



HAL
open science

Etude des signaux bystander émis par des cellules de cartilage cultivées en 3D et irradiées in vitro dans un contexte de radiothérapie conventionnelle et d'Hadronthérapie

Charlotte Lepleux

► **To cite this version:**

Charlotte Lepleux. Etude des signaux bystander émis par des cellules de cartilage cultivées en 3D et irradiées in vitro dans un contexte de radiothérapie conventionnelle et d'Hadronthérapie. Biologie cellulaire. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC289 . tel-02293058

HAL Id: tel-02293058

<https://theses.hal.science/tel-02293058>

Submitted on 20 Sep 2019

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Etude des signaux bystander émis par des cellules de cartilage cultivées en 3D et irradiées in vitro dans un contexte de radiothérapie conventionnelle et d'Hadronthérapie

**Présentée et soutenue par
Charlotte LEPLEUX**

**Thèse soutenue publiquement le 02/11/2018
devant le jury composé de**

M. OLIVIER GUIPAUD	Chercheur, IRSN	Rapporteur du jury
M. JEAN-PIERRE POUGET	Directeur de recherche, IRCM	Rapporteur du jury
Mme MYRIAM BERNAUDIN	Directeur de recherche au CNRS, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. PHILIPPE GALERA	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
Mme CATHERINE LEVISAGE	Directeur de recherche à l'INSERM, Université de Nantes	Membre du jury
M. FRANCOIS CHEVALIER	Chercheur au CEA, 14 GANIL de CAEN	Directeur de thèse

Thèse dirigée par FRANCOIS CHEVALIER, Centre de recherche sur les ions, les matériaux et la photonique (Caen)



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Cette thèse est le fruit d'une collaboration de trois années avec le Dr. François Chevalier. C'est à ses côtés que j'ai mis en œuvre mes travaux de recherches. C'est avec lui que j'ai organisé mes expériences et que j'ai pu apprendre la rigueur scientifique. C'est également avec lui que j'ai pu échanger sur mes travaux en toute liberté. C'est lui qui m'a épaulé tout le long de cette thèse, qui a su me guider et m'encourager dans mon travail. Enfin c'est avec lui que j'ai partagé de très bon moments pendant ces trois années, merci beaucoup François pour ta présence, ta gentillesse et ta disponibilité durant ma thèse.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'y participer.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du Cimap pour m'avoir accueilli et pour avoir rendu cette thèse très agréable et plus particulièrement Monsieur Amine Cassimi, le directeur du Cimap, pour son accueil au sein de son laboratoire.

Je remercie également l'équipe AMA et MADIR avec qui j'ai pu collaborer sur le projet IRHEME et avec qui j'ai pu échanger durant ma thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des étudiants du LARIA et plus particulièrement Aurélie Marie Brassat et Jean-Baptiste Austray qui m'ont aidé dans la réalisation de nombreuses expériences et avec qui j'ai passé de très bons moments.

Je remercie également le Dr Mihaela Temelie pour son aide précieuse dans la mise au point de certaines expériences durant son passage au laboratoire ainsi que pour sa gentillesse et sa patience.

Je remercie aussi les étudiants du Cimap pour leur bonne humeur et tous les échanges que nous avons pu avoir. Je remercie plus spécialement Basile Auge, Alexis Ribet et Mathieu Lalande pour les bons moments passé ensemble.

Mes derniers remerciements vont à ma famille qui m'ont aidé, soutenu et surtout supporté durant ces nombreuses années d'études.

Sommaire

Liste des figures	p09
Liste des tableaux	p11
Liste des abréviations	p13
Avant-propos	p15
Partie 1 : INTRODUCTION	p17
I. Cartilage et chondrosarcome	p19
I. 1. Le cartilage	p19
I. 1. 1. Nature et composants du cartilage	p19
I. 1. 2. Chondrogenèse	p20
I. 1. 3. Équilibre anabolisme/ catabolisme au sein du cartilage	p21
I. 2 Pathologies du cartilage	p22
I. 2. 1. L'arthrose	p22
I. 2. 2. L' arthrite	p23
I. 2. 3. Le chondrosarcome	p24
I. 2. 3. 1 Sarcomes et classifications	p24
I. 2. 3. 2 Description du CHS	p24
I. 2. 3. 3 Classification et grades	p25
I. 2. 3. 4 Exemple de l'évolution d'une tumeur cartilagineuse bénigne en CHS	p26
I. 2. 3. 5 Diagnostique	p27
I. 2. 3. 6 Traitement	p28
II. Radiothérapie	p30
II. 1. Généralités en radiobiologie	p30
II. 1. 1. Historique	p30
II. 1. 2. Rayonnements : définition et classification	p31
II. 1. 3. Les effets biologiques des rayonnements	p32
II. 1. 4. Les effets cellulaires des RI	p35
II. 1. 4. 1. Production de ROS (Reactive Oxygen Species)	p35
II. 1. 4. 2. Peroxydation lipidique	p36
II. 1. 4. 3. Oxydation des protéines	p36
II. 1. 4. 4. Dommages à l'ADN et aux chromosomes	p36
II. 1. 5. Systèmes de réparation des dommages radio-induits	p38
II. 1. 5. 1. Systèmes antioxydants	p38
II. 1. 5. 2. Mécanismes de réparation des dommages radio-induits à l'ADN	p39
II. 1. 6. Réponses cellulaires aux dommages radio-induits	p40
II. 1. 6. 1. Activation des checkpoints du cycle cellulaire	p40
II. 1. 6. 2. Signalisation moléculaire radio-induite	p41
II. 1. 6. 2. 1. Cytokines radio-induites	p41
II. 1. 6. 2. 2. Voies de signalisation radio-induites	p41
II. 1. 7. Morts cellulaires radio-induites	p48
II. 1. 7. 1. Mort immédiate	p48
II. 1. 7. 2. Sénescence	p48

II. 1. 7. 3. Mort mitotique.....	p48
II. 1. 7. 4. Apoptose.....	p49
II. 1. 7. 5. Autophagie.....	p49
II. 2. Hadronthérapie : les ions-carbone	p50
II. 2. 1. Historique	p50
II. 2. 2. Notion de TEL et EBR.....	p50
II. 2. 2. 1. TEL : Transfert d'Énergie Linéique.....	p50
II. 2. 2. 2. EBR : Efficacité Biologique Relative.....	p51
II. 2. 2. 3. Étude de la survie cellulaire.....	p51
II. 2. 3. Propriétés physiques et biologiques des ions-carbone.....	p52
II. 2. 3. 1. Propriétés physiques des ions-carbone	p53
II. 2. 3. 2. Propriétés biologiques des ions carbone (EBR).....	p54
II. 2. 4. Les ions-carbone dans le monde.....	p54
II. 2. 5. Indication pour l'hadronthérapie par ions carbone.....	p56
II. 2. 6. Ions-carbone et CHS.....	p57
III. Effet bystander.....	p58
III. 1. Mise en évidence de l'effet bystander.....	p58
III. 2. Définition de l'effet bystander.....	p59
III. 3. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'effet bystander.....	p61
III. 3. 1. Mécanismes cellulaires de l'effet bystander.....	p61
III. 3. 1. 1. Cellules émettrices et réceptrices.....	p61
III. 3. 1. 2. Sécrétions de facteurs par les cellules irradiées.....	p61
III. 3. 1. 3. Induction de gap-jonction entre les cellules	p62
III. 3. 1. 4. Sécrétion de vésicules	p62
III. 3. 2. Mécanismes moléculaires de l'effet bystander.....	p62
III. 3. 2. 1. Facteurs bystander.....	p62
III. 3. 2. 2. Propagation de l'effet bystander.....	p65
III. 4. Facteurs influençant l'effet bystander.....	p66
III. 4. 1. Choix du type de protocole pour l'étude de l'effet bystander.....	p66
III. 4. 1. 1. Protocoles d'étude de l'effet bystander <i>in vitro</i>	p66
III. 4. 1. 1. 1. Transfert de milieu	p66
III. 4. 1. 1. 2. Co-culture en cupule.....	p68
III. 4. 1. 1. 3. Micro-faisceau	p68
III. 4. 1. 1. 4. « Field ».....	p70
III. 4. 1. 2. Protocoles d'études de l'effet bystander <i>in vivo</i>	p70
III. 4. 2. Choix du type cellulaire pour l'étude de l'effet bystander.....	p70
III. 4. 3. Choix de la source d'irradiation pour l'étude de l'effet bystander.....	p71
III. 4. 3. 1. Importance du type d'irradiation.....	p71
III. 4. 3. 2. Importance du TEL.....	p72
III. 4. 3. 3. Importance de la dose d'irradiation.....	p72
III. 5. Outils d'analyse et réponse biologique de l'effet bystander.....	p74
III. 5. 1. Induction de dommages à l'ADN	p74
III. 5. 1. 1. Étude des chromosomes : échange de chromatides sœurs (SCE).....	p74
III. 5. 1. 2. Étude des MN.....	p75

III. 5. 2. Induction d'un retard de prolifération	p76
III. 5. 3. Induction d'une modification du protéome des cellules bystander et du sécrétome des cellules irradiées	p76
III. 5. 3. 1. Étude de l'expression de protéines cibles	p76
III. 5. 3. 2. Étude globale du protéome des cellules bystander	p78
III. 5. 3. 3. Étude globale du sécrétome des cellules irradiées	p79
III. 5. 4. Induction d'un stress oxydatif dans les cellules bystander	p80
III. 5. 5. Induction du modification des flux calciques dans les cellules bystander	p81
III. 5. 6. Induction de la mort des cellules bystander par apoptose	p82
III. 6. Intérêt d'un modèle 3D pour l'étude de l'effet bystander	p82
III. 7. Effet bystander et CHS	p85
III. 7. 1. Protocoles d'étude	p85
III. 7. 2 Résultats	p86
III. 7. 3 Conclusion et discussion	p87
III. 8. Effet bystander et radiothérapie	p87
Objectifs	p89
Partie 2 : MATERIELS ET METHODES	p91
I. Culture cellulaire	p93
I. 1. Lignées cellulaires	p93
I. 2. Conditions de culture	p95
II. Irradiation	p95
II. 1. Irradiation par rayons-X	p95
II. 2. Irradiation par ions-carbone	p96
II. 2. 1. Ions-carbone : GANIL	p96
II. 2. 2. Ions-carbone : HIMAC	p98
III. Etude de l'effet bystander : protocole de transfert de milieu	p98
III. 1. Protocole d'étude de la survie clonogénique des cellules	p99
III. 1. 1. Survie clonogénique des cellules irradiées	p99
III. 1. 2. Survie clonogénique des cellules bystander	p100
III. 2. Protocole d'étude de la prolifération des cellules (Cell trace)	p100
III. 3. Protocole d'étude de l'impédancemétrie (Xcelligence)	p102
III. 4. Protocole d'étude du cycle cellulaire (CMF)	p103
III. 5. Protocole d'étude de la viabilité cellulaire (bleu trypan)	p105
III. 6. Protocole d'étude des dommages à l'ADN (comptage de MN)	p105
III. 7. Protocole d'étude du protéome des cellules bystander	p106
III. 7. 1. Protocole d'étude du protéome des cellules bystander : Electrophorèse bidimensionnelle	p106
III. 7. 1. 1. Préparation de l'échantillon protéique	p106
III. 7. 1. 2. Lyse et dosage des protéines (Bradford)	p106
III. 7. 1. 3. Focalisation des protéines (première dimension)	p107
III. 7. 1. 3. 1. Réhydratation passive	p107
III. 7. 1. 3. 1. Réhydratation active	p108
III. 7. 1. 4. Electrophorèse SDS-PAGE (seconde dimension)	p108
III. 7. 1. 4. 1. Préparation des gels	p108
III. 7. 1. 4. 2. Equilibration des strips	p109
III. 7. 1. 4. 3. Migration des protéines sur les gels	p109
III. 7. 1. 5. Coloration des gels et analyse	p109

III. 7. 1. 6. Analyse d'image.....	p110
III. 7. 1. 7. Prélèvement de spots et analyse par spectrométrie de masse.....	p111
III. 7. 1. 7. 1. Prélèvement et préparation des spots pour l'analyse.....	p111
III. 7. 1. 7. 2. Analyse par spectrométrie de masse.....	p111
III. 7. 1. 7. 3. Identification des protéines.....	p112
III. 7. 2. Protocole d'étude du protéome des cellules bystander en co-culture.....	p112
III. 7. 2. 1. Création d'une banque de données RNAseq.....	p113
III. 7. 2. 2. 1. Extraction et séquençage d'ARNm.....	p113
III. 7. 2. 2. 2. Assemblage SW 1353 et TC28 RNAseq.....	p113
III. 7. 2. 2. Préparation des échantillons protéiques en mélange.....	p114
III. 7. 2. 3. Analyse des échantillons en mélange.....	p114
III. 7. 2. 3. 1. Préparation des échantillons, extraction des protéines et protéolyse.....	p114
III. 7. 2. 3. 2. spectrométrie de masse en tandem.....	p115
III. 7. 2. 3. 3. Identification des protéines.....	p115
IV. Etude des facteurs bystander.....	p116
IV. 1. Etude des facteurs bystander via des tests de clonogénicité.....	p116
IV. 1. 1. Protocole d'étude de la thermosensibilité des facteurs bystander.....	p116
IV. 1. 2. Protocole d'étude de la concentration en facteurs bystander.....	p116
IV. 2. Etude des cytokines.....	p116
IV. 2. 1. Etude d'un pannel de 13 cytokines inflammatoires par un test d'immuno-billes.....	p116
IV. 2. 2. Etude de 4 cytokines par ELISA multiplex.....	p117
IV. 3. Etude du sécrétome des cellules irradiées.....	p117
IV. 3. 1. Préparation des échantillons.....	p117
IV. 3. 2. Analyse du sécrétome.....	p117
V. Etude de l'effet bystander en 3D.....	p118
V. 1. Culture cellulaire en 3D.....	p118
V. 1. 1. Protocole de mise en culture en 3D.....	p118
V. 1. 2. Milieu et condition de culture 3D.....	p118
V. 2. Histologie des modèles 3D.....	p119
V. 2. 1. Inclusion et coupe en paraffine.....	p119
V. 2. 2. Colorations des lames.....	p120
V. 2. 2. 1. Colorations au Bleu alcian.....	p120
V. 2. 2. 2. Colorations au trichrome de Masson.....	p121
V. 2. 2. 3. Colorations HES (Hématoxyline-Eosine-Safran).....	p122
V. 2. 3. Montage des coupes entre lames et lamelles.....	p122
V.3. Protocole d'étude des dommages à l'ADN dans les pellets (comptage des MN).....	p123
Partie 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	p125
Chapitre 1 : Les cellules de CHS sont-elles capables d'émettre des facteurs bystander ?.....	p127
I. Résultats : Analyse de la réponse bystander.....	p127
I. 1. Identification de cellules émettrices et réceptrices.....	p127
I. 1. 1. Étude sur un panel de lignées cellulaires.....	p127
I. 1. 2. Étude sur les fibroblastes AG0 1522.....	p129
I. 2. Mise en évidence d'un retard de prolifération des cellules bystander.....	p130
I. 2. 1. Étude de la survie clonogénique.....	p130
I. 2. 1. 1 Effets directs.....	p130
I. 2. 1. 2 Effet bystander.....	p132
I. 2. 2. Étude de la prolifération : utilisation du cell trace.....	p134
I. 2. 3. Étude de l'impédancemétrie.....	p135
I. 3. Étude du cycle cellulaire des cellules bystander.....	p137
I. 3. 1. Effets directs.....	p137
I. 3. 2. Effet bystander.....	p140
I. 4. Étude de la viabilité des cellules bystander.....	p142

I. 4. 1. Effets directs	p142
I. 4. 2. Effet bystander	p143
I. 5. Étude des dommages à l'ADN des cellules bystander	p143
I. 5. 1. Effets directs	p143
I. 5. 2. Effet bystander	p144
II. Discussion concernant la réponse bystander	p146
Chapitre 2 : Quels sont les facteurs impliqués dans l'effet bystander ?	p149
<u>I. Résultats : Analyse des facteurs bystander</u>	p147
I. 1. Étude de la nature des facteurs bystander	p147
I. 1. 1. Thermo-sensibilité des facteurs bystander	p147
I. 1. 2. Concentration des facteurs bystander	p150
I. 2. Étude de la nature des facteurs bystander	p151
I. 2. 1. ELISA multiplex	p151
I. 2. 2. Quantification de cytokines par CMF	p152
I. 3. Étude du sécrétome des cellules irradiées	p154
<u>II. Discussion concernant l'analyse des facteurs bystander</u>	p156
Chapitre 3 : Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans le phénomène bystander radio-induit ?	p159
<u>I. Résultats : Étude du protéome des cellules bystander</u>	p159
I. 1. Par électrophorèse bidimensionnelle	p159
I. 2. Par protéo-génomique	p161
<u>II. Discussion concernant l'étude du protéome des cellules bystander</u>	p169
Chapitre 4 : Quel est l'intérêt d'utiliser un modèle de culture cellulaire tridimensionnel pour étudier l'effet bystander ?	p172
<u>I. Résultats : analyse de la réponse bystander en 3D</u>	p172
I. 1. Mise au point d'un modèle de culture en 3D	p172
I. 2. Caractérisation d'un modèle de culture en 3D	p174
I. 3. Étude des dommages à l'ADN des cellules bystander en 3D	p176
<u>II. Discussion concernant l'analyse de la réponse bystander en 3D</u>	p178
Partie 4 : DISCUSSION GENERALE	p181
Partie 5 : PERSPECTIVES	p187
Partie 6 : CONCLUSIONS	p193
Partie 7 : BIBLIOGRAPHIE	p197

Liste des figures

Figure 1 : Répartition dans l'organisme des trois types de tissus cartilagineux.....	p19
Figure 2 : Représentation schématique des composants moléculaires du cartilage articulaire.....	p20
Figure 3 : Schéma de la différenciation chondrocytaire et de ses acteurs.....	p21
Figure 4 : Schéma représentant l'équilibre des composants du cartilage pour le maintien de son intégrité.....	p22
Figure 5 : Arthrose des articulations de la main (A), de la hanche (B) et du genou (C).....	p23
Figure 6 : Schéma de la modification de la balance anabolisme/catabolisme pendant le processus arthrosique.....	p23
Figure 7 : Coupe histologiques de sous-types de CHS rare (Coloration HES, objectif x50).....	p25
Figure 8 : Développement de tumeurs cartilagineuses bénignes et leur progression en CHS.....	p27
Figure 9 : Mise en évidence de la relation étroite liant les cellules de CHS au tissus osseux (Coloration HES, objectif x20 et x40).....	p29
Figure 10 : La découverte du Professeur Roentgen.....	p30
Figure 11 : Les différents types de rayonnements.....	p31
Figure 12 : Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants dans la matière.....	p32
Figure 13 : Effets sur l'organisme en fonction des doses pour une irradiation globale (corps entier).....	p33
Figure 14 : Arbre des réponses possibles d'une cellule après une irradiation par rayonnements ionisants.....	p34
Figure 15 : Principaux effets des RI sur les cellules irradiées.....	p35
Figure 16 : Les principales aberrations chromosomiques de structure.....	p38
Figure 17 : Principales étapes des systèmes de réparation des cassures double brin de l'ADN (DSB).....	p40
Figure 18 : Activation par les cellules des checkpoints du cycle cellulaire après un stress (RI).....	p42
Figure 19 : Activation des facteurs de transcription et des voies de signalisation après une irradiation par des RI.....	p44
Figure 20 : Courbes de survie après une irradiation par photons ou par ions lourds.....	p52
Figure 21 : Schéma présentant les avantages balistiques des hadrons.....	p53
Figure 22 : Effet biologique relatif des photons, protons et ions carbone.....	p54
Figure 23 : Les différents scénarios pouvant être observés après une exposition à des RI.....	p60
Figure 24 : Schéma des mécanismes cellulaires impliqués dans l'effet bystander radio-induit.....	p61
Figure 25 : Intensité de fluorescence des ROS obtenue après transfert de milieu issu de cellules irradiées ou non.....	p63
Figure 26 : Schéma proposant un mode de transfert du miR-21 conduisant à un effet bystander radio-induit.....	p64
Figure 27 : Schéma représentant la propagation de l'effet bystander dans les cellules réceptrices.....	p65
Figure 28 : Exemple d'un protocole de transfert de milieu pour l'étude de l'effet bystander.....	p67
Figure 29 : Exemple d'un protocole de co-culture pour l'étude de l'effet bystander.....	p68
Figure 30 : Exemple d'une irradiation par microfaisceau pour l'étude de l'effet bystander.....	p69
Figure 31 : Exemple d'une irradiation de type "field" en présence d'un masque pour l'étude de l'effet bystander.....	p69
Figure 32 : Courbe de survie des cellules T98G après transfert de milieu provenant de cellules T98G irradiées au Césium-137.....	p73
Figure 33 : Aspects des courbes de survie après une exposition directe ou bystander à des RI.....	p74
Figure 34 : Formation de MN dans les cellules AG1522 après une exposition à différents types de RI.....	p75
Figure 35 : Expression de la protéine COX-2 dans les fibroblastes bystander et réponse bystander modulée par COX-2.....	p77
Figure 36 : Electrophorèse bidimensionnelle représentant le protéome d'une truite arc-en-ciel bystander.....	p78
Figure 37 : Réseau protéique de protéines identifiées liées par des régulateurs communs : TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IFN- γ	p80
Figure 38 : L'intensité relative de la fluorescence induite par les ROS dans les cellules AG0.....	p81
Figure 39 : Influence des flux calciques dans l'induction de MN au sein des cellules bystander.....	p81
Figure 40 : Niveaux d'expression des gènes de protéines (Bax et Bcl-2) impliquées dans l'apoptose.....	p82
Figure 41 : Coupe de Pellets (P) et de Micro-masses (M), après coloration par immunohistochimie du collagène de type I, II et X, barre d'échelle = 100 μ m.....	p84

Figure 42 : Coupe (70 nm) d'un modèle polysaccharidique poreux contenant des chondrocytes, produisant de la MEC (microscopie électronique en transmission, objectif : X6000).....	p84
Figure 43 : Taux relatif d'augmentation du nombre de MN dans les fibroblastes bystander après co-culture avec les cellules de CHS irradiées.....	p86
Figure 44 : Coupe IMRT (Intensity modulated radiation therapy) illustrant le plan de traitement d'un cancer de la prostate en tenant compte de l'effet bystander.....	p88
Figure 45 : Photographie (microscope à contraste de phase) de chondrocytes humain costaux après immortalisation avec pZipNeoSV40 qui ont permis la sélection de la lignée T/C-28a2.....	p93
Figure 46 : Photographie (microscope à contraste de phase) de chondrocytes humain costaux après immortalisation avec pSV40 qui ont permis la sélection de la lignée C20/A4.....	p95
Figure 47 : Photographie de l'irradiateur Pxi XradSmart 225CX©.....	p96
Figure 48 : Schéma de la ligne haute énergie IRABAT (du GANIL).....	p96
Figure 49 : Photo du porteur d'échantillon robotisé (ligne IRABAT).....	p97
Figure 50 : Photo de la sortie du faisceau et du porteur d'échantillons de l'HIMAC.....	p98
Figure 51 : Protocole de transfert de milieu.....	p99
Figure 52 : Principe du marqueur CellTrace.....	p101
Figure 53 : Protocole de préparation des cellules pour la cytométrie en flux.....	p102
Figure 54 : Principe de la technologie Xcelligence.....	p103
Figure 55 : Exemple d'un profil de cytométrie en flux de cellules marquées à l'IP.....	p104
Figure 56 : Exemple de courbe d'étalonnage obtenue lors d'un dosage de Bradford.....	p107
Figure 57 : Shématisation des effets directs d'une irradiation et de la propagation de l'effet dû au phénomène bystander.....	p127
Figure 58 : Survie conogénique des AG01522 après transfert de milieu bystander provenant de SW 1353.....	p130
Figure 59 : Survie conogénique des T/C-28a2 après irradiations par rayons-X et ions-carbone.....	p131
Figure 60 : Survie clonogénique des T/C-28a2 après transfert de milieu de SW 1353 irradiées par rayons-X et ions-carbone.....	p133
Figure 61 : Exemple de courbe d'index cellulaire brute donnée par le logiciel RTCA.....	p136
Figure 62 : Indice cellulaire normalisé des cellules T/C-28a2 bystander (A : Rayons-X, B: ions-carbone).....	p136
Figure 63 : Répartition des cellules T/C-28a2 et SW 1353 marquées à l'IP dans les différentes phases du cycle cellulaire après irradiation.....	p139
Figure 64 : Répartition des cellules T/C-28a2 marquées à l'IP dans les différentes phases du cycle cellulaire après transfert de milieu.....	p141
Figure 65 : Viabilité des cellules T/C-28a2 après irradiation par rayons-X.....	p142
Figure 66 : Viabilité des cellules T/C-28a2 post transfert de milieu bystander.....	p143
Figure 67 : Induction de MN dans les cellules T/C-28a2 post irradiation.....	p144
Figure 68 : Induction de MN dans les cellules T/C-28a2 post transfert de milieu bystander.....	p145
Figure 69 : Mise en évidence de la thermo-sensibilité des facteurs bystander.....	p148
Figure 70 : Mise en évidence de l'importance de la concentration des facteurs bystander.....	p150
Figure 71 : Expression de 4 cytokines sécrétées par les cellules SW 1353 après irradiation (ELISA MSD).....	p151
Figure 72 : Image du gel de référence et des spots variants pour l'analyse bystander 0 Gy / bystander 0,1 Gy des T/C-28a2.....	p160
Figure 73 : Niveau d'expression des protéines "138,16, 85 et 128".....	p161
Figure 74 : Analyse de cellules en mélange par protéogénomique.....	p166
Figure 75 : Photo d'un pellet de T/C-28a2 cultivé en milieu 3D (combinaison 1) après 10 jours de culture.....	p172
Figure 76 : Coupe d'un pellet de T/C-28a2 après coloration HES (15 jours de culture).....	p174
Figure 77 : Coupe d'un pellet de T/C-28a2 après coloration HES (15 jours de culture).....	p175
Figure 78 : Coupe d'un pellet de T/C-28a2 après coloration HES (15 jours de culture).....	p175
Figure 79 : Photographies d'un pellet de T/C-28a2 après marquage au DAPI et observation au microscope Axio Imager Z2, Zeiss, grossissement x400 (a) et x600 (b).....	p176
Figure 80 : Induction de MN dans les pellets de T/C-28a2 post transfert de milieu bystander.....	p177
Figure 81 : Schéma bilan de l'effet bystander radio-induit au sein des cellules T/C-28a2.....	p191

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et thérapeutiques des différents types de CHS.....	p26
Tableau 2 : Contrôle local selon la modalité de traitement, le grade de tumeur, la taille, et état de marge chirurgicale chez 54 patients.....	p29
Tableau 3 : Facteurs de transcription activés après une exposition à des RI.....	p47
Tableau 4 : Centres de traitement par ions carbone dans le monde, d'après https://www.ptcog.ch mis à jour en avril 2018.....	p55
Tableau 5 : Nombre de patients traités par ions-carbone dans le monde de 2007 à 2016 d'après : https://www.ptcog.ch	p56
Tableau 6 : Comparaison du nombre de cellules irradiées et du nombre de cellules montrant des SCE.....	p57
Tableau 7 : Définition de l'effet Bystander proposée dans différentes revues.....	p58
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des potentiels facteurs et voies de signalisation impliquées dans l'effet bystander.....	p63
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des potentiels facteurs et voies de signalisation impliquées dans l'effet bystander.....	p71
Tableau 10 : Tableau représentant la fraction survivante des cellules SW 48 après transfert de milieu provenant de kératinocytes irradiés au cobalt-60.....	p73
Tableau 11 : Survie clonogénique des sphéroïdes de U87MG après une irradiation à 4 Gy ou un transfert de milieu provenant de U87MG irradiées à 4Gy.....	p76
Tableau 12: Préparation des solutions pour gels d'acrylamide 12% homogène 20*20cm.....	p108
Tableau 13: Coloration des protéines au Nitrate d'argent.....	p110
Tableau 14 : Détail du programme P3 (déshydratation des pellets).....	p119
Tableau 15 : Détail du protocole de coloration au bleu alcian.....	p121
Tableau 16 : Détail du protocole de coloration au trichrome de Masson.....	p122
Tableau 17 : Détail du protocole de coloration au trichrome de Masson.....	p122
Tableau 18 : Récapitulatif de la survie clonogénique des différentes combinaisons cellules émettrices/réceptrices.....	p128
Tableau 19 : Paramètres de survie des cellules T/C-28a2.....	p131
Tableau 20 : Index de prolifération des cellules T/C-28a2 bystander.....	p134
Tableau 21 : Expression de 13 cytokines sécrétées par les cellules SW 1353 après irradiation (CMF).....	p153
Tableau 22 : Les 22 protéines avec accession "Swissprot".....	p155
Tableau 23 : Analyse bystander 0 Gy / bystander 0,1 Gy des T/C-28a2.....	p162
Tableau 24 : Récapitulatif des 12 protéines spécifiques aux lignées cellulaires SW 1353 et T/C-28a2.....	p167
Tableau 25 : Test milieu 3D pour la culture en pellet.....	p172

Liste des abréviations

2D : Culture en 2 Dimensions
3D : Culture en 3 Dimensions
ADN : Acide Désoxy-riboNucléique
ARCHADE: Advanced Resource Centre for Hadrontherapy in Europe
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated kinase
ATR: ATM and Rad3-related kinase
BMP-2 : Bone Morphogenic Protein-2
BSA : Bovine Serum Albumin
CDB : Cassures Double Brin de l'ADN
CHS : Chondrosarcome
CMF : Cytométrie en flux
COX-2 : Cyclo-OXygénase 2
CSB : Cassures Simple Brin de l'ADN
CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses
D10 : Dose (Gy) correspondant à 10% de survie
D37 : Dose (Gy) correspondant à 37% de survie
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EBR : Efficacité Biologique Relative
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tetra-Acétate
GAG : GlycosAminoGlycane
Gy : Gray
HES : Hématoxyline-Eosine-Safran
HIF: Hypoxia-Inducible Factor
HIMAC : Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba
HIT : Heidelberg Ion Therapy Centre
HR : Homologous Recombination
HRE : Hypoxia Responsive Elements
IGF : Insulin Growth Factor
IL-1 β : Interleukine-1beta
IL-6 : Interleukine-6
IL-8 : Interleukine-8
IP : Iodure de Propidium
IRABAT: Irradiation Basse Température
LET : Transfert d'Énergie Linéique
MEC : Matrice Extra-Cellulaire
MN : Micro-Noyaux
MMP: Matrix MetalloProteinase
NHEJ : Non Homologous End Joining
PBS : Phosphate Buffered Saline

PE: Plating Efficiency

PFA : ParaFormaldéhyde

RI : Rayonnements-Ionisants

ROS : Reactive Oxygen Species

TNF : Tumor Necrosis Factor

TGF- β : Transforming Growth Factor

SF : Surviving Fraction

SVF : Sérum de Veau fœtal

Avant-propos

Ce projet de recherche s'inscrit dans le projet ARCHADE (Advanced Resource Centre for Hadrontherapy in Europe), centre européen de protonthérapie et de recherche en hadronthérapie par ions-carbone, localisé à Caen, à proximité du site du GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds). Le LARIA (Laboratoire d'Accueil et de Recherches avec les Ions Accélérés), laboratoire dans lequel j'ai réalisé cette thèse, a développé depuis de nombreuses années des thématiques de recherche en lien direct avec la radiobiologie des hadrons, notamment l'étude de l'effet « bystander » radio-induit lors de radiothérapie conventionnelle (photons) ou d'hadronthérapie (radiothérapie par protons et ions-carbone).

L'hadronthérapie est une technique de radiothérapie innovante utilisant des particules accélérées nommées « hadrons ». Ces particules permettent de réduire l'impact de l'irradiation sur les tissus sains tout en augmentant l'efficacité biologique sur la zone tumorale. Ces propriétés cumulées font de l'hadronthérapie et plus particulièrement des ions-carbone, une alternative pertinente pour le traitement de certains cancers radio-résistants.

Le CHS (chondrosarcome), fait partie des tumeurs résistantes aux traitements par radiothérapie conventionnelle. Cette tumeur osseuse a donc été placée en première ligne, pour le traitement par ions-carbone. Cependant, peu d'études se sont intéressées aux effets biologiques des ions-carbone sur les CHS ainsi qu'aux effets de voisinage induits lors de l'irradiation de ces tumeurs.

Lors d'une exposition à des rayonnements ionisants, en plus des effets « directs » observés au niveau des cellules tumorales, il est possible de constater des dommages au niveau des cellules voisines des cellules irradiées. Ce phénomène nommé « effet bystander », va engendrer des réponses biologiques comparables à celles observées au sein des cellules irradiées. C'est dans ce contexte scientifique que j'ai réalisé cette thèse intitulée : **« l'étude des signaux bystander émis par des cellules de cartilage cultivées en 3D et irradiées *in vitro* dans un contexte de radiothérapie conventionnelle et d'hadronthérapie »**.

Partie 1 :

INTRODUCTION

I. Cartilage et chondrosarcome

I. 1 Le cartilage

I. 1. 1 Nature et composants du cartilage

Le cartilage est un tissu conjonctif composé principalement d'un seul type cellulaire : les chondrocytes. Ces cellules sont issues de la différenciation chondrocytaire des cellules souches mésenchymateuses (CSM), retrouvées notamment dans la moelle osseuse, un faible pourcentage de CSM est également retrouvé dans le cartilage (environ 1 %). Les chondrocytes sont répartis dans une MEC (Matrice Extra-cellulaire) dense. Selon la composition de cette matrice, on distingue trois types de cartilages chez l'Homme (*Figure 1*) (1) :

- **Le cartilage hyalin**, qui est retrouvé au niveau des articulations. Il recouvre les extrémités des os et permet de limiter les frottements pendant le mouvement, composé principalement de collagène de type II.
- **Le cartilage fibreux** ou fibrocartilage qui est retrouvé au niveau des disques intervertébraux notamment, composé principalement de collagène de type I.
- **Le cartilage élastique** qui est retrouvé au niveau de l'oreille externe, ou encore du larynx, composé principalement de collagène de type II.

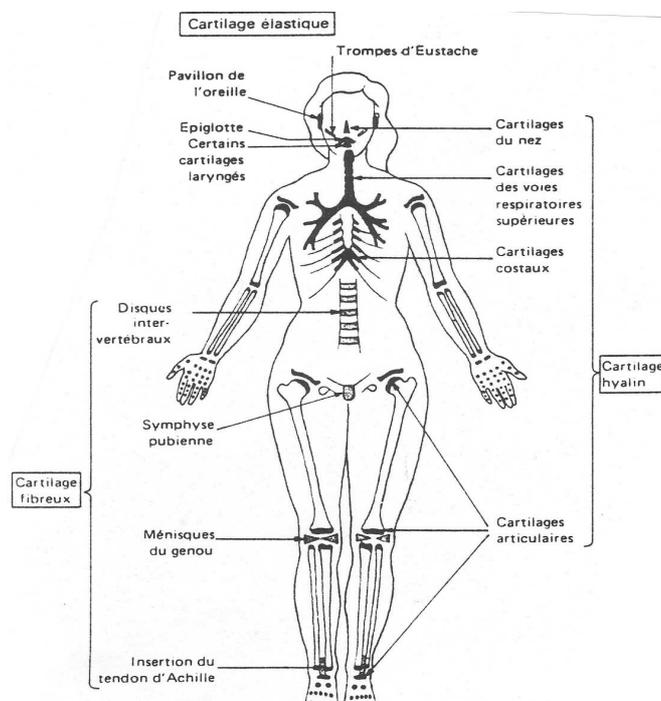


Figure 1 : Répartition dans l'organisme des trois types de tissus cartilagineux (2)

La MEC est composée essentiellement d'agrécan et de collagène. Ce réseau de fibres permet de retenir l'eau (80%) présente dans le collagène et assure ainsi son hydratation permettant une souplesse de mouvement (*Figure 2*).

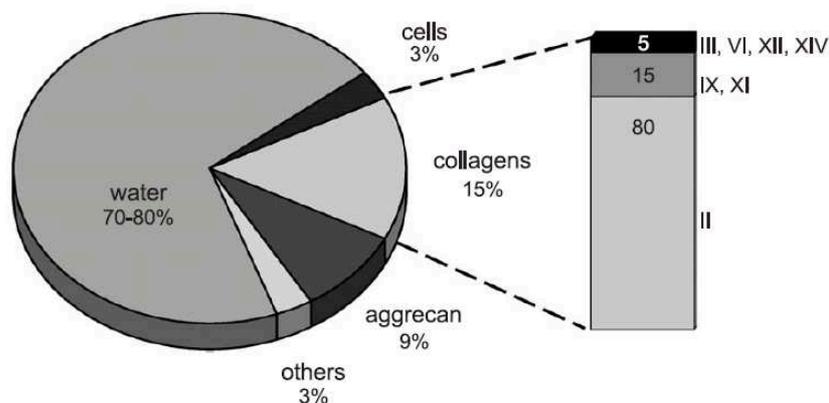


Figure 2 : Représentation schématique des composants moléculaires du cartilage articulaire (3)

I. 1. 2 Chondrogenèse

Durant le processus de chondrogenèse, on distingue 4 phases principales, décrites dans la figure 3 :

- **Différenciation des CSM en pré-chondrocytes** : durant cette première étape, les cellules expriment des collagènes de type I et de type IIA, des GAG (Glycosaminoglycane) et des molécules d'adhésion, telle que la cadhérine.
- **Maturation des pré-chondrocytes en chondrocytes** : les pré-chondrocytes expriment des facteurs de transcription du cartilage spécifiques, tels que SOX9 et SOX6. Ils sont alors transformés en chondrocytes matures et se mettent à produire une MEC, composée d'agrécan et de fibres de collagène (collagène de type II, IX et XI).
- **Mise en place d'une hypertrophie chondrocytaire** : les cellules augmentent en taille et deviennent préhypertrophiques, puis hypertrophiques. Elles ne synthétisent pas de collagène de type II, mais principalement du collagène de type X qui permet de faciliter le dépôt de calcium dans la matrice.
- **Envahissement par les ostéoblastes** : les chondrocytes hypertrophiques produisent du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), qui induit l'apparition de vaisseaux sanguins. Les chondrocytes dégénératifs se retrouvent piégés dans cette zone en cours de calcification et vont mourir par apoptose. La matrice est alors remodelée afin d'organiser l'arrivée des ostéoblastes. Ces cellules expriment principalement le collagène de type I, l'ostéocalcine, l'ostéonectine et l'ostéopontine.

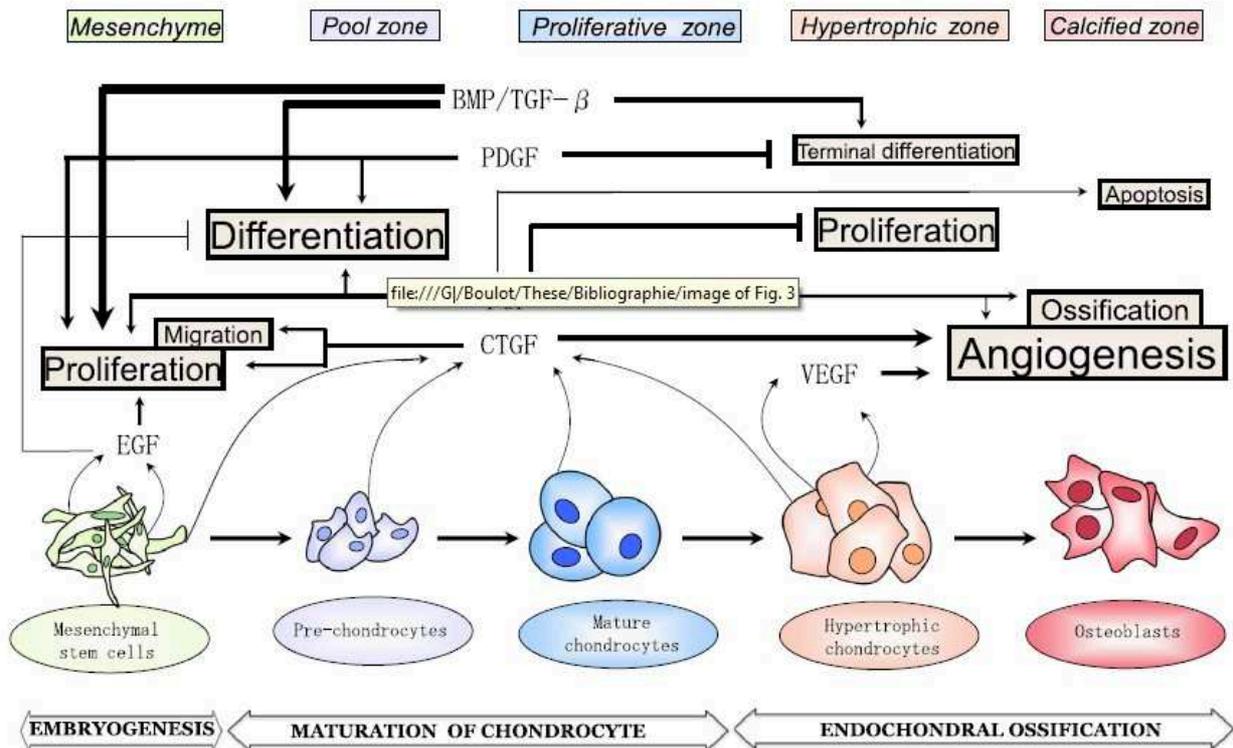


Figure 3 : Schéma de la différenciation chondrocytaire et de ses acteurs (3)

Le bon développement du cartilage implique la présence de nombreux facteurs dans le micro environnement cartilagineux. Ces facteurs vont permettre de guider les cellules vers les différents processus de différenciation. On note notamment l'importance du facteur TGF-β (Transforming Growth Factor-beta). Il induit la différenciation des CSM en chondrocytes, stimule leur prolifération, augmente la production de MEC et inhibe le processus d'ossification. Également le facteur BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) joue un rôle primordial dans la mise en place du cartilage. En effet, à faible concentration, BMP-2 a un effet positif sur la maturation chondrocytaire alors qu'à forte concentration il a un rôle plutôt ostéogénique (3).

I. 1. 3 Équilibre anabolisme/ catabolisme au sein du cartilage

Le cartilage est un tissu avasculaire, aneural et faiblement oxygéné. La plupart des éléments nutritifs nécessaires à son bon fonctionnement sont apportés par les fluides synoviaux grâce à des différences de pression osmotique au niveau de la MEC (4). Les chondrocytes doivent donc s'adapter dans un milieu hypoxique où le taux d'oxygène moyen est de 7%. Ce taux d'oxygène varie selon la profondeur au sein du tissu cartilagineux, suivant un gradient de 1 à 10 % (5) (6). C'est dans ce contexte particulier que les chondrocytes doivent être capables de conserver un équilibre entre les différents composants de la MEC (Figure 4).

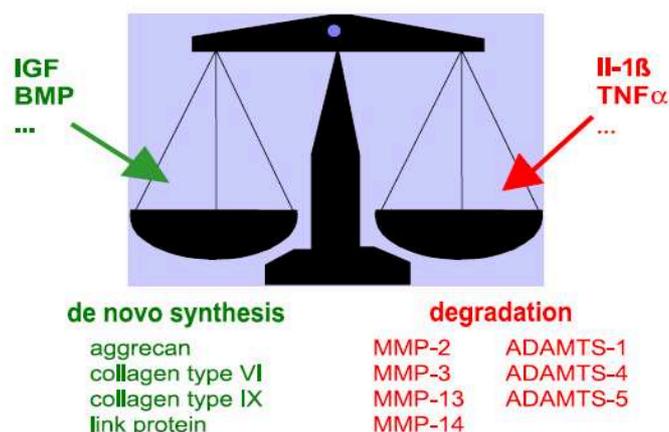


Figure 4 : Schéma représentant l'équilibre des composants du cartilage pour le maintien de son intégrité (1)

Le maintien de l'intégrité de la MEC et donc du tissu cartilagineux, dépend de l'activité anabolique et catabolique des chondrocytes. Ces cellules vont ainsi produire *de novo* de nombreuses molécules, telles que les agrécans et les collagènes. Toutefois, ils vont aussi induire la production de molécules responsables de la dégradation de la MEC ; comme des MMPs (Métalloprotéinases Matricielles) telles que les collagénases, ainsi que des ADAMTS (A Disintegrin-like And Métalloprotéase with Thrombospondin type 1 motif) tels que les agrécánases, que ce soit en conditions normales ou pathologiques. En outre, les chondrocytes vont également produire de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, comme la BMP, l'IGF (Insulin Growth Factor), ou encore le TGF- β , permettant de réguler les voies de synthèse et de dégradation du cartilage. La plupart de ces facteurs, sont connus pour avoir un rôle autocrine dans le cartilage articulaire (1). En cas de déséquilibre entre les différents composants de la MEC, des pathologies du cartilage peuvent faire leur apparition.

I. 2 Pathologies du cartilage

I. 2. 1 L'arthrose

L'arthrose est une maladie dégénérative des articulations touchant principalement les mains, les hanches et les genoux (*Figure 5*).

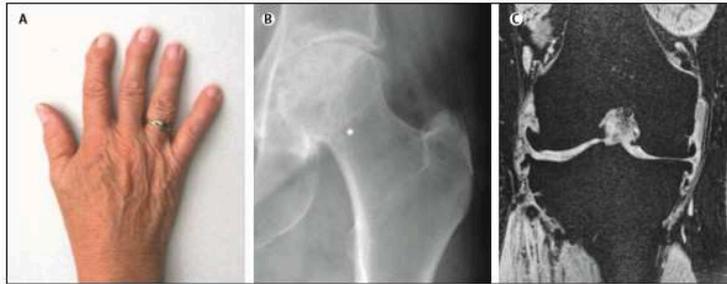


Figure 5 : Arthrose des articulations de la main (A), de la hanche (B) et du genou (C) (7)

L'arthrose est une maladie touchant principalement les personnes âgées de plus de 65 ans. Ainsi, la population étant vieillissante, cela en fait un réel problème de santé publique.

Cette maladie se caractérise par une destruction progressive du cartilage qui limite le glissement entre les os d'une articulation et entraîne de fortes douleurs chez les malades. Ce déséquilibre du cartilage est dû à une baisse d'activité de synthèse de la MEC tels que le collagène de type II et l'agrécane, par les chondrocytes, et à une augmentation de la sécrétion de MMPs et d'agrécanasés (Figure 6) (8).

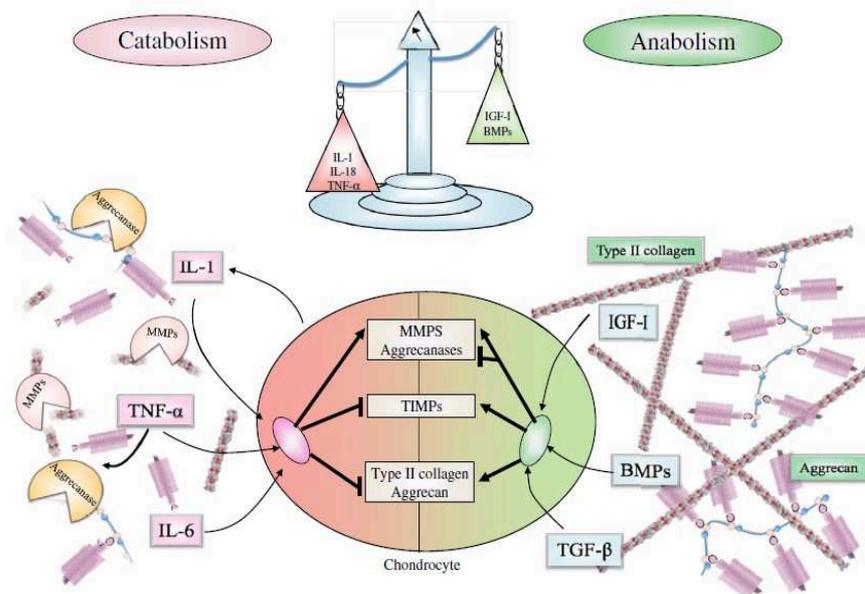


Figure 6 : Schéma de la modification de la balance anabolisme/catabolisme pendant le processus arthrosique (3)

I. 2. 2. L' arthrite

L'arthrite est une pathologie désignant une inflammation articulaire. Souvent liée à une maladie auto-immune (arthrite rhumatoïde), elle peut aussi être d'origine infectieuse. Cette maladie entraîne des douleurs articulaires plus ou moins sévères, la plupart du temps bénignes, mais qui peuvent se montrer invalidantes chez certains patients. L'apparition des symptômes de l'arthrite débute entre 30

et 55 ans chez les malades, avec une prédominance pour les femmes (9). L'inflammation articulaire a pour conséquence une prolifération synoviale excessive, entraînant la destruction du cartilage.

I. 2. 3. Le chondrosarcome

I. 2. 3. 1 Sarcomes et classifications

Les sarcomes sont des tumeurs qui trouvent leur origine dans les tissus dits de soutien de l'organisme (tissu adipeux, os, cartilage...) ; ils sont classés de la façon suivante :

- **Les sarcomes des tissus mous**, ou sarcomes des parties molles, représentent environ 1% des cancers chez l'adulte, avec une incidence de 5 cas pour 100 000 par an en Europe (10). Ils sont classés en fonction de leur tissu d'origine : les fibrosarcomes, les liposarcomes (cellules graisseuses), les léiomyosarcomes (cellules des muscles lisses), les synoviosarcomes, les histiocytomes fibreux malins et les sarcomes développés à partir des viscères, comme les tumeurs stromales gastro-intestinales (classification OMS 2013).
- **Les sarcomes osseux** sont des tumeurs malignes de l'os qui se caractérisent par leur agressivité, leur fort potentiel de récurrence et leur risque de développer des métastases. On distingue différents types de sarcomes osseux, principalement : **les chondrosarcomes**, les ostéosarcomes, les sarcomes indifférenciés et les sarcomes d'Ewing. Ils sont classés en fonction de leur grade, au nombre de trois (I, II et III) décrivant une malignité croissante (11).

I. 2. 3. 2 Description du CHS

Le chondrosarcome (CHS) est la troisième tumeur osseuse primitive maligne après le myélome et l'ostéosarcome. Dans la majorité des cas, les CHS ont une évolution lente et forment rarement des métastases. Les CHS se caractérisent par la capacité de leurs cellules cancéreuses à former de la MEC. En raison de la présence de cette MEC, ainsi que la faible vascularité et cellularité des CHS, ils sont connus pour être résistants aux traitements par radiothérapie et chimiothérapie. Ainsi, le traitement principal des CHS est la résection chirurgicale. Une excision large de la tumeur est pratiquée lorsque sa localisation le permet. D'ailleurs, le pronostic des CHS de bas grade est généralement bon après une chirurgie appropriée (12).

I. 2. 3. 3 Classification et grades

Les CHS sont classés en 2 grandes catégories et 5 sous-groupes (*Tableau 1*) (12) (14) :

- **Les CHS conventionnels**, ils représentent environ 85% des CHS et regroupent :

- Les CHS dits primaires (environ 75% des CHS) car ils se développent dans la cavité centrale de l'os. Leur malignité est croissante selon leur grade (I à III).
- Les CHS secondaires (environ 10% des CHS), quant à eux, se développent la plupart du temps à la surface des os après transformation maligne d'une lésion bénigne (ostéochondrome). Ce sont des CHS de haut grade.

- **Les CHS rares**, représentent environ 15 % des CHS, et regroupent :

- Les CHS dédifférenciés (environ 10% des CHS), non cartilagineux, de haut grade, avec un pronostic sombre et adjacent à un CHS de bas grade (*Figure 7 A*).
- Les CHS mésenchymateux (environ 2% des CHS) sont des CHS de haut grade, retrouvés dans les tissus osseux et dans les tissus mous, touchant des patients jeunes et se caractérisant par la présence de cartilage différencié et de petites cellules rondes (*Figure 7 B*).
- Les CHS à cellules claires (environ 2% des CHS) sont des CHS de bas grade. Ils se caractérisent par des cellules cancéreuses avec des cytoplasmes clairs et vides (*Figure 7 C*).

Les différents types de CHS peuvent être classés en trois grades de malignité croissante (13). Cette classification des CHS se base sur une analyse cytologique (*Figure 7*) des lésions et dépend de différents critères comme la densité cellulaire, la présence de cellules en mitose, la taille des noyaux... Les grades les plus élevés présentent de forts taux de métastases ce qui réduit considérablement la survie des patients.

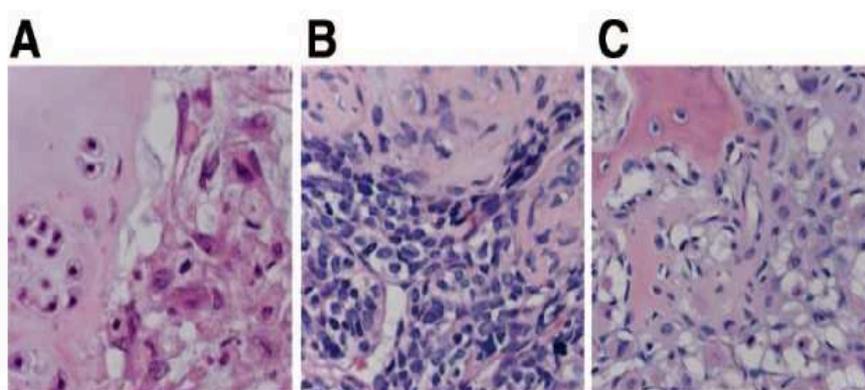


Figure 7 : Coupe histologiques de sous-types de CHS rare (Coloration HES, objectif x50) (12)

	Conventional primary central chondrosarcoma	Conventional secondary peripheral chondrosarcoma	Dedifferentiated chondrosarcoma	Mesenchymal chondrosarcoma	Clear cell chondrosarcoma
% of all chondrosarcomas	~75%	~10%	~10%	<2%	<2%
Precursor lesion	Enchondroma (up to 40%?)	Osteochondroma (100%)	Conventional chondrosarcoma	None	None
Occurrence within syndrome	Enchondromatosis (Ollier disease)	Multiple osteochondromas (MOs)	Rarely in MOs or enchondromatosis	None	None
Age	>50 years	Younger than central chondrosarcoma	Median age 59 years	Any age (peak in second and third decade)	Any age (peak in third to fifth decade)
Preferential location	Pelvis, proximal femur, proximal humerus, distal femur, ribs	Pelvis, shoulder girdle bones	Femur and pelvis	65%–86% skeleton (jawbones, ribs, ilium, vertebrae) 14%–43% extraosseous (meninges)	Epiphysis of humeral or femoral head
Histological grading	Grade I–III	High grade	High grade	Low grade	
Survival	Grade I, 83%; grade II, 64%; grade III, 29% at 10 yrs	24% at 5 yrs	28% at 10 yrs	89% at 10 yrs	
Sensitivity to chemotherapy	None	None	Uncertain	Possibly, if high percentage round cells	None
Sensitivity to radiotherapy	Low	Low	Low	Possibly high	Low
Potential targets for therapy	PTHLH (BCL2), IHH, PDGFR- α , COX-2, MMP, ER, HDAC	PTHLH (BCL2), ER, HDAC	None	BCL2, c-PKC- α , PDGFR- α	PTHLH (BCL2), PDGF, MMP2, IHH

Abbreviations: BCL2, B-cell lymphoma 2 protein; COX-2, cyclo-oxygenase 2; ER, estrogen receptor; HDAC, histone deacetylase; IHH, Indian hedgehog; MMP, matrix metalloproteinase; PDGFR- α , platelet-derived growth factor receptor α ; PTHLH, parathyroid hormone-like hormone.

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et thérapeutiques des différents types de CHS (12)

I. 2. 3. 4 Exemple de l'évolution d'une tumeur cartilagineuse bénigne en CHS

De nombreux CHS sont issus de lésions osseuses bénignes. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la transformation de ces lésions bénignes en CHS est primordiale. La figure 8 représente schématiquement le développement d'un enchondrome résultant d'une différenciation de la plaque de croissance, causée par l'activation de la voie de signalisation Hedgehog. Lorsque des mutations génétiques surviennent, ces lésions bénignes peuvent évoluer en CHS central de bas grade. L'accumulation de mutations génétiques supplémentaires, peut conduire à l'évolution du CHS de bas grade en CHS de haut grade. D'autre part, la mutation du gène exostin (EXT) aboutit à la formation d'un ostéochondrome. Ce dernier, par accumulation de mutations génétiques supplémentaires pourra évoluer en CHS périphérique de bas grade, puis en CHS périphérique de haut grade. Pour chacune de ces transformations, les voies de signalisation responsables ont été identifiées, elles représentent donc de potentielles cibles pour la thérapie de ces tumeurs. Ainsi, il a été mis en évidence que ces différents facteurs : la cyclo-oxygénase 2 (COX2), le facteur d'hypoxie inductible (HIF), le facteur de croissance lié à l'insuline (IGF), les

métalloprotéinases matricielles (MMP), l'hormone parathyroïdienne (PTHrH), SRC et Akt sont tous dérégulés lors d'une évolution tumorale. P53, quant à lui, est retrouvé inactivé lors du processus de transformation de tumeurs bénignes en CHS (15).

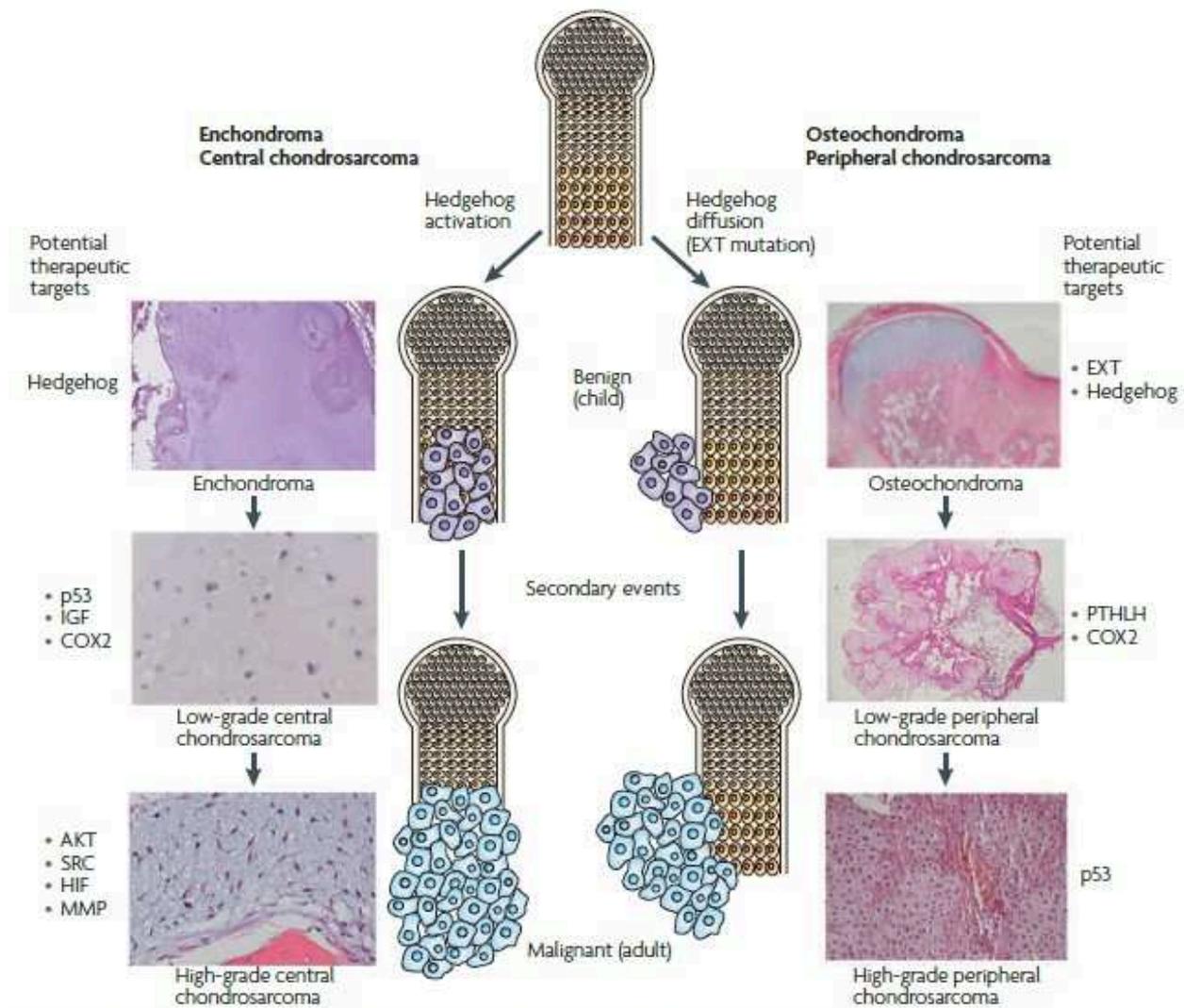


Figure 8 : Développement de tumeurs cartilagineuses bénignes et leur progression en CHS (15)

I. 2. 3. 5 Diagnostic

Au moment du diagnostic, les patients sont généralement âgés de 30 à 70 ans. Avec une légère prédominance masculine, le CHS est le sarcome primaire osseux le plus commun chez l'adulte. Le symptôme principal de ce cancer est la douleur, liée à la présence d'une masse visible ou non, dont l'évolution peut être lente. Les sites d'apparition les plus fréquents des CHS sont les os pelviens, le fémur et l'humérus. D'autres CHS sont observés au niveau du tronc, du crâne et des os du visage, ainsi que plus rarement au niveau des mains et des pieds. Les CHS sont diagnostiqués

principalement par deux types d'imageries : l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomodensitométrie (scanner). L'examen IRM permet de caractériser la tumeur et donne des informations sur sa taille, sa localisation et sa délimitation. Le scanner, quant à lui, met en évidence la présence de zones osseuses détruites, de calcification de la tumeur et permet de mesurer l'étendue des zones intra et extra osseuses atteintes. La présence de douleur chez le patient, un emplacement proximal ou axial sur le squelette, une taille supérieure à 5 cm, un aspect lobulé de la tumeur avec des contours bien définis, et une destruction osseuse, sont des facteurs qui suggèrent la malignité de la lésion. Toutefois, une biopsie est nécessaire pour établir le diagnostic par immunohistochimie et identifier précisément le type de lésion, afin d'orienter au mieux la prise en charge des patients, notamment par l'utilisation d'un traitement adapté (14).

I. 2. 3. 6 Traitement

Dans la majorité des cas, le traitement des CHS est chirurgical et consiste en une résection tumorale la plus complète et la plus large possible, en incluant une marge de tissu sain, dans le but de limiter l'apparition de tumeurs secondaires, tout en essayant de conserver le maximum de tissu sain (15). A un stade très avancé, l'amputation est souvent nécessaire afin de limiter tout risque de récurrence ou de dissémination tumorale. Après ablation de la tumeur ou d'une partie de la tumeur, le taux de survie à 10 ans des patients est de 30% à 80% selon le grade initial du CHS. Toutefois, au vue de la localisation délicate de certaines tumeurs, et/ou pour limiter les risques d'apparition de métastases, un traitement par radiothérapie et/ou chimiothérapie est préconisé, en complément de la chirurgie. Malheureusement, les CHS sont très résistants à ces thérapies. Bien que les voies moléculaires à l'origine de ces résistances ne soient pas encore entièrement définies. Certains expliquent ce phénomène, par la présence d'un micro-environnement inflammatoire permettant aux cellules cancéreuses de proliférer dans cette «niche» osseuse en fournissant tous les éléments requis à la croissance de la tumeur. Comme le montre la figure 9, il existe une relation étroite entre les tissus osseux et les cellules de CHS. On peut d'ailleurs noter sur ces images l'infiltration des cellules de CHS dans l'os (16).

La présence d'une MEC dense et la faible vascularisation des CHS rendent l'action des thérapeutiques conventionnelles, et notamment la radiothérapie délicates (15). Cependant, le caractère inopérable de certaines tumeurs contraint les médecins à opter pour un protocole de radiothérapie. Une dose totale supérieure à 65 Gy, fractionnée en doses moyennes de 2 Gy/ jour, à raison de 5 fractions par semaine, est alors préconisée (17) (18).

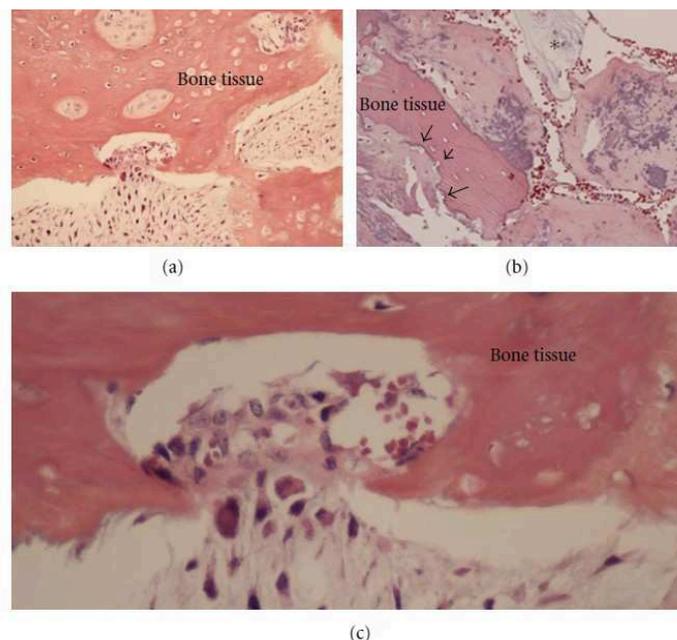


Figure 9 : Mise en évidence de la relation étroite liant les cellules de CHS au tissu osseux (Coloration HES, objectif x20 et x40) (16)

Toutefois, même si ce traitement adjuvant à un acte chirurgical est suffisant pour un contrôle local de la reprise tumorale (*Tableau 2*) (17), les résultats concernant des zones à risque proches de structures neurologiques, comme les sarcomes des tissus mous de la tête et du cou, ont été beaucoup moins concluants. En effet, dans ces zones, il est impossible de délivrer une forte dose de rayonnements au risque de créer des dommages trop importants et de fortes séquelles neurologiques chez les patients. Pour ce type de tumeur, l'hadronthérapie est une solution pertinente (voir paragraphe : « II. 2 Hadronthérapie : les ions-carbone »).

Treatment modality (no. of pts.)	Grade (no. of pts.)			Size (no. of pts.)		Surgical margin status (no. of pts.)			% 5-yr LC (95% CI)
	1	2	3	≤5 cm	>5 cm	NEG	MRD	GRD	
Surgery alone (<i>n</i> = 13)	6	1	6	10	3	8	2	3	59 (27–81)
Surgery + RT ± CT* (<i>n</i> = 36)	10	7	19	14	22	14	11	11	77 (58–87)
RT ± CT† (<i>n</i> = 5)	0	1	4	0	5	0	0	5	0

CT = chemotherapy; RT = radiation therapy; pts. = patients; 5-yr LC = 5-year local control; NEG = negative; MRD = microscopic residual disease; GRD = gross residual disease.

* Seven patients received adjuvant chemotherapy.

† Four patients received adjuvant chemotherapy.

Tableau 2 : Contrôle local selon la modalité de traitement, le grade de tumeur, la taille, et état de marge chirurgicale chez 54 patients

II. Radiothérapie

II. 1 Généralités en radiobiologie

II. 1. 1 Historique

C'est le 8 novembre 1895 que le professeur Wilhelm Roentgen (*Figure 10*) met en évidence l'existence de rayonnements invisibles. En effet, le professeur parvient à mettre en évidence qu'une plaque photographique peut être impressionnée par la lumière. Il place alors divers objets entre une plaque photographique et la source de rayonnement et démontre qu'ils ont une transparence variable. Un essai avec la main de sa femme permet d'observer les os de la main ainsi que son alliance, entouré d'une « ombre » correspondant au tissus mous ; il remarque ainsi que certains tissus, et certaines matières, comme le métal, sont plus ou moins perméables aux rayons (*Figure 10*). En poursuivant ses expériences, le Professeur Roentgen constate que ces rayons sont produits par l'impact des rayons cathodiques sur un objet matériel. Leur nature étant encore inconnue, il leur donne le nom de « rayons X » (X étant le symbole de l'inconnu en mathématiques). C'est plus tard que le professeur Max Von Laue démontrera qu'ils sont de nature électromagnétique, comme la lumière, mais qu'ils se différencient par une plus haute fréquence. La découverte du professeur Roentgen est couronné en 1901 par l'attribution du prix Nobel de physique (19).



Figure 10 : La découverte du Professeur Roentgen (19)

Les médecins comprennent immédiatement l'intérêt de ces rayonnements et leur utilité pour la recherche médicale : c'est le début de la radiologie.

Cependant, des médecins utilisant fréquemment ces rayonnements finissent par tomber malades. Malgré les avantages de ces rayons, il semble qu'à fortes doses, une irradiation est dangereuse et qu'il faut donc s'en protéger. Dans les années 1920 se créent des commissions internationales pour définir des réglementations sur l'utilisation des rayonnements. C'est la naissance de la radioprotection, pour l'homme et l'environnement (20).

II. 1. 2 Rayonnements : définition et classification

On distingue deux types de rayonnements (*Figure 11*) :

- **Les rayonnements ionisants (RI)** qui sont issus de particules ou d'ondes électromagnétiques. Parmi ces RI, on retrouve notamment les rayons-X, les photons, les protons...
- **les rayonnements non-ionisants** qui sont issus d'ondes électromagnétiques et de vibration mécanique. Parmi ces rayonnements non-ionisants, on retrouve notamment les infra-rouges ou encore les ultra-violets.

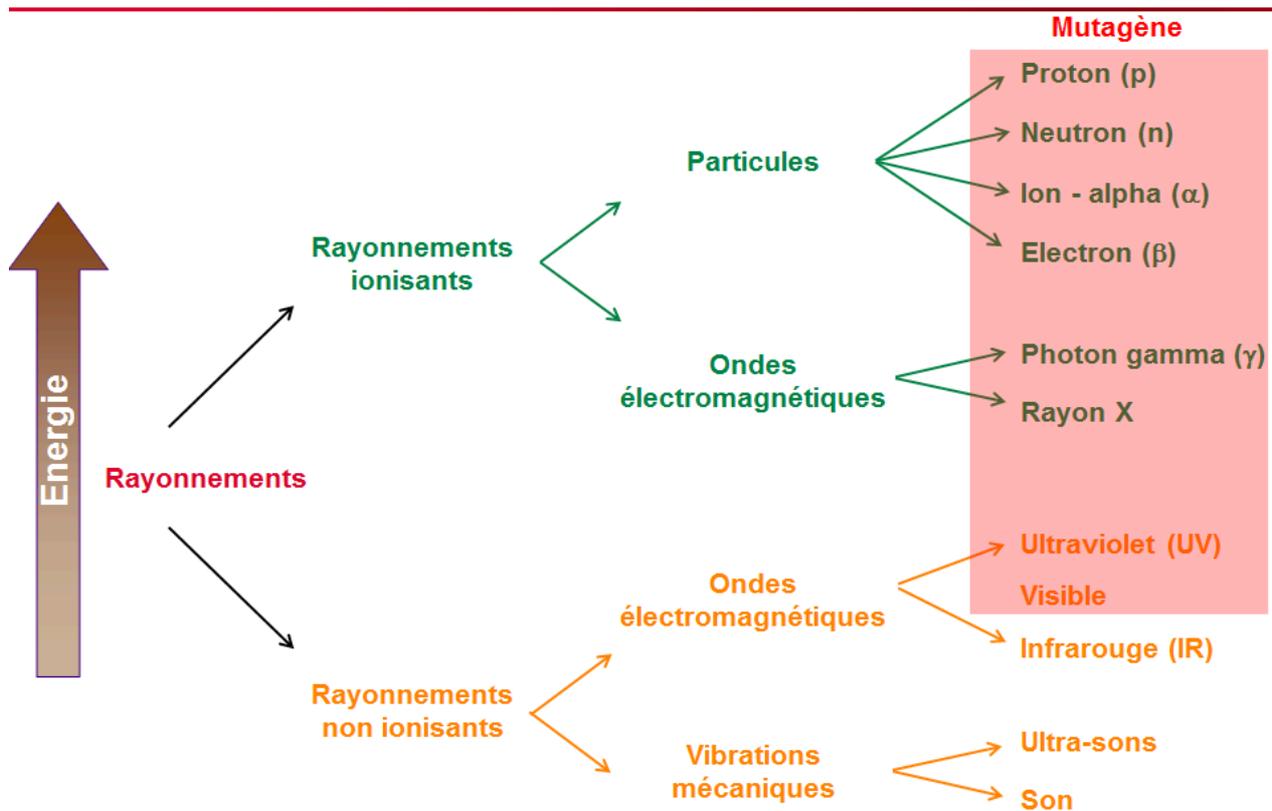


Figure 11 : Les différents types de rayonnements (d'après Y. Saintigny)

Les RI correspondent aux rayonnements les plus énergétiques. Ils sont capables de transférer

suffisamment d'énergie aux électrons de la matière pour les arracher de leur atome. Les atomes, privés de certains de leurs électrons, sont alors chargés positivement et les atomes voisins, qui accueillent les électrons, se chargent négativement. Ces atomes chargés, que ce soit positivement ou négativement, sont appelés ions. Les rayonnements non ionisants, eux, comprennent les ondes électromagnétiques de moindre énergie. Le pouvoir pénétrant des RI dans la matière est variable selon leur nature (*Figure 12*) (20).



Figure 12 : Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants dans la matière (20)

II. 1. 3 Les effets biologiques des rayonnements

Nous savons que les ultraviolets du soleil peuvent présenter un danger en cas d'exposition à long terme, comme des coups de soleils, ou des brûlures, mais surtout des cancers, dus à la présence de rayonnements ultraviolets. Ces rayonnements vont induire une ionisation des molécules présentes au sein de notre organisme. Selon la dose reçue, et le type de rayonnements, leurs effets peuvent être plus ou moins néfastes pour la santé (*Figure 13*). Les effets de ces expositions aux rayonnements, peuvent être étudiés de deux façons :

- soit par des études épidémiologiques, qui vont consister à observer des cohortes ayant subi des irradiations, comme les populations d'Hiroshima ou encore les travailleurs dans les

mines d'uranium.

- soit par des études expérimentales, où les chercheurs vont pouvoir observer les dégâts de ces irradiations sur les cellules exposées et les perturbations engendrées par ces rayonnements, sur l'ADN notamment (20).

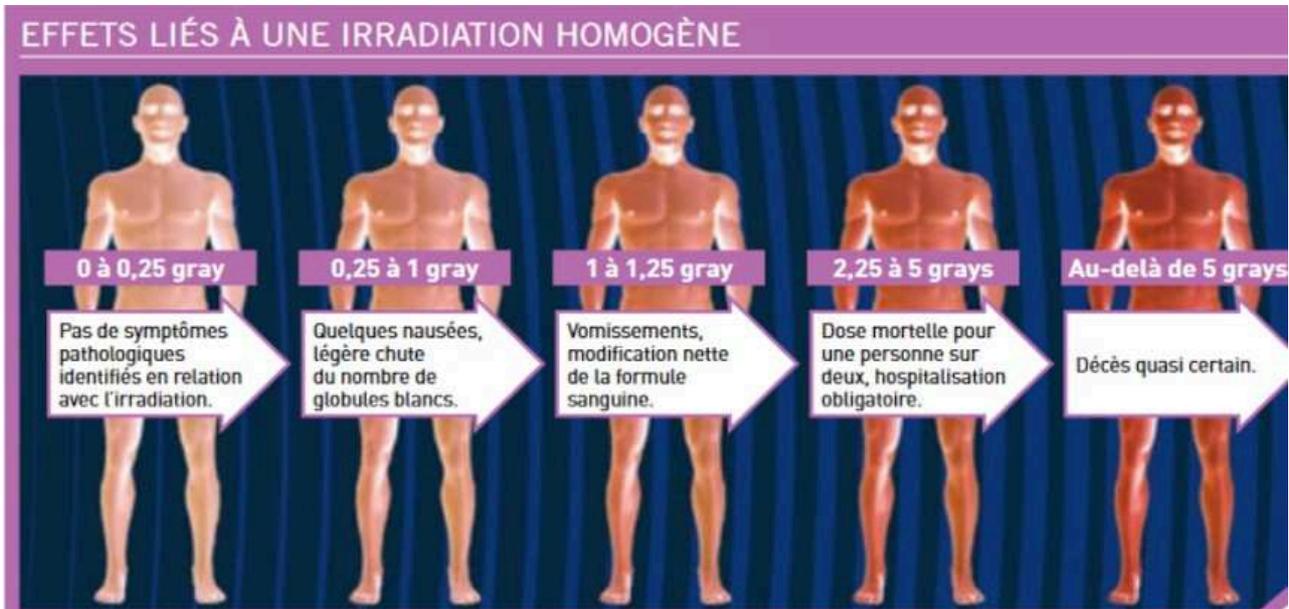


Figure 13 : Effets sur l'organisme en fonction des doses pour une irradiation globale (corps entier) (20)

Le dépôt d'énergie des RI dans la matière se déroule en 5 étapes fondamentales (22) (23) (Figure 14) :

- Une étape « **physique** », très courte ($t < 10^{-15}$ secondes), juste après l'irradiation, qui entraîne la création d'espèces excitées dans la cellule et l'ADN. Elle engendre ainsi une première altération des biomolécules par « effet direct ».
- Une étape « **physico-chimique** » ($10^{-15} < t < 10^{-12}$ secondes) pendant laquelle d'autres éléments cellulaires vont interagir avec l'énergie déposée par les rayonnements, comme H_2O , conduisant à la formation de produits radicalaires, tels que $OH\bullet$, $H\bullet$.
- Une étape « **chimique** », très courte également, au cours de laquelle les différentes espèces formées interagissent entre elles, jusqu'à atteindre un état stationnaire dans l'environnement cellulaire.
- Une étape « **biochimique** », qui débute lorsque les radicaux formés altèrent chimiquement les biomolécules présentes dans le milieu environnant et entraînent leur dégradation.
- Une étape « **biologique** », qui débute quelques secondes après l'irradiation et est à l'origine de dommages à l'ADN, de mutations génétiques..., pouvant aboutir à la mort cellulaire ou à des transformations cellulaires graves (cancers). Ces anomalies peuvent notamment être héréditaires.

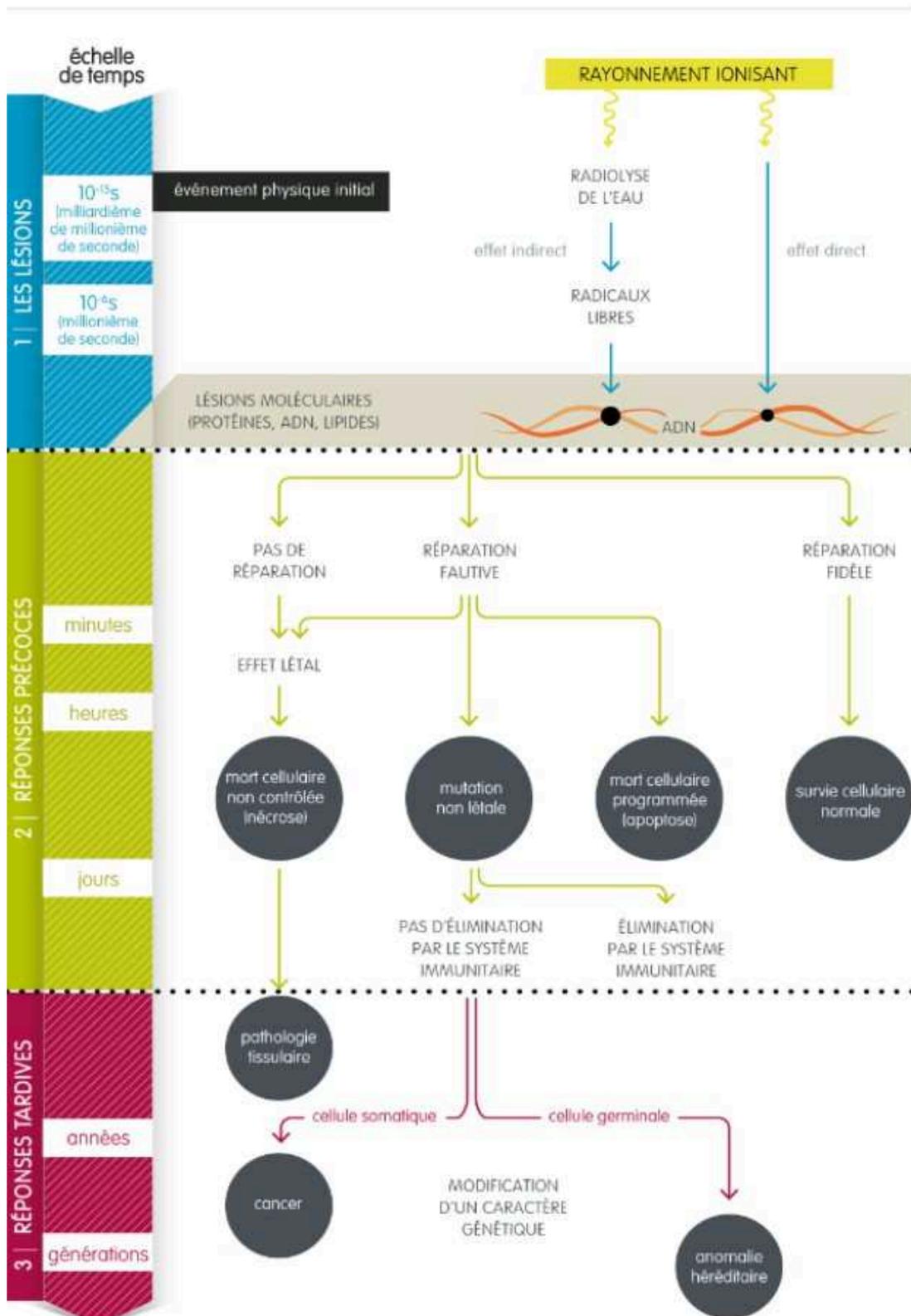


Figure 14 : Arbre des réponses possibles d'une cellule après une irradiation par rayonnements ionisants (23)

II. 1. 4 Les effets cellulaires des RI

L'irradiation par RI d'une cellule engendre l'apparition de multiples dommages et une cascade de réponses cellulaires, comme le montre la figure 15 (24):

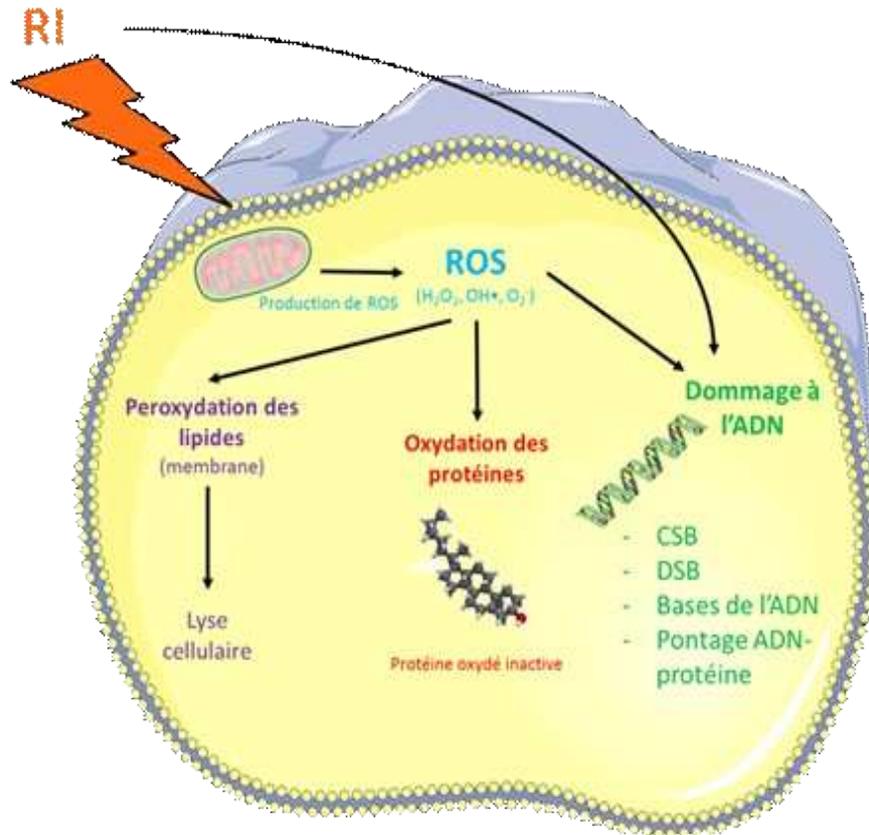


Figure 15 : Principaux effets des RI sur les cellules irradiées

II. 1. 4. 1 Production de ROS (Reactive Oxygen Species)

Les RI sont capables d'induire une ionisation des molécules d'eau ; c'est ce que l'on nomme la radiolyse de l'eau. Cette réaction engendre la formation de radicaux libres, hautement réactifs :

- l'anion superoxyde : O_2^- , produit dans la mitochondrie ;
- le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 issu de la dismutation de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase (SOD);
- le radical hydroxyl $OH\bullet$ provenant de la réaction des radicaux O_2^- et H_2O_2 entre eux, c'est le radical le plus réactif.

Ces ROS vont générer un stress oxydant au sein de la cellule irradiée. Ils vont notamment interagir avec un large panel de molécules organiques, telles que les protéines et les acides nucléiques. Les

ROS peuvent altérer la fonction biologique des molécules cibles. En effet, ils sont considérés comme des éléments majeurs dans le phénomène du vieillissement et dans de nombreux dommages occasionnés au niveau des organismes biologiques (25).

II. 1. 4. 2 Peroxydation lipidique

Les RI, et plus particulièrement les ROS, produits lors d'une irradiation, sont capables d'induire une peroxydation lipidique des phospholipides polyinsaturés, ou des glycolipides, contenus dans les membranes cellulaires. Cette peroxydation entraîne une désorganisation au sein de la membrane, pouvant aboutir à la lyse cellulaire (26). De plus, les produits hydroxylés générés, s'ils ne sont pas rapidement dégradés, peuvent s'avérer très toxiques pour la cellule, notamment en interagissant, et en inactivant, certaines protéines. Par exemple, la peroxydation des acides gras $\omega 6$, est parmi les plus détectées dans les tissus biologiques. Elle a une influence directe, sur la viabilité des cellules, entraînant une déplétion du glutathion, une inhibition de la synthèse de l'ADN et des protéines induisant la mort des cellules (27).

II. 1. 4. 3 Oxydation des protéines

Les ROS peuvent engendrer l'oxydation des acides aminés de certaines protéines, induisant une fragmentation de leur chaîne polypeptidique. Ces protéines pouvant être impliquées dans les voies de signalisation, leur modification va entraîner un dysfonctionnement dans la cellule. Aujourd'hui, l'oxydation des protéines est étudiée par des méthodes innovantes, par immunologie ou par spectrophotométrie, ce qui permet de mettre en évidence l'importance du stress oxydatif engendré sur les cellules après une exposition aux RI. Ces techniques ont permis récemment de montrer que les RI génèrent un potentiel élevé d'oxydation précoce des protéines dans les cellules irradiées et ce, de façon dose-dépendante. Ce déséquilibre rédox va entraîner des bouleversements au sein de la cellule irradiée, notamment au niveau de ses protéines, engendrant des troubles dans la signalisation cellulaire (28).

II. 1. 4. 4 Dommages à l'ADN et aux chromosomes

L'ADN est connu comme étant la cible critique des RI. Les lésions de l'ADN peuvent être induites directement par l'énergie déposée par les RI ou indirectement, par les ROS notamment. Les dommages générés peuvent avoir des conséquences létales ou mutagènes pour la cellule. Une dose

de 1 Gy produit dans chaque cellule environ 2000 dommages de bases, 1000 cassures simples brins (CSB), et 40 cassures doubles brins (CDB) (29).

Ainsi, on distingue différents types, de dommages radio-induits au niveau de l'ADN :

- **Les cassures simples brins (CSB)**

Ces lésions, généralement réparées efficacement dans les minutes qui suivent l'exposition aux RI, ont ainsi peu d'impact létal sur les cellules irradiées.

- **Les cassures doubles brins (DSB)**

Ces lésions sont beaucoup plus délétères. En effet, les cassures doubles brins sont les plus difficiles à réparer et peuvent avoir un effet létal.

- **Les bases de l'ADN**

Les bases pyrimidiques (Thymine et Cytosine) sont plus sensibles que les bases puriques (Adénine et Guanine) aux RI. Leur oxydation par les ROS peut avoir des conséquences létales ou mutagènes sur la cellule. Par exemple, on note que l'hydroxylation de la thymine entraîne le blocage de la réplication de l'ADN, ce qui peut avoir des conséquences dramatiques pour la cellule irradiée (30).

- **Les pontages radio-induits**

Après une exposition des cellules aux RI, la formation de pontages inter-chaînes, ou intra-chaînes, entre l'ADN et les protéines environnantes. Un pontage ADN-protéine, se forme lorsqu'une protéine se lie de façon covalente à l'ADN. Le nombre de pontages radio-induits est de 150 par cellule et par Gy (29). Ils peuvent se former lorsque 2 radicaux sont générés sur l'ADN et sur les acides aminés des protéines à proximité de l'ADN. La guanine, par exemple, possède le potentiel d'ionisation le plus bas parmi les composants de l'ADN, elle est donc facilement oxydée pour former un radical cation, lui-même impliqué dans la formation de nombreuses lésions oxydatives. Ces dommages forment des adduits au niveau de l'ADN, conduisant au blocage de certains processus biologiques fondamentaux comme la réplication ou la transcription (31).

- **Les réarrangements chromosomiques**

Lorsque la réparation de l'ADN, après une exposition à des RI, ne se fait pas correctement, elle peut conduire à des modifications morphologiques des chromosomes. Ces réparations imparfaites vont conduire à la formation de chromosomes de morphologie anormale. Il s'agit d'anomalies chromosomiques de structure observables durant la métaphase, lorsque les chromosomes sont bien individualisés. La figure 16 résume les principales aberrations de structure radio-induites (32). Ainsi, lorsqu'un seul chromosome est impliqué (à gauche), on

obtient la formation d'une paire de fragments ou la formation d'un anneau centrique, accompagné d'une paire de fragments. Lorsque la réparation implique 2 chromosomes différents (à droite), il peut y avoir création d'une aberration chromosomique instable de type dicentrique, ou d'aberrations chromosomiques stables, telles que des translocations et des insertions.

Domage subi par l'ADN								
Aberrations chromosomiques								
Noms	Restauration	Fragment	Anneau centrique	Inversion	Dicentrique	Translocation réciproque	Translocation terminale	Insertion

Figure 16 : Les principales aberrations chromosomiques de structure (32)

II. 1. 5 Systèmes de réparation des dommages radio-induits

Afin de lutter efficacement contre ces dommages radio-induits, la cellule possède tout un arsenal de réparation. Elle est capable, grâce à des systèmes anti oxydants, de rétablir l'homéostasie cellulaire. Elle peut également, en réponse aux dommages radio-induits, mettre en place des mécanismes sophistiqués de réparation des dommages à l'ADN.

II. 1. 5. 1 Systèmes antioxydants

On distingue deux grands mécanismes qui permettent d'assurer l'homéostasie d'oxydoréduction des cellules après une exposition à des RI :

- Des petites molécules, telles que les vitamines C et E dont les pouvoirs anti-oxydant, qui sont utilisées comme traitement anti-oxydant, adjuvants à des thérapies induisant un stress oxydatif et qui ont largement montré leur efficacité (33).
- Des enzymes antioxydantes, comme SOD (Superoxyde Dismutase), qui entraîne la dismutation de O_2^- en H_2O_2 , ou encore la catalase et catalysant la dégradation d' H_2O_2 en H_2O , préservant ainsi les cellules irradiées des effets des ROS (34).

II. 1. 5. 2 Mécanismes de réparation des dommages radio-induits à l'ADN

Les RI induisent différents types de dommages au niveau de la molécule d'ADN, comme des cassures simple brin : SSB (Single Strand Break) de l'ADN, des modifications de base ou des mésappariements, mais surtout des cassures double brin : DSB (Double Strand Break). Ces dernières sont à l'origine de dommages cellulaires importants tels que des mutations de l'ADN, des aberrations chromosomiques ou encore l'induction de la mort des cellules. La qualité des RI affecte la nature des dommages radio-induits, et leur capacité à être réparés par les cellules ainsi, plus les rayonnements sont fortement ionisants, plus les dommages cellulaires seront importants. De même, le niveau de différenciation des cellules joue un rôle sur leurs capacités à réparer leurs dommages à l'ADN, ceci étant notamment dû au fait que la concentration intracellulaire de certaines enzymes, ou encore le niveau de condensation de la chromatine, est différente selon le stade de différenciation cellulaire. Ainsi, plus la chromatine est compacte, moins les dommages à l'ADN induits par les RI seront importants (35). Les DSB de l'ADN sont aujourd'hui largement reconnues comme les lésions ayant l'effet biologique le plus délétère sur les cellules après une irradiation par des RI (36) (37).

Il existe deux mécanismes principaux de réparations des DSB décrits dans la figure 17 (38) :

- **Le mécanisme de recombinaison homologue** : HR (Homologous Recombination), qui permet, grâce à une chromatide sœur non endommagée par les RI, la synthèse des brins endommagés, complémentaires des brins intacts. Cette réparation permet ainsi de conserver l'intégrité génétique. Ce processus se produit généralement dans les cellules en mitose et est étroitement associé à l'étape de réplication. Ainsi, dans un premier temps, le complexe Mre11-Rad50-Nsb1 (Mre11 : Meiotic recombinaison 11, Nsb1 : Nijmegen breakage syndrome protein 1) va reconnaître les cassures et en réséquer une partie. Puis Rad51 et l'ADN polymérase vont pouvoir réparer l'ADN par homologie de séquence (39).

La voie de réparation SSA (Single Strand Annealing) est une variante de la HR, elle ré-associe simplement les extrémités, après délétion, autour des cassures double brin. Cette voie est infidèle, mais cela n'a pas de conséquences car elle concerne des séquences non codantes.

- **Le mécanisme de jonction d'extrémités non homologues** : NHEJ (Non Homologous End Joining), induit le rapprochement d'extrémités de l'ADN lésé. Pour cela, la protéine kinase DNA-PK recrute l'hétérodimère Ku70/80 et facilite le recrutement et l'activation du complexe Mre11-Rad50-Nsb1. Ces derniers permettent d'exciser les zones endommagées, puis l'hétérodimère Xrcc4/ligaseIV permet la ligation des deux brins (40). C'est le mode principal de réparation des cassures double brin chez les mammifères.

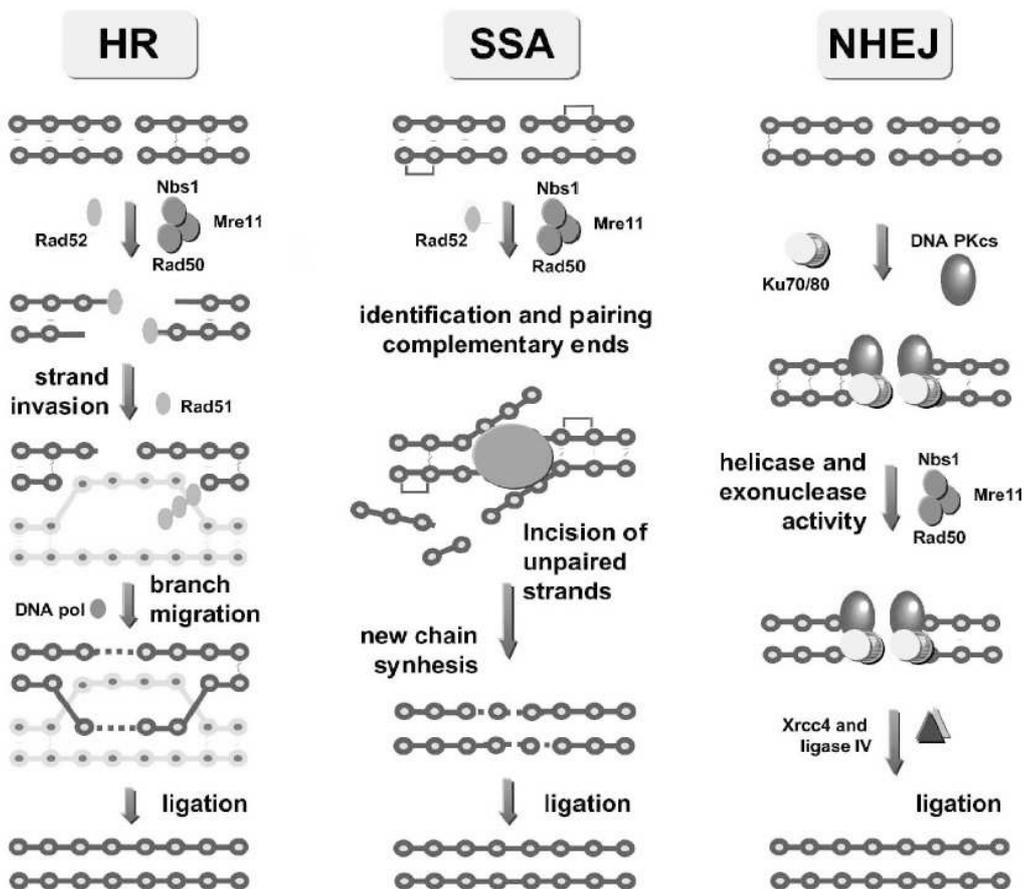


Figure 17 : Principales étapes des systèmes de réparation des cassures double brin de l'ADN (DSB) (38)

II. 1. 6 Réponses cellulaires aux dommages radio-induits

II. 1. 6. 1 Activation des checkpoints du cycle cellulaire

Les dégâts causés à l'ADN, après une exposition à des RI, déclenchent des signaux biochimiques qui, en plus d'initier la réparation de l'ADN, vont activer les points de contrôle (nommés checkpoints) du cycle cellulaire. Ces checkpoints sont responsables du ralentissement de la progression du cycle cellulaire, et vont ainsi permettre à la cellule, d'analyser ces dommages et de tenter de réparer son ADN. Ils vont ainsi bloquer temporairement le cycle cellulaire lors des transitions entre les phases G₁, S et/ou G₂/M (41), permettant aux cellules de réparer leurs dommages radio-induits. De ce fait, soit la cellule parvient à réparer efficacement ses dommages, et reprend un fonctionnement normal, soit la réparation échoue, déclenchant un processus de mort cellulaire (42).

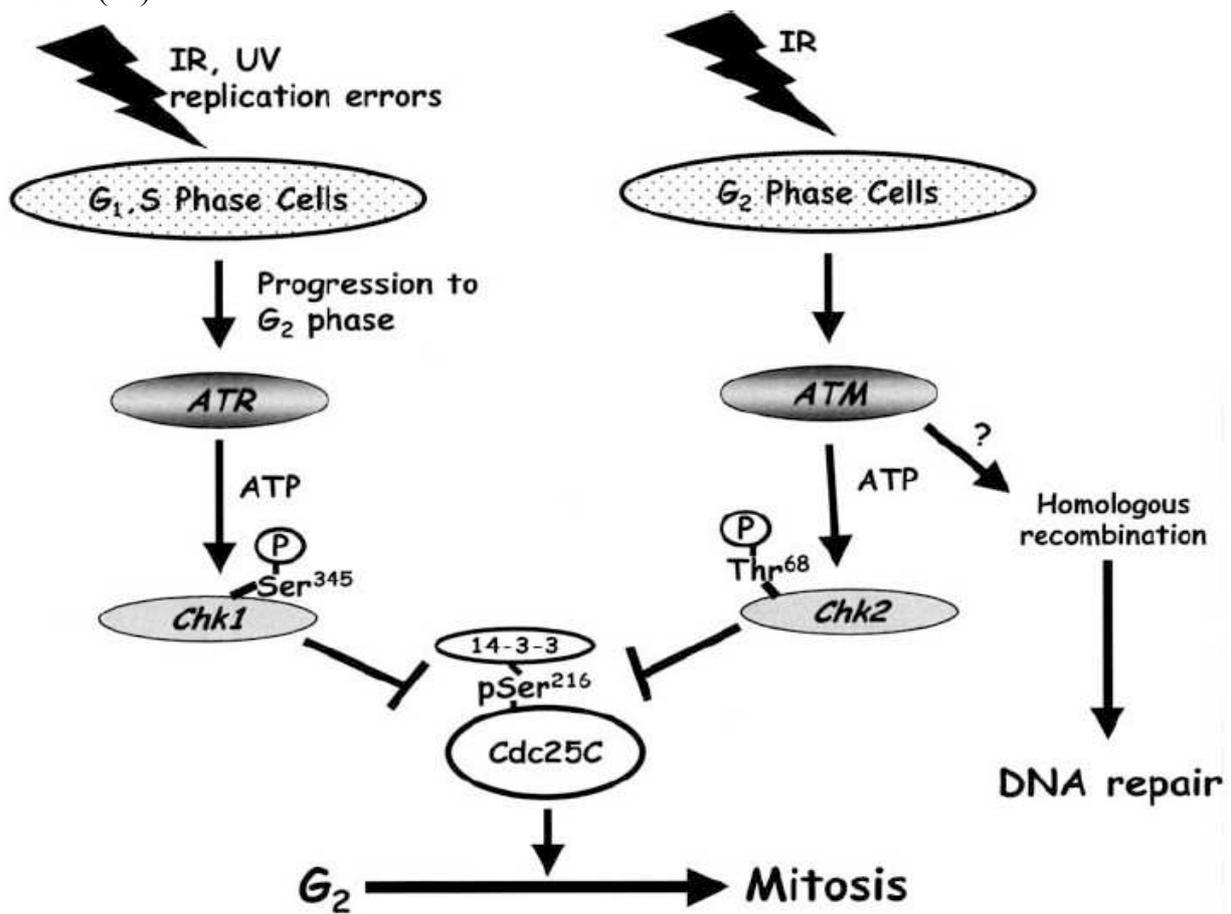


Figure 18 :Activation par les cellules des checkpoints du cycle cellulaire après un stress (RI) (41)

D'après la figure 18, lors d'un stress géno-toxique, tel qu'une irradiation par RI, la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouvent les cellules, au moment d'être irradiées, va jouer un rôle clé dans la radiosensibilité des cellules :

- Lorsque les cellules subissent des dommages à l'ADN avant la fin de la phase S, c'est la voie de détection et de réparation ATR (*ATM and Rad3-related kinase*) qui est activée. ATR est généralement associée aux lésions de l'ADN induites par des stress réplcatifs (stress

oxydatif). ATR permet l'activation de la checkpoint kinase 1 (Chk1) par phosphorylation de la Ser³⁴⁵ (43).

- Lorsque les cellules subissent des dommages à l'ADN pendant la phase G2, c'est la voie de détection et de réparation ATM (*AtaxiaTelangiectasia Mutated kinase*) qui est activée. ATM est généralement impliquée dans l'induction des systèmes de réparation (HR), l'arrêt du cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose radio-induite. ATM permet l'activation de la Checkpoint kinase 2 (Chk2), par phosphorylation de la Thr⁶⁸ (44).

Ces deux voies convergent vers l'inhibition de la phosphatase Cdc25C. Cette dernière permet de réguler l'entrée ou non des cellules en mitose. Lorsque Cdc25C est phosphorylé (Ser²¹⁶), cela crée un site de liaison pour les protéines 14-3-3 ce qui engendre une inhibition catalytique de Cdc25C, empêchant ainsi les cellules d'entrer en mitose (45).

II. 1. 6. 2 Signalisation moléculaire radio-induite

Suite à une exposition à des RI, de nombreuses voies de signalisation vont être activées au sein de la cellule irradiée. Cette signalisation jouera un rôle clé dans la propagation des effets radio-induits, notamment par la communication entre les cellules après irradiation. Ainsi, les ROS et les dommages à l'ADN vont induire l'activation de voies qui conduisent à la production de cytokines.

II. 1. 6. 2. 1 Cytokines radio-induites

Les cytokines sont des médiateurs puissants de la communication entre les cellules. Les RI induisent sur les cellules exposées la production de cytokines. Ces effecteurs vont permettre aux cellules irradiées de communiquer avec les cellules avoisinantes et d'induire une cascade de réponses cellulaires, entre cellules irradiées et entre les cellules irradiées et les cellules non-irradiées voisines. Parmi ces cytokines, les cytokines pro-inflammatoires semblent jouer un rôle prépondérant dans la signalisation cellulaire radio-induite. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence les principales cytokines impliquées dans la réponse à l'irradiation (46).

- L'**IL-1** (Interleukine-1) fait partie des cytokines directement induites après une irradiation et dont l'expression peut perdurer plusieurs semaines après l'irradiation (47). L'IL-1 a été identifiée comme l'un des acteurs majeurs des troubles cardiaques associés à un traitement par radiothérapie des cancers pulmonaires. En effet, l'IL-1 est induite lors d'une thérapie thoracique classique, par rayons-X, et déclenche une réponse cellulaire responsable de cardiomyopathie. Ces effets secondaires sont notables pour les patients et, aujourd'hui, la

limitation de l'action de l'IL-1 lors d'une irradiation (48). A l'inverse, l'IL-1 est également connue pour son rôle dans le maintien de l'intégrité du cartilage et certaines études ont pu montrer qu'une irradiation à faibles doses (entre 0,5 et 2 Gy) du cartilage, engendre une diminution de l'expression de l'IL-1, conduisant à une dédifférenciation des chondrocytes et donc à une perte de l'intégrité du tissu cartilagineux (49).

- L'expression de l'**IL-6** (Interleukine-6) varie également après une exposition aux RI. D'ailleurs, des thérapies ciblées permettent d'inhiber la signalisation de cette cytokine en particulier, afin de limiter la radio-résistance de certains cancers. L'IL-6 a effectivement été identifiée comme jouant un rôle prépondérant dans la capacité des cellules souches de cancer pulmonaire à réparer leur ADN après une irradiation et à ainsi induire une forte radio-résistance du cancer des poumons, par l'intermédiaire de ses cellules souches (50). Aussi, l'IL-6 a été mise en évidence comme jouant un rôle dans la radio-résistance des ESC (cellules de carcinome épidermoïde œsophagien), *via* l'activation de la voie de signalisation IL-6/STAT3/TWIST, provoquant une TEM (Transition Épithélio-Mésenchymateuse) des cellules d'ESC, conduisant à une migration, une invasion et une radio-résistance accrues de ces cellules (51).
- Le **TGF-β** (Transforming Growth Factor) est une cytokine impliquée dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire, induisant la prolifération, la différenciation ou encore la mort des cellules. Des études ont mis en évidence que le TGF était à l'origine de la sur-expression de certains micro-ARN (miR) dans des cancers. C'est d'ailleurs le cas du miR-181a qui est retrouvé sur-exprimé dans les cancers du sein (52) ou encore dans le CHS (53).
- L'**IL-8** (Interleukine-8), est une cytokine qui est connue pour être exprimée au sein des cellules, après une irradiation. L'IL-8 a même été identifiée dans des études protéomiques comme une biomolécule particulièrement sensible aux RI. L'analyse du protéome salivaire de personnes après une irradiation corporelle totale a révélé une augmentation importante de son expression. Ces tests salivaires pourraient d'ailleurs se révéler utiles en cas d'accident nucléaire, en permettant notamment de détecter le degré d'exposition des personnes aux RI et ainsi adapter leur prise en charge, *via* un dosage de l'expression de l'IL-8 (54).
- Le **TNF** (Tumor Necrosis Factor) est l'une des cytokines principales de l'inflammation. Le TNF est relargué de façon massive par les cellules irradiées (46). En particulier, il a été montré que la protéine TNF était sur-exprimée dans 5 lignées cellulaires de sarcomes osseux après une exposition à des RI (55). Le TNF a également la capacité d'induire l'expression d'autres cytokines, telles que l'IL-6 (46).

II. 1. 6. 2. 2 Voies de signalisation radio-induites

Après une exposition à des RI, une cascade de réactions va se mettre en place au sein de la cellule irradiée, et induire notamment la propagation des signaux radio-induits, comme le montre la figure 19 (56).

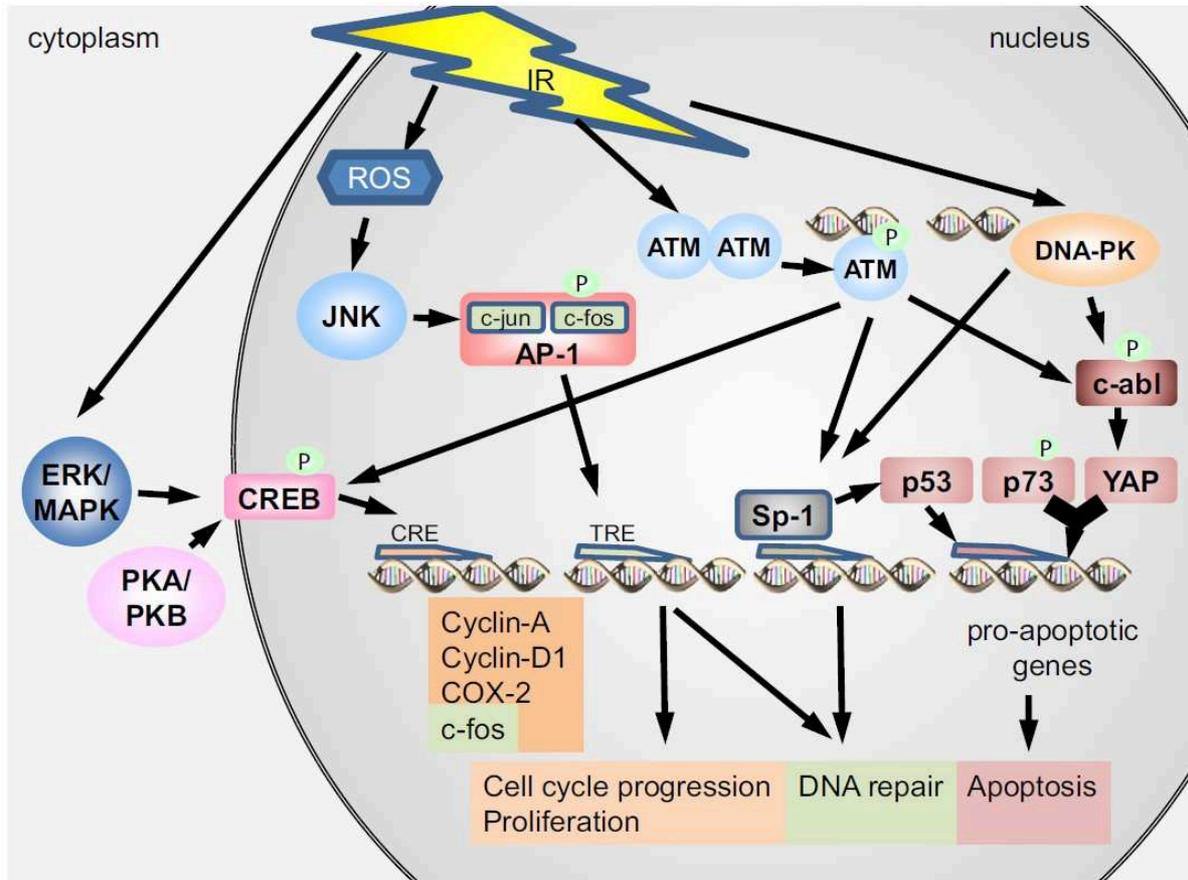


Figure 19 : Activation des facteurs de transcription et des voies de signalisation après une irradiation par des RI (56)

Les facteurs de transcription CREB (CAMP Responsive Element Binding protein), AP-1 (Activated Protein 1), Sp-1, p73, et YAP (YES-associated protein), après une exposition à des RI, vont activer les protéines kinases A (PKA) et B (PKB) ainsi que la voie ERK (Extracellular signal-Regulated) /MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) dans le cytoplasme des cellules irradiées. PKA/PKB, ERK/MAPK et ATM vont phosphoryler CREB qui, par translocation nucléaire, va se lier à CRE, afin d'exprimer des protéines pro-survie. ATM et DNA-PK peuvent phosphoryler c-abl (Abelson murine leukemia), qui active YAP. YAP phosphorylé agit avec p73 sur la stimulation de l'expression de gènes pro-apoptotiques. ATM et DNA-PK peuvent induire Sp1, qui agit comme pro-apoptotique, en induisant p53, ou comme pro-survie, par la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN, et

par l'induction de la réparation de l'ADN. Les ROS peuvent activer JNK qui induit la phosphorylation du complexe AP-1, initiant ainsi sa liaison à l'ADN aux gènes TRE. L'expression des gènes TRE entraîne l'induction de la réparation de l'ADN et promeut la progression de la cellule dans le cycle cellulaire.

On distingue plusieurs acteurs clés de cette signalisation cellulaire radio-induite, le tableau 3 résume les principaux facteurs activés après une exposition à des RI (56):

- **p53** est défini comme le gardien de l'intégrité génomique (57). C'est le point de contrôle clé dans la réponse aux dommages à l'ADN radio-induits. De nombreuses études, ont mis en évidence l'importance du statut p53 dans la radiosensibilité des cellules. En effet, les cellules au statut p53 muté sont plus radio-résistantes que les cellules p53 non-mutées, ce phénomène s'expliquant notamment par l'importance de p53 dans l'induction de la mort par apoptose des cellules irradiées (58).
- **NFκB** (Nuclear Factor κ B) est un facteur de transcription qui est impliqué dans la régulation de la survie cellulaire, des réponses immunitaires et de l'inflammation. Après une exposition à des RI, NF-κB est activé par ATM, lui-même activé par les DSB. Également, les cytokines et autres signaux émis par les cellules mourantes après irradiation peuvent activer NF-κB, *via* les TLR (Toll like receptor). Des études ont montré que, selon la dose d'irradiation, ou encore le tissu concerné, l'activation de NF-κB pouvait soit promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale induite et avoir un effet radio-sensibilisateur (59) soit induire la survie des cellules tumorales et donc leur radio-résistance aux traitements (60).
- **Nrf2** (Nuclear erythroid-derived 2 Related Factor2) est un facteur activé lors du stress oxydatif engendré par une exposition de la cellule à des RI. Il permet la mise en place de systèmes de défense antioxydants. Il a d'ailleurs été mis en relation que le niveau d'expression basal de Nrf2 jouait un rôle fondamental dans la radio-résistance des cellules : plus Nrf2 est exprimé, plus les cellules luttent efficacement contre le stress oxydatif radio-induit (61).
- **CREB** est un facteur de transcription nucléaire activé par phosphorylation et qui, en se liant au facteur CRE, va induire la transcription de gènes responsables de la survie et de la prolifération des cellules. Des travaux ont d'ailleurs souligné le rôle clé de CREB dans la survie des cellules érythroleucémiques après une exposition à des RI suggérant l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques contre CREB pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie de ce cancer (62).
- **AP-1** (Activated Protein 1) est un facteur de transcription formé par homo- ou hétéro-

dimérisation de protéines de la famille Jun, ou de la famille Fos. Ce facteur, activé lors d'un stress oxydatif, entraîne sa liaison à l'ADN et conduit à l'activation de gènes pro-apoptotiques, ou encore de prolifération cellulaire (63).

- **Sp1 (Specificity Protein 1)** est un facteur de transcription exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules et qui est activé par phosphorylation *via* ATM en réponse aux RI. Des études ont démontré l'importance de ce facteur dans la capacité des cellules à réparer des DSB de l'ADN et notamment pour son rôle dans la signalisation des sites spécifiques de ces lésions. En effet, Sp1 est rapidement recruté dans la région immédiatement adjacente aux sites de DSB de l'ADN et est requis pour la réparation de ces dommages. D'ailleurs la déplétion de Sp1 inhibe la réparation des DSB de l'ADN (64).
- **EGR-1 (Early Growth Response 1)** est un facteur de transcription activé par les ROS après une exposition à des RI. EGR-1 est connu pour son rôle anti-prolifératif et pro-apoptotique sur les cellules tumorales (65).

Experimental model	Radiation quality	Dose	Method	Effect
p53				
H1299 (originally p53 null)	X-rays	2-5 Gy	Colony-forming ability (CFA) assay, acridine orange/ethidium bromide staining, Western blot, quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR)	Wildtype p53 cells: higher sensitivity compared to p53 null or mutated p53 cells
	¹³⁷ Cs 290 MeV/u	2-5 Gy		Low LET radiation ⇒ p53-dependent apoptosis High LET ⇒ p53-independent apoptosis
A549, AGS, and MCF-7	X-rays	0-12 Gy	RT-qPCR, Western blot, flow cytometry, luciferase reporter assay, CFA assay	miR-375 overexpression ⇒ p53 expressions ↓
	Etoposide	0-100 μM		Radiosensitivity ↓
HCT116 (colorectal cells) p53 wt and ko cells	X-rays	0-8 Gy	Viability assay (transwell co-culture), micronuclei and apoptosis evaluation, beta-galactosidase staining, RT-qPCR	Low doses: no difference between cell lines
				Higher doses: significant differences, e.g., micronuclei ↑ and apoptotic cells ↑ in p53 ^{-/-} cells, p53 ^{+/+} : high levels of senescence
Lung epithelial cells	α-particles (²³⁹ Pu) X-rays	0-1.2 Gy 0-2.5 Gy	Flow cytometry	p53 expression levels ↑
HCT116	¹³⁷ Cs 290 MeV/u	0-3 Gy	CFA assay, flow cytometry, immunofluorescence	X-rays ⇒ higher sensitivity and apoptosis ↑ in p53 ^{+/+} cells
	X-rays	0-8 Gy		C-ions ⇒ no difference of sensitivity (mitotic catastrophe ↑ in p53 ^{-/-} cells, apoptosis ↑ in p53 ^{+/+} cells)
NF-κB				
Human, mouse, rat, hamster normal, transformed and tumor cell lines and primary cells, animal models (rat, mouse)	X-rays, γ-radiation, protons, α-particles, Fe ions, C ions, Ar ions	0.05-100 Gy	EMSA, Western blot, immunofluorescence, reporter assays, oligonucleotide enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	Dose, cell line/cell type, and radiation quality-dependent activation
Nrf2				
NIH-3T3 MCF7-AREc32 Embryonic fibroblasts from wt and Nrf2 ko mice	γ-radiation ¹³⁷ Cs source	2-8 Gy, 10 Gy	Luciferase assay, RT-qPCR, Western blot, CFA assay, ROS measurement (H ₂ DCFH-DA)	No short-term activation of Nrf2 activation Late activation of Nrf2 Nrf2 activation after fractionated irradiation
PC3 and DU145 prostate cancer cell lines	γ-radiation ⁶⁰ Co source	1-10 Gy 4 and 8 Gy	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA), RT-qPCR Knockdown (kd) of Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) expression using short hairpin RNA (shRNA)	Differences in basal Nrf2 expression determine resistance to irradiation High basal Nrf2 activity ⇒ Nrf2 activity ↑, target gene expression ↑ (DU145 cells) ⇒ higher radioresistance than PC3 cells Knockdown of Nrf2 ⇒ cell death ↑
Murine T-cell lymphoma cell line EL-4	γ-radiation ⁶⁰ Co source	4 Gy	shRNA-kd, RT-qPCR, EMSA	ERK and Nrf2 interact in radioresistance of EL-4 cells
Dermal fibroblasts from wt mice and Nrf2 and Keap1-KO mice	UV-A-UV-B radiation	10.000 mJ/cm ²	Western blot, immunofluorescence, flow cytometry	UV-A, but not UV-B, induces Nrf2 activity, cellular survival depends on Nrf2
C57BL/6, CD-1, and SJL/C57BL/6 CD45.1 mice	γ-radiation	6.9, 7.0, 7.1, 7.25, 7.3, 10 Gy TBI	RT-qPCR	Interplay between Nrf2 and Notch signaling, Nrf2 mediates Notch signaling and increases hematopoietic stem cell function
<i>Mx-Cre-Keap1^{flloxlox}</i>	¹³⁷ Cs source			
<i>GMVCre-Keap1^{flloxlox}</i>	¹³⁷ Cs ⁺ ions	2 Gy	RT-qPCR of Nrf2 downstream genes NAD(P)H quinine oxidoreductase 1 (NQO1), HO-1, gamma-glutamyl cysteine synthetase (γ-GCS), immunofluorescence, Western blot	NQO1, HO-1, γ-GCS ↑ in curcumin-pretreated mice
<i>Keap1^{flloxlox}</i> mice				
HCEC CT7s cells (immortalized colon epithelial cells)	γ-radiation ¹³⁷ Cs source (cells)	4-5 Gy	Immunohistochemistry, Western blot, subcellular fractionation, immunofluorescence, assay for chromosomal aberrations at metaphase, shRNA against Nrf2, DNA fiber assay, ChIP qPCR	Nrf2 enhances DDR and reduces number of DNA DSB
C57BL/6 wt mice	X-rays (mice)	7.5-10 Gy TBI		Nrf2 ⇒ 53BP1 expression ↑
EA.hy926 and HMVEC cells	Photons from linear accelerator	0, 0.3, 0.5, 0.7, 1 Gy	RT-qPCR, flow cytometry, Western blot, enzyme activity of glutathione peroxidase, EMSA	Non-linear activation of Nrf2 and target genes Nrf2 activation prior to irradiation ⇒ cell adhesion ↑ Nrf2 expression and binding to DNA lowest at 0.5 Gy
CREB				
Human U1-Mel cell line	⁶⁰ Co γ-rays	4.5 Gy	EMSA with nuclear extracts	CREB DNA binding ↑
Jurkat leukemic T cell line	10 MV X-rays	1.5 and 6 Gy	Western blot	CREB phosphorylation ↑
K562 erythroleukemia cells	10 MV X-rays	1.5 and 15 Gy	Western blot	CREB phosphorylation ↑
Chinese Hamster V79 cells	¹³⁷ Cs ⁺ ions	0.1 and 1 Gy	Western blot	p44/42 MAPK ↑
AG1522 human diploid skin fibroblasts	α-particles (²³⁹ Pu source)	0.01, 0.05, and 0.10 Gy	Western blot	p38 MAPK and ERK 1/2 ↑
AP-1				
AG1522 human diploid skin fibroblast	α-particles (²³⁹ Pu source)	0.003 and 0.006 Gy	EMSA	AP-1 DNA-binding activity ↑
MRC5CV1 normal human fibroblasts	¹³⁷ Cs γ-rays	20 Gy	Western blot EMSA	c-jun phosphorylation ↑ AP-1 DNA-binding activity ↑
ROS 17/2.8 osteoblasts	X-rays	5 Gy	EMSA with supershift	AP-1 DNA-binding activity ↑
Spontaneously immortalized human breast epithelial cell line MCF-10F	α-particles, LET 150 keV/μm	6 and 1.2 Gy	Northern blot and immunochemical protein staining	c-jun, c-fos, FRA1 RNA, and protein expression ↑
C57BL/6J mice	⁵⁶ Fe ions, 1000 MeV/n, LET 148 keV/μm	1.6 Gy	SOD 1/2 and catalase activity, NADPH oxidase activity assay and immunohistochemistry of p-H3	SOD 1/2, catalase, NADPH oxidase and mitogenic activity ↑
Sp1				
Normal human diploid fibroblasts	6 MV X-rays	0.5, 2.5, 5, 10, 20, 40 Gy	Western blot	Sp1 expression and phosphorylation ↑
U1-Mel cells	¹³⁷ Cs γ-rays	3 and 4.5 Gy	EMSA and Western blot	Sp1 DNA binding and phosphorylation ↑
H1299	α-particles, LET 123 keV/μm	1 Gy	IPA upstream regulator analysis	Sp1 network involvement
Normal human fibroblasts (HFL 3)	C ions, 290 MeV/n, LET 70 keV/μm Fe ions, 500 MeV/n, LET 200 keV/μm	2 Gy	PCC assay and immunofluorescence	DNA-PKc autophosphorylation ↑
EGR-1				
Isolated lymphocytes	Na ²¹¹ At α-particles	0.05-1.6 Gy	RT-qPCR	EGR-1 gene expression ↑
Prostate cancer cells PC-3	100 kV X-rays	5 Gy	Western blot	Protein induction ↑
Human HL 525 myeloid leukemia cells	¹³⁷ Cs γ-rays	20 Gy	Western blot	Protein expression ↑

Tableau 3 : Facteurs de transcription activés après une exposition à des RI (56)

II. 1. 7 Morts cellulaires radio-induites

Le type de mort cellulaire après une exposition à des RI dépend de plusieurs facteurs. En effet, la phase du cycle cellulaire dans lequel se trouvent les cellules, au moment de l'irradiation, est primordiale. De même, le statut p53 des cellules va jouer un rôle dans l'induction de leur mort. Il existe 5 types de mort cellulaire radio-induites décrits dans la littérature (66).

II. 1. 7. 1 Mort immédiate

Elle survient de quelques minutes à quelques heures, après une exposition à forte dose de RI. La mort immédiate est considérée comme une forme de suicide cellulaire. Ce type de mort est lié à une hyper-activation de PARP-1 (PolyADP-Ribose Polymérase). Ainsi, on observe dans les cellules touchées une perte de leur intégrité membranaire des cellules, et une désintégration des organites cellulaires, conduisant ainsi, à la mort rapide des cellules irradiées.

II. 1. 7. 2 Sénescence

L'arrêt en G1 n'est pas observé dans les cellules au statut p53^{-/-} (tumorales). Toutefois, dans les cellules au statut p53^{wt,+/+} (normales), il peut devenir irréversible. On parle alors d'induction de la sénescence. Les cellules en sénescence perdent toute capacité répliquative. Ce mécanisme permet ainsi de bloquer les cellules qui auraient incomplètement réparé leurs dommages à l'ADN, induits lors d'un stress. Ce phénomène constitue un rempart efficace contre la formation de tumeurs.

II. 1. 7. 3 Mort mitotique

Ce type de mort est lié à la perte de la faculté d'accomplir avec succès une mitose symétrique. Elle est retrouvée dans les cellules ayant subi de nombreuses lésions chromosomiques non réparées, et caractérisées par l'apparition de cellules bi-nuclées et de MN (micro-noyaux). Ces MN sont éliminés par exocytose conduisant ainsi à la perte d'une partie du matériel génétique des cellules. La mort mitotique est le mécanisme de mort prépondérant dans les cellules au statut p53 muté (tumorales). Les cellules en mort mitotique présentent un gonflement de leur cytoplasme et une perméation de leur membrane plasmique.

II. 1. 7. 4 Apoptose

Elle se développe en 6 à 72 heures après une exposition à des RI. Elle permet le maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire le maintien de l'équilibre croissance/prolifération. Ce n'est pas le type de mort prédominant des cellules tumorales, contrairement à la mort mitotique, que l'on constate après une exposition à des RI. Toutefois elle peut être induite par certaines cytokines radio-induites comme le TNF. Ce type de mort se caractérise par une activation du protéasome cellulaire et la perte de l'intégrité mitochondriale. S'en suit une cascade de réactions au sein de la cellule (fuite de cytochrome C, activation des caspases...) conduisant à la fragmentation de l'ADN génomique puis à la formation de petites vésicules, nommées « corps apoptiques », qui seront ensuite éliminées par phagocytose.

II. 1. 7. 5 Autophagie

Cette mort se caractérise par un processus d'involution de plusieurs organites cellulaires (Golgi, réticulum endoplasmique et mitochondrie). Ce mécanisme de mort permet à la cellule de s'adapter à une privation de ressources métaboliques. Elle résulte d'un programme coordonné, comme pour l'apoptose. Cependant, durant le processus d'autophagie, le cytosquelette est préservé, tandis que les mitochondries sont dégradées. Elle peut conduire à la mort cellulaire après une exposition à un stress oxydatif important, de la même façon que la mort immédiate.

Les dommages radio-induits, sont dépendants du type d'irradiation utilisé ; il semblerait ainsi que l'utilisation des ions-carbone permette d'augmenter les lésions des cellules irradiées.

II. 2 Hadronthérapie : les ions-carbone

II. 2. 1 Historique

C'est en 1946 que le physicien Dr. Robert R. Wilson, qui travaillait sur le développement des accélérateurs à particules, proposa l'utilisation des protons pour la thérapie des cancers (67). Moins de 10 ans après cette découverte, les premiers patients atteints de cancers ont été traités par des protons. Entre 1977 et 1992, au laboratoire Lawrence Berkeley (Californie), a eu lieu la première expérience clinique concernant des tumeurs de la base du crâne traitées à l'aide d'ions hélium et carbone (68). Les résultats ont été très encourageants. Ainsi, le traitement par les ions a gagné un intérêt croissant et de nombreux centres de traitement se sont développés un peu partout dans le monde. L'hadronthérapie est devenue une technique innovante de radiothérapie, utilisant un faisceau de particules pour irradier les cellules tumorales. Les hadrons incluent les neutrons, les protons et surtout les ions (néon, hélium, carbone...). L'intérêt de ces particules, par rapport aux photons et électrons utilisés en routine, réside dans leurs propriétés physiques et biologiques. En effet, ces faisceaux de particules combinent plusieurs avantages par rapport aux photons :

- une plus grande précision balistique,
- un dépôt de dose localisé (pic de Bragg),
- un effet radiobiologique supérieur à dose équivalente.

II. 2. 2 Notion de TEL et EBR

II. 2. 2. 1 TEL : Transfert d'Énergie Linéique

Le TEL (Transfert d'Énergie Linéique) d'une particule chargée dans un milieu correspond au rapport dE/dl . dE représente l'énergie moyenne déposée par la particule qui traverse une distance (dl) dans ce milieu défini. Le TEL, s'exprime en $keV/\mu m$, l'eV étant l'énergie acquise par un électron accéléré depuis le repos par une différence de potentiel d'un volt ($1 eV = 1,60217653 \times 10^{-19}$ joule). Cette valeur du TEL est une quantité moyennée car, à l'échelle microscopique, le dépôt d'énergie peut varier le long du trajet d'une particule. Le TEL reflète et permet de quantifier la densité d'ionisation d'une particule donnée d'énergie connue et, de ce fait, la capacité à produire des dommages biologiques. En radiobiologie, les RIs sont classés en rayonnement de bas TEL (quelques $keV/\mu m$), à faible densité d'ionisation, et en rayonnement de haut TEL (vingtaine jusqu'à

plusieurs centaines de keV/ μm) dont la densité d'ionisation est élevée le long du trajet. Cette valeur est proportionnelle au carré de la charge de la particule incidente et inversement proportionnelle au carré de sa vitesse (66).

La notion de TEL, et la densité d'ionisation de l'ADN qui en découle, permet d'introduire le concept d'efficacité biologique relative (EBR), très utilisée en hadronthérapie.

II. 2. 2. 2 EBR : Efficacité Biologique Relative

Quel que soit le RI utilisé, la dose délivrée dans la matière se mesure en Gray (Gy). Toutefois, il est nécessaire de connaître, en plus de la dose utilisée pour le traitement, la nature du RI afin de prédire les effets biologiques induits. En effet, en fonction de la nature du RI, les particules peuvent être plus ou moins efficaces pour produire une lésion. L'efficacité biologique relative (EBR) permet de préciser l'aptitude d'un rayonnement à produire un effet biologique précis. L'EBR d'un rayonnement à étudier (« test ») comparé à un rayonnement de référence (« réf ») est définie comme le rapport des doses absorbées, $D_{\text{réf}}$ et D_{test} , nécessaire pour produire un effet biologique (66).

On a donc : $EBR = D_{\text{réf}} / D_{\text{test}}$

L'EBR est une valeur expérimentale qui doit être rapportée à une dose donnée et à un effet biologique dont la nature et le niveau sont précisés. En général, l'EBR de référence classiquement utilisé est celui des rayons-X. L'EBR augmente avec le TEL pour atteindre une valeur maximale aux environs de 100 keV. μm^{-1} . A des TEL plus élevés, l'EBR redescend.

II.2. 2. 3 Étude de la survie cellulaire

Il existe différentes valeurs qui permettent d'étudier la survie des cellules après une exposition à des RI :

- La D10 qui est la dose à laquelle on observe 10% de survie.
- La SF2 (*Survival Fraction 2 Gy*) qui donne le pourcentage de cellules vivantes suite à une irradiation à 2 Gray.

Ces valeurs sont le reflet de la survie cellulaire et peuvent être modélisées par un modèle mathématique appelé modèle linéaire quadratique, également connu sous le nom de « courbe de survie avec épaulement », utilisé pour les irradiations par rayons X (69). Ce modèle a pour équation : $-\text{Ln}(S) = \alpha D + \beta D^2$

S : correspond à la fraction de cellules survivantes

D: correspond à la dose physique en Gy

α : correspond à la valeur des cibles létales du rayonnement *via* des cassures au niveau de la molécule d'ADN

β : correspond à la valeur des événements sublétaux *via* la création de radicaux libres suite à une interaction avec les molécules d'H₂O contenues dans la cellule. Du fait de l'électron libre à la surface d'un de leurs atomes, ces radicaux libres vont déclencher l'oxydation de nombreuses molécules et ainsi entraîner une accélération du vieillissement cellulaire, mais également la saturation des systèmes de réparation.

Le ratio α/β définit la dose pour laquelle αD et βD contribuent à part égale dans la létalité radio-induite.

Pour étudier la survie cellulaire de RI de haut TEL (ions-carbone par exemple), contrairement aux rayons-X, c'est un modèle linéaire qui est utilisé (Figure 20) (70).

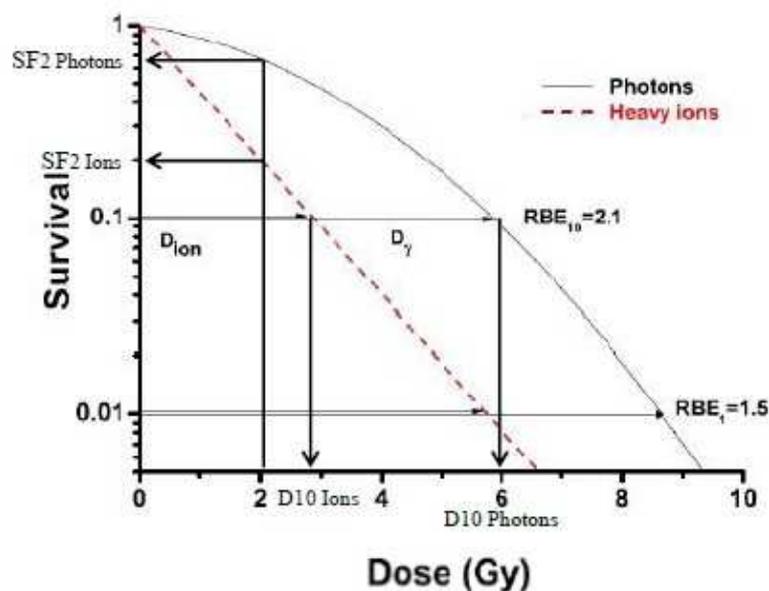


Figure 20 : Courbes de survie après une irradiation par photons ou par ions lourds (70)

II. 2. 3 Propriétés physiques et biologiques des ions-carbone

L'intérêt fondamental des ions-carbone est de pouvoir combiner précision balistique et efficacité biologique. En effet, comparativement à des traitements par radiothérapie conventionnelle (utilisant des photons par exemple), les ions carbone vont permettre d'épargner au maximum les tissus sains environnant la tumeur, mais aussi d'induire des dommages plus délétères au niveau de la tumeur (71).

II. 2. 3. 1 Propriétés physiques des ions-carbone

L'utilisation des ions-carbone permet les mêmes avantages balistiques que les protons, comme le montre la figure 21 qui permet de comparer, la diffusion latérale et la queue de fragmentation pour des faisceaux d'ions ^{12}C de 195 MeV, 281 MeV et 392 MeV, et de protons de 103 MeV, 147 MeV et 204 MeV (72).

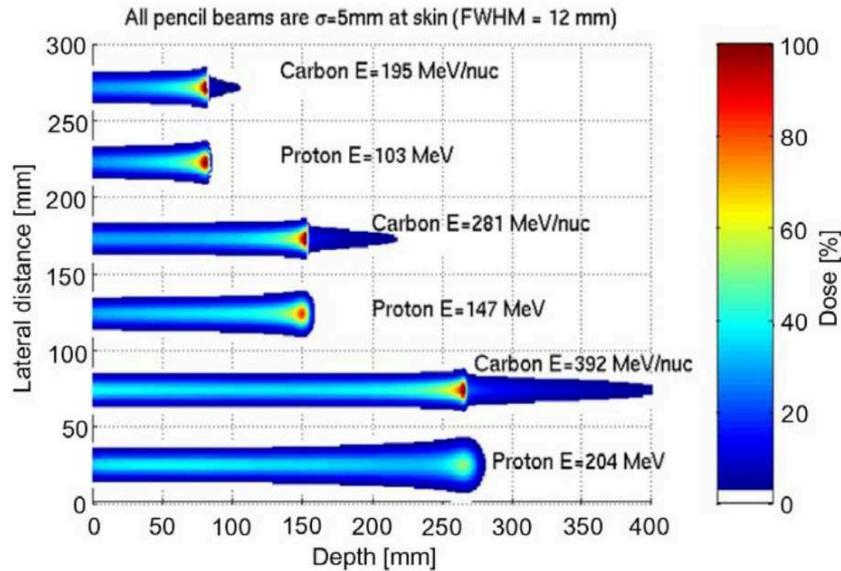


Figure 21 : Schéma présentant les avantages balistiques des hadrons (72)

En plus de cette précision balistique, les ions-carbone permettent, par leur distribution de doses en profondeur, un dépôt de dose localisé, qui se caractérise par l'existence d'un plateau et d'un pic très étroit en fin de parcours nommé pic de Bragg. La profondeur du pic de Bragg dans les tissus dépend de l'énergie et peut être ajustée en fonction de la profondeur de la tumeur à irradier. Il est possible d'étaler ce pic de Bragg par superposition de plusieurs pics de Bragg, de différentes énergies et de moduler leur intensité pour une répartition homogène du dépôt de doses. On obtient alors un SOBP (Spread Out Bragg Peak) qui permet notamment de traiter en profondeur les tumeurs de grand volume (Figure 22) (73). La balistique des photons ne permet pas de protéger les tissus sains en amont et en aval de la tumeur. A l'inverse, les protons et les ions carbonés vont permettre une meilleure irradiation du volume cible (la tumeur) tout en limitant l'irradiation des tissus sains permettant notamment une diminution du risque de cancer radio-induit (74).

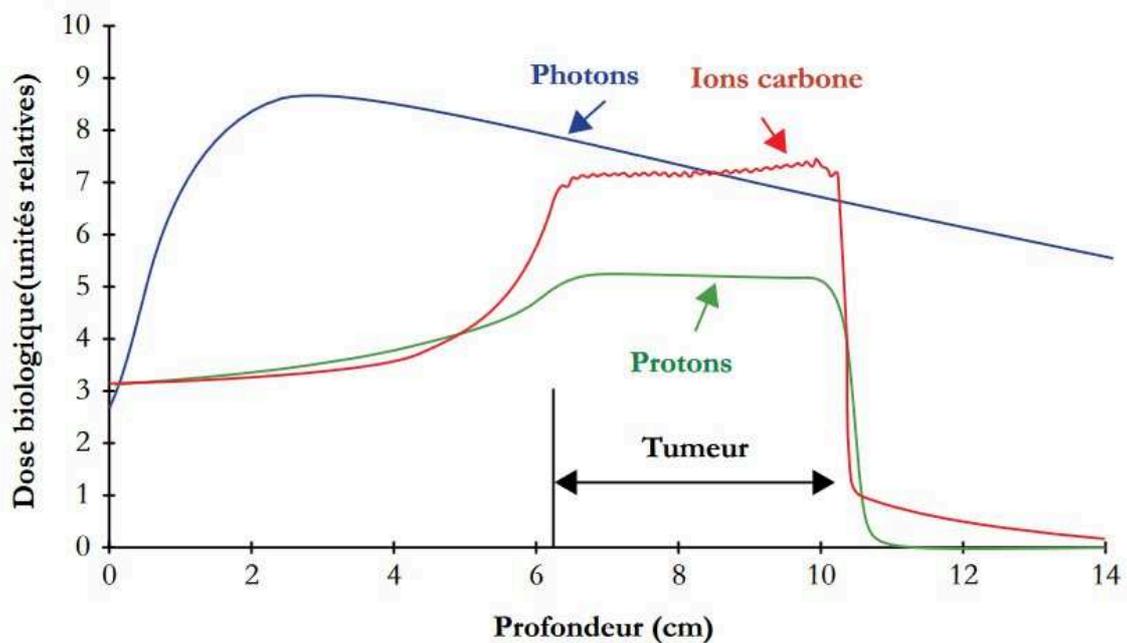


Figure 22 : Effet biologique relatif des photons, protons et ions carbone (73)

II. 2. 3. 2 Propriétés biologiques des ions carbone (EBR)

Les ions-carbone sont des particules de haut TEL. Ainsi, lorsqu'ils pénètrent dans les tissus, ils sont progressivement ralentis et leur TEL augmente. Leur effet biologique se manifeste au niveau du pic de Bragg, à la fin de la trajectoire des ions, et non dans le faisceau d'entrée. C'est pourquoi la tumeur qui se trouve au niveau du pic de Bragg est exposée à un rayonnement de haut TEL, alors que les tissus sains, situés au niveau du plateau, sont exposés à un rayonnement de bas TEL.

Les rayonnements de haut TEL ont une meilleure EBR, c'est-à-dire que pour une même dose, l'effet biologique est plus important (75). L'EBR des ions carbone est de 1,5 à 3, il est supérieur à l'EBR des protons (en moyenne 1,1) pour une même dose physique délivrée (76) (77). De plus, les ions-carbone sont plus efficaces sur les cellules cancéreuses évoluant dans un environnement hypoxique que les photons (78) (79).

II. 2. 4 Les ions-carbone dans le monde

C'est au Japon que les premiers centres médicaux dédiés au traitement des cancers par ions-carbone ont vu le jour en 1994, plus précisément à Chiba, au NIRS (National Institute of Radiological Sciences). En Europe, il faudra attendre 2009 pour que le centre allemand HIT (Heidelberg Ion-Beam Therapy Center) ouvre ses portes pour traiter des patients par ions carbone.

Puis, progressivement, de nombreux centres se sont ouverts un peu partout dans le monde comme on peut le voir décrit dans le tableau 5. Les onze premiers centres qui apparaissent dans ce tableau sont actuellement en fonctionnement, les six derniers (en italique) sont en cours de construction ou de mise au point.

Pays	Site	Début des traitements
Autriche	MedAustron, Wiener Neustadt	2017
Chine	IMP-CAS, Lanzhou	2006
Chine	SPHIC, Shanghai	2014
Allemagne	HIT, Heidelberg	2009
Allemagne	MIT, Marburg	2015
Italie	CNAO, Pavia	2012
Japon	HIMAC, Chiba	1994
Japon	HIBMC, Hyogo	2002
Japon	GHMC, Gunma	2010
Japon	SAGA-HIMAT, Tosu	2013
Japon	i-Rock Kanagawa Cancer Center, Yokohama	2015
<i>Chine</i>	<i>HITFil at IMP, Lanzhou, Gansu</i>	<i>2018</i>
<i>Chine</i>	<i>Heavy Ion Cancer Treatment Center, Wuwei, Gansu</i>	<i>2018</i>
<i>Japon</i>	<i>Osaka Heavy Ion Therapy Center, Osaka</i>	<i>2018</i>
<i>Japon</i>	<i>Yamagata University Hospital, Yamagata</i>	<i>2018</i>
<i>Corée du Sud</i>	<i>KIRAMS, Busan</i>	<i>2019</i>
<i>France</i>	<i>ARCHADE, Caen</i>	<i>2020</i>

Tableau 4 : Centres de traitement par ions carbone dans le monde, d'après <https://www.ptcog.ch> mis à jour en avril 2018.

Le centre ARCHADE (Advanced Resource Center for HADrontherapy in Europe), en France, traite actuellement des patients par protonthérapie et qu'il est aussi un centre de recherche technologique en carbonothérapie dans le but de traiter également des patients par ions carbone.

Le nombre de patients traités a lui aussi augmenté d'année en année (Tableau 6).

Année	Total des patients traités par ions carbone
2007	4450
2008	5342
2009	5582
2010	7101
2011	9283
2012	10753
2013	13119
2014	15736
2015	19376
2016	21580

Tableau 5 : Nombre de patients traités par ions-carbone dans le monde de 2007 à 2016 d'après : <https://www.ptcog.ch>

II. 2. 5 Indication pour l'hadronthérapie par ions carbone

Aujourd'hui, l'hadronthérapie par ions-carbone est principalement destinée au traitement des tumeurs inopérables, ou incomplètement résécables et radiorésistantes, entourées de tissus sains radiosensibles. En effet, ces éléments sont limitants lors de traitement par radiothérapie conventionnelle.

Actuellement, il existe une liste de cancers dont le traitement par ions carbone est pertinent (80) :

- Carcinomes adénoïdes cystiques ;
- Tumeurs des sinus de la face et des glandes salivaires ;
- Mélanomes muqueux ;
- Chordomes et **chondrosarcomes** de la base du crâne ;
- Sarcomes du squelette axial et des tissus mous, non résécables ou en résection incomplète ;
- Récidives locales non résécables des cancers du rectum ;
- Hépatocarcinomes de grande taille (diamètre supérieur à 4-5cm) ;
- Mélanomes choroïdes et tumeurs oculaires ;
- Tumeurs de la prostate ;
- Tumeurs du col de l'utérus ;
- Tumeurs pulmonaires non à petites cellules de stade I.

Ainsi ces pathologies forment un groupe hétérogène pour lequel de nombreuses approches

thérapeutiques sont possibles (chirurgie et/ou radiothérapie et/ou chimiothérapie). L'absence de protocole standardisé rend assez difficile la comparaison des résultats cliniques entre différentes institutions. De plus, des réponses variables sont observées en fonction du tissu concerné et des critères biologiques et cliniques.

II. 2. 6 Ions-carbone et CHS

Une étude allemande, menée par le Dr Schulz-Ertner (18), portant sur 54 patients atteints de CHS de la base du crâne traités de 1998 à 2005, a montré des résultats très encourageants sur le traitement des CHS par les ions carbone. En effet, le taux de contrôle local à 4 ans a été de 98,2% et le taux de survie globale à 5 ans a été de 98,2 %. Un patient a développé une mucosite de grade 3. Il a été rapporté 5 cas (9 %) de toxicités tardives de grade 1-2 et 1 cas de toxicité tardive de grade 3 (1,8 %).

Plus récemment une étude menée par le Dr Imai R. (81) portant sur le traitement par ions carbone de 73 patients atteints de différents CHS non résécables, a montré des résultats encourageants.

Les CHS étaient retrouvés :

- 38 au bassin (iliaque / pubien / ischion)
- 26 sur la colonne vertébrale (col de l'utérus / thorax / bois d'oeuvre / sacrum)
- 9 CHS de diverses localisations (sternum, fémur...).

Le contrôle local à 5 ans, la survie globale et l'absence de maladie étaient de 53 %, 53 % et 34 % respectivement. Ainsi, en connaissant la radiorésistance des CHS ainsi que leur chimiorésistance (82), l'utilisation des ions carbone semble être une option pertinente dans le traitement des CHS non résécables.

Toutefois, il est nécessaire d'en savoir davantage sur les effets non ciblés induits lors de ces traitements, connus sous le nom d'effet bystander.

III. Effet bystander

III. 1. Mise en évidence de l'effet bystander

La première étude, ayant permis de mettre en évidence la libération de facteurs solubles, après une exposition à des RI, date de 1922. Des sérums provenant d'animaux irradiés mis en contact avec des cellules lymphoïdes induisent une augmentation de la croissance de ces dernières (83). A cette époque, cet effet n'était pas encore bien défini et les auteurs décrivaient seulement un effet se produisant des cellules irradiées vers les cellules non irradiées. Le terme «bystander» n'était pas encore utilisé. Parmi les études préliminaires sur ce phénomène, les expériences du Dr. Nagasawa et du Dr. Little, menées en 1992, portaient sur l'induction après irradiation des échanges de chromatides sœurs (SCE) de cultures de cellules ovariennes de hamsters. Les cellules étaient exposées à un flux très bas de particules- α (0,31 mGy), tel que seulement 0,1 à 1% des cellules étaient irradiées. Cela a eu comme conséquence une augmentation des SCE pour 20 à 40% des cellules de la population. Tandis qu'habituellement, une dose de 2 Gy était nécessaire pour induire un résultat similaire de SCE avec une irradiation par rayons-X. Ces résultats ont ainsi pu mettre en évidence, que les dommages génétiques peuvent être induits par de très faibles doses de rayonnements, dans les cellules qui n'ont pas été traversées par des particules- α (84). D'autres équipes ont confirmée ultérieurement ces conclusions, notamment sur des fibroblastes humains (85). En effet, comme le montre le tableau 6, on peut voir que le nombre de particules- α qui traversent les noyaux des cellules n'est pas proportionnel au pourcentage de cellules montrant des SCE. Ces expériences démontrent une nouvelle fois que de faibles doses de RI peuvent induire des dommages génétiques aux cellules directement irradiées mais également aux cellules qui n'ont pas été traversées par des particules- α .

Alpha-particle dose (cGy)	Average number of α particles/nucleus	Percentage of cells receiving one or more nuclear hits	Percentage of cells showing excessive SCEs
1.8	0.129	12.1	36.4
2.3	0.173	15.9	44.6
3.6	0.267	23.4	47.4
5.7	0.420	34.3	37.7
6.2	0.461	36.9	53.2
8.4	0.620	46.2	56.4
12.9	0.955	61.5	38.1

Tableau 6 : Comparaison du nombre de cellules irradiées et du nombre de cellules montrant des SCE (85)

D'autres études ont mis en évidence la formation de micro-noyaux ou encore l'induction de l'apoptose dans les cellules bystander (86) (87). Aujourd'hui, le nombre d'études portant sur l'effet

bystander est en constante augmentation : on dénombre plus de 1300 articles sur Pubmed résultant de la recherche des termes « bystander radiation ». Ainsi une définition précise de ce phénomène secondaire à une irradiation a pu être établie.

III. 2. Définition de l'effet bystander

Après la découverte de l'effet bystander, plusieurs définitions ont été proposées concernant ce phénomène, comme le montre le tableau 7 issu de la revue du Dr. Blyth, publiée en 2011 (88). On peut remarquer une grande différence d'interprétation de ce phénomène et, notamment, concernant la relation entre les cellules irradiées et non irradiées. En effet, certaines études ne précisent pas la distance qui existe entre les cellules irradiées et les cellules bystander. D'autres parlent d'un effet exclusivement observé entre cellules voisines. Enfin, certains suggèrent un effet qui pourrait se propager loin de la zone d'irradiation.

Bystander effect definition
...the induction of biological effects in cells that are not directly traversed by a charged particle, but are in close proximity to cells that are.
...biologic responses in cells that were not traversed by an ionising radiation track and, thus, not subject to direct energy deposition; that is, the responses occur in nonirradiated cells. These bystander effects take place in the neighbours of irradiated cells or in other nonirradiated cells that have received secreted signals from irradiated cells.
...effects occurring in cells that were not traversed by radiation but were induced by signals from irradiated cells.
Bystander cells in exposed cell populations can be described as the non-irradiated cells that have received signals from neighbouring or distant irradiated cells.
...[a] response, in which non-exposed cells neighbouring an exposed cell respond.
...damage that occurs in cells that were not traversed by radiation but were in the same radiation environment; i.e., they were "bystanders" at the time of irradiation.
...the ability of cells affected by an agent to convey manifestations of damage to other cells not directly targeted by the agent or necessarily susceptible to it <i>per se</i> .
...cells exhibiting responses typically associated with direct radiation exposure but occurs as a consequence of contact with irradiated cells or by receiving soluble signals from irradiated cells.
In the radiation field, it has come to be loosely defined as the induction of biological effects in cells that are not directly traversed by a charged particle, but are in close proximity to cells that are.
...radiation-induced effects in unirradiated cells.
...the occurrence of damage in cells that were not directly hit by radiation.
...the detection of responses in unirradiated cells that can reasonably be assumed to have occurred as a result of exposure of other cells to radiation.

Tableau 7 : Définition de l'effet Bystander proposée dans différentes revues (88)

Ainsi, on voit bien toute l'importance de définir plus précisément ce que l'on nomme effet bystander. Notamment en distinguant les effets secondaires induits après une exposition à des RI. La figure 23 permet de différencier ces effets radio-induits.

Dans le premier scénario (*Figure 23 A*), l'auteur décrit l'effet bystander comme un phénomène se produisant d'une cellule irradiée vers une cellule non irradiée voisine. Il distingue cet effet bystander de l'effet abscopal (*Figure 23 B*), qui correspond à un effet provoqué sur une plus longue distance d'un tissu irradié vers un autre tissu non irradié, notamment *via* les grands circuits de communication de l'organisme, comme les vaisseaux sanguins. Enfin l'auteur décrit un troisième

effet, de cohorte (*Figure 23 C*) qui correspond à une propagation des signaux après une irradiation mais uniquement entre cellules irradiées.

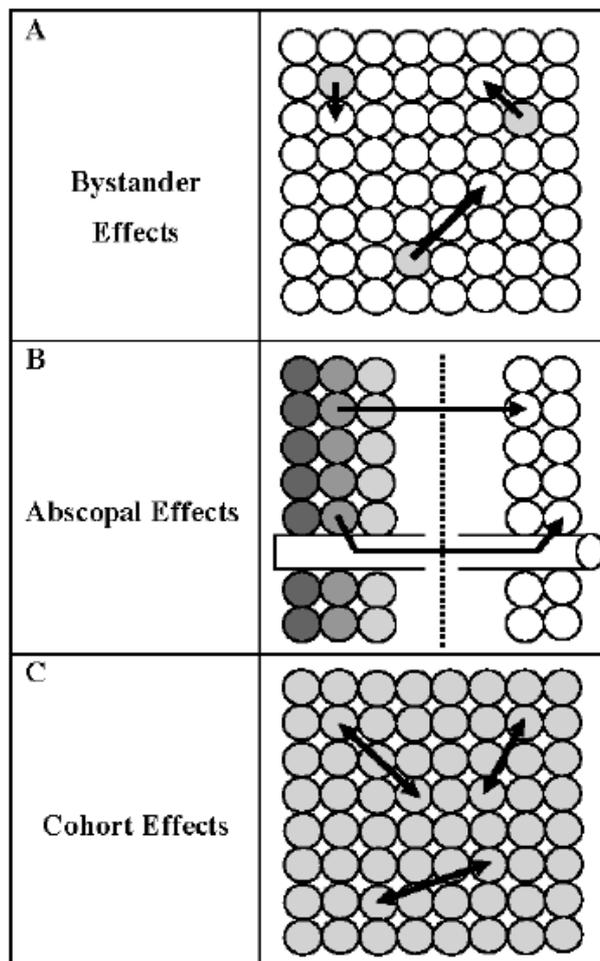


Figure 23 : Les différents scénarios pouvant être observés après une exposition à des RI (88)

Finalement, on note trois points essentiels qui définissent l'effet bystander radio-induit :

- c'est un phénomène qui se produit d'une zone irradiée vers une zone non irradiée ;
- au voisinage, à proximité de la zone irradiée ;
- et qui produit des effets similaires à ceux observés après une exposition à des RI.

III. 3. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'effet bystander

III. 3. 1 Mécanismes cellulaires de l'effet bystander

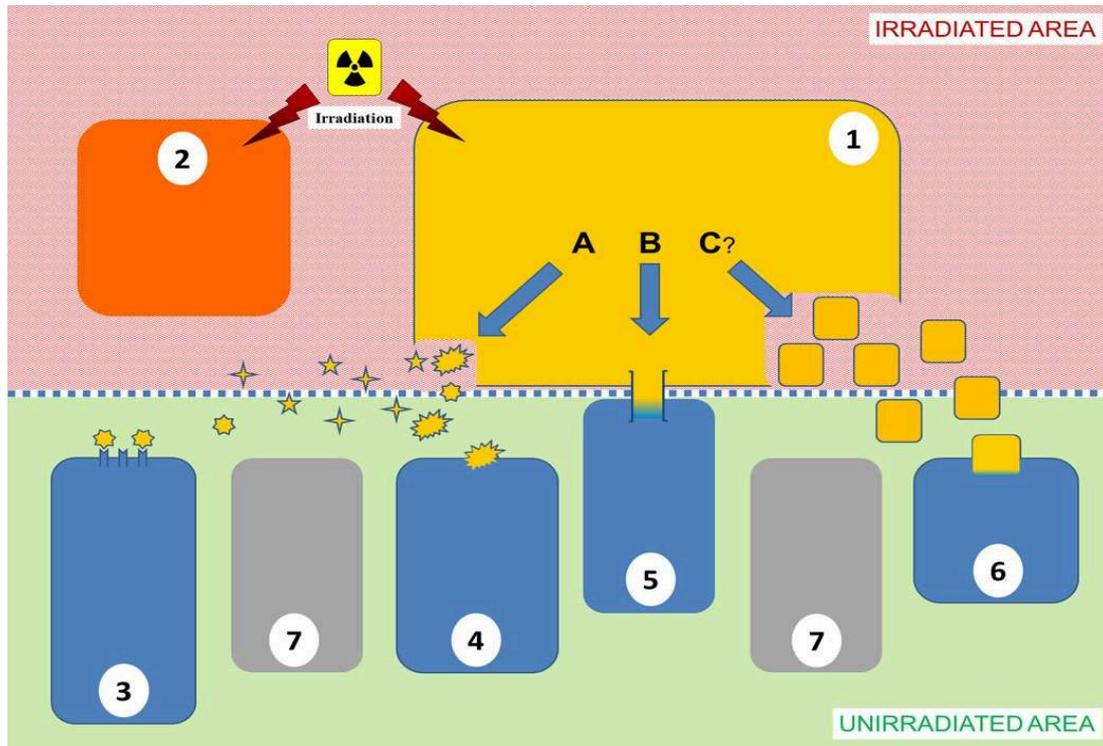


Figure 24 : Schéma des mécanismes cellulaires impliqués dans l'effet bystander radio-induit (89)

III. 3. 1. 1 Cellules émettrices et réceptrices

Comme le montre la figure 24, après une exposition à des RI, certaines cellules irradiées vont être capables d'émettre des signaux bystander, que l'on nomme cellules « émettrices » (cellule n°1), d'autres non (cellule n°2). L'ensemble de ces signaux se retrouvant dans la zone non irradiée vont interagir avec certaines cellules dites « réceptrices » des signaux bystander (cellules n° 3, 4, 5 et 6). Tandis que d'autres cellules sont incapables d'interpréter ces facteurs bystander (cellule n°7).

III. 3. 1. 2 Sécrétions de facteurs par les cellules irradiées

Les signaux bystander peuvent être directement sécrétés par les cellules irradiées dans leur micro-environnement (voie A). Ces facteurs bystander vont être émis par les cellules émettrices, après irradiation, et diffuser librement tout autour de la zone irradiée. Ainsi, ils vont pouvoir interagir avec les cellules réceptrices à proximité, se trouvant dans la zone non irradiée. Ils vont être

incorporés à l'intérieur de la cellule réceptrice, soit par diffusion à travers la membrane cellulaire (cellule n°4), soit en étant reconnus, *via* des récepteurs cellulaires situés sur la membrane des cellules réceptrices (cellule n°3), conduisant à une réponse bystander (89).

III. 3. 1. 3 Induction de gap-jonction entre les cellules

Les cellules irradiées peuvent également interagir avec les cellules non irradiées proches *via* des gap-jonctions (87) (voie B). Ces pontages entre cellules irradiées (cellule n°1) et cellules non irradiées voisines (cellules n°5) vont permettre de créer un moyen de communication directe entre ces cellules. La transmission des signaux bystander *via* les gap-jonctions a été mise en évidence par des études utilisant une drogue inhibant les gap-jonctions (18- α -glycyrrhétinique acid) (90).

III. 3. 1. 4 Sécrétion de vésicules

Enfin, la sécrétion de petites vésicules, comme des exosomes (voie C), par les cellules irradiées (cellule n°1), peut aussi permettre de communiquer des facteurs bystander vers les cellules non irradiées (cellule n°6) (91). Ce mécanisme va permettre aux cellules d'échanger des facteurs solubles ou insolubles.

III. 3. 2 Mécanismes moléculaires de l'effet bystander

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet bystander sont très proches de ceux qui sont impliqués dans les effets directs, observés dans les cellules après une exposition à des RI. Toutefois, l'effet bystander radio-induit est observé au niveau de la zone non irradiée à proximité de la zone irradiée.

III. 3. 2. 1 Facteurs bystander

Après une exposition à des RI, les cellules irradiées vont émettre une multitude de signaux au sein de leur micro-environnement. Parmi eux, certains sont souvent retrouvés dans la littérature et représentent des candidats intéressants pour l'explication du phénomène bystander (*Tableau 8*) (92) (93) (94):

Intercellular signal candidates	Reference
TGF- β	(92)
TNF- α	(94)
IL-8	(93)
Nitric oxide	(96)
Reactive oxidative species	(95)
Membrane signaling	(97)
DNA fragments	(98)

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des potentiels facteurs et voies de signalisation impliquées dans l'effet bystander
(88)

- **les cytokines** jouent un rôle fondamental dans l'effet bystander radio-induit.

Le TGF- β est une cytokine dont l'expression est nettement augmentée après une irradiation. Il joue un rôle crucial dans la propagation de l'effet bystander. Ainsi des études portant sur son inhibition *via* l'utilisation du miR radiosensible, le mir-663 qui cible de façon spécifique le TGF- β 1, ont montré une inhibition de la propagation de l'effet bystander radio-induit dans les cellules non irradiées, limitant ainsi la transmission des signaux bystander (95).

D'autres cytokines ont été identifiées comme ayant un rôle prépondérant dans l'effet bystander radio-induit ; c'est le cas de l'IL-8. En effet, cette cytokine joue un rôle crucial dans la TEM permettant notamment aux cellules tumorales de passer d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux, favorisant ainsi la formation de métastases. L'IL-8 est sécrétée par les cellules tumorales après une exposition à des RI, entraînant ainsi la TEM des cellules adjacentes à la tumeur (96).

Également, le TNF- α voit son expression augmenter après une irradiation. Des études ont montré, notamment pour le cancer colorectal, qu'une inhibition de cette cytokine permettait d'induire une apoptose accrue des cellules tumorales (97).

- **les ROS (Reactive Oxygen Species)** sont produits en grande quantité par les cellules après une exposition à des RI.

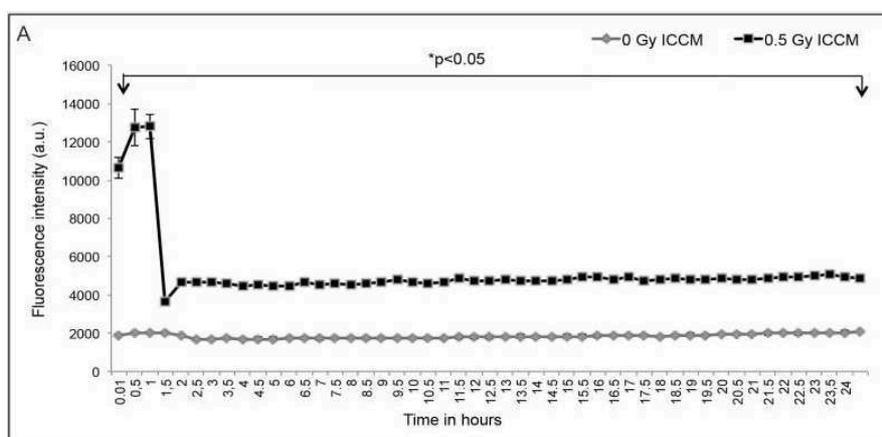


Figure 25 : Intensité de fluorescence des ROS après transfert de milieu issu de cellules irradiées ou non (98)

Des études récentes ont pu montrer *via* des techniques de microscopie en temps réel, que des cellules bystander de kératinocytes humains ayant reçu un milieu conditionné provenant de cellules irradiées à 0,5 Gy (*Figure 25*), produisaient des ROS. Ainsi, ces résultats suggèrent que les ROS produits par les cellules bystander vont engendrer au sein de ces cellules une cascade de réactions très proches de celles observées après une exposition à des RI (98).

- **les miR** (micro RNA) jouent un rôle dans la signalisation bystander. En effet, ces miR sont impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN ou encore dans l'induction de l'expression de certaines cytokines au niveau des cellules bystander. Toutefois, la façon dont les cellules irradiées émettrices transfèrent des miR vers les cellules non irradiées réceptrices est encore peu documentée. Une étude récente a permis de montrer que les exosomes pourraient être les transporteurs permettant le transfert de ces petits fragments d'ARN vers les cellules bystander (*Figure 26*) (99). Cette étude portait plus précisément sur le miR-21 retrouvé dans les cellules bystander et qui permet la réparation de dommages liés à l'ADN.

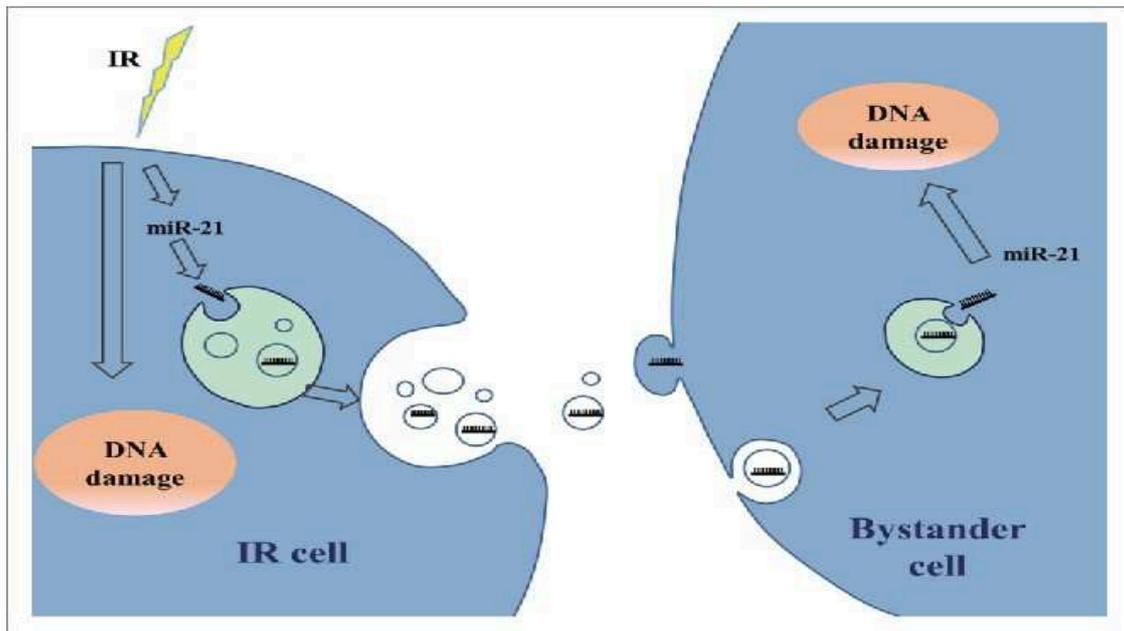


Figure 26 : Schéma proposant un mode de transfert du miR-21 conduisant à un effet bystander radio-induit (99)

III. 3. 2. 2 Propagation de l'effet bystander

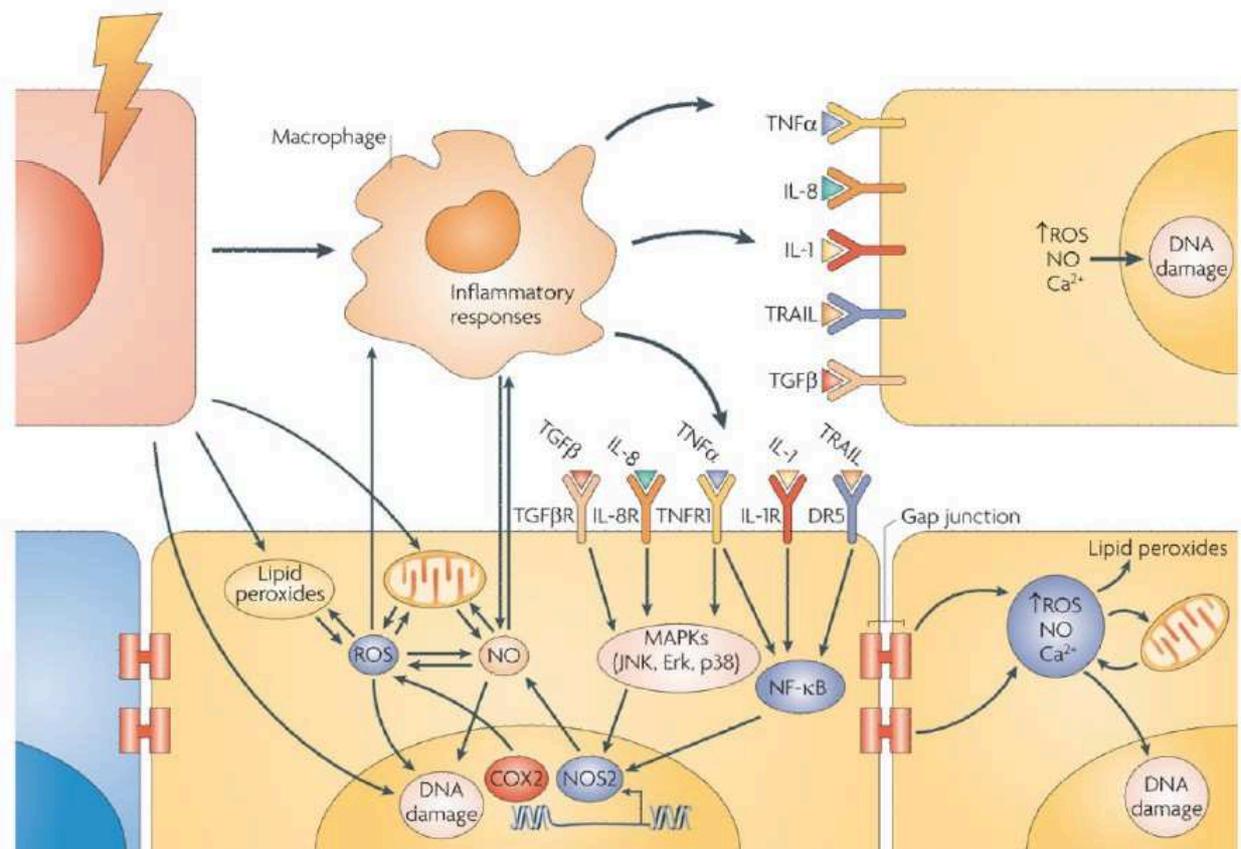


Figure 27 : Schéma représentant la propagation de l'effet bystander dans les cellules réceptrices (100)

D'après la figure 27, on note que la propagation de l'effet bystander dépend de la capacité des cellules réceptrices (cellules jaunes) à induire une réponse bystander. En effet, les cellules irradiées (cellules rouges) émettrices de signaux vont sécréter des facteurs bystander directement dans leur micro-environnement ou par l'induction de gap-jonctions comme on a pu le décrire précédemment. Ces facteurs bystander, qui sont principalement des facteurs solubles comme les cytokines (l'IL-6, l'IL-8, TGF β , TNF α), vont induire une réponse bystander au sein des cellules réceptrices. Pour cela, ces effecteurs vont être dans un premier temps reconnus par des récepteurs spécifiques (IL-8R par exemple) et vont activer des voies de signalisation au sein de la cellule bystander. Parmi ces voies de signalisation, on note le rôle central des voies MAPK et NF- κ B (101). Entre autres, ces voies de signalisation vont induire l'activation du facteur COX-2 (cyclooxygénase-2) (97) qui se révèle être un acteur clé de la réponse bystander radio-induite, puisqu'il va être à l'origine de la formation de ROS au sein des cellules bystander. Tout comme la réponse que l'on observe au sein d'une cellule après exposition à des RI, les cellules bystander vont connaître des dommages, comme des lésions à l'ADN, l'induction de ROS ou encore la peroxydation lipidique. Ainsi ces dommages pourront conduire, comme dans le cas d'une cellule irradiée, à la mort cellulaire ou à une réparation efficace

par la cellule de ces lésions. Les cellules bystander vont également être capables d'émettre des signaux ou encore d'induire des gap-jonctions avec leurs cellules voisines non irradiées et ainsi induire la propagation de l'effet bystander radio-induit. Les macrophages vont également participer activement à la propagation de l'effet bystander radio-induit. En effet, *in vivo* les macrophages sont décrits comme des médiateurs importants dans la réponse bystander. Ces derniers vont être activés par l'environnement inflammatoire créé après une irradiation et vont permettre, *via* la sécrétion de cytokines, de propager l'action de ces effecteurs aux cellules environnantes (102).

III. 4. Facteurs influençant l'effet bystander

L'effet bystander radio-induit est un phénomène complexe, induisant des effets biologiques sur les cellules bystander relativement proches de ceux observés dans les cellules après une exposition à des RI. La mise en évidence de ces effets va dépendre de 3 facteurs clés :

- le choix du **protocole** d'études de l'effet bystander ;
- le choix du **type cellulaire** utilisé pour les expériences ;
- la **source d'irradiation** utilisée.

III. 4. 1 Choix du type de protocole pour l'étude de l'effet bystander

III. 4. 1. 1 Protocoles d'étude de l'effet bystander *in vitro*

Il existe 4 protocoles principaux décrits dans la littérature, permettant l'étude de l'effet bystander radio-induit (103) :

III. 4. 1. 1. 1 Transfert de milieu

La figure 28 (89) représente un exemple de protocole de transfert de milieu permettant d'analyser l'effet bystander radio-induit. Ainsi, dans un premier temps, les cellules sont irradiées en flacon de culture. Au retour de l'irradiation le milieu de culture est retiré puis du milieu sans sérum est ajouté sur les cellules irradiées. Ces dernières vont ainsi pouvoir sécréter des facteurs bystander, puis le milieu conditionné contenant ces facteurs sera déposé sur des cellules en flacon de culture et non-irradiées. Par la suite, une étude des effets directement liés à l'irradiation peut être effectuée sur les cellules irradiées. De même, l'étude de l'effet du transfert de milieu provenant de cellules irradiées sur les cellules non-irradiées pourra être réalisée. On note la présence de deux temps clés dans ce

protocole : T1, correspondant au temps de sécrétion des facteurs bystander par les cellules irradiées et T2, correspondant au temps de contact entre les cellules non-irradiées et le milieu bystander. Il est également important de constater que le milieu de culture est changé directement après l'irradiation, évitant ainsi tout risque d'effet biologique sur les cellules non-irradiées qui serait dû à l'irradiation du milieu lui-même, et non pas à la présence de facteurs bystander.

Le rapport de l'UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) révèle 22 articles utilisant ce protocole pour l'étude de l'effet bystander sur la période de 1992 à 2006 (103). Aujourd'hui, on dénombre plus de 100 études (recensées sur Pubmed) utilisant ce type de protocole.

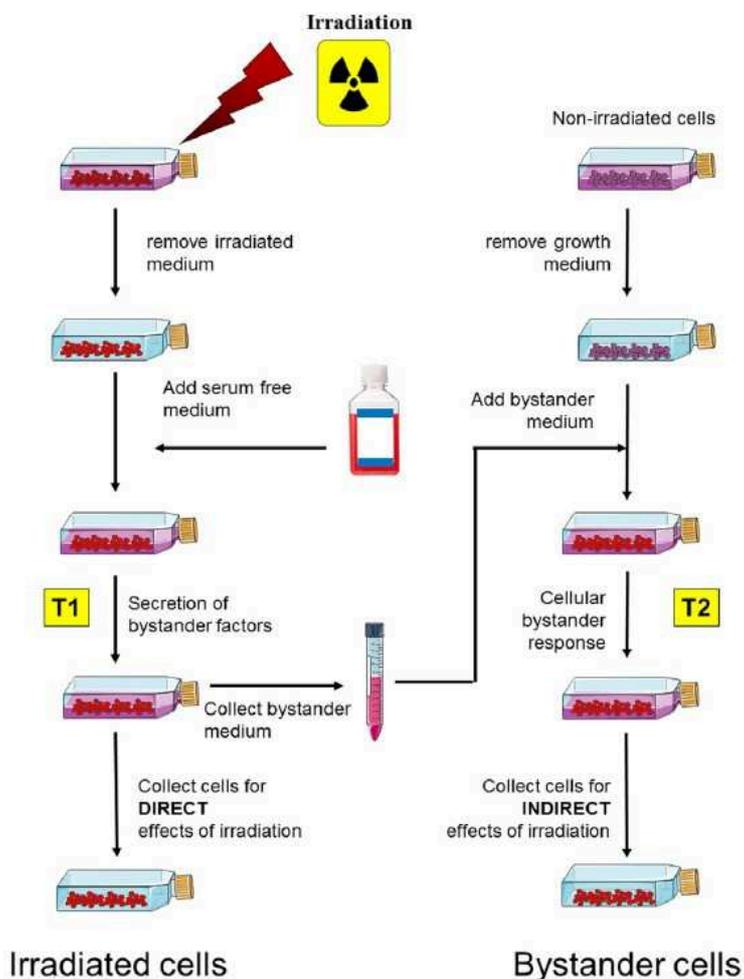


Figure 28 : Exemple d'un protocole de transfert de milieu pour l'étude de l'effet bystander (89)

III. 4. 1. 1. 2 Co-culture en cupule

La figure 29 (89) représente un exemple de protocole de co-culture permettant l'étude de l'effet bystander radio-induit. Ce système de co-culture permet de simplifier l'étude de l'effet bystander. En effet, dans le protocole précédemment décrit, on note l'existence des temps T1, et T2 qui peuvent représenter un frein dans la mise en évidence d'un effet biologique notamment s'ils sont mal choisis. C'est en cela que le protocole de co-culture est intéressant. En effet, ce dernier permet de s'affranchir de cette notion de temps en permettant une synchronisation dans la sécrétion de facteurs bystander, et dans la réception de ces derniers, par les cellules non-irradiées. Ainsi il suffit, par exemple, d'utiliser un système de cupule (*Figure 29 A*) permettant la culture de cellules irradiées dans le même volume que les cellules non-irradiées, notamment par la présence d'une séparation physique des cellules *via* une membrane poreuse permettant l'échange de facteurs bystander entre les cellules (*Figure 29 B 1*). Il est également envisageable d'utiliser des systèmes de co-culture permettant aux cellules de se lier les unes aux autres, notamment par l'induction de gap-jonctions (*Figure 29 B 2*).

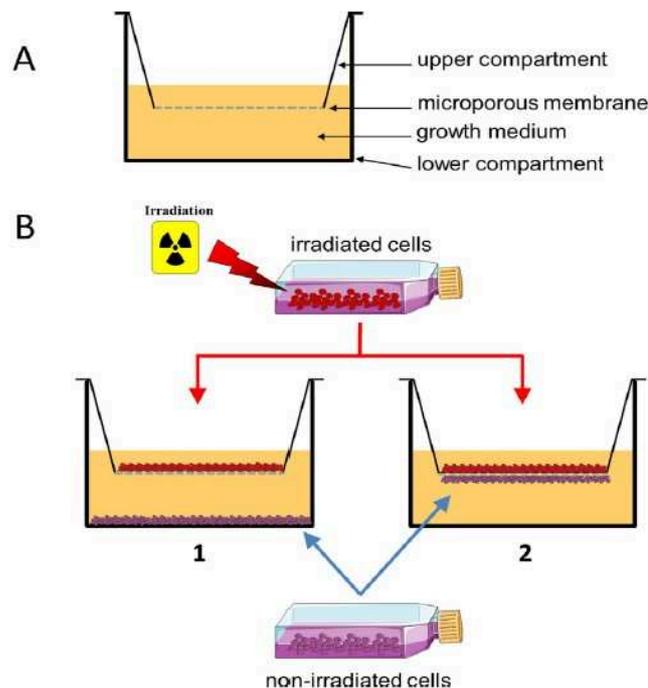


Figure 29 : Exemple d'un protocole de co-culture pour l'étude de l'effet bystander (89)

III. 4. 1. 1. 3 Micro-faisceau

Il existe d'autres protocoles permettant l'étude de l'effet bystander en co-culture. Notamment l'utilisation de particules- α , à faible fluence. Ces dernières vont permettre d'irradier seulement une

petite partie de la population cellulaire présente dans un flacon de culture (*Figure 30*) (104), puis d'en étudier les effets sur l'ensemble des cellules. Toutefois cette technique permet d'étudier seulement un type cellulaire. C'est ce protocole qui a été utilisé dans l'étude du Dr Nagasawa et du Dr. Little, menée en 1992 et portant sur l'induction des échanges de chromatides sœurs (SCE) décrite précédemment. Ces chercheurs avaient notamment mis en évidence que 20 à 40% des cellules présentaient des SCE alors que seulement 0,1 à 1% des cellules avaient été traversées par des particules- α (84).

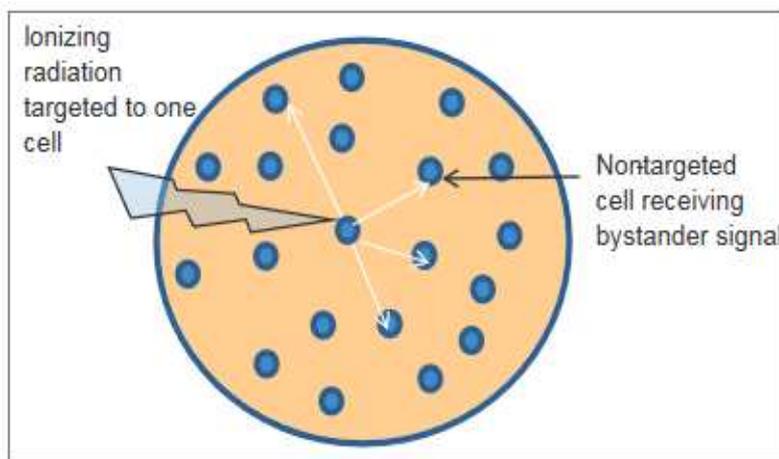


Figure 30 : Exemple d'une irradiation par microfaisceau pour l'étude de l'effet bystander (104)

III. 4. 1. 1. 4 « Field »

Aussi il est possible d'utiliser des protocoles spécifiques permettant de générer deux populations de cellules mélangées. Notamment *via* l'utilisation de la technique de « field » qui utilise un masque, lors de l'irradiation, permettant ainsi d'irradier seulement une partie des cellules se trouvant dans le même flacon de culture que les cellules non-irradiées, comme on peut le voir illustré dans la figure 31 (105). Ensuite, il est possible d'étudier la survie des cellules dans le champ d'irradiation et hors du champ (106).



Figure 31 : Exemple d'une irradiation de type “field” en présence d'un masque pour l'étude de l'effet bystander (105)

III. 4. 1. 2 Protocoles d'études de l'effet bystander *in vivo*

Il est plus aisé de travailler sur l'effet bystander radio-induit avec un modèle cellulaire simple, *in vitro* comme décrit précédemment. Toutefois ce type de protocole ne permet pas d'étudier l'effet bystander de façon très réaliste. On a notamment pu voir précédemment l'importance des macrophages dans la propagation de l'effet bystander radio-induit ; cependant ces derniers ne sont pas présents dans un système *in vitro*. De même la diffusion des facteurs dans un tissu ne peut pas être étudiée dans un système de culture en deux dimensions classique.

Toutefois l'effet bystander radio-induit, est beaucoup moins étudié *in vivo* ; le rapport de l'UNSCEAR révèle seulement cinq études existantes sur la période de 1992 à 2006 (103). Quelques études se sont ajoutées depuis ce rapport, une revue a d'ailleurs été publiée en 2013, rapportant 26 études réalisées *in vivo*. Cependant en regardant plus en détail ces études, on se rend compte qu'il ne s'agit pas d'études sur l'effet bystander, comme décrit précédemment, mais plutôt d'études montrant un effet abscopal, à distance de la zone irradiée (sur d'autres organes *via* les vaisseaux sanguins par exemple) (107). Il semblerait notamment que, lors d'une irradiation, la composition du sérum de souris irradiées varie, ce qui pourrait induire une réponse dans les tissus environnants (108). D'autres études menées sur des poissons ont également permis de montrer l'effet d'un milieu aquatique provenant de poissons irradiés sur des poissons non-irradiés (109).

III. 4. 2 Choix du type cellulaire pour l'étude de l'effet bystander

De nombreux types cellulaires ont été étudiés pour leur capacité à générer et/ou à recevoir des signaux bystander. Parmi eux, on retrouve des cellules humaines, de souris, de rat, de porc et enfin de hamster comme décrit dans le tableau 9. Il n'existe aucune étude utilisant les mêmes protocoles d'analyses ayant fait l'inventaire détaillé afin de comparer toutes les cellules pouvant être émettrices et réceptrices de signaux bystander. Cependant, il est bien établi que les fibroblastes répondent régulièrement aux signaux bystander. Ainsi, dans de nombreuses études, ces derniers sont utilisés comme témoins positifs de cellules réceptrices à des signaux bystander (88).

Species	Cell/tissue type	
Human (normal/ transformed)	Peripheral blood lymphocytes	
	Keratinocytes	
	Fibroblasts	
	Endothelial cells	
	Lung fibroblasts	
	Foreskin fibroblast	
	Astrocytes	
	Intestinal epithelial cells	
	Human (tumor)	Prostate carcinoma
		Colon carcinoma
Glioma		
Salivary gland tumor		
Placental choriocarcinoma		
Mouse	Embryonic fibroblasts	
	Bladder epithelium	
	Bone marrow cells	
	Lymphoma	
	Spleen lymphocytes	
Rat	Liver epithelial cells	
	Tracheal epithelial cells	
Pig	Ureter epithelium	
Chinese hamster	Lung fibroblasts	
	Ovarian cells (with human chromosome 11)	

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des potentiels facteurs et voies de signalisation impliqués dans l'effet bystander (88)

Ainsi, il est impératif de sélectionner des cellules qui sont capables d'émettre des signaux bystander, mais également des cellules qui sont aptes à les recevoir. Par exemple, dans le cadre du CHS, l'équipe de Wakatsuki a permis de mettre en évidence que les cellules de CHS SW 1353, sont capables d'émettre des signaux bystander et que les fibroblastes AG0 1522 sont capables de les recevoir. Toutefois les cellules de CHS ne parviennent pas à répondre aux signaux bystander émis par les fibroblastes irradiés (110).

III. 4. 3 Choix de la source d'irradiation pour l'étude de l'effet bystander

III. 4. 3. 1. Importance du type d'irradiation

Tout comme le protocole utilisé, et le type cellulaire choisi, le type d'irradiation joue un rôle clé

dans l'étude de l'effet bystander radio-induit. En effet, il existe aujourd'hui de nombreux articles utilisant différentes sources de rayonnement pour l'étude de ce phénomène, dont les particules- α , les rayons-X, les protons, les ions-carbone... Cependant, la majorité de ces études ne s'intéresse qu'aux effets bystander induits par un seul type de rayonnement, rares sont celles qui comparent l'effet bystander induit par différents types de rayonnement. Toutefois, on note l'existence de certains articles comparant un effet bystander radio-induit dans un même système (protocole et type cellulaire identique) mais avec 2 types d'irradiations distinctes. Par exemple, l'étude du Dr. Frankenberg D. menée en 2006, qui a comparé l'effet d'une irradiation par micro-faisceau de protons ou de particules- α sur des cultures de cellules primaires de fibroblastes humains, a permis de mettre en évidence un effet bystander radio-induit sur ce type cellulaire dépendant du type d'irradiation. En effet, en irradiant seulement 10% de la population cellulaire avec des particules- α , les auteurs ont pu montrer une absence d'effet bystander radio-induit. Tandis qu'ils ont pu observer une diminution de la survie clonogénique des cellules irradiées par des protons (111).

III. 4. 3. 2. Importance du TEL

Également on peut noter l'influence du TEL sur l'effet bystander radio-induit (112) (113). L'étude d'Azenberg menée en 2008, a notamment permis de mettre en évidence un effet bystander dépendant du TEL dans des cellules humaines de carcinomes de la prostate et de fibroblastes humains. Les auteurs ont montré une différence significative dans la réponse bystander observée après une irradiation avec des rayons-X ou avec des particules- α .

III. 4. 3. 3. Importance de la dose d'irradiation

Enfin, en plus du type d'irradiation et du TEL, la dose d'irradiation joue un rôle considérable dans l'induction de l'effet bystander radio-induit. Ainsi on retrouve 3 grands phénomènes dépendant de la dose d'irradiation utilisée :

- un phénomène d'**hypersensibilité aux faibles doses** (inférieur à 1 Gy) est relaté par certains auteurs, comme décrit dans la figure 32, où l'on peut voir une diminution de la survie clonogénique des cellules de gliome (T98G) jusqu'à 1 Gy, après transfert de milieu provenant de cellules T98G irradiées (entre 0 et 3Gy) (114) (115) ;

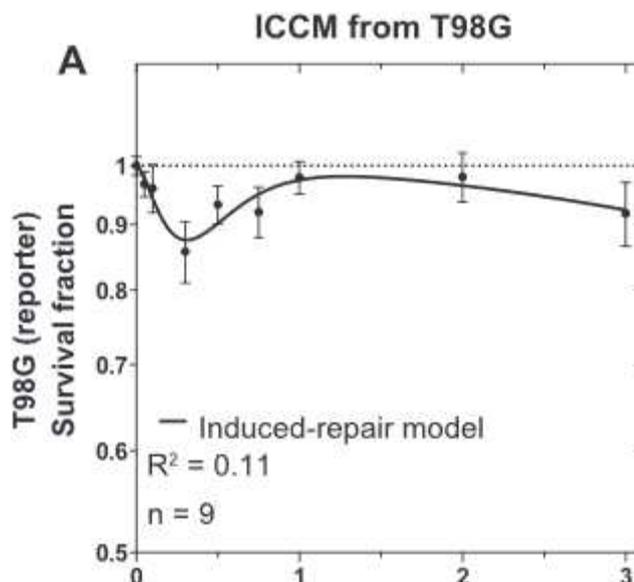


Figure 32 : Courbe de survie des cellules T98G après transfert de milieu provenant de cellules T98G irradiées au Césium-137 (114)

- un phénomène **dose réponse**, avec un accroissement de l'effet aux fortes doses, est également décrit dans la littérature ainsi, comme le montre le tableau 10, on observe une diminution progressive de la fraction de cellules survivantes de SW 48 après transfert de milieu provenant de kératinocytes irradiés au cobalt-60 (116);

Dose (Gy)	% SF (actual dose)	% SF (irradiated medium)
0	100 ± 8.1	100 ± 4.7
0.5	47.4 ± 4.1	40.3 ± 8.9
1.0	33.2 ± 1.4	42.0 ± 9.1
3.0	5.1 ± 0.4	37.3 ± 8.7
5.0	1.8 ± 0.5	10.36 ± 1.3

Tableau 10 : Tableau représentant la fraction survivante des cellules SW 48 après transfert de milieu provenant de kératinocytes irradiés au cobalt-60 (116)

- un phénomène de **saturation** de l'effet bystander après des doses supérieures à 0,5 Gy notamment (110) (117) ainsi, comme le montre la figure 33, au lieu d'une réponse qui augmente en fonction de la dose d'irradiation comme on peut l'observer lors de l'étude des effets directs des RI, on observe une saturation de la réponse à partir de doses relativement faibles (moins de 1Gy). Cette saturation signifie qu'au-dessus d'une certaine dose, aucun effet supplémentaire ne se produit au sein des cellules bystander.

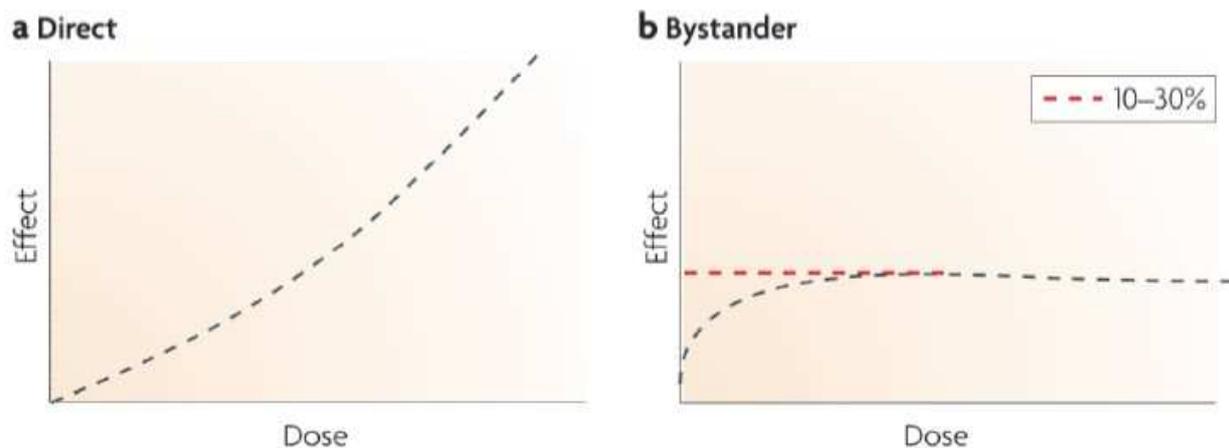


Figure 33 : Aspects des courbes de survie après une exposition directe ou bystander à des RI (100)

III. 5. Outils d'analyse et réponse biologique de l'effet bystander

Comme évoqué précédemment, la réponse biologique induite dans les cellules bystander est très proche de celle observée dans les cellules irradiées.

Ainsi on retrouve au sein des cellules bystander, de la même façon que dans les cellules irradiées, des lésions telles que :

- des dommages à l'ADN et aux chromosomes
- des altérations protéiques.

Ainsi, cette réponse bystander va, de la même façon que dans les cellules ayant été exposées à des RI, activer des voies de signalisation cellulaire au sein de la cellule bystander, conduisant à la propagation de l'effet bystander comme on a pu le décrire précédemment ou encore la mort des cellules bystander.

III. 5. 1 Induction de dommages à l'ADN

III. 5. 1. 1 Étude des chromosomes : échange de chromatides sœurs (SCE)

La première étude ayant analysé les dommages induits aux chromosomes durant la réponse bystander date de 1992, il s'agit de l'étude de Nagasawa et Little décrite précédemment et faisant partie des premières publications portant sur l'effet bystander (84). Durant les années 90, d'autres études portant sur le SCE ont été menées afin de mettre en évidence un effet bystander radio-induit (118). Toutefois, l'évolution des techniques d'étude a vite laissé place à des expériences plus sensibles telles que l'analyse des cellules bi-nuclées.

III. 5. 1. 2 Étude des MN

Il existe actuellement une centaine d'études utilisant les micro-noyaux (MN) pour étudier l'effet bystander radio-induit (recensées dans Pubmed). En effet, cette technique très utilisée en radiobiologie permet de mettre en évidence des dommages à l'ADN de façon très sensible.

Le premier article utilisant les MN pour étudier la réponse bystander des cellules date de 1998. Ces recherches avaient été menées par le Dr. K. Prise et son équipe dans le but d'étudier les effets d'une irradiation par des particules- α sur des cultures de cellules primaires de fibroblastes humains. Ils avaient ainsi pu mettre en évidence la présence de cellules micro-nucléées au sein de la population bystander (86).

Plus récemment, une étude menée en 2017, visant à étudier l'effet bystander radio-induit, et plus précisément le rôle des gap-jonctions dans ce phénomène, a également eu recours à la technique des MN. Les auteurs ont ainsi étudié l'induction de MN dans des cellules bi-nucléées de fibroblastes humains (AG 1522) après différents types d'exposition à des RI, comme on peut le voir sur la figure 34.

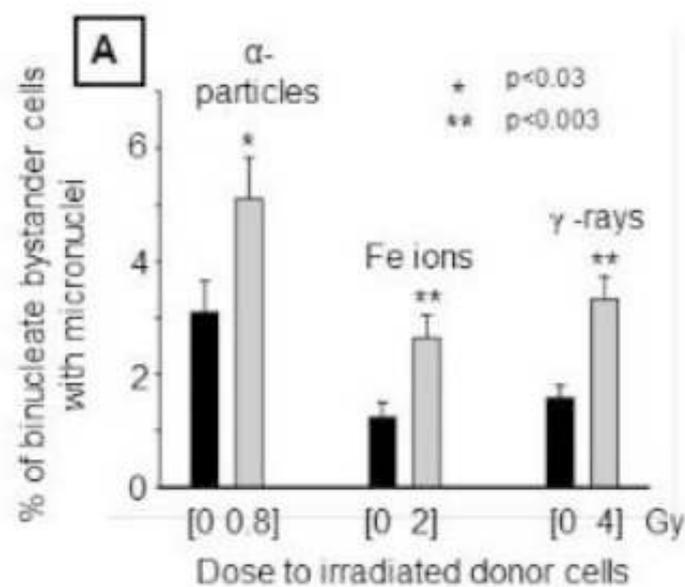


Figure 34 : Formation de MN dans les cellules AG1522 après une exposition à différents types de RI (119)

Cette figure montre bien l'induction de MN dans les cellules bystander, mais elle montre aussi le caractère sensible de cette technique. En effet, en regardant d'un peu plus près l'échelle, on remarque que le comptage des MN permet de comparer des données variant de quelques pourcents les unes des autres et ce, de façon significative.

III. 5. 2 Induction d'un retard de prolifération

Le test de clonogénicité est la technique la plus utilisée en radiobiologie pour mettre en évidence un retard de prolifération cellulaire. Ce test permet d'établir la capacité des cellules exposées à des RI ou à un traitement, comme le transfert d'un milieu bystander, à survivre et donc à proliférer sous forme de clones. C'est la seconde technique après l'étude de l'induction de MN, la plus utilisée pour la mise en évidence d'un effet bystander radio-induit. On recense une cinquantaine d'article (Pubmed) utilisant cette technique pour étudier le phénomène bystander. Elle est notamment très utilisée lors de protocole de transfert de milieu car elle permet d'étudier spécifiquement la survie clonogénique des cellules bystander ayant reçu le surnageant de cellules irradiées.

La première étude utilisant ce type d'expérience pour l'étude du phénomène bystander date de 1997. Menée par le Dr. C. Mothersill, elle a permis de montrer une diminution de la survie clonogénique des cellules humaines dérivées d'un carcinome du colon après transfert de milieu provenant de kératinocytes irradiés au cobalt-60 (*Tableau 10 décrit précédemment*) (116).

Plus récemment, une étude datant de 2015, réalisée par le Dr. Faqihi et son équipe, portant sur l'étude de l'effet bystander, utilisant un protocole de transfert de milieu provenant de cellules irradiées à 4 Gy par rayons-X, a permis de montrer une diminution de la fraction de cellules survivantes, en condition bystander, dans des sphères de cellules de gliomes (*Tableau 11*) (120).

Group	Mean no. colonies	S	% P	SD	PV ^c	%SF mean ^b	SD
Radiation control	173	19.71	3.46	0.39	-	-	-
Bystander control	165.75	21.82	3.31	0.43	0.952	-	-
Radiation	60.00	13.83	1.20	0.27	0.000	34.68	8.11
Bystander	115.25	14.17	2.30	0.28	0.001	69.48	8.56

Tableau 11 : Survie clonogénique des sphéroïdes de U87MG après une irradiation à 4 Gy ou un transfert de milieu provenant de U87MG irradiées à 4Gy (120)

III. 5. 3 Induction d'une modification du protéome des cellules bystander et du sécrétome des cellules irradiées

III. 5. 3. 1 Étude de l'expression de protéines cibles

L'étude de l'expression de protéines spécifiques pour analyser l'effet bystander implique une

connaissance des mécanismes impliqués dans cet effet. Ainsi, de la même façon que dans des cellules exposées à des RI, les cellules bystander voient leurs protéines modifiées, notamment certaines dont l'expression est fortement modulée dans les cellules irradiées, comme la protéine p53 ou encore p21. Ce sont d'ailleurs ces deux protéines qui ont été étudiées dans l'article datant de 1998 du Dr Azzam et de son équipe qui, par des expériences de western-blot ont pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de ces protéines, dans une population bystander de fibroblastes après une exposition à des particules- α d'une petite fraction cellulaire. Ils ont également pu mettre en évidence le rôle des gap-jonctions dans la modulation d'expression de ces protéines, puisqu'en inhibant ces jonctions, l'augmentation d'expression de p53 et p21 est significativement réduite (121).

L'étude menée par le Dr. Zhou en 2005 a permis de mettre en évidence le rôle de la protéine COX-2 dans l'effet bystander radio-induit, observé dans des fibroblastes bystander après une exposition à des particules- α . En effet, comme on peut le voir dans la figure 35, on observe l'induction de l'expression de la protéine COX-2, en condition bystander. En terme de signalisation cellulaire, cette protéine joue un rôle fondamental dans la voie MAPK, permettant entre autre de créer des réponses variées au sein de la cellule bystander comme l'induction d'un contexte inflammatoire, des mutations ou encore une instabilité génomique pouvant induire une transformation maligne des cellules bystander (*Figure 35*) (97).

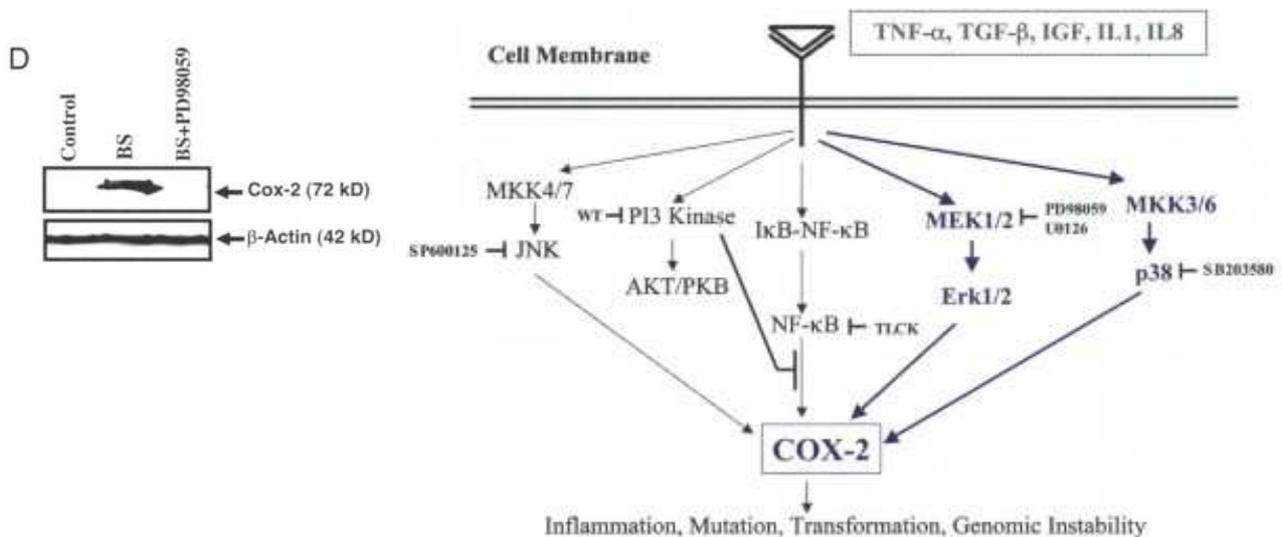


Figure 35 : Expression de la protéine COX-2 dans les fibroblastes bystander et réponse bystander modulée par COX-2 (97)

III. 5. 3. 2 Étude globale du protéome des cellules bystander

Il existe à ce jour, une dizaine de publications, s'intéressant à l'étude du protéome des cellules bystander. Parmi ces données, on note particulièrement les expériences menées par le Dr. Mothersill et son équipe portant sur l'analyse du protéome de truites arc-en-ciel ayant été en contact avec des poissons irradiés ou avec l'eau dans laquelle ont vécu des poissons irradiés.

Ainsi, dans leurs travaux datant de 2007, les auteurs ont analysé le protéome des branchies de poissons irradiés par rayons-X par électrophorèse bidimensionnelle. Ces analyses protéomiques ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de l'anexine II, pointée par la flèche n°1 sur la figure 36 (protéine pro-tumorale). Également, des protéines protectrices contre le stress oxydatif ont été augmentées. Ces données suggèrent une réponse protectrice des poissons bystander face aux facteurs de stress émis par les poissons irradiés (122).

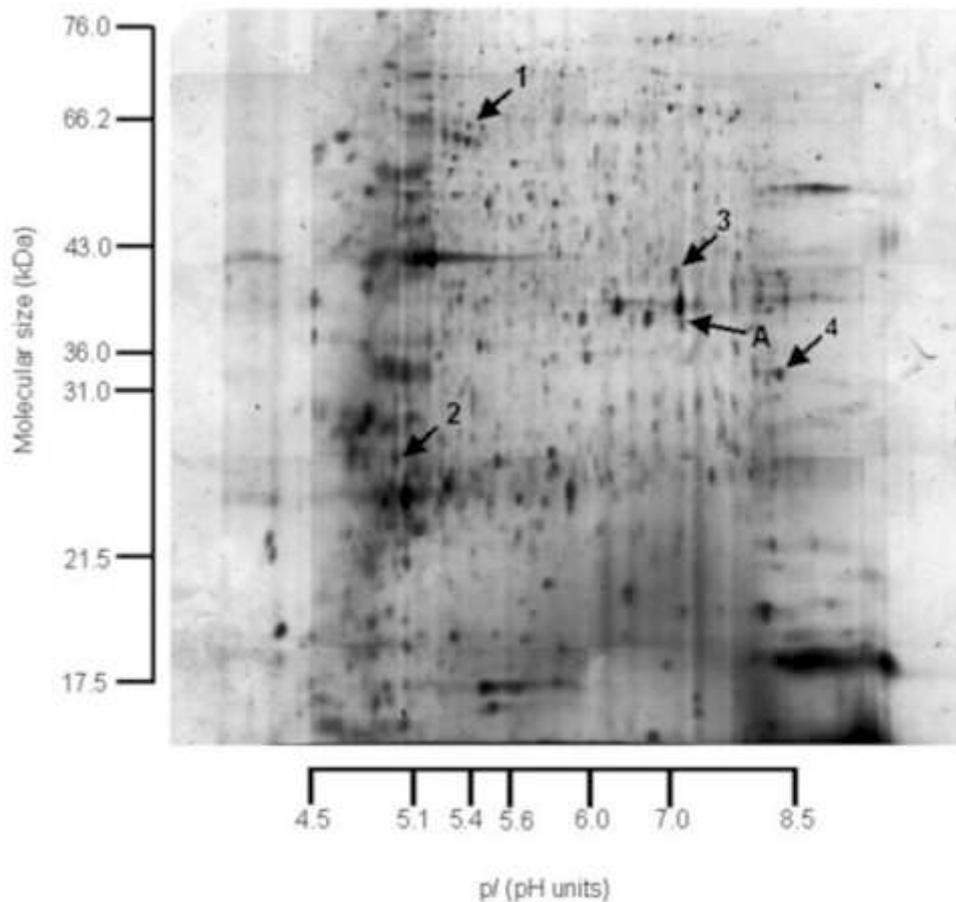


Figure 36 : Electrophorèse bidimensionnelle représentant le protéome d'une truite arc-en-ciel bystander (122)

Plus récemment, en 2018, cette même équipe a étudié l'impact d'une irradiation à 0,5 Gy par rayons-X d'œufs de truites arc-en-ciel. Ils ont pu constater qu'une irradiation précoce pouvait induire un

effet bystander à long terme sur les animaux non irradiés qui avaient vécu avec ces poissons irradiés à l'état de larve, en étudiant de la même façon que précédemment le protéome des branchies de poissons adultes (123).

III. 5. 3. 3 Étude globale du sécrétome des cellules irradiées

En effet, il est très important d'étudier le sécrétome des cellules irradiées afin de mieux comprendre l'effet bystander et d'identifier les effecteurs impliqués dans ce phénomène. Pour cela, une analyse globale du sécrétome permet de recenser l'ensemble des protéines sécrétées par les cellules irradiées, sans *a priori*, et par comparaison avec le sécrétome de cellules non irradiées d'identifier des candidats potentiellement responsables de l'effet bystander radio-induit. Ces protéines variantes, présentent notamment dans le sérum de patients, peuvent représenter un outil de diagnostic et de pronostic des lésions induites par une exposition à des RI, notamment des lésions secondaires dues à un traitement par radiothérapie, par exemple.

Ainsi, l'équipe du Dr. Guipaud s'est intéressée à l'étude du protéome du sérum de souris, après irradiation, afin de découvrir des marqueurs associés à l'irradiation et aux dommages radio-induits. Pour cela, les souris ont été irradiées à des doses de 20 à 80 Gy et leurs protéines sériques recueillies à 3 et 7 jours post-irradiation. Des expériences de 2D-DIGE (2-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis), permettant de comparer simultanément deux protéomes d'un même système biologique dans différentes conditions ont permis, en comparant le sérum de souris irradiées avec celui de souris non irradiées, d'identifier une liste de 15 protéines pouvant être des candidates intéressantes afin de déterminer la gravité et le pronostic de lésions cutanées radio-induites (124). La mise en relation par un logiciel spécialisé (Pathway Studio) de ces différentes protéines a permis d'établir un réseau protéique, représenté par la figure 37. On peut noter l'implication de certains grands acteurs connus dans ce réseau, tels que le TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IFN γ , décrits précédemment comme des protéines radio-induites après une exposition des cellules à des RI ou encore comme des protéines impliquées dans l'effet bystander. Cette étude permet encore une fois de mettre en évidence le rôle clé des cytokines dans la réponse des cellules à une irradiation, mais aussi dans la propagation de la réponse bystander.

Une autre étude datant de 2014, portant sur l'analyse des protéines sécrétées, par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse, dans un modèle de tissu cutané tridimensionnel, a montré après une irradiation par rayons-X allant de 3 à 200 cGy, une variation d'expression de 135 protéines entre les conditions contrôles et les conditions irradiées. De façon générale, les auteurs ont observé une diminution globale de l'expression des protéines sécrétées après une irradiation à 2 Gy,

reflétant les dommages délétères provoqués aux cellules par les RI. Cependant, à l'inverse, ils ont pu observer une augmentation de la sécrétion de protéines après une irradiation à faible dose, reflétant le stress engendré sur les cellules (125). Ces protéines pourraient ainsi représenter des candidates pertinentes pour mieux comprendre le phénomène bystander.

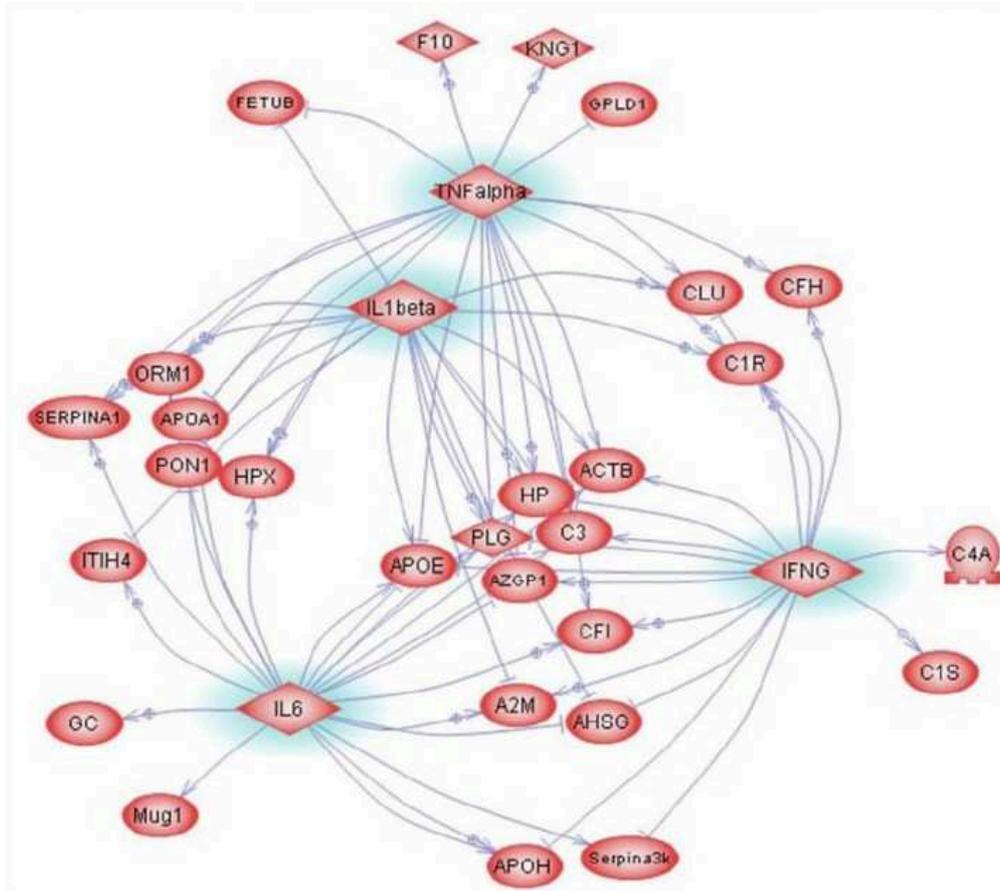


Figure 37 : Réseau protéique de protéines identifiées liées par des régulateurs communs : TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IFN- γ (124)

III. 5. 4 Induction d'un stress oxydatif dans les cellules bystander

De la même façon que dans les cellules irradiées, on observe la production de ROS au sein des cellules bystander. Ainsi, on retrouve plusieurs études qui se sont intéressées spécifiquement à la formation de ces ROS , pour la mise en évidence de l'effet bystander.

C'est le cas de l'étude menée par le Dr. C. Shao et son équipe, en 2005, qui se sont intéressés par des expériences de co-cultures de cellules de gliomes et de fibroblastes, après une exposition à des particules d'hélium, à mesurer entre autre la production de ROS *via* des sondes fluorescentes marquant spécifiquement les ROS au sein des cellules. Ainsi, comme le montre la figure 38, après une irradiation de seulement 1 % de fibroblastes AG0 1522, ils ont observé une augmentation de 18

% du taux de ROS par rapport à la condition contrôle non-irradiée (126).

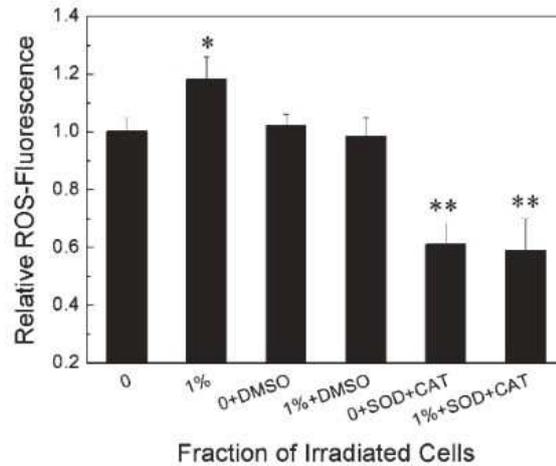


Figure 38 : L'intensité relative de la fluorescence induite par les ROS dans les cellules AG0 (126)

III. 5. 5 Induction du modification des flux calciques dans les cellules bystander

Les flux calciques sont connus pour moduler la réponse bystander. En effet, le calcium va jouer un rôle prépondérant dans la signalisation cellulaire des cellules bystander notamment *via* l'induction de la voie MAPK, très impliquée dans l'effet bystander, et pouvant induire la mort des cellules (127).

L'étude menée en 2006, par le Dr. K. Prise et son équipe, s'est intéressée de plus près à l'induction de ces flux calciques au sein des cellules bystander. Ainsi ils ont pu montrer l'implication de la modulation de ces flux calciques, dans la réponse bystander. Notamment par des expériences de co-culture de cellules de gliomes et fibroblastes irradiés, à seulement 10 % par un micro-faisceau d'hélium. La figure 39, représente le nombre de MN, comptabilisé dans les cellules AG0 (fibroblastes) et T98G (gliomes) non irradiées, bystander (co-culture) et bystander ayant subi un traitement, entraînant le blocage des flux de calcium au sein des cellules (CaC). On peut ainsi constater l'induction de MN dans les cellules bystander et la perte de l'effet lors de l'ajout du CaC (126).

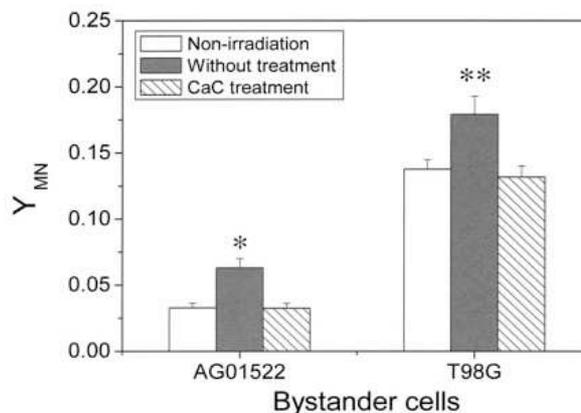


Figure 39 : Influence des flux calciques dans l'induction de MN au sein des cellules bystander (126)

III. 5. 6 Induction de la mort des cellules bystander par apoptose

Après une exposition à des RI, on observe une cascade de réponses biologiques au sein de la cellule irradiée pouvant conduire jusqu'à la mort de celle-ci. C'est le même phénomène que l'on observe dans les cellules bystander. C'est pourquoi des auteurs se sont intéressés à l'induction de la mort par apoptose au sein des cellules bystander.

Notamment l'article paru en 2013, du Dr. H. Furlong et son équipe, portant sur l'étude de l'induction de gènes de protéines apoptotiques, dans des kératinocytes humains, ayant reçu du milieu de culture provenant de cellules irradiées à des faibles doses allant de 0,05 à 0,5 Gy par du cobalt 60. Ces expériences de RT-PCR en temps réel ciblant des gènes pro-apoptotiques tels que Bax ou au contraire anti-apoptotiques tels que Bcl-2, ont permis de montrer une induction de ces gènes relativement proche de celle observée dans les cellules directement irradiées (*Figure 40*).

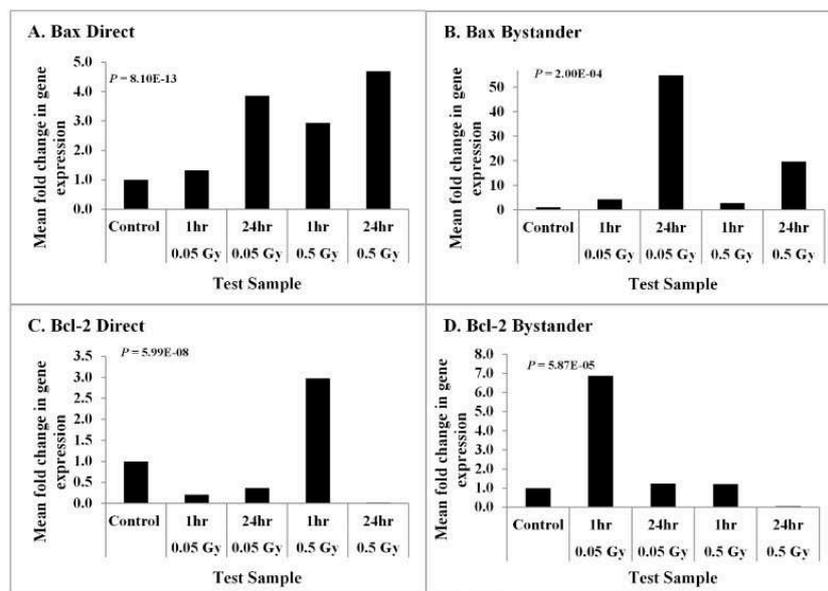


Figure 40 : Niveaux d'expression des gènes de protéines (Bax et Bcl-2) impliqués dans l'apoptose (128)

Ainsi, cette étude confirme l'induction de la mort par apoptose au sein des cellules bystander et ce particulièrement aux faibles doses d'irradiation (0,05 Gy) (128).

III. 6. Intérêt d'un modèle 3D pour l'étude de l'effet bystander

L'effet bystander radio-induit peut être, provoqué par la libération de facteurs solubles par les cellules irradiées. Ces facteurs vont ainsi se retrouver dans le micro-environnement tumoral et interagir, ou non, avec les cellules saines avoisinantes. C'est pourquoi l'utilisation d'un modèle de

culture cellulaire en 3D (trois dimensions) pour l'étude de l'effet bystander est très pertinent. En effet, lors d'études *in vitro* en flacons de culture, la notion de gradient de diffusion des facteurs bystander est perdue, toutefois c'est un point essentiel pour une meilleure compréhension de ce phénomène. De plus, le cartilage étant un tissu faiblement oxygéné, l'utilisation de modèle 3D permettra de s'approcher davantage de la physiologie du cartilage en recréant un gradient en oxygène au sein de ces structures. Pour étudier l'effet bystander en 3D dans le contexte d'une irradiation du cartilage, pour le traitement d'un CHS, plusieurs options sont possibles comme l'utilisation d'éponges de collagène, de pellets ou encore d'hydrogels et d'autres modèles 3D :

- Les **éponges de collagène** permettent de recréer un modèle 3D *in vitro*, proche d'un cartilage hyalin, grâce à un maillage de collagène dans lequel les chondrocytes peuvent s'implanter. Ceci est possible par l'ajout de différents facteurs chondrogéniques comme la Bmp-2 (Bone morphogenetic protein-2) ou encore l'IGF-I (insulin-like growth factor I), ainsi que des conditions de culture spécifique comme une faible tension en oxygène (2%). Ces conditions vont permettre aux chondrocytes présents dans le modèle de produire de la MEC, recréant ainsi, *in vitro*, une structure proche du cartilage (129). Il est également possible d'utiliser des cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui pourront se différencier en chondrocytes au sein de ces modèles de culture. Au sein du laboratoire, le Dr. D. Hamdi a adapté ces éponges pour pouvoir s'en servir dans le cadre d'études préliminaires de radiothérapie du CHS (130). Il serait donc tout à fait envisageable d'utiliser ce type de modèle pour l'étude de l'effet bystander.
- Les **hydrogels**, quant à eux, sont très étudiés comme modèle afin d'aider des patients souffrant d'arthrose. En effet, il est tout à fait envisageable de transplanter ces structures 3D aux patients arthrosiques afin d'aider la reconstruction de leur cartilage (131). Pour cela, il est nécessaire d'obtenir un modèle se rapprochant le plus possible de la physiologie du cartilage, notamment *via* l'utilisation de CSM différenciées en chondrocytes, qui vont pouvoir produire leur MEC au sein de l'hydrogel.
- L'utilisation d'agrégats cellulaires comme **les pellets ou les micro-masses**, est également très répandue dans l'étude de la différenciation chondrogénique. Ces petits modèles 3D, simples, contenant exclusivement des cellules, obtenus par centrifugation, ou par agrégation, sont tout à fait utilisables pour des études préliminaires de l'effet bystander radio-induit. De plus, ils permettent de recréer un environnement physiologique proche du cartilage. En effet, comme on peut le voir sur la figure 41, on retrouve au sein de ces modèles des éléments caractéristiques de la MEC du cartilage articulaire, comme le collagène de type II (132).



Figure 41 : Coupe de Pellets (P) et de Micro-masses (M), après coloration par immunohistochimie du collagène de type I, II et X, barre d'échelle = 100µm (132)

- Il existe également d'autres structures 3D visant à corriger des défauts du cartilage et qui pourraient être utilisées pour étudier le phénomène bystander. C'est le cas des matrices polysaccharidiques, poreuses, dans lesquelles peuvent se développer des CSM. Une étude récente datant de 2016 utilisant des micro aimants permettant la condensation de chondrocytes, a permis de recréer un modèle 3D de cartilage avec des caractéristiques physiologiques très proches de la réalité d'un cartilage. Notamment, comme on peut le voir sur la figure 42, les auteurs ont montré une production accrue de fibres de collagène dans les modèles dits « dynamiques » (dans lesquels ont été incorporés des aimants), permettant la condensation des chondrocytes et donc une production de MEC plus importante que dans les conditions dites « statiques » (sans aimants) (133).

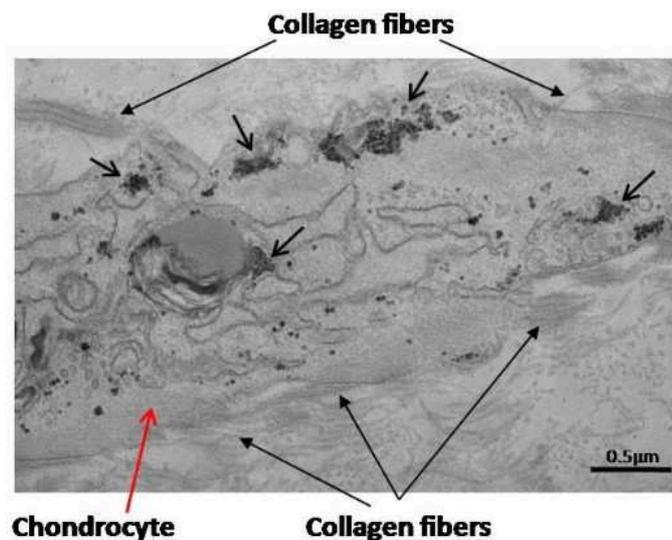


Figure 42 : Coupe (70 nm) d'un modèle polysaccharidique poreux contenant des chondrocytes, produisant de la MEC (microscopie électronique en transmission, objectif : X6000) (133)

III. 7. Effet bystander et CHS

Actuellement, en recherchant sur pubmed les mots clés suivants : « bystander radiation chondrosarcoma », une seule étude porte sur ce sujet. En effet, le CHS étant une pathologie plutôt rare et l'effet bystander radio-induit un phénomène récemment découvert, il existe peu de recherches s'intéressant à ce phénomène. C'est d'ailleurs pour cela qu'il est nécessaire d'en connaître davantage sur cet effet dans le cadre du traitement d'un CHS par radiothérapie, et notamment par hadronthérapie utilisant des ions-carbone.

C'est le Dr. Masaru Wakatsuki, et son équipe, qui a publié en 2012 cet article : « Differential Bystander Signaling Between Radioresistant Chondrosarcoma Cells and Fibroblasts After X-Ray, Proton, Iron Ion and Carbon Ion Exposures » (110), portant sur l'étude de l'effet bystander dans des cellules de CHS et de fibroblastes après une irradiation classique par rayons-X mais aussi après une exposition à des protons, des ions fer et des ions carbone.

III. 7. 1 Protocoles d'étude

- Lignées cellulaires utilisées : les cellules HTB-94, aussi connues sous le nom de SW 1353, qui sont des cellules de CHS. Les cellules AG0 1522 qui sont des cellules de fibroblastes humains.
- Paramètres d'irradiation des cellules :
 - rayons-X : 250 kVp, 12 mA, débit de dose de 2,1 Gy/min.
 - ions-fer : 151 keV/ μm
 - ions-carbone : 13 keV/ μm
 - protons : 0,2 keV/ μm

Le débit utilisé, était de 0,1 à 2 Gy/min selon l'ion et la dose utilisée.

- Protocole utilisé pour l'étude de l'effet bystander : un système de co-culture avec insert, dont le fond est composé d'une membrane, comportant des pores (1,0 mm), a été utilisé pour étudier l'effet bystander. Ce système permet l'échange des facteurs entre les cellules irradiées (dans le fond des puits) et les cellules bystander (dans l'insert).

Les cellules bystander sont laissées en contact avec les cellules irradiées pendant 2 heures après irradiation. Plusieurs expériences ont été réalisées avec les cellules de CHS (HTB-94) irradiées, émettrices des signaux bystander et les fibroblastes (AG0 1522), non-irradiées, réceptrices des signaux, et inversement. Les contrôles sont traités de la même façon mais

sans irradiation.

- Expériences utilisées afin d'étudier la radio-résistance des cellules : des tests de clonogénicité après irradiation des cellules HTB-94 et AG0 1522 ont été effectués.
- Expériences utilisées pour l'étude du phénomène bystander : le nombre de micro-noyaux (MN) et le marquage de la protéine 53BP1 (p53 binding protein 1) afin de déterminer la présence de dommage à l'ADN dans les cellules bystander.

III. 7. 2 Résultats

- Les tests de clonogénicité ont permis de mettre en évidence la radio-résistance des cellules de CHS utilisées.
- Les expériences de comptage de MN et de marquage de la protéine 53BP1 dans les cellules de CHS bystander n'ont pas permis de mettre en évidence un effet bystander radio-induit dans ces cellules.
- Les expériences de comptage de MN dans les fibroblastes bystander (en co-culture avec des cellules de CHS irradiées) ont permis de mettre en évidence un effet bystander radio-induit dans ces cellules (*Figure 43*).
- Les expériences de comptage de MN dans les cellules de CHS bystander (en co-culture avec des cellules de fibroblastes irradiées) n'ont pas permis de mettre en évidence un effet bystander radio-induit dans ces cellules.

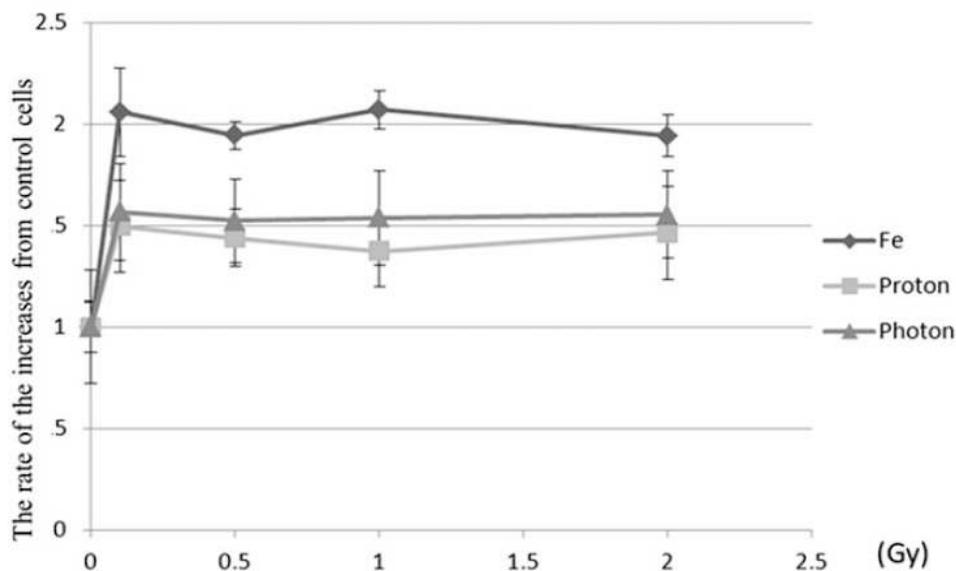


Figure 43 : Taux relatif d'augmentation du nombre de MN dans les fibroblastes bystander après co-culture avec les cellules de CHS irradiées (110)

III. 7. 3 Conclusion et discussion

Ces expériences ont permis de mettre en évidence d'une part la capacité des cellules de CHS à émettre des signaux bystander et d'autre part la capacité des fibroblastes à les recevoir et à induire une réponse bystander. Toutefois, il semblerait que les cellules de CHS ne soient pas capables d'induire de réponse bystander *via* leurs propres signaux, mais aussi à ceux émis par des fibroblastes irradiés. Cependant, comme nous avons pu le voir dans les chapitres précédents l'étude de l'effet bystander est très dépendante de l'outil utilisé pour les analyses. D'où la pertinence de poursuivre l'étude de l'effet bystander radio-induit par des cellules de CHS irradiées avec d'autres protocoles et d'autres techniques d'analyses. Enfin, l'utilisation d'autres lignées cellulaires, notamment concernant les cellules bystander, est particulièrement intéressante dans le cadre du traitement d'un CHS. En effet, les CHS prenant naissance au niveau du cartilage, il est pertinent de s'intéresser à l'effet des facteurs bystander émis par des cellules de CHS irradiées sur des cellules de chondrocytes non irradiés. Enfin cette étude a été menée dans des conditions particulières, en absence de CO₂, il serait très intéressant d'utiliser une tension en oxygène de 2% pour la culture des cellules, afin de refléter la physioxie du cartilage.

III. 8. Effet bystander et radiothérapie

L'objectif de l'étude du Dr. McMahon était de voir si les observations faites *in vitro*, montrant une contribution significative de l'effet bystander dans la mort des cellules, à des doses classiquement utilisées en radiothérapie, pouvaient être rapprochées à un modèle *in vivo* et ainsi prédire l'impact de cette signalisation cellulaire radio-induite sur les traitements par radiothérapie. Ces expériences ont porté sur des patients atteints de cancer de la prostate, traités par radiothérapie conventionnelle. Les auteurs ont utilisé un modèle mathématique, afin de générer des plans incorporant la signalisation cellulaire radio-induite, après un traitement par radiothérapie. Ils ont pu mettre en évidence que la prise en charge de l'effet bystander conduit à des différences significatives, entre la dose ajustée, tenant compte de l'effet bystander, et la dose physique utilisée pour le traitement. Ainsi ils ont montré, qu'au niveau des tissus se trouvant irradiés à faible dose, à proximité de la tumeur, les volumes réellement impactés par le traitement (prenant en compte l'effet bystander) étaient beaucoup plus larges que prévu. Tandis que pour les régions irradiées à forte dose, au niveau de la tumeur, l'augmentation du volume réellement impacté était moindre (*Figure 44*) (134).

Dose physique

(distribution de la dose appliquée lors du plan de traitement)

Effet bystander

(signalisation cellulaire radio-induite, autour de la zone irradiée, en vert)

Intégration de l'effet bystander dans le plan de traitement dit « ajusté »

(élargissement du volume ciblé)

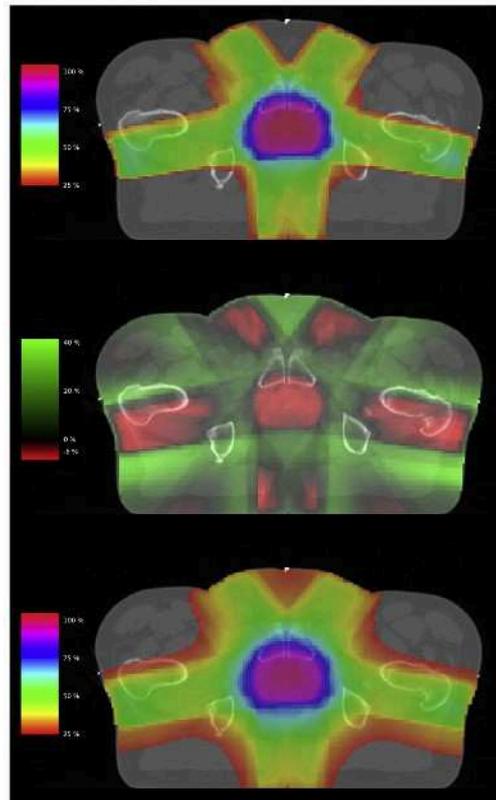


Figure 44 : Coupe IMRT (Intensity modulated radiation therapy) illustrant le plan de traitement d'un cancer de la prostate en tenant compte de l'effet bystander (134)

Ainsi, cette étude permet de montrer l'impact non négligeable de l'effet bystander radio-induit lors d'un traitement par radiothérapie, particulièrement au niveau des tissus sains voisins de la tumeur. Des études cliniques doivent encore être menées afin d'en connaître davantage sur ce phénomène et de pouvoir ajuster de façon adéquate les plans de traitement par radiothérapie des patients, notamment *via* des techniques de radiothérapie innovantes, telles que les ions-carbone.

Objectifs

Cette thèse s'intéresse à un cancer particulier, le chondrosarcome, connu pour sa radio-résistance à une radiothérapie conventionnelle, il est inscrit en première ligne pour le traitement par ions-carbone. Toutefois qu'en est-il de l'effet de voisinage induit par ce type d'irradiation ?

Pour répondre à cette problématique, plusieurs questions se sont posées :

- 1) Les cellules de CHS sont-elles capables d'émettre des facteurs bystander ?
- 2) Quels sont ces facteurs bystander ?
- 3) Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène ?
- 4) Quel est l'intérêt d'utiliser un modèle de culture cellulaire tridimensionnel pour étudier l'effet bystander ?

1) Les cellules de CHS sont-elles capables d'émettre des facteurs bystander ?

Pour répondre à cette première question, nous allons irradier des cellules de CHS, puis nous allons mettre en contact des cellules de cartilage, les chondrocytes, avec les facteurs bystander provenant des cellules de CHS irradiées. Ensuite nous allons étudier la survie de ces chondrocytes ainsi que leur capacité à proliférer. Ces expériences nous permettent de mettre en évidence la capacité des cellules de CHS à émettre des signaux bystander, ainsi que la capacité des chondrocytes à les recevoir.

2) Quels sont ces facteurs bystander ?

Afin d'étudier la nature des facteurs bystander émis par les cellules de CHS irradiées, nous allons étudier le milieu contenant ces facteurs. Pour cela nous allons d'abord chauffer et diluer le milieu. Ensuite, nous allons réaliser une étude ciblée des cytokines présentes ou non dans ce milieu bystander. Enfin nous allons réaliser une étude globale du sécrétome des cellules de CHS irradiées, sans *a priori*, afin d'identifier d'éventuelles protéines cibles responsables de l'effet bystander observé. Ces études nous permettront de caractériser davantage les facteurs bystander émis par les cellules de CHS irradiées.

3) Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène ?

Pour comprendre la mécanistique de l'effet bystander, nous allons réaliser des études globales du protéome des cellules bystander, afin de décrypter les protéines impliquées et donc les voies de signalisation activées par les facteurs bystander.

4) Quel est l'intérêt d'utiliser un modèle de culture cellulaire tridimensionnel pour étudier l'effet bystander ?

L'effet bystander radio-induit repose sur la sécrétion de facteurs bystander par des cellules irradiées qui vont induire un effet biologique au niveau des cellules non irradiées voisines, proche de celui observé dans les cellules irradiées. Ainsi, il est pertinent de vouloir étudier ce phénomène en 3D. En effet, cela permettra de recréer des conditions physiologiques plus proches de la réalité, notamment en termes de tension en oxygène et surtout un modèle 3D permettra de recréer un gradient de diffusion des facteurs bystander.

Ces problématiques seront développées dans la partie « Résultats » de cette thèse.

Partie 2 :

MATERIELS ET

METHODES

I. Culture cellulaire

I. 1. Lignées cellulaires

Dans le cadre de ce projet, deux lignées cellulaires ont été principalement utilisées :

- La lignée de CHS SW 1353 (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Allemagne), a été initiée à partir d'un chondrosarcome de grade II de l'humérus droit provenant d'une femme caucasienne âgée de 72 ans. La lignée SW 1353 est définie comme diploïde et mutante pour TP53 p.Val203Leu (135) (136).
- La lignée de Chondrocytes T/C-28a2, a été obtenue auprès du laboratoire du Professeur Mary B. Goldring, Hôpital de Chirurgie Spéciale, Weill Medical College de l'Université Cornell (New York, New York). Ces cellules ont été initiées par transfection de cultures primaires de cartilage costal provenant d'une femme de 15 ans par un vecteur rétroviral exprimant le virus simien SV40 codant pour l'antigène T. L'immortalisation a ensuite été obtenue en changeant les gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, tels que P53 et RB (Rétinoblastome) (137) (138).

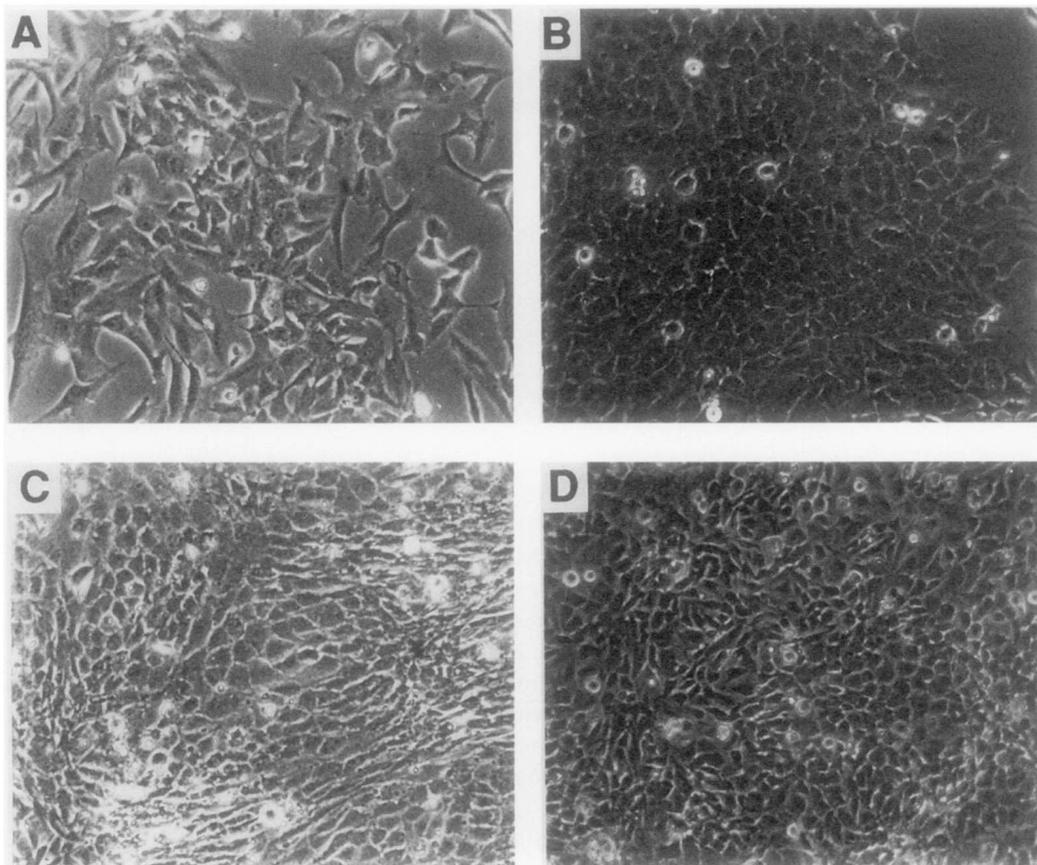


Figure 45 : Photographie (microscope à contraste de phase) de chondrocytes humain costaux après immortalisation avec pZipNeoSV40 qui ont permis la sélection de la lignée T/C-28a2

- La figure 45 représente les différentes phases de sélection conduisant à la sélection des cellules T/C-28a2. La photographie A (*Figure 45A*) montre des cellules T/C-28a2 ayant été sélectionnées pour leur résistance à la néomycine et leur capacité de prolifération après 20 passages en culture. Sur la figure 45B, on peut voir les mêmes cellules après 6 mois de culture et ayant été cultivées sur des plaques recouvertes d'agarose 1 % afin de sélectionner des « agrégats » similaires à ceux obtenus avec des cultures de chondrocytes normaux. La figure 45C présente une mono-couche cellulaire bien homogène qui a permis l'obtention de la lignée T/C-28a2 puis après 40 passages et une nouvelle sélection sur agarose 1 % l'obtention de la lignée T/C-28a2 (*Figure 45D*).

D'autres lignées cellulaires ont été utilisées pour quelques expériences :

- La lignée cellulaire AG01522, qui a été initiée à partir d'explants de prépuce prélevé ante mortem 1 jour plus tôt. La morphologie cellulaire est semblable à celle des fibroblastes. Le caryotype est 46, XY; homme diploïde normal.
- La lignée cellulaire CH2879, qui a été établie à partir d'une biopsie d'une patiente de 35 ans atteinte d'un chondrosarcome de grade III au niveau de la paroi thoracique. Cette lignée est caractérisée au niveau génétique par une expression de la Vimentine, HNK-1, HBA-71, Ki-67, la cycline D1, Fli-1, S-100, p21, p27 et p53 ; mais également par une absence de l'expression de la cytokératine, EMA, p14, p16, MDM2, Rb et des antigènes c-erb-b2 (139).
- La lignée cellulaire Oums-27, qui a été établie à partir d'une biopsie d'un chondrosarcome de grade III de l'humérus gauche d'un homme de 65 ans. Cette lignée est caractérisée au niveau phénotypique par un temps de doublement de 41 heures, des cellules de forme polygonales et qui deviennent rondes à confluence. Au niveau génétique, cette lignée est caractérisée par une structure et une distribution aberrante des chromosomes. De plus cette lignée est décrite comme mutée pour la protéine p53 et comme exprimant les ARNm des collagènes de type I, II et III et des protéoglycanes (140).
- La lignée cellulaire C20/A4 a également été établie au sein du laboratoire du Professeur Mary B. Goldring. Ces cellules ont été initiées par transfection de cultures primaires de cartilage costal provenant d'un garçon de 5 ans par un vecteur rétroviral exprimant le virus simien SV40 codant pour l'antigène T (137). La figure 46 présente des chondrocytes humains ayant été transfectés par un plasmide exprimant le virus simien SV40 (*Figure 46A*). La photographie B présente les mêmes cellules obtenues après 60 passages qui sont à l'origine de la lignée stable C20/A4.

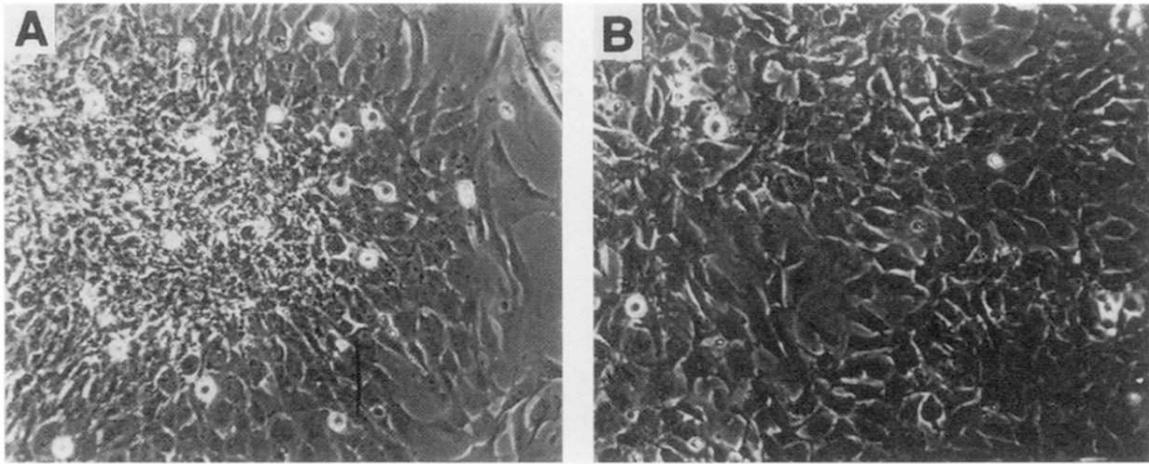


Figure 46 : Photographie (microscope à contraste de phase) de chondrocytes humain costaux après immortalisation avec pSV40 qui ont permis la sélection de la lignée C20/A4

I. 2 Conditions de culture

Les lignées cellulaires : T/C-28a2, SW 1353, C20/A4 et Oums-27 ont été cultivées dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium Eagle, M5650, Sigma-Aldrich), complété de 5% de sérum de veau foetal (SVF, Lonza), 2 mM de L-glutamine (Gibco) et 1 % d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine, Sigma-Aldrich). Les cellules AG01522 ont été cultivées dans le même milieu mais complété de 10 % de SVF.

Les cellules de la lignée CH2879 ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, Sigma) supplémenté de 10 % de SVF, de 1 % de Glutamine et 1 % d'antibiotiques.

Toutes les expériences ont été réalisées en atmosphère humide avec 5 % de CO₂ et des conditions de physioxie avec 2% d'O₂ à 37 ° C, dans un incubateur Tri-Gas Heracell™ 150i.

II. Irradiation

II. 1 Irradiation par rayons-X

Pour les irradiations par rayons-X, nous avons utilisé l'irradiateur Pxi XradSmart 225CX© (*Figure 47*) sur la plateforme de Cycéron (Caen, France). Le contrôle de la dose délivrée aux échantillons est réalisé grâce à une chambre d'ionisation de détection interne vérifiant le débit de dose ou DAP (cGy/min). L'irradiateur est paramétré à une tension de 225kV. L'intensité est paramétré à 1 mA

pour les irradiations inférieurs à 0,5 Gy ce qui correspond à un débit de 0,2 Gy / min. L'intensité est paramétré à 10 mA pour les irradiations comprises entre 0,5 et 8 Gy correspondant à un débit de dose de 2 Gy/min. Lors des irradiations photoniques, l'arrivée du faisceau est verticale et les supports d'irradiations sont donc horizontaux.

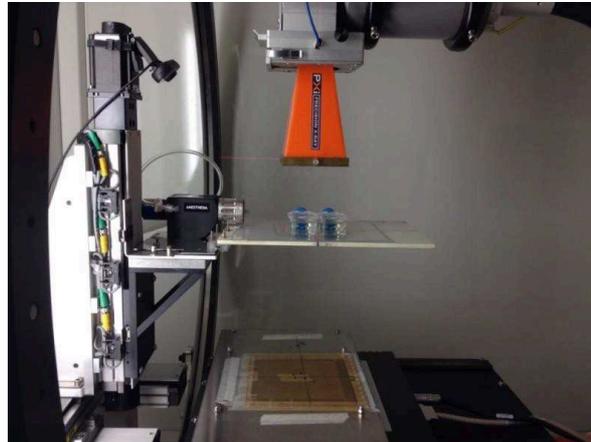
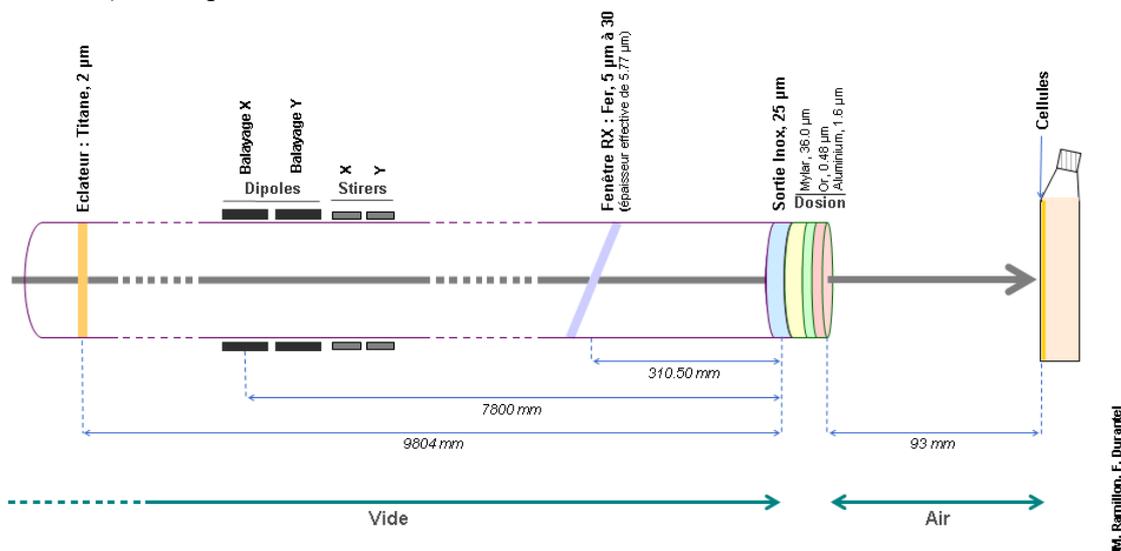


Figure 47 : Photographie de l'irradiateur Pxi XradSmart 225CX©

II. 2. Irradiation par ions-carbone

II. 2. 1 Ions-carbone : GANIL

Le GANIL (Caen, France) est, à ce jour, le seul complexe en France permettant de réaliser des irradiations cellulaires avec des ions lourds accélérés. Ainsi, la plupart des irradiations ont été réalisées au GANIL *via* la ligne de faisceau IRABAT ((Irradiation Basse Température), schématisée sur la figure 48, où sont représentés les différents composants (éclateur, dipôles, stirers, détecteur de RX, dosimètre) ainsi que les distances entre eux.



J.M. Ramillon, F. Durantei

Figure 48 : Schéma de la ligne haute énergie IRABAT (du GANIL)

Pour ces expériences, nous avons sélectionné deux TEL afin de se rapprocher le plus possible de la réalité clinique lors d'un traitement par hadronthérapie:

- un bas TEL de 28 keV/ μm , qui correspond au plateau (*Figure 22*) retrouvé au niveau des tissus sains en amont de la tumeur, utilisé pour l'irradiation des lignées cellulaires de chondrocytes (T/C-28a2 et C20/A4) ;
- un haut TEL de 73 keV/ μm qui correspond au SOBP au niveau de la tumeur, utilisé pour l'irradiation des lignées cellulaires de CHS le second LET correspondait à la région SOBP de la tumeur (SW 1353, Oums-27 et CH2879).

Ces deux TEL ont été obtenus par un faisceau d'ions-carbone (12C) natif de 95 MeV/A avec ou sans dispositif PMMA (Polyméthacrylate de méthyle) inséré entre la sortie du faisceau et le porte-échantillon : sans PMMA (faisceau natif), le TEL est de 28 keV/ μm ($2 \text{ Gy} = 4,46 \times 10^7$ particules/ cm^2) ; et en utilisant le PMMA de 16,9 mm d'épaisseur, le faisceau est dégradé et le TEL est de 73 keV/ μm ($2 \text{ Gy} = 1,71 \times 10^7$ particules/ cm^2). Lors des irradiations 12C, l'arrivée du faisceau est horizontale et les supports d'irradiations sont donc verticaux (*Figure 49*).



Figure 49 : Photo du porteur d'échantillon robotisé (ligne IRABAT)

II. 2. 2 Ions-carbone : HIMAC

Quelques répétitions d'expériences utilisant un faisceau d'ions-carbone ont été réalisées à l'HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator) à Chiba au Japon et plus précisément au NIRS (National Institute of Radiological Sciences). Les ions-carbone ont été accélérés avec une énergie initiale de 290 MeV/n et les cellules ont été irradiées au niveau du SOBP (pic de Bragg étalé) de 6 cm, à un TEL moyen de 50 keV/ μm . De la même façon qu'au GANIL, l'arrivée du faisceau est horizontale et les supports d'irradiations verticaux, ainsi les flasques sont placées à la verticale durant toute la durée de l'irradiation (*Figure 50*). Afin de ne pas laisser les cellules à l'air libre durant l'irradiation, les flasques sont remplies de milieu de culture avant d'être irradiées. L'excédant de milieu est ensuite retiré à la fin de l'irradiation.



Figure 50 : Photo de la sortie du faisceau et du porteur d'échantillons de l'HIMAC

III. Etude de l'effet bystander : protocole de transfert de milieu

Afin d'étudier l'effet Bystander, nous avons mis au point un protocole de transfert de milieu décrit dans la figure 51. Les cellules sont irradiées puis, au retour de l'irradiation, le milieu de culture est changé pour limiter les effets dus à l'irradiation du milieu de culture et ainsi étudier uniquement les effets dus aux facteurs bystander sécrétés dans le milieu par les cellules irradiées. Ensuite, 24 h après l'irradiation, le milieu contenant les facteurs bystander est récupéré, centrifugé, puis placé sur les cellules non-irradiées et laissé en contact 24 h. Enfin, 24 h après le transfert de milieu (et 48 h post-irradiation), l'effet du transfert de milieu est étudié sur les cellules bystander, c'est à dire sur les

cellules qui ont reçu le milieu contenant les facteurs bystander sécrétés par les cellules irradiées pendant 24h post-irradiation.

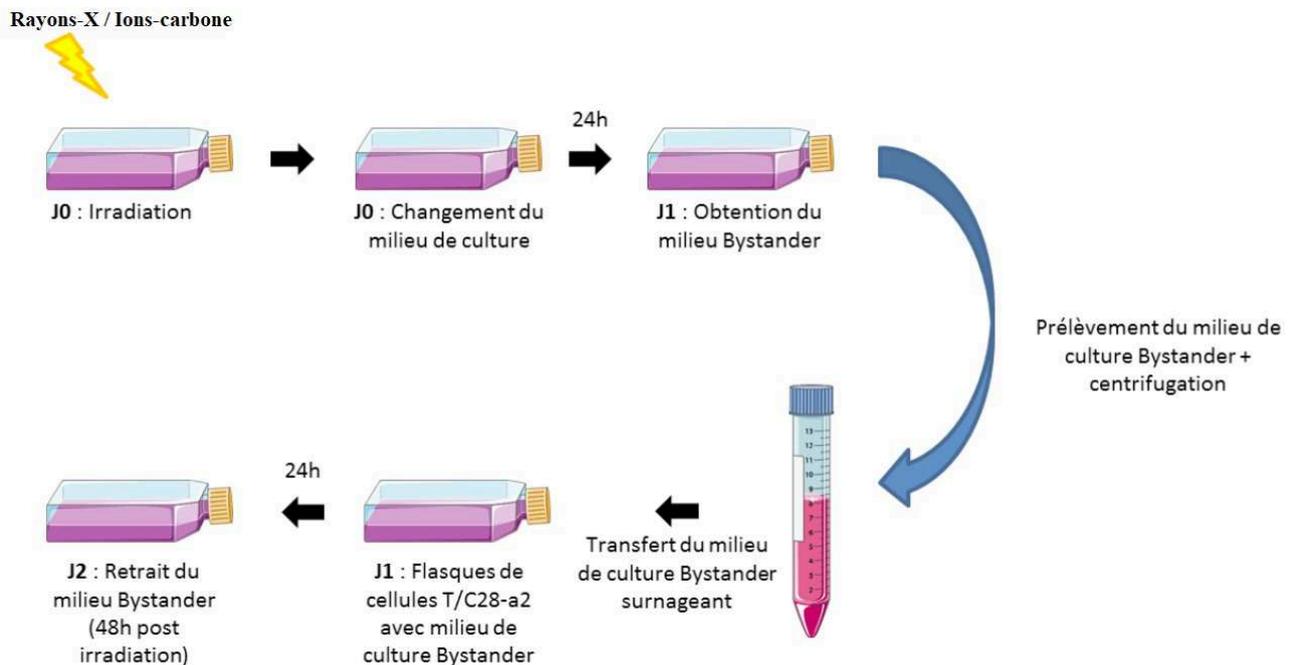


Figure 51 : Protocole de transfert de milieu

A l'issue de ce protocole de transfert de milieu, plusieurs expériences ont été menées afin d'étudier l'effet bystander :

- des études de survie cellulaire par des tests de clonogénicité
- des études de prolifération par cell trace
- des études d'impédancemétrie par la technologie Xcelligence
- des études du cycle cellulaire par CMF (Cytométrie en Flux)
- des études de la viabilité cellulaire par des marquages au bleu trypan
- des études des dommages à l'ADN par le comptage des MN
- des études du protéome des cellules bystander par électrophorèse bidimensionnelle

III. 1 Protocole d'étude de la survie clonogénique des cellules

III. 1. 1 Survie clonogénique des cellules irradiées

Afin d'étudier l'effet bystander radio-induit, il est nécessaire de connaître les effets directs dus à l'irradiation des cellules pour pouvoir les comparer à ceux obtenus au sein des cellules bystander et

ainsi pouvoir quantifier l'importance de l'effet observé. Les tests de clonogénicité permettent d'évaluer la sensibilité des cellules à différentes qualités de rayonnements.

Ainsi pour étudier les effets directs de l'irradiation *via* des tests de clonogénicité, les cellules ont été irradiées à confluence dans des flasques de 25 cm² (T25). Après irradiation, le milieu a été changé immédiatement, puis les flacons ont été replacés dans l'incubateur pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées et re-platées avec des dilutions appropriées dans les plaques 6 puits, afin d'atteindre environ 100 et 1000 clones par puits dans des échantillons témoins. Après une période d'incubation d'au moins 10 jours, les colonies ont été colorées avec une solution de cristal violet (cristal violet à 0,3 % p/v dans de l'éthanol à 20 % v/v). Les colonies composées d'au moins 50 cellules ont été comptées visuellement. Un modèle linéaire-quadratique de survie cellulaire a été utilisé pour ajuster les résultats obtenus avec l'irradiation aux rayons X selon l'équation :

$$SF (Dose) = \exp (\alpha \times Dose + \beta \times Dose^2)$$

Un modèle linéaire de survie cellulaire a été utilisé pour ajuster les résultats obtenus avec l'irradiation aux ions-carbone selon l'équation :

$$SF (Dose) = \exp (a \times Dose)$$

Toutes les courbes ont été analysées à l'aide d'un outil dédié au calcul de survie clonogénique, le logiciel CS-cal (www.oncoexpress.de).

III. 1. 2 Survie clonogénique des cellules bystander

Cette expérience a été utilisée pour estimer l'effet bystander radio-induit avec un protocole de "transfert de milieu" de cellules irradiées vers des cellules non-irradiées. Ainsi, comme décrit dans la figure 51, le milieu provenant des cellules irradiées est transféré sur les cellules bystander. A l'issue des 24h de contact entre les cellules non-irradiées et le milieu provenant des cellules irradiées, les cellules dites « bystander » sont récoltées et re-platées à faible densité dans des plaques 6 puits, comme décrit dans le paragraphe précédent concernant les essais clonogéniques pour l'étude des effets directs.

III. 2 Protocole d'étude de la prolifération des cellules (Cell trace)

Le kit CellTrace Far Red (C34564 Invitrogen®) permet un marquage *in vitro* des cellules afin de tracer plusieurs générations à l'aide de la dilution de colorants par cytométrie en flux. Ce marqueur est un fluorochrome excitable pour une longueur d'onde de 633-635nm et émettant à une longueur d'onde de 661nm. Il diffuse librement à l'intérieur des cellules et se lie de façon covalente aux

amines intra-cellulaires. C'est un marqueur stable et bien conservé par les cellules au cours de leurs divisions cellulaires. Le principe de la méthode par dilution de fluorescence repose sur un marquage fluorescent des cellules au niveau de leur membrane plasmique mais aussi de leur cytoplasme. Lorsque les cellules se divisent, l'intensité de la fluorescence diminue de moitié car elle est répartie de façon égale entre les cellules filles (*Figure 52*).

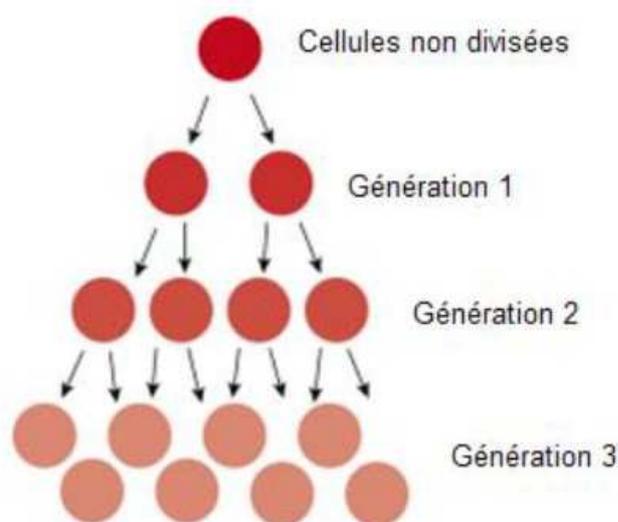


Figure 52 : Principe du marqueur CellTrace

Dans un premier temps, il faut préparer le marqueur CellTrace. Pour cela il faut ajouter 20 μL de DMSO (Diméthyl sulphoxide 836.73230 VWR Prolabo) au réactif CellTrace Far Red. On obtient alors une solution à une concentration de 1 mM. Il faut ensuite réaliser une dilution pour obtenir la concentration voulue. Pour observer 5 générations ou plus, il est conseillé d'utiliser des concentrations de 5 μM à 10 μM . Nous utiliserons une concentration de 10 μM pour le marquage. La dilution s'effectue dans du PBS.

Ensuite, il faut marquer les cellules à analyser. Le marquage s'effectue sur des cellules à confluence. Les cellules à marquer sont au préalableensemencées dans des flasques T12,5. On retire le milieu de culture de la flasque, on rince au PBS, puis, on ajoute 0,5 mL de marqueur à la concentration souhaitée. On laisse ensuite incuber 20 minutes à 37°C. Au bout de 20 minutes, on retire la solution de marqueur, on rince deux fois avec 2,5 mL de milieu de culture complet préchauffé, permettant d'enlever la totalité du marqueur en excès, et on remplace la flasque avec 2,5 mL de milieu de culture complet pendant 10 minutes dans l'incubateur avant toute nouvelle manipulation.

On réalise le marquage des cellules juste avant le transfert de milieu bystander. Une fois marquées

les cellules sontensemencées à faible densité afin d'avoir l'espace suffisant pour proliférer pendant 5 jours. Elles reçoivent ensuite le milieu bystander. Enfin l'échantillon marqué est analysé par CMF *via* le cytomètre Gallios Beckman Coulter. L'analyse est réalisée à J5 du marquage cellulaire sauf pour la manipulation Bystander où elle est réalisée à J6 du marquage. Ceci permet la visualisation d'au moins 5 générations, les temps de doublement des deux lignées cellulaires étant estimé à environ 26 h pour chacune. Les cellules marquées sont préparées de la façon suivante pour être analysé par CMF :

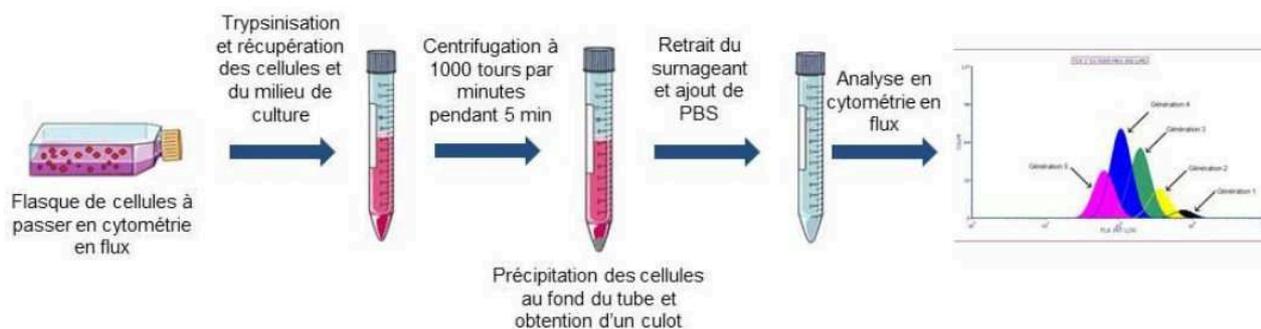


Figure 53 : Protocole de préparation des cellules pour la cytométrie en flux

On place le tube dans de la glace pour le transport. Les résultats de la cytométrie en flux sont ensuite exploités à l'aide du logiciel FCS 6 Express Plus. Chaque génération cellulaire apparaît donc comme un pic différent sur l'histogramme de l'analyse en cytométrie. Le nombre de pics ainsi que l'amplitude entre les pics sont donc un reflet de la prolifération cellulaire.

III. 3 Protocole d'étude de l'impédancemétrie (Xcelligence)

Afin d'étudier l'effet des facteurs bystander sécrétés par les cellules SW 1353 irradiées sur les cellules T/C-28a2 non-irradiées, nous nous sommes intéressés à la technologie Xcelligence (ACEA, Ozyme, France) et plus précisément, nous avons utilisé l'instrument multi-plaques Real-Time Cell Analyzer (RTCA MP). Cette technique permet de mesurer l'impédance, c'est à dire la résistance au passage d'un courant électrique à la surface des cellules adhérentes. Ainsi en l'absence de cellules, le courant électrique circule librement à travers le milieu de culture, complétant ainsi le circuit entre les électrodes. Tandis que lorsque les cellules adhèrent et prolifèrent sur les électrodes, une résistance au courant électrique apparaît, fournissant une indication extrêmement sensible du nombre de cellules, de leur taille, de leur morphologie et de leur capacité à adhérer (*Figure 54 A et B*). L'ensemble de ces paramètres permet d'établir un index cellulaire qui sera proportionnel au nombre de cellules se trouvant dans les puits de culture (*Figure 54 C*).

Ainsi, pour réaliser cette étude, les cellules SW 1353 ont été irradiées à confluence en T25 à 0/0,05/0,1/0,2/0,5/2/8 Gy. Les cellules T/C-28a2 ont, elles, étéensemencées (7500 cellules/puits) dans les plaques 96 puits équipées d'électrodes et qui permettent la mesure d'impédance. Les plaques ont ensuite été placées sur le système RTCA MP dans un incubateur à 37°C. Au retour de l'irradiation le milieu a été changé par du milieu neuf et après 24 h de contact avec les cellules irradiées, ce milieu a été recueilli puis centrifugé à 2000 g et placé dans les puits (E-Plate View 96) annoté pour chaque condition (0/0,05/ 0,1/0,2/0,5/2/8 Gy) sur les cellules T/C-28a2 non irradiées. Les cellules bystander sont restées pendant 6 jours en contact avec le milieu conditionné et l'impédance a été mesurée en continu. Les écarts-types des réplicats des puits ont été analysés avec le logiciel RTCA.

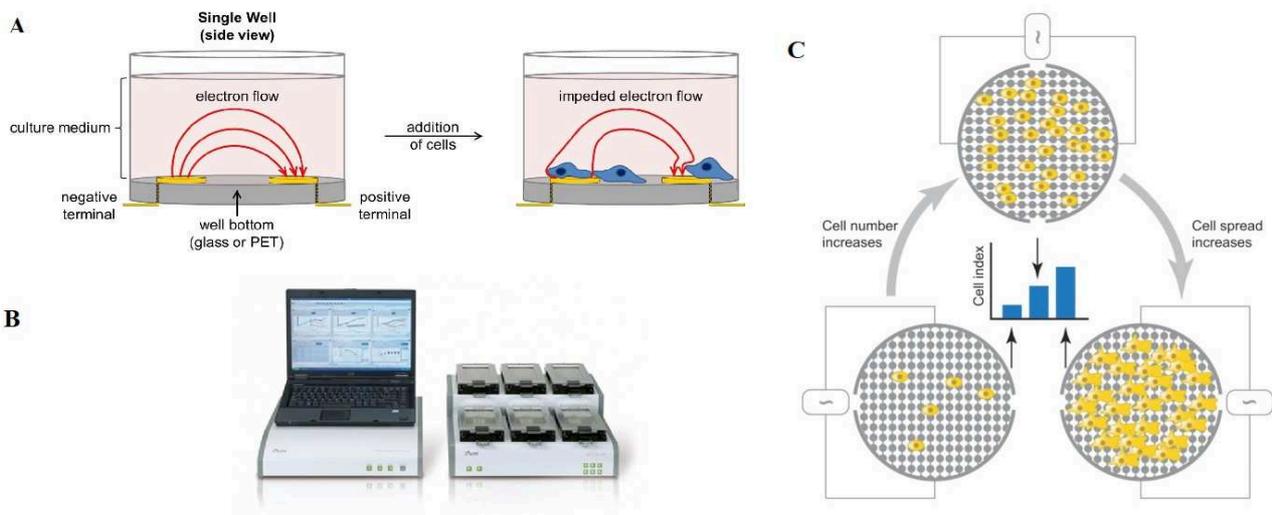


Figure 54 : Principe de la technologie Xcelligence

III. 4 Protocole d'étude du cycle cellulaire (CMF)

Cette technique permet de déterminer dans quelle phase du cycle cellulaire les cellules se trouvent à un instant t donné par marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (IP). C'est un agent intercalant qui fluoresce en rouge à 600 nm une fois excité à 488 nm. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN. La plupart des cellules se trouvent en phase G1 parce que c'est l'étape la plus longue. En phase S, l'ADN commence à se dupliquer alors l'intensité de la fluorescence augmente et en phase G2/M, la quantité d'ADN est doublée par rapport à celle contenue en phase G1 (Figure 55).

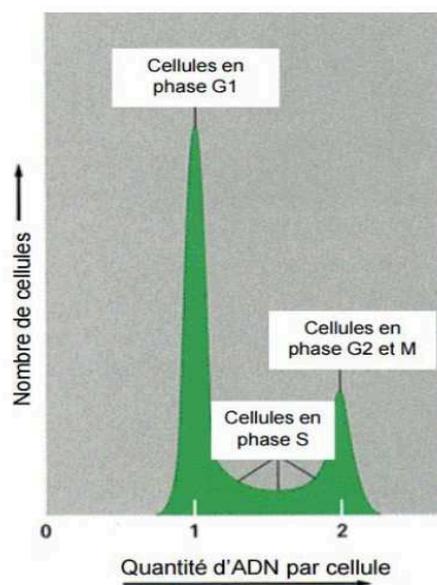


Figure 55 : Exemple d'un profil de cytométrie en flux de cellules marquées à l'IP

Au retour de l'irradiation les cellules sont divisées en 4 flasques (correspondant au 4 temps d'analyses : 24/48/72/96h) pour chacune des doses (0/0,1/2/8 Gy) à des densités décroissantes afin de pouvoir croître dans les flacons de culture jusque 96 h post-irradiation. Concernant les conditions bystander, les cellules sont réparties également à densité décroissante dans les flacons de culture puis reçoivent le milieu bystander qui est laissé en contact avec les cellules de 24 à 96h avant l'analyse. A l'issue des 24/48/72/96h post-irradiation ou post-transfert de milieu bystander, on récupère, dans un tube de 15 mL, le milieu de culture contenant éventuellement des cellules détachées. On réalise un lavage au PBS que l'on récupère lui aussi au sein du tube de 15 mL. Le tapis cellulaire est ensuite détaché par trypsinisation puis ajouté au tube contenant les cellules en suspension. Le tube de 15 mL est centrifugé à 700 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est ensuite éliminé par retournement et le culot est repris dans 350 μ L de PBS, 300 μ L de la suspension cellulaire en PBS sont fixés par de l'éthanol à une concentration finale de 70%. Une fois fixées, les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 3900 rpm puis l'alcool est éliminé par retournement. Le culot cellulaire est repris avec 5 mL de PBS à 37°C puis réhydraté à 37°C pendant 30 minutes. Les cellules sont de nouveau centrifugées à 3900 rpm pendant 5 minutes puis le PBS est éliminé par retournement. Le culot obtenu est repris dans une solution d'iodure de propidium (IP) (Propidium iodide solution P4864, Sigma Aldrich) supplémenté en RNases, il est ensuite homogénéisé par un vortex. Les tubes sont conservés à 4°C à l'obscurité avant de pouvoir procéder à l'analyse par le cytomètre en flux (Gallios).

III. 5 Protocole d'étude de la viabilité cellulaire (bleu trypan)

De la même façon que le protocole décrit dans la figure 51, nous avons réalisé un transfert de milieu provenant des cellules SW 1353 irradiées (à 0 Gy, 0,1 Gy, 2 Gy et 8 Gy) sur les cellules T/C-28a2 dans le but d'étudier l'effet de ce transfert de milieu sur la viabilité des cellules bystander. À l'issue des 24 heures de contact entre les cellules bystander et le milieu provenant des SW 1353 irradiées, les cellules sont réensemencées dans différents flacons de culture puis après 24h de culture les cellules sont décollées. On prélève alors 100 µL de la suspension cellulaire à laquelle on ajoute 100µL de Bleu Trypan (Trypan Blue solution T8154, Sigma Aldrich). Le Bleu Trypan pénètre dans les cellules mortes dont la membrane est perméabilisée, ainsi les cellules apparaissent bleues, les cellules vivantes sont capables d'expulser le colorant et apparaissent réfringentes. Ensuite on dépose quelques microlitres du mélange (Bleu Trypan + cellules) sur une cellule de comptage que l'on place dans le compteur automatique de cellules (TC20 automated cell counter, BioRad). Ce dernier évalue le nombre total de cellules de l'échantillon ainsi que le taux de viabilité cellulaire.

III. 6 Protocole d'étude des dommages à l'ADN (comptage de MN)

Le test des micronoyaux est un essai de génotoxicité pour la détection des micronoyaux dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux peuvent provenir de fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire sans centromère), ou de chromosomes entiers qui ne peuvent migrer vers les pôles pendant l'étape d'anaphase de la division cellulaire. Pour réaliser ce test, il est nécessaire d'utiliser la cytochalasine B, un inhibiteur de polymérisation de l'actine qui induit un blocage de la cytokinèse. La cytochalasine B permet l'identification et l'analyse sélective de la fréquence des micronoyaux dans les cellules qui ont complété une mitose, ces cellules étant binucléées.

Afin d'étudier l'effet direct d'une irradiation, les cellules T/C-28a2 ont étéensemencées dans des chambres de culture sur lame Nunc™ Lab-Tek™ (154534PK – ThermoScientific). Ces lames ont ensuite été irradiées à différentes doses (0/0,1/0,2/0,5/1/2 Gy). Pour l'étude de l'effet bystander les cellules T/C-28a2 ont étéensemencées sur des lamelles en verre dans des plaques 24 puits. En parallèle, des cellules SW 1353 ont étéensemencées en T25 pour être irradiées à 0/0,1/0,2/0,5/1/2/8 Gy et produire le milieu bystander. Le traitement à la Cytochalasine B ne devant pas excéder 20 heures, ce dernier est ajouté 4 heures post-irradiation (ou 4 h post transfert de milieu). Après 24h post-transfert ou post-irradiation, le milieu de culture est éliminé, les lames sont rincées avec du

PBS puis fixées par une solution de méthanol/acide acétique (9/1) pendant 20 minutes à 4°C. Les lamelles sont montées avec le milieu de montage Invitrogen (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI - P36941) qui permet la coloration des noyaux par un marquage au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Les lames sont laissées à 4°C jusqu'au jour de l'observation au microscope à fluorescence (Axio Imager Z2, Zeiss). Les résultats sont analysés en calculant la fréquence des cellules bi-nucléées contenant un ou plusieurs micronoyaux pour 1000 cellules bi-nucléées. Les micronoyaux ont été identifiés selon les critères de Countryman et Heddle (1976) : diamètre inférieur à 1/3 du noyau principal, non-réfractilité, ne touchant pas le noyau, et de la même couleur que le noyau ou plus léger. Des expériences indépendantes ont été réalisées avec trois puits pour chaque condition de traitement.

III. 7. Protocole d'étude du protéome des cellules bystander

III. 7. 1 Protocole d'étude du protéome des cellules bystander : Electrophorèse bidimensionnelle

III. 7. 1. 1 Préparation de l'échantillon protéique

Les cellules T/C-28a2 sontensemencées en T75 (flasque de 75 cm²), autant que nécessaire afin d'obtenir suffisamment de protéines (250 µg/gel), à confluence elles reçoivent le surnageant bystander provenant des cellules SW 1353 irradiées à 0/0,1/2 Gy. Après 24 h de contact avec le milieu bystander, le tapis cellulaire est rincé *via* du PBS puis les cellules sont détachées par trypsinisation, la trypsine est stoppée par l'ajout de milieu complet. La suspension cellulaire est ensuite centrifugées à 2000 rpm pendant 5 minutes et le culot cellulaire repris dans 2ml de PBS et transféré dans un micro-tube puis de nouveau centrifugé et congelé à -80°C en culot sec jusqu'au dosage.

III. 7. 1. 2 Lyse et dosage des protéines (Bradford)

Le culot protéique est décongelé puis repris dans une solution de RIPA (Lysis and extraction buffer 89900, Thermo Fisher Scientific), on ajoute 1ml de RIPA supplémenté en anti-protéases et anti-phosphatases pour 100 millions de cellules. L'extraction se fait à 4°C, sur glace, à l'aide de seringues. L'échantillon est passé 10 fois dans la seringue puis après 2 minutes de pause il est de nouveau passé 10 fois dans une seringue (seringue à insuline de 1 ml), il reste ensuite 1 h sur glace pour terminer la lyse des protéines. La solution, une fois lysée, est centrifugée à 20 000g, 1h à 4°C.

Le surnageant contenant les protéines est récupéré puis dosé par la technique de Bradford.

Le dosage des protéines se fait par la méthode colorimétrique de Bradford selon les instructions du kit Bradford Protein Assay (Biorad). On prélève 1 à 2 µl de la solution, que l'on ajoute au réactif de Bradford, une gamme étalon est établie en parallèle par l'ajout d'une quantité connue de BSA (Bovin Serum Albumin) dans chaque tube, en duplicat. A l'issue du dosage, le volume de solution protéique nécessaire pour déposer 250 µg de protéines sur chaque strip est calculé selon la droite d'étalonnage obtenue grâce à la gamme, par report de l'absorbance de chaque échantillon sur la courbe étalon, comme on peut en voir un exemple sur la figure 56.

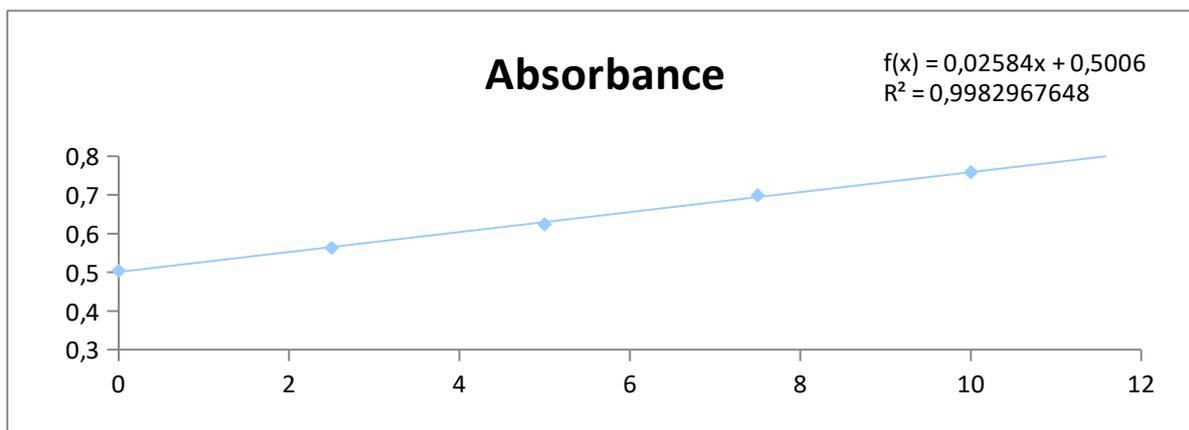


Figure 56 : Exemple de courbe d'étalonnage obtenue lors d'un dosage de Bradford

III. 7. 1. 3 Focalisation des protéines (première dimension)

L'électrophorèse bidimensionnelle implique une séparation des protéines d'un échantillon en deux dimensions :

- la première dimension, *via* l'utilisation de strips (petites bandes de gels), permet la séparation des protéines selon leur point iso-électrique ;
- la seconde dimension, *via* une SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis), permet la séparation des protéines réparties sur la strip selon leur poids moléculaire.

III. 7. 1. 3. 1. Réhydratation passive

Les échantillons protéiques ont été repris en tampon de solubilisation (Biorad) de la façon suivante : volume de protéines nécessaire pour avoir 250 µg de protéines par gel + tampon de solubilisation qsp (quantité suffisante pour) 300 µl par strip. Pour la focalisation des protéines nous avons utilisé

des strips immobiline[®] Drystrip pH 4-7, 18cm (GE Healthcare, 17-1233-01). Les 300µl de solution contenant les protéines ont été déposés sur chacune des strips permettant leur réhydratation durant tout la nuit à température ambiante.

III. 7. 1. 3. 1. Réhydratation active

Les strips se trouvant dans un rack spécialisé sont ensuite placées dans le générateur PROTEAN IEF CELL (Biorad) pour l'étape de réhydratation active. Le programme suivant est appliqué à l'ensemble des strips :

- 1) 50V / 9h
- 2) 500V / 1h
- 3) 1000V / 1h
- 4) 10 000V / 33 000V/hr
- 5) 10 000V / 27 000V/hr
- 6) 200V / 99h

A la fin de ces 6 étapes, les protéines se retrouvent « figées » à leur point de focalisation selon leur point iso-électrique. C'est la fin de la première dimension.

III. 7. 1. 4 Electrophorèse SDS-PAGE (seconde dimension)

III. 7. 1. 4. 1. Préparation des gels

Les gels sont préparés de la façon suivante, selon le nombre de gels souhaités, en général par 13 :

	nb gel	vol final	acrylamide	tp gel 4x	H2Oodd	SDS 20%	APS 10%	Temed
12%	6	400	120	100	178,0	2,0	2,0	0,1
	8	500	150	125	222,5	2,5	2,5	0,1
	10	600	180	150	267,0	3,0	3,0	0,2
	12	680	204	170	302,6	3,4	3,4	0,2
	13	750	225	188	333,8	3,8	3,8	0,2

Tableau 12: Préparation des solutions pour gels d'acrylamide 12% homogène 20*20cm

Soit par exemple, pour préparer 13 gels d'acrylamide à 12%, homogène de 20*20cm : 225 ml de solution d'acrylamide (Euromedex), 188 ml de tampon Tris à 1,5 M (ph : 8,8), 333,8 ml d'eau (filtrée, MiliQ), 3,8 ml d'APS (Amonium PerSulfate en solution à 10%) et 200 µl de Tetramethylethylenediamine (Temed, Biorad). La solution d'acrylamide est ensuite déposée dans un

système permettant le coulage (Dodecca Cell, Biorad) de 13 gels maximum, chaque gel est contenu dans des cassettes en verre. Après environ 2 h de polymérisation, les gels sont stockés à 4°C jusqu'au jour de l'électrophorèse.

III. 7. 1. 4. 2. Equilibration des strips

Pour l'étape d'équilibration des strips, il est nécessaire de préparer 2 solutions au préalable :

- la première solution contenant : urée 6,75 M ; SDS 2% ; glycérol 30% ; Tris pH 8,8 50 mM ; DTT (Dithiothréitol) 130 mM ;
- la seconde solution contenant : urée 6,75 M ; SDS 2% ; glycérol 30% ; Tris pH 8,8 50 mM ; iodoacetamide 130 mM.

Ces solutions vont permettre de réaliser les 4 bains nécessaires à l'équilibration des strips :

- 1er et 2ème bain : solution DTT (10 minutes/bain)
- 3ème et 4ème bain : solution iodo (10 minutes/bain)

III. 7. 1. 4. 3. Migration des protéines sur les gels

Chaque strip est ensuite placée en haut de chacun des gels d'acrylamide 12% avec un petit papier imprégné de marqueur de taille. L'ensemble est fixé au gel par l'ajout d'une solution d'agarose à 1%. Les gels + strips + marqueurs de taille sont déposés dans le système de migration Dodecca Cell (Biorad) contenant environ 25l de tampon TGS (Tris Glycine SDS). Le tout est raccordé à un système réfrigérant pour réguler la température pendant l'électrophorèse. Le générateur est d'abord activé pendant 1 h à 1 W pour permettre l'entrée des protéines dans le gel d'agarose. Puis toute la nuit à 80 V (17 h à 8 h environ).

III. 7. 1. 5 Coloration des gels et analyse

A l'issue de la migration des protéines selon leur point iso-électrique et leur poids moléculaire, les gels sont sortis des cassettes en verre puis traités de la façon suivante :

Etape	Solution	Temps
1) Fixation	- Ethanol 30% - Acide acétique 5%	1h ou toute la nuit
2) Lavage	Eau MiliQ	1 rinçage rapide puis 3 x 10 min
3) Sensibilisation	Thiosulfate de Na 0,02% (soit 2ml de Thio 10%/1l)	1 min
4) Lavage	Eau MiliQ	2 min
5) Coloration	- AgNO ₃ 0,2% (soit 2g/1l) - Formaldéhyde 0,011% (soit 300µl /1l)	30 à 45 min
6) Lavage	Eau MiliQ	5 à 10 sec
7) Révélation	- Na Carbonate 85mM (soit 24g/1l) - Na thiosulfate 0,00125% (soit 125µl de thio 10%/1l) - Formaldéhyde 0,011% (soit 300µl/1l)	À déterminer (environ 5 min)
8) Stop	- Tris (40g/1l) - Acide acétique (16,5ml/1l)	30 min
9) Préservation	- DMSO 2% (soit 20ml/1l) - Acide acétique 5%	48h

Tableau 13: Coloration des protéines au nitrate d'argent

Une fois colorés, les gels sont scannés grâce à un scanner spécialisé GS-900 (Biorad).

III. 7. 1. 6 Analyse d'image

L'analyse d'image se fait grâce au logiciel Samespot. L'ensemble des images des gels à analyser est entré dans le logiciel. Un gel dit de "référence" est sélectionné. Les différents spots présents sur le gel sont ensuite détectés et on obtient une cartographie de l'ensemble des spots. Selon les conditions que l'on souhaite comparer les gels sont matchés les uns avec les autres et alignés un à un avec le gel de référence afin d'identifier les spots variants. Ainsi plusieurs spots seront sélectionnés par le logiciel comme variants d'une condition à une autre. Certains verront leur intensité augmentée ou diminuée tandis que d'autres seront présent uniquement dans certaines conditions et absents dans d'autres. Certains spots peuvent également être légèrement "décallé" ou présent en "chapelet" ce qui correspond à une même protéine mais légèrement modifiée, phosphorylée ou glycosylée par exemple. Les spots variants sont ensuite analysés un à un par le logiciel selon différents critères

comme le fold qui est un facteur permettant d'évaluer l'augmentation ou la diminution d'un spot, une analyse statistique permettant d'évaluer la significativité des variations est également réalisée. A l'issue de cette analyse une liste de spots variant est établie afin de pouvoir les prélever sur un gel préparatif.

III. 7. 1. 7. Prélèvement de spots et analyse par spectrométrie de masse

III. 7. 1. 7. 1. Prélèvement et préparation des spots pour l'analyse

Chaque spot a été repéré, prélevé manuellement et transféré dans un micro-tube de 1,5 ml. Les étapes suivantes ont été réalisées par la plateforme : « Plateforme de spectrométrie de masse protéomique » à Montpellier. Les spots ont ensuite été lavés avec 0,2 ml d'eau / spot puis 0,2 ml de NH_4HCO_3 à 3,25 mM. Les spots ont ensuite été décolorés par deux rinçages avec 0,2 ml d'acétonitrile 50 % (dilué en NH_4HCO_3 25 mM). Les spots ont été déshydratés avec 0,2 ml de CH_3CN à 100 % et finalement laissés à sécher à température ambiante. Chaque spot a ensuite reçu 10 μl d'une solution de trypsine (Promega, Madison, USA) à une concentration de 0,0125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ diluée en NH_4HCO_3 pendant 10 min à 4°C (sur glace). A l'issue de ces 10 minutes, 10 μl de NH_4HCO_3 à 25 mM ont été ajoutés et les échantillons ont été maintenus de nouveau 10 minutes mais à température ambiante. La digestion a été effectuée pendant une nuit à 37 ° C, puis les peptides ont été acidifiés par l'ajout de 10 μl d'acide formique à 2%. Les tubes ont été vortexés pendant 10 minutes et les surnageants ont été transférés dans un insert en verre de 0,5 ml. Les peptides ont été extraits des spots 2D par addition de 20 μL d'acétonitrile à 80% dilués en acide formique (FA) aqueux à 2% puis les surnageants obtenus ont été ajoutés dans l'insert en verre de 0,5 ml. L'ensemble a été séché dans une centrifugeuse sous vide. Les peptides ont ensuite été re-suspendus dans 8 μl de FA 2% avant d'être analysés par LC-MS / MS.

III. 7. 1. 7. 2. Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée *via* un système de chromatographie liquide à haute performance U3000 NCS nano (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) et un spectromètre de masse Q Exactive Plus Orbitrap. 6 μl de peptides ont été chargés sur une pré-colonne (Thermo Scientific PepMap 100 C18, granulométrie 5 μm , taille de pores 100 Å, longueur de 300 μm x 5 mm) de l'échantillonneur automatique Ultimate 3000 pendant 3 min à un débit de 10

$\mu\text{L}/\text{min}$. La séparation des peptides est effectuée par chromatographie en phase inverse à un débit de 300 nL/min sur une nano-colonne Thermo Scientific en phase inverse (Thermo Scientific PepMap C18, granulométrie : 2 μm , pores : 100 Å, taille : 75 μm id x 50 cm de longueur). Après les 3 min, la valve de la colonne a été commutée pour permettre l'élution des peptides de la pré-colonne sur la colonne analytique. Le solvant A (de l'eau + 0,1% de FA) et le solvant B (80% d'ACN, 20% d'eau + 0,1% de FA). Le gradient linéaire utilisé était de 4 à 40% de solvant B en 19 minutes, puis de 40 à 90% de solvant B de 19 à 20 minutes. La durée totale de traitement était de 35 minutes, y compris une étape de lavage et une étape de ré-équilibrage. Le nano-HPLC et le spectromètre ont été couplés à une source de nano-électrospray. Les peptides ont été passés en phase gazeuse par une ionisation à ions positifs à 1,7 kV par électrospray. Les échantillons ont ensuite été analysés en mode d'acquisition dépendante des données (DDA). Dans le DDA, les 10 principaux précurseurs ont été acquis entre 375 et 1500 m/z avec une fenêtre d'isolation de 2 m/z, une exclusion dynamique de 40 secondes, une énergie de collision normalisée de 27 et des résolutions de 70 000 pour MS et 17 500 pour MS2. Le spectre a été enregistré avec le logiciel Xcalibur (4.1.31.9) (Thermo Fisher Scientific).

III. 7. 1. 7. 3. Identification des protéines

Enfin, les données de spectrométrie de masse ont été traitées à l'aide du logiciel Proteome Discoverer (version 1.4.0.288, Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne) et le moteur de recherche Mascot (version 2.4, Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>). Les données de spectrométrie de masse ont ensuite été rentrées dans SwissProt avec la taxonomie Homo sapiens (20215) selon les paramètres suivants: trypsine comme enzyme, 1 clivage autorisé, carbamidométhylation de cystéine comme modification fixe et acétylation N-terminale de la protéine, désamidation de l'asparagine et de la glutamine, pyroglutamylation N-terminale de la glutamine et du glutamate, oxydation de la méthionine, sous forme de modifications variables. La tolérance de masse a été fixée à 10 ppm en balayage complet et à 0,02 Da pour les ions fragmentés. Les protéines ont été validées lorsqu'elles contenaient au moins deux peptides ayant un score supérieur à 26 et un taux de découverte erroné inférieur à 1%.

III. 7. 2 Protocole d'étude du protéome des cellules bystander en co-culture

L'objectif de ce projet est de mettre en place une stratégie qui permet d'étudier l'effet bystander dans une culture de cellules en mélange. Notamment par la mise en évidence de biomarqueurs

spécifiques du phénomène bystander. La stratégie de protéogénomique repose ainsi sur la mise en œuvre de co-culture des cellules SW 1353 irradiées avec des cellules T/C-28a2 non-irradiées au sein d'une même flasque. Une analyse très approfondie de leur protéome respectif, tenant compte des protéoformes spécifiques de chaque lignée permet ainsi de mettre en évidence les protéoformes induites lors du phénomène bystander. La préparation des échantillons cellulaires individuels et en mélange a été réalisée au sein du laboratoire puis les analyses ont été effectuées sur la plateforme "ProGénoMix", au laboratoire Li2D du CEA de Marcoule pour être analysé.

III. 7. 2. 1. Création d'une banque de données RNAseq

III. 7. 2. 2. 1. Extraction et séquençage d'ARNm

Sept millions de cellules de chaque lignée cellulaire ont été récoltées, trypsinisées, lavées avec un tampon PBS et centrifugées. Le culot obtenu a été homogénéisé dans 600 µL de tampon RNA Later du kit d'extraction RNeasy mini (Qiagen). Ensuite, les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit RNeasy Mini selon les directives du fournisseur. Les ARN totaux extraits ont été élués avec 50 µl d'eau exempte de RNase et quantifiés avec un spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermofisher). La pureté et la quantification des échantillons a été vérifiée avec l'analyseur TapeStation d'Agilent. Le séquençage de l'ARNm a été effectué par le séquenceur à protons du torrent Ion. Le flux de travail comprend quatre étapes principales: la construction de la bibliothèque, la préparation du modèle, le séquençage et l'analyse. La bibliothèque a été préparée avec le kit de préparation de bibliothèque ARNm-Seq de Lexogen selon le protocole du fournisseur. Le séquençage a été réalisé avec le kit de séquençage des protons ioniques après la quantification de l'ADNc avec le système HS D1000 Screen Tape® d'Agilent sur instrument TapeStation (Agilent) et la préparation de la matrice d'ADNc avec le kit Ion Proton Template OT2 HiQ 200 (Thermofisher). Le séquençage était orienté de 3' → 5'. Au total, 50 209 727 lectures de la lignée cellulaire SW-1353 d'une longueur moyenne de 150 pb ont été séquencées correspondant à 7 569 018 185 nucléotides et un total de 47 083 396 lectures de la lignée cellulaire TC28 / A2 ont été séquencées correspondant à 7 207 809 861 nucléotides.

III. 7. 2. 2. 2. Assemblage SW 1353 et TC28 RNAseq

D'abord les séquences d'ARN ont été entrées dans le logiciel FastQC afin de vérifier la qualité des séquences. Avant l'assemblage, aucun pré-traitement des séquences n'a été effectué. Les lectures ont

été reportés sur le dernier assemblage de génome humain de référence GCF_000001405.35_GRCh38.p9_genomic.fna (GRCh38) avec le logiciel Star (version 2.5.2b). Une fois cette cartographie effectuée, deux méthodes d'assemblage RNAseq ont été utilisées pour produire un transcriptome. La première méthode, guidée par le génome, était basée sur l'utilisation de Cufflinks. Ce logiciel est conçu pour détecter des transcriptions et des épissages alternatifs qui fournissent une annotation modifiée du génome en fonction du mappage des lectures. Les données ont ensuite été extraites avec le module Gffread inclus dans le package Cufflinks pour produire le fichier fasta. La seconde méthode utilisait l'assemblage *de novo* réalisé avec Trinity permettant la détection SNV basée sur le graphe De Bruijn. Les paramètres par défaut ont été utilisés pour réaliser l'assemblage, y compris la longueur de Kmer fixée à 25 nucléotides.

III. 7. 2. 2. Préparation des échantillons protéiques en mélange

Les cellules SW 1353 sont encencées en flasques (T25) à 50 % ($\frac{1}{2}$ T25) de confluence puis une fois qu'elles ont adhéré à la flasque, elles sont irradiées à 0/0,1/2 Gy. Au retour de l'irradiation 50 % ($\frac{1}{2}$ T25) de cellules T/C-28a2 est ajouté à la flasque contenant les 50 % de cellules SW 1353 irradiées par rayons-X ou ions-carbone. Après 24h de co-culture entre cellules irradiées et cellules non-irradiées, le tapis cellulaire est rincé avec du PBS puis les cellules sont détachées par trypsinisation, la trypsine est stoppée par l'ajout de milieu complet. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 2000 rpm pendant 5 minutes et le culot cellulaire repris dans 2 ml de PBS et transféré dans un micro-tube puis de nouveau centrifugé et congelé à -80°C en culot sec jusqu'au dosage. La lyse et le dosage s'effectue de la même façon que décrit dans le paragraphe : “III. 7. 1. 2 Lyse et dosage des protéines (Bradford)”. Le volume de chaque échantillon est ajusté avec du RIPA (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA USA 02451) pour obtenir une concentration finale à 2,25 mg/ml en protéine.

III. 7. 2. 3. Analyse des échantillons en mélange

III. 7. 2. 3. 1. Préparation des échantillons, extraction des protéines et protéolyse

Une première étape de fragmentation du protéome est nécessaire, elle est réalisée par SDS-PAGE à partir des échantillons protéiques à 2,25mg/ml de protéines provenant des cellules en mélange décrit précédemment. Ainsi 30 μ g de mélange (+ 10 μ l de tampon Laemmli) ont été chargés sur les gels NuPAGE (Invitrogen), 10 puits, avec un gradient de 4 à 12% pour effectuer une électrophorèse de

15 minutes à 200 volts. La migration a généré pour chaque échantillon une bande colorée par la coloration Coomassie Blue Safe (Invitrogen) suffisamment grande pour couper trois bandes égales de 2,5 mm. Chaque bande a ensuite été traitée séparément avec de la trypsine puis a été décolorée séparément avec de l'eau ultra pure et du méthanol, traitée avec du dithiothréitol et de l'iodoacétamide, puis protéolysée avec de la trypsine de qualité séquentielle (Roche) additionnée de 0,01% de tensioactif ProteaseMAX (Promega). Les mélanges de peptides résultants ont ensuite été séparés par chromatographie en phase inverse avant d'être analysés par spectrométrie de masse.

III. 7. 2. 3. 2. spectrométrie de masse en tandem

Les mélanges de peptides résultants ont été analysés en mode dépendant des données *via* un système de chromatographie liquide à haute performance Ultimate 3000 (Dionex LC-Packing, Thermofisher) et un spectromètre de masse Q Exactive. D'abord 4 μ L de chaque échantillon dessalés ont été injectés dans une pré-colonne capillaire à inversion de phase C18 PepMap TM 100 (emballage LC), puis séparés dans une colonne nano-C18 PepMap TM 100 (emballage LC) durant 120 minutes par un gradient de 20% à 80% de CH_3CN , 0,1% d'acide formique. Une fois séparés, les spectres de masse des peptides ont été acquis dans la plage complète m/z 350-1800, avec une résolution de 60000, une cible AGC à 3.106 et une sélection de peptides selon la méthode Top20 pour leur fragmentation. Les spectres de masse MS2 ont été acquis avec une cible AGC fixée à 105, un compte de boucle de 60 ms, une fenêtre d'isolation à 1,6 m/z , une résolution à 15 000 et un balayage dans une plage de masse de 200 à 2000 m/z .

III. 7. 2. 3. 3. Identification des protéines

Enfin, les données de spectrométrie de masse ont été entrées dans la base de données créer spécifiquement au laboratoire Li2D pour l'analyse de nos mélanges cellulaire par l'étudiant en thèse Yannick Cogne. Cette base de données se compose de l'ensemble des données protéomiques issue de l'analyse du protéome des cellules SW 1353, auquel ont été ajouté les données de la base de données Swissprot (human) ainsi que les données issues de la banque de données RNAseq créée selon les instructions décrites dans le paragraphe : "III. 7. 2. 1. Création d'une banque de données RNAseq". L'ensemble de ces informations ont ainsi permis la création de la banque de données nommées : "SWT-B3".

IV. Etude des facteurs bystander

IV. 1. Etude des facteurs bystander *via* des tests de clonogénicité

IV. 1. 1. Protocole d'étude de la thermosensibilité des facteurs bystander

De la même façon que dans le protocole décrit dans la figure 51, l'effet bystander a été étudié *via* des expériences de transfert de milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées (0/0,1/2 Gy) vers des cellules T/C-28a2 non-irradiées. Toutefois avant le transfert le milieu (sans SVF) a été préalablement chauffé à 70°C et 95°C. Un témoin avec un milieu conditionné non chauffé a été réalisé. Après 24 h de contact, la survie clonogénique des cellules bystander a été analysée de la même façon que pour un test de clonogénicité classique décrit dans le paragraphe : « III. 1. 2 Survie clonogénique des cellules bystander ».

IV. 1. 2. Protocole d'étude de la concentration en facteurs bystander

De nouveau c'est le protocole de transfert de milieu qui a été utilisé pour cette étude. Cependant avant d'être transféré sur les cellules bystander, le milieu a été dilué à 50%, 25% et 10% avec du milieu neuf. Un témoin (100%) avec un milieu conditionné non dilué a été effectué. Après 24h de contact, la survie clonogénique des cellules bystander a été analysée de la même façon que pour un test de clonogénicité classique décrit dans le paragraphe : « III. 1. 2 Survie clonogénique des cellules bystander ».

IV. 2. Etude des cytokines

IV. 2. 1. Etude d'un panel de 13 cytokines inflammatoires par un test d'immuno-billes

Ce protocole est utilisé pour analyser un panel de 13 cytokines (IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL12P70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33) avec le kit Biolegend (Human Inflammation Panel, réf 740118) sur le milieu bystander provenant de cellules de CHS irradiées. Pour cette expérience, les cellules SW 1353 ont été irradiées à confluence dans des flacons T25 cm². Le milieu des flacons irradiés a été changé immédiatement après irradiation et remplacé par du milieu neuf, 24 heures après l'irradiation, les milieux bystander ont été recueillis et préparés selon

les instructions du kit Biolegend (141). Les échantillons ont été analysés en utilisant un cytomètre de flux Gallios (Beckman Coulter, France).

IV. 2. 2. Etude de 4 cytokines par ELISA multiplex

Pour cette étude, le panel « inflammatoire V-PLEX Human Pro 4 plex » (réf K15053D-1) a été utilisé et a permis la quantification de 4 cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α) par ELISA multiplex avec le kit MSD. Les cellules SW 1353 ont été irradiées à confluence dans des T25 cm², le milieu a été changé immédiatement après irradiation et remplacé par du milieu neuf (sans sérum); 24 heures après l'irradiation, les milieux bystander ont été recueillis, centrifugés 10 minutes à 3000 tours par minute et additionnés d'anti-protéases et d'anti-phosphatases. Les échantillons ont été stockés à -80 ° C jusqu'à l'analyse selon les instructions du kit MSD.

IV. 3. Etude du sécrétome des cellules irradiées

IV. 3. 1. Préparation des échantillons

A confluence, les cellules SW 1353 ont été irradiées à 0 et 0,1 Gy par rayons-X puis au retour de l'irradiation, le tapis cellulaire a été rincé (5 à 10 fois) avec du PBS et 3 ml de milieu de culture sans sérum a été ajouté dans chaque flasque. Après 24 h de sécrétion des facteurs bystander, le milieu a été récupéré, centrifugé puis congelé à -80°C, avant d'être envoyé à Marcoule pour analyse.

IV. 3. 2. Analyse du sécrétome

Avant d'être analysé en spectrométrie de masse, les échantillons de milieu conditionné ont été précipité au TCA (Acide TriChloroacétique) et déposé sur gel afin de concentrer les protéines. Ils ont ensuite été analysés de la même façon que les échantillons en mélange selon le protocole décrit dans le paragraphe : « III. 7. 2. 3. 2. spectrométrie de masse en tandem ».

V. Etude de l'effet bystander en 3D

V. 1. Culture cellulaire en 3D

V. 1. 1 Protocole de mise en culture en 3D

À partir d'une suspension cellulaire issue de cellules cultivées en 2D, le volume nécessaire pour 1 000 000 de cellules par modèle 3D est prélevé. Il est centrifugé pendant 10 minutes (4°C, 600 rpm). Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est éliminé puis le culot cellulaire est repris avec le volume nécessaire afin d'avoir 1 million de cellules dans 500 µL pour chaque modèle 3D. Chaque tube est centrifugé de nouveau pendant 10 minutes (4°C, 600 rpm). Les tubes contenant chacun un modèle 3D sont placés dans l'incubateur (37°C, 2% CO₂) afin de permettre la formation de « petites billes » à partir des culots cellulaires nommés « pellets ».

V. 1. 2 Milieu et condition de culture 3D

Composition du milieu de culture pour les pellets :

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose D6429, Sigma Aldrich)
- SVF 5%
- BMP-2 (BMP-2, Novus) 10 ng/mL
- Insuline (CC-4147, Lonza) 0,1 mM
- Acide ascorbique (CC-4147, Lonza) 0,1 mM
- Glutamine 2 mM
- Hydrocortisone (CC-4147, Lonza) 0,1%

Les pellets sont ensuite placées en atmosphère humide avec 5 % de CO₂ et des conditions de physioxie avec 2 % d'O₂ à 37 ° C, dans un incubateur Triac Gas Heracell™ 150i.

A partir de 3 à 5 jours de culture, le pellet se forme et le milieu de culture peut être changé tous les 2 à 3 jours. A la fin de l'expérience les pellets sont rincés au PBS, fixés au PFA (paraformaldehyde) 4 % (200 µl/pellet) pendant 3 h à température ambiante et de nouveau rincé au PBS, transféré dans de l'éthanol 70 % et prêt à inclure.

V. 2. Histologie des modèles 3D

V. 2. 1. Inclusion et coupe en paraffine

Afin d'étudier les modèles cellulaires 3D, il est nécessaire de les inclure en paraffine puis de réaliser des coupes. Ces expériences ont été réalisées au sein du Laboratoire d'Ingénierie Ostéo Articulaires et Dentaire (LIOAD unité INSERM U1229/RMeS) à Nantes dirigé par Jérôme Guicheux (PFSC3M, PT Histologie, INSERM, UMRS1229-RMeS).

On commence par placer nos échantillons dans différentes cassettes (Cassettes HistoScreen™ Tissue-Loc™ - Thermofisher) que l'on annote au préalable. Ces dernières sont plongées dans l'alcool 70% afin de rincer et fixer les échantillons. On place ensuite les différentes cassettes dans le panier de l'automate à déshydratation (STP120-Thermofisher). En effet, les pellets doivent préalablement être débarrassés de toute leur eau. La déshydratation des échantillons se fait progressivement en plongeant les cassettes dans 7 bains successifs d'alcool éthylique : 2 bains d'alcool à 80 %, 2 bains d'alcool à 95 % et 3 bains d'alcool à 100 %. Les échantillons sont ensuite plongés dans des bains de méthylcyclohexane (solvant organique équivalent du xylène) qui a pour rôle de remplacer l'alcool contenu dans les pellets ce qui nous permettra d'inclure ensuite en paraffine les échantillons. Pour finir les échantillons passent dans deux bains de paraffine à chaud successifs afin d'obtenir une imprégnation aussi complète que possible des pellets suite à l'élimination de l'eau. Pour les pellets, on programme P3 sur l'automate de déshydratation.

Réactifs	P3
Alcool 80 %	5 minutes
Alcool 80 %	5 minutes
Alcool 95 %	10 minutes
Alcool 95 %	10 minutes
Alcool 100 %	15 minutes
Alcool 100 %	30 minutes
Alcool 100 %	30 minutes
Méthylcyclohexane	15 minutes
Méthylcyclohexane	15 minutes
Méthylcyclohexane	30 minutes
Paraffine	30 minutes
Paraffine	30 minutes
Total	3h45

Tableau 14 : Détail du programme P3 (déshydratation des pellets)

On passe ensuite au processus d'inclusion en paraffine qu'on réalise avec un appareil à enrobage

(TES Valida–Medite). On place les pellets à l'aide d'une pince dans des moules en acier inoxydable de taille appropriée. Le fond du moule est ensuite rempli avec de la paraffine liquide, il est nécessaire de travailler à chaud car la température de fusion de la paraffine est d'environ 58°C. Le fond de chaque moule est ensuite refroidi de manière à fixer les pellets puis on complète le remplissage du moule avec de la paraffine liquide qu'on laisse ensuite refroidir sur une surface plane à -12°C. Après quelques minutes, le bloc est démoulé et prêt à être coupé.

La coupe des échantillons se fait au microtome (RM255–Leica). Le bloc est fixé sur le microtome de telle façon que l'axe optique soit parallèle à la lame du rasoir. On dégrossit ensuite lentement le bloc à 7 µm afin d'atteindre le prélèvement en entier en évitant de le léser. Puis, on réalise un ruban de quelques coupes à 3,5 µm qu'on jette afin d'égaliser la surface du bloc et d'éliminer de potentiels artéfacts ayant pu se produire lors du dégrossissage. On étale le ruban de coupes sur le bain-marie à 38°C et il faut attendre le défripement complet du ruban. On recueille le nombre de coupes voulu (ici 3), de 3,5 µm sur une lame que l'on annote au préalable. Les lames sont ensuite placées à l'étuve à 37°C pendant une nuit entière pour sécher.

V. 2. 2. Colorations des lames

Afin de caractériser nos modèles 3D, nous réalisons diverses colorations :

- Bleu alcian ;
- Trichome de Masson ;
- Hématoxyline – Éosine – Safran.

V. 2. 2. 1. Colorations au Bleu alcian

Le Bleu Alcian met en évidence les glycoaminoglycanes (GAG). Les chaînes de GAG peuvent être liées par covalence à une protéine pour former des protéoglycanes. Les protéoglycanes sont les composants essentiels de la matrice extracellulaire. Pour réaliser la coloration, un automate de coloration (Shandon Gemini ES) est utilisé selon le protocole détaillé dans le tableau 15. Les résultats attendus sont une couleur rouge pour les noyaux et légèrement bleuté pour les GAG.

Étapes	Temps d'Incubation
Déparaffinage	
Méthylcyclohexane	5 mins
Méthylcyclohexane	5 mins
Méthylcyclohexane	5 mins
Alcool 100 %	1 min
Alcool 95 %	1 min
Alcool 70 %	1 min
Eau distillée	1 min
Coloration Bleu Alcian	
Bleu Alcian 0,1 %	30 mins
Eau du robinet	10 mins
Eau distillée	1 min
Kernechtrot	10 mins
Eau du robinet	1 min
Eau distillée	1 min
Montage	
Ethanol 95 %	30 sec
Ethanol 100 %	30 sec
Ethanol 100 %	30 sec
Méthylcyclohexane	1 min
Méthylcyclohexane	1 min
Méthylcyclohexane	1 min
Montage eukitt	

Tableau 15 : Détail du protocole de coloration au bleu alcian

V. 2. 2. 2. Colorations au trichrome de Masson

Le Trichrome de Masson est une technique de coloration histologique, topographique, trichromique, usuelle. Ce dernier associe une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Weigert, une coloration cytoplasmique par un mélange de colorants acides (Ponceau-Fuschine acide) et une coloration différentielle du tissu conjonctif au Vert Lumière. Pour réaliser la coloration au trichrome de Masson, un automate de coloration (Shandon Gemini ES) est utilisé suivant le protocole décrit dans le tableau 16. Les résultats attendus sont une couleur bleue noire à brun pour les noyaux, vert clair pour le collagène et mucus, rose à rouge pour le cytoplasme.

Étapes	Temps d'Incubation
Coloration Trichome de Masson	
Hématoxyline ferrique de Weigert	20 min
Eau du robinet	1 min
Acide picrique 1 %	1 min 30
Eau du robinet	1 min
Ponceau / Fuschine acide	4 min
Eau du robinet	1 min
Eau distillée	1 min
Acide phosphomolybdique 1 %	10 min
Vert Lumière	8 min
Acide acétique 1 %	10 min

Tableau 16 : Détail du protocole de coloration au trichrome de Masson

V. 2. 2. 3. Colorations HES (Hématoxyline-Eosine-Safran)

La coloration HES implique l'action successive d'un colorant nucléaire basique, l'hématoxyline de Harris et d'un colorant cytoplasmique acide, l'éosine-érythrosine. Le safran permet de colorer le tissu conjonctif. Pour réaliser la coloration HES, un automate de coloration (Shandon Gemini ES) est selon le protocole décrit dans le tableau 17. Les résultats attendus sont une coloration bleue noire des noyaux, jaune orangé du collagène et rose du cytoplasme.

Étapes	Temps d'Incubation
Coloration HES	
Hématoxyline de Harris	5 min
Eau du robinet	1 min
Alcool chlorhydrique	5 sec
Eau du robinet	1 min
Carbonate de lithium	30 sec
Eau du robinet	1 min
Eosine -Érythrosine	2 min
Eau du robinet	1 min
Alcool 95%	30 sec
Alcool 100%	30 sec
Alcool 100%	30 sec
Safran Alcoolique	2 min

Tableau 17 : Détail du protocole de coloration au trichrome de Masson

V. 2. 3. Montage des coupes entre lames et lamelles

Pour observer une coupe histologique en microscopie photonique, il faut monter la coupe entre lames et lamelles. En effet, les coupes colorées ne supportent pas le dessèchement, il est donc nécessaire d'utiliser un milieu de montage entre les lames et lamelles, on utilise donc une résine appelée Eukitt (Eukitt® 045798 – Dutscher). On commence par déshydrater les coupes en les passant successivement dans 3 bains d'alcool de 70 %, 90 % et 100 % (chaque bain dure 5 minutes) afin d'éliminer toutes traces d'eau. On rince ensuite les coupes dans du méthylcyclohexane (3 bains successifs d'une minute) afin d'éliminer les traces d'éthanol. Il faut ensuite se placer sous la sorbonne car l'Eukitt contient du xylène qui est nocif. On place le liquide de montage Eukitt en deux points sur la lamelle à l'aide d'une pipette pasteur. On dépose ensuite la lamelle sur la lame fraîchement sortie du dernier bain de méthylcyclohexane. Pour finir, on laisse sécher sous la sorbonne et une fois que le méthylcyclohexane s'est évaporé, la lamelle est fixée définitivement. Les lames sont ensuite observées grâce à un scanner de lames (Nanozoomer 2.0 HT – Hamamatsu) qui se trouve sur la plateforme de LIOAD.

V. 3. Protocole d'étude des dommages à l'ADN dans les pellets (comptage des MN)

Afin d'étudier l'effet bystander en 3D, nous avons réalisé des pellets de cellules T/C-28a2 sur lesquels nous avons transféré durant 24 h du milieu bystander provenant de cellules SW153 irradiées à 0/0,1/2 Gy à confluence, en T25. Le traitement par la cytochalasine B est réalisé au moment du transfert de milieu, 24 h après les pellets sont rincés au PBS, fixés au PFA (paraformaldehyde) 4 % (200 µl/pellet) pendant 3h à température ambiante et de nouveau rincés au PBS et transférés dans de l'éthanol 70 %. Ils sont ensuite inclus en paraffine et coupés comme décrit précédemment. Les coupes sont colorées au DAPI puis fixées entre lame et lamelle et prêtes à être étudiées pour le comptage des MN.

Partie 3 :

**RESULTATS ET
DISCUSSIONS**

Chapitre 1 : Les cellules de CHS sont-elles capables d'émettre des facteurs bystander ?

I. Résultats : Analyse de la réponse bystander

I. 1. Identification de cellules émettrices et réceptrices

I. 1. 1. Étude sur un panel de lignées cellulaires

Afin d'identifier des cellules capables d'émettre des signaux bystander ainsi que des cellules capables de les recevoir, nous avons utilisé le protocole de transfert de milieu décrit précédemment dans la figure 51 et dans le paragraphe : “III. 1. 2 Survie clonogénique des cellules bystander”.

Ainsi les cellules dites “émettrices” ont été irradiées à 0/0,1/0,5/1/2/4/8 Gy par Rayons-X. Au retour de l'irradiation, le milieu de culture des cellules irradiées a été remplacé par du milieu neuf puis les cellules émettrices ont pu sécréter leurs facteurs bystander durant 24 h. Ensuite, le milieu bystander provenant des cellules émettrices a été transféré sur les cellules dites “réceptrices” durant 24 h. A l'issue de ces 24 h de contact entre le milieu bystander et les cellules non-irradiées, un test de clonogénicité a été réalisé sur les cellules réceptrices afin d'en étudier la survie clonogénique et ainsi l'effet du transfert de milieu sur les cellules réceptrices. Nous avons utilisé des lignées de CHS comme cellules émettrices et des chondrocytes comme cellules réceptrices afin de recréer *in vitro* des conditions proches de celles rencontrées lors du traitement d'un CHS par radiothérapie. En effet, comme on peut le voir sur la figure 54, les cellules de CHS représentant la tumeur sont directement irradiées tandis que les chondrocytes représentant le tissu sain environnant la tumeur sont indirectement impactés par le traitement notamment *via* l'effet bystander.

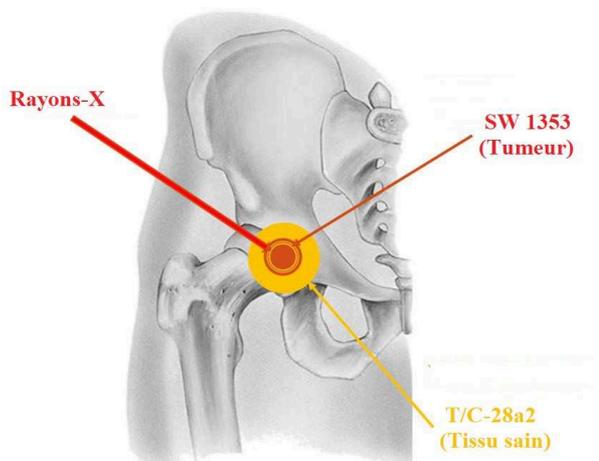


Figure 57 : Shématisation des effets directs d'une irradiation et de la propagation de l'effet dû au phénomène bystander

Le tableau 18 est un récapitulatif des différentes combinaisons de cellules émettrices / réceptrices réalisées afin d'étudier l'effet bystander radio-induit. En vert sont représentées des lignées cellulaires de CHS et en bleu les lignées cellulaires de chondrocytes. L'ensemble de ces résultats est issu d'une répétition par expérience, les données sont normalisées par rapport à la condition 0 Gy fixée à 100%. La condition 0 Gy correspond à un transfert de milieu sur les cellules réceptrices provenant de cellules émettrices non-irradiées mais qui ont été traitées dans les mêmes conditions que les cellules irradiées :

Cellules		Doses bystander						
Émettrices	Réceptrices	0	0,1	0,5	1	2	4	8
CH 2879	C20A4	100	115	116	88	101	107	76
Oums-27	C20A4	100	101	119	86	82	82	79
SW 1353	T/C-28a2	100	58	87	88	79	85	88
SW 1353	SW 1353	100	91	82	86	88	82	88
T/C-28a2	T/C-28a2	100	85	95	90	66	60	57

Tableau 18 : Récapitulatif de la survie clonogénique des différentes combinaisons cellules émettrices/réceptrices

- La première ligne concerne les cellules de CHS CH 2879 et les cellules de chondrocytes C20/A4. On constate que la survie clonogénique des C20/A4 reste proche de la condition contrôle (100 %) pour les doses bystander 0,1/0,5/2/4 Gy. On observe une légère baisse de la survie, 88 % et 76 % pour les doses 1 et 8 Gy respectivement.
- La seconde ligne concerne les cellules de CHS Oums-27 et de nouveau les cellules C20/A4. On constate que la survie clonogénique des C20/A4 n'est pas affectée jusqu'à la dose 1Gy bystander. De 1 à 8 Gy bystander, la survie des cellules C20/A4 oscille autour de 80%.
- La troisième ligne concerne les cellules de CHS SW 1353 et la lignée cellulaire dérivée de chondrocytes T/C-28a2. On remarque une diminution de 42 % de la survie clonogénique des cellules T/C-28a2 après avoir été en contact durant 24 h avec du milieu bystander provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy. Ensuite la survie des cellules de chondrocytes remonte pour se retrouver en moyenne à plus de 85 % pour les doses bystander allant de 0,5 à 8 Gy.
- Au vu de ce phénomène particulièrement intéressant observé avec la lignée cellulaire SW 1353 utilisée comme cellules émettrices, nous avons voulu en apprendre davantage sur ces cellules. En effet, ces dernières se révèlent être émettrices de signaux bystander, nous avons voulu savoir si elles étaient également réceptrices de leurs propres signaux. Ainsi comme on peut le voir décrit sur la quatrième ligne, au delà de 0,1 Gy, il semblerait que la survie clonogénique des cellules SW 1353 oscille autour de 85 %.
- Enfin en sachant que les cellules T/C-28a2 étaient capables de recevoir les signaux

bystander des cellules SW 1353 irradiées, nous nous sommes intéressés à la capacité de ces cellules à émettre des signaux bystander. Comme on peut le voir dans la cinquième et dernière ligne du tableau 18, les cellules T/C-28a2 sont capables d'émettre et de recevoir leurs propres signaux. Notamment à partir de 2 Gy bystander, où la survie clonogénique n'est plus que de 66 % pour décroître davantage à 60 et 57 % après un transfert de milieu provenant de T/C-28a2 irradiées à 4 et 8 Gy respectivement.

A l'issue de ces tests de clonogénicité, nous pouvons dire que l'ensemble des lignées irradiées testées semblent capables d'émettre des signaux bystander, et que les lignées utilisées comme cellules réceptrices ont toutes plus ou moins réussi à interpréter et à répondre aux signaux bystander provenant des cellules irradiées. Toutefois il est à noter que l'expérience utilisant les cellules SW 1353 comme cellules émettrices et les cellules T/C-28a2 comme cellules réceptrices, a permis de mettre en évidence un effet bystander radio-induit plus marqué que pour les autres combinaisons cellulaires étudiées. C'est donc pour cela que la plupart des expériences qui seront présentées ensuite se focaliseront sur cette association de cellules.

I. 1. 2. Étude sur les fibroblastes AG0 1522

Au vu des résultats précédemment obtenus, nous avons souhaité vérifier la capacité des cellules SW 1353 à émettre des signaux bystander dans nos conditions de culture et notamment avec notre protocole de transfert de milieu. Pour cela nous avons utilisé une lignée cellulaire connue pour être réceptrice de signaux bystander provenant des cellules de CHS SW 1353 : la lignée de fibroblastes AG0 1522. C'est d'ailleurs cette lignée qui avait été utilisée dans l'étude du Dr. Wakatsuki (110). Ainsi les cellules SW 1353 ont été irradiées par rayons-X à des doses de 0/0,1/0,5/1/2/4/8 Gy puis après 24 h d'irradiation le milieu bystander a été transféré sur des cellules AG0 1522 pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été décollées de leur flasque de culture etensemencées à faible densité afin de réaliser un test de clonogénicité. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 58 et sont issus de 2 expériences indépendantes.

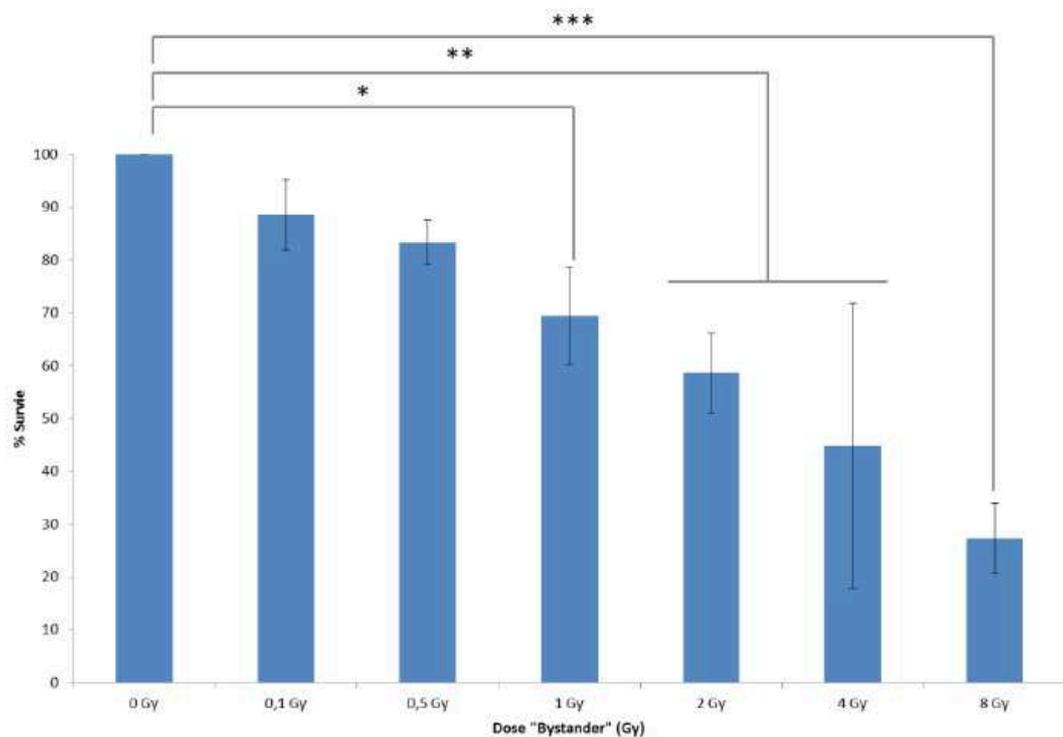


Figure 58 : Survie clonogénique des AG01522 après transfert de milieu bystander provenant de SW 1353

On remarque que la survie cellulaire diminue de façon dose-dépendante à partir de 1 Gy bystander où elle est d'environ 70 %. La fraction de cellule survivante diminue jusqu'à 8 Gy bystander qui est la dose la plus forte testée où la survie atteint un minimum de 30 % environ. Cette expérience nous permet de confirmer avec une lignée cellulaire déjà répertoriée comme réceptrice de signaux bystander (la lignée AG01522) que la lignée cellulaire SW 1353 testée précédemment est bien émettrice de signaux bystander.

I. 2. Mise en évidence d'un retard de prolifération des cellules bystander

I. 2. 1. Étude de la survie clonogénique

I. 2. 1. 1 Effets directs

Après avoir sélectionné les lignées cellulaires émettrices et réceptrices de signaux bystander SW 1353 et T/C-28a2 respectivement, nous avons souhaité définir plus précisément le phénomène observé précédemment.

Nous avons donc dans un premier temps réalisé des études des effets directs d'une irradiation par

rayons-X et ions-carbone sur les cellules T/C-28a2. Pour cela les cellules ont été irradiées à confluence et un test de clonogénicité a été réalisé 24h après irradiation par rayons-X ou ions-carbone à 0/0,1/0,5/1/2/4/6/8 Gy en suivant le protocole décrit précédemment dans le paragraphe : « III. 1. 1 Survie clonogénique des cellules irradiées ». Cette première étude a permis d'établir un point de comparaison entre les effets directs et les effets bystander observés sur les cellules après irradiation ou après transfert de milieu.

Ainsi comme on peut le voir sur la figure 59, on observe une diminution dose-dépendante de la survie clonogénique des cellules de chondrocytes après une irradiation par rayons-X représentée selon un modèle linéaire quadratique. Après une irradiation par ions-carbone, on observe également une diminution dose-dépendante de la survie clonogénique des cellules mais cette fois-ci de façon plus importante, en suivant un modèle linéaire.

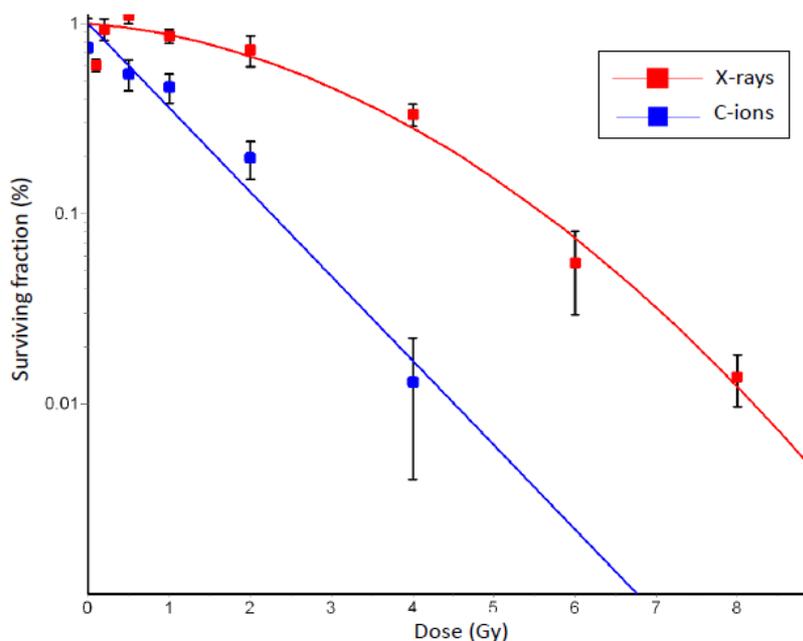


Figure 59 : Survie clonogénique des T/C-28a2 après irradiations par rayons-X et ions-carbone

	D10	D37	SF2	RBE(D10)	RBE(D37)
Rayons-X	5,6	3,47	0,67	/	/
Ions-carbone	2,25	0,97	0,12	2,49	3,58

Tableau 19 : Paramètres de survie des cellules T/C-28a2

D10 : correspond à la dose donnant une fraction survivant de 10 %

D37 : correspond à la dose donnant une fraction survivant de 37 %

SF2 : correspond à la fraction survivante observé à 2 Gy

RBE (D10) : correspond à la valeur calculée selon cette équation : (D10 X-Rays) / (D10 C-ions)

RBE (D37) : correspond à la valeur calculée selon cette équation : (D37 X-Rays) / (D37 C-ions)

Irradiation par rayons-X : modèle linéaire quadratique

$$SF(\text{Dose}) = \exp(\text{Alpha} * \text{Dose} + \text{Beta} * \text{Dose}^2)$$

$$SF(0) = 0,1812$$

$$\text{Alpha} = -0,0831$$

$$\text{Beta} = -0,0583$$

$$\text{Alpha/Beta - ratio} = 1,4249$$

Irradiation par ions-carbone : modèle linéaire

$$SF(\text{Dose}) = \exp(a * \text{Dose})$$

$$SF(0) = 0,2998$$

$$a = -1,0212$$

Le tableau 19 récapitule l'ensemble des informations concernant les courbes de survie des T/C-28a2. La D10 (dose nécessaire pour obtenir 10 % de survie) est de 5,6 Gy avec les rayons-X contre seulement 2,25 Gy avec les ions-carbone, correspondant à un RBE de 2,49 des ions-carbone. Il en est de même pour la D37 (dose nécessaire pour obtenir 37 % de survie) où la dose est de 3,47 Gy et 0,97 Gy pour les rayons-X et les ions-carbone, respectivement correspondant à un RBE de 3,58 des ions-carbone. Ainsi les RBE obtenus nous permettent de mettre en évidence un effet bien plus délétère des ions-carbone par rapport aux rayons-X sur les cellules T/C-28a2. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui montraient un effet biologique supérieur des ions-carbone comparés aux rayons-X.

I. 2. 1. 2 Effet bystander

Nous avons poursuivi l'étude de l'effet bystander radio-induit sur les cellules T/C28-a2 après transfert de milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées de la même façon qu'avec les expériences qui nous ont permis d'identifier ces deux lignées cellulaires comme réceptrices et émettrices de signaux bystander. Cependant, nous avons testé davantage de doses d'irradiation et de types d'irradiation puisque nous avons également regardé l'effet induit par des ions carbone (*Figure 60*).

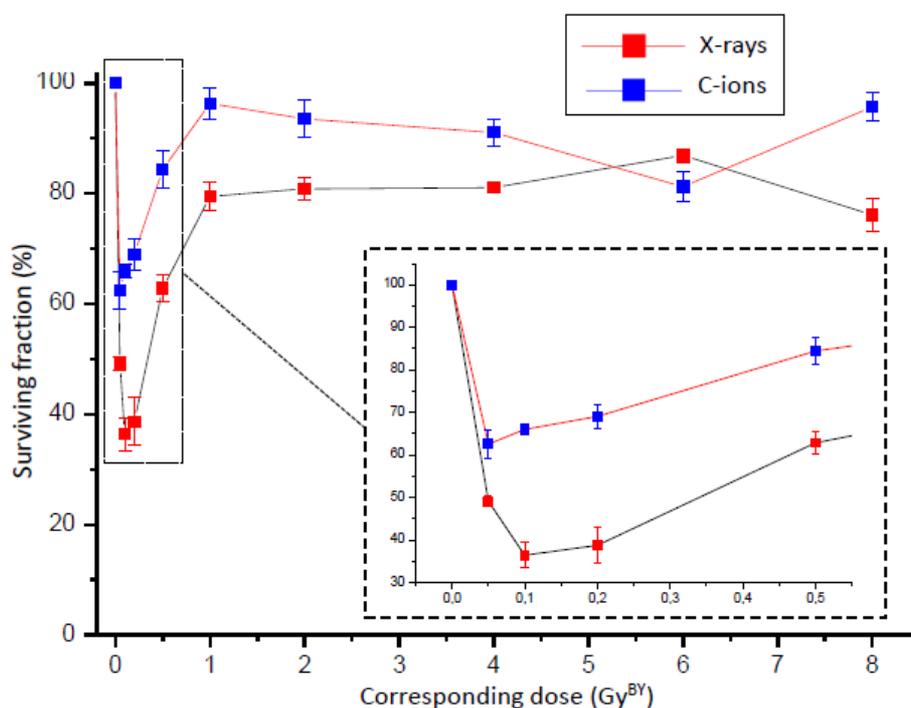


Figure 60 : Survie clonogénique des T/C-28a2 après transfert de milieu de SW 1353 irradiées par rayons-X et ions-carbone

Ainsi, nous avons pu préciser l'effet bystander observé précédemment, notamment on constate une diminution de la survie des cellules à partir de 0,05 Gy bystander (à noter que les termes « Gy^{BY} » et « Gy bystander » correspondent à la dose bystander, c'est à dire la dose d'irradiation utilisée pour irradier les cellules émettrices ici les cellules SW 1353 dont le milieu est ensuite transféré sur les cellules réceptrices ici les cellules T/C-28a2, dans ce cas précis la dose bystander est de 0,05 Gy ce qui signifie que du milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0,05 Gy a été transféré sur des cellules T/C-28a2) pour atteindre un minimum de 36 % à 0,1 Gy bystander et remonter ensuite progressivement jusqu'à une survie de plus de 85 % pour les doses plus fortes à partir de 1 Gy bystander pour les rayons-X. Également, on remarque que l'effet bystander observé après une irradiation par ions-carbone des cellules émettrices est similaire à celui observé pour les rayons-X en terme d'effet localisé aux faibles doses. Cependant il est moindre puisque le minimum de survie observé des cellules T/C-28a2 est de 62 % à la dose 0,05 Gy. Ce faible taux de survie de 36 % observé pour les cellules T/C-28a2 après un transfert de milieu provenant de cellules de CHS irradiées par rayons-X à seulement 0,1 Gy est comparable à l'effet que l'on observe sur ces mêmes cellules (T/C-28a2) après une irradiation directe de ces dernières par rayons-X à 3,5 Gy. L'ensemble de ces résultats permet ainsi de prendre en considération l'importance de l'effet bystander radio-induit dans le modèle cellulaire que nous avons sélectionné.

I. 2. 2. Étude de la prolifération : utilisation du cell trace

Dans le but de mieux caractériser, mais aussi de confirmer l'effet bystander observé par une autre technique que les tests de clonogénicité, nous nous sommes intéressés à l'étude de la prolifération des cellules bystander T/C-28a2 par la méthode « cell trace ». Comme décrit précisément dans le paragraphe : « III. 2 Protocole d'étude de la prolifération des cellules (Cell trace) », cette technique permet par un marquage des cellules de tracer plusieurs générations par la dilution du colorant analysé par cytométrie en flux.

Ainsi après 24 h de contact entre les cellules T/C-28a2 et le milieu bystander provenant de cellules SW 1353 irradiées par rayons-X à 0/0,1/2 Gy nous avons étudié la prolifération des cellules bystander préalablement marquées. L'analyse par cytométrie en flux et le traitement des données par un logiciel spécifique (FCS Express 6 Plus®) a permis de déterminer l'index de prolifération de chaque condition testée. Cet index reflète la capacité des cellules à proliférer après un traitement, ainsi plus il est élevé et plus les cellules ont proliféré. L'ensemble des données est issu d'une expérience et est présenté dans le tableau 20 :

Conditions	Index de prolifération
Contrôle	84,47
0 Gy bystander	97,18
0,1 Gy bystander	106,42
2 Gy bystander	104,2

Tableau 20 : Index de prolifération des cellules T/C-28a2 bystander

- La première ligne de ce tableau correspond à la condition contrôle, c'est à dire à l'index de prolifération des cellules T/C-28a2 n'ayant subi aucun traitement.
- La seconde ligne correspond à l'index de prolifération des cellules T/C-28a2 ayant reçu du surnageant provenant de cellules SW 1353 non irradiées.
- Les troisième et quatrième lignes correspondent à l'index de prolifération des cellules T/C-28a2 ayant reçu le milieu bystander provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0,1 et 2 Gy, respectivement.

Ainsi, on constate que l'index de prolifération de la condition contrôle (qui n'a subi aucun transfert de milieu) est inférieur à celui de la condition 0 Gy bystander suggérant un effet potentialisant du transfert de milieu provenant de cellules SW 1353 sur l'index cellulaire des cellules bystander T/C-28a2. On peut également constater une augmentation de cet index après irradiation des cellules SW 1353 à 0,1 et 2 Gy et particulièrement à 0,1 Gy où l'index atteint un maximum de 106,42.

L'ensemble de ces résultats est difficilement rattachable aux résultats obtenus précédemment par les tests de clonogénicité. En effet, ces données sont opposées à la diminution de la survie clonogénique observée lors des tests de clonogénicité et semblent révéler une stimulation de la prolifération des cellules bystander après transfert de milieu. Nous avons donc décidé de poursuivre nos analyses afin de mieux comprendre les résultats obtenus *via* des expériences d'impédancemétrie.

I. 2. 3. Étude par l'impédancemétrie

Le protocole précis utilisé pour l'étude de la prolifération des cellules bystander par impédancemétrie est détaillé dans le paragraphe : « III. 3 Protocole d'étude de l'impédancemétrie (Xcelligence) ».

Brièvement, les cellules T/C-28a2 ont étéensemencées dans des microplaques spécifiques au système Xcelligence, après 24 h le milieu bystander provenant de SW 1353 irradiées à 0/0,05/0,1/0,2/0,5/2/8 Gy par rayons-X et pas ions-carbone a été ajouté. C'est ce temps particulier : le moment de l'ajout du milieu bystander, qui a été utilisé pour la normalisation de tous les réplicats. La mesure de l'impédance des cellules bystander a ainsi permis d'établir un index cellulaire reflétant le nombre de cellules, leur taille, leur morphologie et leur capacité à adhérer aux supports après avoir reçu le surnageant bystander. Contrairement aux techniques précédentes, le milieu est laissé en contact avec les cellules bystander durant toute l'expérience (6 jours) et il n'est pas retiré au bout de 24 h. L'ensemble des données répertoriées a ensuite été analysé grâce à un logiciel spécifique (RTCA) permettant d'établir des courbes représentant l'index cellulaire des cellules bystander, comme on peut le voir sur la figure 61.

Ces courbes permettent d'avoir une vision globale de l'étude et notamment de sélectionner la partie linéaire permettant l'analyse des données. Ces expériences ont été répétées 2 fois avec pour chaque répétition 6 puits par condition.

T/C-28a2 Bystander
7500 cellules / puits
Normalisation à 24h post-ensemencement

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F			0 Gy		CTR		0,05 Gy		0,1 Gy			
G												
H			0,2 Gy		0,5 Gy		2 Gy		8 Gy			

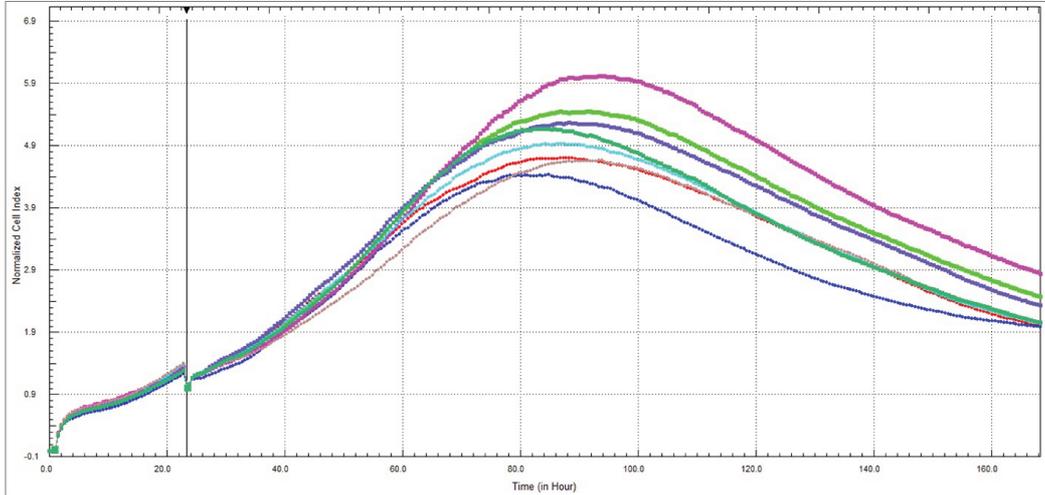


Figure 61 : Exemple de courbe d'indice cellulaire brut donnée par le logiciel RTCA

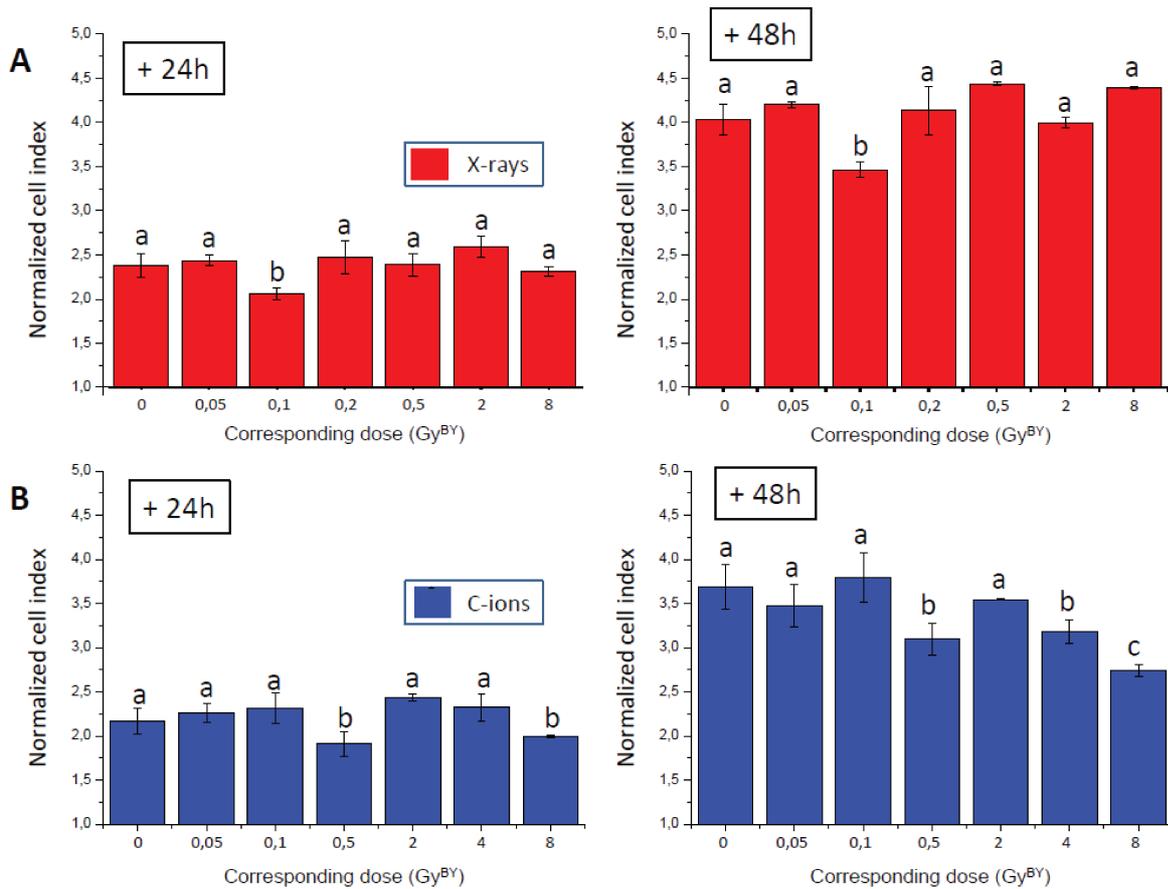


Figure 62 : Indice cellulaire normalisé des cellules T/C-28a2 bystander (A : Rayons-X, B: ions-carbone)

La figure 62 A présente les résultats obtenus 24 et 48h post transfert de milieu bystander provenant de cellules (SW 1353) irradiées par rayons-X. Les lettres a et b signifient que les données récoltées sont significativement distinctes. Ainsi, on peut observer une baisse significative de l'index cellulaire à la dose 0,1 Gy bystander après 24 et 48h de transfert de milieu. Concernant les autres doses bystander, les différences ne sont pas significativement différentes.

La figure 62 B présente les résultats obtenus 24 et 48h post transfert de milieu bystander provenant de cellules (SW 1353) irradiées par des ions-carbone. Les lettres a, b et c signifient que les données récoltées sont significativement distinctes. Ainsi on peut observer également une réduction de l'index cellulaire des cellules T/C-28a2 mais plutôt lorsque les cellules SW 1353 ont été irradiées à 0,5 et 8 Gy et ce que ce soit à 24 ou 48h de transfert de milieu.

Finalement, on observe un effet bystander proche de celui observé lors des tests de clonogénicité, mais aussi que cet effet semble être différent selon le type d'irradiation employé.

I. 3. Étude du cycle cellulaire des cellules bystander

I. 3. 1. Effets directs

Nous avons poursuivi la caractérisation du phénomène bystander observé par des études du cycle cellulaire. Le protocole détaillé utilisé pour ces expériences est décrit dans le paragraphe : « III. 4 Protocole d'étude du cycle cellulaire (CMF) ». Cette étude a été réalisée par marquage de l'ADN des cellules à l'iodure de propidium (IP) qui permet par analyse en CMF de déterminer dans quelle phase du cycle cellulaire les cellules se trouvent à un instant t donné.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude des effets directs d'une irradiation par rayons-X sur les cellules SW 1353 et T/C-28a2 afin d'avoir un élément de comparaison pour étudier ensuite l'effet bystander. Les cellules ont été irradiées à 0/0,1/2/8 Gy puis récupérées à différents temps 24/48/72/96 h post-irradiation. Ces expériences ont été réalisées une fois et les données ont été exploitées avec le logiciel FCS Express 6, De novo.

L'ensemble des profils de répartition des cellules T/C-28a2 non-irradiées (0 Gy) est similaire quel que soit le temps de l'analyse. Il en est de même lorsque les cellules sont irradiées à 0,1 Gy. On note environ 1 à 2 % de cellules en sub-G1, environ 50 % de cellules en phase G1, environ 40 % de cellules en phase S et un peu moins de 10 % de cellules en phase G2/M (*Figure 63*).

À partir de 2 Gy, on peut voir que les cellules commencent légèrement à s'accumuler en phase G2/M avec environ 10 à 12 % de cellules après une irradiation à 2 Gy contre un peu moins de 10 %

pour la condition 0 Gy.

À 8 Gy, la répartition des cellules dans le cycle est complètement perturbée. En effet, les cellules sont bloquées en phase G2/M (environ 50 % des cellules contre moins de 10 % en condition contrôle). Ce phénomène peut s'expliquer par une accumulation de cassures double brin de l'ADN des cellules irradiées, causant un blocage de la phase de réplication et donc un arrêt des cellules en phase G2/M, conséquence certainement d'une catastrophe mitotique. Le profil des T/C-28a2 observé après une irradiation à 8 Gy est caractéristique de cellules mutantes pour p53 en effet, malgré le blocage en phase G2/M, on observe une phase S montrant que malgré les dommages, les T/C-28a2 sont capables de passer de la phase G1 à la phase S puis de la phase S à la phase G2/M avec un blocage en G2/M. On note également une augmentation du nombre de cellules en Sub-G1 après une irradiation à 8 Gy avec notamment plus de 14 % de cellules en Sub-G1 après 96h d'irradiation contre environ 2 % pour la condition contrôle. Cette augmentation peut s'expliquer par la présence de débris cellulaires (ou corps apoptotiques) pouvant résulter de cellules en apoptose.

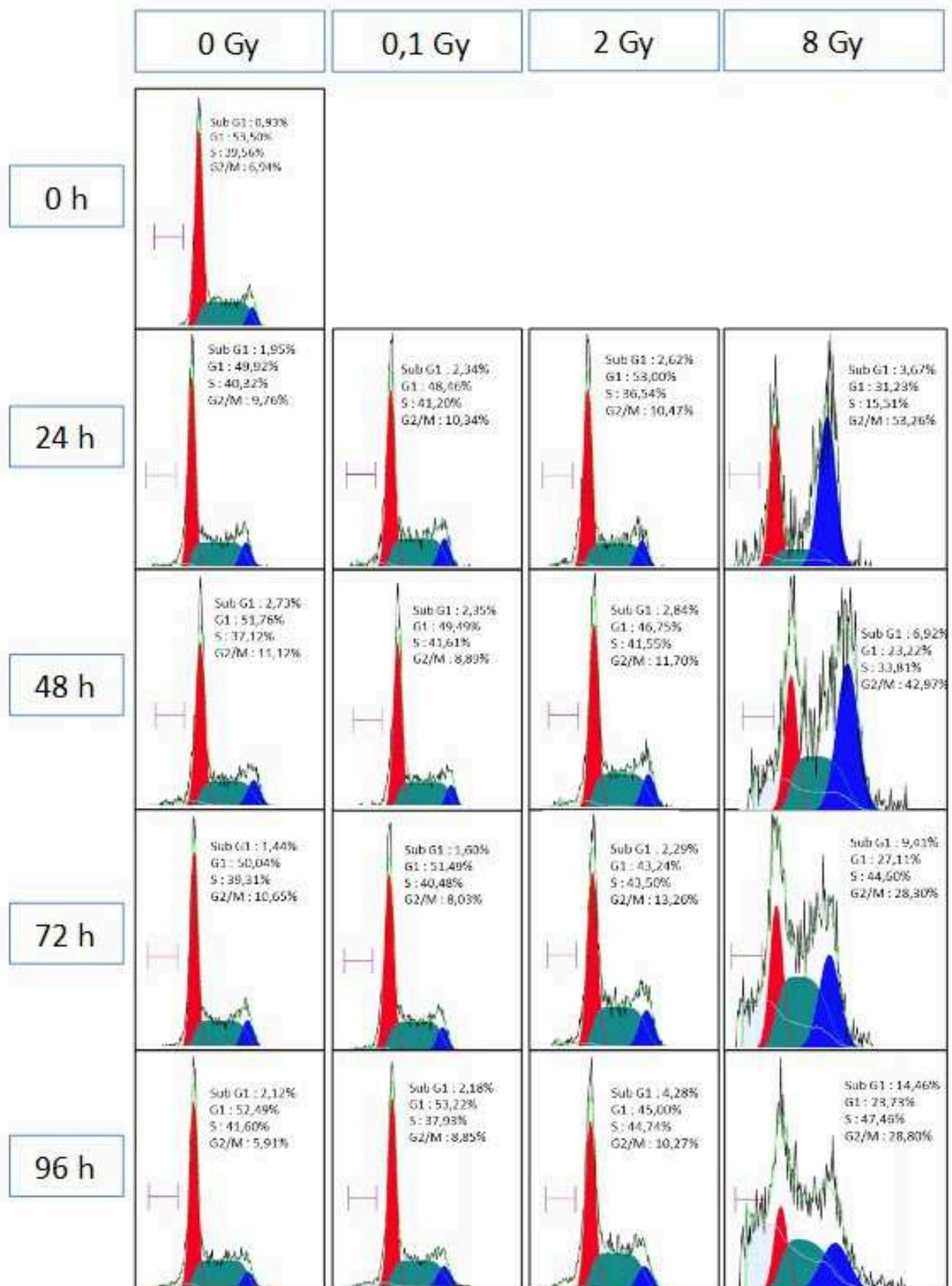


Figure 63 : Répartition des cellules T/C-28a2 marquées à l'IP dans les différentes phases du cycle cellulaire après irradiation

I. 3. 2. Effet bystander

Pour l'étude de l'effet bystander nous avons réalisé des expériences de transfert de milieu afin d'étudier la répartition des cellules T/C-28a2 ayant reçu du milieu provenant de SW 1353 irradiées à 0/0,1/2/8 Gy après 24/48/72/96 h post-transfert. Ces expériences ont été réalisées deux fois et les données ont été exploitées avec le logiciel FCS Express 6, De novo.

Ainsi comme on peut le voir sur la figure 64, l'ensemble des profils de répartition des cellules bystander dans le cycle cellulaire est très semblable peu importe la condition analysée. On note environ 1 à 2 % de cellules en sub-G1, environ 50 % de cellules en phase G1, environ 40 % de cellules en phase S et un peu moins de 10 % de cellules en phase G2/M.

Toutefois on observe une légère augmentation du nombre de cellules en sub-G1 à partir de 72h pour la condition 0 Gy bystander où l'on a plus de 10 % de cellules en sub-G1 et à partir de 72h également pour les conditions 0,1/2/8 Gy bystander mais surtout à 96h où la proportion de cellules en sub-G1 oscille entre 3 et 11 %. Ce phénomène qui ne semble pas être spécifique à une condition en particulier peut s'expliquer par le manque de place des cellules au delà des 72h de culture et donc à un début de mort des cellules se traduisant par la présence de corps apoptotiques.

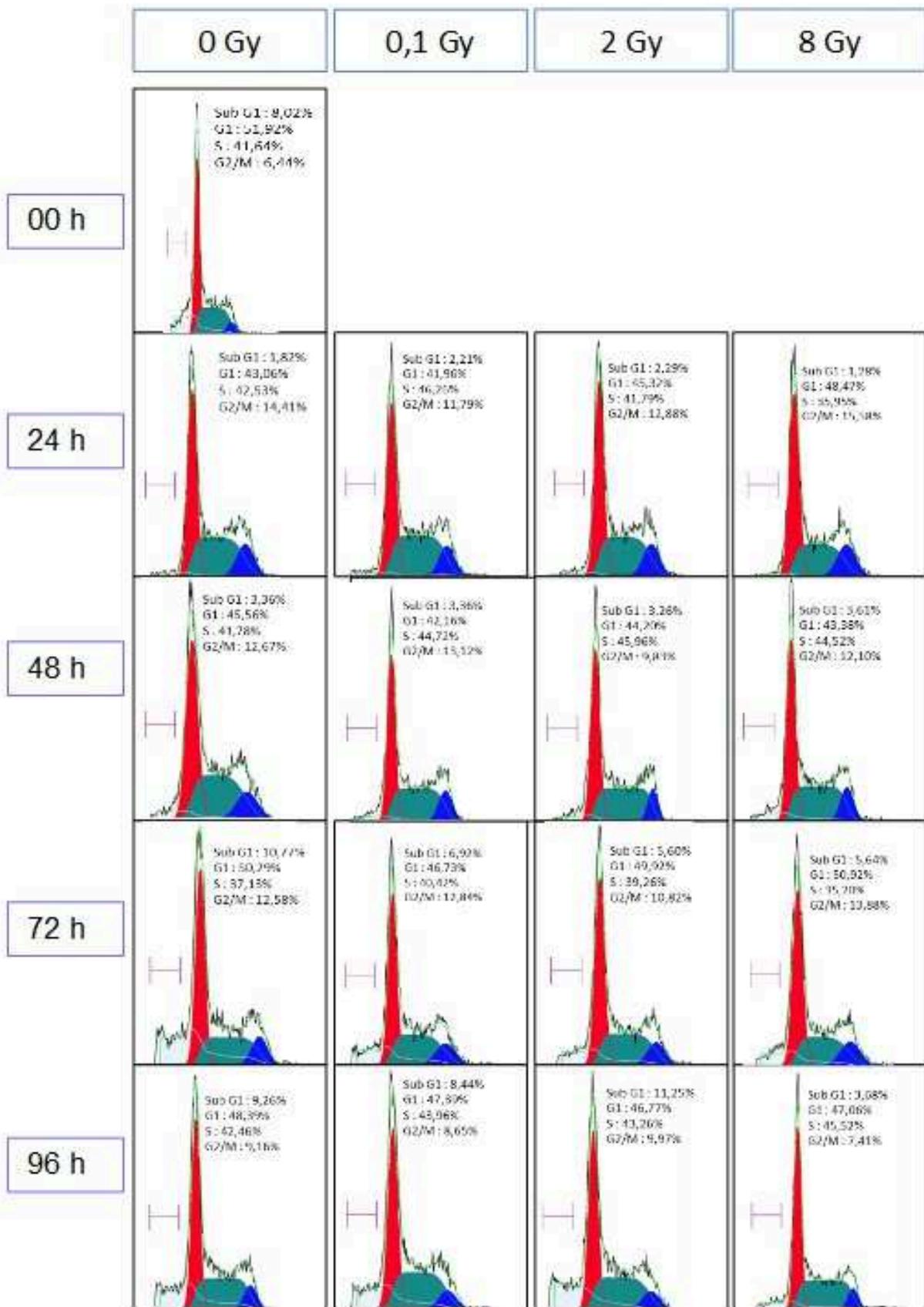


Figure 64 : Répartition des cellules T/C-28a2 marquées à l'IP dans les différentes phases du cycle cellulaire après transfert de milieu

I. 4. Étude de la viabilité des cellules bystander

I. 4. 1. Effets directs

Toujours dans le but d'étudier la réponse bystander des cellules T/C-28a2, nous nous sommes intéressés à l'étude de la viabilité des cellules. Le protocole utilisé est décrit dans le paragraphe : « III. 5 Protocole d'étude de la viabilité cellulaire (bleu trypan) ». Comme pour l'étude de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire, nous avons d'abord étudié les effets d'une irradiation sur la viabilité des cellules T/C-28a2 et SW 1353 afin d'avoir une étude de référence pour ensuite étudié la viabilité des cellules bystander.

Les cellules ont donc été irradiées à 0/0,1/2/8 Gy par rayons-X puis nous avons observé à 24/48/72/96 h les effets de l'irradiation par numération des cellules colorées au Bleu Trypan. Les résultats sont présentés sur la figure 65, les expériences ont été réalisées deux fois pour chaque lignées et moyennées.

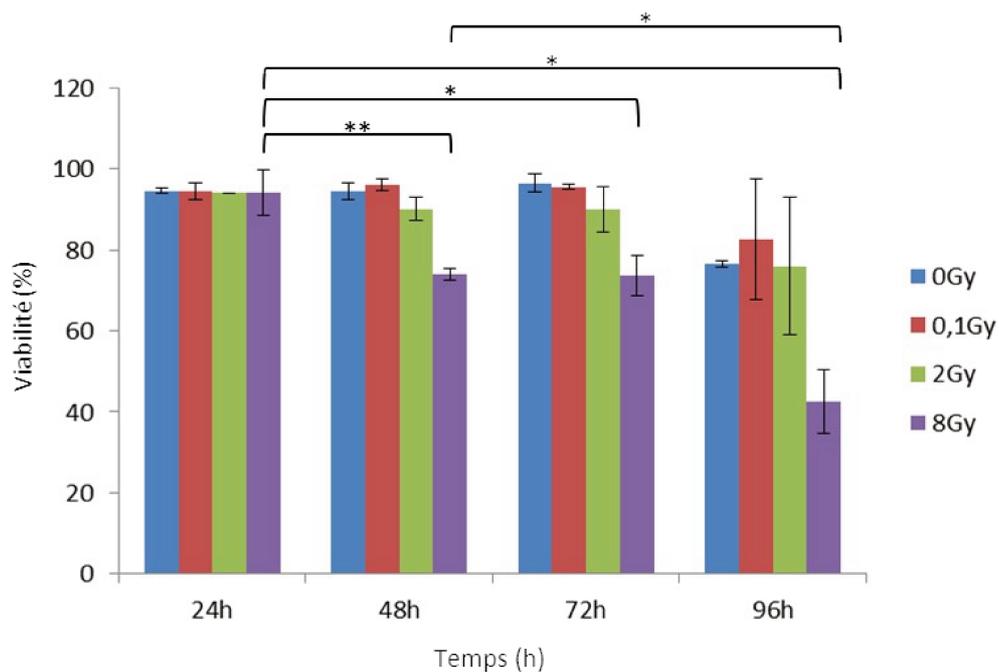


Figure 65 : Viabilité des cellules T/C-28a2 après irradiation par rayons-X

D'après la figure 65 on remarque que la viabilité des cellules T/C-28a2 semble diminuer à partir de 48h après une irradiation à 8 Gy. Cette diminution s'accroît particulièrement à 96h post-irradiation.

I. 4. 2. Effet bystander

Nous avons poursuivi les expériences de viabilité sur les cellules bystander. Pour cela les T/C-28a2 ont reçu du surnageant provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0/0,1/2/8 Gy par rayons-X. Après 24/48/72/96 h de contact les cellules bystander ont été colorées au Bleu Trypan puis comptées grâce au compteur automatique de cellules qui permet d'estimer la viabilité des cellules. Les résultats sont présentés sur la figure 66, les expériences ont été répétées deux fois et moyennées.

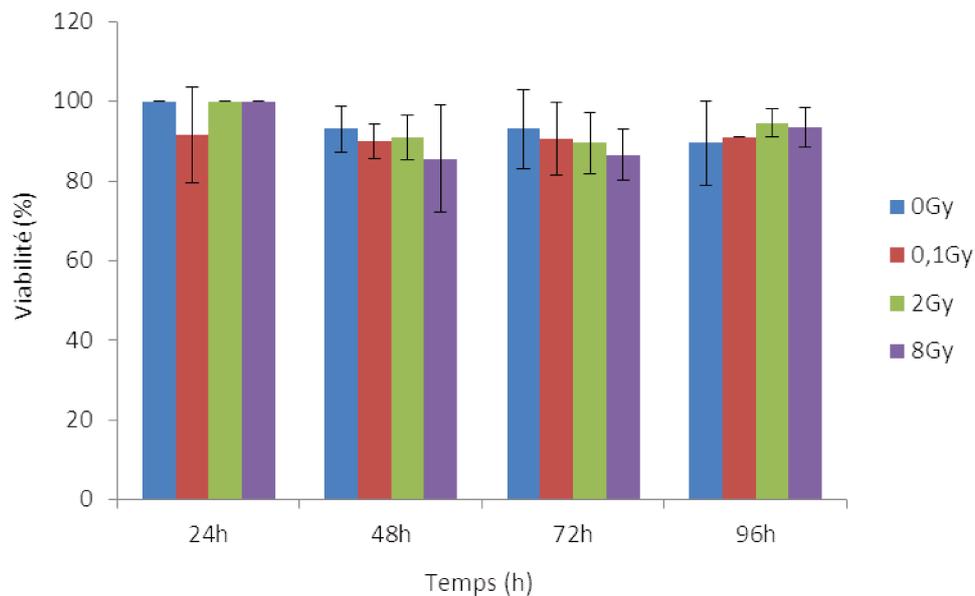


Figure 66 : Viabilité des cellules T/C-28a2 post transfert de milieu bystander

D'après la figure 65, on remarque que le transfert de milieu a peu d'effet sur la viabilité des cellules T/C-28a2 et ce peu importe le temps ou la dose bystander étudiée. Cette absence d'effet bystander sur la viabilité cellulaire peut s'expliquer par un temps de contact entre les cellules et le milieu bystander trop court ou encore une observation à partir de 24h trop tardive, il pourrait être envisagé de regarder dès 12h par exemple ou à l'inverse à des temps plus longs.

I. 5. Étude des dommages à l'ADN des cellules bystander

I. 5. 1. Effets directs

Pour poursuivre nos investigations sur le phénomène bystander radio-induit par les cellules SW 1353 sur les cellules T/C-28a2, nous nous sommes intéressés aux dommages à l'ADN. Ce protocole d'étude, détaillé précisément dans le paragraphe : « III. 6 Protocole d'étude des dommages à l'ADN

(comptage de MN)” nous a également permis d'étudier l'effet bystander en 3D car contrairement aux protocoles précédemment utilisés pour l'étude de l'effet bystander, le comptage des MN peut être réalisé sur des coupes de modèle 3D et ne nécessite pas des cellules individualisées.

L'induction de MN a dans un premier temps a été étudiée dans des cellules T/C-28a2 24h après irradiation par rayons-X et ions-carbone, à des doses de 0/0,05/0,1/0,5/1/2 Gy et 20h après le traitement à la cytochalasine B. Les résultats sont analysés en calculant la fréquence des cellules bi-nucléées contenant un ou plusieurs micronoyaux pour 1000 cellules bi-nucléées. Les expériences ont été réalisées trois fois de façon indépendante et en triplicat (trois puits) pour chacune des conditions. Les résultats sont présentés sur la figure 67. On remarque une induction de MN de façon dose dépendante que ce soit avec des rayons-X (en rouge) ou avec des ions-carbone (en bleu), toutefois l'induction est plus élevée avec les ions-carbone. D'ailleurs le calcul : MN ions-carbone / MN rayons-X pour la dose 1 Gy est estimé à 1,95.

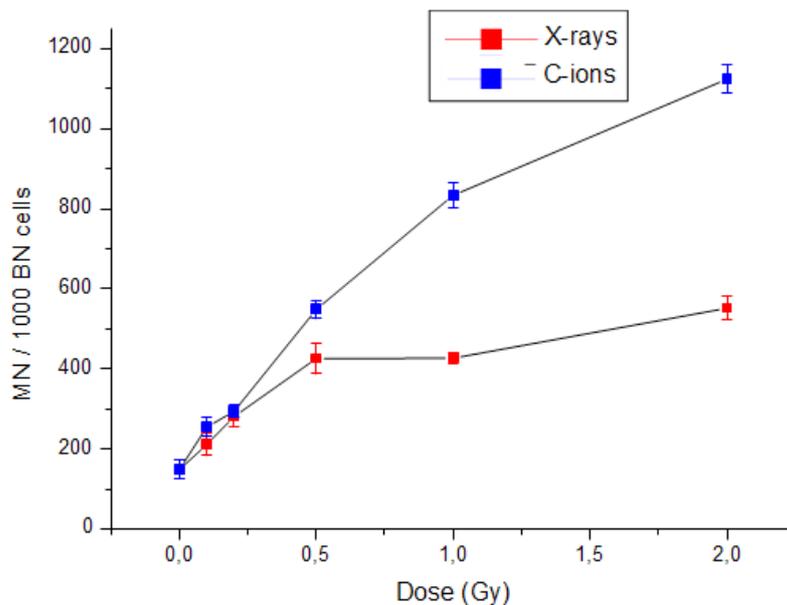


Figure 67 : Induction de MN dans les cellules T/C-28a2 post irradiation

I. 5. 2. Effet bystander

Ensuite nous avons étudié l'induction de MN au sein des cellules T/C-28a2 24h après transfert de milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0/0,05/0,1/0,5/1/2/8 Gy par rayons-X et ions-carbone et 20h après traitement à la cytochalasine B. Les résultats sont représentés sur la figure 68, concernant les rayons-X, le nombre de MN augmente à partir de 0,1 Gy bystander et atteint un plateau à partir de 0,2 Gy bystander jusqu'à la dernière dose étudiée de 8 Gy bystander avec une moyenne de 240 MN/cellules binucléées. Avec les ions-carbone, le nombre de MN augmente dans

les cellules T/C-28a2 dès la dose 0,05 Gy bystander pour atteindre un plateau à 0,1 Gy bystander jusqu'à 8 Gy bystander avec une moyenne de 225 MN/cellules binuclées.

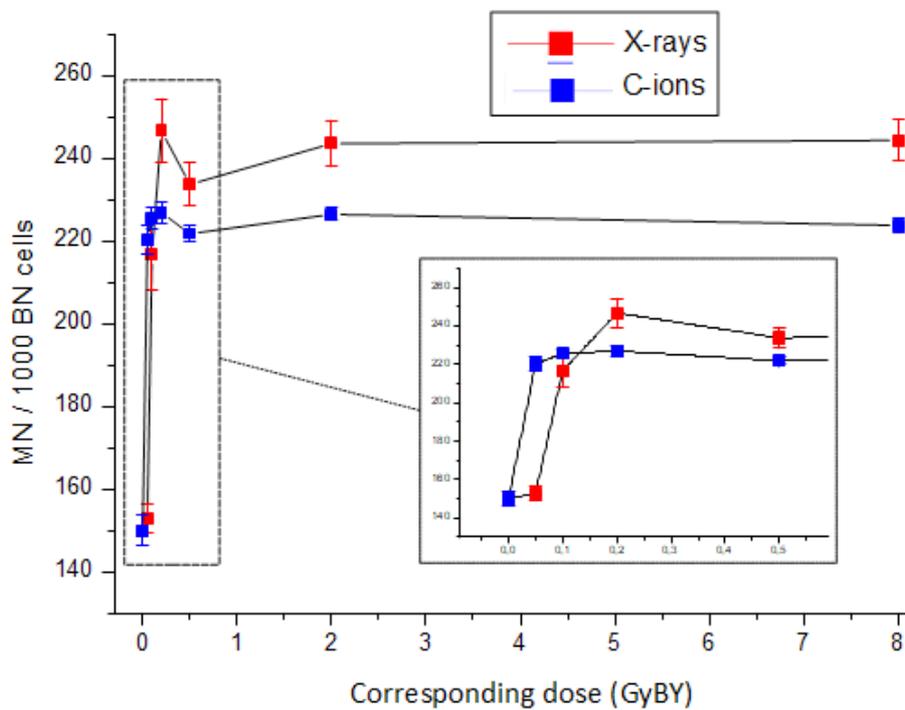


Figure 68 : Induction de MN dans les cellules T/C-28a2 post transfert de milieu bystander

II. Discussion concernant la réponse bystander

La question posée en début de chapitre était : « Les cellules de CHS sont-elles capables d'émettre des signaux bystander ? ».

Pour répondre à cette interrogation et afin de se replacer dans un contexte d'irradiation du cartilage lors d'une radiothérapie d'un CHS, nous avons cherché à identifier des cellules de CHS capables d'émettre des signaux bystander et des chondrocytes capables de les recevoir. Ainsi nous avons irradié des cellules de CHS, qui ont émis ou non des facteurs bystander dans leur milieu de culture et nous avons transféré ce milieu sur des chondrocytes.

Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence la capacité des cellules SW 1353 (CHS) à émettre des signaux bystander et la capacité des cellules T/C-28a2 (chondrocytes) à les recevoir. En effet, le transfert de milieu provenant de cellules SW 1353 après une irradiation par rayons-X à 0,1 Gy induit plus de 60 % de diminution de survie des cellules T/C-28a2. Le plus fort effet bystander radio-induit que nous avons observé est donc causé par des facteurs provenant de cellules SW 1353 irradiées à seulement 0,1 Gy. Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature par certains auteurs comme une « hypersensibilité aux faibles doses » (114) (115). Il est possible de tenter d'expliquer cela par la capacité de cellules faiblement irradiées à induire un effet biologique et notamment à sécréter des facteurs. Par exemple des auteurs ont récemment montré la capacité des cellules de types monocytes, après une irradiation à 0,1 Gy par rayons-X, à émettre des signaux tel que des cytokines (IL-1, TNF, IL-5...) (142). Ils ont d'ailleurs ensuite réalisé des expériences de transfert de milieu provenant des cellules U937 (monocytes) irradiées à 0,1 Gy par rayons-X sur des cellules de kératinocytes et ont pu remarquer l'induction d'une réponse bystander au sein des kératinocytes (HPK). Cet effet se traduisait notamment par une augmentation de l'expression de certaines protéines dont c-Myc et p21 au sein des cellules bystander, qui sont connues pour leur implication dans la voie de signalisation NF- κ B. Cette voie de signalisation est d'ailleurs très impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires tel que l'inflammation et la mort des cellules par apoptose (121). Ainsi nous pouvons envisager que les cellules SW 1353 secrètent des facteurs similaires à ceux qui sont sécrétés par les cellules U937 après irradiation et que ces facteurs induisent au sein des cellules T/C-28a2 des mécanismes cellulaires proches de ceux observés au sein des kératinocytes conduisant à la diminution de la survie des cellules bystander que l'on a pu montrer.

Afin de confirmer la capacité des cellules SW 1353 à émettre des signaux bystander nous avons étudié la survie des cellules de fibroblastes AG0 1522 qui sont reconnues comme étant des cellules réceptrices de signaux bystander (143) (110) (126). Ainsi ces expériences nous ont permis de

confirmer la capacité des cellules SW 1353 à émettre des signaux bystander. Cependant la réponse bystander observée au sein des cellules de fibroblastes est différente de celle observée au sein des cellules de chondrocytes (T/C-28a2). En effet, pour les AG0 1522 la réponse bystander induite par le transfert de milieu provenant des cellules SW 1353 irradiées par rayons-X pourraient être qualifiée de dose-dépendante (augmente en fonction de la dose) tandis que pour les cellules T/C-28a2, la réponse bystander est maximale et localisée à 0,1 Gy bystander. Ce résultat confirme l'idée développée dans l'introduction concernant la variabilité de l'effet bystander observé en fonction de plusieurs facteurs dont le type cellulaire (88).

Nous avons étudié de la même façon l'effet bystander radio-induit par le milieu conditionné provenant de cellules SW 1353 irradiées sur des cellules T/C-28a2 mais en utilisant un autre type d'irradiation que les rayons-X, les ions-carbone. Nous avons pu mettre en évidence un effet bystander mais inférieur à celui observé après une irradiation des cellules émettrices par rayons-X. En effet, avec les ions-carbone la diminution de survie observée des cellules T/C-28a2 est de 38 % à la dose 0,05 Gy. Ce phénomène peut s'expliquer par l'effet radio-induit sur les cellules SW 1353 irradiées. En effet, une irradiation par rayons-X n'induit pas le même effet qu'une irradiation par ions-carbone. De nombreuses études ont comparé l'impact d'une irradiation par rayons-X par rapport aux ions-carbone sur les cellules (144) (145), notamment une étude précédemment menée au sein du laboratoire visant à comparer les effets radio-induits de ces deux types d'irradiation sur des fibroblastes (146). Ainsi les auteurs avaient pu montrer une augmentation de la sécrétion de l'IL-6 supérieure après une irradiation par rayons-X par rapport à une irradiation par ions-carbone. Ces différences de réponses à l'irradiation des cellules irradiées peuvent s'expliquer par l'influence du TEL sur l'effet bystander radio-induit (112) (113) dont nous avons déjà discuté dans l'introduction.

Enfin, ces expériences nous ont permis de montrer les difficultés d'étude de l'effet bystander et notamment l'importance du choix de l'outil d'analyse. En effet, nous avons eu du mal à trouver des techniques différentes des tests de clonogénicité permettant d'étudier ce phénomène. Les expériences de marquage par « cell trace » ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet bystander. En effet, nous n'avons observé aucune différence d'index de prolifération des cellules contrôles et des cellules T/C-28a2 ayant reçu le milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy par rayons-X comme on aurait pu s'y attendre.

De même l'étude de la viabilité des cellules et de la répartition des cellules bystander au sein du cycle cellulaire n'ont pas permis de mettre en évidence un effet bystander.

Ces résultats peuvent s'expliquer par des différences dans les protocoles utilisés pour réaliser ces expériences. En effet, lors des tests de survie les cellules sont restées 24h en contact avec le milieu bystander puis le test de clonogénicité était réalisé mais avec du milieu neuf tandis que pour ces expériences, le milieu bystander était placé sur les cellules jusqu'à la fin de la culture avant l'analyse de la répartition des cellules au sein du cycle cellulaire par CMF soit de 24 à 96h de contact et comme on a pu le voir dans la partie : « III. 4. 1 Choix du type de protocole pour l'étude de l'effet bystander » de l'introduction, le temps est un facteur influençant grandement l'effet bystander.

Ainsi, afin de pallier aux difficultés rencontrées et notamment concernant le facteur « temps », nous avons poursuivi nos investigations par des expériences d'impédancemétrie. Cette technique a l'avantage d'être très sensible et permet donc de mettre en évidence des effets parfois imperceptibles *via* d'autres techniques. De plus, il s'agit d'une accumulation de données en continu et donc le choix du temps de l'analyse est moins restreint. Ces expériences nous ont permis de montrer un effet bystander sur les cellules T/C-28a2 particulièrement après irradiation des cellules émettrices à 0,1 Gy par des rayons-X et de confirmer les données obtenues lors des tests de clonogénicité.

Enfin, l'étude des dommages à l'ADN *via* des tests de MN a également permis de montrer un effet bystander radio-induit. On a pu observer une réponse que l'on pourrait qualifier comme étant saturée. En effet, on observe une induction de MN à partir de 0,1 Gy bystander après une irradiation des cellules émettrices (SW 1353) par rayons-X et à partir de 0,05 Gy après une irradiation des SW 1353 par des ions-carbone pour ensuite atteindre un "plateau" jusqu'à la dernière dose étudiée de 8 Gy bystander. Ces résultats assez différents de ceux obtenus lors de nos expériences précédentes sont similaires à ceux obtenus dans l'étude du Dr. Wakatsuki utilisant des fibroblastes comme cellules réceptrices et les cellules SW 1353 comme cellules émettrices. En effet, les auteurs ont pu observer une induction de MN dans les cellules bystander à faible dose et un plateau pour des doses plus élevées (110).

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, nous sommes capables de répondre à la question suivante : « Les cellules de CHS sont elles capables d'émettre des signaux bystander ? ». En effet, nos expériences ont prouvé la capacité des cellules de CHS SW 1353 à émettre des signaux bystander, particulièrement à des faibles doses d'irradiation. Toutefois nos expériences ont aussi mis en lumière la complexité de l'étude de l'effet bystander et notamment l'importance du choix de 3 paramètres fondamentaux pour l'étude de ce phénomène :

- l'**outil** d'analyse ;
- le **type cellulaire** ;
- et la **source d'irradiation**.

Chapitre 2 : Quels sont les facteurs impliqués dans l'effet bystander ?

I. Résultats : Analyse des facteurs bystander

I. 1. Étude de la nature des facteurs bystander

I. 1. 1. Thermo-sensibilité des facteurs bystander

Après avoir mis en évidence un phénomène bystander radio-induit sur les cellules de chondrocytes T/C-28a2 après un transfert de milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées par rayons-X et ions-carbone, localisé principalement aux faibles doses, nous avons voulu comprendre à quoi pouvait être dû ce phénomène et plus précisément à ce que pouvait contenir le milieu bystander provenant des SW 1353 irradiées pour induire un tel effet biologique sur les cellules T/C-28a2.

Ainsi nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la thermo-sensibilité des facteurs contenus dans le milieu bystander. Nous avons donc réalisé des tests de clonogénicité sur les cellules T/C-28a2 après transfert de milieu mais cette fois ci en chauffant le surnageant bystander, le protocole détaillé de ces expériences est décrit dans le paragraphe : « IV. 1. 1. Protocole d'étude de la thermosensibilité des facteurs bystander ». Les expériences ont été réalisées deux fois de façon indépendante, les résultats sont donc moyennés et normalisés par rapport à la condition 0 Gy bystander non chauffé. Les résultats sont représentés sur la figure 69, les lettres a, b et c signifient que les résultats sont significativement différents. Ainsi, on note une sensibilité à la chaleur du milieu conditionné à partir de 70 ° C. En effet, lorsque le milieu a été chauffé à 70 ° C et à 95 ° C, l'effet bystander habituellement observé à 0,1 Gy bystander sur les T / C28-a2 est perdu.

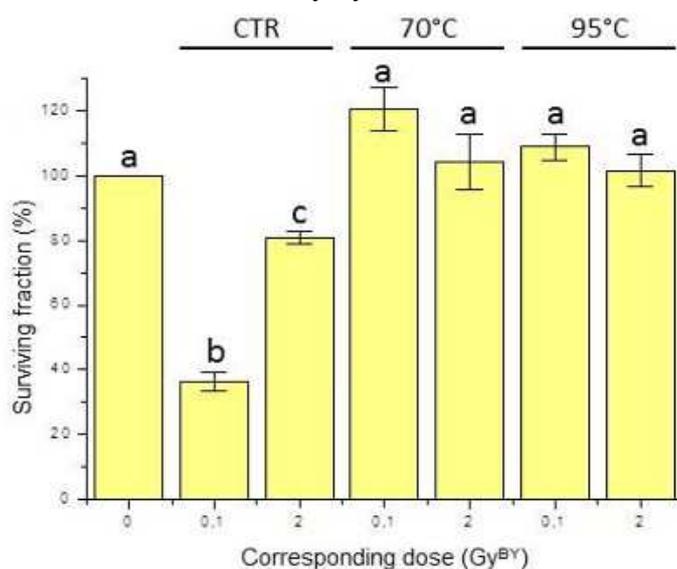


Figure 69 : Mise en évidence de la thermo-sensibilité des facteurs bystander

I. 1. 2. Concentration des facteurs bystander

Nous avons poursuivi nos expériences de caractérisation du milieu bystander par des tests de dilution. Pour cela, avant d'être transféré sur les cellules T/C-28a2, le milieu provenant des cellules SW 1353 irradiées par rayons-X à 0,1 Gy a été dilué. Le protocole utilisé est décrit dans le paragraphe : « IV. 1. 2. Protocole d'étude de l'importance de la concentration en facteurs bystander ». Le milieu bystander a été dilué à 50%, 25% et 10% avec du milieu neuf. Les expériences ont été réalisées deux fois de façon indépendante, les résultats sont donc moyennés et normalisés par rapport à la condition 0 Gy bystander non dilué. Les lettres a, b et c signifient que les résultats sont significativement différents. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 70 :

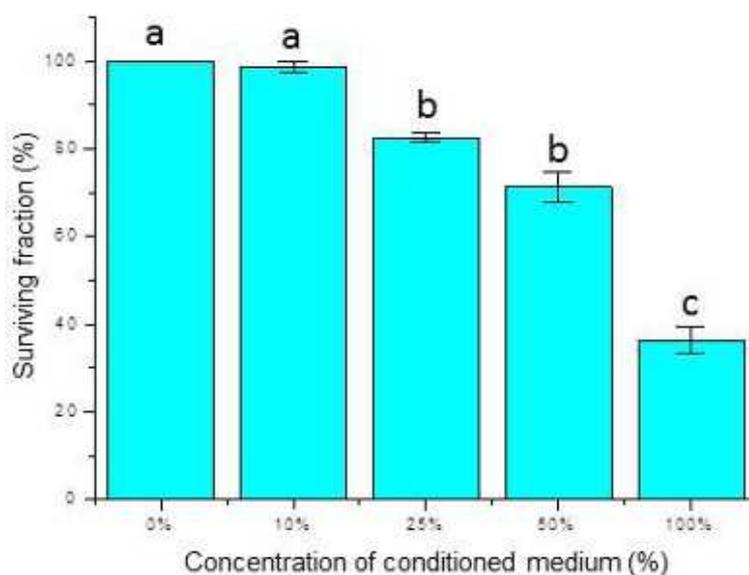


Figure 70 : Mise en évidence de l'importance de la concentration des facteurs bystander

- Lorsque 10 % du milieu bystander est transféré (+ 90 % de milieu neuf) aucun effet bystander n'a été observé.
- Lorsque 25 % du milieu bystander est transféré (+ 75% de milieu neuf), on a pu observer une réduction du taux de survie des cellules T/C-28a2 de 18 %.
- Lorsque 50 % du milieu bystander est transféré (+ 50 % de milieu neuf), la fraction survivante de cellules T/C-28a2 est de seulement 72 % ce qui correspond à la moitié de l'effet bystander communément observé en comparaison avec le milieu conditionné non dilué où la fraction survivante est de 36 %.

I. 2. Étude de la nature des facteurs bystander

I. 2. 1. ELISA multiplex

Ainsi, pour cette étude, nous avons étudié le milieu bystander issu des cellules SW 1353 irradiées à 0/0,1/2 Gy par rayons-X et par ions-carbone. Le protocole complet concernant ces expériences est décrit dans le paragraphe : “IV. 2. 2. Etude de 4 cytokines par ELISA multiplex”.

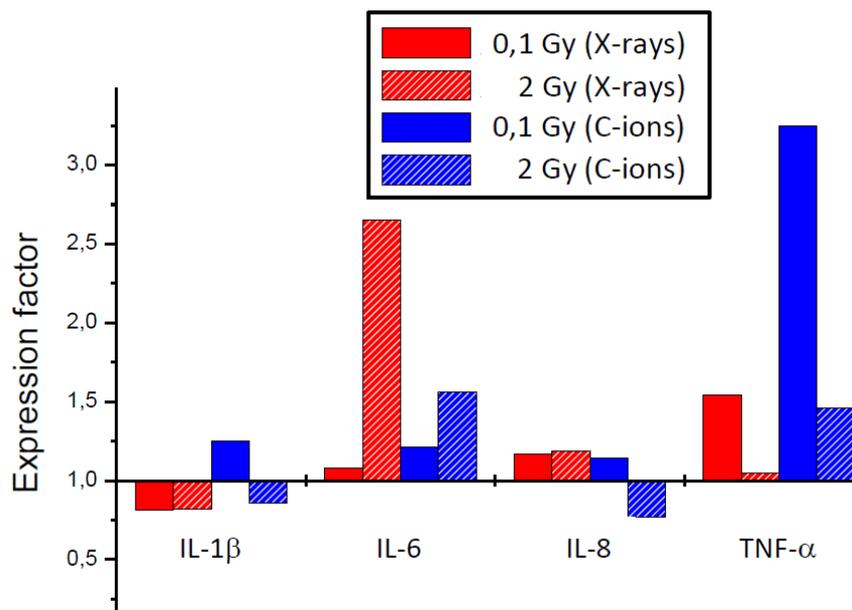


Figure 71 : Expression de 4 cytokines sécrétées par les cellules SW 1353 après irradiation (ELISA MSD)

Par la technologie ELISA MSD (Figure 71), 4 cytokines ont été analysées (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α) :

- Concernant l'IL-1 β , peu importe la dose ou le type d'irradiation, il semble que l'expression de cette cytokine ne soit pas modulée.
- Concernant l'IL-6, on observe une forte augmentation de son expression d'environ 2,6 fois après une irradiation des SW 1353 à 2 Gy par rayons-X et d'environ 1,5 fois par ions-carbone.
- Concernant l'IL-8, de la même façon que pour l'IL-1 β on observe une très faible variation de son expression et ce quel que soit la condition étudiée.
- Concernant le TNF- α , on observe une augmentation de plus de 3 fois après une irradiation à 0,1 Gy par ions-carbone et de 1,5 fois par rayons-X. Une augmentation de son expression de 1,5 fois est également observée pour une irradiation à 2 Gy par ions-carbone.

Ces résultats nous ont permis de proposer un candidat potentiel, le TNF- α pour expliquer au moins en partie l'effet bystander radio-induit observé après transfert de milieu issu de cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy sur des cellules T/C-28a2. En effet, nous recherchions un facteur qui soit principalement augmenté (l'effet étant perdu après une dilution du milieu bystander) après une irradiation des cellules SW 1353 à 0,1 Gy.

I. 2. 2. Quantification de cytokines par CMF

Nous avons décidé de poursuivre nos investigations sur l'étude des cytokines par une autre technique afin de confirmer notre hypothèse sur l'implication du TNF- α et également d'élargir le panel de cytokines étudiées pour peut-être identifier d'autres cytokines impliquées dans le phénomène bystander observé.

Ainsi nous nous sommes intéressés à l'étude d'un panel de 13 cytokines (IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL12P70, IL-17A, IL-18, IL-23, IL-33) grâce au kit Biolegend (Human Inflammatory Panel) dont le protocole précis est décrit dans le paragraphe : « IV. 2. 1. Etude d'un panel de 13 cytokines inflammatoires par un test d'immuno-billes ».

Ces expériences ont été réalisées sur du milieu bystander provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0/0,1/2 Gy par rayons-X et par ions-carbone. Les milieux bystander ont ensuite été traités selon les instructions du kit et donc marqués par immuno-marquage afin d'être ensuite analysés par CMF pour identifier chacune des cytokines présentes dans le milieu et surtout en quelle proportion.

Les résultats sont présentés dans le tableau 21, ils sont exprimés en pourcentage d'augmentation ou de diminution d'expression par rapport à la condition contrôle 0 Gy :

- On remarque que globalement les 13 cytokines testées sont augmentées après une irradiation à 0,1 Gy par des ions-carbone.
- Plusieurs cytokines présentent peu de variation d'expression post-irradiation que ce soit à des doses différentes (0,1 et 2 Gy) ou pour des types d'irradiation différents. C'est le cas de l'IL-1 β , l'IFN- α 2, l'IFN- γ et le TNF- α dont les expressions varient de -5 à +5.
- La cytokine MCP-1 est celle dont l'expression augmente le plus fortement après une irradiation par ions-carbone à 0,1 Gy (+104). Elle augmente aussi après une irradiation par rayons-X à 0,1 Gy mais de façon moins forte (+15) qu'avec les ions-carbone.
- L'IL-6 est plus exprimé après une irradiation à 0,1 Gy par rayons-X et ions-carbone (+47 et +12, respectivement) mais également et de façon plus forte encore après une irradiation par rayons-X à 2 Gy (+67).

- L'IL-8 est globalement plus exprimé après irradiation mais d'avantage après une irradiation par rayons-X et particulièrement à 0,1 Gy (+198). C'est d'ailleurs la plus forte hausse d'expression observée dans ces expériences.
- Les 6 dernières cytokines présentées dans ce tableau voient leur expression légèrement modifiée d'une condition à une autre, de -11 à +16.

	Rayons-X (Gy)		Ions-carbone (Gy)	
	0,1	2	0,1	2
IL-1 β	-5	+5	+1	-4
IFN- α 2	+2	+2	+3	0
IFN- γ	-2	0	+1	-1
TNF- α ,	-5	0	+1	0
MCP-1	+15	-9	+104	+9
IL-6	+47	+67	+12	-3
IL-8	+198	+140	+24	+3
IL-10	-11	+11	+6	0
IL12P70	-6	+16	0	-6
IL-17A	-4	+14	+12	+1
IL-18	0	+11	+10	-2
IL-23	+2	+4	+7	+1
IL-33	+1	+2	+7	+4

Tableau 21 : Expression de 13 cytokines sécrétées par les cellules SW 1353 après irradiation (CMF)

Ces résultats nous permettent d'en apprendre d'avantage sur les potentiels cytokines candidates pour l'explication du phénomène bystander observé précédemment. On peut retenir la cytokine MCP-1 dont l'expression augmente spécifiquement après une irradiation par ions-carbones à 0,1 Gy. L'expression de l'IL-8 est également très fortement augmentée concernant la condition irradiée par rayons-X à 0,1 Gy.

I. 3. Étude du sécrétome des cellules irradiées

Le protocole utilisé pour cette étude est décrit dans la partie : “IV. 3. Etude du sécrétome des cellules irradiées”. Brièvement, nous avons récolté le milieu bystander provenant de cellules SW 1353 irradiées par rayons-X à 0 et 0,1 Gy. Ce dernier a ensuite été analysé par spectrométrie de masse au laboratoire Li2D (CEA, Marcoule). Cette étude nous a permis de comparer le sécrétome des cellules SW 1353 non-irradiées (0Gy) avec le sécrétome des cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy et ainsi d'identifier les protéines pouvant être impliquées dans l'effet bystander radio-induit.

Chaque condition a été répétée trois fois de façon indépendante et chaque réplicat a été analysé deux fois par spectrométrie de masse correspondant à 24 runs nano LC-MS / MS cumulés. A l'issue de cette analyse, l'ensemble des données a été analysé de la façon suivante :

- Première étape : les données ont été entrées dans la base de données « Bos taurus » afin d'éliminer les contaminants dû au SVF. En effet, même si le tapis de cellules SW 1353 a été rincé (5 ou 10 fois) au PBS au retour de l'irradiation il reste des résidus de sérum dans nos échantillons, cette étape a donc pour but de quantifier la quantité de protéines provenant du SVF. Ainsi 357 084 spectres ont été détectés dont 21 209 spectres ont été identifiés comme provenant du SVF soit 6 % des spectres totaux. Toutefois le taux de BSA (Bovin Serum Albumin), qui est la protéine la plus abondante dans le SVF, est d'environ 2 % par échantillons lavés 10 fois tandis qu'il est de 10 à 12 % pour les échantillons lavés 5 fois.
- Deuxième étape : les données ont été entrées dans la base de données « Swissprot human ». Un total de 1522 protéines a pu être validé.
- Troisième étape : les données ont été entrées dans la base de données « SWT-B3 » préparée par Yannick Cogne et décrite dans le paragraphe : « III. 7. 2. 3. 3. Identification des protéines ». Un total de 1676 protéines a pu être validé (possédant au moins 2 peptides spécifiques).
- Quatrième étape : les données ont été entrées dans les bases de données « SWT-B3 » + « Bos taurus ». Un total de 1740 protéines a pu être validé.
- Cinquième étape : les protéines identifiées ont été regroupées en différents groupes selon leur accession (tout en différenciant les protéines humaines et bovines). Ces « Groupes de Protéines » ont permis d'identifier 1698 protéines. Ensuite, on réalise une comparaison entre les protéines détectées après une irradiation des cellules à 0,1 Gy versus les protéines détectées dans les cellules non-irradiées. Ainsi un total de 87 protéines a été détecté comme

différentiellement exprimé dont 55 protéines sont plus abondantes et 32 protéines sont moins abondantes dans la condition 0,1 Gy par rapport à la condition 0 Gy. Parmi ces 87 protéines, 21 protéines sont spécifiques au SVF, il y a donc 66 protéines qui présentent un intérêt pour notre étude. Parmi ces 66 protéines, nous avons pu débiter l'analyse de 21 d'entre elles qui ont une accession « Swissprot », elles sont présentées dans le tableau ci-dessous :

accession	description	Fold
O43790-04	Keratin, type II cuticular Hb6	7,67
P23528	Cofilin-1	4,85
Q13257	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	2,83
P40227-01	T-complex protein 1 subunit zeta	2,81
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome	2,31
P42167-01	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	2,27
Q14847	LIM and SH3 domain protein 1	2,11
P61163	Alpha-centractin	2,00
Q00325-01	Phosphate carrier protein, mitochondrial	2,00
A6NDG6	Glycerol-3-phosphate phosphatase	1,88
O00232-01	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	1,80
P30566-01	Adenylosuccinate lyase	1,70
P30405	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	1,58
Q99798-01	Aconitate hydratase, mitochondrial	1,54
P61769-01	Beta-2-microglobulin	1,50
Q9NZN4-01	EH domain-containing protein 2	1,50
P54577-01	Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic	-1,64
Q9UBM7-01	7-dehydrocholesterol reductase	-1,67
Q14152-03	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	-1,80
P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	-2,00
P49189-01	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	-2,67
	Protéine dont l'expression est augmentée après irradiation à 0,1 Gy	
	Protéine dont l'expression est diminuée après irradiation à 0,1 Gy	

Tableau 22 : Les 22 protéines avec accession «Swissprot»

Les 45 protéines d'intérêt qui ont été identifiées spécifiquement par la banque de données « SWT-B3 » seront prochainement analysées dès la réception de leur accession. En effet, les résultats concernant l'analyse du sécrétome ayant été obtenus seulement début Septembre 2018, nous n'avons pas pu étudier l'ensemble des protéines d'intérêt.

II. Discussion concernant l'analyse des facteurs bystander

La problématique de ce chapitre 2 était d'étudier et d'identifier les facteurs impliqués dans le phénomène bystander.

Afin de cibler nos expériences nous avons d'abord voulu identifier la nature des facteurs bystander car comme nous avons pu le voir dans la partie introductive de cette thèse, il existe de nombreux facteurs impliqués dans l'effet bystander et leur nature peut être très variée (protéines, ROS, exosomes...).

Ainsi nous avons commencé par des expériences visant à tester la thermo-sensibilité de notre milieu conditionné provenant de cellules SW 1353 irradiées à différentes doses. Pour cela le milieu bystander a été chauffé avant d'être transféré sur les cellules T/C-28a2. Nous avons pu constater que dès 70°C l'effet bystander était perdu. Cette première expérience nous a permis de conclure sur le caractère thermo-sensible du milieu conditionné et donc des facteurs bystander.

Ensuite nous avons réalisé des expériences de dilution du milieu bystander provenant de cellules SW 1353 irradiées par rayons-X. Lorsque le milieu était dilué à 25 et 50 % avant le transfert sur les T/C-28a2, on a observé encore un effet bystander mais inférieur à celui observé avec 100 % de milieu bystander et l'effet était perdu lorsque seulement 10 % du milieu bystander était transféré. Dans une étude similaire utilisant un protocole de dilution et de transfert de milieu, les auteurs ont aussi pu observer une perte de l'effet bystander (147). En effet, la diminution d'environ 20 % de la survie des cellules HPV-G, ayant reçu du milieu provenant de cellules HaCAT irradiées au cobalt-60 à 0,5 ou 5 Gy, étaient perdus lorsque le milieu conditionné était dilué à 50 % avec du milieu frais. Les auteurs de cette étude ont suggéré que ce mécanisme dose-dépendant pouvait s'expliquer par la présence au sein du milieu conditionné de facteurs induits par une irradiation, tel que le TNF- α , le TGF- β et l'oxyde nitrique (NO), qui sont communément reconnus comme étant impliqués dans l'effet bystander. Ainsi, il est tout à fait envisageable que le phénomène que nous observons fasse appel à des mécanismes similaires à celui décrit dans cette étude.

A la suite de ces expériences et ayant davantage d'informations sur la nature des facteurs bystander sécrétées, nous nous sommes intéressés à la possibilité que ces facteurs soient des cytokines. En effet, comme on a pu le voir dans l'introduction, les cytokines sont sécrétées par les cellules après une irradiation (46) et elles sont connues pour être impliquées dans l'effet bystander radio-induit (92) (93) (148). Ainsi, l'étude des cytokines présentées dans le milieu provenant de SW 1353 irradiées a été réalisée par 2 techniques et a permis de révéler l'implication potentiel de 3 cytokines dans l'effet bystander radio-induit :

- La cytokine MCP-1 dont l'expression est augmentée après une irradiation par rayons-X et surtout par ions-carbone (à la dose 0,1 Gy) des cellules SW 1353. Cette cytokine est d'ailleurs déjà identifiée dans la littérature comme étant impliquée dans l'effet bystander. En effet, une étude ayant mis en évidence l'induction de dommages à l'ADN (par comptage γ -H2AX) au sein des cellules bystander *via* des expériences de transfert de milieu provenant de cellules de fibroblastes irradiées à 2 Gy par rayons-X, a également montré par des analyses du milieu conditionné, une augmentation de l'expression de MCP-1 (149).
- La cytokine IL-8 dont l'expression est fortement augmentée après une irradiation par rayons-X à 0,1 Gy. Cette cytokine est connue pour son rôle dans la propagation de l'effet bystander radio-induit. De nombreuses cellules réceptrices possèdent le récepteur à l'IL-8 (IL-8R) qui va entraîner, une fois lié à la cytokine, une cascade de réactions au sein de la cellule bystander notamment en passant par les voies de signalisation MAPK et NF- κ B induisant entre autre la formation de ROS au sein des cellules bystander. Les ROS qui de la même façon qu'au sein d'une cellule irradiée peuvent induire des lésions à l'ADN pouvant entraîner la mort des cellules (96). Également, ces ROS peuvent conduire les cellules bystander à émettre des signaux ou encore à créer des gap-jonctions avec leurs cellules voisines non irradiées et ainsi propager l'effet bystander radio-induit (102).
- Le TNF- α dont l'expression est augmentée après une irradiation par rayons-X et par ions-carbone à 0,1 Gy. Cette cytokine est identifiée dans la littérature comme étant massivement relarguée par les cellules irradiées (46). Une étude de transfert de milieu provenant de cellules de cancer de poumons irradiées à 2 Gy par rayons-X a permis de mettre en évidence une diminution de la survie des cellules bystander (150). Les auteurs se sont ensuite intéressés à la composition du milieu bystander responsable de cet effet et ont ainsi montré la présence de TNF- α au sein du milieu conditionné. Le TNF- α étant connu pour activer la voie NF- κ B induisant entre autres la mort des cellules par apoptose les auteurs ont émis l'hypothèse que la diminution de la survie des cellules pouvait s'expliquer par cette voie de signalisation au sein des cellules bystander.

Ces 3 cytokines représentent des candidats potentiels pour expliquer l'effet bystander radio-induit que l'on observe. En effet, en plus d'avoir été identifiés spécifiquement dans le milieu bystander, nous savons que les facteurs responsables de cet effet sont thermo-sensibles, ce qui est le cas des cytokines. Toutefois les résultats obtenus sont assez peu reproductibles d'une expérience à une autre. En effet, avec le test ELISA multiplex, on a observé une augmentation significative du TNF- α à 0,1 Gy (rayons-X et ions-carbones), ce qui n'a pas été le cas avec le dosage des cytokines par CMF. À

l'inverse, l'expression de l'IL-8 a été retrouvée comme augmentée après une irradiation par rayons-X avec le dosage des cytokines par CMF, ce qui n'a pas été observé avec le test ELISA.

Chapitre 3 : Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans le phénomène bystander radio-induit ?

I. Résultats : Étude du protéome des cellules bystander

I. 1. Par électrophorèse bidimensionnelle

Le protocole précis utilisé pour ces expériences est décrit dans le paragraphe : “III. 7. 1 Protocole d'étude du protéome des cellules bystander : Electrophorèse bidimensionnelle”.

Brièvement, des expériences de transfert de milieu ont été réalisées afin d'étudier les modifications induites sur le protéome des cellules bystander qui ont reçu du milieu issu de cellules irradiées. Pour cela les cellules SW 1353 ont été irradiées à 0 et 0,1 Gy puis le surnageant bystander a été transféré sur les cellules bystander T/C-28a2 pendant 24h. Les cellules ont ensuite été décrochées afin d'en extraire les protéines, à la suite d'un dosage de Bradford les protéines ont été déposées en quantité suffisante (250 µg / gel) sur des strips immobiline[®] Drystrip pH 4-7 afin d'être séparées selon leurs point iso-électrique. A l'issue de cette première dimension, les strips ont été déposés sur des gels d'acrylamide 12 % afin d'être séparés selon leur masse moléculaire. Les gels obtenus ont ensuite été colorés par une solution contenant du nitrate d'argent. Une fois colorés, les gels ont été scannés grâce à un scanner spécialisé GS-900 (Biorad) puis analysés.

L'analyse des gels permet de superposer différentes conditions et de comparer les spots (correspondant aux protéines) pour chaque condition. Certains spots seront visibles dans toutes les conditions et représenteront surtout des protéines structurales comme l'actine ou les micro-tubules. Tandis que d'autres seront propres à une condition précise et leur intensité pourra être modulée selon la condition analysée. Enfin, certaines protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles ou être modifiées par des voies de signalisation cellulaire entraînant des glycosylations où des phosphorylations qui engendreront des différences de localisation de ces protéines sur les gels.

La figure 72 représente un gel utilisé comme référence pour la comparaison des conditions bystander 0 Gy par rapport à la condition bystander 0,1 Gy. Cette analyse permet ainsi de mettre en évidence la totalité des spots variants entre ces deux conditions reflétant les variations des protéomes de ces 2 conditions. Ainsi, pour cette étude on peut noter 29 spots variants entre les 2 conditions testées. Ces spots variants ont ensuite été prélevés puis analysés par un spectromètre de masse afin

d'identifier les protéines correspondantes pour chacun de ces spots.

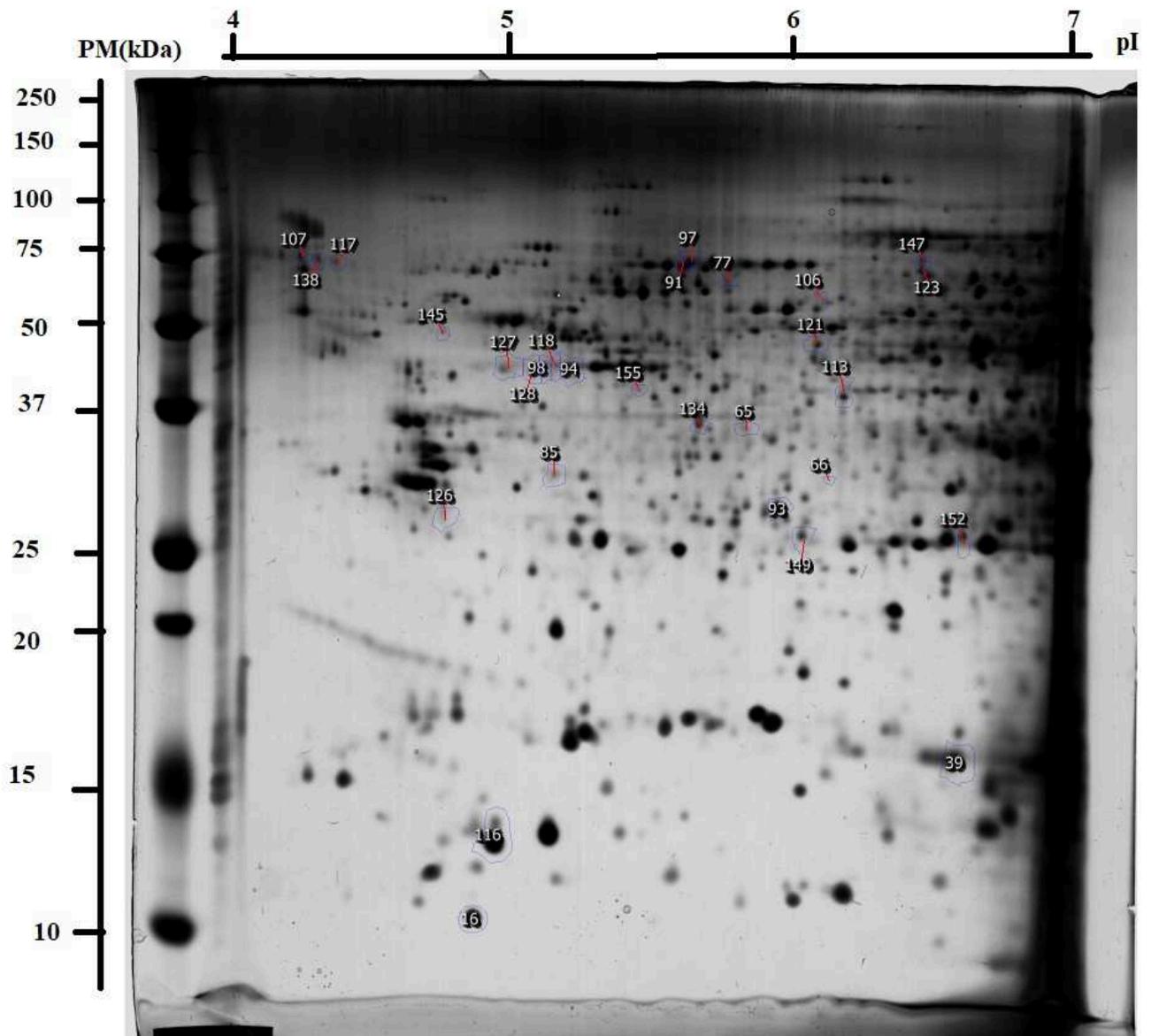


Figure 72 : Image du gel de référence et des spots variants utilisés pour l'analyse bystander 0 Gy / bystander 0,1 Gy des T/C-28a2

La figure 73 présente plusieurs exemples de spots sélectionnées sur le gel de référence et qui ont ensuite été analysés individuellement par le logiciel Same spot (les n°138, 16, 85 et 128 sur le gel de référence). Certains spots comme les spots n° 138, 16 et 85 sont augmentés dans la condition 0,1 Gy par rapport à la condition 0 Gy, tandis que d'autres comme le spot 128 sont diminués dans la condition 0,1 Gy par rapport à la condition 0 Gy.

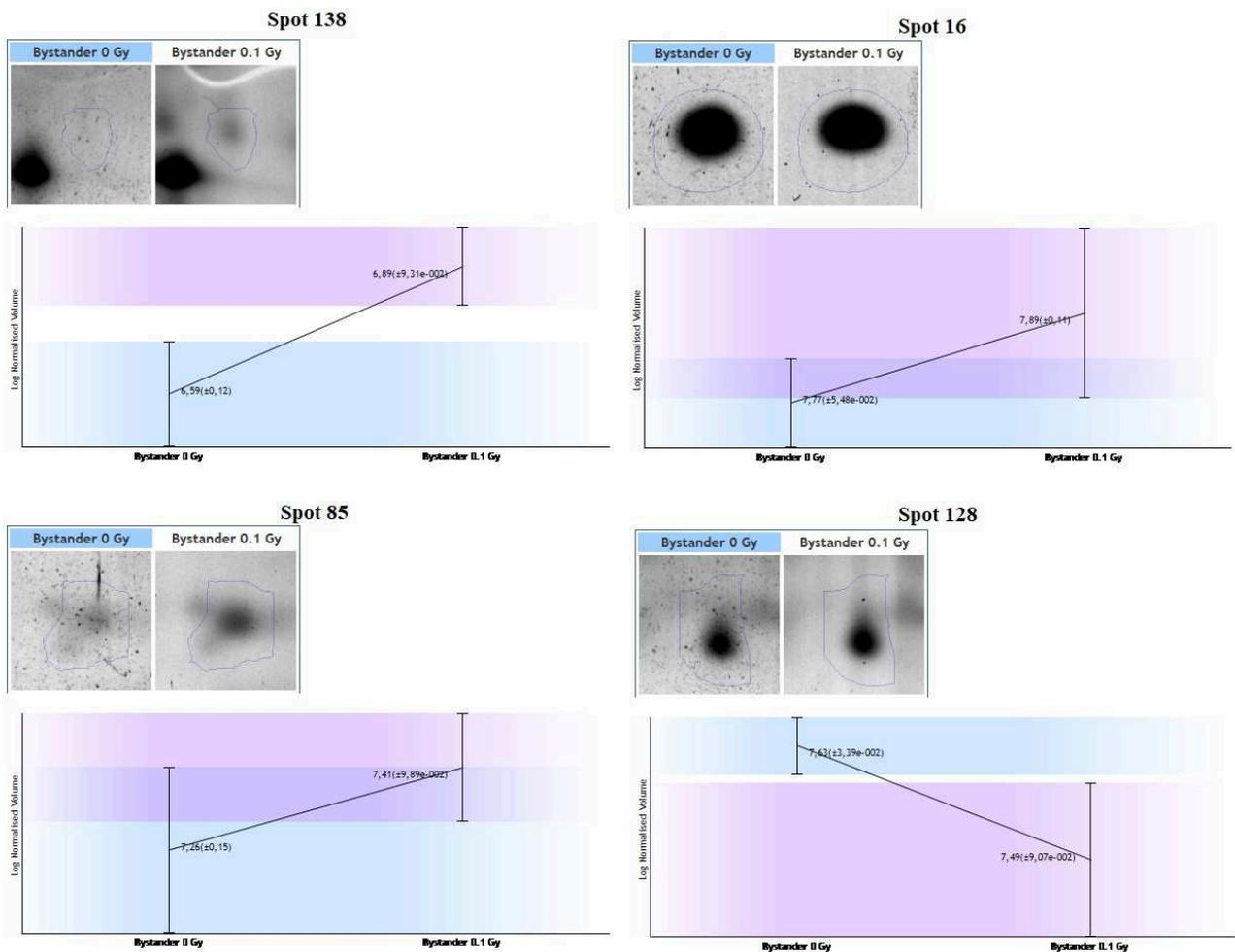


Figure 73 : Niveau d'expression des protéines “138,16, 85 et 128”

Le tableau 23 représente l'ensemble des résultats de l'analyse des spots prélevés, par spectrométrie de masse. On distingue 6 colonnes dans ce tableau. La colonne “Notes” représente les numéros de chaque spot cartographié sur le gel de référence (*Figure 72*). La colonne “Fold” représente le niveau d'expression de chacune des protéines par rapport à la condition contrôle, il est obtenu après l'analyse individuelle de chaque spot (*Figure 73*). En effet, comme on peut le voir dans le tableau 23, l'expression des protéines en jaune est augmentée dans la condition 0 Gy tandis que l'expression des protéines en vert est augmentée dans la condition 0,1 Gy. La colonne “pI” représente le point iso-électrique des protéines identifiées. La colonne “MW” correspond à la masse des protéines étudiées. La colonne “Accession” correspond au code à entrer dans la base de données “Uniprot” permettant l'identification de la protéine, cette donnée permet aussi de retrouver l'ensemble des informations existantes sur cette protéine. Enfin la colonne “Description” permet de nommer les protéines identifiées et donner quelques informations sur leurs rôles potentiels au sein des cellules.

Notes	Fold	pI	MW	Accession	Description
16	1,3079416	4,79	20	P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]
39	1,6234021	6,69	26	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2 - [PPIA_HUMAN]
65	1,8130469	5,86	72	P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENO1_HUMAN]
				P05388	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1 - [RLA0_HUMAN]
66	1,4032771	6,19	62	x	
77	1,5575053	5,79	130	P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1 OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 - [IGHA1_HUMAN]
				Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B OS=Homo sapiens GN=ZG16B PE=1 SV=3 - [ZG16B_HUMAN]
85	1,3800701	5,11	63	Q15691	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Homo sapiens GN=MAPRE1 PE=1 SV=3 - [MARE1_HUMAN]
91	1,2932961	5,63	140	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 - [HSP7C_HUMAN]
93	1,3063549	5,99	57	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSME1 PE=1 SV=1 - [PSME1_HUMAN]
94	1,3768728	5,18	88	x	
97	1,3219603	5,64	141	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2 - [GRP75_HUMAN]
98	1,5893781	5,09	88	x	
106	1,3056829	6,18	115	x	
107	1,6085417	4,11	146	x	
113	1,273867	6,25	79	P40121	Macrophage-capping protein OS=Homo sapiens GN=CAPG PE=1 SV=2 - [CAPG_HUMAN]
116	1,2721674	4,87	23	P15924	Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3 - [DESP_HUMAN]
				P10599	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3 - [THIO_HUMAN]
117	1,3195794	4,25	143	x	
118	1,4420502	5,13	88	x	
121	1,4716126	6,15	94	P35998	26S proteasome regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens GN=PSMC2 PE=1 SV=3 - [PRS7_HUMAN]
123	1,3127831	6,56	136	P49368	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=4 - [TCPG_HUMAN]
126	1,6276638	4,67	56	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Homo sapiens GN=TPM1 PE=1 SV=2 - [TPM1_HUMAN]
				P31946	14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=1 SV=3 - [1433B_HUMAN]
127	1,3070507	4,91	87	P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]
				Q16186	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 OS=Homo sapiens GN=ADRM1 PE=1 SV=2 - [ADRM1_HUMAN]
128	1,3553405	5,03	87	Q16186	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 OS=Homo sapiens GN=ADRM1 PE=1 SV=2 - [ADRM1_HUMAN]
134	1,2603369	5,68	73	Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens GN=EIF3I PE=1 SV=1 - [EIF3I_HUMAN]
138	1,9817232	4,18	145	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]
145	1,4712852	4,67	98	Q98TY7	Protein HGH1 homolog OS=Homo sapiens GN=HGH1 PE=1 SV=1 - [HGH1_HUMAN]
147	1,4495543	6,56	144	x	
149	1,3028428	6,09	51	x	
152	1,3145383	6,72	51	x	
155	1,3942451	5,43	82	x	

	Total spots
non piquée ou kératine	12
protéines de structure	5
protéines d'intérêt ?	17

Protéine dont l'expression est augmentée dans la condition 0 Gy
Protéine dont l'expression est augmentée dans la condition 0,1 Gy

Tableau 23 : Analyse bystander 0 Gy / bystander 0,1 Gy des T/C-28a2

Ainsi d'après le tableau 23, on peut noter 34 protéines variantes entre le protéome issu de cellules T/C-28a2 ayant reçu du milieu provenant de cellules SW 1353 non-irradiées et le protéome issu de cellules T/C-28a2 ayant reçu du milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées par rayons-X à 0,1 Gy. Il est possible de classer ces 24 protéines en 3 groupes distincts :

- Les spots “**non piqués ou correspondant à de la kératine**” (en gris dans le tableau 23) qui correspondent aux protéines qui n'ont pas pu être prélevées pour l'analyse car souvent les spots étaient trop faibles ou les protéines identifiées comme étant de la kératine. La kératine est naturellement présente dans les cellules, il s'agit d'une protéine de structure mais elle peut aussi être retrouvée à la suite d'une contamination lors du prélèvement du spot. Dans notre analyse, 12 protéines ont été classées dans cette catégorie.
- Les protéines “**de structures**” (en bleu dans le tableau 23) qui sont constitutives des cellules et qui ne sont *a priori* pas en lien avec l'effet bystander que l'on étudie. Par exemple l'actine et les micro-tubules font partie de ces protéines structurales. Dans notre analyse, 5 protéines ont été classées dans cette catégorie.
- Les protéines “**d'intérêt**” (en rose dans le tableau 23), ce sont elles qui nous intéressent particulièrement car ce sont celles qui sont susceptibles de varier spécifiquement entre la condition contrôle et la condition bystander 0,1 Gy. Dans notre analyse, 17 protéines ont été classées dans cette catégorie.

L'analyse des 17 protéines d'intérêt a été réalisée *via* « Uniprot » :

- La **cyclophiline A** (P62937) ou Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) régule le repliement des protéines ainsi que leurs trafics au sein des cellules. Elle est retrouvée au niveau du cytoplasme des cellules mais peut aussi être sécrétée. La cyclophiline A est décrite comme étant impliquée dans de nombreuses pathologies humaines telles que des maladies cardiovasculaires, des infections virales, la neuro-dégénérescence, le cancer, l'asthme... (151).
- L'**alpha-enolase** (P06733) est une enzyme qui joue un rôle dans divers processus tels que le contrôle de la croissance, la tolérance à l'hypoxie et les réactions allergiques. L'alpha-enolase interagit avec la protéine MBP-1 (Myc promoter-Binding Protein 1), permettant la liaison de MBP-1 au promoteur (P2) de l'oncogène Myc entraînant une inhibition de la transcription de l'oncogène conduisant à l'inhibition de la prolifération des cellules (152).
- La protéine **60S acidic ribosomal protein P0** (P05388) est localisée au niveau du cytoplasme des cellules. Elle représente la sous-unité 60S des ribosomes et permet la

synthèse des protéines (153).

- La protéine **IGHA1** (Immunoglobulin heavy constant alpha 1) (P01876) correspond à la région constante des chaînes lourdes d'immunoglobuline. Elle est retrouvée au niveau membranaire et peut aussi être sécrétée (154).
- La protéine **HSC 70** (Heat shock cognate 70 kDa protein) (P11142) est une protéine impliquée dans l'homéostasie des protéines. Elle intervient notamment dans le processus de repliement des protéines. Elle est capable également par liaison au LPS (lipopolysaccharide) bactérien de provoquer une réponse inflammatoire et notamment d'induire la sécrétion de TNF par les monocytes (155) (156).
- La protéine : **Proteasome activator complex subunit 1** ou PSME1 (Q06323) qui est impliquée dans l'assemblage du protéasome engendrant la dégradation des protéines (157).
- La protéine **Hspa9** ou Stress-70 protein, mitochondrial (P38646) qui joue un rôle important dans la biogenèse des ISC (Iron-Sulfur Cluster) mitochondriaux régulant ainsi l'érythropoïèse *via* la stabilisation de l'assemblage des ISC (158).
- **Macrophage-capping protein** ou CAP-G (P40121) est une protéine impliquée dans la motilité des cellules notamment par son interaction avec l'actine (159). Elle est associée aux processus d'invasion/métastases dans plusieurs cancers (160) (161).
- La **thioredoxine** (P10599) est une enzyme d'oxydo-réduction. Elle joue un rôle dans la S-nitrosylation des résidus de cystéine des protéines en réponse à l'oxyde nitrique (NO) intracellulaire. Elle régule la transcription d'AP-1 (162).
- La protéine **26S proteasome regulatory subunit 7** (P35998) est une des composantes du protéasome 26S qui est un complexe multi-protéique permettant la dégradation des protéines ubiquitinées. Ce complexe joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie des protéines en éliminant les protéines mal repliées ou endommagées. Cette protéine est retrouvée dans le cytoplasme des cellules (163).
- La protéine **CCT3** ou **T-complex protein 1 subunit gamma** (P49368) est une protéine chaperonne permettant le bon repliement des protéines (164). Elle est également impliquée dans la prolifération de certaines cellules cancéreuses (165).
- La protéine : **14-3-3 protein beta/alpha** (P31946) appartient à la famille des protéines « 14-3-3 » impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires dont le cycle cellulaire, l'apoptose et la migration des cellules. C'est une protéine qui est retrouvée comme sur-exprimée dans la plupart des cancers (166).
- La protéine : **Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1** (Q16186) est comme la protéine

26S proteasome regulatory subunit 7 décrite précédemment, une des composantes du protéasome 26S.

- **Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I** (Q13347) est un des composants du facteur d'initiation de traduction eucaryote 3 (eIF-3) qui est requis pour plusieurs étapes dans l'initiation de la synthèse des protéines. Le complexe eIF-3 cible et initie spécifiquement la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm impliqué dans la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (167).
- La protéine : **Zymogen granule protein 16 homolog B** (Q96DA0)
- La protéine : **HGH1** (Q9BTY7)

Ainsi l'étude du protéome des cellules bystander par électrophorèse bidimensionnelle, nous a permis d'identifier 17 protéines possiblement impliquées dans l'effet bystander radio-induit au sein des cellules T/C-28a2 ayant reçu du milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy par rayons-X.

I. 2. Par protéo-génomique

L'objectif de ce projet est de mettre en place une stratégie qui permet d'étudier l'effet bystander dans une culture de cellules en mélange, notamment par la mise en évidence de bio-marqueurs spécifiques au phénomène bystander. La stratégie de protéogénomique repose ainsi sur la mise en œuvre de co-culture des cellules SW 1353 irradiées avec des cellules T/C-28a2 non-irradiées au sein d'une même flasque. Une analyse très approfondie de leur protéome respectif, tenant compte des protéo-formes spécifiques à chaque lignée cellulaire permet ainsi de mettre en évidence les protéo-formes induites lors du phénomène bystander. La préparation des échantillons cellulaires individuels et en mélange a été réalisée au sein du laboratoire puis les analyses ont été effectuées sur la plateforme "ProGénoMix", au laboratoire Li2D du CEA de Marcoule. Le protocole détaillé pour cette étude est présenté dans la partie : "III. 7. 2 Protocole d'étude du protéome des cellules bystander en co-culture" du matériels et méthodes.

Mélange SW1353 (0Gy) + T/C-28a2 (0Gy)
vs
Mélange SW1353 (0,1Gy en X-rays) + T/C-28a2 (0Gy)

- Total de 6249 protéines identifiées
 - dont 6020 protéines non-modulées
 - **et 229 protéines modulées** dont 130 augmentées et 99 diminuées

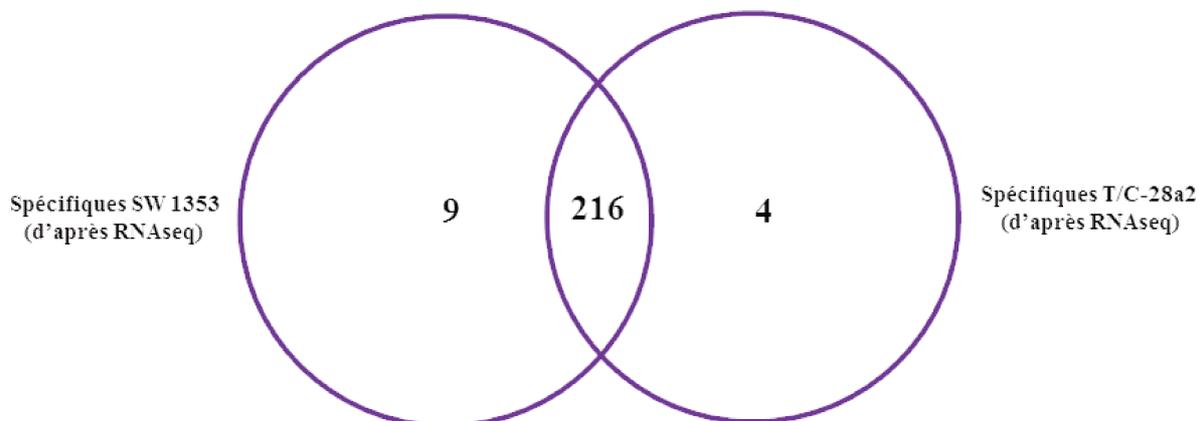


Figure 74 : Analyse de cellules en mélange par protéogénomique

Ainsi, comme on peut le voir sur la figure 74, le mélange de cellules SW 1353 non-irradiées (0 Gy) cultivées avec des cellules T/C-28a2 non-irradiées (0 Gy) a été comparé au mélange de cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy cultivées avec des cellules T/C-28a2 non-irradiées (0 Gy). Cette étude comparative a permis d'identifier 6249 protéines dont 6020 qui ne sont pas modulées entre les 2 mélanges de cellules comparés. Ainsi un total de 229 protéines ont été répertoriées comme modulées dont 130 protéines (soit un total de 3 %) augmentées et 99 diminuées dans le mélange SW 1353 0,1 Gy + T/C-28a2 0 Gy par rapport au mélange SW 1353 0 Gy + T/C-28a2 0 Gy. Sur la base des données RNAseq, 9 protéines parmi les 229 protéines modulées ont été identifiées comme étant spécifiques aux cellules SW 1353 et 4 protéines ont été identifiées comme étant spécifiques aux cellules T/C-28a2. Ainsi cette analyse a permis de mettre en évidence 13 protéines spécifiques aux deux lignées cellulaires (*Tableau 24*), soit 5,6 % des protéines modulées.

Accession	Fold change	Identification
Q9BZE4	0,66	Nucleolar GTP-binding protein 1
Q8CGC7	2,00	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase
inconnu	2,67	inconnu
Q8WTZ3	0,50	Zinc finger protein
Q9H4A3	2,00	Serine/threonine-protein kinase
Q08AG5	0,50	Zinc finger protein 844
Q9UHX1	0,50	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60
P46976.4	0,38	Glycogenin-1
O00370	2,86	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein
P29692	2,67	Elongation factor 1-delta
P62936	2,39	Cyclophilin A
inconnu	2,00	inconnu
O00370	0,45	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein
		Protéines spécifiques à la lignée T/C-28a2
		Protéines spécifiques à la lignée SW 1353

Tableau 24 : Récapitulatif des 12 protéines spécifiques aux lignées cellulaires SW 1353 et T/C-28a2

Les données présentées dans le tableau 24 regroupent l'ensemble des protéines identifiées comme étant spécifiques à la lignée cellulaire T/C-28a2 ou SW 1353 et modulées entre les deux mélanges cellulaires étudiés (mélange contrôle/mélange bystander). Ainsi, on peut dire que les protéines qui sont spécifiques aux cellules SW 1353 sont liées à l'irradiation à 0,1 Gy, tandis que les protéines spécifiques aux cellules T/C-28a2 sont liées à l'effet bystander radio-induit par les cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy.

Parmi les 4 protéines spécifiques à la lignée T/C-28a2, seulement 3 ont pu être identifiées, la quatrième étant inconnue. On peut aussi noter que deux d'entre elles ont leur expression qui augmente dans le mélange de cellules SW 1353 0,1 Gy + T/C-28a2 0 Gy par rapport au mélange de cellules SW 1353 0 Gy + T/C-28a2 0 Gy. La protéine « inconnue » qui est augmentée 2,67 fois dans le mélange bystander et la protéine « Bifonctionnal glutamate/proline—tRNA ligase » qui est augmentée 2,00 fois dans le mélange bystander également. Les 2 autres protéines, la « Nucleolar GTP-binding proteine 1 » et la « Zinc finger protein » sont quant à elles diminuées de 0,66 et 0,50 fois respectivement. Compte tenu de la réception tardive de ces résultats, les analyses fonctionnelles concernant ces protéines sont en cours, et seront abordés lors de la soutenance de thèse.

Concernant les 9 protéines spécifiques aux cellules SW 1353, une d'entre elles n'a pas pu être identifiée : « inconnue ». En terme de niveau d'expression 5 protéines sont augmentées et 4 sont diminuées dans le mélange bystander par rapport au mélange contrôle.

II. Discussion concernant l'étude du protéome des cellules bystander

La question posée en début de chapitre était la suivante : « Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans le phénomène bystander radio-induit ? »

Pour répondre à cette problématique, nous avons utilisé deux techniques d'analyse du protéome des cellules bystander :

- La première technique a consisté en une étude du protéome des cellules bystander par électrophorèse bidimensionnelle. Pour cela les cellules T/C-28a2 ont reçu du milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy par rayons-X et le protéome des cellules bystander a ensuite été analysé.
- La seconde technique a consisté en une étude du protéome des cellules bystander par protéogénomique. Pour cela les cellules T/C-28a2 et les cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy par rayons-X ont été placées au sein d'une même flasque et le protéome du mélange de ces cellules a été analysé par protéogénomique.

Ainsi l'utilisation de ces deux techniques a permis une étude globale du protéome des cellules bystander, permettant ainsi d'identifier au sein des cellules T/C-28a2 les acteurs de l'effet bystander radio-induits et notamment les voies de signalisation qui vont être à l'origine de l'induction du retard de prolifération observé sur les cellules bystander.

Toutefois, on peut noter des différences de protocoles entre les deux techniques utilisées. En effet, pour l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle, nous avons utilisé un protocole classique de transfert de milieu. Ainsi, l'effet bystander et les variations sur le protéome des cellules T/C-28a2 est dû à la présence de facteur bystander sécrétés par les cellules SW 1353 irradiées. Tandis que pour l'étude de l'effet bystander par protéogénomique, les cellules sont cultivées en mélange. Ainsi l'effet bystander que l'on observe sur les cellules T/C-28a2 peut également être dû aux facteurs sécrétés par les cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy, mais il peut aussi être dû au contact direct entre les cellules irradiées et les cellules bystander. En effet, les cellules étant cultivées au sein d'une même flasque, elles vont pouvoir communiquer librement et notamment créer des gap-jonctions qui sont connus pour leur implication dans l'effet bystander, comme nous avons déjà pu le voir dans la partie : « II. 3. 1. 3 Induction de gap-jonction entre les cellules » de cette thèse (87) (89).

La technique d'électrophorèse bidimensionnelle va quant à elle permettre d'avoir des informations supplémentaires, notamment concernant les modifications post-traductionnelles des protéines. Par exemple on peut remarquer que la protéine : « Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 » est présente dans 2 spots distincts. Ce phénomène peut s'expliquer par une modification de cette

dernière conduisant à un changement de point isoélectrique pouvant être causé par une phosphorylation de cette protéine.

Globalement ces études nous ont permis d'identifier un ensemble de protéines « candidates » pouvant expliquer en partie l'effet bystander radio-induit que l'on observe. Bien que la plupart d'entre elles ne sont pas encore décrites dans la littérature comme ayant une implication dans l'effet bystander radio-induit, il est possible de lier certaines d'entre elles à des voies de signalisation connues pour participer à ce phénomène.

Par exemple, la cyclophiline A qui a été identifiée à la fois dans les expériences d'électrophorèse bidimensionnelle et dans les expériences de protéo-génomique comme augmentée est connue pour son implication dans la voie de signalisation NF- κ B. En effet, plusieurs études ont mis en évidence qu'une augmentation de l'expression de la cyclophiline A induisait au sein des cellules une activation de la voie NF- κ B (168) (169). Également la cyclophiline A a été décrite comme ayant un lien avec certaines cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF- α et l'IL-8 qui sont également connue pour leur implication dans cette voie de signalisation. Une étude portant sur la prolifération des cellules de glioblastomes (U87) a permis de montrer qu'une inhibition par ARN interférence de la cyclophiline A induisait une inhibition de l'IL-8 causé par une inactivation de la voie NF- κ B, cette dernière régulant la transcription de l'IL-8. Ainsi les auteurs ont montré qu'une inhibition de la cyclophiline A induisait une diminution de la prolifération des cellules U87 (170). Ainsi, au vu de l'ensemble de ces études il est tout à fait envisageable que la cyclophiline A soit impliquée dans l'effet bystander radio-induit que nous avons pu observer au vu de son lien étroit avec la voie de signalisation NF- κ B qui est l'une des voies de signalisation les plus décrites dans le phénomène bystander (171) (172).

Une deuxième protéine, dont l'expression est diminuée au sein du protéome des cellules bystander, présente un intérêt non négligeable pour tenter d'expliquer l'effet bystander radio-induit observé au sein de nos cellules, il s'agit de l'énolase- α . En effet, cette protéine interagit avec la protéine MBP-1 ce qui entraîne la liaison de MBP-1 au promoteur (P2) de l'oncogène Myc et régule à la baisse l'expression de c-myc conduisant à une baisse de la prolifération cellulaire (173).

Une étude a mis en évidence qu'une sur-expression de MBP-1 dans des cellules de cancer gastrique (SC-M1) avait pour conséquence de diminuer la prolifération des cellules tumorales. Les auteurs ont montré que MBP-1 se lie au promoteur de COX-2 entraînant une diminution de l'expression de COX-2 (174).

Hors plusieurs études ont mis en évidence l'implication de la protéine COX-2 dans l'effet bystander (175) notamment *via* la voie de signalisation NF- κ B (176). Ainsi, de part la similitude entre

l'enolase- α et la protéine MBP-1 dont l'ADNc codant pour ces 2 protéines présente 97 % d'homologie de séquence (152) et leurs interactions connues, il est judicieux de s'intéresser à l'enolase- α pour tenter de mieux caractériser l'effet bystander que l'on observe.

D'autres protéines peuvent également être liées à l'effet bystander comme par exemple la thioredoxine dont l'expression est augmentée au sein du protéome des cellules bystander, et qui régule la transcription d'AP-1 (177). Le facteur de transcription AP-1 est connu pour son rôle dans la signalisation des cellules ayant été exposées à des RI. AP-1 est notamment activé par les ROS et engendre au sein des cellules irradiées la transcription de gènes responsables entre autres de la progression des cellules dans le cycle cellulaire et de la prolifération des cellules (56). Les mécanismes induits au sein des cellules bystander étant relativement proches de ceux observés dans les cellules irradiées nous pouvons imaginer qu'un mécanisme similaire impliquant ces mêmes protéines pourrait avoir lieu au sein de nos cellules bystander.

Enfin concernant les autres protéines que nous avons pu identifier dans nos expériences, il est difficile avec le peu d'informations disponibles les concernant de les lier au phénomène bystander que l'on observe. Toutefois on peut noter le rôle de plusieurs d'entre elles dans des mécanismes pouvant participer à l'effet bystander radio-induit telles que la prolifération cellulaire, l'invasion cellulaire, la régulation de l'adhésion des cellules, la régulation du stress oxydatif, la régulation de la dégradation des protéines...

Chapitre 4 : Quel est l'intérêt d'utiliser un modèle de culture cellulaire tridimensionnel pour étudier l'effet bystander ?

I. Résultats : analyse de la réponse bystander en 3D

I. 1. Mise au point d'un modèle de culture en 3D

Afin d'étudier l'effet bystander en 3D, nous avons dans un premier temps mis au point un modèle permettant la mise en culture de nos cellules en 3D. Nous avons décidé de travailler sur un modèle de type « pellet » qui correspond à un agrégat cellulaire formé à partir de la centrifugation douce d'une suspension de cellules qui a la particularité de former une petite sphère dont le maintien est permis par la production par les cellules d'éléments matriciels.

D'abord, nous avons testé la composition du milieu de culture optimal pour la culture en pellet. Ainsi, nous avons testé les 4 combinaisons présentées dans le tableau 25. Le lot de facteurs correspond à un ensemble d'éléments connus pour favoriser la culture en 3D, cet ensemble se compose plus précisément d'acide ascorbique, d'insuline et d'hydrocortisone.

	1	2	3	4
DMEM (high glucose)	+	+	+	+
SVF	+	-	+	+
Bmp2	+	+	-	+
Lots de facteurs	+	+	+	-

Tableau 25 : Test milieu 3D pour la culture en pellet

C'est la combinaison 1 qui a donné les résultats les plus intéressants pour la culture en pellet. En effet, il semblerait que l'ajout de SVF, de Bmp-2 et de facteurs 3D permette de former les pellets qui ont le meilleur maintien et la plus grande taille après 10 jours de culture (*Figure 75*).

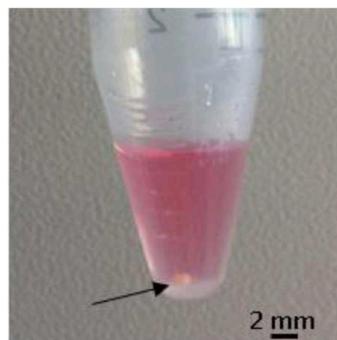


Figure 75 : Photo d'un pellet de T/C-28a2 cultivé en milieu 3D (combinaison 1) après 10 jours de culture

Les pellets issus des cultures utilisant les autres combinaisons de composants (combinaison 2, 3 et 4) et particulièrement sans Bmp-2 (combinaison 3) présentaient une forme particulière « en donut » caractéristique d'un début de formation du pellet, ou encore un mauvais maintien global, voire une dislocation totale au moment du changement de milieu de culture.

Également, le TGF- β a été utilisé comme potentiel facteur chondrogénique facilitant la mise en 3D de nos cellules. Toutefois, ce facteur a donné des pellets moins stables que ceux obtenus avec la Bmp-2.

Les mêmes tests ont été réalisés avec du milieu MEM en remplacement du milieu DMEM (high glucose) mais n'ont pas permis la formation de pellets suffisamment gros, faisant moins d'un millimètre environ. Ce phénomène peut s'expliquer par la différence de composition entre ces deux milieux et notamment par la concentration élevée en glucose du milieu DMEM (high glucose) qui permet d'apporter les éléments essentiels au maintien des cellules dans le pellet qui sont très nombreuses (environ 1 million) dans un petit volume de milieu de culture (0,5 ml).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la concentration en SVF dans le milieu de culture et nous avons testé l'ajout de SVF à 5 ou 10 %. Il s'est avéré que les pellets les plus compacts et réguliers étaient obtenus avec la condition SVF à 5 %. L'absence totale de sérum quant à elle n'impacte pas la formation du pellet mais a tendance à entraîner l'adhésion du pellet à la paroi du tube ce qui est problématique lors du changement de milieu et entraîne souvent la scission de ce dernier en 2 petits pellets, l'un collé à la paroi et l'autre qui s'est décroché lors du changement de milieu.

Enfin, nous avons testé les conditions d'oxygénation des modèles 3D. Notamment, nous avons testé la culture de pellets en normoxie à 21 % d'oxygène et en physioxie à 2 % d'oxygène. Il y avait assez peu de différences entre les pellets obtenus pour ces 2 conditions, si ce n'est le meilleur maintien des pellets maintenus en physioxie après 10 jours de culture. En effet, les pellets cultivés en normoxie semblaient se désagréger plus facilement que ceux cultivés en physioxie.

A l'issue de ces mises au point, nous avons retenu le milieu de culture suivant pour la culture des cellules T/C-28a2 en pellet :

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose D6429, Sigma Aldrich)
- SVF 5%
- BMP-2 (BMP-2, Novus) 10 ng/mL
- Insuline (CC-4147, Lonza) 0,1mM
- Acide ascorbique (CC-4147, Lonza) 0,1mM
- Glutamine 2mM
- Hydrocortisone (CC-4147, Lonza) 0,1%

L'intégralité du protocole permettant la mise en culture en 3D de cellules T/C-28a2 est décrit dans le paragraphe : « V. 1. 1 Protocole de mise en culture en 3D »

I. 2. Caractérisation d'un modèle de culture en 3D

Étant désormais capables de cultiver en grande quantité et de façon reproductible des modèles 3D, nous avons voulu caractériser ces pellets. Cette caractérisation avait pour but de vérifier que ce modèle était adapté pour l'étude en 3D de l'effet bystander radio-induit et notamment de savoir si il permettait de recréer un micro-environnement proche de celui retrouvé au sein du cartilage.

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire d'Ingénierie Ostéo Articulaire et Dentaire (LIOAD unité INSERM U1229/RMeS) à Nantes.

A la suite de l'inclusion en paraffine et de la coupe de nos pellets (après 15 jours de culture) non-irradiés et n'ayant pas reçu de milieu bystander, nous avons procédé à trois types de colorations :

- Une **coloration HES** qui permet de mettre en évidence les noyaux et le cytoplasme des cellules ainsi que le tissu conjonctif. Les noyaux sont colorés en bleu-noir, le cytoplasme en rose et le tissu conjonctif en jaune orangé. La figure 76 représente la coupe d'un pellet coloré HES, on peut clairement distinguer les cellules et leur noyau (bleu noir) (a) ainsi que leur cytoplasme (rose) (b). On observe peu de coloration jaune orangé, on a donc peu de tissu conjonctif visible sur les coupes. Cette première coloration permet de mettre en évidence la forte densité cellulaire des pellets qui sont visiblement très compacts.

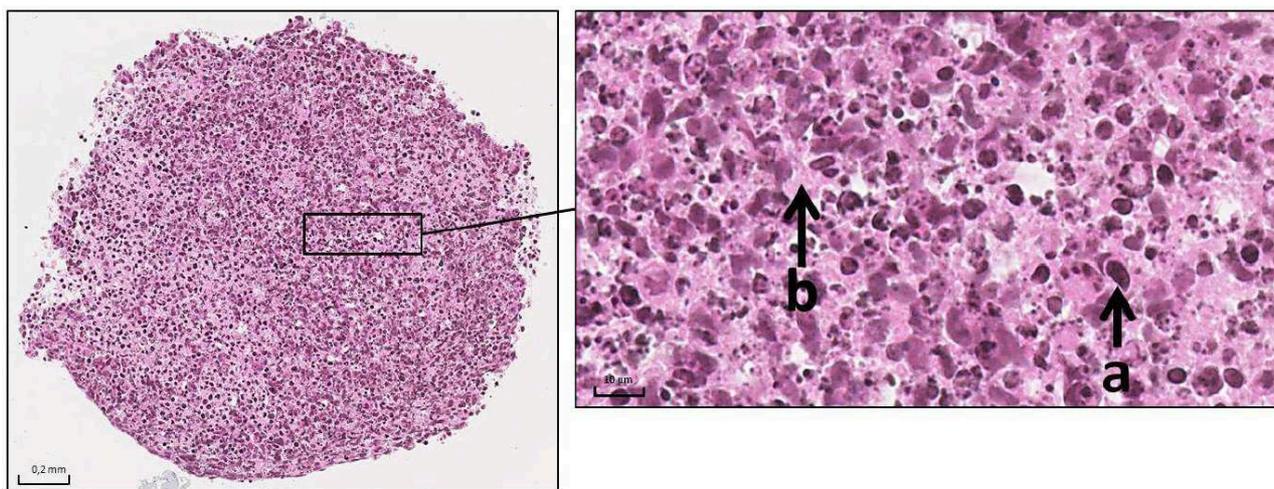


Figure 76 : Coupe d'un pellet de T/C-28a2 après coloration HES (15 jours de culture)

- Une **coloration Bleu Alcian** qui permet de mettre en évidence les GAG. Les chaînes de GAG peuvent être liées par covalence à une protéine pour former des protéoglycanes qui sont des composants essentiels de la MEC. Cette coloration permet donc de déterminer la capacité des cellules T/C-28a2 à produire de la MEC. Les noyaux sont colorés en rouge, les GAG en bleu. D'après la figure 77 on remarque de nombreux noyaux cellulaires en rose foncé (a). Cependant, on observe peu de coloration bleue indiquant une faible quantité de MEC présente (b).

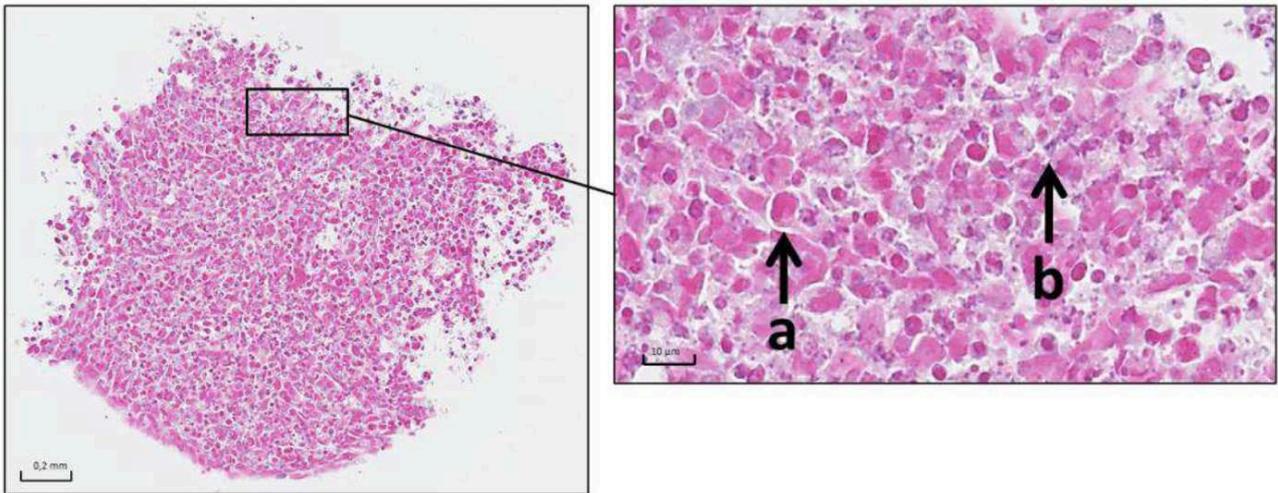


Figure 77 : Coupe d'un pellet de T/C-28a2 après coloration HES (15 jours de culture)

- Une **coloration Trichome de Masson** qui permet de mettre en évidence le tissu conjonctif tel que le collagène, notamment le collagène de type II caractéristique du tissu cartilagineux. Cette coloration permet de colorer les noyaux en bleu-noir voire brun (a), le collagène et le mucus en vert clair (b) et le cytoplasme en rose-rouge (c). D'après la figure 78, on observe de très nombreux noyaux au sein de la coupe et peu de collagène.

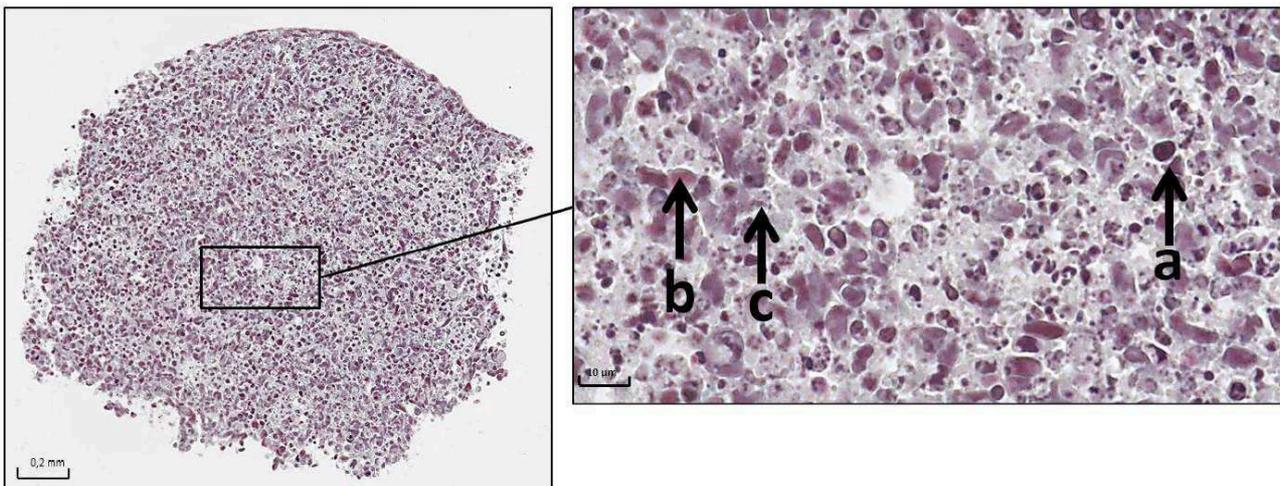


Figure 78 : Coupe d'un pellet de T/C-28a2 après coloration HES (15 jours de culture)

En conclusion, la caractérisation des pellets par ces trois colorations nous a permis de visualiser la forte cellularité de ce modèle composé de cellules T/C-28a2 et aussi une faible MEC (peu de tissu conjonctif, de protéoglycanes et de collagène). Cependant, même si la MEC est présente en faible quantité, elle permet le maintien de la structure en 3D ainsi que sa manipulation, rendant ce modèle approprié pour des études préliminaires en radiobiologie.

I. 3. Étude des dommages à l'ADN des cellules bystander en 3D

L'étude des dommages à l'ADN présentée dans le paragraphe : « I. 5. Étude des dommages à l'ADN des cellules bystander » sur des cultures en 2D de cellules T/C-28a2 a été adaptée pour l'étude des dommages à l'ADN sur les pellets.

Ainsi les cellules SW 1353 ont été cultivées en 2D et irradiées à 0/0,1/2 Gy puis 24h post-irradiation, le milieu bystander a été transféré sur des pellets de cellules T/C-28a2 cultivés pendant 15 jours au préalable à 37°C et en physioxie à 2% d'O₂. Le protocole détaillé concernant ces expériences est présenté dans le paragraphe : « V. 3. Protocole d'étude des dommages à l'ADN dans les pellets (comptage des MN) ».

La figure 79 présente une coupe de pellet colorée au DAPI et visualisée par un microscope à fluorescence. On remarque de la même façon que pour les coupes réalisées précédemment pour la caractérisation des pellets, la forte cellularité au sein de ces modèles. En effet, on peut voir que de nombreuses couches de cellules se superposent rendant un comptage des MN robuste assez délicat.

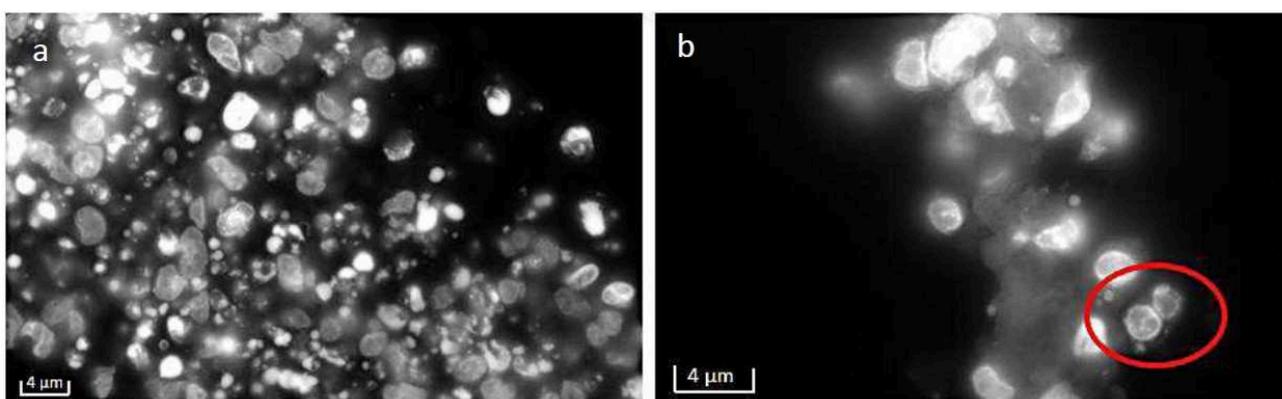


Figure 79 : Photographies d'un pellet de T/C-28a2 après marquage au DAPI et observation au microscope Axio Imager Z2, Zeiss, grossissement x400 (a) et x600 (b)

Pour pallier à ce problème de densité cellulaire, nous avons décidé de définir les zones de comptage sur la périphérie des coupes au niveau de l'extérieur du pellet (*Figure 79 b*).

Les résultats des comptages des MN sont présentés sur la figure 80. Ces derniers sont proches de ceux obtenus lors de l'étude de l'induction de MN post-transfert de milieu sur les cellules T/C-28a2 en 2D. En effet, le nombre de MN à 0,1 Gy bystander est semblable à celui observé pour la dose de 2 Gy bystander. Une différence significative est observée entre les échantillons contrôles (0 Gy) et ceux ayant reçu le milieu bystander. Ces résultats préliminaires semblent donc montrer un effet bystander sur des pellets de T/C-28a2 suite à un transfert de milieu de cellules SW 1353 irradiées en 2D.

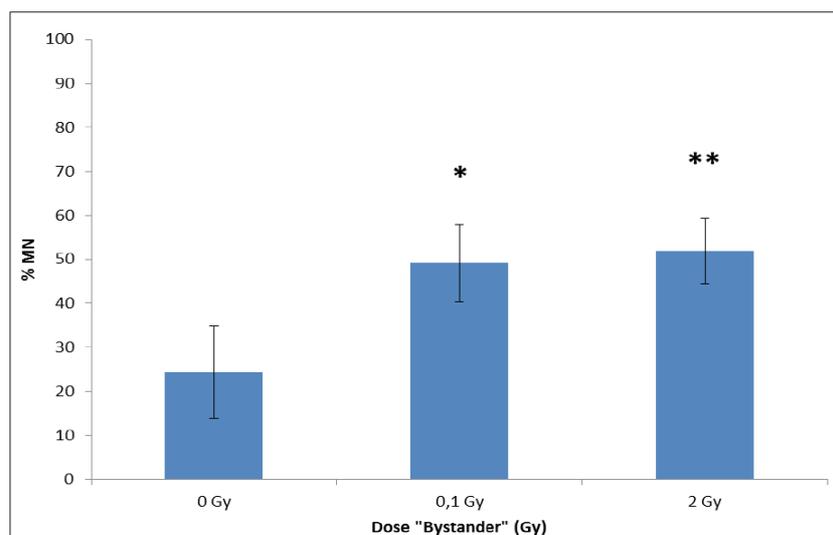


Figure 80 : Induction de MN dans les pellets de T/C-28a2 post transfert de milieu bystander

II. Discussion concernant l'analyse de la réponse bystander en 3D

La question posée en début de chapitre était la suivante : « Quel est l'intérêt d'utiliser un modèle de culture cellulaire tridimensionnel pour étudier l'effet bystander ? »

Afin de répondre à cette interrogation et pouvoir discuter de l'intérêt d'utiliser un modèle de culture en 3D dans notre étude, nous avons dans un premier temps mis au point un modèle cellulaire tridimensionnel.

Il existe de nombreux modèles de culture cellulaire en 3D permettant de recréer *in vitro* un micro-environnement cellulaire très proche du tissu cartilagineux. Parmi ces modèles on retrouve entre autres les éponges de collagène, les hydrogels ou encore les pellets que nous avons déjà évoqué dans la partie : « III. 6. Intérêt d'un modèle 3D pour l'étude de l'effet bystander » de cette thèse. Dans la majorité de ces modèles, ce sont des CSM qui sont utilisées et qui par ajout de différents facteurs chondrogéniques tels que la Bmp-2 ou encore l'IGF-I ainsi que des conditions de culture spécifiques comme une faible tension en oxygène (2%) vont se différencier en chondrocytes et ainsi produire de la MEC dont la composition est relativement proche de celle retrouvée dans du cartilage hyalin (129). Cependant l'utilisation de cellules primaires présentent un coût non négligeable et au vu des expériences de protéomiques envisagées sur nos modèles 3D (nécessitant plusieurs dizaines de millions de cellules), nous n'avons pas pu utiliser ce type de cellules. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser une lignée cellulaire. Les cellules T/C-28a2 sont décrites dans la littérature comme phénotypiquement proches de chondrocytes humains. Cette lignée cellulaire a été établie au sein du laboratoire du Dr. Goldring, ces cellules ont montré une morphologie proche de celle de chondrocytes ainsi qu'une expression significative de SOX9 qui est reconnue comme étant un marqueur de la différenciation chondrocytaire. Toutefois l'immortalisation par la transfection d'un vecteur rétroviral exprimant le virus simien SV40 codant pour l'antigène T de ces chondrocytes, provenant du cartilage costal d'une femme de 15 ans, a entraîné des modifications de ces cellules, et notamment au niveau de leur capacité à sécréter de la MEC. En effet, les auteurs ont montré l'incapacité de ces cellules à produire les éléments de la MEC (collagène, agrécane...) en proportion comparable à ceux produits par des chondrocytes primaires (138). Nos expériences ont d'ailleurs confirmé l'incapacité de ces cellules à produire de la MEC en grande quantité comme peuvent le faire les chondrocytes. Cependant, nous avons estimé que ces cellules étaient intéressantes pour développer notre modèle 3D au vu de leur proximité phénotypique avec les chondrocytes humains et de leur facilité d'utilisation. En effet, ces cellules nous ont permis de mettre au point un modèle

de culture cellulaire tridimensionnel reproductible et utilisable pour des expériences préliminaires nécessitant beaucoup de matériels biologiques.

Ainsi, après avoir établi notre modèle 3D et l'avoir caractérisé, nous avons, toujours dans l'optique de répondre à la problématique posée en début de chapitre, développer une technique nous permettant d'étudier l'effet bystander dans une structure tridimensionnelle. En effet, la plupart des expériences que nous avons réalisées pour mettre en évidence l'effet bystander radio-induit nécessitent des cellules individualisées. C'est pourquoi nous avons mis au point la technique d'étude des dommages à l'ADN par le comptage de MN. Nous avons d'abord établi un protocole permettant cette étude sur nos cellules bystander en 2D afin de vérifier que cette technique permettait bien de mettre en évidence un effet bystander radio-induit. Puis, après avoir validé cette technique comme outil permettant d'étudier le phénomène bystander et après quelques ajustements de protocoles nous avons pu appliquer cette technique à nos modèles 3D. Les études des dommages à l'ADN ont révélé dans les 2 types de culture, un effet bystander relativement proche. En effet, que ce soit en 2D (*Figure 68*) ou en 3D (*Figure 80*), on observe une différence significative entre les échantillons contrôles (0 Gy) et ceux ayant reçu le milieu bystander. Plus précisément, on voit une augmentation du nombre de MN après un transfert de milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées à 0,1 et 2 Gy. Nous avons ainsi montré que cette technique nous permet d'étudier l'effet bystander en 3D.

Partie 4 :

DISCUSSION

GENERALE

L'ensemble des résultats obtenus durant ces 3 années de thèse nous a permis d'établir la figure 81. Ce schéma récapitulatif se positionne dans un contexte d'étude de l'effet bystander radio-induit lors du traitement d'un CHS. Ainsi, nous avons placé les informations obtenues *via* les expériences d'irradiations des cellules SW 1353 de CHS au sein de la « zone irradiée » tandis que les informations acquises *via* les expériences menées sur les cellules T/C-28a2 de chondrocytes au sein de la « zone non-irradiée ». Puis, par analogie avec les données de la littérature nous avons proposé des mécanismes qui pourraient expliquer en partie l'effet bystander radio-induit que l'on a observé. Ainsi ce schéma illustre la capacité des cellules de CHS après une irradiation à sécréter des facteurs bystander au sein de la zone irradiée. Parmi ces facteurs bystander, nous avons pu identifier 3 cytokines candidates : l'IL-8, le TNF- α et MCP-1 qui pourraient être impliquées dans l'effet bystander. En effet, il est tout à fait envisageable que ces cytokines soient retrouvées au niveau de la zone non-irradiée et qu'elles se lient à la surface des cellules de chondrocytes qui possèdent les récepteurs à l'IL-8 (IL-8R), au TNF- α (TNFR) et à MCP-1 (CCR2). L'interaction de ces cytokines avec les cellules non-irradiées pourrait ainsi induire l'activation de voies métaboliques responsable des dommages à l'ADN et du retard de prolifération observé au sein des cellules non-irradiées. La sécrétion d'IL-8 par les cellules de CHS irradiées pourrait s'expliquer par une augmentation de la CypA induite par l'irradiation. En effet, des études ont montré l'implication de la CypA dans la régulation de l'IL-8 (170). La CypA est également augmentée au sein des cellules de chondrocytes. Ainsi, en sachant que cette protéine joue un rôle dans la régulation de l'IL-8, nous pouvons suggérer qu'elle engendre la sécrétion par les cellules bystander d'IL-8, contribuant à la propagation de l'effet bystander radio-induit aux cellules voisines. Aussi, il est possible que des gap-jonctions soient formées entre les cellules T/C-28a2 adjacentes permettant ainsi un échange direct de facteurs comme l'IL-8 ou la CypA aux cellules voisines. Concernant les différentes voies métaboliques induites par l'interaction entre les cytokines et les cellules bystander, il semblerait que la voie de signalisation NF- κ B qui interagit entre autre avec le facteur COX-2 soit une candidate intéressante. En effet, le facteur COX-2 a déjà été décrit pour son implication dans l'effet bystander radio-induit (97), notamment il semblerait que ce dernier soit impliqué dans la formation de ROS pouvant être responsable des dommages à l'ADN que nous avons observés (100). De plus, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de l'enolase- α au sein des cellules de chondrocytes. Cette protéine est retrouvée dans la littérature comme inhibitrice de COX-2 *via* notamment son interaction avec la protéine MBP-1(174). Également, la cytokine MCP-1 est décrite dans la littérature comme étant liée à l'induction de dommages à l'ADN au sein des cellules bystander (149).

Enfin nos expériences nous ont également permis de mettre en évidence un retard de prolifération et

une induction de dommages à l'ADN au sein de cellules bystander ayant reçu du milieu provenant de cellules irradiées par ions-carbone. Également les cytokines MCP-1 et TNF- α ont été identifiées comme sur-exprimées dans le milieu provenant de cellules SW 1353 irradiées par ions-carbone à 0,1 Gy. Ainsi même si l'effet bystander observé avec ce type de RI est inférieur à celui observé après une irradiation des cellules de CHS par rayons-X, il est possible que les mécanismes décrits précédemment pour expliquer l'effet bystander radio-induit soit similaires.

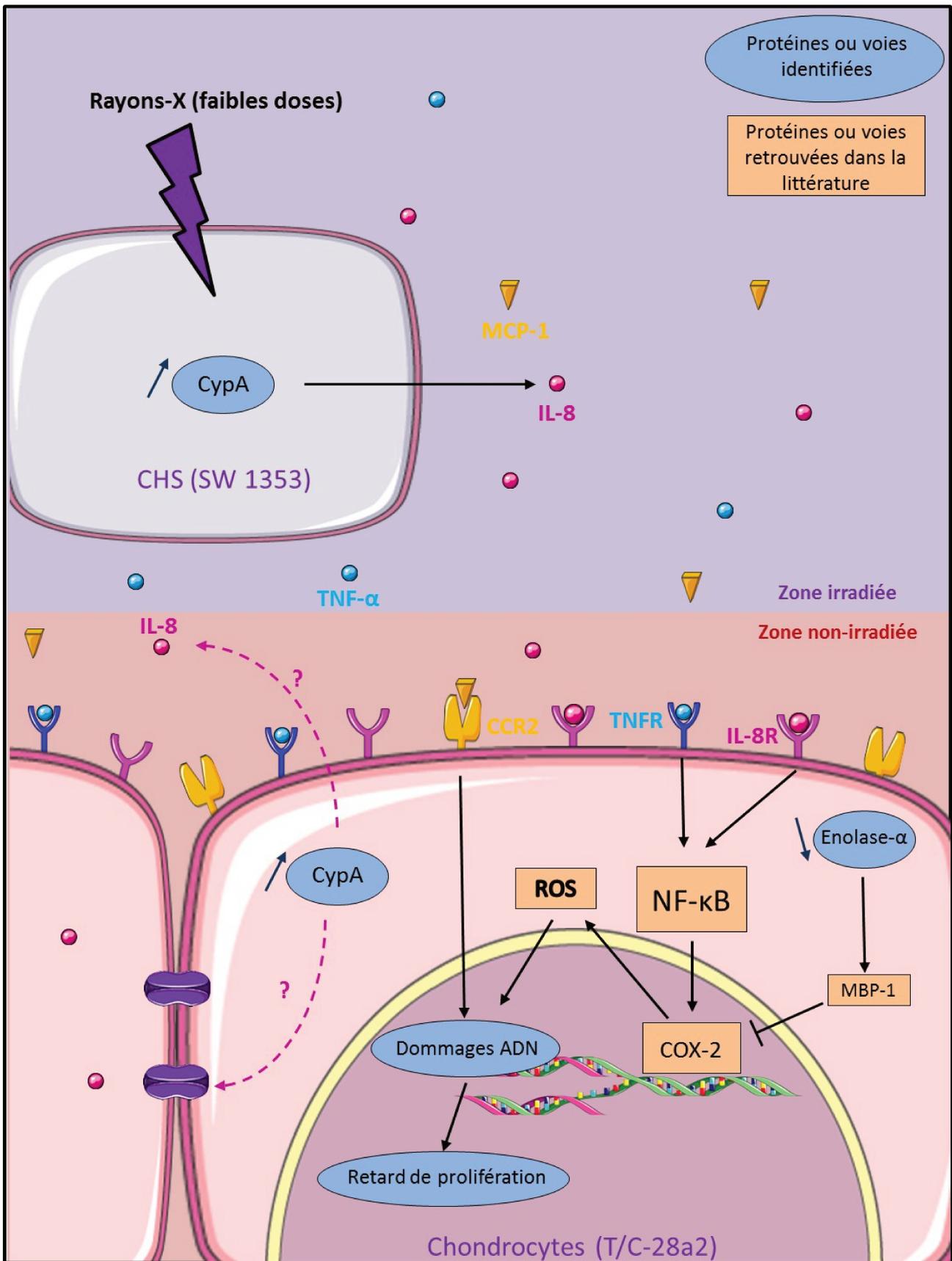


Figure 81 : Schéma bilan de l'effet bystander radio-induit au sein des cellules T/C-28a2

Partie 5 :

PERSPECTIVES

L'ensemble de nos résultats ont permis de mieux comprendre l'effet bystander radio-induit par des cellules de CHS irradiées, au sein de cellules de chondrocytes.

Toutefois plusieurs expériences sont à envisager afin de compléter cette étude et aussi afin de résoudre les problèmes rencontrés durant nos expériences.

Ainsi, concernant l'étude de l'effet bystander radio-induit par des rayons-X, il sera nécessaire de reprendre les expériences de viabilité, d'étude de la prolifération (« cell trace ») et d'analyse du cycle cellulaire afin d'homogénéiser les protocoles utilisés. En effet lors des tests de clonogénicité, le transfert de milieu se faisait sur des cellules à confluence et le temps de contact entre le milieu bystander et les cellules non-irradiées était de 24h, tandis que pour les expériences de viabilité, d'étude de la prolifération (« cell trace ») et d'analyse du cycle cellulaire, les cellules étaient ensemencées à faible densité pour pouvoir rester en flasque jusqu'à 5 jours, et le temps de contact entre le milieu bystander et les cellules non-irradiées pouvait aller jusque 5 jours. Ainsi il serait intéressant de répéter ces expériences en ajustant à 24h le temps de contact entre le milieu bystander et les cellules non-irradiées et de réaliser le transfert de milieu sur des cellules à confluence afin que les paramètres utilisés pour les différentes expériences soient d'avantage comparables d'une expérience à une autre.

Également, afin d'estimer l'importance de la diminution de l'index cellulaire observée dans les expériences d'impédancemétrie, à la dose 0,1 Gy bystander après 24 et 48h de transfert de milieu, il serait intéressant de réaliser des expériences portant sur les effets directs d'une irradiation par rayons-X des T/C-28a2. En effet, nous savons par comparaison entre les taux de survie des T/C-28a2 après irradiation et après transfert de milieu que 36 % de survie après un transfert de milieu 0,1 Gy bystander correspond à une irradiation des mêmes cellules à 3,5 Gy mais qu'en est-t-il pour l'index cellulaire ? En effet, il est logique de se demander si la diminution observée est également équivalente à celle obtenue après une irradiation à 3,5 Gy comme c'est le cas pour les tests de clonogénicité. De plus, en sachant que l'index cellulaire est le reflet de plusieurs paramètres, tels que le nombre de cellules, leur taille, leur morphologie et leur capacité à adhérer aux supports après avoir reçu un traitement, ainsi il serait pertinent de savoir quels paramètres sont modifiés plus spécifiquement lors des expériences de transfert de milieu pour pouvoir en apprendre davantage sur les mécanismes impliqués dans ce phénomène. C'est pourquoi, des expériences permettant d'acquérir des images en temps réel des cellules bystander pourraient nous renseigner sur les caractéristiques morphologiques de nos cellules et mieux comprendre les paramètres qui varient dans les cellules bystander et qui sont responsables de la variation de mesure d'impédancemétrie que nous avons pu observer.

Également, il serait intéressant de compléter les données portant sur l'étude de la survie des cellules

SW 1353 bystander. En effet, les tests de clonogénicité ont pu mettre en évidence une diminution de la survie des cellules SW 1353 bystander d'environ 20 %, après un transfert de milieu provenant du même type cellulaire irradié à 0,5/1/2/4/8 Gy. Cette information est particulièrement intéressante car elle montre la capacité des cellules de CHS à émettre et à recevoir ses propres signaux bystander. Cette propriété des cellules de CHS, si elle est validée, pourrait ainsi être utilisée pour potentialiser l'effet de la radiothérapie sur la tumeur. Ainsi, les cellules irradiées pourraient émettre des signaux qui seraient interprétés par les autres cellules tumorales voisines et induire un effet bystander au sein de la tumeur conduisant à une propagation de dommages radio-induits dans la masse tumorale et ce même en utilisant des faibles doses d'irradiation.

Concernant les expériences de protéo-génomique, les 13 protéines candidates identifiées devront être étudiées une à une afin de mieux comprendre leur rôle dans l'effet bystander radio-induit. Il en est de même pour les 66 protéines identifiées dans le sécrétome des cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy par rayons-X. Enfin, à la suite de ces analyses, nous pourrions envisager pour les protéines les plus impliquées dans l'effet bystander, des expériences de sur-expression ou au contraire d'inhibition nous permettant de valider leur rôle dans le phénomène bystander observé.

Enfin une étude visant à étudier la cinétique d'apparition de l'effet bystander a été réalisée sur des échantillons de cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy en mélange avec des cellules T/C-28a2 non irradiées. Pour ces expériences les mélanges cellulaires ont été récoltés à 6/24/48/72 h après avoir été mélangés puis analysés par protéo-génomique. Les données de cette étude sont actuellement en cours d'analyse.

Également, il sera judicieux de réaliser d'avantage d'expériences étudiant l'effet bystander radio-induit par les ions-carbone.

En effet, au vu de la difficulté d'accession aux faisceaux d'ions-carbones, certaines expériences n'ont pu être réalisées qu'avec des rayons-X. C'est le cas notamment des expériences de caractérisation de la nature des facteurs bystander, qui ont montré la thermo-sensibilité et le caractère concentration-dépendant des facteurs bystander émis par des cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy par rayons-X. Il sera donc nécessaire de réaliser ces expériences après une irradiation des cellules SW 1353 par ions-carbone.

Également les expériences qui ont permis d'analyser le sécrétome des cellules SW 1353 irradiées à 0,1 Gy par rayons-X, devront être réalisées sur du milieu provenant de cellules irradiées par des ions-carbone.

De plus, les expériences d'étude des voies de signalisation impliquées dans l'effet bystander réalisé par électrophorèse bidimensionnelle sur les cellules T/C-28a2 ayant reçu du milieu bystander

provenant de SW 1353 irradiées à 0,1 Gy par rayons-X, devront être faites avec des ions-carbone. Concernant l'étude par protéo-génomique des échantillons de cellules T/C-28a2 en mélange avec des cellules SW 1353 irradiées par ions-carbone, les données ont été recueillies et sont actuellement en cours d'analyse.

Enfin, concernant l'étude de l'effet bystander en 3D, nos expériences ont permis de développer un modèle de culture tridimensionnelle et de débiter l'analyse de l'effet bystander radio-induit.

Cependant, notre modèle est perfectible et il devra être modifié afin de se rapprocher d'avantage de la physiologie du tissu cartilagineux. Ainsi, nous pourrions envisager d'utiliser des cellules primaires comme des CSM ou des chondrocytes afin de vérifier que l'effet observé en 2D et dans nos pellets est bien retrouvé dans des cellules se rapprochant d'avantage de la réalité biologique dans lequel s'inscrit notre projet de recherche, à savoir l'irradiation du cartilage. Également, lorsque nous aurons identifié précisément les facteurs impliqués dans l'effet bystander, nous pourrions envisager de marquer spécifiquement ces protéines *via* des anticorps par exemple, sur des coupes de modèle 3D, et ainsi étudier la diffusion des facteurs au sein d'une structure tridimensionnelle.

Partie 6 :

CONCLUSIONS

L'ensemble de ces résultats nous ont permis d'apporter des éléments nouveaux dans la compréhension de l'effet bystander radio-induit.

En effet, la capacité des cellules de CHS à émettre des signaux bystander avait déjà été démontrée dans la littérature, toutefois notre étude a permis de resituer cette propriété dans un contexte d'irradiation du cartilage. En effet, nos expériences ont permis de montrer la capacité des cellules de chondrocytes à recevoir des facteurs bystander émis par les cellules de CHS irradiées. Également nous avons pu identifier des protéines candidates pouvant expliquer en partie l'effet bystander que l'on observe, à savoir un retard de prolifération des cellules de chondrocytes. Nos expériences ont aussi permis d'émettre des hypothèses sur les voies de signalisation qui pouvaient être induites par les facteurs bystander sécrétés au sein des cellules bystander.

Toutefois, d'avantage d'expériences seront nécessaires afin de mieux caractériser le phénomène bystander observé dans notre modèle cellulaire, notamment concernant l'étude de la réponse bystander des cellules de chondrocytes dans une conformation tridimensionnelle. En effet, il est essentiel d'étudier l'effet bystander dans un modèle 3D se rapprochant d'avantage de la conformation des cellules au sein d'un organisme, afin notamment d'appréhender la capacité de diffusion des facteurs bystander. Ainsi, ces données permettront d'adapter les protocoles de traitement des patients par radiothérapie et hadronthérapie afin de limiter l'imprécision biologique de ces traitements, induite par l'effet bystander au niveau des tissus sains.

Partie 7 :

BIBLIOGRAPHIE

1. Aigner T, Stöve J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 28 nov 2003;55(12):1569-93.
2. Dvp app squelettique [Internet]. [cité 13 juin 2018]. Disponible sur: <http://alain.lhermite.pagesperso-orange.fr/Dvpappsquelettique.htm>
3. Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H, et al. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* août 2014;1840(8):2414-40.
4. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage.* août 2005;13(8):643-54.
5. Brighton CT, Heppenstall RB. Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. An in vitro and in vivo study in rats and rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* juin 1971;53(4):719-28.
6. Saintigny Y, Cruet-Hennequart S, Hamdi DH, Chevalier F, Lefaix J-L. Impact of therapeutic irradiation on healthy articular cartilage. *Radiat Res.* févr 2015;183(2):135-46.
7. Bijlsma JWW, Berenbaum F, Lafeber FPJG. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet Lond Engl.* 18 juin 2011;377(9783):2115-26.
8. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J-P, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* avr 2008;22(2):351-84.
9. Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* mars 2004;36(3):372-8.
10. Casali PG, Blay J-Y, On behalf of the ESMO/CONTICANET/EUROBONET Consensus Panel of experts. Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 1 mai 2010;21(Supplement 5):v198-203.
11. Gerrand C, Athanasou N, Brennan B, Grimer R, Judson I, Morland B, et al. UK guidelines for the management of bone sarcomas. *Clin Sarcoma Res.* 2016;6:7.
12. Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiou AHM, et al. The clinical approach towards chondrosarcoma. *The Oncologist.* mars 2008;13(3):320-9.
13. Angelini A, Guerra G, Mavrogenis AF, Pala E, Picci P, Ruggieri P. Clinical outcome of central conventional chondrosarcoma. *J Surg Oncol.* déc 2012;106(8):929-37.
14. Ollivier L, Vanel D, Leclère J. Imaging of chondrosarcomas. *Cancer Imaging Off Publ Int Cancer Imaging Soc.* 22 oct 2003;4(1):36-8.
15. Bovée JVMG, Hogendoorn PCW, Wunder JS, Alman BA. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.* juill 2010;10(7):481-8.
16. David E, Blanchard F, Heymann MF, De Pinieux G, Gouin F, Rédini F, et al. The Bone Niche of Chondrosarcoma: A Sanctuary for Drug Resistance, Tumour Growth and also a Source of New

Therapeutic Targets. Sarcoma. 2011;2011:1-8.

17. Le QT, Fu KK, Kroll S, Fitts L, Massullo V, Ferrell L, et al. Prognostic factors in adult soft-tissue sarcomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 15 mars 1997;37(5):975-84.
18. Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Hof H, Didinger B, Combs SE, Jäkel O, et al. Carbon ion radiotherapy of skull base chondrosarcomas. *Int J Radiat Oncol*. janv 2007;67(1):171-7.
19. Dunn PM. Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923), the discovery of x rays and perinatal diagnosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. mars 2001;84(2):F138-139.
20. CEA_Livret_HommesEtRayonnements.pdf [Internet]. [cité 26 mai 2018]. Disponible sur: http://www.cea.fr/multimedia/Documents/publications/livrets-thematiques/CEA_Livret_HommesEtRayonnements.pdf
21. 1-generalites-sur-les-rayonnements-11s2-janvier-2012.pdf [Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <http://etumed.e-monsite.com/medias/files/1-generalites-sur-les-rayonnements-11s2-janvier-2012.pdf>
22. document.pdf [Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00006928/document>
23. CEA. Les effets des rayonnements ionisants sur le vivant [Internet]. CEA/Découvrir & Comprendre. 2015 [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.cea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-effets-des-rayonnements-ionisants-sur-vivant.aspx>
24. Azzam EI, Jay-Gerin J-P, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*. 31 déc 2012;327(0):48-60.
25. Sznarkowska A, KostECKA A, Meller K, Bielawski KP. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget*. 30 nov 2016;8(9):15996-6016.
26. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*. avr 1990;15(4):129-35.
27. Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med*. 15 juin 2000;28(12):1745-50.
28. Pietraforte D, Paulicelli E, Patrono C, Gambardella L, Scorza G, Testa A, et al. Protein oxidative damage and redox imbalance induced by ionising radiation in CHO cells. *Free Radic Res*. avr 2018;52(4):465-79.
29. Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol*. janv 1994;65(1):7-17.
30. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*. 8 mars 1999;424(1-2):9-21.
31. Silerme S, Bobyk L, Taverna-Porro M, Cuier C, Saint-Pierre C, Ravanat J-L. DNA-polyamine cross-links generated upon one electron oxidation of DNA. *Chem Res Toxicol*. 16 juin 2014;27(6):1011-8.

32. Chap04_art2.pdf [Internet]. [cité 11 juin 2018]. Disponible sur: http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/aktis-lettre-dossiers-thematiques/RST/RST-2002/Documents/Chap04_art2.pdf
33. Rosário PW, Batista KCS, Calsolari MR. Radioiodine-induced oxidative stress in patients with differentiated thyroid carcinoma and effect of supplementation with vitamins C and E and selenium (antioxidants). *Arch Endocrinol Metab.* août 2016;60(4):328-32.
34. Ahmad IM, Temme JB, Abdalla MY, Zimmerman MC. Redox Status in Workers Occupationally Exposed to Long Term Low Levels of Ionizing Radiation - A pilot study. *Redox Rep Commun Free Radic Res.* mai 2016;21(3):139-45.
35. Tabocchini MA, Belli M, Campa A, Löbrich M, Saporà O, Simone G, et al. Induction and repair of DNA damage in human cells at different stages of differentiation. *Radiat Prot Dosimetry.* 2002;99(1-4):123-8.
36. Campa A, Ballarini F, Belli M, Cherubini R, Dini V, Esposito G, et al. DNA DSB induced in human cells by charged particles and gamma rays: experimental results and theoretical approaches. *Int J Radiat Biol.* nov 2005;81(11):841-54.
37. Bryant PE. Enzymatic restriction of mammalian cell DNA: evidence for double-strand breaks as potentially lethal lesions. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* juill 1985;48(1):55-60.
38. Belli M, Saporà O, Tabocchini MA. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res (Tokyo).* déc 2002;43 Suppl:S13-19.
39. Syed A, Tainer JA. The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu Rev Biochem.* 25 avr 2018;
40. Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol CB.* 1 août 1997;7(8):588-98.
41. Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol.* déc 2001;13(6):738-47.
42. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 1 sept 2001;15(17):2177-96.
43. Leung-Pineda V, Ryan CE, Piwnicka-Worms H. Phosphorylation of Chk1 by ATR Is Antagonized by a Chk1-Regulated Protein Phosphatase 2A Circuit. *Mol Cell Biol.* 15 oct 2006;26(20):7529-38.
44. Ahn JY, Schwarz JK, Piwnicka-Worms H, Canman CE. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* 1 nov 2000;60(21):5934-6.
45. Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science.* 5 sept 1997;277(5331):1501-5.

46. Müller K, Meineke V. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Exp Hematol.* avr 2007;35(4 Suppl 1):96-104.
47. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 30 août 1995;33(1):99-109.
48. Mezzaroma E, Mikkelsen RB, Toldo S, Mauro AG, Sharma K, Marchetti C, et al. Role of Interleukin-1 in Radiation-Induced Cardiomyopathy. *Mol Med Camb Mass.* 26 mars 2015;21:210-8.
49. Hong E-H, Song J-Y, Lee S-J, Park I-C, Um H-D, Park JK, et al. Low-dose γ -radiation inhibits IL-1 β -induced dedifferentiation and inflammation of articular chondrocytes via blockage of catenin signaling. *IUBMB Life.* févr 2014;66(2):128-37.
50. Chen Y, Zhang F, Tsai Y, Yang X, Yang L, Duan S, et al. IL-6 signaling promotes DNA repair and prevents apoptosis in CD133+ stem-like cells of lung cancer after radiation. *Radiat Oncol Lond Engl [Internet].* 14 nov 2015 [cité 12 juin 2018];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4647293/>
51. Zang C, Liu X, Li B, He Y, Jing S, He Y, et al. IL-6/STAT3/TWIST inhibition reverses ionizing radiation-induced EMT and radioresistance in esophageal squamous carcinoma. *Oncotarget.* 4 janv 2017;8(7):11228-38.
52. Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL, Danielpour D, Schiemann WP. TGF- β upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest.* janv 2013;123(1):150-63.
53. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. MicroRNA Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Chondrosarcoma Cells. *Clin Orthop.* mars 2015;473(3):907-13.
54. Moore HD, Ivey RG, Voytovich UJ, Lin C, Stirewalt DL, Pogossova-Agadjanyan EL, et al. The Human Salivary Proteome is Radiation Responsive. *Radiat Res.* mai 2014;181(5):521-30.
55. Hallahan DE, Beckett MA, Kufe D, Weichselbaum RR. The interaction between recombinant human tumor necrosis factor and radiation in 13 human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* juill 1990;19(1):69-74.
56. Hellweg CE, Spitta LF, Henschenmacher B, Diegeler S, Baumstark-Khan C. Transcription Factors in the Cellular Response to Charged Particle Exposure. *Front Oncol.* 2016;6:61.
57. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 2 juill 1992;358(6381):15-6.
58. Takahashi A, Matsumoto H, Yuki K, Yasumoto J-I, Kajiwara A, Aoki M, et al. High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 oct 2004;60(2):591-7.
59. Hellweg CE. The Nuclear Factor κ B pathway: A link to the immune system in the radiation response. *Cancer Lett.* 28 nov 2015;368(2):275-89.
60. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest.* févr 2001;107(3):241-6.

61. Jayakumar S, Kunwar A, Sandur SK, Pandey BN, Chaubey RC. Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity. *Biochim Biophys Acta*. janv 2014;1840(1):485-94.
62. Cataldi A, di Giacomo V, Rapino M, Genovesi D, Rana RA. Cyclic nucleotide Response Element Binding protein (CREB) activation promotes survival signal in human K562 erythroleukemia cells exposed to ionising radiation/etoposide combined treatment. *J Radiat Res (Tokyo)*. juin 2006;47(2):113-20.
63. Jochum W, Passequé E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*. 30 avr 2001;20(19):2401-12.
64. Beishline K, Kelly CM, Olofsson BA, Koduri S, Emrich J, Greenberg RA, et al. Sp1 facilitates DNA double-strand break repair through a nontranscriptional mechanism. *Mol Cell Biol*. sept 2012;32(18):3790-9.
65. Ahmed MM, Sells SF, Venkatasubbarao K, Fruitwala SM, Muthukkumar S, Harp C, et al. Ionizing radiation-inducible apoptosis in the absence of p53 linked to transcription factor EGR-1. *J Biol Chem*. 26 déc 1997;272(52):33056-61.
66. Tubiana M, Pierquin B. [Radiotherapy. Biological and technical basis]. *Rev Prat*. 1 nov 1972;22(28):3793-801.
67. Wilson RR. Radiological use of fast protons. *Radiology*. nov 1946;47(5):487-91.
68. Castro JR, Linstadt DE, Bahary JP, Petti PL, Daftari I, Collier JM, et al. Experience in charged particle irradiation of tumors of the skull base: 1977-1992. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 juill 1994;29(4):647-55.
69. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9.
70. Schulz-Ertner D, Jäkel O, Schlegel W. Radiation therapy with charged particles. *Semin Radiat Oncol*. oct 2006;16(4):249-59.
71. hadrontherapie_annexe__vf_pdf.pdf [Internet]. [cité 18 juin 2018]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-03/hadrontherapie_annexe__vf_pdf.pdf
72. Suit H. Proton: the particle. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 nov 2013;87(3):555-61.
73. Pommier P, Sunyach M-P, Hu Y, Amsalem E, Claude L, Moncort-Boulch D, et al. [Radiotherapy for sarcoma: hadrontherapy, for whom and what for?]. *Bull Cancer (Paris)*. juin 2010;97(6):657-72.
74. Miralbell R, Lomax A, Cella L, Schneider U. Potential reduction of the incidence of radiation-induced second cancers by using proton beams in the treatment of pediatric tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 nov 2002;54(3):824-9.
75. Hug EB, Fitzek MM, Liebsch NJ, Munzenrider JE. Locally challenging osteo- and chondrogenic tumors of the axial skeleton: results of combined proton and photon radiation therapy using three-dimensional treatment planning. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 févr

1995;31(3):467-76.

76. Mohamad O, Yamada S, Durante M. Clinical Indications for Carbon Ion Radiotherapy. *Clin Oncol R Coll Radiol G B.* mai 2018;30(5):317-29.
77. Uzawa A, Ando K, Koike S, Furusawa Y, Matsumoto Y, Takai N, et al. Comparison of biological effectiveness of carbon-ion beams in Japan and Germany. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 avr 2009;73(5):1545-51.
78. Glowa C, Peschke P, Brons S, Neels OC, Kopka K, Debus J, et al. Carbon ion radiotherapy: impact of tumor differentiation on local control in experimental prostate carcinomas. *Radiat Oncol Lond Engl [Internet].* 9 nov 2017 [cité 18 juin 2018];12. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5679331/>
79. Tinganelli W, Ma N-Y, Von Neubeck C, Maier A, Schicker C, Kraft-Weyrather W, et al. Influence of acute hypoxia and radiation quality on cell survival. *J Radiat Res (Tokyo).* juill 2013;54(Suppl 1):i23-30.
80. *hadrontherapie_rapport_preliminaire_vf_pdf.pdf [Internet].* [cité 18 juin 2018]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-03/hadrontherapie_rapport_preliminaire_vf_pdf.pdf
81. Imai R, Kamada T, Araki N, WORKING GROUP FOR BONE and SOFT-TISSUE SARCOMAS. Clinical Efficacy of Carbon Ion Radiotherapy for Unresectable Chondrosarcomas. *Anticancer Res.* 2017;37(12):6959-64.
82. van Maldegem AM, Gelderblom H, Palmerini E, Dijkstra SD, Gambarotti M, Ruggieri P, et al. Outcome of advanced, unresectable conventional central chondrosarcoma. *Cancer.* 15 oct 2014;120(20):3159-64.
83. Murphy JB, Liu JH, Sturm E. STUDIES ON X-RAY EFFECTS : IX. THE ACTION OF SERUM FROM X-RAYED ANIMALS ON LYMPHOID CELLS IN VITRO. *J Exp Med.* 28 févr 1922;35(3):373-84.
84. Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* 15 nov 1992;52(22):6394-6.
85. Deshpande A, Goodwin EH, Bailey SM, Marrone BL, Lehnert BE. Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target. *Radiat Res.* mars 1996;145(3):260-7.
86. Prise KM, Belyakov OV, Folkard M, Michael BD. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int J Radiat Biol.* déc 1998;74(6):793-8.
87. Azzam EI, De Toledo SM, Spitz DR, Little JB. Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Res.* 1 oct 2002;62(19):5436-42.
88. Blyth BJ, Sykes PJ. Radiation-induced bystander effects: what are they, and how relevant are they to human radiation exposures? *Radiat Res.* août 2011;176(2):139-57.
89. Chevalier F, Hamdi DH, Saintigny Y, Lefaix J-L. Proteomic overview and perspectives of the

- radiation-induced bystander effects. *Mutat Res Rev Mutat Res.* mars 2015;763:280-93.
90. Autsavapromporn N, Suzuki M, Funayama T, Usami N, Plante I, Yokota Y, et al. Gap junction communication and the propagation of bystander effects induced by microbeam irradiation in human fibroblast cultures: the impact of radiation quality. *Radiat Res.* oct 2013;180(4):367-75.
 91. Albanese J, Dainiak N. Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation. *Exp Hematol.* juin 2003;31(6):455-64.
 92. Matsumoto H, Hayashi S, Hatashita M, Shioura H, Ohtsubo T, Kitai R, et al. Induction of radioresistance to accelerated carbon-ion beams in recipient cells by nitric oxide excreted from irradiated donor cells of human glioblastoma. *Int J Radiat Biol.* déc 2000;76(12):1649-57.
 93. Nagasawa H, Cremesti A, Kolesnick R, Fuks Z, Little JB. Involvement of Membrane Signaling in the Bystander Effect in Irradiated Cells. :5.
 94. Ermakov AV, Kostiuk SV, Egorina NA, Malinovskaia EM, Veïko NN, Spitkovskiï DM. [The DNA fragments obtained from the culture media exposed to adaptive doses of the ionizing radiation as factors of stress signaling between lymphocytes and bystander cells]. *Radiats Biol Radioecol.* avr 2007;47(2):133-40.
 95. Hu W, Xu S, Yao B, Hong M, Wu X, Pei H, et al. MiR-663 inhibits radiation-induced bystander effects by targeting TGF β 1 in a feedback mode. *RNA Biol.* 2014;11(9):1189-98.
 96. Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res.* 1 août 2011;71(15):5296-306.
 97. Zhou H, Ivanov VN, Gillespie J, Geard CR, Amundson SA, Brenner DJ, et al. Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 oct 2005;102(41):14641-6.
 98. Jella KK, Moriarty R, McClean B, Byrne HJ, Lyng FM. Reactive oxygen species and nitric oxide signaling in bystander cells. *PLoS ONE* [Internet]. 5 avr 2018 [cité 26 juin 2018];13(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5886541/>
 99. Xu S, Wang J, Ding N, Hu W, Zhang X, Wang B, et al. Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect. *RNA Biol.* 21 oct 2015;12(12):1355-63.
 100. Prise KM, O'Sullivan JM. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* mai 2009;9(5):351-60.
 101. Pouget J-P, Georgakilas AG, Ravanat J-L. Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy: Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis. *Antioxid Redox Signal.* 22 mars 2018;
 102. Coates PJ, Rundle JK, Lorimore SA, Wright EG. Indirect macrophage responses to ionizing radiation: implications for genotype-dependent bystander signaling. *Cancer Res.* 15 janv 2008;68(2):450-6.
 103. United Nations, Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Effects of

ionizing radiation. UNSCEAR 2006: Scientific annexes C, D and E Vol. 2 Vol. 2. New York: United Nations; 2008.

104. Jalal N, Haq S, Anwar N, Nazeer S, Saeed U. Radiation induced bystander effect and DNA damage. *J Cancer Res Ther.* déc 2014;10(4):819-33.
105. Butterworth KT, McGarry CK, Trainor C, O'Sullivan JM, Hounsell AR, Prise KM. Out-of-field cell survival following exposure to intensity-modulated radiation fields. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 avr 2011;79(5):1516-22.
106. Butterworth KT, McGarry CK, Trainor C, McMahan SJ, O'Sullivan JM, Schettino G, et al. Dose, dose-rate and field size effects on cell survival following exposure to non-uniform radiation fields. *Phys Med Biol.* 21 mai 2012;57(10):3197-206.
107. Hatzi VI, Laskaratou DA, Mavragani IV, Nikitaki Z, Mangelis A, Panayiotidis MI, et al. Non-targeted radiation effects in vivo: a critical glance of the future in radiobiology. *Cancer Lett.* 1 janv 2015;356(1):34-42.
108. Chaze T, Slomianny M-C, Milliat F, Tarlet G, Lefebvre-Darroman T, Gourmelon P, et al. Alteration of the serum N-glycome of mice locally exposed to high doses of ionizing radiation. *Mol Cell Proteomics MCP.* févr 2013;12(2):283-301.
109. Mothersill C, Smith RW, Agnihotri N, Seymour CB. Characterization of a radiation-induced stress response communicated in vivo between zebrafish. *Environ Sci Technol.* 1 mai 2007;41(9):3382-7.
110. Wakatsuki M, Magpayo N, Kawamura H, Held KD. Differential bystander signaling between radioresistant chondrosarcoma cells and fibroblasts after x-ray, proton, iron ion and carbon ion exposures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 sept 2012;84(1):e103-108.
111. Frankenberg D, Greif K-D, Giesen U. Radiation response of primary human skin fibroblasts and their bystander cells after exposure to counted particles at low and high LET. *Int J Radiat Biol.* janv 2006;82(1):59-67.
112. Yang H, Anzenberg V, Held KD. The time dependence of bystander responses induced by iron-ion radiation in normal human skin fibroblasts. *Radiat Res.* sept 2007;168(3):292-8.
113. Anzenberg V, Chandiramani S, Coderre JA. LET-dependent bystander effects caused by irradiation of human prostate carcinoma cells with X rays or alpha particles. *Radiat Res.* oct 2008;170(4):467-76.
114. Fernandez-Palomo C, Seymour C, Mothersill C. Inter-Relationship between Low-Dose Hyper-Radiosensitivity and Radiation-Induced Bystander Effects in the Human T98G Glioma and the Epithelial HaCaT Cell Line. *Radiat Res.* févr 2016;185(2):124-33.
115. Nuta O, Darroudi F. The impact of the bystander effect on the low-dose hypersensitivity phenomenon. *Radiat Environ Biophys.* avr 2008;47(2):265-74.
116. Mothersill C, Seymour C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol.* avr 1997;71(4):421-7.

117. Seymour CB, Mothersill C. Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve. *Radiat Res.* mai 2000;153(5 Pt 1):508-11.
118. Lehnert BE, Goodwin EH, Deshpande A. Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res.* 1 juin 1997;57(11):2164-71.
119. de Toledo SM, Buonanno M, Harris AL, Azzam EI. Genomic instability induced in distant progeny of bystander cells depends on the connexins expressed in the irradiated cells. *Int J Radiat Biol.* 2017;93(10):1182-94.
120. Faqihi F, Neshastehriz A, Soleymanifard S, Shabani R, Eivazzadeh N. Radiation-induced bystander effect in non-irradiated glioblastoma spheroid cells. *J Radiat Res (Tokyo).* sept 2015;56(5):777-83.
121. Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T, Little JB. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res.* nov 1998;150(5):497-504.
122. Smith RW, Wang J, Bucking CP, Mothersill CE, Seymour CB. Evidence for a protective response by the gill proteome of rainbow trout exposed to X-ray induced bystander signals. *Proteomics.* nov 2007;7(22):4171-80.
123. Smith RW, Moccia RD, Seymour CB, Mothersill CE. Irradiation of rainbow trout at early life stages results in a proteomic legacy in adult gills. Part A; proteomic responses in the irradiated fish and in non-irradiated bystander fish. *Environ Res.* mai 2018;163:297-306.
124. Chaze T, Hornez L, Chambon C, Haddad I, Vinh J, Peyrat J-P, et al. Serum Proteome Analysis for Profiling Predictive Protein Markers Associated with the Severity of Skin Lesions Induced by Ionizing Radiation. *Proteomes.* 10 juill 2013;1(2):40-69.
125. Zhang Q, Matzke M, Schepmoes AA, Moore RJ, Webb-Robertson B-J, Hu Z, et al. High and Low Doses of Ionizing Radiation Induce Different Secretome Profiles in a Human Skin Model. *PLoS ONE [Internet].* 18 mars 2014 [cité 7 juill 2018];9(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3958549/>
126. Shao C, Folkard M, Michael BD, Prise KM. Bystander signaling between glioma cells and fibroblasts targeted with counted particles. *Int J Cancer.* 10 août 2005;116(1):45-51.
127. Lyng FM, Maguire P, McClean B, Seymour C, Mothersill C. The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects. *Radiat Res.* avr 2006;165(4):400-9.
128. Furlong H, Mothersill C, Lyng FM, Howe O. Apoptosis is signalled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect. *Mutat Res.* févr 2013;741-742:35-43.
129. Legendre F, Ollitrault D, Hervieu M, Baugé C, Maneix L, Goux D, et al. Enhanced hyaline cartilage matrix synthesis in collagen sponge scaffolds by using siRNA to stabilize chondrocytes phenotype cultured with bone morphogenetic protein-2 under hypoxia. *Tissue Eng Part C Methods.* juill 2013;19(7):550-67.

130. Hamdi DH, Barbieri S, Chevalier F, Groetz J-E, Legendre F, Demoor M, et al. In vitro engineering of human 3D chondrosarcoma: a preclinical model relevant for investigations of radiation quality impact. *BMC Cancer* [Internet]. 8 août 2015 [cité 9 juill 2018];15. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4529727/>
131. Merceron C, Portron S, Masson M, Lesoeur J, Fellah BH, Gauthier O, et al. The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplant*. 2011;20(10):1575-88.
132. Zhang L, Su P, Xu C, Yang J, Yu W, Huang D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett*. sept 2010;32(9):1339-46.
133. Luciani N, Du V, Gazeau F, Richert A, Letourneur D, Le Visage C, et al. Successful chondrogenesis within scaffolds, using magnetic stem cell confinement and bioreactor maturation. *Acta Biomater*. 2016;37:101-10.
134. McMahan SJ, McGarry CK, Butterworth KT, O'Sullivan JM, Hounsell AR, Prise KM. Implications of intercellular signaling for radiation therapy: a theoretical dose-planning study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 déc 2013;87(5):1148-54.
135. Leibovitz A, McCombs WM, Johnston D, McCoy CE, Stinson JC. New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex. *J Natl Cancer Inst*. août 1973;51(2):691-7.
136. Ottaviano L, Schaefer K-L, Gajewski M, Huckenbeck W, Baldus S, Rogel U, et al. Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. *Genes Chromosomes Cancer*. janv 2010;49(1):40-51.
137. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, et al. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest*. déc 1994;94(6):2307-16.
138. Finger F, Schörle C, Zien A, Gebhard P, Goldring MB, Aigner T. Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis Rheum*. déc 2003;48(12):3395-403.
139. Gil-Benso R, Lopez-Gines C, López-Guerrero JA, Carda C, Callaghan RC, Navarro S, et al. Establishment and characterization of a continuous human chondrosarcoma cell line, ch-2879: comparative histologic and genetic studies with its tumor of origin. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. juin 2003;83(6):877-87.
140. Kunisada T, Miyazaki M, Mihara K, Gao C, Kawai A, Inoue H, et al. A new human chondrosarcoma cell line (OUMS-27) that maintains chondrocytic differentiation. *Int J Cancer*. 11 sept 1998;77(6):854-9.
141. Lehmann JS, Zhao A, Sun B, Jiang W, Ji S. Multiplex Cytokine Profiling of Stimulated Mouse Splenocytes Using a Cytometric Bead-based Immunoassay Platform. *J Vis Exp JoVE*. 09 2017;(129).
142. Sekihara K, Saitoh K, Yang H, Kawashima H, Kazuno S, Kikkawa M, et al. Low-dose

- ionizing radiation exposure represses the cell cycle and protein synthesis pathways in in vitro human primary keratinocytes and U937 cell lines. *PloS One*. 2018;13(6):e0199117.
143. Trainor C, Butterworth KT, McGarry CK, Liberante F, O'Sullivan JM, Hounsell AR, et al. Cell survival responses after exposure to modulated radiation fields. *Radiat Res*. janv 2012;177(1):44-51.
 144. Durante M, Yamada S, Ando K, Furusawa Y, Kawata T, Majima H, et al. X-rays vs. carbon-ion tumor therapy: cytogenetic damage in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 juin 2000;47(3):793-8.
 145. Kiyohara H, Ishizaki Y, Suzuki Y, Katoh H, Hamada N, Ohno T, et al. Radiation-induced ICAM-1 expression via TGF- β 1 pathway on human umbilical vein endothelial cells; comparison between X-ray and carbon-ion beam irradiation. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2011;52(3):287-92.
 146. Laurent C, Leduc A, Pottier I, Prévost V, Sichel F, Lefaix J-L. Dramatic increase in oxidative stress in carbon-irradiated normal human skin fibroblasts. *PloS One*. 2013;8(12):e85158.
 147. Ryan LA, Smith RW, Seymour CB, Mothersill CE. Dilution of irradiated cell conditioned medium and the bystander effect. *Radiat Res*. févr 2008;169(2):188-96.
 148. Ermakov AV, Kostiuk SV, Egolina NA, Malinovskaia EM, Veiko NN, Spitkovskii DM. [The DNA fragments obtained from the culture media exposed to adaptive doses of the ionizing radiation as factors of stress signaling between lymphocytes and bystander cells]. *Radiats Biol Radioecol*. avr 2007;47(2):133-40.
 149. Dieriks B, De Vos WH, Derradji H, Baatout S, Van Oostveldt P. Medium-mediated DNA repair response after ionizing radiation is correlated with the increase of specific cytokines in human fibroblasts. *Mutat Res*. 1 mai 2010;687(1-2):40-8.
 150. Shareef MM, Cui N, Burikhanov R, Gupta S, Satishkumar S, Shajahan S, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and TRAIL in high-dose radiation-induced bystander signaling in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 15 déc 2007;67(24):11811-20.
 151. Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis*. 31 oct 2013;4:e888.
 152. Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R, Giallongo A. ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett*. 4 mai 2000;473(1):47-52.
 153. RPLP0 ribosomal protein lateral stalk subunit P0 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cité 6 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=6175>
 154. Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochem J*. 15 oct 1990;271(2):285-96.
 155. Rauch JN, Zuiderweg ERP, Gestwicki JE. Non-canonical Interactions between Heat Shock Cognate Protein 70 (Hsc70) and Bcl2-associated Anthanogene (BAG) Co-Chaperones Are Important for Client Release. *J Biol Chem*. 16 2016;291(38):19848-57.

156. Su X, Sykes JB, Ao L, Raeburn CD, Fullerton DA, Meng X. Extracellular heat shock cognate protein 70 induces cardiac functional tolerance to endotoxin: differential effect on TNF- α and ICAM-1 levels in heart tissue. *Cytokine*. juill 2010;51(1):60-6.
157. PSME1 proteasome activator subunit 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cité 6 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=5720>
158. Shan Y, Cortopassi G. Mitochondrial Hspa9/Mortalin regulates erythroid differentiation via iron-sulfur cluster assembly. *Mitochondrion*. janv 2016;26:94-103.
159. CAPG capping actin protein, gelsolin like [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cité 6 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=822>
160. Zhu W-Y, Hunag Y-Y, Liu X-G, He J-Y, Chen D-D, Zeng F, et al. Prognostic evaluation of CapG, gelsolin, P-gp, GSTP1, and Topo-II proteins in non-small cell lung cancer. *Anat Rec Hoboken NJ* 2007. févr 2012;295(2):208-14.
161. Zhuo J, Tan EH, Yan B, Toehhawng L, Jayapal M, Koh S, et al. Gelsolin induces colorectal tumor cell invasion via modulation of the urokinase-type plasminogen activator cascade. *PLoS One*. 2012;7(8):e43594.
162. Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 avr 1997;94(8):3633-8.
163. Gu ZC, Enenkel C. Proteasome assembly. *Cell Mol Life Sci CMLS*. déc 2014;71(24):4729-45.
164. CCT3 chaperonin containing TCP1 subunit 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cité 6 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=7203>
165. Shi X, Cheng S, Wang W. Suppression of CCT3 inhibits malignant proliferation of human papillary thyroid carcinoma cell. *Oncol Lett*. juin 2018;15(6):9202-8.
166. Neal CL, Yu D. 14-3-3 ζ as a prognostic marker and therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets*. déc 2010;14(12):1343-54.
167. Masutani M, Sonenberg N, Yokoyama S, Imataka H. Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J*. 25 juill 2007;26(14):3373-83.
168. Sun S, Guo M, Zhang JB, Ha A, Yokoyama KK, Chiu RH. Cyclophilin A (CypA) interacts with NF- κ B subunit, p65/RelA, and contributes to NF- κ B activation signaling. *PLoS One*. 2014;9(8):e96211.
169. Wei Y, Jinchuan Y, Yi L, Jun W, Zhongqun W, Cuiping W. Antiapoptotic and proapoptotic signaling of cyclophilin A in endothelial cells. *Inflammation*. juin 2013;36(3):567-72.
170. Sun S, Wang Q, Giang A, Cheng C, Soo C, Wang C-Y, et al. Knockdown of CypA inhibits interleukin-8 (IL-8) and IL-8-mediated proliferation and tumor growth of glioblastoma cells

through down-regulated NF- κ B. *J Neurooncol.* janv 2011;101(1):1-14.

171. Zhang L, Luo Y, Lu Z, He J, Wang L, Zhang L, et al. Astragalus Polysaccharide Inhibits Ionizing Radiation-Induced Bystander Effects by Regulating MAPK/NF- κ B Signaling Pathway in Bone Mesenchymal Stem Cells (BMSCs). *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 6 juill 2018;24:4649-58.
172. Nelson G, Kucheryavenko O, Wordsworth J, von Zglinicki T. The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. *Mech Ageing Dev.* 2018;170:30-6.
173. Gerashchenko BI, Yamagata A, Oofusa K, Yoshizato K, de Toledo SM, Howell RW. Proteome analysis of proliferative response of bystander cells adjacent to cells exposed to ionizing radiation. *Proteomics.* juin 2007;7(12):2000-8.
174. Hsu K-W, Hsieh R-H, Wu C-W, Chi C-W, Lee Y-HW, Kuo M-L, et al. MBP-1 suppresses growth and metastasis of gastric cancer cells through COX-2. *Mol Biol Cell.* déc 2009;20(24):5127-37.
175. Zhao Y, de Toledo SM, Hu G, Hei TK, Azzam EI. Connexins and cyclooxygenase-2 crosstalk in the expression of radiation-induced bystander effects. *Br J Cancer.* 1 juill 2014;111(1):125-31.
176. Zhou H, Ivanov VN, Lien Y-C, Davidson M, Hei TK. Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects. *Cancer Res.* 1 avr 2008;68(7):2233-40.
177. Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 avr 1997;94(8):3633-8.