol/chloroforme (1:1) est ajouté au volume à extraire. Après une centrifugation de 2 mn à 12000 rpm, la phase supérieure est prélevée et un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24:1) est ajouté afin d'éliminer toutes traces de phénol. Une nouvelle centrifugation de 2 minutes à 12000 rpm permet d'extraire la phase supérieure et l'ADN est précipité par l'ajout de 2 volumes d'éthanol froid à 95 %. Le tout est centrifugé à  $4^{\circ}\text{C}$ , 12 000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est lavé à l'éthanol à 70 %, séché et repris dans le volume d' $\text{H}_2\text{O}$  adéquat.

#### 3.4.4. Concentration des acides nucléiques

Pour certaines réactions, les acides nucléiques en solution aqueuse doivent être concentrés. La concentration des acides nucléiques est alors réalisée par une précipitation à l'éthanol absolue.

Les acides nucléiques sont précipités par 2,5 volumes d'éthanol pur froid en présence d'acétate de sodium 0,3 M final. La réaction s'effectue à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit ou à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant une heure. Le microtube de 1,5 ml est centrifugé 30 minutes à 12000 g, puis le culot est lavé avec de l'éthanol à 70 %. Il est ensuite séché puis dissous dans un volume adéquat de TE 1× pH 8 pour obtenir la concentration désirée.

### 4. Manipulations et analyse de l'ADN

#### 4.1. Électrophorèse des ADN sur gel d'agarose

Selon la taille des fragments des ADN à séparer, un gel est préparé à une concentration d'agarose appropriée (0,8 à 2 %) dans le tampon TAE 0,5× (Tris-acétate 40 mM ; EDTA 1 mM pH 8,0). Le BET est ajouté à une concentration finale de 10 µg/ml. Le gel solidifie par refroidissement. La taille des fragments d'ADN séparés par électrophorèse peut-être déterminée par comparaison avec la position de marqueurs de taille (Invitrogen) soumis simultanément à une électrophorèse sur le même gel.

Avant les dépôts, 0,2 volume du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25 % (Invitrogen) ; glycérol 30 %) est ajouté aux échantillons d'ADN. Ces derniers sont ensuite déposés et séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose dans un tampon de TAE 0,5× (Tris-acétate 40 mM ; EDTA 1 mM, pH 8,0). Les acides nucléiques chargés négativement migrent vers l'anode lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique.

L'ADN est repéré par fluorescence aux UV après avoir été mis en contact avec du bromure d'éthidium (BET stock à 10 mg/ml).

#### 4.2. Estimation de la quantité d'ADN

Une lecture de l'absorbance à 260 nm permet de déterminer la pureté de l'ADN : en effet, le rapport de densités optiques (DO) 260 nm/280 nm est normalement voisin de 1,7. Un rapport plus élevé indique une contamination par des ARN ; un rapport plus faible indique une contamination par les protéines (280 nm) ou du phénol (270 nm). De plus, le rapport 260 nm/230 nm permet d'estimer si les sels utilisés pour la précipitation de l'ADN ont bien été éliminés : ce rapport doit être supérieur à 1,7.

Lorsque l'ADN est pur, la quantité d'ADN peut être appréciée d'après la lecture de la DO à 260 nm.  $1 \text{ DO (à } 260 \text{ nm)} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$  pour l'ADN double brin ou  $40 \text{ ng}/\mu\text{l}$  pour l'ADN simple brin.



### 4.3. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Dans les expériences de sous-clonage, les plasmides cibles et donneurs sont digérés par 10 U de l'enzyme sélectionné (ou 10 U de chaque enzyme sélectionné) pour 5 µg d'ADN, avec 5 µl de tampon 10× adéquat, 0,5 · l de BSA 100x, H<sub>2</sub>O q.s.p. 50 · l. La digestion est effectuée à 37°C pendant 1 h.

Un contrôle de digestion est effectué sur 2 · l de ce mélange par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %, avec migration à 100 V pendant 20 min.

### 4.4. Déphosphorylation des extrémités 5' phosphate du vecteur

Les phosphatases dites alcalines, car actives à pH alcalin, catalysent l'élimination d'un groupement phosphate en 5' d'une chaîne d'ADN. On utilise des phosphatases alcalines d'origine bovine (« CIP », *calf intestinal phosphatase*) ou d'origine bactérienne (« BAP »).

Après linéarisation du vecteur plasmidique, ce dernier est déphosphorylé par l'enzyme CIP (Ozyme) afin d'éviter une fermeture du plasmide sur lui-même, ce qui est appelé l'auto-ligation. Lors de l'insertion du fragment d'ADN double brin à étudier, celui-ci apporte ces deux groupements phosphate en 5' et participe à deux des quatre liaisons esters qui sont nécessaires à la formation d'un ADN double brin recombinant circulaire clos. La réaction se fait directement sur le produit de digestion en présence de tampon CIP 10× (Tris-HCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH 9) et de 200 unités de CIP à 200 U/· l. Le volume réactionnel est ajusté à 50 µl et la réaction est conduite à 37°C pendant 1 h. Il est extrêmement important d'inactiver efficacement l'enzyme pour que celle-ci n'interfère pas avec la suite des étapes de clonage. En effet, les traces de CIP peuvent déphosphoryler le fragment d'intérêt et empêcher toute ligation.

On termine par une inactivation par chauffage à 65°C pendant 30 minutes puis une extraction au phénol-chloroforme.

### 4.5. Séparation et purification de fragments d'intérêt

Les fragments d'intérêt sont extraits et purifiés sur gel d'agarose. Le produit de la réaction de digestion est déposé sur un gel d'agarose à 1 %. Après migration, la bande de gel contenant l'insert à purifier est découpée sous lumière UV avec une lame de scalpel stérile. Le fragment de PCR est ensuite purifié par le système de purification de fragment de PCR sur colonne GFX (GE Healthcare). Le fragment ainsi préparé est utilisable pour sa ligation dans le vecteur de choix préalablement digéré et déphosphorylé.

## 4.6. Ligation

Deux stratégies ont été utilisées :

- le clonage par la méthode Topo-TA qui consiste en l'ajout spécifique d'une adénine aux extrémités 5' du produit PCR (séquence d'intérêt), qui permet à l'ADN topoisomérase I fixée à chaque extrémité 3' du vecteur (ouvert et avec aux extrémités 5' une thymidine) de réaliser une ligation simple brin qui sera complétée par la bactérie hôte après transformation.
- le sous-clonage à partir des vecteurs (pcDNA3.1), construits par la méthode Topo-TA, dans un vecteur « classique » (pTRACER).

Cette étape est la plus délicate du clonage. L'insertion du fragment d'intérêt préalablement digéré et purifié dans un vecteur préalablement déphosphorylé est catalysée par la ligase du phage T4 (Roche); elle requiert la présence d'ATP et s'effectue dans les conditions suivantes : les quantités d'ADN de l'insert et du vecteur sont au préalable appréciées sur un gel d'agarose, par rapport à un marqueur de poids moléculaire quantifié (NEB).

Conditions de ligation :

Composants	Quantité ou volume
Vecteur linéarisé et déphosphorylé	50 ng
Fragment PCR linéarisé et digéré	100 à 250 ng
Tampon ligase 10×	1 · 1
Ligase T4 ADN	1 unité
Eau millipore stérile	qsp 10 · 1

L'incubation est réalisée 15 mn à température ambiante. La stœchiométrie relative entre le fragment à insérer et le vecteur est déterminante. La pureté, la qualité du fragment digéré, purifié et du vecteur linéarisé, déphosphorylé sont également à considérer. On teste donc systématiquement plusieurs rapports stœchiométriques entre le vecteur plasmidique linéarisé et l'insert à attacher (1 : 1, 1 : 3, 1 : 6). L'absence de phosphatase ou de toute enzyme de restriction est absolument nécessaire à la réussite de la ligation. Les traces de phosphatases seraient susceptibles de déphosphoryler l'insert ce qui empêcherait toute ligation. Des traces d'enzymes de restriction pourraient digérer les vecteurs qui auraient intégré l'insert au cours de la ligation.

Parallèlement, on réalise trois témoins de ligation : un témoin avec le vecteur linéarisé mais en absence de ligase ; un témoin avec l'insert et le vecteur toujours en absence de ligase ; un témoin contenant uniquement du vecteur linéarisé et de la ligase.

Afin de vérifier l'intégrité du fragment cloné, on contrôle sa séquence par séquençage des deux brins afin de s'assurer que la polymérase n'a pas introduit de mutation. Le séquençage des ADNc entier a été effectué par une société prestataire de service (Cogenics).

#### 4.7. Amplification par PCR « Polymerase Chain Reaction » (réaction en chaîne par polymérase)

Cette méthode enzymatique très utilisée est très efficace pour l'amplification de fragments d'ADN *in vitro*. Elle repose sur la répétition de trois phases :

**1. Dénaturation** : le tube est chauffé quelques secondes à 94-95°C. Les double-brins d'ADN se séparent et l'ADN est dénaturé.

**2. Hybridation** : la température est rapidement abaissée à 55°C (généralement  $T_m - 5^\circ\text{C}$  en fonction du tampon et de la stringence nécessaire à la spécificité du produit). Les amorces « reconnaissent » leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles. Elles s'hybrident chacune sur son brin respectif. Cette étape dure généralement 30 secondes.

**3. Élongation** : la température du tube est ensuite augmentée à 68-72°C, ce qui permet à la Taq polymérase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5' vers 3'. Les nucléotides ne sont pas incorporés de façon aléatoire mais en fonction de la matrice, par complémentarité des nucléotides. Cette étape dure une minute par kilobase amplifiée.

Composition du mélange réactionnel de PCR :

Composant	Volume : Concentration ou quantité
Tampon 10×	5 $\mu\text{l}$
Matrice (40 ng/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$ : 40 ng
Mélange des 4 dNTP à 10 mM	1 $\mu\text{l}$ : 200 $\mu\text{mol/l}$
Amorce sens (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$ : 200 nmol/l
Amorce anti-sens (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$ : 200 nmol/l
Enzyme Taq platinum polymerase (Invitrogen) (5 unités/ $\mu\text{l}$ )	0,2 $\mu\text{l}$ : 1 unité
Eau Millipore stérile	40,8 $\mu\text{l}$

Le mélange des 4 dNTPs contient les dATP, dGTP, dCTP et dTTP. L'enzyme Taq Polymerase Platinum (Invitrogen) est ajoutée en dernier. À l'issue de la réaction, une aliquote de la réaction est analysée sur gel d'agarose 1 à 2 % (m/v) en tampon TAE 0,5× (Tris Acétate EDTA).

Le tableau 3 présente les séquences des oligonucléotides que nous avons utilisés pour les réactions de PCR.

région	orientation	séquence	Tm (°C)	Enzyme	MgCl2	programme	Application	ADN amplifié	enzymes de RFLP
ERCC1 118	sens	CCTGTGGTTATCAAGGGTCA	57,9	Taq Platinum	1,5µM	95°C 2' ; 45 cycles (95°C 20"/60°C 20"/72°C 20") ; 72°C 2'	pyroséquençage	ADNg : 111 pb	-
ERCC1 118	anti-sens	AGCACATAGTCGGGAATTACG	58,9						
XPA 114	sens	CGTGGAGCTGGGAGCTAG	61,8	Taq Platinum	1,5µM	95°C 2' ; 45 cycles (95°C 20"/60°C 20"/72°C 20") ; 72°C 2'	pyroséquençage	ADNg : 111 pb	-
XPA 114	anti-sens	CTCCGCGGGTTGCTCTAA	60,6						
XPC 499	sens	TGATGAGGATCCGAACCTG	58,1	Taq Platinum	1,5µM	95°C 2' ; 45 cycles (95°C 20"/60°C 20"/72°C 20") ; 72°C 2'	pyroséquençage	ADNg : 111 pb	-
XPC 499	anti-sens	TTTCCTCCTGCTCACAGAACA	59,1						
XPC 939	sens	GCAGCTTCCCACCTGTTC	62,1	Taq Platinum	1,5µM	95°C 2' ; 45 cycles (95°C 20"/60°C 20"/72°C 20") ; 72°C 2'	pyroséquençage	ADNg : 111 pb	-
XPC 939	anti-sens	TGGTGGGTGCCCTCTAG	63						
XPD 312	sens	CAGGATCAAAGAGACAGACGA	58,2	Taq Platinum	1,5µM	95°C 2' ; 35 cycles (95°C 1'/60°C 30"/72°C 30") ; 72°C 2'	RFLP	ADNg : 262 pb ADNc : 188 pb	Hpy99I
XPD 312	anti-sens	TCAGGAAGCCCAGGAAAT	55,8						
XPD751	sens	CCTCTGTCTCTGCAGGAGGA	62,6	Taq Platinum	1,5µM	95°C 2' ; 35 cycles (95°C 1'/60°C 30"/72°C 30") ; 72°C 2'	RFLP	ADNg : 250 pb	PstI
XPD751	anti-sens	CCTGCGATTAAAGGCTGTGGA	61,1						
XPD 751 c	sens	GTACTTCTGCGGCAGAT	58,7	Taq Platinum	1,5µM	95°C 2' ; 35 cycles (95°C 1'/60°C 30"/72°C 30") ; 72°C 2'	RFLP	ADNg : 607 pb ADNc : 120 pb	PstI
XPD 751 c	anti-sens	TGAGCAATCTGCTCTATCCT	57,5						
XPD ORF	sens	GCCGGCGCCATGAAGCTCAA	67,6	pfu turbo HS	1µM	95°C 2' ; 35 cycles (95°C 1'/60°C 1'/68°C 2,5') ; 68°C 10'	clonage	ADNc : 2289 pb	-
XPD ORF	anti-sens	GAGCTGCTGAGCAATCTGCT	62,5						
XPD 751 muta	sens	GAATCAGAGGAGACGCTGCAGAGGATAGAGCAGATTGCT	83,7	pfu ultra	1,5µM	95°C 2' ; 25 cycles (95°C 2'/60°C 30"/68°C 8') ; 68°C 10'	mutagenèse dirigée	ADNp : 8336 pb	-
XPD 751 muta	anti-sens	GAGCAATCTGCTCTATCCTCTGCAGCGTCTCCTCTGATT	83,7						
XPG 1104	sens	TCAAGCCTGAAAAGAAAGAGG	54,6	Taq Platinum	1,5µM	95°C 2' ; 35 cycles (95°C 1'/60°C 30"/72°C 30") ; 72°C 2'	RFLP	ADNg : 211 pb ADNc : 211 pb	NlaIII
XPG 1104	anti-sens	CGGGAGCTTCCTTCACTGAGT	62,8						
XPG ORF	sens	AGCCGCCTCATGGGGTCCA	70,7	pfu turbo HS	1µM	95°C 2' ; 35 cycles (95°C 1'/60°C 1'/68°C 3,5') ; 68°C 10'	clonage	ADNc : 3564 pb	-
XPG ORF	anti-sens	TTTCCTTTTCTTCCCCTCGCACGTCT	65						
XPG 1104 muta	sens	CATCTGATGGATCTTCAAGTGAAGATGCTGAAAGTTCAT	78,5	pfu ultra	1,5µM	95°C 2' ; 25 cycles (95°C 2'/60°C 30"/68°C 9,5') ; 68°C 10'	mutagenèse dirigée	ADNp : 9611 pb	-
XPG 1104 muta	anti-sens	GATGAACCTTCAGCATCTTCACTTGAAGATCCATCAGAT	78,5						
T7 prom	sens	TAATACGACTCACTATAGGG	52			séquençage			
BGH rev	anti-sens	TAGAAGGCACAGTCGAGG	57,5			séquençage			
XPD 3'UTR endo	anti-sens	GAGTCACCAGGAACCGTTTAT	58,1			50°C 2' ; 95°C 2' ; 45 cycles (95°C 1'/60°C 30"/72°C 15"/80°C 30") ; 72°C 2'	PCR quantitative		
3'UTR pTRACER	anti-sens	GGATAGGCCTTACCTTCGAACC	58,3				PCR quantitative		
XPG 3' UTR endo	anti-sens	GATGACGATGGAGGAAAGA	57,8				PCR quantitative		
GFP	sens	TACAAGACGCGTGCTGAAGT	61	1,5µM	1,5µM	50°C 2' ; 95°C 2' ; 45 cycles (95°C 1'/60°C 30"/72°C 15"/80°C 30") ; 72°C 2'	PCR quantitative	ADNc : 159 pb	-
GFP	anti-sens	CTTTTGTGTTGCTGCCGTGA	56,3						
GAPDH	sens	CCTGGTATGACAACGAATTT	53,4	1,5µM	1,5µM	50°C 2' ; 95°C 2' ; 45 cycles (95°C 1'/60°C 30"/72°C 15"/80°C 30") ; 72°C 2'	PCR quantitative		-
GAPDH	anti-sens	GTGAGGGTCTCTCTCTCTCT	59,3						
XPG 1104 biot	anti-sens	TTTCGCAGCTGTTCTCCTTTGTA	60	1,5µM	1,5µM	-	pyroséquençage	ADNg : 159 pb	-
XPG 1104 seq	sens	TCTGATGGATCTTCAAGTG	52,7						
XPD 751 biot	sens	TGGAGCAGCTAGAATCAGA	56,9	1,5µM	1,5µM	-	pyroséquençage		-
XPD 751 seq	sens	GCAATCTGCTCTATCCTC	53,7						
siXPD		CCTCCTTGCTAACTTTGCCACCCCTT	64,6	-	-	-	-	-	-
siXPD		GGTGCCCATACTTCCTTGCTCGATA	75,3	-	-	-	-	-	-

Tableau 3. Liste des oligonucléotides que nous avons utilisés dans notre étude.

## 4.8. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée par PCR est réalisée avec le kit Stratagen QuikChange® II XL (pfu Ultra et XL10Gold), en deux étapes : une première série de réactions est réalisée sur le fragment à modifier avec une paire d'oligonucléotides complémentaires, comprenant le ou les nucléotides à modifier. Les oligonucléotides de mutagenèse sont des 40-mers avec un minimum de 10 bases s'appariant strictement à la matrice de part et d'autre de la mutation, avec un  $T_m$  idéal supérieur à 78°C (<http://www.stratagene.com/QPCR/tmCalc.aspx>).

Le mélange de PCR est composé de 10 ng d'ADN matrice, 125 ng d'amorces sens et antisens, 1 µl de dNTP, 3 µl de Quick solution, 5 µl de tampon spécifique 10×, 2,5 U d'ADN polymérase (PfuUltra HF DNA polymerase), H<sub>2</sub>O qsp 50 µl. Les conditions de la PCR de cette mutagenèse sont une dénaturation initiale de 2 mn à 95°C, suivie de 18 cycles composés d'une dénaturation de 30 s à 95°C, d'une hybridation à 60°C pendant 30 s, puis d'une élongation à 68°C pendant 1 mn par kb à synthétiser. Enfin la température de 68°C est maintenue pendant 7 mn supplémentaires après le dernier cycle. Une digestion des produits de mutagenèse par 10 U de DpnI introduit dans les 50 µl de solution PCR permet l'élimination des plasmides ayant servi de matrice (méthylés). Elle est effectuée à 37°C pendant 1 h.

## 4.9. Génotypage

### 4.9.1. PCR-RFLP

Afin d'identifier l'allèle d'un gène, une PCR – RFLP est réalisée. En effet, le caractère sauvage ou variant de l'allèle peut modifier le site de restriction d'une enzyme. Une PCR est donc réalisée pour amplifier la zone contenant le nucléotide variant (SNP). Ainsi, la digestion est réalisée sur les produits de PCR qui ne contiennent qu'un site de restriction ou aucun site de restriction de l'enzyme sélectionné, suivant l'allèle amplifié. La digestion des produits de PCR est réalisée dans 20 µl avec 20 U d'enzyme et 10 µl de la solution de PCR. Le profil de digestion est obtenu par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 %, avec une migration de 1 h à 120 V. Une coloration par bain au bromure d'éthidium permet une observation sous une lampe à UV.

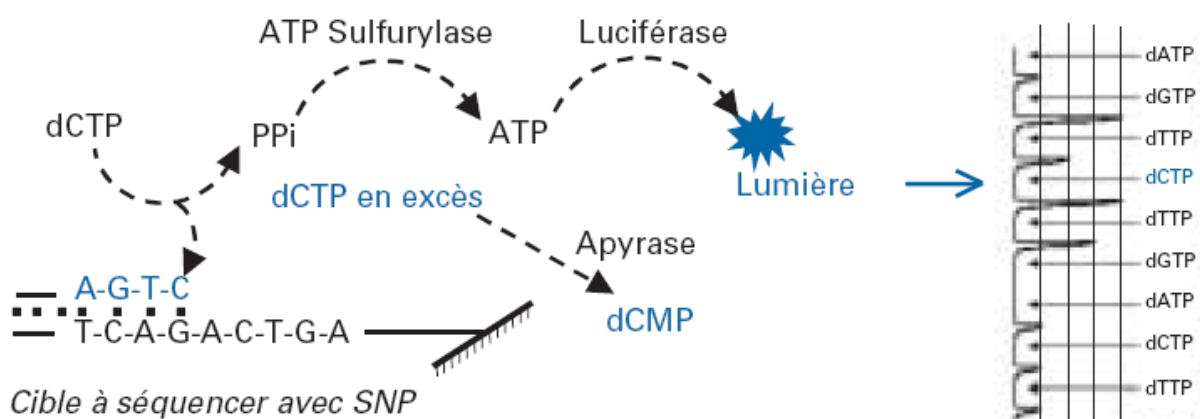
### 4.9.2. Séquençage

La réaction de séquençage (selon la méthode de Sanger) est réalisée avec le kit BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Elle est constituée de 3,5 µl de Sequencing buffer 5×, 2 µl de big dye terminator, 1 µl d'amorce à 10 mM (Eurogentec), 1 à 3 ng d'ADN à séquencer, H<sub>2</sub>O qsp 20 µl. Les conditions de cette réaction de polymérisation sont une dénaturation initiale de 95°C pendant 5 mn, suivie de 30 cycles composés d'une dénaturation de 30 s à 95°C, d'une hybridation de

10 s à 50°C, et enfin d'une élongation à 60°C pendant 4 mn. L'ADN est alors précipité par addition à la réaction de séquençage de 2 µL d'EDTA 125 mM, 2 µl d'acétate de sodium 3 M, 50 µl d'éthanol à 100%, laissés 15 mn à température ambiante. Une centrifugation pendant 30 mn à 11000 rpm est réalisée. Le surnageant est alors totalement retiré, et lavé par 250 µl d'éthanol à 70 %. Une nouvelle centrifugation à 11000 rpm pendant 15 mn est réalisée. Le surnageant est éliminé, et le culot est laissé sécher à l'obscurité. Une fois sec, le culot est repris dans 10 µl de formamide. Les produits de la réaction de séquençage sont analysés avec le séquenceur 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystems Hitachi. Avec cette méthode, nous pouvons séquencer jusqu'à 700 nucléotides à partir de l'amorce.

#### 4.9.3. Pyroséquençage

Il s'agit d'une technique de séquençage utilisant une mesure de luminescence, par le système luciférine/luciférase, produite par le pyrophosphate libéré lors de l'incorporation de nucléotides triphosphates. Une amorce oligonucléotidique spécifique de la cible recherchée est utilisée pour le séquençage. Celle-ci s'hybride avec le produit de PCR dénaturé à proximité du SNP recherché. Les quatre désoxyribonucléotides triphosphates sont ajoutés successivement en présence d'un cocktail d'enzymes. Lorsque le dNTP ajouté est complémentaire du nucléotide situé sur le brin à séquencer, il est incorporé par l'ADN polymérase et libère un groupe pyrophosphate. Ce groupement pyrophosphate est détecté par une cascade enzymatique induisant des réactions générant des pics de lumière via la luciférase. À chaque nucléotide incorporé correspond un pic lumineux et la séquence peut alors être déterminée (Figure 7).



**Figure 7.** Principe du pyroséquençage

## 5. Culture cellulaire

### 5.1. Lignées cellulaires utilisées

Les lignées cellulaires utilisées pour ces travaux sont des lignées fibroblastiques immortalisées issues de patients atteints de Xeroderma Pigmentosum (XP) :

- XP6BE (de phénotype XPD [-/-]), fournie par le Coriell Institute. Les allèles du gène *ERCC2* portés par ces cellules donnent une protéine mutée au niveau de l'acide aminé 683 (Arg > Trp) pour l'un, et une protéine ayant une délétion entre les résidus d'acides aminés 36 et 61 (provenant d'une délétion des nucléotides 106 à 183) pour l'autre. Les deux protéines synthétisées sont absolument non fonctionnelles (phénotype de déficience sévère).
- 94RD27 (de phénotype XPG [-/-]), fournie gracieusement par S.G. Clarkson. Les deux allèles du gène *ERCC5* portés par ces cellules comportent une délétion de la thymine 2972, ce qui provoque un décalage du cadre de lecture, qui lui-même entraîne le changement d'un codon tyrosine par un codon stop (Tyr980ter). Cela a aussi provoqué chez le patient dont est issue la lignée 94RD27, un syndrome de Cockayne (CS), le phénotype est donc XP-CS.

D'autres lignées cellulaires ont été utilisées pour ces travaux, ce sont des lignées dérivées de cellules tumorales humaines, cinq lignées colorectales : HCT15, HT29, SW620, Colo205, HCC-2998 ; deux lignées de cancer du sein : MCF7 et MDA-MB-231/ATCC ; deux lignées de cancer de la prostate : PC-3 et DU145 ; une lignée de leucémie : HL-60 et une lignée de cancer du poumon : A549/ATCC, fournies par le *National Cancer Institute*, Bethesda.

### 5.2. Principes généraux de culture

La culture cellulaire nécessite l'emploi de précautions très strictes pour éviter toute contamination.

#### 5.2.1. Conditions de culture

Les cellules en suspension sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) contenant du GlutaMAX™ I (L-Alanyl-L-Glutamine) et les cellules adhérentes dans du DMEM (Gibco, Invitrogen) contenant du GlutaMAX™ I, 4500 mg/L D-glucose, 110 mg/l de pyruvate de sodium. Ces milieux sont additionnés de sérum de veau fœtal à 10% (Pan Biotech). Les cellules ont été cultivées dans des plaques à 6, 12, 24 et 96 puits, des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre ou des flacons de 25, 75 ou 175 cm<sup>2</sup>. La culture s'effectue dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère saturée en humidité et contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.



### 5.2.2. Milieu de congélation

Quel que soit le type cellulaire, le milieu de congélation est le même. Il se compose de 50 % de sérum de veau fœtal, 40 % de milieu de culture DMEM et 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma). Les cellules ( $1 \text{ à } 10 \cdot 10^6$ ) sont congelées progressivement avec ce milieu dans des cryotubes de 1,5 mL au moins une nuit à  $-80^\circ\text{C}$  avant d'être transférées à  $-196^\circ\text{C}$  dans l'azote liquide pour une longue conservation.

### 5.2.3. Dissociation des cellules à la trypsine-EDTA

Dès que les cellules atteignent la confluence dans les boîtes de culture, un repiquage est réalisé. Les tapis cellulaires sont rincés avec du PBS 1×, pH 7,5, et une solution de trypsine-EDTA (Gibco, Invitrogen) est mise au contact des cellules. Les cellules sont alors placées 2 à 5 mn dans l'étuve à  $37^\circ\text{C}$  pour laisser agir la trypsine. Quand elles n'adhèrent plus au support, la trypsine est neutralisée par ajout d'au moins un volume de milieu de culture complet. La suspension cellulaire, récupérée dans un tube de 15 ou 50 ml, est alors centrifugée 5 min à 1000 rpm, puis les cellules peuvent être réensemencées à la dilution adéquate.

### 5.2.4. Comptage des cellules

Pour réensemencer des cellules, ou à l'occasion de certaines expériences, il est nécessaire de compter les cellules à l'aide d'un compteur de cellules : Coulter Z2 (Beckman Coulter). Après reprise du culot cellulaire dans du milieu de culture, 500  $\mu\text{l}$  sont prélevés et dilués 20 fois dans du NaCl 0,9%. Le comptage s'effectue ensuite sur cette dilution. À chaque passage d'une cellule dans l'ouverture de l'électrode du compteur, une dépolarisation est induite. Cette dépolarisation est comptabilisée comme correspondant à une cellule.

## 5.3. Courbes de croissance

Dans un premier temps, pour caractériser les lignées cellulaires, nous avons déterminé leurs temps de doublement. Cette mesure permet de réaliser les tests de cytotoxicité en respectant la durée du cycle cellulaire.

Les cellules sont ensemencées dans des plaques à 6 puits à raison de 5 000 cellules par puits. Les cellules sont cultivées pendant 8 jours en changeant le milieu de culture tous les deux jours. Chaque jour, les cellules contenues dans 3 puits sont décollées avec de la trypsine, puis comptées. Une courbe, représentant le nombre de cellules en fonction du temps de culture, est construite pour chaque lignée. Ces courbes sont caractérisées par une phase de latence, suivie d'une phase exponentielle de croissance, et enfin par un plateau. Le temps de doublement des lignées est déterminé au niveau de la phase exponentielle de croissance.

## 5.4. Les médicaments anticancéreux utilisés

Les médicaments anticancéreux utilisés proviennent de différents fournisseurs. Ils ont été dilués extemporanément dans des solutions spécifiques. Ces données sont répertoriées dans le tableau suivant.

Médicament	Fournisseur	Concentration	Solution de dilution
Taxol (paclitaxel)	Bristol-Myers Squibb	6 mg/ml	PBS
Cisplatine	Merck	1 mg/ml	PBS
Yondelis (Tabectédine)	Pharmamar	1 mg/ml	Éthanol

**Tableau 4.** Liste des médicaments anticancéreux utilisés

## 6. Les tests de cytotoxicité

Deux tests ont été utilisés pour mesurer la cytotoxicité des agents anticancéreux étudiés. Cette dernière peut être représentée par la concentration de médicament induisant 50 % d'inhibition de croissance ou par celle induisant 50 % d'inhibition de l'efficacité de clonage. Le premier est un test comparant la croissance d'une population cellulaire traitée pendant 24 heures par un médicament à celle d'une population non traitée ; le second est un test comparant les capacités de clonage en milieu semi-solide de populations cellulaires traitées et non traitées par un médicament.

### 6.1. Test d'inhibition de croissance

#### 6.1.1. Principe

Il repose sur la mesure d'une inhibition de croissance. Il utilise la réduction d'un sel de tétrazolium (le bromure de 3,4,5-diméthylthiazol-2,5-diphényl tétrazolium ou MTT) en formazan par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. Le MTT-formazan forme des cristaux violets, solubles dans le DMSO, et dont on peut évaluer la concentration par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 530 nm. Le test est réalisé avec un temps de contact de 72 heures entre les médicaments (à différentes concentrations) et les cellules. Afin d'établir les conditions optimales de sensibilité du test, il est nécessaire de déterminer le nombre de cellules à ensemercer et la durée de l'essai, qui doivent permettre aux cellules de rester en phase exponentielle de croissance au moment de la mesure. L'utilisation de cette technique pour évaluer la cytotoxicité des médicaments antitumoraux

sur les différentes lignées a nécessité quelques expériences préliminaires qui ont permis d'établir les conditions optimales de mesure.

### 6.1.2. Détermination de la concentration optimale d'ensemencement

Nous avons utilisé des plaques de culture à 96 puits, pour chacune des lignées. À  $J_0$ , une gamme de cellules comprise entre 100 et 10 000 cellules par puits estensemencée sur deux plaques différentes. Les cellules sont maintenues en culture dans les deux plaques pendant 48 heures pour la première et 120 heures pour la seconde. La croissance cellulaire, entre  $J_2$  et  $J_5$ , est alors évaluée par coloration au MTT et comparée pour chaque niveau d'ensemencement. Les niveaux d'ensemencement donnant la plus grande différence entre  $J_2$  et  $J_5$  sont retenus pour l'évaluation des effets des médicaments.

À partir de ces quatre concentrations cellulaires, nous déterminons celle qui donne le plus grand nombre de doublements entre  $J_2$  et  $J_5$  par comptage des cellules à l'aide du compteur de cellules.

### 6.1.3. Mesure de l'inhibition de croissance

Après ce calcul du nombre optimal de cellules à ensemenecer, il est possible de mettre en œuvre le test de cytotoxicité.

Les cellules, en phase exponentielle de croissance, sont décollées de leur support à l'aide de trypsine-EDTA (Gibco, Invitrogen). Après une remise en suspension dans du milieu de culture frais, les cellules sontensemencées dans des plaques à 96 puits dans un volume de 200  $\mu$ l à raison de 1000 cellules par puits (concentration déterminée dans les expériences préliminaires) puis placées dans un incubateur pendant 48 heures.

Le milieu de culture est ensuite remplacé par du milieu de culture frais contenant les concentrations appropriées des différents médicaments anticancéreux étudiés. Toutes les dilutions nécessaires sont effectuées extemporanément. Après une exposition au médicament de 72 heures, le milieu de culture est éliminé et la quantité de cellules estimée par coloration au MTT (5 mg de MTT par ml de PBS additionné de 900 % de milieu RPMI sans sérum, à raison de 200  $\mu$ l par puits).

La cytotoxicité d'un médicament est évaluée par son  $IC_{50}$ , c'est-à-dire la concentration de médicament qui entraîne une diminution de 50 % de la quantité de cellules, comparée au contrôle incubé simultanément sans médicament.

## 6.2. Mesure de l'efficacité de clonage

Ce test repose sur le principe qu'une cellule viable est capable de donner naissance à une colonie cellulaire. Cela permet de tenir compte de la quiescence cellulaire et de la mort cellulaire différée. L' $IC_{50}$  est la concentration du médicament pour laquelle il y a une diminution de 50 % du nombre de colonies formées par rapport aux cultures non traitées. L' $IC_{50}$  est la concentration du médicament pour

laquelle il y a une diminution de 50 % du nombre de colonies formées par rapport aux cultures non traitées.

### 6.3. Test de survie aux irradiations

Nous avons travaillé avec des cellules ayant un système NER déficient, et nous avons établi à partir de celles-ci des clones stables exprimant une forme active de la protéine qui était responsable de la déficience. Afin de sélectionner les clones exprimant la protéine fonctionnelle, nous avons réalisé des tests de survie aux UVC (254 nm).

Un million de cellules estensemencé dans des boîtes de 10 cm la veille du test. Après remplacement du milieu de culture par 10 ml de PBS 1×, différentes doses (0,4 J/m<sup>2</sup> à 4 J/m<sup>2</sup>) sont appliquées, à l'exception des boîtes témoins qui ne sont pas irradiées. 72h plus tard les cellules sont décollées à la trypsine puis comptées au compteur de cellules (Z2, Beckman).

Les courbes de survies des clones complémentés sont comparées au témoin négatif (clone transfecté par le vecteur vide).

## 7. Transfection cellulaire

Grâce à plusieurs méthodes de transfections cellulaires, nous avons pu mettre en place une approche de génétique inverse (étude des phénotypes de sous ou surexpression d'un gène).

### 7.1. Transfection de vecteurs plasmidiques

Les vecteurs contenant l'ADNc de l'un ou l'autre allèle du gène *ERCC2* ou du gène *ERCC5* ont été construits dans le but d'établir des clones cellulaires stables, c'est pourquoi nous avons choisi de linéariser les vecteurs avant de les transfecter. Le site unique de restriction est choisi dans une région qui n'est plus nécessaire par exemple dans le gène de résistance à l'ampicilline.

#### 7.1.1. Technique de transfection

La transfection des vecteurs plasmidiques dans les lignées humaines immortalisées XP6BE et 94RD27 a été réalisée dans des plaques à 6 puits à l'aide de l'agent de transfection Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 24 h après ensemencement des cellules à 80 % de confluence, le milieu complet est remplacé par du milieu sans sérum de veau. Un mélange Lipofectamine 2000 et ADN plasmidique réalisé extemporanément dans du milieu OptiMEM (Gibco, Invitrogen), est ajouté. Le milieu de transfection est remplacé par du milieu de culture complet, après 4h d'incubation dans l'étuve à CO<sub>2</sub>, afin d'éviter une cytotoxicité trop importante.

Pour la lignée XP6BE (XPD [-/-]), nous avons transfecté soit le vecteur pTRACER contenant la forme commune de l'ADNc d'ERCC2 (NM\_000400), soit la forme variante lys751gln, soit le vecteur pTRACER vide, soit le vecteur pTRACER-LacZ.

De même, pour la lignée 94RD27 (XPG [-/-]), nous avons transfecté soit le vecteur contenant la forme commune de l'ADNc (NM\_000123), soit la forme variante asp1104his, soit le vecteur pTRACER vide, soit le vecteur pTRACER-LacZ.

24 h après, les cellules transfectées sont réensemencées à une dilution 1/10<sup>ème</sup>.

### 7.1.2. Mise en évidence du taux de transfection

Après un rinçage au PBS, les cellules, transfectées (48h auparavant) par le vecteur pTRACER-LacZ, sont fixées pendant 5 minutes à 4°C dans une solution de fixation (formaldéhyde 2% ; glutaraldéhyde 0,2% dans du PBS). La coloration est mise en évidence par le chromogène X-gal (Sigma) à 1mg/ml ajouté à une solution de coloration (ferrocyanure de potassium 5 mM (Sigma) ; ferricyanure de potassium 5 mM (Sigma); MgCl<sub>2</sub> 2 mM ; dans du PBS pH 7,5). Une coloration bleue apparaît après 4 à 12 heures d'incubation des cellules à 37°C. La coloration peut être arrêtée par remplacement de la solution de coloration par du PBS 1×.

### 7.1.3. Obtention de transfectants stables

Une culture d'au moins deux semaines va permettre de sélectionner les cellules ayant intégré le vecteur plasmidique dans leur génome.

Les cellules issues de la sélection sont passées au cytomètre de flux (Beckman Coulter) ce qui nous permet d'estimer le pourcentage de cellules exprimant la protéine de résistance étiquetée par la GFP (*green fluorescent protein*) par rapport à la lignée de départ (témoin négatif).

Nous procédons à un enrichissement de ces populations par tri cellulaire sur FACS-ARIA (BD-Biosciences), ainsi qu'à un clonage sur plaque 96 puits à différentes concentrations allant de une cellule par puits à 50 cellules par puits.

Les populations enrichies sont sauvegardées par congélation tandis que les clones ayant poussé et apparaissant comme monoclonal sous le microscope sont réensemencées en plaques 24 puits. Ils sont alors analysés en cytométrie (FACS Beckman Coulter) afin d'estimer le pourcentage de cellules positives et la modalité de la population clonale.

Les clones apparaissant pour leur fluorescence (GFP) de manière unimodale sont de nouveau amplifiés : une partie est sauvegardée, l'autre partie sert à extraire les ARN totaux ainsi que les protéines. L'expression du transgène est testée en qRT-PCR puis en western-blot.

La complémentation du phénotype UV-hypersensible de ces lignées est mesurée par un test de survie aux UV. Le fait pour les clones sélectionnés d'avoir une sensibilité aux UV, bien inférieure à la lignée de départ confirme que la protéine codée par notre construction est bien fonctionnelle.

## 7.2. Transfection d'ARN interférents

Nous avons eu recours à la technologie des siRNA dans le but d'éteindre l'expression de la protéine XPD afin d'étudier le phénotype résultant de l'absence de cette protéine, en particulier pour l'étude de la sensibilité au paclitaxel.

En effet, la lignée XP6BE n'est pas un modèle idéal pour cette étude dans le sens où la protéine XPD mutante est bien déficiente pour son activité hélicase, mais conserve sa possible interaction avec ses partenaires du complexe TFIIH. (Ito et al., 2007)

Nous avons testé différents siRNA XPD et différents agents de transfection, ainsi que différents niveaux de confluence cellulaire.

### 7.2.1. Les siRNA XPD

- siRNA Smartpool (Dharmacon) : correspond à un pool de 4 siRNA prémélangés, le rapport entre les 4 oligomères étant « optimal ». Mais les résultats n'ont pas été assez convaincants.
- siRNA Accell (Dharmacon) : correspond aux mêmes oligomères que le smartpool mais « préparés » de manière à ne pas nécessiter d'agent de transfection, en revanche la concentration demandée est de 1  $\mu$ M. Mais les résultats n'étaient pas plus convaincants.
- siRNA Stealth (Invitrogen) : correspond à 3 oligomères. Nous les avons testés chacun séparément, 2 sur les 3 ont donné de bons résultats, ainsi nous avons décidé d'utiliser ces deux oligomères en pool à différentes concentrations, puis avec différents agents de transfections à différents niveaux de confluence cellulaire. Il en est ressorti qu'une concentration de 100 nM de chacun des 2 siRNA XPD transfectés avec la lipofectamine RNAiMax sur des cellules à 30 % de confluence donnait les meilleurs résultats.

### 7.2.2. Les agents de transfection

Nous avons testé la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), Dharmafect 1, 2, 3 et 4 (Dharmacon), l'Interferin (Ozyme), la Lipofectamine RNAiMax. Cette dernière s'est révélée la plus efficace. Plusieurs paramètres influencent notablement le rendement de transfection : l'agent de transfection et le niveau de confluence.

Ce dernier paramètre est important. Nous avons observé pour les lignées que nous avons testées (XP6BE, DU145, MCF7) qu'un niveau de confluence de 30% était optimale, alors que des niveaux supérieurs entraînaient une baisse drastique du rendement de transfection et que des niveaux inférieurs

posaient des problèmes de cytotoxicité de la transfection. En fonction du type d'expérience en aval, les transfections ont été réalisées en plaque 96 ou 6 puits, ou en boîtes de Pétri de 10 cm, avec les rapports suivants :

Support	Surface	nombre de cellules	Volume de milieu	Volume de lipofectamine RNAiMax	Volume de siRNA à 20 $\mu$ M	Volume de milieu OptiMEM	Volume final	Concentration en siRNA en nM
96 puits	0,32 cm <sup>2</sup>	1 000	100 $\mu$ L	0,24 $\mu$ L	1,2 $\mu$ L	20 $\mu$ L	120 $\mu$ L	200
6 puits	9,5 cm <sup>2</sup>	200 000	2mL	5 $\mu$ L	25 $\mu$ L	500 $\mu$ L	2,5mL	200
boite 10cm	55 cm <sup>2</sup>	1 000 000	10mL	24 $\mu$ L	120 $\mu$ L	2mL	12mL	200

**Tableau 5.** Protocole adapté de transfection des siRNA par la lipofectamine RNAiMax.

Chaque transfection de siRNA « ciblé » est accompagnée d'une autre transfection réalisée avec un siRNA contrôle (dont la séquence n'est complémentaire avec aucun ARNm humain)

Le degré de diminution de l'expression est testé par qRTPCR et/ou par western blot à 24, 48, 72, 96 et 120 h après la transfection.

## 8. Cytométrie en flux

### 8.1. Analyse du cycle cellulaire

Après avoir décollé les cellules à la trypsin (diluée au tiers dans du PBS 1 $\times$ ) à raison de 600  $\mu$ L par boîte 10 cm, on ajoute 1,4mL d'une solution de perméabilisation contenant du Iodure de Propidium. On obtient les concentrations finales suivantes : 4% de SVF, 50 $\mu$ M de Digitonine (Sigma), 50  $\mu$ g/mL de Iodure de Propidium (Sigma), 5  $\mu$ M d'EGTA, solution saline intracellulaire qsp 1,4 mL. On laisse perméabiliser 5 minutes à température ambiante dans l'obscurité, puis on incube 1 heure à +4°C.

Les échantillons sont ensuite passés sur un cytomètre de type FACS Calibur (BD Biosciences) à 1,5  $\mu$ l par seconde, les données sont acquises en FL2 à l'aide du logiciel Cell Quest Pro, puis les fichiers .FCS sont ensuite analysés à Angers dans le laboratoire du Pr Morel au centre Paul-Papin grâce au logiciel Modfit (Verity).

### 8.2. Analyse de la fluorescence

L'expression de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) est analysée en cytométrie en flux (FACS Beckman Coulter). La fluorescence des cellules transfectées par le vecteur pTRACER contenant le gène de résistance à la blasticidine fusionné avec celui de la GFP, peut être comparé à un témoin négatif non transfecté. Le pourcentage de cellules positives (exprimant la GFP) ainsi que l'homogénéité de cette population vis-à-vis de l'expression de la GFP, peuvent être déterminés.



### 8.3. Tri cellulaire et clonage

Nous avons eu recours au tri cellulaire sur FACS Aria (BD Bioscience), afin d'obtenir des clones cellulaires exprimant de manière stable et homogène la protéine d'intérêt. Ce service nous a été rendu par le Dr Vincent Pitard de la plateforme de cytométrie de l'IFR66.

Après avoir décollé les cellules à la trypsine, elles sont reprises dans une solution de PBS 1× additionnée de 0,5% de BSA et 0,2µM d'EDTA. La solution contenant les cellules est ensuite filtrée pour éliminer les amas cellulaires et conservée dans la glace jusqu'au passage au cytomètre de tri.

Nous avons dans un premier temps trié les cellules exprimant la GFP, puis après les avoir amplifiées et sauvegardées, nous les avons clonées sur plaques à 96 puits à raison de 1 à 20 cellules par puits (en fonction de l'efficacité de clonage de la lignée).

## 9. Préparation et analyse des protéines

Plusieurs protocoles d'extraction des protéines ont été réalisés en fonction de l'utilisation prévue.

### 9.1. Protocole d'extraction pour le western-blot

Les culots cellulaires secs sont repris dans 1mL de PBS froid puis centrifugé 5 minutes à 3000 g. Après aspiration du PBS, 400 µL de tampon de lyse RIPA (Tris-HCL pH 8 50 mM ; NaCl 150 mM ; SDS 0,1% ; NP40 1% ; Sodium désoxycholate 0,5% ; Cocktail d'inhibiteurs de protéases 1x (Roche)) sont ajoutés dans chaque boîte 10 cm. Pour augmenter l'efficacité de la lyse cellulaire, les échantillons sont incubés 30 minutes à 4°C puis centrifugés 15 min à 15000 g à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré et analysé.

### 9.2. Dosage des protéines

Du fait de la réactivité de nombreux détergents avec le réactif de Bradford, nous préférons utiliser la méthode de Lowry. Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec la tyrosine et le tryptophane et, dans une moindre mesure, avec la cystéine et l'histidine. L'absorbance est mesurée à 750 nm. Le test de Lowry (Biorad) est réalisé comme indiqué ci-dessous :

- 5 µl de l'extrait protéique non dilué puis dilué au 5ème.
- 25 µl de solution A'
- 200 µl solution B

Après 15 mn d'incubation à température ambiante, la densité optique du mélange est mesurée à 750 nm avec un spectrophotomètre à plaque de 96 puits PowerWaveX (Bio-Tek). La concentration en protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine de sérum de bœuf (BSA) (1, 2, 3, 4, 5 µg) (Sigma) réalisée extemporanément.

### 9.3. Migration sur gel et transfert

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide dénaturant (en présence de SDS). La séparation des protéines se fait uniquement en fonction de leur masse moléculaire, la densité de charge et la structure étant rendues homogènes par le détergent anionique ajouté (SDS). La migration des protéines est d'autant plus rapide que leur poids moléculaire est faible.

Le gel est constitué de deux parties : un gel de concentration contenant 5% d'acrylamide et un gel de séparation contenant 10% d'acrylamide.

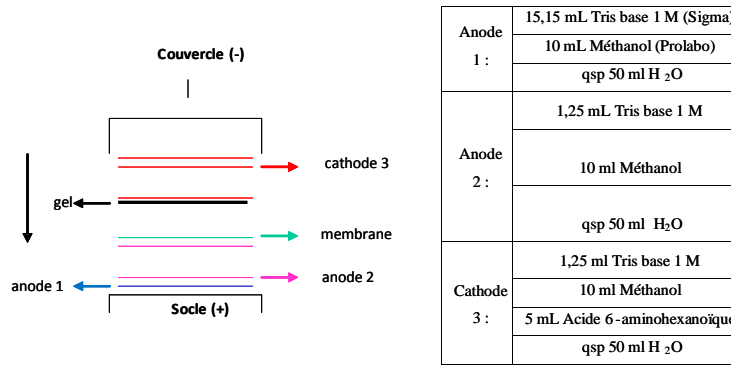
La composition de ces gels est la suivante (volume pour 2 gels de 1,5 mm) :

	<i>Gel de concentration 5 %</i>	<i>Gel de séparation 10 %</i>
Acrylamide/Bis (30 %)	850 µl	6,6 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8		5 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8	1,25 ml	
SDS 20 %	25 µl	100 µl
H <sub>2</sub> O	2,85 ml	8,2 ml
Ammonium persulfate 10 %	25 µl	100 µl
Temed	5 µl	10 µl

En plus des échantillons et du témoin positif de l'immunodétection, nous avons déposé sur le gel un marqueur de poids moléculaire permettant de suivre la bonne réalisation de la migration et du transfert : *Precision Plus Protein* (Biorad).

La migration est réalisée 10 min à 80 V/300 mA puis 60 min à 120 V/40 mA dans du tampon de Laemmli 1× : Tris base pH 8,3 25 mM, Glycine 0,25 M, SDS 0,1 %.

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF Immobilon (Millipore). Ce transfert est un électrotransfert semi-liquide réalisé avec un Milliblot Graphite Electrobloetter (Millipore). Des feuilles de papier Whatman sont imbibées des solutions décrites ci-dessous. Le montage pour le transfert est réalisé comme représenté sur la figure 8.



**Figure 8.** Représentation schématique du montage réalisé pour le transfert des protéines du gel vers la membrane.

#### 9.4. Immunodétection

La membrane est saturée pendant une heure sous faible agitation avec la solution de blocage composée de TBS-T (TBS contenant 0,05 % de Tween-20 (Sigma)) et 5 % de lait écrémé en poudre. L'anticorps primaire est dilué au 1/500<sup>e</sup> dans la solution de blocage et est mis en contact avec la membrane sous agitation faible pendant une nuit à 4°C. La membrane est rincée une fois dans du TBS-TL puis lavée trois fois : une fois 15 mn et deux fois 5 mn dans du TBS-T en changeant de solution à chaque lavage. Après ces lavages, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire dilué au 1/20 000<sup>e</sup> dans la solution de blocage sous agitation faible pendant une heure à température ambiante. La même série de lavages est répétée avec un dernier lavage dans le TBS.

protéine	poids	antigène	espèce	clone	fournisseur	modifiaion	dilution	application
XPD	80 kDa	aa 1-406	souris	monoclonal	Abcam		1/250e	WB
XPG	133 kDa	aa 1120-1137	lapin	polyclonal	Abcam		1/500e	IF/WB
XPG	133 kDa	seq. interne	lapin	polyclonal	Abcam		1/500e	WB
Cyline B1	58 kDa	C-term	lapin	monoclonal	Abcam		1/5000e	WB
CDK7	40 kDa	C-term	souris	monoclonal	Abcam		1/500e	WB
Cyline H	38 kDa	aa 1-110	souris	monoclonal	Abcam		1/500e	WB
CDK1	34 kDa	seq. interne	lapin	polyclonal	Calbiochem		5ug/mL	IP
CDK1	34 kDa	aa 220-227	lapin	monoclonal	Abcam		1/500e	WB
anti-souris			mouton	-	GE	HRP	1/20000e	WB
anti-lapin			âne	-	GE	HRP	1/20000e	WB
anti-V5			souris	monoclonal	Invitrogen	HRP	1/5000e	WB-IF

**Tableau 6.** Liste des anticorps utilisés

La révélation est effectuée à l'aide du système ECL+ (Amersham, GE) de chimioluminescence. La membrane placée sur du film Saran, est mise en contact avec le réactif ECL+ à raison de 0,125 ml par cm<sup>2</sup> de membrane durant 5 mn. La membrane est alors exposée le temps adéquat sous un film (Kodak). La révélation est réalisée en chambre noire en développant le film selon le procédé photographique : 1 mn dans un révélateur photo (Kodak), lavage dans de l'eau, puis passage du film dans un fixateur photo (Kodak) et de nouveau un rinçage à l'eau.

Pour vérifier la qualité du transfert, les protéines fixées sur la membrane de PVDF sont colorées de façon réversible par le rouge Ponceau S (Sigma). La membrane est trempée quelques secondes dans du méthanol avant d'être plongée pendant cinq minutes dans une solution de coloration (acide acétique 1% ; rouge Ponceau S 0,5 %). Les bandes protéiques apparaissent après rinçage, cette coloration peut être fixée à l'acide acétique 1%.

## 9.5. Mesure de l'activité kinase du CDK1

500 µg d'extraits protéiques sont incubés avec des billes de protéine A-Sépharose (GE) dans 1 ml de tampon de lyse (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,25 %, NaF 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 100 µg/ml, DTT 1 mM et cocktail inhibiteur de protéase complet 1× (Roche)) durant 2 h afin d'éliminer les protéines se fixant sur les billes de façon non spécifique (Étape de *preclearing*).

Le mélange extrait/billes est ensuite centrifugé et le surnageant sans bille est incubé avec 5 µg d'anticorps anti-CDK1 polyclonal (Calbiochem, VWR) pendant la nuit à 4°C. Les complexes anticorps-antigènes sont ensuite récupérés après 3 à 4h d'incubation avec des billes de protéine A-Sépharose et centrifugation. Puis, les billes de protéines A-Sépharose sont lavées avec 1 ml de tampon kinase CDK1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM), et incubées dans 20µL de tampon kinase contenant 100 µM d'ATP (Pharmacia), 5 µCi de [<sup>32</sup>P] γATP (Amersham Biosciences, GE) et 2,5 µg d'histone H1 (Upstate, Millipore) 10 min à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 10 µl de LSB 4× et une incubation 5 min à 95°C. Les extraits sont ensuite séparés sur un gel SDS-PAGE à 10 % d'acrylamide. Le gel est séché et la radioactivité associée à l'histone H1 est quantifiée par PhosphorImager (Molecular Dynamics).

## 10. Analyse des ARN

### 10.1. Extraction des ARN

Les extractions sont réalisées à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

### 10.2. Rétrotranscription des ARN

Pour le clonage des ADN complémentaires (ADNc), la rétrotranscription des ARNm est réalisée à l'aide de l'enzyme SuperScript III (Invitrogen) avec un oligo dT (Invitrogen) dans un mélange réactionnel recommandé par le fournisseur. 1 µg d'ARN totaux par réaction est utilisé.

Pour la RT-PCR quantitative en temps réel le kit Vilo (Invitrogen), contenant un pool d'amorces oligonucléotidiques aléatoires, est utilisé. 500 ng d'ARN totaux par réaction sont utilisés.

### 10.3. PCR quantitative

Afin de réaliser une quantification comparative de transcrits, nous avons mélangé un aliquote de chaque réaction de rétrotranscription avec les réactifs de PCR quantitative du kit Express SyBR (Invitrogen).

L'appareil de PCR quantitative en temps réel que nous utilisons est un Rotorgene 3000 (Corbett Life Science). Pour chaque couple d'amorces, une première PCR est réalisée puis les produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose à 2 %. Sur ce même gel, on fait migrer un marqueur de taille qui est également un marqueur quantitatif : le Smart DNA Ladder (Invitrogen). Ce marqueur permet, après une coloration du gel avec du BET, de déterminer la taille des produits de PCR ainsi que la quantité déposée sur le gel. Ainsi, la concentration des produits de PCR de chaque couple d'amorces peut être déterminée. Ces produits de PCR subissent quatre dilutions en série au  $1/50^{\text{ème}}$ . En parallèle, 2  $\mu$ l de chaque dilution sont utilisés comme matrice pour les PCR quantitatives. Cette gamme de quantification a deux intérêts. Elle permet de placer le seuil de détermination du Ct (Threshold Cycle). En effet, seule la phase exponentielle de la PCR est représentative du nombre initial de copies. C'est le moment où le niveau de fluorescence est supérieur au bruit de fond. Ce moment correspond à un certain nombre de cycles appelé Ct. Avec cette technique, le seuil est placé au niveau de fluorescence pour lequel il y a la meilleure corrélation entre les concentrations données (mesurées précédemment) et les concentrations calculées par le logiciel du Rotor-Gene 5 (Corbett Life Science). La gamme de quantification permet également de quantifier l'expression des gènes dans chaque échantillon. L'équation d'une droite représentant la concentration de la gamme en fonction de nombre de cycle est calculée. Ainsi pour chaque échantillon correspond un Ct, et grâce à cette gamme étalon, une concentration est déterminée.

### 10.4. Étude de la stabilité des ARN messagers

*Étude in silico* : Nous avons utilisé le logiciel en ligne RNAfold, disponible à l'adresse suivante : <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>. Différentes séquences des messagers sont soumises à l'algorithme proposé.

*Étude de la demi-vie du messenger du gène ERCC2* : 48 h après ensemencement de 300 000 cellules dans des plaques 6 puits, le milieu de culture est renouvelé et additionné de 5  $\mu$ g/ml d'actinomycine D (Invitrogen). On réalise des prélèvements à 0 h ; 2 h ; 4 h ; 9 h ; 16 h et 24 h. Les lysats cellulaires sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à extraction des ARN. Une RT-PCR quantitative est ensuite réalisée sur cette cinétique avec au moins un couple d'amorces ciblant l'ADNc d'*ERCC2* et un couple d'amorces contrôle ciblant l'ADNc de l'ARN ribosomiale 18S. La courbe de dégradation de l'ARNm d'*ERCC2* est déduite et la demi-vie correspond au temps où l'on obtient 50 % de la quantité de messenger présente au temps zéro.

## 11. Études sur les collections cellulaires tumorales

### 11.1. Études *in silico*

#### 11.1.1. La collection du NCI-60 et la base de données correspondante

Comme nous l'avons dit plus haut, le modèle d'étude dont nous sommes partis initialement consiste en une collection de 60 lignées cellulaires tumorales humaines établie au début des années 90 par le *National Cancer Institute* pour cribler des composés issus de la recherche académique ou industrielle quant à leurs propriétés antiprolifératives. La cytotoxicité de chaque composé a été évaluée par inhibition de croissance après 72 heures de culture en présence de l'agent cytotoxique et la concentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire ( $IC_{50}$ ) a été calculée. Nous avons eu accès, grâce à une collaboration avec le Dr J.N. Weinstein, aux culots cellulaires et aux ADN extraits de ces cellules, ainsi qu'à la base de données publiques disponibles sur le site du NCI (<http://dtp.nci.nih.gov>). Cette base contient pour chaque lignée, d'une part les  $IC_{50}$  de milliers de composés, et d'autre part les niveaux d'expression des gènes cellulaires, obtenus sur plusieurs séries de microarrays Affymetrix successives. Nous avons extrait de cette base, pour les 60 lignées du panel, les  $IC_{50}$  de 125 agents antiprolifératifs représentatifs, ainsi que les niveaux d'expression des gènes d'intérêt pour notre étude.

#### 11.1.2. La collection du JFCR-45 et les données correspondantes

Nous avons pu bénéficier en outre d'une deuxième collection de cellules tumorales humaines en culture, établie par la *Japanese Foundation for Cancer Research*, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Takao Yamori (Tokyo). Une quarantaine d'agents anticancéreux ont été criblés sur cette collection et les données de chimio-sensibilité ont été publiées (Nakatsu et al., 2005). Ces données ont été obtenues dans des conditions proches de celles obtenues pour le panel du NCI ( $IC_{50}$  calculée par inhibition de croissance sur 72 heures de culture).

#### 11.1.3. La collection de la société Oncotest

La société Oncotest (Fribourg, Allemagne) a mis à notre disposition une collection de 55 tumeurs humaines de diverses provenances maintenues par transplantations successives dans la sous *nude* par xéno greffe sous-cutanée. La société Oncotest a réalisé les profils d'expression des gènes de chaque tumeur sur microarray Affymetrix et évalué la chimio-sensibilité de ces tumeurs *in vivo* vis-à-vis de plusieurs médicaments anticancéreux. Les données nous ont été fournies par le Dr H.H. Fiebig.

#### 11.1.4. Analyses statistiques sur les données expérimentales

Nous avons dans un premier temps établi les moyennes des  $IC_{50}$  pour chaque génotype étudié, après avoir réalisé une conversion en valeurs logarithmiques afin d'obtenir une distribution normale

( $-\log IC_{50}$ ). La comparaison de ces moyennes a été réalisée à l'aide d'un test de Student ( $\alpha = 5\%$ ), la correction de Bonferroni ayant été appliquée quand des tests multiples devaient être effectués.

En ce qui concerne les niveaux d'expression, nous avons utilisé directement les valeurs de la base de données sans conversion logarithmique, leur distribution apparaissant normale. Comme pour les valeurs d' $IC_{50}$ , leurs moyennes ont été déterminées pour chaque génotype et comparées par un test de Student. Les relations entre  $IC_{50}$  et niveaux d'expression ont été établies à l'aide du calcul du coefficient de corrélation de Pearson.

Le test de Student est un test statistique de comparaison des valeurs moyennes d'un paramètre donné dans une population. Il repose sur l'analyse de la variance de ces moyennes, qui est le reflet de la dispersion des valeurs individuelles du paramètre. Il se traduit par une valeur de p, qui est la probabilité que la différence que l'on étudie soit le fait du hasard. On convient habituellement que p doit être inférieur à 0,05, c'est-à-dire que l'on a moins de 5 % de chances que la différence observée soit le fait du hasard, en d'autres termes que l'on a moins de 5 % de chances de se tromper en disant que les deux populations étudiées sont différentes.

Lorsque l'on effectue par exemple 20 comparaisons de moyennes sur 20 populations différentes dans une étude, on va peut-être, par le simple fait du hasard, trouver une valeur de p inférieure à 0,05 qui, en fait, ne correspondra pas à une différence significative. La correction de Bonferroni impose de diviser le seuil de significativité (0,05) par le nombre de comparaisons effectuées ; si l'on en fait 20, le seuil de significativité sera de  $0,05/20 = 0,0025$ , pour que l'on ait moins de 5 % de chances de se tromper en disant que les deux populations étudiées sont différentes.

Le coefficient de corrélation de Pearson r est une mesure du lien qui existe entre les paramètres correspondants de deux populations différentes. Il est de 1 quand la corrélation est parfaite et s'éloigne de 1 quand cette corrélation est moins bonne. Il permet de calculer, selon la taille des populations, la valeur de p, qui a la même définition que celle déjà exposée : probabilité que le lien observé soit le fait du hasard, et l'on retient habituellement la valeur de 0,05 comme seuil, c'est-à-dire celle pour laquelle on a moins de 5 % de chances de se tromper en disant qu'il existe un lien entre les paramètres des deux populations.

## 11.2. Étude clinique rétrospective

Nous avons été amenés à rechercher les polymorphismes des gènes ECRR2 et ERCC5 dans une série de patientes traitées par chimiothérapie néo-adjuvante pour un cancer du sein. Notre étude représente donc une étude ancillaire de l'essai 10994 de l'EORTC qui visait à déterminer si les mutations de p53 pouvaient prédire la réponse des cancers du sein aux taxanes en situation néo-adjuvante. Cette étude, dont l'inclusion s'est terminée en novembre 2006, avait inclus 1800 patientes, dont 135 à Bordeaux ; elle reposait sur un traitement tiré au sort consistant, soit en 6 cycles de FEC (5-fluorouracile –



épirubicine – cyclophosphamide : bras sans taxane), soit en 3 cycles de docétaxel et 3 cycles d'épirubicine – docétaxel : bras avec taxane. L'évaluation de la réponse thérapeutique était réalisée par l'anatomo-pathologiste sur la pièce d'exérèse de la tumeur, et était donc estimée de façon très précise (réponse pathologique). Les ganglions non envahis par la tumeur et conservés en paraffine étaient accessibles auprès des services de pathologie pour l'extraction de l'ADN et le génotypage, tout au moins pour les patientes qui, lors de l'inclusion, avaient accepté que des études biologiques ultérieures puissent être réalisées sur les prélèvements obtenus lors de la chirurgie.

Nous avons obtenu l'autorisation du coordonnateur de l'étude, le Pr H. Bonnefoi (Bordeaux), et celle du responsable des analyses biologiques complémentaires, le Dr D. Cameron (Leeds, UK). Plusieurs services d'oncologie médicale ayant inclus des patients et les services d'anatomo-pathologie correspondants ont accepté de nous fournir des ganglions non envahis pour l'étude pharmacogénétique et les pages des CRF (*Case report forms*) nécessaires pour l'évaluation de la réponse pathologique : ce sont les services des Centres de lutte contre le cancer de Bordeaux, Dijon, Saint-Cloud et Montpellier.

Nous avons comparé, dans le bras « avec taxane » et dans le bras « sans taxane », le nombre de réponses pathologiques complètes (pas de tumeur résiduelle ou quelques cellules isolées) et de réponses pathologiques non complètes (tumeur résiduelle présente, avec ou sans effet de la chimiothérapie) pour chacun des génotypes identifiés. Les comparaisons statistiques ont été réalisées par le test exact de Fisher.

# Résultats et discussion

---

## 1. Étude de l'association des polymorphismes de gènes du NER avec la réponse cellulaire aux agents anticancéreux dans le panel du NCI-60

La thématique du laboratoire porte sur la pharmacologie des agents anticancéreux et plus particulièrement sur l'étude du rôle des polymorphismes de gènes candidats dans la réponse thérapeutique aux agents anticancéreux. La réplication de l'ADN des cellules est la cible de nombreux médicaments utilisés en cancérologie, comme les alkylants. Ces médicaments créent des lésions de l'ADN et font intervenir, dans les cellules saines comme dans les cellules tumorales, des systèmes protéiques de réparation de l'ADN. L'efficacité de ces systèmes est naturellement impliquée dans la réponse aux agents anticancéreux. Cette efficacité de la réparation des lésions de l'ADN peut varier en fonction de polymorphismes présents sur les différents gènes codant pour les protéines des systèmes de réparation de l'ADN. Les lésions provoquées par les alkylants et les dérivés du platine comme le cisplatine sont réparées par le système de réparation par excision de nucléotide (NER) (Aloyz et al., 2002 ; Atanassov et al., 2004)

### 1.1. Choix du modèle : le panel du NCI-60

Nous avons donc entrepris le génotypage de plusieurs SNPs de gènes codant pour des protéines intervenant dans le NER, dans le panel de lignées cellulaires tumorales humaines du NCI (NCI-60). Nous avons choisi des SNPs relativement fréquents (fréquence allélique  $\geq 25\%$ ) dans les populations caucasiennes, étant donné que les lignées du NCI-60 sont *à priori* en majorité d'origine caucasienne. Ensuite, nous avons choisi parmi ces SNPs ceux qui concernent des régions codantes (exons), de préférence des mutations faux-sens ou des régions promotrices.

L'identification des polymorphismes génétiques et leurs liens éventuels avec la chimio-sensibilité n'avaient pas été recherchés dans le panel du NCI et, dans le cadre d'une collaboration entreprise entre mon laboratoire d'accueil et le NCI, nous avons pu disposer de l'ensemble des culots cellulaires des lignées constituant le panel.

### 1.2 Génotypage des SNPs sélectionnés

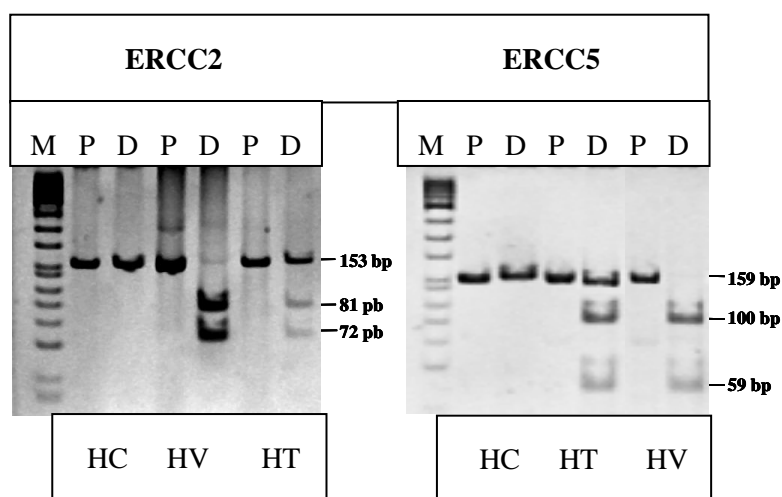
és

Plusieurs polymorphismes des gènes du NER ont été étudiés : *ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *XPA*, *XPC*. Deux techniques de génotypage ont été utilisées pour ce travail : la PCR-RFLP et le pyroséquençage. La figure 9 montre quelques profils électrophorétiques de produits de PCR avant et après digestion par

les enzymes de restriction appropriés. Le tableau 7 présente la répartition de ces polymorphismes dans les lignées du panel du NCI. Nous avons remarqué que, pour les fréquences alléliques observées, la distribution des génotypes faisait apparaître un nombre d'hétérozygotes inférieur à celui attendu dans le cadre d'une distribution de Hardy-Weinberg. Cette situation est à mettre en rapport avec le fait qu'il s'agit de lignées tumorales qui présentent des caryotypes très remaniés avec de nombreuses pertes de bras chromosomiques pouvant se traduire par des pertes d'hétérozygotie.

Gène	Variation étudiée	Lignées HC	Lignées HT	Lignées HV	Fréquence allélique	
ERCC1	asn118asn	rs11615	27	19	13	38 %
ERCC2	asp312asn	rs1799793	30	19	10	33 %
	lys751gln	rs13181	28	20	11	36 %
ERCC5	asp1104his	rs17655	39	10	10	25 %
XPA	114A>G	rs1800975	35	12	12	31 %
XPC	ala499val	rs2228000	32	16	11	32 %
	lys939gln	rs2228001	26	22	11	37 %

**Tableau 7.** Distribution des lignées cellulaires du NCI selon les différents polymorphismes étudiés.



**Figure 9.** Exemples de profils électrophorétiques de restriction (RFLP) obtenus à partir des produits d'amplification des régions adéquates des gènes *ERCC2* et *ERCC5*, dans les lignées de génotype homozygote commun (HC), hétérozygote (HT) et homozygote variant (HV) pour les polymorphismes lys751gln du gène *ERCC2* et asp1104his du gène *ERCC5*. Dans les puits M est déposé un marqueur de

poids moléculaire ; dans les puits P, le produit de PCR non digéré ; dans les puits D, les produits de PCR digérés

Nous avons recherché l'existence de corrélations entre la cytotoxicité des agents anticancéreux et la présence d'un polymorphisme de chacun des gènes considérés. Nous avons tout d'abord recherché l'existence de corrélations individuelles entre les génotypes de chacune des 125 molécules retenues pour l'analyse. Nous avons ensuite recherché des corrélations au niveau de chaque famille chimique d'anticancéreux selon la classification proposée par le laboratoire de pharmacologie moléculaire du NCI (Scherf et al., 2000). Une difficulté d'ordre statistique se présente d'emblée : avec trois génotypes pour chaque polymorphisme et 125 molécules différentes, on est conduit à faire 375 tests statistiques de comparaison. Avec un seuil de significativité fixé à 5 % ( $p < 0,05$ ), on aura, de façon aléatoire, des relations apparemment significatives qui ne sont dues qu'au grand nombre de tests réalisés. Nous n'avons pas retenu comme significatives, au niveau des molécules prises une à une, les valeurs de  $p$  supérieures à 0,0005. Pour l'étude des classes chimiques de médicaments, nous n'avons retenu comme significatives que les valeurs de  $p$  inférieures à  $10^{-6}$ , et à la condition que plusieurs molécules individuelles dans la classe considérée présentent elles-mêmes une tendance associant leur cytotoxicité à la présence d'un génotype. Ces conditions drastiques permettent d'éliminer la majeure partie des faux positifs qui se présentent lors de corrélations multiples.

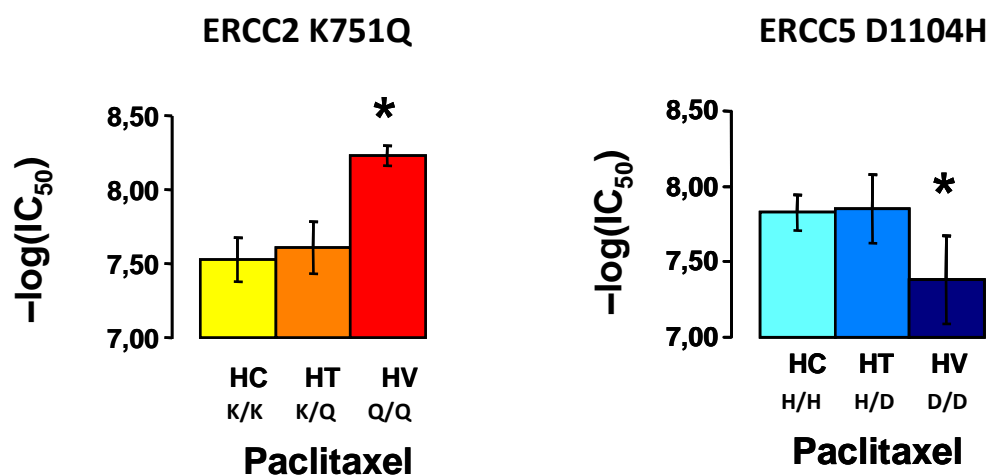
En ce qui concerne les polymorphismes des gènes *ERCC1*, *XPA* et *XPC*, nous avons observé des corrélations occasionnelles, sporadiques, entre la cytotoxicité de quelques molécules et la présence d'un génotype particulier. En aucun cas les seuils de significativité que nous avons définis n'ont été atteints. Ils ont été approchés dans un seul cas : les cellules ayant un génotype variant pour le polymorphisme ala499val du gène *XPC* ont une tendance à être moins sensibles aux taxanes que les lignées de génotype homozygote commun ( $p = 10^{-4}$ ) et pour 4 composés individuels sur 13, il existe une telle tendance, manifestée par un  $p < 0,05$ .

Dans le cas du polymorphisme lys751gln du gène *ERCC2*, plusieurs associations ont été observées entre la cytotoxicité d'agents alkylants, d'inhibiteurs de topoisomérase I et II et le génotype, sans atteindre toutefois le seuil de significativité que nous avons fixé. De façon inattendue, c'est avec la cytotoxicité des taxanes qu'apparaît une relation très significative. Pris individuellement, 6 taxanes sur 13 présentent une association entre le génotype des cellules pour ce polymorphisme et leur chimio-sensibilité, avec une valeur de  $p$  inférieure à 0,05. Par exemple, l' $IC_{50}$  du paclitaxel est de 17,2 nM dans les lignées de génotype lys/lys et de 3,8 nM dans les lignées de génotype gln/gln ( $p = 0,02$ ), les lignées hétérozygotes lys/gln présentant une chimio-sensibilité similaire à celle des lignées lys/lys (figure 10). Pour l'ensemble de la classe des taxanes, les lignées de génotype homozygote variant apparaissent en moyenne 3,6 fois plus sensibles que les lignées de génotype homozygote commun, et

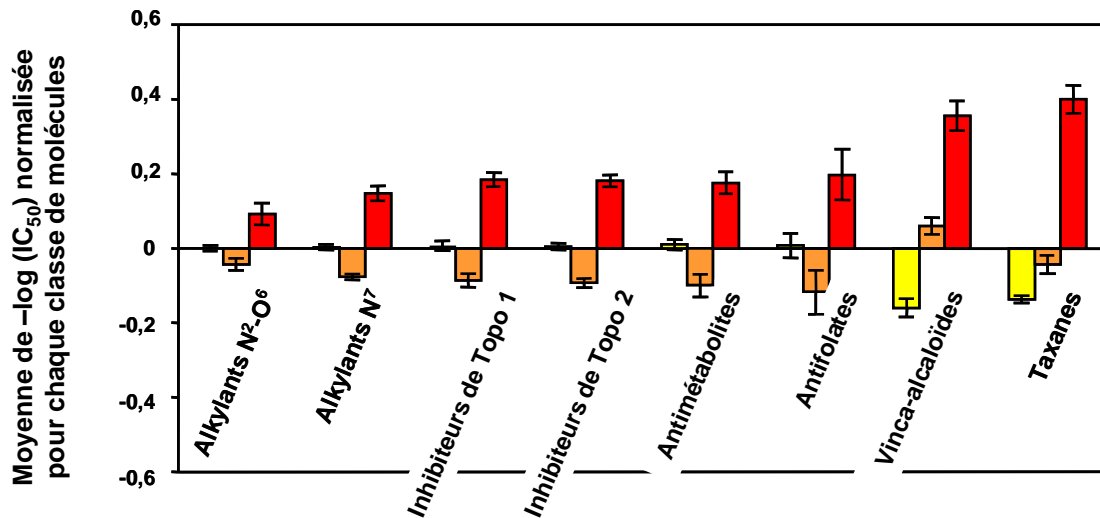
cette différence est significative ( $p = 4 \times 10^{-8}$ ) (figure 11). En revanche, le polymorphisme asp312asn du même gène n'est associé à aucune modification significative de la sensibilité aux taxanes.

Enfin, en ce qui concerne le polymorphisme asp1104his du gène *ERCC5*, en dehors de quelques associations sporadiques que nous n'avons pas retenues, c'est aussi dans la classe des taxanes que se manifeste une association significative entre génotype et chimio-sensibilité. C'est ainsi que l' $IC_{50}$  du paclitaxel est de 25 nM dans les lignées de génotype asp/asp et de 10 nM dans les lignées de génotype his/his ( $p = 0,014$ ), les lignées asp/his présentant une chimio-sensibilité intermédiaire, avec une  $IC_{50}$  de 13 nM (figure 10). Les lignées de génotype homozygote variant apparaissent dans ce cas en moyenne 2,5 fois plus résistantes que les lignées de génotype homozygote commun ( $p = 10^{-7}$ ) (figure 11).

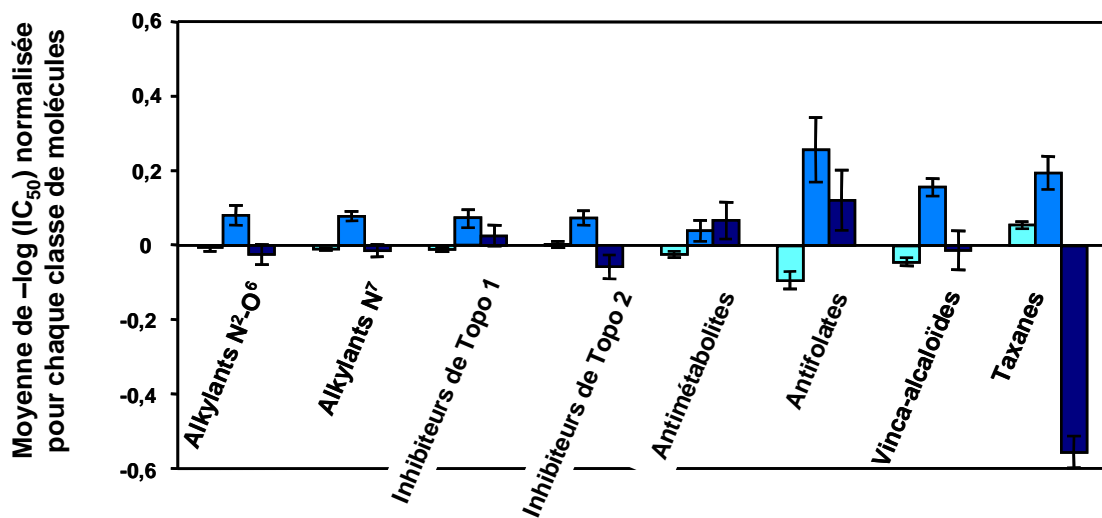
Il faut noter que nous désignons dans notre étude par « génotype variant », l'allèle le moins fréquent chez les Caucasiens, qui est celui lié à l'acide aminé asp. Celui-ci représente en fait, dans l'espèce humaine, le génotype commun, les Caucasiens présentant de façon majoritaire un variant du gène ancestral. En outre la protéine XPG est relativement bien conservée du point de vue phylogénétique et l'acide aminé asp (D) est souvent retrouvé à cette position alors que l'acide aminé his (H) n'est présent que dans l'espèce humaine.



**Figure 10.** Représentation schématique des  $IC_{50}$  du paclitaxel dans les lignées de génotype homozygote commun (HC), hétérozygote (HT) et homozygote variant (HV) pour les polymorphismes lys751gln (K751Q) du gène *ERCC2* et asp1104his (D1104H) du gène *ERCC5*.



**Figure 11A.** Représentation schématique des IC<sub>50</sub> moyennes relatives des groupes de médicaments selon les génotypes cellulaires d'ERCC2 (■ homozygotes communs, ■ hétérozygotes, ■ homozygotes variants). La ligne 0 correspond à l'IC<sub>50</sub> moyenne des molécules dans le panel de lignées ; l'échelle logarithmique positive correspond à une cytotoxicité plus élevée, la négative à une cytotoxicité plus faible.



**Figure 11B.** Représentation schématique des IC<sub>50</sub> moyennes relatives des groupes de médicaments selon les génotypes cellulaires d'ERCC5 (■ homozygotes communs, ■ hétérozygotes, ■ homozygotes variants). La ligne 0 correspond à l'IC<sub>50</sub> moyenne des molécules dans le panel de lignées ; l'échelle logarithmique positive correspond à une cytotoxicité plus élevée, la négative à une cytotoxicité plus faible.

Il était inattendu que, pour deux polymorphismes de gènes du NER, il puisse exister une association significative entre le génotype et la chimio-sensibilité aux taxanes. Toutefois, nous avons souhaité rechercher si le lien mis en évidence dans le panel du NCI entre les génotypes de *ERCC2* et de *ERCC5* et la sensibilité aux taxanes pouvait être retrouvé dans d'autres modèles, et s'il existait des liens entre l'expression de ces gènes et la sensibilité aux taxanes.

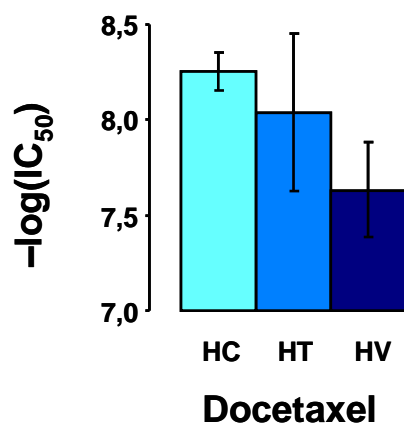
### 1.3. Validation sur un autre modèle cellulaire *in vitro*

Il existe peu de collections de lignées cellulaires caractérisées par leur chimio-sensibilité à divers anticancéreux. Outre le panel du NCI, il existe deux collections de lignées établies par la *Japanese Foundation for Cancer Research* (JFCR) : le panel JFCR-39 et le panel JFCR-45 (Nakatsu et al., 2005). Le premier reprend essentiellement des lignées de la collection du NCI, le second, plus original, contient des lignées cellulaires humaines provenant de patients surtout japonais souffrant de tumeurs du sein, de l'estomac et du foie. Les données de cytotoxicité d'une quarantaine de médicaments anticancéreux sont disponibles, dont deux taxanes : le paclitaxel et le docetaxel. Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr T. Yamori, de la JFCR, nous avons pu obtenir 42 extraits d'ADN de la collection JFCR-45. Nous avons déterminé les polymorphismes des gènes *ERCC2* et *ERCC5* sur cette collection d'ADN et comparé leur distribution avec la cytotoxicité des deux taxanes *in vitro*.

En ce qui concerne le gène *ERCC2*, nous n'avons pu valider le lien entre polymorphisme et chimio-sensibilité pour la seule raison que la variation considérée (lys751gln) est beaucoup moins fréquente chez les sujets asiatiques que chez les sujets caucasiens : la fréquence allélique observée dans la collection était de 5 %, et le panel contenait 36 lignées de génotype homozygote commun et 6 lignées de génotype hétérozygote, et aucune lignée de génotype homozygote variant. Il nous a donc été impossible de montrer l'association recherchée.

En ce qui concerne le gène *ERCC5* en revanche, la distribution des génotypes était proche de la distribution observée chez les sujets caucasiens, avec une fréquence allélique de 33 % (homozygotes communs : 16 ; hétérozygotes : 13 ; homozygotes variants : 13). Les lignées de génotype asp/asp se sont révélées 2,0 et 2,6 fois plus résistantes au paclitaxel et au docetaxel, respectivement, que les lignées de génotype his/his, les lignées asp/his étant intermédiaires : ce résultat est très voisin de celui obtenu dans les lignées du panel NCI-60. Il reste toutefois non significatif ( $p = 0,11-0,12$ ) et il n'est pas possible, comme pour le panel NCI-60, de regrouper l'ensemble des taxanes, puisque seules deux molécules ont été étudiées. La figure 12 présente ce résultat.





**Figure 12.** Représentation schématique des  $IC_{50}$  du docetaxel dans les lignées du panel JFCR-45 de génotype homozygote commun (HC), hétérozygote (HT) et homozygote variant (HV) de *ERCC5*.

#### 1.4. Analyse de l'expression des gènes *ERCC2* et *ERCC5*

Une fois l'observation de l'association entre les SNP de *ERCC2* et *ERCC5* réalisée, il nous a semblé important de réaliser une étude de l'expression des messagers de ces gènes.

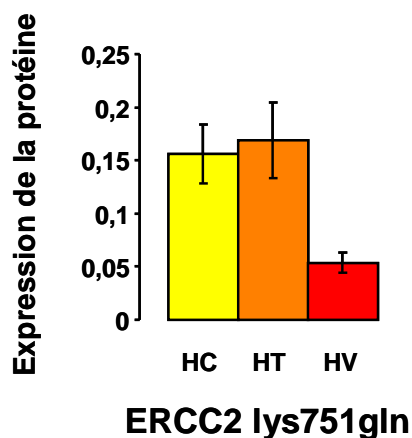
##### 1.4.1. Expression des gènes *ERCC2* et *ERCC5* dans le panel du NCI-60

Outre les données de cytotoxicité de centaines de composés distincts, la base de données du DTP contient les résultats de plusieurs profils d'expression géniques réalisés sur des microarrays de plusieurs générations successives. Nous avons recherché les corrélations pouvant exister entre l'expression des gènes *ERCC2* et *ERCC5* et le génotype des lignées.

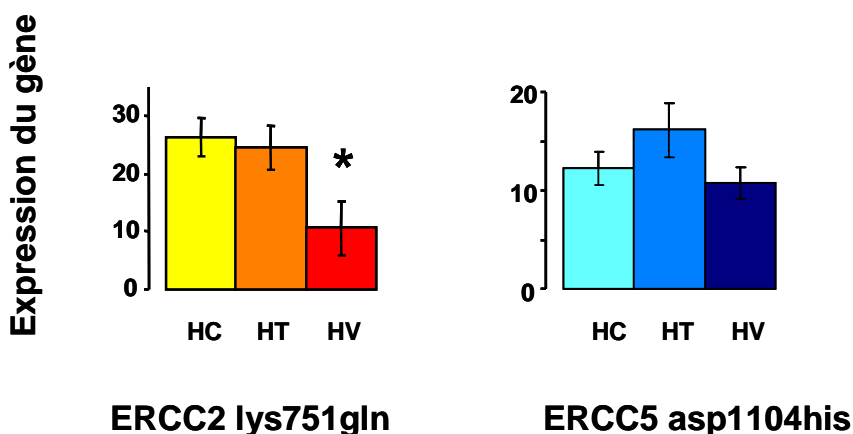
En ce qui concerne le gène *ERCC2*, sept séries de données sont disponibles : une réalisée sur les microarrays originaux de l'équipe de Botstein à Stanford, deux dans le cadre d'une collaboration entre le NCI et la firme Novartis, sur des « puces » Affymetrix U95, trois dans le cadre d'une collaboration entre le NCI et la société Gene Logic, sur des puces Affymetrix U133 et une dans le cadre d'une collaboration entre le NCI et la société Chiron, sur des puces Affymetrix U133A. Une de ces séries de données paraît d'emblée aberrante et n'a pas été retenue : les niveaux d'expression ne présentent aucune concordance avec ceux des six autres séries. Il existe un lien significatif entre expression et génotype *ERCC2* : les lignées de génotype homozygote variant ont un niveau d'expression inférieur à celui des lignées de génotype homozygote commun d'un facteur 1,2 à 2,5 et cette différence est significative dans 5 cas sur 6 ( $0,011 < p < 0,071$ ). En poolant les niveaux d'expression obtenus sur microarrays Affymetrix, la valeur de  $p$  atteint 0,004. Enfin, comme un auteur a publié des résultats obtenus par western blot de la protéine XPD dans le panel du NCI-60 (Xu et al., 2002), nous avons pu vérifier que la quantité de protéine est significativement différente selon le génotype des lignées, les

lignées de génotype homozygote variant présentant une concentration inférieure aux lignées de génotype homozygote commun ou hétérozygote (Figure 13).

En ce qui concerne le gène *ERCC5*, aucune relation ne peut être mise en évidence entre le génotype des cellules et l'expression du gène, telle qu'elle figure dans les bases de données de DTP ; dans lesquelles huit différentes déterminations sont disponibles, dont une est à exclure en raison de son absence de toute concordance avec les sept autres. Indépendamment du polymorphisme, il existe une relation entre l'expression du gène *ERCC5* et la sensibilité aux taxanes ; cette relation est inconstante dépend à la fois du taxane considéré et du microarray analysé. L'expression du gène *ERCC5* n'apparaît pas déterminante pour la chimio-sensibilité des lignées du panel aux taxanes (Figure 14).

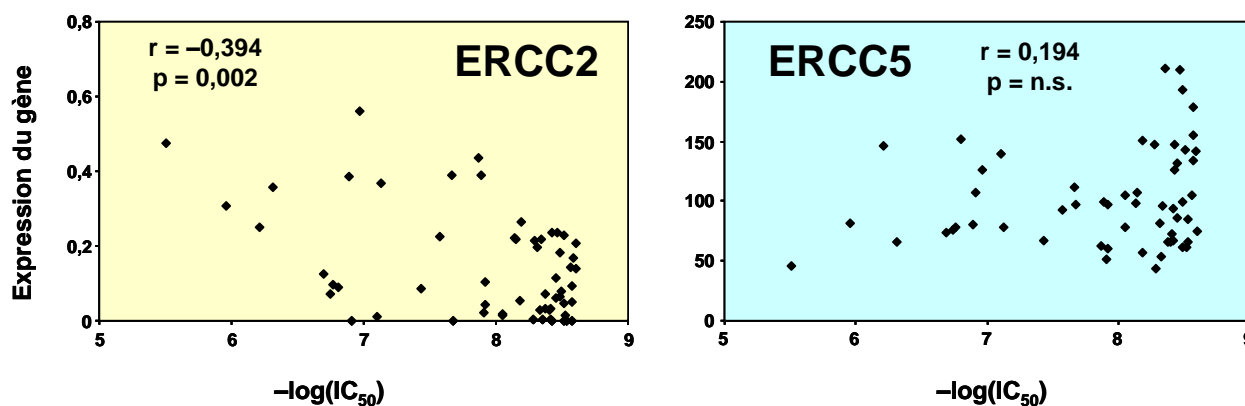


**Figure 13.** Représentation schématique des niveaux d'expression de la protéine XPD dans les lignées du panel du NCI-60 de génotype homozygote commun (HC), hétérozygote (HT) et homozygote variant (HV) pour le polymorphisme lys751gln du gène *ERCC2*. (à partir du travail de Xu et al., 2002)



**Figure 14.** Représentation schématique des niveaux d'expression de *ERCC2* et *ERCC5* dans les lignées du panel NCI-60 de génotype homozygote commun (HC), hétérozygote (HT) et homozygote variant (HV) pour les polymorphismes lys751gln du gène *ERCC2* et asp1104his du gène *ERCC5*. Les niveaux d'expression sont indiqués en unités arbitraires et ont été obtenus sur microarray Affymetrix U95.

Indépendamment du polymorphisme, nous avons recherché s'il existait une relation entre l'expression des gènes *ERCC2* et *ERCC5* et la sensibilité aux taxanes. Cette relation est inconstante et dépend à la fois du taxane considéré et du microarray analysé. Pour le gène *ERCC2*, les lignées ayant la plus forte expression du gène sont celles qui sont le moins sensibles au paclitaxel (Figure 15). Pour le gène *ERCC5*, aucune tendance nette ne peut être dégagée (Figure 15).



**Figure 15.** Relation entre l'expression des gènes *ERCC2* et *ERCC5* (unités arbitraires) et la chimio-sensibilité au paclitaxel dans le panel NCI-60.

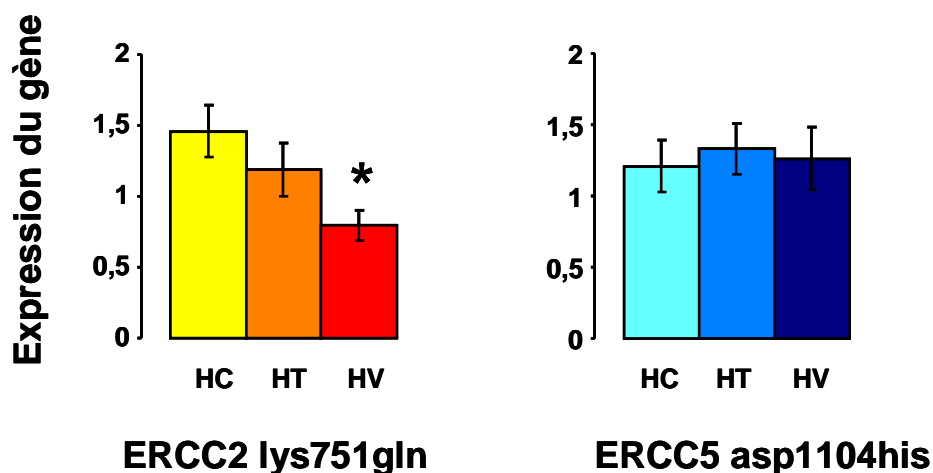
#### 1.4.2. Validation dans une population de tumeurs humaines xéngreffées chez la souris

Dans le cadre d'une collaboration avec la société Oncotest (Fribourg, Allemagne), nous avons pu disposer d'une collection d'ADN de 55 tumeurs humaines transplantées chez la souris *nude* et sur lesquelles avaient été établis antérieurement des profils d'expression génique sur microarrays Affymetrix U133A+ et la détermination de leur chimio-sensibilité *in vivo* à une série de composés anticancéreux, en particulier le paclitaxel.

Le génotypage des gènes *ERCC2* et *ERCC5* a fait apparaître une fréquence allélique respectivement de 35 et 36 %, avec une perte d'hétérozygotie analogue à celle que nous avons observée dans les lignées tumorales maintenues *in vitro*. Le niveau d'expression du gène *ERCC2* est significativement inférieur dans les lignées de génotype homozygote variant à celui observé dans les lignées de génotype homozygote sauvage (0,79 vs. 1,46 unités arbitraires,  $p = 0,02$ ). Les lignées de génotype hétérozygote ont un niveau d'expression intermédiaire (1,19). En ce qui concerne le gène *ERCC5*, aucune différence significative d'expression ne peut être objectivée en fonction du génotype (Figure 16).

Nous avons recherché si la réponse des tumeurs au paclitaxel différait en fonction des génotypes *ERCC2* et *ERCC5* dans cette collection de tumeurs. Les données qui fournies par la société Oncotest sont les rapports des volumes tumoraux des tumeurs traitées et non traitées ( $T/C \times 100$ ).

La comparaison de ces rapports dans les tumeurs de génotype commun et variant, pour le gène *ERCC2* comme pour le gène *ERCC5*, n'a pas fait apparaître de différence statistiquement significative.



**Figure 16.** Expression des gènes *ERCC2* et *ERCC5* dans les tumeurs transplantées de génotype homozygote commun (HC), hétérozygote (HT) ou homozygote variant (HV) pour les polymorphismes des gènes *ERCC2* et *ERCC5* (Microarrays Affymetrix U133A+).

En conclusion de cette étude de l'expression de *ERCC2* et *ERCC5*, nous avons pu mettre en évidence dans chacun des modèles une relation significative entre le polymorphisme lys751gln de *ERCC2* et le niveau de son ARNm ainsi que de sa protéine dans le modèle du NCI-60. En revanche il n'existe pas une telle association avec l'expression de *ERCC5*.

### 1.5. Discussion de la première partie

Pour le gène *ERCC2*, nous avons pu identifier une association du polymorphisme du codon 751 avec la cytotoxicité des taxanes, mais aussi avec le niveau d'expression de son ARNm. Cela semble indiquer qu'il pourrait exister un rôle de ce polymorphisme sur l'expression de l'ARNm.

Pour le gène *ERCC5*, nous avons pu identifier une association du polymorphisme du codon 1104 avec la cytotoxicité des taxanes. Le niveau d'expression ne paraît pas dépendre du polymorphisme. Notre hypothèse est que la protéine sauvage et la protéine variante exercent un effet différent sur la stabilisation de TFIIF. Notre analyse *in silico* de l'impact du polymorphisme sur l'activité intrinsèque de la protéine prédit un effet important de cette variation, car elle concerne une région hautement conservée de l'enzyme. L'acide aminé « défavorable » est codé par le gène commun, ce qui peut expliquer que la protéine XPG commune soit moins efficace dans la stabilisation du facteur TFIIF et entraîne une activité mitotique plus importante, donc une hypersensibilité aux taxanes, telle que nous l'avons observée sur le modèle des lignées du NCI.

Il était inattendu que deux polymorphismes de gènes du NER, soit associé à la chimio-sensibilité cellulaire aux taxanes. Mais le rôle central de XPD et XPG dans la stabilité du complexe TFIIF qui

possède par l'intermédiaire de son sous-complexe CAK une activité régulatrice du cycle cellulaire pour expliquer le mécanisme de cette observation. Cette double association nous a encouragés à dans notre projet de recherche avec deux objectifs : d'une part comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels des polymorphismes de gènes du NER pouvaient être impliqués dans la cytotoxicité de poisons du fuseau ; et d'autre part de rechercher si cette observation pouvait avoir une traduction clinique et permettre ainsi d'identifier de nouveaux facteurs prédictifs de la réponse aux taxanes.

## 2. Étude de l'effet des polymorphismes *ERCC2* lys751gln et *ERCC5* asp1104his sur la réponse cellulaire aux agents cytotoxiques : construction de clones cellulaires isogéniques stables

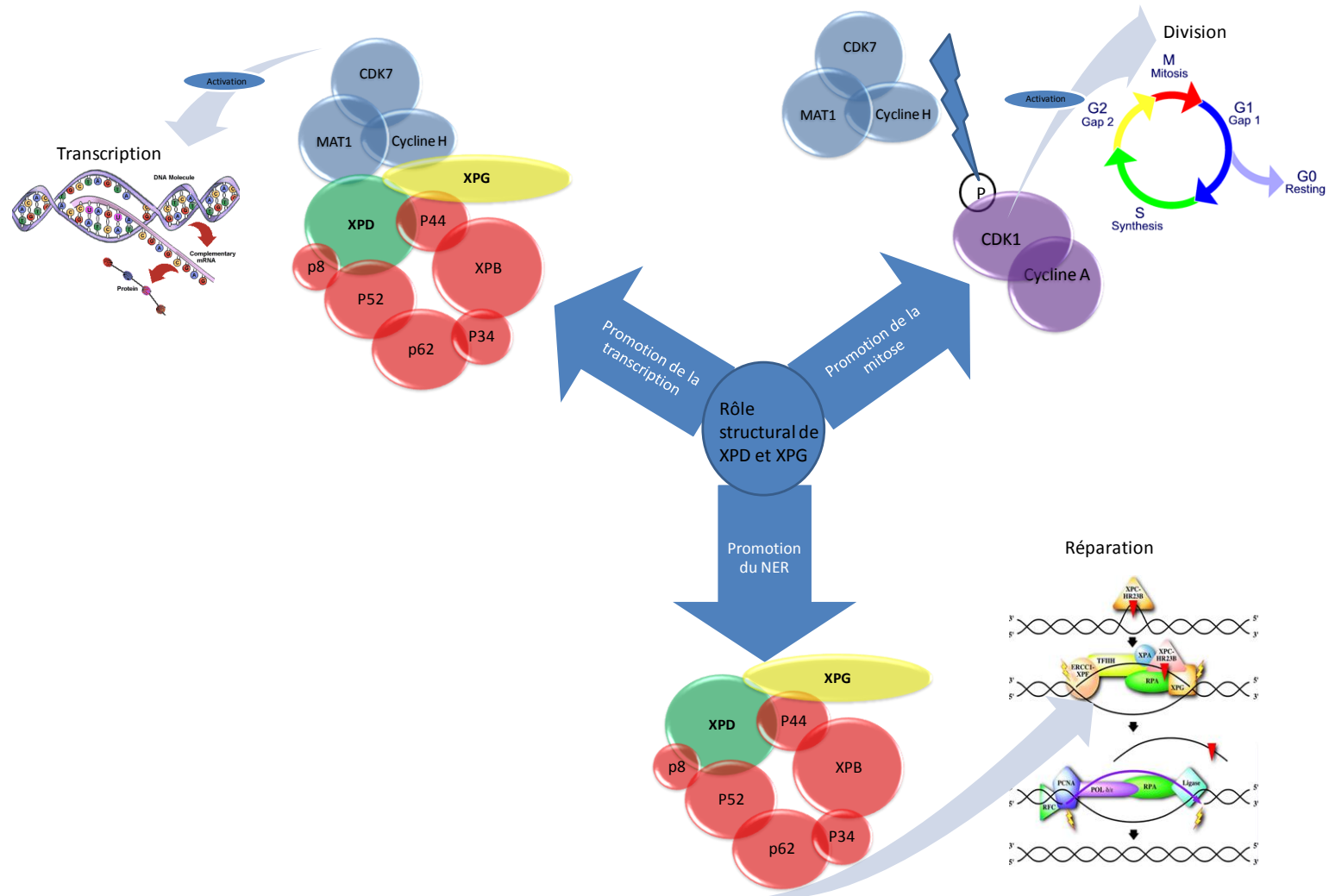
Pour tenter d'expliquer comment le polymorphisme d'un gène de réparation de l'ADN peut influencer la sensibilité à des poisons du fuseau mitotique, il faut rappeler que le complexe multiprotéique de réparation TFIIH, responsable de la reconnaissance des lésions et de l'excision de nucléotides, regroupe plusieurs entités protéiques distinctes dont XPD, mais aussi le sous-complexe CAK (*CDK activating kinase*) qui résulte de l'association entre le CDK7, la protéine MAT1 et la cycline H.

De plus, ce complexe est stabilisé par XPG. Outre son implication dans la réparation, ce complexe est responsable de la phosphorylation et de l'activation de CDK1, lui-même responsable, après conjugaison à la cycline B, de l'entrée en mitose. Ce n'est que lors de la libération de CAK du complexe TFIIH qu'il peut exercer son activité pro-mitotique. De cette manière, il existe une régulation spatiale de l'activité de CAK qui permet à la cellule d'alterner les phases de transcription et les phases de division (Figure 17).

La stabilisation du complexe TFIIH dépend, entre autres, de la présence des protéines XPD et XPG. Un déficit quantitatif et/ou qualitatif de l'une ou l'autre de ces protéines aura pour conséquence la dissociation du complexe TFIIH, la libération de CAK et la mise en route d'une mitose. La mitose étant la cible toute particulière des poisons du fuseau, nous avons fait l'hypothèse que cette entrée intempestive en mitose allait sensibiliser les cellules à l'action des taxanes : un défaut quantitatif et/ou fonctionnel de XPD ou de XPG serait, dans cette hypothèse, susceptible de sensibiliser les cellules à l'action des taxanes.

Afin de pouvoir comparer le rôle de la protéine XPD « commune » et celui de la protéine XPD « variante », nous avons choisi d'établir des clones stables exprimant soit la protéine « commune » soit la protéine « variante » à partir d'une lignée cellulaire humaine déficiente pour XPD. La même approche a été entreprise pour l'étude du polymorphisme de XPG, à partir d'une lignée déficiente pour cette protéine.

Pour cela, nous avons travaillé sur des lignées cellulaires issues de patients atteints de Xeroderma Pigmentosum qui possèdent une mutation sur chacun des deux allèles d'un gène XP, la maladie étant récessive. La sévérité du phénotype observé chez ces patients varie en fonction du gène qui est muté mais aussi en fonction de la position de la mutation sur le gène.



**Figure 17.** Schéma montrant comment le complexe CAK peut réguler la division cellulaire, la transcription et la réparation de l'ADN dans le cadre du complexe TFIIH. (d'après Ito et al., 2007 ; Coin et al., 2008)

Nous avons donc choisi des lignées provenant d'un patient avec un phénotype de la maladie sévère et avec des mutations du gène entraînant l'expression d'une protéine tronquée.

- Ainsi pour l'étude du polymorphisme de *ERCC2* nous avons choisi la lignée humaine immortalisée XP6BE qui possède sur un allèle du gène *ERCC2* une mutation provoquant l'expression d'une protéine XPD tronquée et sur l'autre allèle une simple mutation faux-sens. Aucune de ces deux protéines n'est active au niveau de la réparation de l'ADN.
- Pour l'étude du polymorphisme *ERCC5* nous avons choisi la lignée humaine immortalisée 94RD27 qui est issue d'un patient XP-CS (XPCS1R0). Les deux allèles du gène *ERCC5* possèdent la même mutation décalant le cadre de lecture et entraînant l'expression d'une protéine tronquée (980 acides aminés au lieu de 1186) inactive au niveau de la réparation de l'ADN et non détectable en western-blot.

Nous avons donc construit différents vecteurs plasmidiques contenant la forme commune ou variante des ADNc de *ERCC2* ou *ERCC5* afin de les transférer de manière stable dans ces lignées et d'établir des clones isogéniques. Le but est d'étudier la réponse cellulaire aux agents anticancéreux de ces lignées complémentées, en fonction du polymorphisme de ces deux gènes et ainsi de déterminer si les associations que nous avons observées dans le panel du NCI-60 peuvent être confirmées dans notre modèle cellulaire.



## 2.1. Construction des vecteurs d'expression

Les lignées cellulaires tumorales sont en général immortalisées du fait des réarrangements génétiques qui les ont conduites à leur phénotype tumoral. En revanche, ce n'est pas le cas de la plupart des lignées cellulaires d'autres origines. Les lignées, issues de patients atteints de Xeroderma Pigmentosum que nous avons acquises, ont été immortalisées par transfection stable du gène codant pour l'antigène T du virus SV40.

Nous avons tout d'abord cloné les ADN complémentaires (ADNc) des gènes XPD et XPG dans un plasmide de type pcDNA3.1 par la méthode de « Topo/TA cloning ». Ce type de plasmide contient une origine de réplication SV40. Cette origine de réplication permet une réplication épisomique du vecteur dans les cellules eucaryotes exprimant l'antigène T du virus SV40. Cela présente l'avantage de permettre une expression importante et prolongée des transgènes. En revanche, le maintien à l'état épisomique ne permet pas d'obtenir des clones stables avec un niveau défini de l'expression du transgène qui dépend de la région chromosomique d'intégration.

Dans nos lignées XP, tous phénomènes d'intégration chromosomique d'un tel plasmide serait délétère pour la cellule car entraîneraient des cassures chromosomiques dues à la réplication asynchrone du plasmide pcDNA3.1-ori SV40 par rapport aux chromosomes de la cellule hôte.

Au cours de notre étude, nous avons réalisé l'importance d'obtenir un modèle cellulaire avec une expression stable et définie du transgène à étudier, et cela pour comparer l'effet du SNP sans qu'il y ait de confusion avec des niveaux d'expression variables ou trop élevés.

Ainsi, afin d'établir des clones cellulaires stables dans de bonnes conditions, nous avons dû sous-cloner les ADNc dans un vecteur plasmidique ne contenant pas d'origine de réplication SV40 ; nous avons choisi le plasmide pTRACER.

### 2.1.1. Obtention des différents vecteurs

Les plasmides pcDNA3.1-Topo/TA et pTRACER-EF/Bsd-B (Invitrogen) possèdent le même site multiple de clonage et une étiquette V5-his identique. L'étiquette V5-his nous a permis de distinguer, lors d'immuno-marquage, la protéine XPD transduite de la protéine endogène, qui existe sous forme non tronquée dans la lignée XP6BE.

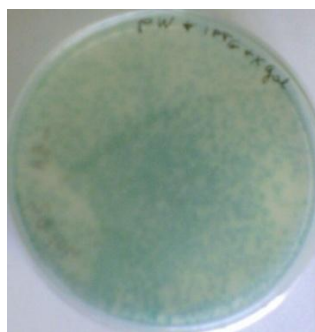
Nous avons pu extraire l'ADNc du plasmide pcDNA3.1 et digérer le plasmide pTRACER avec les mêmes enzymes. En raison de l'existence de différents sites de restriction présents dans les séquences des ADNc de *ERCC2* et *ERCC5*, nous avons utilisé les deux couples d'enzymes suivant : KpnI/PmeI pour *ERCC2* et KpnI/XbaI pour *ERCC5*. Nous avons pu réaliser les deux digestions par couple d'enzyme de manière simultanée, car leurs tampons réactionnels sont compatibles. Après séparation

des produits de digestion sur gel d'agarose à 1% et purification sur colonne de silice, nous avons pu procéder à la ligation, puis à la transformation dans des bactéries chimio-compétentes Top10.

Le clonage dans pcDNA3.1-Topo/TA, de l'ADNc de ERCC5 a été particulièrement difficile, certainement du fait de sa taille importante de 3,75 kpb, qui rend l'efficacité de transformation du plasmide ainsi construit (9,75 kpb) très faible. Mais le sous-clonage dans pTRACER a été encore plus difficile à mettre en œuvre. Tout d'abord pour les mêmes raisons que le premier clonage dans pcDNA3.1 (taille du plasmide construit), mais aussi, à cause de la recombinaison qui avait lieu entre le vecteur et l'insert. Nous obtenions après transformation, des colonies résistantes qui étaient positives pour le test PCR spécifique de ERCC5, mais la carte de restriction de plus de 100 plasmides testés était toujours mauvaise. Ce n'est qu'en utilisant les bactéries compétentes STBL2 (Invitrogen), une souche de E. Coli, que nous avons pu obtenir un clone bactérien contenant le plasmide pTRACER-ERCC5 entier. Les bactéries compétentes STBL2 sont préconisées pour le clonage de vecteurs instables qui recombinent facilement. Cette souche de bactérie possède en plus de *RecA1* d'autres mutations limitant la recombinaison de l'ADN.

Une fois un allèle de chacun des deux gènes ERCC2 et ERCC5 sous-clonés, nous avons obtenu l'allèle supplémentaire de ces deux gènes par mutagenèse dirigée. Pour cela, nous avons conçu deux couples d'amorces de 40 nucléotides contenant dans leur partie centrale le nucléotide à modifier. La PCR de mutagenèse est menée dans des conditions standards avec des temps d'élongation différents reposant sur le principe de 1 min/kilobases. Les produits de mutagenèse ont ensuite été digérés par l'enzyme de restriction DpnI, qui coupe l'ADN méthylé utilisé comme matrice de PCR. Une aliquote est transformée dans des bactéries compétentes.

Nous avons obtenu plusieurs dizaines de colonies. Un témoin mutagenèse est réalisé en parallèle, il consiste en un plasmide contenant le gène Lac Z non fonctionnel qui est « corrigé » en gène fonctionnel par mutagenèse. Le test d'expression de ce gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase, par coloration au X-gal, permet d'estimer l'efficacité de la réaction de mutagenèse et de la digestion par DpnI (Figure 18).



**Figure 18.** Coloration au X-gal des colonies bactériennes transformées avec le produit de mutagenèse « contrôle ».

L'efficacité de mutagenèse est estimée à plus de 90 % dans le « contrôle », ce qui nous a permis de déterminer que l'extraction d'ADN génomique à partir de deux colonies suffirait pour déterminer le génotype attendu. Le génotype des plasmides extraits a été vérifié par PCR-RFLP (Figure 20).

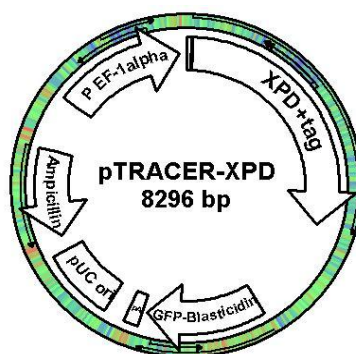
### 2.1.2. Analyse moléculaire de vecteurs construits

Afin de vérifier que « l'insert » se soit intégré correctement et dans le bon sens, les ADN plasmidiques sont digérés par des enzymes de restriction choisies en fonction du nombre et de la position de leurs sites de restriction présents ou non sur les différentes constructions obtenues. (Tableau 8 et figure 19)

	<i>Bam</i> HI	<i>Xho</i> I	<i>Kpn</i> I <i>Pme</i> I	<i>Kpn</i> I <i>Xba</i> I	PCR-RFLP**
<b>XPD wt</b>	4342pb, 1825pb, 1709pb, 420pb***	4154pb, 2648pb, 1494pb	5824pb, 2472pb	5921pb, 2375pb	120pb
<b>XPD var</b>	4342pb, 1825pb, 1709pb, 420pb	4154pb, 2648pb, 1494pb	5824pb, 2472pb	5921pb, 2375pb	99pb, 21pb*
<b>XPG wt</b>	4342pb, 2878pb, 2351pb	4154pb, 3923pb, 1494pb	5824pb, 3747pb	5921pb, 3650pb	158pb
<b>XPG var</b>	4342pb, 2878pb, 2351pb	4154pb, 3923pb, 1494pb	5824pb, 3747pb	5921pb, 3650pb	99pb, 59pb
<b>pTracer vide</b>	4342pb, 1645pb	4154pb, 1490pb, 343pb***	5824pb, 163pb*	5917pb, 70pb*	NC

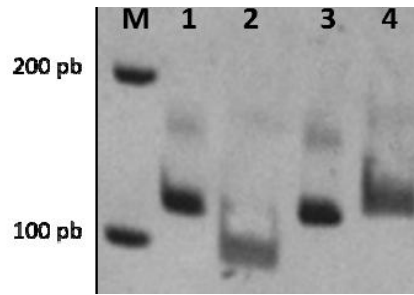
**Tableau 8.** Carte de restriction des plasmides pTRACER.

\*Bandes non visibles lors de l'électrophorèse ; \*\*Migration sur gel de polyacrylamide ; \*\*\*Bandes peu visibles lors de l'électrophorèse.



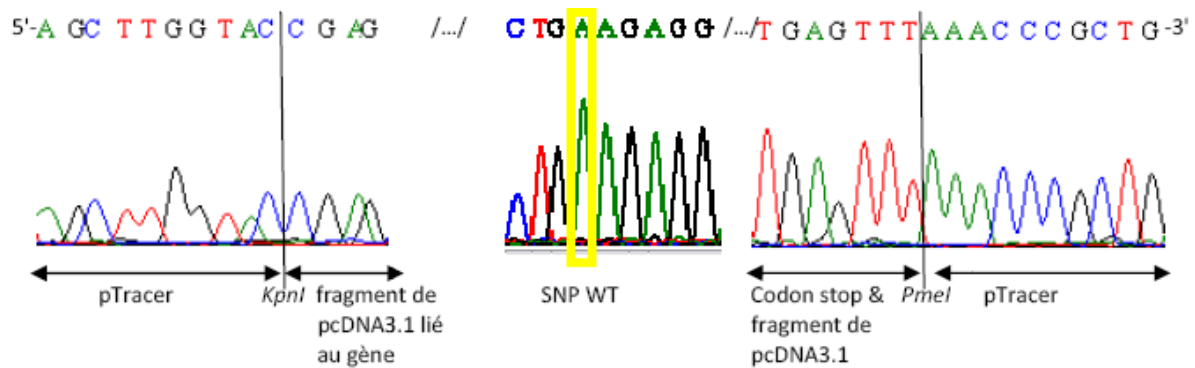
**Figure 19.** Représentation schématique de la construction plasmidique du vecteur pTRACER-ERCC2

Nous avons génotypé la forme allélique des ADNc clonés par PCR-RFLP.



**Figure 20.** Génotypage par PCR-RFLP des ADNc des deux allèles de *ERCC2* clonés dans le plasmide pTRACER-EF/Bsd. Puits M, marqueur de poids moléculaire ; puits 1 : produits PCR de 120pb contenant le SNP, réalisé sur le plasmide contenant l'ADNc « variant » obtenu par mutagenèse et puits 2 : produit de PCR digéré par *PstI* ; puits 3 produits de PCR réalisé sur le plasmide contenant l'ADNc « commun » et puits 4 : le produit de PCR digéré par *PstI*.

Afin de vérifier qu'aucune mutation n'a été ajoutée dans les ADNc lors du clonage ou surtout lors de la PCR de mutagenèse dirigée, nous avons séquencé les sites de ligation des plasmides possédant le profil de RFLP désiré (Figure 21). Ensuite, les différents ADNc ont été séquencés dans leur intégralité par une société prestataire de service.



**Figure 21.** Vérification par séquençage du sous-clonage du fragment de pcDNA3.1 contenant l'ADNc de *ERCC2* (allèle commun) dans le plasmide pTRACER.

Le séquençage par la méthode de Sanger sur un séquenceur capillaire permet d'obtenir des séquences allant jusqu'à 800 paires de bases. Des amorces spécifique à chaque gène ont dues être conçues en plus des amorces de séquençage communément utilisées T7 et BGH. Deux amorces ont été synthétisées pour *ERCC2* (2289 pb) et 4 amorces pour *ERCC5* (3564 pb) afin d'obtenir la séquence entière et continue des ADNc par la méthode d'assemblage par recouvrement des extrémités redondantes.

Les différents profils de séquençage montrent que ni la ligation, ni la mutagenèse n'a produit de mutation dans les clones sélectionnés. Toutefois un clone a été écarté, car il possédait une mutation non-sens dans la séquence de l'ADNc de *ERCC2*.

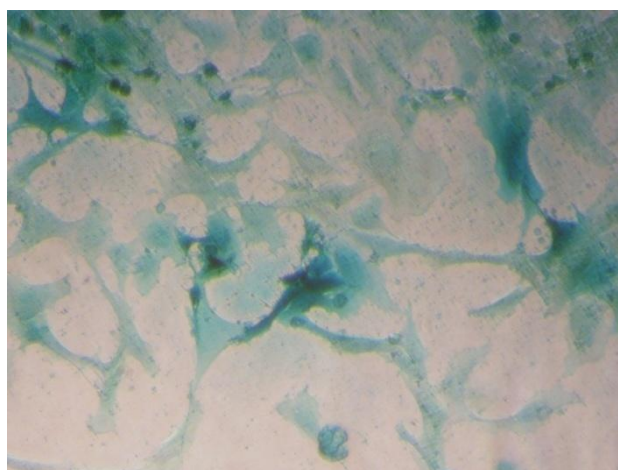
## 2.2. Établissement de clones isogéniques stables complémentés XPD et XPG

Pour étudier la fonction des différentes protéines XPD et XPG sous la forme commune ou variante, nous avons choisi de compléter les lignées déficientes XP6BE (pour XPD) et 94RD27 (pour XPG) par transfection à la lipofectamine 2000.

### 2.2.1. Transfection des différentes lignées

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de culture à 6 puits à raison de 1 millions de cellules par puits. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont transfectées par l'ajout d'un mélange de lipofectamine 2000 et de plasmide contenant le gène d'intérêt. Pour optimiser les chances d'une intégration chromosomique du plasmide de chaque gène à exprimer (gène de sélection et gène d'intérêt) et qu'ils ne soient pas interrompus lors de la recombinaison, nous avons linéarisé le plasmide dans une région adéquate par l'enzyme *FspI* pour les plasmides contenant *ERCC2* et *ERCC5*, et pour le plasmide vide. L'enzyme *ScaI* a été utilisée pour celui contenant le gène *LacZ*. Les produits de digestion ont été purifiés et vérifiés sur gel d'agarose à 1 %.

Nous avons pu estimer les taux de transfection par coloration au X-Gal des lignées transfectées avec le vecteur contenant le gène *Lac Z* à la place du gène d'intérêt. Pour les cellules XP6BE (XP-D), nous avons obtenu des taux de transfection d'environ 30% et pour les cellules 94RD27 (XP-G) les taux de transfection étaient d'environ 50%, puisque près de la moitié des cellules étaient bleues. (Figure 22).

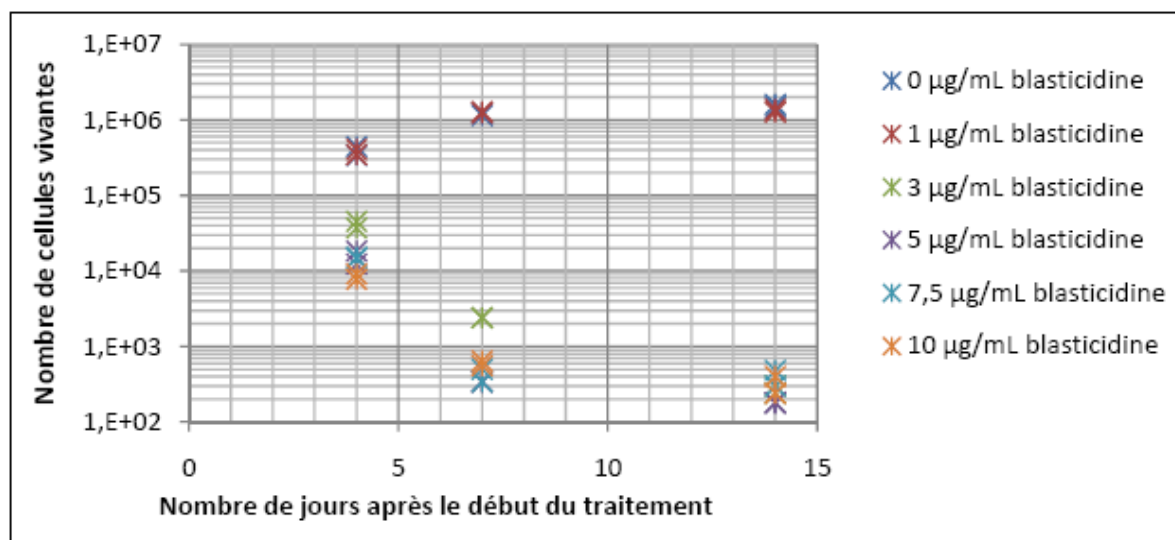


**Figure 22.** Cellules 94RD27 colorées au X-gal 24h après avoir été transfectées avec le plasmide pTRACER-LacZ.

Afin de déterminer la dose d'agent de sélection à délivrer après la transfection, une courbe de cytotoxicité de la blasticidine a été réalisée pour chacune des lignées utilisées. Nous avons déterminé que la dose de 5 $\mu$ g de blasticidine par millilitre de milieu était adéquate pour sélectionner les cellules XP6BE et 94RD27 ayant intégré le plasmide pTRACER.

### 2.2.2. Établissement de clones cellulaires

Pour obtenir des cellules transfectées de manière stable (sélection des événements d'intégration), deux semaines de sélection avec 5 $\mu$ g de blasticidine par millilitre de milieu ont été nécessaires. Cette concentration avait été déterminée par notre gamme de test de cytotoxicité de la blasticidine (figure 23).



**Figure 23.** Gamme de concentrations de blasticidine testée sur les fibroblastes XP6BE (XP-D), pour de définir la dose adéquate pour sélectionner les cellules effectivement transfectées par le plasmide pTRACER (5 $\mu$ g/mL).

La fluorescence des populations cellulaires transfectées a ensuite été analysée par cytométrie en flux. Nous avons ainsi pu calculer par rapport à la lignée non transfectée, qui sert de contrôle négatif, le pourcentage de cellules exprimant la GFP. La GFP étant exprimée en fusion avec la protéine de résistance, et non comme c'est parfois le cas avec la protéine d'intérêt, ce pourcentage reflète en théorie le pourcentage de cellule ayant intégré le plasmide, mais pas forcément le pourcentage de cellules exprimant effectivement la protéine d'intérêt (XPD ou XPG).

Ce pourcentage de cellules fluorescentes était toujours autour de 10%.

Les cellules exprimant la GFP sont triées sur ce critère afin obtenir des populations enrichies en cellules positives et sont remises en culture pour être amplifiées, puis revérifiées en cytométrie.

Le pourcentage de cellules fluorescentes était toujours autour de 80% immédiatement après le tri et descendait parfois à 50-60% voir 40% deux semaines plus tard, alors que les cellules étaient toujours sous sélection à la blasticidine.

Les populations cellulaires ainsi enrichies, nous avons procédé au clonage de ces cellules grâce à un trieur de cellules (FACS ARIA, BD Biosciences). Nous avons choisi différents paramètres comme le niveau de fluorescence minimum des cellules considérées comme positive par rapport à un témoin négatif (lignées non transfectées) et le nombre de cellules fluorescentes à déposer dans chaque puits (plaque de culture 96 puits). Nous avons choisi de déposer les quantités suivantes : 1, 3, 5, 10, 30, 100 cellules par puits dans une plaque de 96 puits de culture. Au bout de deux semaines, des clones ont pu être prélevés.

Pour les populations cellulaires issues de la lignée XP6BE, les puits contenant au départ de 1 à 3 cellules ont pu être exploités. En revanche, pour celles issues de la lignée 94RD27, seuls les puits dans lesquels 30 cellules ont étéensemencées, ont pu être étudiés.

Les clones apparaissant au microscope comme issus d'une seule cellule ont été décollés à la trypsine puis réensemencés dans des puits plus grands afin des les amplifier en vue de leur caractérisation.

Finalement, les clones amplifiés sont analysés en cytométrie pour vérifier qu'ils ont conservé l'expression de la GFP et qu'ils ont une fluorescence homogène. Les cellules sont considérées comme monoclonales si leur diagramme de fluorescence forme une courbe uni-modale, à l'inverse, une courbe bi ou plurimodale est caractéristique de cellules polyclonales.

### **2.3. Caractérisation moléculaire des clones cellulaires**

Les clones cellulaires exprimant la protéine de détoxication de la blasticidine étiqueté par la GFP, expriment aussi en théorie la protéine d'intérêt. Nous avons vérifié grâce à une approche moléculaire que les clones utilisés portaient le bon génotype du transgène et exprimaient bien la protéine.

#### **2.3.1. Vérification de l'intégration du transgène par PCR sur ADN génomique**

Nous avons fait synthétiser des couples d'amorces oligonucléotidiques de PCR spécifique de l'ADN du transgène, c'est-à-dire qu'une amorce est spécifique de l'ADNc du gène d'intérêt et la seconde amorces est spécifique d'une partie adjacente présente exclusivement sur l'ADN plasmidique.

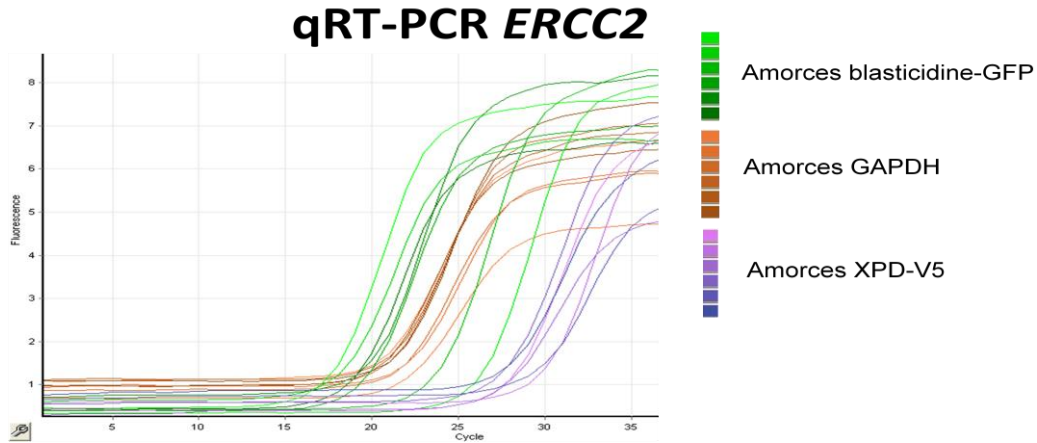
Nous avons ainsi réalisé des PCR sur l'ADN génomique des différents clones cellulaires fluorescents. Il s'est avéré que tous les clones testés étaient positifs pour la PCR spécifique de la séquence codant pour la GFP et pour la PCR spécifique de la séquence codant pour XPD ou pour XPG suivant les cas.

De plus, nous avons génotypé les produits de PCR par pyroséquençage, afin de vérifier que la forme allélique de l'ADNc intégré était bien celle désirée.



### 2.3.2. Comparaison de l'expression du transgène par RT-PCR en temps réel

Une fois la vérification de l'intégration des gènes plasmidiques réalisée par PCR, nous avons quantifié leur expression par RT-PCR quantitative en temps réel.



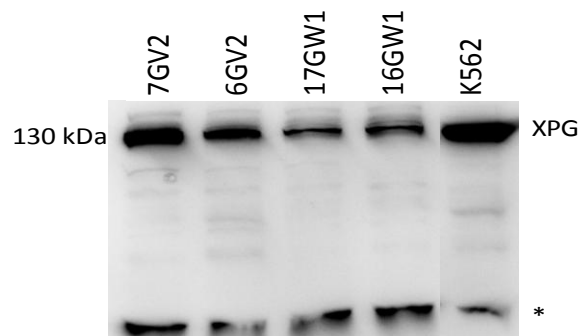
**Figure 24.** Résultats de la quantification relative de l'expression des gènes plasmidiques (blasticidine-GFP et XPD-V5) intégrés dans le génome des différents clones cellulaires sélectionnés.

Nous avons retenu les clones de génotype XPD commun et XPD variant pour lesquels nous mesurons un niveau d'expression semblable du transgène.

Nous avons utilisé la même approche pour les clones XPG.

### 2.3.3. Comparaison de l'expression de la protéine transuite par Western blot

Pour les clones présentant une expression transcriptionnelle satisfaisante du transgène, nous avons recherché si l'ARN messager était bien traduit en protéine avec la taille attendue et à un niveau comparable à celui présent dans une lignée non déficiente. Nous avons choisi pour cela le témoin positif constitué de l'extrait protéique de la lignée K562. Nous avons observé des niveaux d'expression comparables entre eux quel que soit le clone analysé.



**Figure 25.** Western-blot anti-XPG réalisés sur 50 µg d'extraits protéiques des clones retenus.

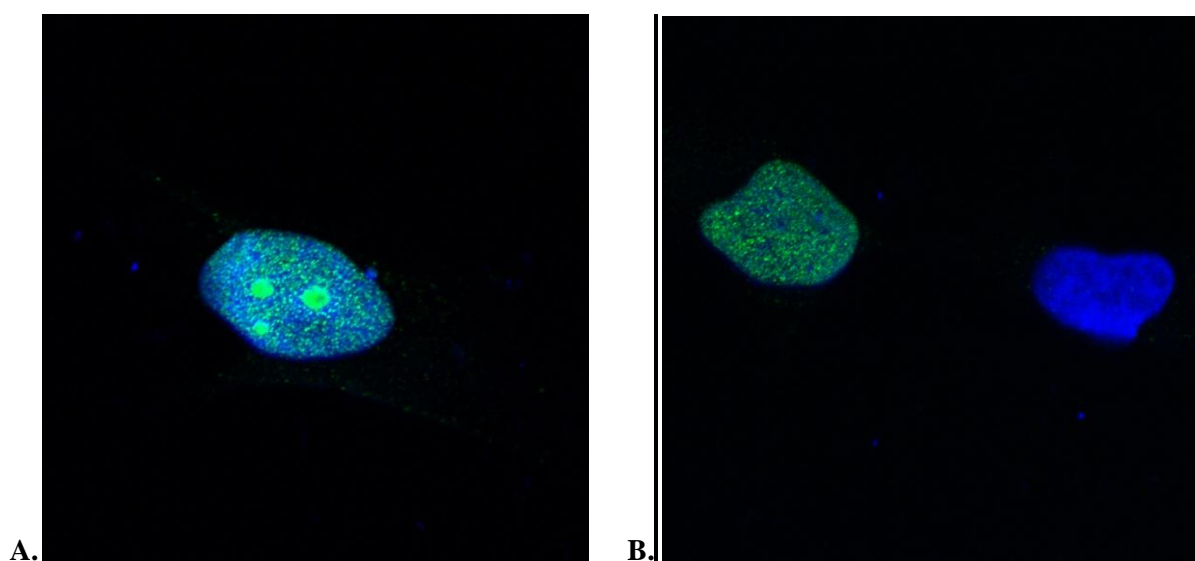
\* bande protéique révélée de manière aspécifique, qui sert de contrôle de charge.



### 2.3.4. Vérification de la localisation par microscopie confocale

Une fois la vérification de la production de la protéine transduite, il fallait s'assurer de son bon adressage au noyau et ce malgré l'étiquette V5 en C-terminal. XPD et XPG sont connues pour être des protéines quasi-exclusivement nucléaires.

Nous avons donc déposé 50 000 cellules sur des lamelles de verre déposées au fond de puits de plaques de culture à 24 puits. 24 heures plus tard nous avons procédé à l'immuno-marquage fluorescent avec l'anticorps anti-V5, puis un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome vert (la cyanine-3) a été ajouté.

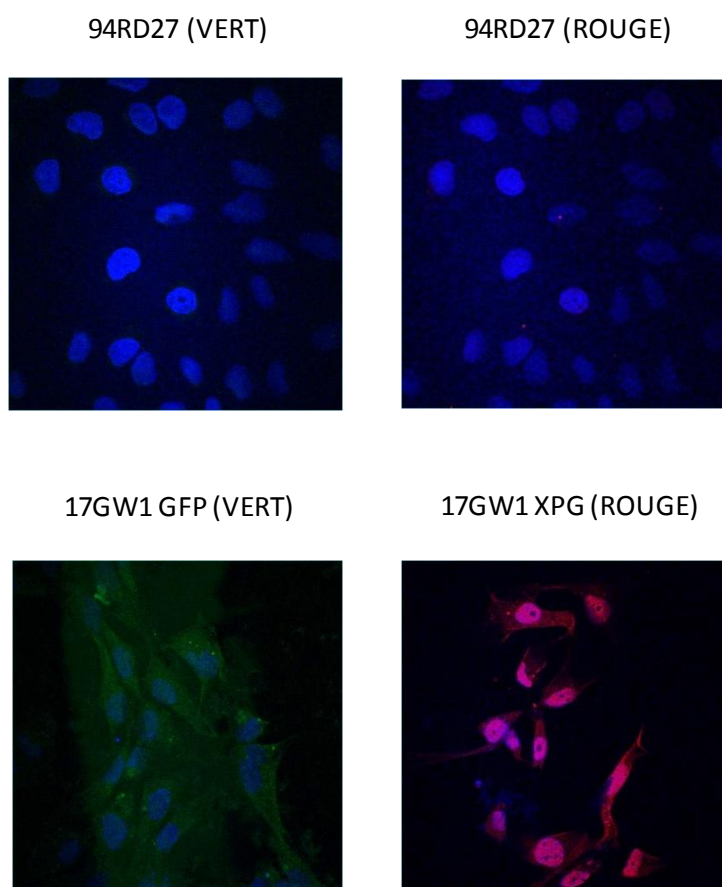


**Figure 26.** **A.** Microscopie confocale des fibroblastes 94RD27 transfectés de manière transitoire avec le vecteur pcDNA3.1-*ERCC5* variant. **B.** Microscopie confocale des fibroblastes 94RD27 transfectés avec le vecteur pcDNA3.1-*ERCC5* commun avec une cellule négative en contrôle. L'immuno-histo-marquage fluorescent a été réalisé avec un anticorps anti-V5 qui cible ici la protéine XPG-V5. Les noyaux sont colorés en bleu au DAPI.

L'expérience d'immunofluorescence révèle que la protéine de fusion XPG-V5 est correctement exprimée et adressée au noyau de la cellule.

Ainsi, il est donc possible d'envisager des tests fonctionnels des différents clones se révélant positifs à chaque étape de la caractérisation moléculaire.

De la même manière que nous l'avons fait avec les transfections transitoires, nous avons observé l'expression de la GFP et du transgène dans les clones stables en microscopie confocale (Figure 27) afin de compléter l'analyse de cytométrie qui permettait d'identifier les clones fluorescents ainsi que le pourcentage de cellules fluorescentes. La microscopie confocale nous permet en plus d'apprécier l'homogénéité des clones en observant la fluorescence de différents champs, de déterminer si les cellules GFP positives sont aussi positives pour le transgène, qui dépend d'un promoteur différent. La blasticidine-GFP est sous la dépendance d'un promoteur CMV, tandis que le gène d'intérêt est sous la dépendance d'un promoteur EF1- $\alpha$ .



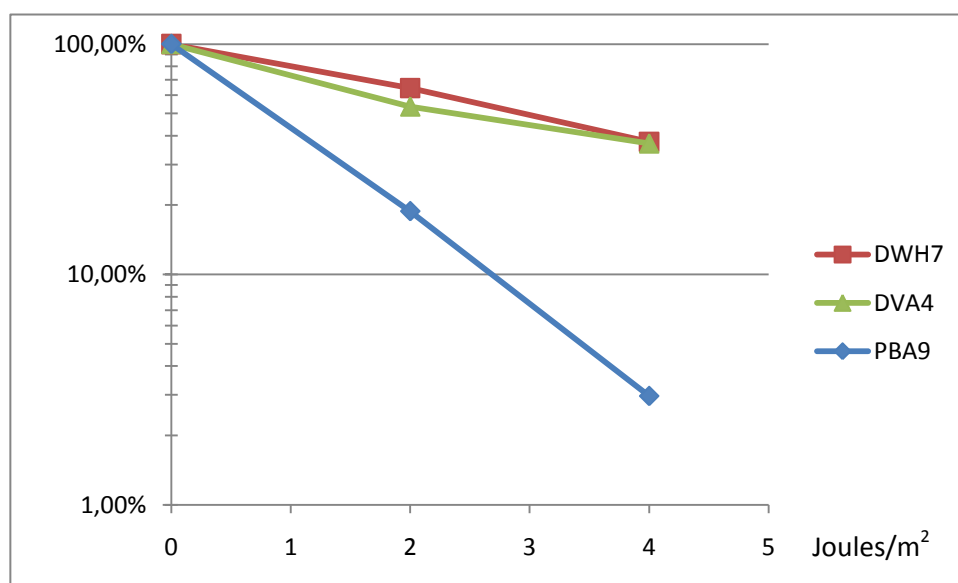
**Figure 27.** Microscopie confocale des fibroblastes 94RD27 non transfectés et du clone 17GW1 transfectés stable avec le vecteur pTRACER-ERCC5-WT. L'immuno-histo-marquage fluorescent a été réalisé avec un anticorps anti-XPG qui cible la partie C-terminale de XPG et un anticorps secondaire couplé à la cyanine-5 (rouge). Les noyaux sont colorés en bleu au DAPI.

Nous avons retenu le clone 17GW1 qui a été obtenu par transfection stable du plasmide pTRACER-ERCC5-WT dans les cellules 94RD27déficientes pour XPG et qui présente une expression homogène du transgène dans les cellules observées. Nous avons procédé de même pour l'ensemble des clones positifs en cytométrie et en western-blot.

### 2.3.5. Tests fonctionnels

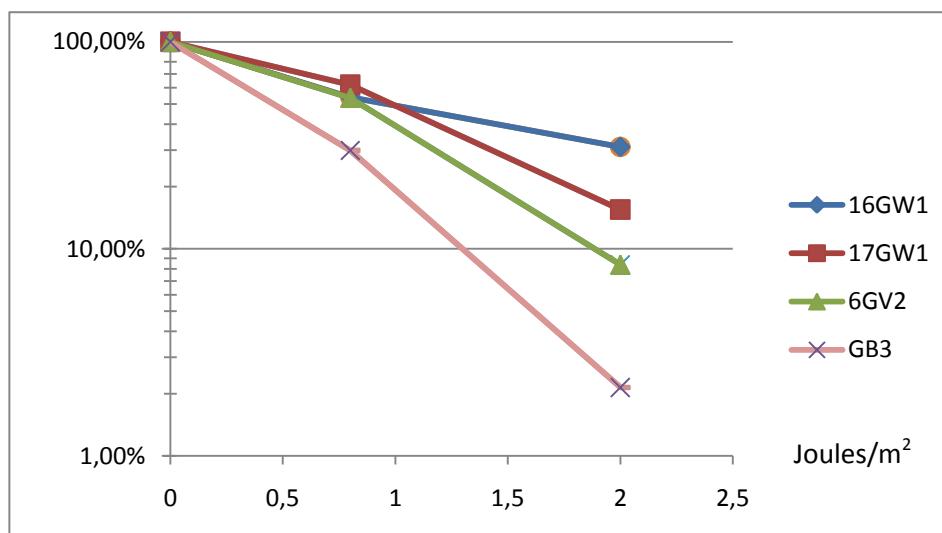
Pour vérifier la fonctionnalité de la complémentation des clones, nous avons réalisé des tests de survie aux irradiations UV. Ces tests consistent à irradier les cellules 48h après l'ensemencement, à raison de 1 million de cellules par boîte de culture de 10cm, sous une lampe à UVC (254nm). Un lot de boîtes n'est pas irradié afin de servir de contrôle, tandis que d'autres lots sont irradiés à raison de 0,4 Joules par seconde avec des temps d'exposition croissants (1s pour 0,4 Joule/m<sup>2</sup> ; 5 s pour 2 Joule/m<sup>2</sup>). 72h après irradiation, les cellules sont comptées et le pourcentage de cellules intactes est calculé par rapport au nombre de cellules présente dans le cas contrôle.

Nous avons obtenu des clones complémentés exprimant la protéine XPD commune et des clones exprimant la protéine variante. Ces complémentations se sont révélées fonctionnelles comme le montre la figure 28 dans la quelle on peut observer que les clones stables DVA4 et DWH7 ont perdu l'hypersensibilité aux UV caractéristique de la lignée de départ XP6BE. On n'observe pas de différence de sensibilité entre le clone XPD variant (DVA4) et le clone XPD commun (DWH7). Cela implique que leur capacité de réparation des lésions induites par les UV est équivalente.



**Figure 28.** Courbe d'inhibition de croissance par les UV de DVA4 : clone exprimant la protéine XPD variante ; DWH7 : clone exprimant la protéine XPD commune ; PBA9 : clone non complémenté : transfecté avec le vecteur « vide ».

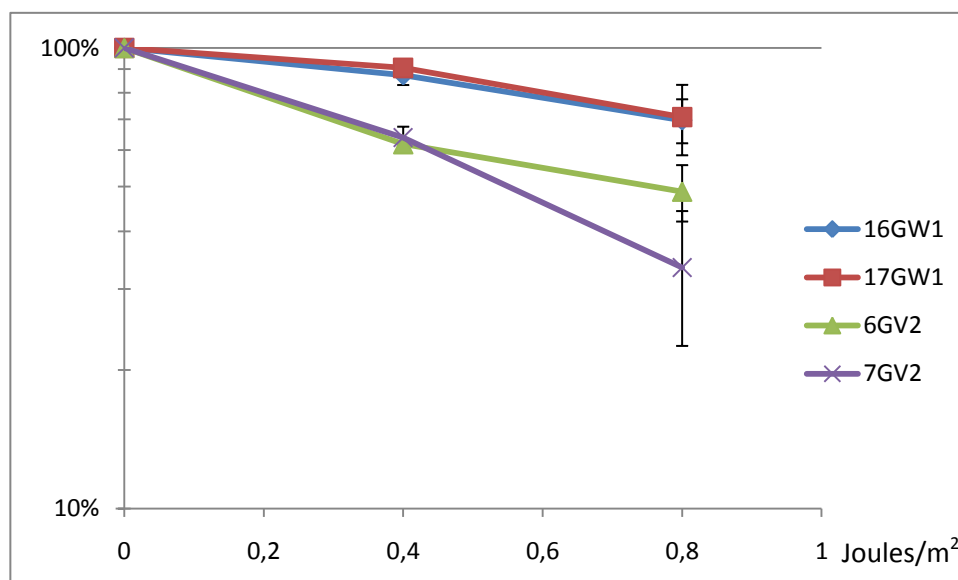
Nous avons aussi obtenu des clones complémentés exprimant la protéine XPG commune et des clones exprimant la protéine variante. Ces complémentations sont bien fonctionnelles comme le montre la figure 29 dans laquelle on peut voir que les clones stables 6GV2, 16GW1 et 17GW1 ont perdu l'hypersensibilité aux UV caractéristique de la lignée de départ 94RD27. On peut noter que cette dernière est particulièrement sensible aux UV comme cela a été décrit dans les cas de XP-CS due à des déficiences en protéines XPG (Ellison et al., 1998).



**Figure 29.** Courbe d'inhibition de croissance après traitement aux UV.

(GB3 : population cellulaire transfectée avec le vecteur « vide » ; 6GV2 : clone exprimant la protéine XPG variante ; 16GW1 et 17GW1 : clones exprimant la protéine XPG commune)

Lors de cette vérification de la fonctionnalité de la complémentation des clones XPG, nous avons observé une différence de survie entre les clones sauvages et le clone variant testé. Pour confirmer cette observation, nous avons répété cette expérience en triple sur deux clones XPG sauvages et deux clones XPG variants (Figure 30). Nous avons montré que l'activité de réparation de la protéine XPG variante (1104asp) était moins élevée que celle de la protéine commune (1104his). Nous envisageons de confirmer ces résultats par d'autres approches.



**Figure 30.** Courbe d'inhibition de croissance après traitement aux UV.

16GW1 et 17GW1 : clones exprimant la protéine XPG commune ; 6GV2 et 7GV2 : clones exprimant la protéine XPG variante.

## 2.4. Étude de l'effet des polymorphismes XPD lys751gln et XPG asp1104his sur la réponse cellulaire aux agents cytotoxiques

Avant d'envisager une étude comparative de la cytotoxicité de plusieurs médicaments anticancéreux en fonction de l'expression de la protéine commune, de la protéine variante ou de l'absence de protéine fonctionnelle, nous avons réalisé des tests d'inhibition de la croissance cellulaire. Pour cela, nous avons choisi de mesurer cette inhibition de croissance par le test MTT. Ce test possède l'avantage d'être relativement rapide (la lecture d'une plaque de culture 96 puits se fait en quelques secondes), il ne nécessite pas d'analyse subjective (pas de comptage visuel), et il possède une bonne reproductibilité. Ces mesures ont été réalisées sur les clones complémentés par les deux allèles du gène *ERCC5* (que nous appellerons « clones XPG ») et par les deux allèles du gène *ERCC2* (que nous appellerons « clones XPD »).

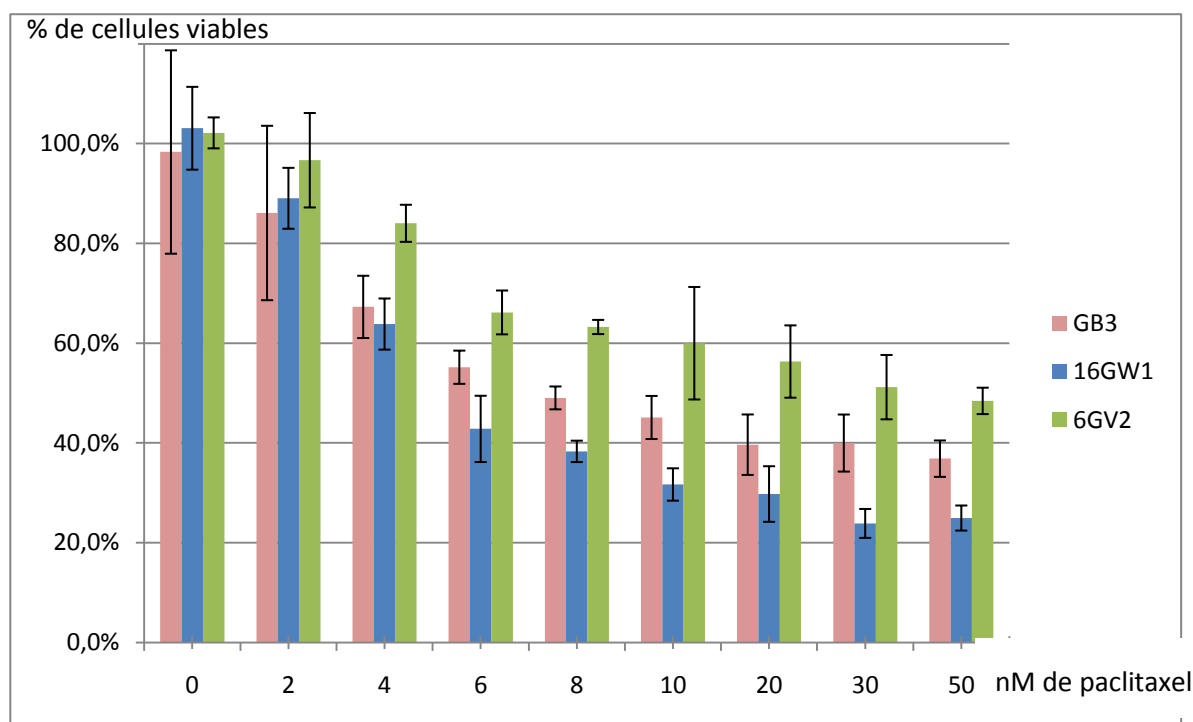
### 2.4.1. Test de cytotoxicité par mesure de l'inhibition de croissance (MTT) des clones XPG

#### 2.4.1.1. Inhibition de croissance des clones XPG par le paclitaxel

Nous avons observé dans notre étude sur le panel de lignées du NCI-60 que les lignées de génotype XPG homozygote commun étaient plus sensibles que les lignées de génotype homozygote variant. Nous avons donc entrepris de comparer la cytotoxicité du paclitaxel dans notre modèle de clones complémentés par la forme commune ou variante de XPG.

On observe une différence importante de toxicité du paclitaxel sur le clone XPG variant (6GV2) par rapport au clone XPG commun (16GW1) en particulier pour les concentrations importantes du médicament. La viabilité du clone XPG variant est deux fois plus importante que celle du clone XPG commun. L' $IC_{50}$  est de 50 nM pour le clone XPG variant tandis qu'elle est de 5 nM pour le clone de génotype commun ; les cellules complémentées avec la forme commune de XPG ont donc une sensibilité au paclitaxel dix fois plus importante que les cellules complémentées avec la forme variante (Figure 31).

Cette observation est en totale adéquation avec ce que nous avons observé dans le modèle du panel cellulaire du NCI-60.

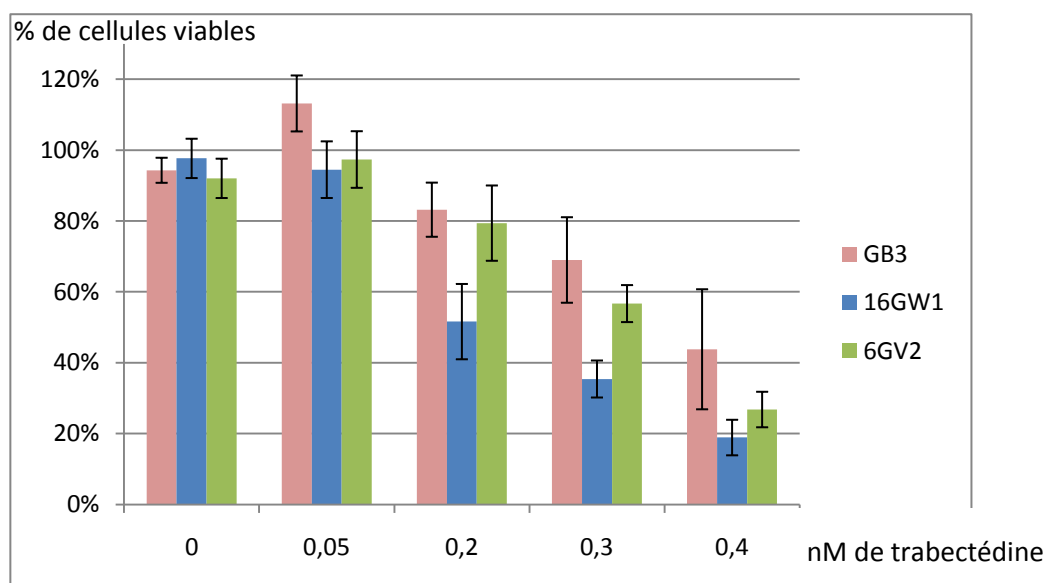


**Figure 31.** Courbe d'inhibition de croissance par le paclitaxel, mesuré par un test MTT.

GB3 correspond à une population cellulaire transfectée avec le vecteur « vide » ; 6GV2 correspond à un clone exprimant la protéine XPG variante ; 16GW1 correspond à un clone exprimant la protéine XPG commune.

#### 2.4.1.2. Inhibition de croissance des clones XPG par la trabectédine

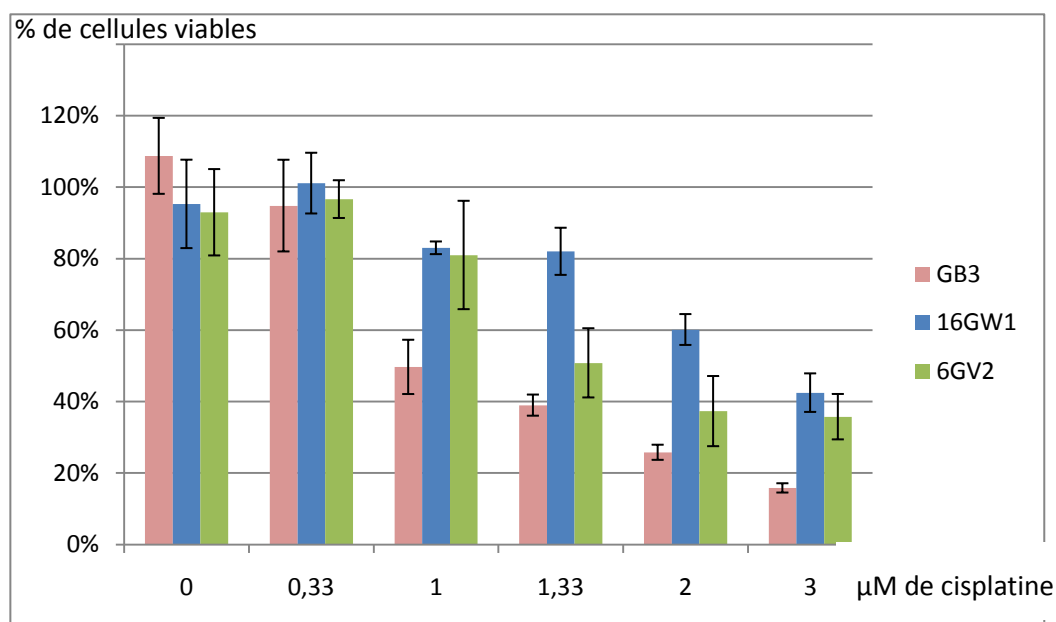
Des études portant sur l'effet antiprolifératif de la trabectédine ont montré que les lignées déficientes pour certaines protéine du NER, dont XPG, manifestaient une résistance à ce médicament (Takebayashi et al., 2001). Afin de caractériser nos clones par rapport à cette observation, nous avons effectué une mesure de la cytotoxicité de la trabectédine sur nos clones complémentés par XPG (6GV2 et 16GW1) et sur une population contrôle déficiente (GB3) (Figure 32).



**Figure 32.** Courbe d'inhibition de croissance par la trabectedine de GB3 : population cellulaire transfectée avec le vecteur « vide » ; 6GV2 : clone exprimant la protéine XPG variante ; 16GW1 : clone exprimant la protéine XPG commune.

#### 2.4.1.3. Inhibition de croissance des clones XPG par le cisplatine

La déficience en protéine XPG fonctionnelle rend la lignée 94RD27 hypersensible aux UV, mais aussi aux molécules créant des adduits à l'ADN comme le cisplatine. Afin de parfaire la caractérisation de nos clones nous avons testé l'effet de cette molécule sur la croissance cellulaire (Figure 33).



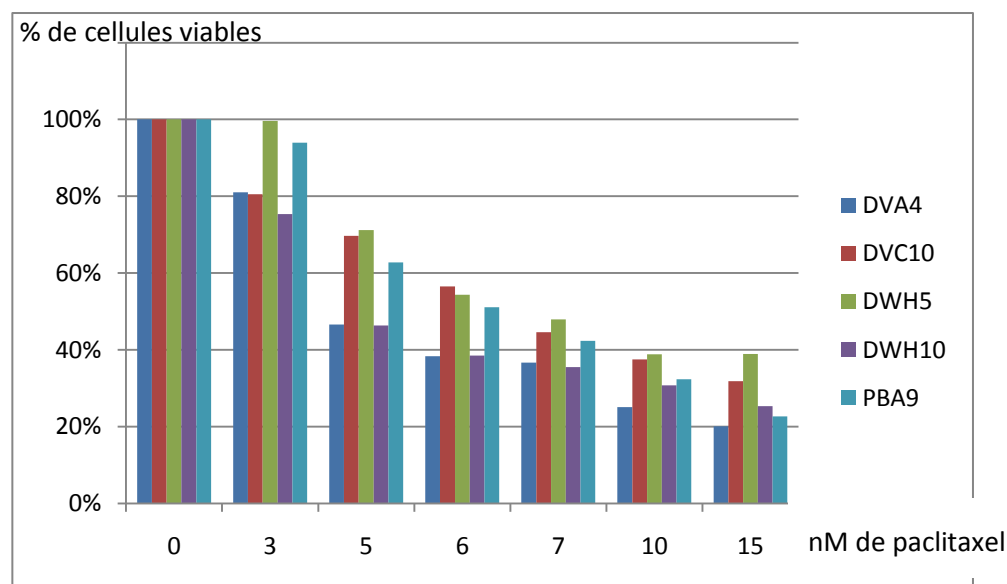
**Figure 33.** Courbe d'inhibition de croissance du cisplatine ; GB3 correspond à une population cellulaire transfectée avec le vecteur « vide » ; 7GV2 correspond à un clone exprimant la protéine XPG variante ; 16GW1 correspond à un clone exprimant la protéine XPG commune.

Les tests de cytotoxicité du paclitaxel, de la trabectédine, et du cisplatine présentés Figures 31, 32 et 33 montrent d'une part, que la complémentation de la lignée déficiente par la forme commune ou variante de la protéine XPG a un effet sur l'inhibition de croissance provoquée par ces agents anticancéreux ; et d'autre part que l'on observe une réponse cellulaire différente suivant le type de complémentation réalisée. Alors que la complémentation par la protéine XPG commune (16GW1) sensibilise les cellules au paclitaxel et à la trabectédine, on constate l'effet inverse pour le cisplatine pour lequel cette complémentation s'accompagne d'une moindre sensibilité. La complémentation par la protéine XPG variante (6GV2) s'accompagne aussi d'une résistance des cellules au cisplatine ; cette résistance est moins importante que celle accompagnant la complémentation par la protéine commune. En revanche, à l'inverse, on observe une résistance des cellules au paclitaxel. On constate aussi, d'une manière moins importante que pour la complémentation avec la protéine commune, une sensibilisation des cellules à la trabectédine.

#### 2.4.2. Test de cytotoxicité par mesure de l'inhibition de croissance (MTT) des clones XPD

##### *Inhibition de croissance des clones XPD par le paclitaxel*

Comme nous l'avons fait avec les clones XPG sélectionnés, nous avons réalisé l'étude de la toxicité du paclitaxel sur les différents clones complémentés avec la protéine XPD commune ou la protéine XPD variante (Figure 34).



**Figure 34.** Courbe d'inhibition de croissance par le paclitaxel de DVA4 et DVC10 correspondant à des clones exprimant la protéine XPD variante ; DWH5 et DWH10 correspondent à des clones exprimant la protéine XPD commune ; PBA9 correspond à un clone non complémenté (vecteur « vide »).



Le test de cytotoxicité du paclitaxel réalisé sur différents clones XPD et représenté Figure 34 montre qu'il n'existe pas de différence en terme d'inhibition de croissance entre ceux exprimant la protéine XPD commune par rapport à ceux exprimant la protéine XPD variante.

Il faut rappeler que malgré la déficience de la lignée XP6BE en activité hélicase XPD, il a été observé récemment *in vitro* que la protéine mutante XPD présente dans cette lignée est capable d'ancrer le sous-complexe CAK sur le cœur de TFIIH (Ito et al., 2007) et donc d'assumer sa seconde fonction. De ce fait, ce modèle n'est pas idéal pour réaliser une étude de complémentation. En effet, la protéine endogène s'ajoute à la protéine transduite dans son action d'ancrage du sous-complexe CAK. Il n'est donc pas possible d'étudier la capacité des variants transduits à stabiliser cette interaction.

L'étude du rôle du polymorphisme de XPD dans la stabilisation du complexe TFIIH, qui pourrait intervenir dans la réponse au paclitaxel par régulation de l'activité du MPF, n'est pas réalisable dans ce modèle cellulaire. Ainsi nous avons été contraint d'abandonner ce modèle d'étude, et c'est pourquoi l'étude de la cytotoxicité du cisplatine ou de la trabectedine n'a pas été entreprise.

De plus au cours de la réalisation de notre étude, un travail de l'équipe de J.M. Egly a montré *in vitro* que les variants de protéines XPD avaient une activité identique sur la réparation de l'ADN par le NER et sur le taux basal de transcription (Lainé et al., 2007). Il nous fallait alors reconsidérer notre hypothèse de travail et notre modèle d'étude. Nous avons vu plus haut que les lignées du NCI présentant le génotype variant gln/gln avaient une expression de XPD significativement plus faible que les lignées de génotypes lys751lys et lys751gln, sur au moins deux systèmes de microarrays différents. Si les deux protéines XPD ne diffèrent pas sur le plan qualitatif, nous avons pensé que l'effet du polymorphisme pouvait se manifester par une différence quantitative de l'expression de la protéine. Nous avons donc décidé d'aborder le problème du polymorphisme de *ERCC2* de façon différente de celle prévue initialement : l'approche choisie vise d'abord à comprendre comment la variation polymorphique est responsable d'une diminution d'expression, puis à évaluer les conséquences d'une extinction de l'expression du gène sur la fonction de la protéine.

## 2.5. Étude des messagers communs et variants du gène *ERCC2* (XPD)

L'expression de *ERCC2* étant corrélée avec le SNP du codon 751 alors que la protéine compte 760 acides aminés, on peut imaginer que cette variation proche de l'extrémité 3' UTR (non traduite) soit impliquée dans la stabilité du messager.

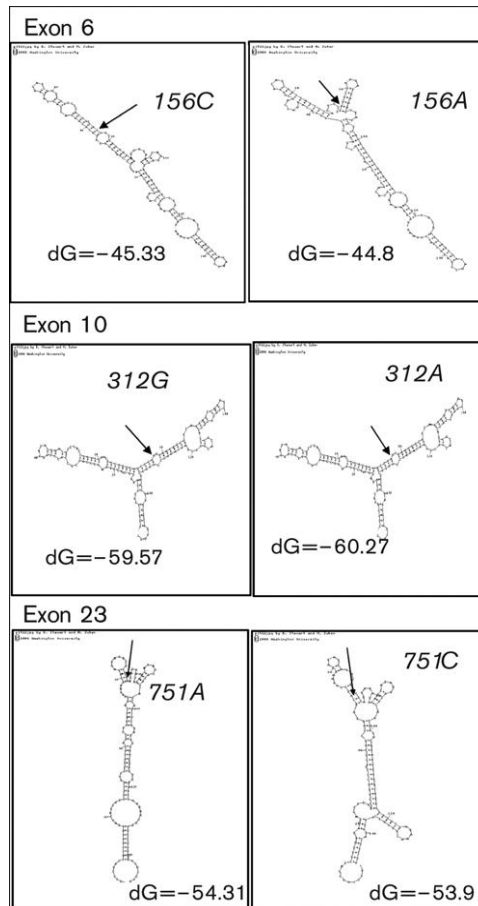
Avant d'étudier de la stabilité des ARNm transcrit sur les allèles commun et variant du gène *ERCC2*, nous avons recherché dans un premier temps si la modification de la séquence du messager par le polymorphisme lys751gln était susceptible d'altérer sa stabilité par modification de sa structure secondaire.

### 2.5.1. Étude de la structure secondaire de l'ARNm de *ERCC2*

Afin d'étudier la structure secondaire des ARNm de *ERCC2*, nous avons réalisé une approche *in silico* utilisant le logiciel RNAfold a été réalisée. Le changement du seul nucléotide concerné par le polymorphisme lys751gln modifie considérablement la structure secondaire du messager entier de *ERCC2* (Figure 35) alors que la variation de séquence induite par un autre polymorphisme (asp312asn), dépourvue de conséquences pharmacologiques sur la sensibilité aux taxanes dans le modèle du NCI, n'entraîne aucune modification de la structure secondaire du messager entier de *ERCC2*. Ce travail a été confirmé par la publication d'une étude associant le polymorphisme à une variation significative de la quantité de messager de *ERCC2* (Wolfe et al., 2007) (Figure 36). Ces résultats sont bien en faveur de l'hypothèse que le polymorphisme du codon 751 est responsable d'une variation de la stabilité de *ERCC2*.



**Figure 35.** Structure secondaire théorique des ARN messagers du gène *ERCC2* produits à partir de l'allèle sauvage et de l'allèle variant du gène *ERCC2*. Les cercles de couleur encadrent les régions où les différences sont importantes.



**Figure 36.** Effet des polymorphismes des codons 156 (exon 6), 312 (exon 10) et 751 (exon 23) sur la structure secondaire prédite par le logiciel Mfold.

Les séquences partielles de l'ARNm de XPD (140nt) entourant chacun des SNPs ont été analysées. Il apparaît que l'adénine (A) pour le codon 156, l'adénine (A) pour le codon 312 et la cytosine (C) pour le codon 751 permettent la structure secondaire optimale en terme d'appariement des brins et d'énergie requise (dG), en comparaison de la séquence de référence cytosine (C), guanine (G), et adénine (A) pour les même codons respectivement. La forme variante pour les codon 156 et 751 apparait la moins stable (Wolf et al., 2007)

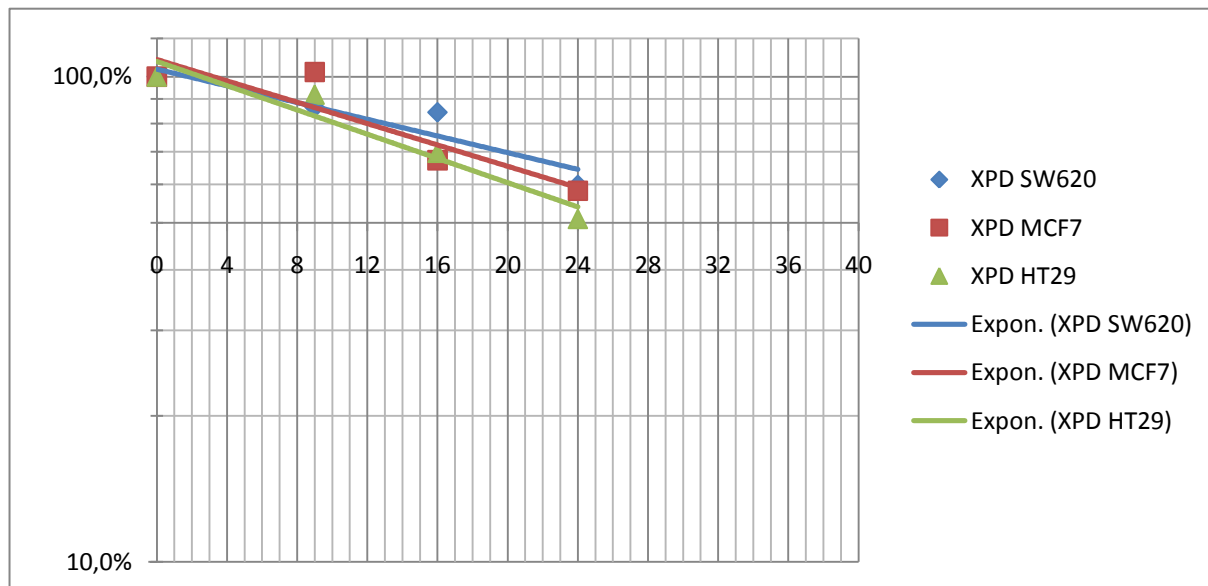
Nous avons tenté de valider cette hypothèse : (1) en recherchant une différence de stabilité des ARN messagers dans des lignées de génotype homozygote commun, homozygote variant ou hétérozygote pour le SNP du codon 751 de *ERCC2*, (2) en évaluant dans des lignées hétérozygotes pour le gène *ERCC2*, la transcription de chacun des deux allèles de *ERCC2*, en recherchant un taux de transcription diminué pour l'allèle 751gn.

### 2.5.2. Étude de la stabilité des ARNm de ERCC2

Le polymorphisme de lys751gln ERCC2 se situe à proximité de la partie 3' UTR (non traduite) du messager qui possède 761 codons. Nous avons pu voir par notre étude *in silico* de la structure secondaire de l'ARNm que ce SNP modifiait particulièrement le repliement de celui-ci.

Deux modèles ont été envisagés pour étudier la stabilité des deux messagers : le modèle cellulaire des clones complétés avec le plasmide pTRACER-XPB qui présente l'avantage d'être isogénique mais la partie 3' UTR du messager est fortement modifiée par l'étiquette « V5-his » ce qui pourrait masquer l'effet du polymorphisme sur la stabilité de l'ARNm.

C'est pourquoi nous avons préféré un modèle non isogénique, constitué de lignées du panel NCI-60, dont le génotype de XPD est soit homozygote variant (SW620), soit homozygote commun (MCF7), soit hétérozygote (HT29). Ainsi, il est possible de réaliser une cinétique de dégradation de l'ARNm endogène de XPD et d'étudier l'influence potentielle de chacune des protéines, commune et variante, sur la régulation de leur ARNm en comparant la demi-vie des messagers dans les lignées hétérozygotes par rapport aux homozygotes. Nous avons obtenu les demi-vies suivantes : 38,5 h pour la lignée homozygote variante (SW620) ; 31 h pour la lignée homozygote commune (MCF7) ; 27 h pour la lignée hétérozygote (HT29) (figure 37).



**Figure 37.** Quantification par qRT-PCR en temps réel de la dégradation de l'ARNm de XPD en fonction du temps. La transcription des ARN est bloquée à T = 0 par addition de 6,5 µg d'actinomycine D. Génotype XPD des lignées étudiées : SW620 = homozygote variante ; MCF7 = homozygote commune ; HT29 = hétérozygote.

Nous n'avons donc pas démontré de différence de stabilité de l'ARNm de XPD qui soit notable et qui puisse expliquer la plus faible expression de la protéine variante. Il semblerait donc que le polymorphisme du codon 751 ne soit pas responsable d'une modification de la stabilité de l'ARNm. Si tel n'était pas le cas, cela voudrait dire que le SNP du codon 751 ne serait qu'un marqueur non fonctionnel du niveau d'expression de XPD. Il est possible que la stabilité du messenger soit bien mise en jeu, mais pas de manière différente dans les 3 lignées que nous avons étudiées, c'est-à-dire qu'elles ne porteraient pas le SNP responsable de la modification de la demi-vie de l'ARNm. Le SNP 156 ou 711 seraient de bons candidats. Le SNP711 provoque des effets similaires (*in silico*) que le SNP751 sur la structure secondaire de l'ARNm. Il est également possible que la stabilité du messenger ne soit pas mise en jeu : il existe peut-être un SNP dans la partie promotrice qui serait responsable de la variation de l'expression de XPD et qui serait lié génétiquement avec le SNP 751. Peut-être s'agit-il du SNP en position -114 (rs3810366) puisqu'il est relativement fréquent (la fréquence de l'allèle rare est de 36 %) et qu'il existe un site sp1 en position -110. Un prolongement de cette étude serait nécessaire afin de connaître de manière certaine l'impact de ces polymorphismes sur la stabilité de l'ARNm ERCC2.

## 2.6. Étude du rôle cellulaire de la variation du niveau de la protéine XPD

Il a été montré que la surexpression de XPD n'a pas d'effet sur le cycle cellulaire (Aloyz et al., 2002). D'après nos résultats, elle n'a pas d'effet non plus sur la cytotoxicité du paclitaxel (figure 34). En revanche, il a été montré dans une lignée cellulaire de drosophile que l'extinction de la protéine XPD provoquait une accélération du cycle cellulaire (Chen et al., 2003).

Afin de mettre en évidence le rôle de XPD dans la régulation du cycle cellulaire et dans la réponse aux poisons du fuseau mitotique, nous avons réalisé une étude sur des lignées cellulaires humaines transfectées par des siRNA ciblant le messenger d'*ERCC2*.

### 2.6.1. Choix de la méthode d'extinction - Mise au point de l'extinction

Le choix de la méthode d'extinction dépend de plusieurs paramètres. Tout d'abord si l'on envisage l'obtention de résultat à court terme, la transfection transitoire de siRNA s'impose. Dans le cas inverse, la méthode d'infection par un lentivirus contenant la séquence d'un shRNA peut-être envisagé, mais la manipulation de cellules transfectées par un lentivirus nécessite une infrastructure adaptée. Dans notre cas, nous avons besoin d'une extinction relativement prolongée (96 à 120h en fonction des médicaments utilisés pour les traitements qui suivent l'extinction). Nous avons donc opté pour une transfection transitoire de siRNA optimisé pour nos études pharmacologiques.

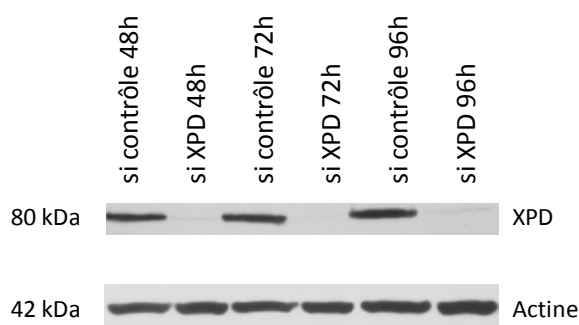
Nous avons testé deux fournisseurs (Dharmacon et Invitrogen) et trois types de siRNA.

L'agent de transfection est également primordial afin d'obtenir un bon niveau d'extinction mais un très faible niveau de toxicité de la transfection. Nous en avons comparé quatre.

Finalement, nous avons choisi deux siRNA ERCC2 et deux siRNA contrôles de type « Stealth » (Invitrogen) qui possèdent une modification chimique prolongeant leur stabilité et donc leur effet dans la cellule. Ces siRNA ont été délivrés grâce à l'agent de transfection lipofectamine RNAiMax (Invitrogen).

### 2.6.2. Cinétique d'extinction de la protéine

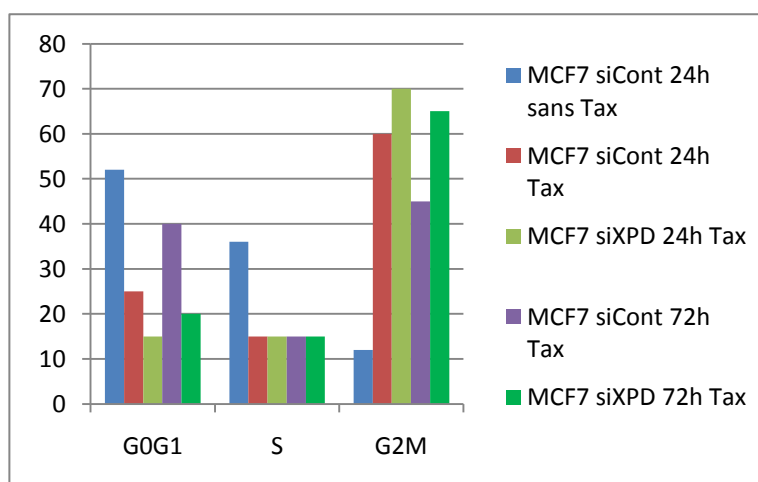
Dans nos conditions optimales de transfection, nous avons obtenu une extinction prolongée de la protéine XPD de 48 h à 96 h après la transfection. (Figure 38)



**Figure 38.** Western blot montrant une cinétique d'extinction de la protéine XPD entre 48 et 96 h après transfection par des siRNA dirigés contre le messager de *ERCC2*, dans la lignée XP6BE.

### 2.6.3. Étude du cycle cellulaire en fonction de l'extinction de XPD

Afin d'étudier l'influence de la protéine XPD sur le cycle cellulaire, nous avons entrepris une analyse du cycle cellulaire sur la lignée MCF7 en fonction de l'extinction de XPD par siRNA avec un traitement par le paclitaxel qui permet de bloquer les cellules en phase G2/M. Celle-ci montre que l'extinction de XPD provoque une augmentation du nombre de cellules en phase G2/M. (Figure 39).



**Figure 39.** Pourcentages des cellules MCF7 dans les différentes phases du cycle cellulaire sous traitement par 50 nM de paclitaxel (Tax) selon que l'expression de la protéine XPD a subi une extinction (siXPD) ou non (siCont).

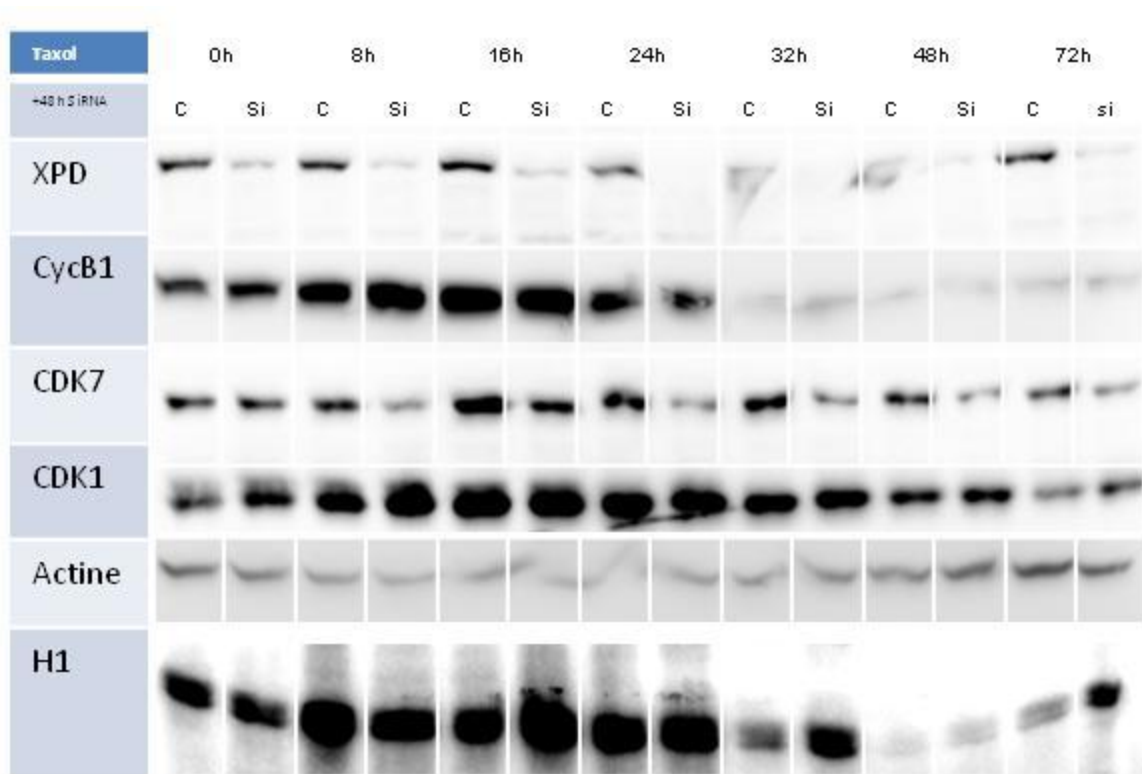
#### 2.6.4. Étude de l'activité de CDK1 en fonction de l'extinction de XPD

Il a été montré que la concentration cellulaire de XPD influençait la progression du cycle cellulaire chez la drosophile (Chen et al., 2003). De plus, nous avons vu plus haut que le polymorphisme de *ERCC2* joue un rôle dans le niveau d'expression de l'ARNm. Le niveau d'expression de l'ARNm de *ERCC2* est corrélé, dans le panel du NCI, avec la quantité de protéine. Ainsi, nous avons voulu vérifier dans des lignées humaines que l'extinction de la protéine XPD par méthode antisens pouvait promouvoir l'activation du complexe MPF (CDK1 / cycline B).

L'activation du MPF se faisant par phosphorylation de CDK1 par le CAK (contenant CDK7), nous avons quantifié par western-blot la concentration cellulaire du CDK1, de la cycline B1 et de CDK7. Il a été montré pour la lignée MCF7 que l'extinction de BRCA1 diminuait l'activité kinase de CDK1 et diminuait dans le même temps la sensibilité cellulaire au paclitaxel (Chabalier et al., 2006).

L'activité de CDK1 est mesurée par quantification de l'intégration du  $^{32}\text{P}$  marqué par l'histone H1, son substrat *in vitro*. Le traitement au paclitaxel à un niveau peu cytotoxique ( $\text{IC}_{20}$ ) nous sert ici à bloquer les cellules en phase G2/M afin de mieux observer l'activité kinase du MPF.

Nous avons choisi de réaliser cette expérience sur la lignée MCF7 (Figure 40) et la lignée XP6BE (Figure 41).



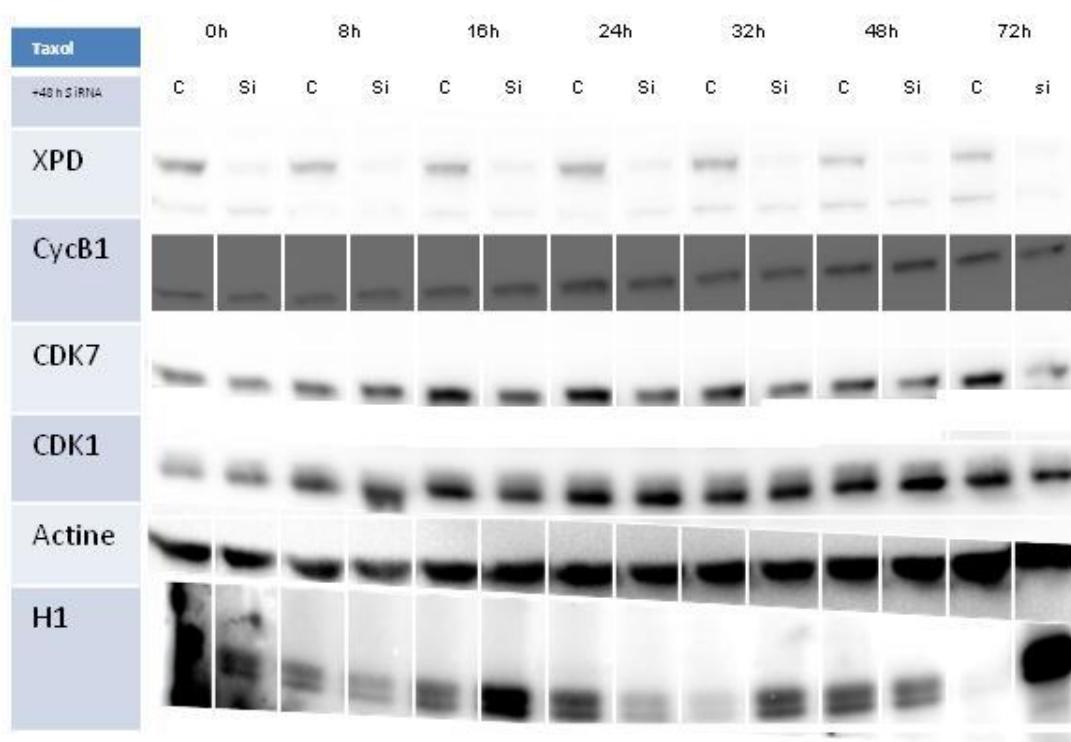
**Figure 40.** Activité CDK1 dans la lignée MCF7, durant un traitement par le paclitaxel, en fonction de l'extinction de la protéine XPD (C = siRNA contrôle ; si = siRNA XPD).

## Résultats - 2. Étude de l'effet des polymorphismes sur la réponse cellulaire

L'extinction de XPD entraîne, dans la lignée MCF7, une augmentation de l'activité de CDK1, en particulier à 16 h, 32 h, et 72 h de traitement par le paclitaxel (Taxol). La régulation de l'activité de CDK1 par XPD/CDK7 ne semble pas ici s'opérer par une dégradation plus ou moins tardive de la cycline B.

On observe que si l'extinction de XPD provoque la libération de CDK7, elle entraîne également la baisse de sa concentration cellulaire. Ces résultats avaient déjà été rapportés chez la drosophile (Chen et al., 2003). Il se met alors en place un équilibre complexe entre la régulation spatio-temporelle du CAK (CDK7) et la régulation de sa concentration globale intracellulaire.

Nous avons souhaité poursuivre cette étude dans la lignée XP6BE, dans laquelle la protéine XPD est mutée et déficiente pour son activité hélicase, afin de savoir si l'activité enzymatique de XPD était mise en jeu dans la régulation de l'activité de CDK1.



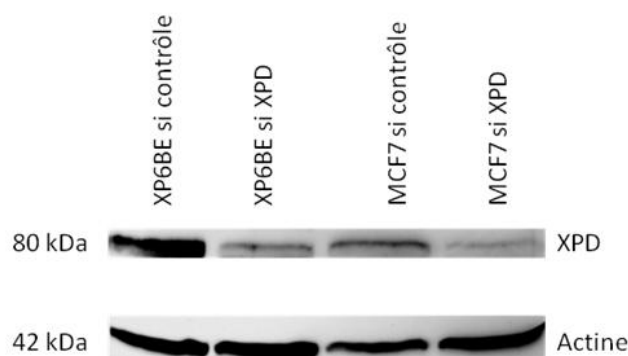
**Figure 41.** Activité CDK1 dans la lignée XP6BE, durant un traitement par le paclitaxel, en fonction de l'extinction de la protéine XPD. (C = siRNA contrôle ; si = siRNA XPD)

L'extinction de XPD entraîne aussi, dans la lignée XP6BE, une augmentation de l'activité de CDK1, mais avec une cinétique différente. Ainsi l'activité enzymatique de XPD n'apparaît pas nécessaire ou impliquée dans la régulation de l'activité CDK1 par XPD.



### 2.6.5. Tests d'inhibition de croissance (MTT) des lignées MCF7 et XP6BE

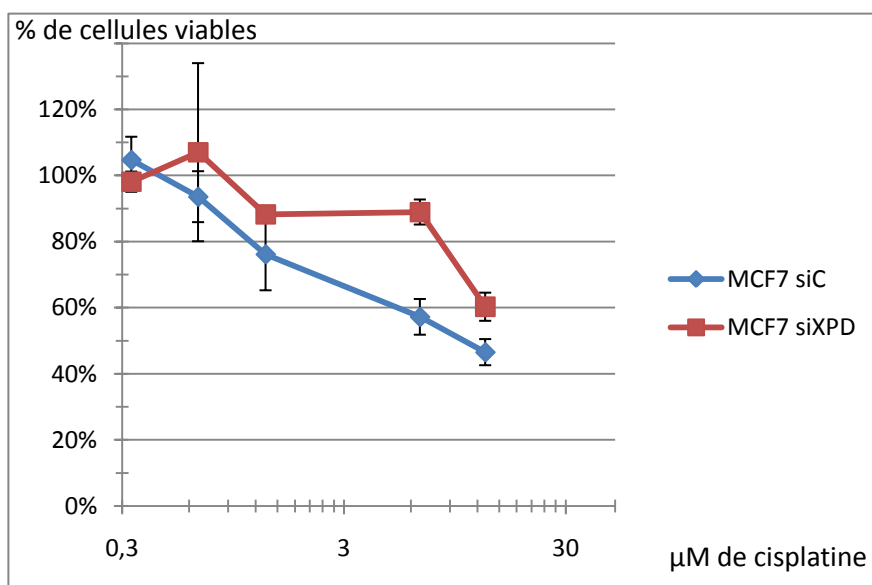
Nous avons réalisé une extinction de XPD dans les lignées MCF7 et XP6BE ensemencées en plaques de culture à 96 puits afin de réaliser des tests d'inhibition de croissance par le cisplatine et le paclitaxel (Figure 42).



**Figure 42.** Extinction de la protéine XPD par transfection à haut débit de siRNA en plaque de culture à 96 puits

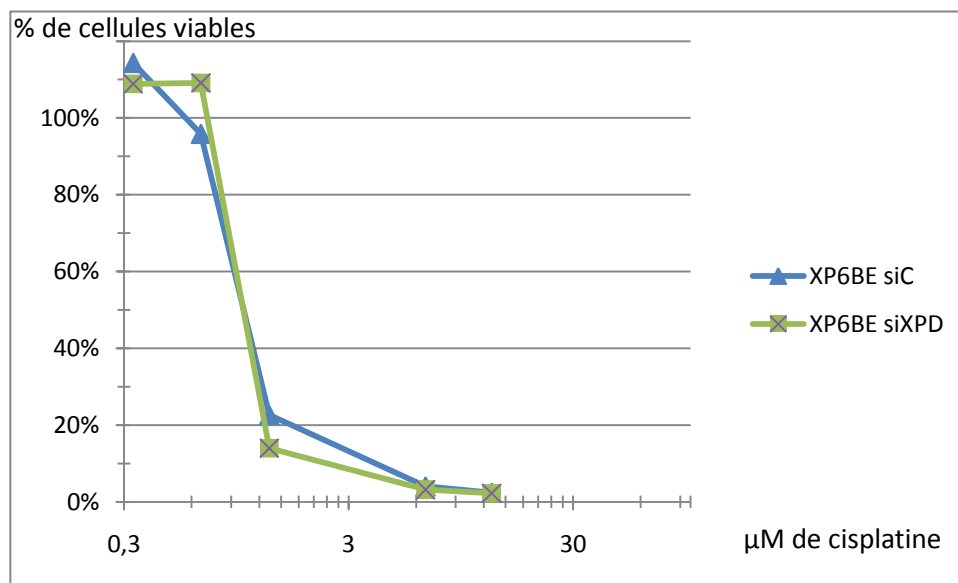
#### 2.6.5.1. Inhibition de croissance par le cisplatine des cellules traitées par siRNA ciblant XPD

Nous avons montré qu'une diminution du niveau d'expression de XPD est associée à la résistance au cisplatine dans la lignée MCF7 (figure 43). En effet, bien qu'il n'ait pas été identifié de corrélation entre l'expression de XPD et la cytotoxicité du cisplatine, d'après Araujo et al. (2000) et Coin et al. (2008) la libération de CAK du cœur de TFIIH permettrait l'activation de différents facteurs du NER qui seraient inhibés par phosphorylation dans le cas contraire. Ainsi, l'extinction partielle de la protéine XPD par le siRNA permet une activation du NER, tout en conservant une quantité suffisante d'hélicase XPD pour une réparation efficace.



**Figure 43.** Inhibition de croissance par le cisplatine de la lignée MCF7 traitée par des siRNA contrôles ou ciblant XPD.

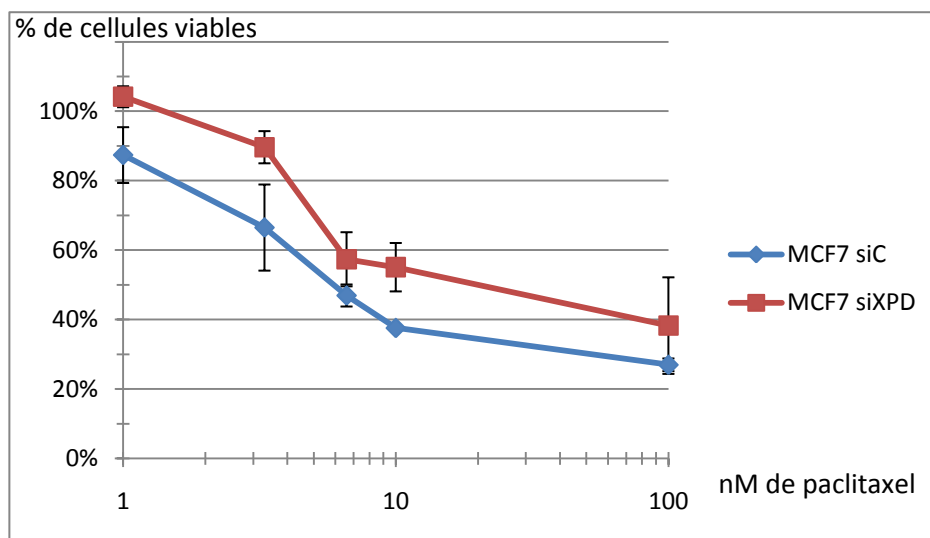
Nous avons également évalué l'inhibition de croissance par le cisplatine de la lignée XP6BE après extinction de XPD par siRNA. Cette lignée est hypersensible au cisplatine du fait de sa déficience en réparation de son ADN. La variation du niveau d'expression de la protéine XPD n'a, dans ce cas, pas d'influence sur la réparation (figure 44). On peut imaginer qu'il y a bien libération de CAK pouvant activer le NER, mais ce dernier étant déficient il ne peut exister une telle activité.



**Figure 44.** Inhibition de croissance par le cisplatine de la lignée XP6BE traitée par des siRNA contrôles ou ciblant XPD

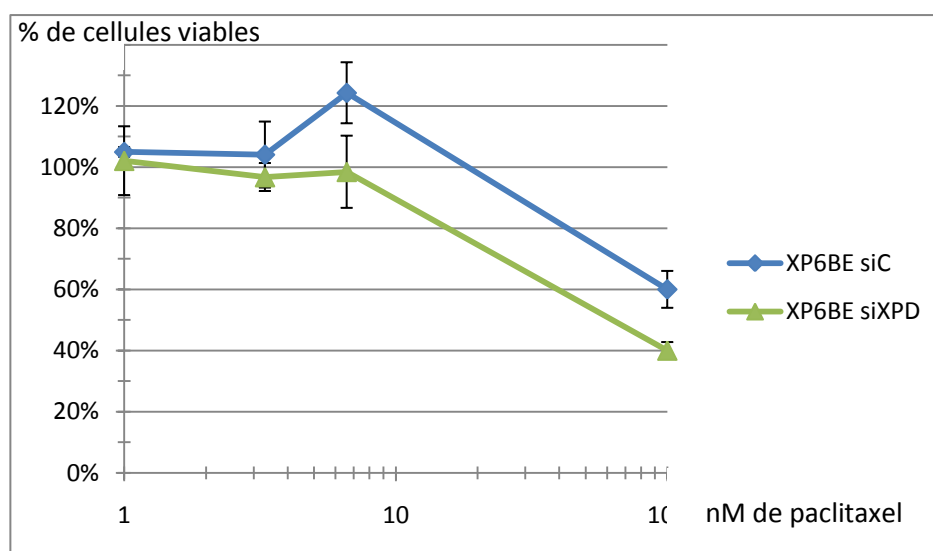
#### 2.6.5.2. Inhibition de croissance par le paclitaxel des cellules traitées par siRNA ciblant XPD

Nous avons montré que le traitement de la lignée MCF7 par le siRNA XPD, rendait celle-ci moins sensible au paclitaxel (Figure 45). Cette observation était relativement inattendue, mais nous l'expliquons par le fait que la lignée MCF7 fait partie des lignées les plus sensibles au paclitaxel du panel du NCI-60. De plus, son expression basale de XPD est relativement faible ; ainsi malgré son génotype XPD commun, il semble difficile de sensibiliser davantage cette lignée au paclitaxel par extinction de la protéine XPD. Il serait intéressant de répéter cette expérience sur une lignée cellulaire qui soit résistante au paclitaxel avec une expression importante de XPD.



**Figure 45.** Courbe d'inhibition de croissance par le paclitaxel de la lignée MCF7 par des siRNA contrôles ou ciblant XPD.

Nous avons ensuite étudié l'effet du paclitaxel sur la lignée XP6BE (Figure 46). Nous avons observé que les cellules traitées par les siRNA ciblant XPD étaient, cette fois, plus sensibles au paclitaxel. Ce résultat va dans le même sens que notre observation sur les lignées du panel NCI-60, mais il apporte une donnée nouvelle : l'activité hélicase de XPD n'est pas un paramètre entrant en jeu dans la réponse au paclitaxel puisqu'elle est absente dans la lignée étudiée. Cela vient en contradiction avec l'hypothèse impliquant une variation de cette activité dans le rôle du polymorphisme du codon 751 dans la réponse aux agents anticancéreux. En revanche, cet argument est soutenu par l'étude montrant une activité de réparation équivalente de la protéine XPD commune et variante (Lainé et al., 2007).



**Figure 46.** Courbe d'inhibition de croissance par le paclitaxel de la lignée XP6BE par des siRNA contrôles ou ciblant XPD.

Le nombre important d'études concernant le polymorphisme de *ERCC2*, et dans une moindre mesure le polymorphisme de *ERCC5*, ne pouvait trouver son explication dans le seul rôle de réparation de ces protéines ; pourtant le rôle « pluripotent » de ces protéines qui font le pont entre trois mécanismes distincts, a souvent été négligé. En effet, dès 2002, Xu et al. avaient observé une association significative entre le niveau protéique de XPD et la cytotoxicité du paclitaxel dans le panel du NCI-60 ; pourtant, ils ne le mentionnent pas expressément dans leurs résultats ni leur discussion et se limitent à l'analyse des associations du même ordre avec la cytotoxicité des dérivés du platine et des alkylants.

### 3. Étude clinique rétrospective du rôle des polymorphismes XPD lys751gln et XPG asp1104his sur la réponse pathologique au docetaxel

#### 3.1. Choix de l'étude

Afin de pouvoir déterminer si l'observation initiale que nous avons faite avait une validité clinique, il nous fallait identifier une situation capable d'apporter des réponses sans avoir à entreprendre un essai clinique dont la durée excèderait sans nul doute le calendrier d'une thèse. Pour cela, il nous fallait disposer d'une étude, prospective ou rétrospective : (1) dont les résultats pouvaient être obtenus rapidement ; (2) s'adressant à une tumeur *a priori* sensible aux taxanes ; (3) ayant inclus un bras de traitement sans taxane ; (4) dont le critère principal de jugement était la réponse tumorale à la chimiothérapie et non la survie ; (5) dont la réponse tumorale avait été évaluée de façon non ambiguë ; (6) pour laquelle on pouvait obtenir des prélèvements non tumoraux pour le génotypage.

#### 3.2. Description de l'étude clinique

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes adressés à l'essai 10994 de l'EORTC qui remplissait toutes ces conditions. Ce protocole, qui visait à rechercher une association entre les mutations de p53 et la réponse aux taxanes des cancers du sein en situation néo-adjuvante (voir p. 59), nous est apparu comme idéal pour répondre à la question que nous nous posions et nous avons obtenu l'accord de l'EORTC pour réaliser cette étude. Il existe toutefois un facteur de confusion qui exige qu'un nombre important de prélèvements soit étudié : la présence d'une anthracycline dans les deux bras de traitement. Il est bien sûr impossible de distinguer, dans le bras comprenant un taxane, les patientes répondant à l'action de l'anthracycline de celles répondant à l'action du docetaxel.

#### 3.3. Étude statistique

Dans un premier temps, nous avons analysé 81 échantillons disponibles à Bordeaux. L'étude statistique a fait apparaître une tendance vers des résultats positifs conformes à notre hypothèse : les patientes de génotype ERCC2 homozygote variant du bras « avec taxane » comptaient 4 réponses pathologiques complètes ou sub-complètes et 0 réponse incomplète alors que celles du bras « sans taxane » comptaient 2 réponses complètes et 5 réponses incomplètes ( $p = 0,06$ ). En outre, les patientes de génotype ERCC5 homozygote commun ou hétérozygote du bras « avec taxane » comptaient 28 réponses complètes et 8 réponses incomplètes, alors que celles du bras « sans taxane » comptaient 15 réponses complètes et 12 réponses incomplètes ( $p = 0,10$ ). Nous avons alors calculé que, si les proportions observées étaient conservées, il nous faudrait 320 patientes pour atteindre le seuil de significativité.

À ce stade de notre travail, nous avons recruté un total de 167 patientes pour lesquelles nous disposons des résultats de la réponse pathologique évaluée selon Sataloff et 155 autres pour lesquelles cette donnée n'est pas disponible et qu'il faudra faire évaluer spécialement par un pathologiste à partir des comptes-rendus anatomopathologiques. Les résultats que nous présentons ne sont donc pas définitifs ; ils confirment la tendance à une différence significative mais seule l'analyse complète des résultats cliniques des 155 patientes encore à analyser nous permettra de conclure définitivement (Tableau 9).

		167 patientes		p
		90 « avec taxane »	77 « sans taxane »	
Génotype <i>ERCC2</i>	gln/gln	8 RC, 3 NR	3 RC, 8 NR	0,086
	lys/lys + lys/gln	48 RC, 31 NR	36 RC, 30 NR	0,501
Génotype <i>ERCC5</i>	asp/asp	7 RC, 4 NR	6 RC, 6 NR	0,680
	his/his + asp/his	49 RC, 30 NR	33 RC, 32 NR	0,182

**Tableau 9.** Distribution des 167 patientes analysées de l'étude EORTC 10994 en fonction de leurs génotypes *ERCC2* et *ERCC5* et de la réponse pathologique déterminée à l'issue d'une chimiothérapie néo-adjuvante contenant ou non du docetaxel.

RC : réponse complète ou sub-complète ; NR : absence de réponse complète ou sub-complète

À défaut d'être définitifs, nos résultats sont encourageants et montrent une tendance à une probabilité de réponse plus élevée chez les patientes de génotype *ERCC2* homozygote variant et chez les patientes de génotype *ERCC5* homozygote sauvage ou hétérozygote lorsque la chimiothérapie contient un taxane, le docetaxel. Certes, sur la base de ces résultats, le génotypage de *ERCC2* ou de *ERCC5* ne pourra être considéré comme un marqueur prédictif de réponse au docetaxel utilisable en clinique, mais la tendance observée corrobore les observations que nous avons faites *in vitro* et justifie la recherche du mécanisme par lequel la sensibilité aux taxanes peut être associée à deux polymorphismes de la voie de réparation de l'ADN par excision de nucléotides.

---

# Conclusion

---

Nous avons abordé cette étude grâce au modèle cellulaire du panel du NCI-60 ; nous avons génotypé dans celui-ci plusieurs SNPs de gènes intervenant dans le système de réparation NER et nous avons recherché une association entre la présence de polymorphismes génétiques de ce système et la cytotoxicité d'agents anticancéreux. Ce modèle nous a ouvert des pistes, que nous avons pu explorer ensuite. Cette approche, partant de modèles cellulaires comme le modèle du NCI et permettant de générer des hypothèses que l'on explore ensuite, est de plus en plus utilisée aujourd'hui.

De manière un peu inattendue, nous avons pu observer une association entre ces polymorphismes et la réponse aux taxanes. L'association la plus significative a été trouvée entre les polymorphismes lys751gln de *ERCC2* (XPD) et asp1104his de *ERCC5* (XPG) avec la chimio-sensibilité au paclitaxel. Par ailleurs, nous avons montré que le polymorphisme du codon 751 du gène *ERCC2* était associé à une diminution de l'expression du messenger et de la protéine XPD. Certains travaux avaient montré que le rôle de ces protéines ne se limitait pas à la réparation de l'ADN, et qu'elles pouvaient avoir un rôle important dans d'autres mécanismes comme la transcription ou la division cellulaire. Nous avons fait porter nos efforts dans la mise en évidence et la compréhension des mécanismes pouvant expliquer le lien entre les variations génomiques individuelles du codon 751 du gène *ERCC2* et du codon 1104 du gène *ERCC5* et la réponse aux taxanes.

Nous avons pu montrer que l'activité hélicase de XPD n'était pas impliquée dans la réponse au paclitaxel, puisque la complémentation de cellules déficientes (XP6BE) ne modifie pas significativement leur sensibilité à ce médicament. En outre, l'extinction ciblée par siRNA de la protéine XPD mutée (inactive) dans ces mêmes cellules entraîne une suractivation de CDK1, une augmentation du nombre de cellules en mitose et une hypersensibilité au paclitaxel. Il semble donc que ce soit le rôle structural de XPD qui est en cause et qu'il y ait ainsi un effet de la disponibilité de XPD pour la régulation du cycle cellulaire.

Nous avons tenté d'identifier le lien mécanistique qui relie la présence du SNP variant à l'état homozygote à la diminution de l'expression de XPD. Nous avons recherché si cela pouvait s'expliquer par une moindre stabilité de son ARNm, comme cela avait été suggéré au même moment par une autre équipe (Wolfe et al., 2007), mais les mesures de la demi-vie des différents ARNm n'ont pu valider cette hypothèse. Ces observations suggèrent que le SNP du codon 751 n'est qu'un marqueur du niveau d'expression d'XPD et qu'il ne joue pas de rôle direct sur l'expression du gène. D'autres polymorphismes, en particulier dans la région 5'UTR du gène *ERCC2*, pourraient être impliqués dans le taux de transcription de gène ou la stabilité de son ARN messenger. Un prolongement de cette étude

---

serait nécessaire afin de connaître de manière certaine l'impact de tels polymorphismes sur l'expression du gène *ERCC2*.

Dans notre étude du rôle du SNP du codon 1104 de *ERCC5* sur la cytotoxicité des agents anticancéreux, nous avons pu montrer que les lignées homozygotes variantes étaient moins sensibles aux taxanes que les autres. Cela a pu être confirmé dans notre étude fonctionnelle par complémentation d'une lignée déficiente pour l'activité de réparation par NER (94RD27). Les cellules complémentées de manière stable avec la protéine XPG commune sont jusqu'à dix fois plus sensibles que les cellules complémentées avec la protéine variante. De la même manière que pour XPD, cela peut s'expliquer par le rôle structural de XPG sur la stabilisation du sous-complexe CAK sur le cœur de TFIIH. La diminution du rôle stabilisateur et d'ancrage, de manière qualitative pour XPG et quantitative pour XPD, provoquerait une augmentation du pool de CAK libre. Les sous-complexes CAK ainsi libérés seraient disponibles pour phosphoryler le CDK1 et ainsi promouvoir l'entrée en mitose.

Nous avons observé qu'en fonction de la complémentation de la lignée déficiente par la forme commune ou variante de XPG, les réponses au cisplatine et à la trabectédine étaient différentes, ce qui traduit bien une différence d'efficacité des deux protéines sur la réparation des lésions de l'ADN. De plus, une étude certes a montré que la variation de l'expression de XPG était associée à la cytotoxicité du cisplatine, mais ce n'est pas le cas pour la trabectédine (Koeppel et al., 2004). Il apparaît donc que c'est la variation de la séquence protéique qui est responsable d'une modification de son activité de réparation.

Nous avons également montré que la forte diminution de l'expression de XPD par siRNA dans la lignée MCF7 augmentait sa résistance au cisplatine. Cette relation inverse, qui peut s'expliquer par l'activation du NER entraînée par la libération de CAK du cœur de TFIIH, montre encore une fois le rôle plus structural que purement enzymatique de cette protéine sur la stabilité de TFIIH. On peut ainsi souligner le rôle important de la régulation de cette protéine dans l'équilibre de trois mécanismes centraux que sont la réparation, la transcription et la division cellulaire. Cela est sans doute conforté par le fait qu'il n'a pu être établi de modèle de souris knock-out pour XPD, car les souris meurent à des stades précoces du développement alors que l'activité hélicase de cette protéine n'est indispensable que pour la réparation de l'ADN.

Nous avons souhaité montrer l'association des polymorphismes de *ERCC2* et *ERCC5* avec la réponse aux taxanes dans une étude clinique rétrospective mais, même si l'on observe une tendance vers la confirmation des résultats *in vitro*, nous n'avons pas atteint le seuil de significativité. De toute façon, on ne pourra considérer les polymorphismes étudiés comme des marqueurs prédictifs de la sensibilité aux taxanes utilisables en clinique en raison de la faible sensibilité de l'association, même si elle devient significative en augmentant le nombre de patients. En revanche, la tendance manifestée en



clinique suggère fortement qu'il existe une association entre la sensibilité aux taxanes et l'expression et/ou l'activité de protéines du NER, liées à leurs polymorphismes, ce qui est en accord avec notre hypothèse de départ.

Ce travail a permis d'améliorer certains aspects de la compréhension de la régulation de mécanismes interconnectés que sont la réparation, la transcription et la division cellulaire, dans le cadre général d'une recherche visant à améliorer l'individualisation des thérapeutiques. Cette étude met en lumière la complexité de l'identification de marqueurs génétiques permettant de prédire la réponse thérapeutique d'un patient. Il est certes possible de montrer des associations significatives entre un marqueur génotypique chez un patient ou dans sa tumeur et la réponse à un traitement donné, mais l'existence de telles relations ne permet qu'exceptionnellement d'influencer le choix thérapeutique. Ainsi, il est extrêmement difficile d'identifier de nouveaux marqueurs présents de façon fréquente dans la population, facilement identifiables, et fortement associés à l'efficacité ou à la toxicité d'un traitement anticancéreux. La pharmacogénétique connaît actuellement une expansion rapide et de nombreux travaux lui sont consacrés en cancérologie ; de même, l'identification et la validation de signatures transcriptomiques associées au pronostic ou prédictives de la réponse thérapeutique constituent une voie explorée par de nombreuses équipes à travers le monde. Ces développements sont encourageants et nous confortent dans l'idée que des travaux comme celui que nous présentons aujourd'hui apportent une contribution non négligeable à la compréhension du caractère individuel du lien entre le médicament et ses effets dans l'organisme.

---

# Références

---

- Agrawal A, Gutteridge E, Gee JM, Nicholson RI, Robertson JF. Overview of tyrosine kinase inhibitors in clinical breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12 Suppl 1: S135-44.
- Akoulitchev S, Chuikov S, Reinberg D., TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 2000; 407(6800): 102-6.
- Aloyz R, Xu ZY, Bello V, Bergeron J, Han FY, Yan Y, Malapetsa A, Alaoui-Jamali MA, Duncan AM, Panasci L., Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIID subunit XPD. *Cancer Res* 2002; 62(19): 5457-62.
- Andersen G, Poterszman A, Egly JM, Moras D, Thierry JC. The crystal structure of human cyclin H 10. *FEBS Lett* 1996; 397[1], 65-9.
- Arenas-Sordo Mde L, Hernández-Zamora E, Montoya-Pérez LA, Aldape-Barrios BC, Cockayne's syndrome: a case report. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*.2006; 11(3): E236-8.
- Atanassov B, Velkova A, Mladenov E, Anachkova B, Russev G. Comparison of the global genomic and transcription-coupled repair rates of different lesions in human cells. *Z Naturforsch [C]* 2004; 59(5-6): 445-53.
- Benhamou S, Sarasin A. ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005; 161: 1-14.
- Bergmann E, Egly JM. Trichothiodystrophy, a transcription syndrome. *Trends Genet* 2001; 17(5): 279-86.
- Brown AJ, Jones T, Shuttleworth J. Expression and activity of p40MO15, the catalytic subunit of cdk-activating kinase, during *Xenopus* oogenesis and embryogenesis. *Mol Biol Cell* 1994; 5: 921-32.
- Cai L, Roginskaya M, Qu Y, Yang Z, Xu Y, Zou Y. Structural characterization of human RPA sequential binding to single-stranded DNA using ssDNA as a molecular ruler. *Biochemistry* 2007; 46: 8226-33.
- Cargill M, Daley GQ. Mining for SNPs: putting the common variants--common disease hypothesis to the test. *Pharmacogenomics* 2000; 1(1): 27-37.
- Chabalier C, Lamare C, Racca C, Privat M, Valette A, Larminat F. BRCA1 downregulation leads to premature inactivation of spindle checkpoint and confers paclitaxel resistance. *Cell Cycle* 2006; 5(9): 1001-7.
- Chen J, Larochelle S, Li X, Suter B. Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature* 2003; 424(6945): 228-32.

- Ciccia A, McDonald N, West SC. Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 259-87.
- Cleaver JE, Bootsma D. Xeroderma Pigmentosum: Biochemical and Genetic Characteristics. *Annu Rev Genet* 1975; 9: 19-38.
- Coin F, Oksenyich V, Mocquet V, Groh S, Blattner C, Egly JM. Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Mol Cell* 2008; 31(1): 9-20.
- Coin F, Proietti De Santis L, Nardo T, Zlobinskaya O, Stefanini M, Egly JM. p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit. *Mol Cell* 2006; 21(2): 215-26.
- de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 1999; 13: 768-85.
- De Weerd-Kastelein EA, Keijzer W, Bootsma D. A third complementation group in xeroderma pigmentosum. *Mutat Res* 1974; 22(1): 87-91.
- De Weerd-Kastelein EA., Keijzer W., Bootsma D., Genetic heterogeneity of xeroderma pigmentosum demonstrated by somatic cell hybridization. *Nat New Biol* 1972; 238(81): 80-3.
- Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* 1997; 16: 6559-73.
- Fisher RP. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 22): 5171-80.
- Fousteri M, Mullenders LH. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* 2008; 18(1): 73-84.
- Garcia J, Riely GJ, Nafa K, Ladanyi M., KRAS mutational testing in the selection of patients for EGFR-targeted therapies. *Semin Diagn Pathol* 2008; 25(4): 288-94..
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1513-30.
- Graham JMJ, Anyane-Yeboa K, Raams A, Appeldoorn E, Kleijer WJ, Garritsen VH, Busch D, et al Cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a nucleotide excision-repair defect and a mutated XPD gene, with prenatal diagnosis in a triplet pregnancy. *Am J Human Genet* 2001; 69: 291-300
- Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, Zhou W, Su L, Wain JC, Lynch TJ, Neuberg DS, Christiani DC. XPD and XRCC1 genetic polymorphisms are prognostic factors in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2594-601.
- Hagting A, Jackman M, Simpson K, Pines J. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 1999; 9:680-9.

- Hall H, Gurský J, Nicodemou A, Rybanská I, Kimlícková E, Pirsal M. Characterization of ERCC3 mutations in the Chinese hamster ovary 27-1, UV24 and MMC-2 cell lines. *Mutat Res* 2006; 593(1-2): 177-86.
- Henning KA, Li L, Iyer N, McDaniel LD, Reagan MS, Legerski R, Schultz RA, Stefanini M, Lehmann AR, Mayne LV, Friedberg EC. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* 1995; 82(4): 555-64.
- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002; 4(2): 45-61.
- Hou SM, Falt S, Angelini S, Yang K, Nyberg F, Lambert B, Hemminki K. The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2002; 23: 599-603.
- Hu Z, Shao M, Yuan J, Xu L, Wang F, Wang Y, Yuan W, Qian J, Ma H, Wang Y, Liu H, Chen W, Yang L, Jin G, Huo X, Chen F, Jin L, Wei Q, Huang W, Lu D, Wu T, Shen H. Polymorphisms in DNA damage binding protein 2 (DDB2) and susceptibility of primary lung cancer in the Chinese: a case-control study. *Carcinogenesis* 2006; 27(7): 1475-80.
- Hu Z, Xu L, Shao M, Yuan J, Wang Y, Wang F, Yuan W, Qian J, Ma H, Wang Y, Liu H, Chen W, Yang L, Jing G, Huo X, Chen F, Jin L, Wei Q, Wu T, Lu D, Huang W, Shen H. Polymorphisms in the two helicases ERCC2/XPD and ERCC3/XPB of the transcription factor IIH complex and risk of lung cancer: a case-control analysis in a Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(7): 1336-40.
- Huang RS, Duan S, Kistner EO, Zhang W, Bleibel WK, Cox NJ, Dolan ME. Identification of genetic variants and gene expression relationships associated with pharmacogenes in humans. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18(6): 545-9.
- Ito S, Kuraoka I, Chymkowitch P, Compe E, Takedachi A, Ishigami C, Coin F, Egly JM, Tanaka K. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol Cell* 2007; 26(2): 231-43.
- Jeon HS, Kim KM, Park SH, Lee SY, Choi JE, Lee GY, Kam S, Park RW, Kim IS, Kim CH, Jung TH, Park JY. Relationship between XPG codon 1104 polymorphism and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1677-81.
- Jorgensen TJ, Helzlsouer KJ, Clipp SC, Bolton JH, Crum RM, Visvanathan K. DNA repair gene variants associated with benign breast disease in high cancer risk women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(1): 346-50.

- Kapetanaki MG, Guerrero-Santoro J, Bisi DC, Hsieh CL, Rapić-Otrin V, Levine AS. The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(8): 2588-93.
- Keriel A, Stary A, Sarasin A, Rochette-Egly C, Egly JM. XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. *Cell* 2002; 109(1): 125-35.
- Khan SG, Metter EJ, Tarone RE, Bohr VA, Grossman L, Hedayati M, Bale SJ, Emmert S, Kraemer KH. A new xeroderma pigmentosum group C poly(AT) insertion/deletion polymorphism. *Carcinogenesis* 2000; 21(10): 1821-5.
- Kraemer KH, Coon HG, Petinga RA, Barrett SF, Rahe AE, Robbins JH. Genetic heterogeneity in xeroderma pigmentosum: complementation groups and their relationship to DNA repair rates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72(1): 59-63.
- Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol* 1994; 130: 1018-21.
- Kulaksiz G, Reardon JT, Sancar A. Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. *Mol Cell Biol* 2005; 25(22): 9784-92.
- Kumar R, Hoglund L, Zhao C, Forsti A, Snellman E, Hemminki K. Single nucleotide polymorphisms in the XPG gene: determination of role in DNA repair and breast cancer risk. *Int J Cancer* 2003; 103: 671-5.
- Lainé JP, Mocquet V, Bonfanti M, Braun C, Egly JM, Brousset P. Common XPD (ERCC2) polymorphisms have no measurable effect on nucleotide excision repair and basal transcription. *DNA Repair (Amst)* 2007; 6(9): 1264-70.
- Lainé JP, Mocquet V, Egly JM. TFIIH enzymatic activities in transcription and nucleotide excision repair. *Methods Enzymol* 2006; 408: 246-63.
- Lee KM, Miklos I, Du H, Watt S, Szilagy Z, Saiz JE, Madabhushi R, Penkett CJ, Sipiczki M, Bähler J, Fisher RP. Impairment of the TFIIH-associated CDK-activating kinase selectively affects cell cycle-regulated gene expression in fission yeast. *Mol Biol Cell* 2005; 16(6): 2734-45.
- Lehmann AR, Arlett CF, Broughton BC, Harcourt SA, Steingrimsdottir H, Stefanini M, Taylor AMR, et al., Trichothiodystrophy, a human DNA repair disorder with heterogeneity in the cellular response to ultraviolet light. *Cancer Res* 1988; 48: 6090-6.
- Lehmann AR. Three complementation groups in Cockayne syndrome. *Mutat Res* 1982; 106(2): 347-56.

- Le Morvan V, Bellott R, Moisan F, Mathoulin-Pélissier S, Bonnet J, Robert J. Relationships between genetic polymorphisms and anticancer drug cytotoxicity vis-à-vis the NCI60 panel. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 843-852
- Le Morvan V, Smith D, Laurand A, Brouste V, Mathoulin-Pélissier S, Soubeyran I, Bellott R, Robert J. Determination of XPD Lys751Gln and GSTP1 Ile105Val polymorphisms in colorectal cancer patients: relationships with treatment outcome. *Pharmacogenomics* 2007, 8: 1693-703.
- Li C, Wang LE, Wei Q., DNA repair phenotype and cancer susceptibility--a mini review. *Int J Cancer* 2009; 124(5): 999-1007.
- Loeb LA, Bielas JH, Beckman RA. Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications. *Cancer Res.*2008; 68(10): 3551-7;
- Lolli G, Johnson LN. CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* 2005; 4(4): 572-7.
- Lolli G. Binding to DNA of the RNA-polymerase II C-terminal domain allows discrimination between Cdk7 and Cdk9 phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(4): 1260-8.
- Ma H, Hu Z, Wang H, Jin G, Wang Y, Sun W, Chen D, Tian T, Jin L, Wei Q, Lu D, Huang W, Shen H. ERCC6/CSB gene polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Lett* 2009; 273(1): 172-6.
- Matsuno M, Kose H, Okabe M, Hiromi Y. TFIIF controls developmentally-regulated cell cycle progression as a holocomplex. *Genes Cells* 2007; 12(11): 1289-300.
- Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest* 2005; 115(6): 1404-7.
- Moisan F, Longy M, Robert J, Le Morvan V. Identification of gene polymorphisms of human DNA topoisomerase I in the National Cancer Institute panel of human tumour cell lines. *British Journal of Cancer* 2006; 95: 906-913
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Wolff AV, Goodrich MG, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a high flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Nat Cancer Inst* 1991; 83: 757-66.
- Monzo M, Moreno I, Navarro A, Ibeas R, Artells R, Gel B, Martinez F, Moreno J, Hernandez R, Navarro-Vigo M. Single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes XPA, XPD, XPG and ERCC1 in advanced colorectal cancer patients treated with first-line oxaliplatin/fluoropyrimidine. *Oncology* 2007; 72(5-6): 364-70.
- Nichols AF, Itoh T, Graham JA, Liu W, Yamaizumi M, Linn S. Human damage-specific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation. *J Biol Chem* 2000; 275(28): 21422-8.

- Nief N, Le Morvan V, Robert J. Involvement of gene polymorphisms of thymidylate synthase in gene expression, protein activity and anticancer drug cytotoxicity using the NCI-60 panel. *Eur J Cancer* 2007; 43: 955-62
- Ohi R, Gould KL. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2): 267-73.
- Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8654-8.
- Park DJ, Zhang W, Stoehlmacher J, Tsao-Wei D, Groshen S, Gil J, Yun J, Sones E, Mallik N, Lenz HJ. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003; 1(3): 162-6.
- Petri ET, Errico A, Escobedo L, Hunt T, Basavappa R. The crystal structure of human cyclin B. *Cell Cycle* 2007; 6(11): 1342-9.
- Poon RYC, Yamashita K, Howell M, Ershler MA, Belyavsky A, Hunt T. Cell cycle regulation of the p34cdc2/p33cdk2-activating kinase p40MO15. *J Cell Sci* 1994; 107: 2789-99.
- Potapova TA, Daum JR, Byrd KS, Gorbsky GJ. Fine tuning the cell cycle: activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit. *Mol Biol Cell* 2009; 20(6): 1737-48.
- Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; 1: 65-70.
- Puyo S, Le Morvan V, Robert J. Impact of EGFR gene polymorphisms on anticancer drug cytotoxicity in vitro. *Mol Diag Ther* 2008; 12: 225-234.
- Koeppel F, Poindessous V, Lazar V, Raymond E, Sarasin A, Larsen AK.
- Irofulven cytotoxicity depends on transcription-coupled nucleotide excision repair and is correlated with XPG expression in solid tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16): 5604-13.
- Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 99-108.
- Sakaguchi K, Ishibashi T, Uchiyama Y, Iwabata K. The multi-replication protein A (RPA) system--a new perspective. *FEBS J* 2009; 276(4): 943-63.
- Schärer OD. Hot topics in DNA repair: the molecular basis for different disease states caused by mutations in TFIID and XPG. *DNA Repair (Amst)* 2008; 7(2): 339-44.
- Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein



- JN. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000; 24: 236-44.
- Schneider E, Kartarius S, Schuster N, Montenarh M., The cyclin H/cdk7/Mat1 kinase activity is regulated by CK2 phosphorylation of cyclin H. *Oncogene* 2002; 21(33): 5031-7.
- Shen H, Sturgis EM, Khan SG, Qiao Y, Shahlavi T, Eicher SA, Xu Y, Wang X, Strom SS, Spitz MR, Kraemer KH, Wei Q. An intronic poly (AT) polymorphism of the DNA repair gene XPC and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Res* 2001; 61(8): 3321-5.
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58: 604-8.
- Shivji MK, Ferrari E, Ball K, Hübscher U, Wood RD. Resistance of human nucleotide excision repair synthesis in vitro to p21Cdn1. *Oncogene* 1998; 17(22): 2827-38.
- Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* 2008; 18(1): 64-72.
- Staresinic L, Fagbemi AF, Enzlin JH, Gourdin AM, Wijgers N, Dunand-Sauthier I, Giglia-Mari G, Clarkson SG, Vermeulen W, Schärer OD. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J* 2009; 28(8): 1111-20.
- Sary A, Sarasin A. The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. *Biochimie* 2002; 84: 49-60.
- Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, Lenz HJ. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 936-42.
- Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S, Lenz HJ. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 344-54.
- Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB, Nakayama K, Emmert S, Ueda T, Urasaki Y, Kanzaki A, Akiyama SI, Popescu N, Kraemer KH, Pommier Y. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med* 2001; 7: 961-6.
- Tapias A, Auriol J, Forget D, Enzlin JH, Schärer OD, Coin F, Coulombe B, Egly JM. Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *J Biol Chem* 2004; 279(18): 19074-83.
- Tassan JP, Schultz SJ, Bartek J, Nigg EA. Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* 1994; 127(2): 467-78.



- Tassan JP, Jaquenod M, Fry AM, Frutiger S, Hughes G, Nigg EA. In vitro assembly of a functional human cdk7/cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO J* 1995; 14: 5608-17.
- Tissier A, McDonald JP, Frank EG, Woodgate R., poliota, a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes Dev* 2000; 14(13): 1642-50.
- Ulrich CM, Robien K, McLeod HL. Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 912-20.
- Vekris A, Meynard D, Haaz MC, Bayssas M, Bonnet J, Robert J. Molecular determinants of the cytotoxicity of platinum compounds: the contribution of *in silico* research. *Cancer Res* 2004; 64: 356-62.
- Vogel U, Hedayati M, Dybdahl M, Grossman L, Nexo BA. Polymorphisms of the DNA repair gene XPD: correlations with risk of basal cell carcinoma revisited. *Carcinogenesis* 2001; 22: 899-904.
- Weeda G, Ham RCAv, Vermeulen W, Bootsma D, Eb AJvd, Hoeijmakers JHJ. A presumed helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell* 1990; 62 :777-91.
- Wolfe KJ, Wickliffe JK, Hill CE, Paolini M, Ammenheuser MM, Abdel-Rahman SZ. Single nucleotide polymorphisms of the DNA repair gene XPD/ERCC2 alter mRNA expression. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17(11): 897-905.
- Wood RD. DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* 1999; 81(1-2): 39-44.
- Wood RD, Robins P, Lindhal T. Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell* 1988; 53: 97-106.
- Wu X, Zhao H, Wei Q, Amos CI, Zhang K, Guo Z, Qiao Y, Hong WK, Spitz MR. XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity. *Carcinogenesis* 2003; 24(3): 505-9.
- Xu Z, Chen ZP, Malapetsa A, Alaoui-Jamali M, Bergeron J, Monks A, Myers TG, Mohr G, Sausville EA, Scudiero DA, Aloyz R, Panasci LC. DNA repair protein levels vis-à-vis anticancer drug resistance in the human tumor cell lines of the National Cancer Institute drug screening program. *Anticancer Drugs* 2002; 13(5): 511-9.
- Yang Z, Roginskaya M, Colis LC, Basu AK, Shell SM, Liu Y, Musich PR, Harris CM, Harris TM, Zou Y. Specific and efficient binding of xeroderma pigmentosum complementation group A to double-strand/single-strand DNA junctions with 3'- and/or 5'-ssDNA branches. *Biochemistry* 2006; 45(51): 15921-30.

Yarosh DB, Canning MT, Teicher D, Brown DA. After sun reversal of DNA damage: enhancing skin repair. *Mutat Res* 2005; 571(1-2): 57-64.

# Publications et communications

---

## Publications dans des journaux à comité de lecture

**Moisan F**, Longy M, Robert J, Le Morvan V. Identification of gene polymorphisms of human DNA topoisomerase I in the National Cancer Institute panel of human tumour cell lines. *British Journal of Cancer* 2006; 95: 906-913

Le Morvan V, Bellott R, **Moisan F**, Mathoulin-Pélissier S, Bonnet J, Robert J. Relationships between genetic polymorphisms and anticancer drug cytotoxicity vis-à-vis the NCI60 panel. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 843-852

## Communications à des congrès scientifiques

Le Morvan V, Bellott R, **Moisan F**, Robert J. Le panel de 60 lignées tumorales humaines du NCI : un outil pour analyser les relations entre polymorphismes génétiques et activité des agents anticancéreux. 25<sup>e</sup> Forum de Cancérologie, Paris, 21-23 juin 2005. Résumé n°78. *Bulletin du Cancer* 2005; 92: 553

**Moisan F**, Longy M, Robert J, Le Morvan V. Identification of gene polymorphisms of human DNA topoisomerase I in the National Cancer Institute panel of human tumour cell lines. 17<sup>th</sup> International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, National Cancer Institute, European Organization for Research and Treatment of Cancer, American Association for Cancer Research, Philadelphie, 14-18 novembre 2005. Abstract n°B185, p. 175. *Clinical Cancer Research* 2005; 24: 9078-9079

**Moisan F**, Longy M, Robert J, Le Morvan V. Identification of gene polymorphisms of human DNA topoisomerase I in the National Cancer Institute panel of human tumour cell lines. 27<sup>th</sup> Winter meeting of the Pharmacology and Molecular Mechanisms Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer, Edimbourg, 18-21 janvier 2006. Abstract n°O6

Le Morvan V, Bellott R, **Moisan F**, Mathoulin-Pélissier S, Bonnet J, Robert J. Relationships between genetic polymorphisms and anticancer drug cytotoxicity vis-à-vis the NCI60 panel. 97<sup>th</sup> Annual meeting of the American Association for Cancer Research, Washington, 1-5 avril 2006. Abstract n°1317 p. 311

Robert J, Le Morvan V, Bellott R, **Moisan F**, Bonnet J. The NCI-60 panel, a powerful tool for the study of relationships between gene polymorphisms and anticancer drug cytotoxicity. Symposium organisé par le National Cancer Institute “*NCI60 molecular targets*”, Washington, 2 avril 2006

Robert J, Le Morvan V, Bellott R, Nief N, Charasson V, **Moisan F**, Mathoulin-Pélissier S, Bonnet J. Genetic polymorphisms in the ERCC2, ERCC5, GSTP1, CES2 and TS genes in the NCI-60 panel: relationships with anticancer drug cytotoxicity. 19<sup>th</sup> meeting of the European Association for Cancer Research, Budapest, 1-4 juillet 2006. Abstract n°359 Oral, p. 229

Le Morvan V, Bellott R, **Moisan F**, Bonnet J, Robert J. Relations entre polymorphismes génétiques et activité des agents anticancéreux : peut-on utiliser le panel de 60 lignées tumorales humaines du NCI comme modèle ? 11<sup>es</sup> Journées du groupe de Pharmacologie clinique oncologique, Bonifacio, 13-14 octobre 2006

Le Morvan V, Bellott R, **Moisan F**, Nief N, Bonnet J, Robert J. Le panel de 60 lignées tumorales humaines du NCI : un outil pour analyser les relations entre polymorphismes génétiques et activité des agents anticancéreux. 2<sup>es</sup> Journées Scientifiques du Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Toulouse, 18-19 octobre 2006. Poster P61. *Bulletin du Cancer* 2006; 93: S299

**Moisan F**, Le Morvan V, Laurand A, Robert J. Polymorphisms of nucleotide excision repair proteins in the NCI-60 panel: relationships to anticancer drug cytotoxicity. 28<sup>th</sup> Winter meeting of the Pharmacology and Molecular Mechanisms Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer, Berlin, 31 janvier-3 février 2007. *Targeted Oncology* 2007; 2 suppl. 1: S52-3

**Moisan F**, Ricard N, Pourquier P, Robert J, Le Morvan V. Influence of polymorphisms of the DNA repair genes *ERCC2* and *ERCC5* on anticancer drugs response. 12<sup>th</sup> Annual meeting of the French Society of Pharmacology and Therapeutics, et 75<sup>th</sup> Annual meeting of the Society of Physiology. Abstract n°61. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2008; 22 Suppl 1: 13

**Moisan F**, Ricard N, Pourquier P, Robert J, Le Morvan V. Influence of polymorphisms of the DNA repair genes *ERCC2* and *ERCC5* on anticancer drugs response. 99<sup>th</sup> Annual meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, 12-16 avril 2008. Abstract n°4788