

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ SPÉCIALISÉE (BIOLOGIE APPLIQUÉE ET ENTREPRISE)

Etude du dialoque moléculaire entre des cellules tumorales et des cellules endothéliales en co-culture après leur irradiation par un faisceau de protons

Abel, Denis

Award date: 2013

Awarding institution: Universite de Namur

Link to publication

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- · Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
 You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR

Faculté des Sciences

Etude du dialogue moléculaire entre des cellules tumorales et des cellules endothéliales en co-culture après leur irradiation par un faisceau de protons

Mémoire présenté pour l'obtention du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire Denis ABEL

Janvier 2013

Table des matières

I. INTRODUCTION	
1) Le cancer	1
1.1) Epidémiologie	1
1.2) Caractéristiques du cancer	1
2) L'angiogenèse tumorale	3
3) La radiothérapie	4
3.1) Historique	4
3.2) Radiothérapie conventionnelle et hadronthérapie : quelques aspects	
physiques	5
3.3) Les dégâts cellulaires induits par les radiations ionisantes	7
3.4) La DNA Damage Response	9
3.5) Les types de mort cellulaire induits après irradiation	10
 3.5.1) L'apoptose 3.5.2) La nécrose 3.5.3) L'autophagie 3.5.4) La sénescence 3.5.5) La mitose catastrophique 	11 11 12 12 13
3.6) Importance de la communication entre cellules tumorales et	
endothéliales dans le processus de radiorésistance	14
4) Objectifs	15
II. MATERIEL ET METHODES 1) Culture cellulaire	16
2) Repiquage en chambre d'irradiation	17
3) Extraction de l'ARN total	. 19
4) Rétrotranscription de l'ARN en ADNc	20
5) Analyse de l'expression de gènes (PCR en temps réel)	21
6) Evaluation de la capacité de prolifération cellulaire (test de clonogénicité).	21
7) Analyse du cycle cellulaire	22
III. RESULTATS	

1) Evaluation de la capacité de prolifération des cellules A549 et EAhy926	
après irradiation par un faisceau de protons	24
2) Analyse du cycle cellulaire après irradiation par un faisceau de protons	26
3) Analyse du niveau d'expression de gènes d'intérêt 24 heures après	
irradiation	29
IV. DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES 1) Discussion et perspectives	34
1.1) Effets de l'irradiation par un faisceau de protons des cellules A549 et	
EAhy926 sur la survie des cellules et sur leur cycle cellulaire	34
1.2) Effets de l'irradiation des cellules A549 et EAhy926 par un faisceau de	
protons sur l'expression de divers gènes d'intérêt	35
2) Conclusion générale	38
V. BIBLIOGRAPHIE VI. ANNEXE	

I. INTRODUCTION







Figure I.2: Les 6 caractéristiques principales du cancer. (Hanahan et Weinberg, 2000)

1) Le cancer

1.1) Epidémiologie

En 2012, dans les pays industrialisés, le cancer est la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. Pour l'année 2008, ce ne sont pas moins de 7.6 millions de personnes qui sont décédées d'un cancer dans le monde (Globocan, 2008). En Europe, il est prédit qu'environ 1.3 millions de personnes mourront d'un cancer pour l'année qui se termine (Malvezzi et al., 2012).

L'incidence des cancers est plus grande pour les hommes que pour les femmes. Les statistiques prédisent d'ailleurs qu'un homme sur deux sera touché par un cancer au cours de son existence alors que pour les femmes, le ratio prévu est de une sur trois. Les estimations des différentes formes diagnostiquées et du taux de mortalité pour chacune de ces formes aux Etats-Unis en 2012 peuvent être visualisées à la figure I.1. Il en ressort que chez l'homme, le cancer le plus fréquent est celui de la prostate alors que chez la femme, c'est le cancer du sein qui arrive en première position des cas diagnostiqués. Cependant, le cancer faisant le plus de morts reste celui du poumon et ce peu importe le sexe (ACSC facts and figures, 2012)

En effet, les statistiques montrent que le cancer du poumon (avec celui du pancréas) sera le seul cancer dont le taux de mortalité sera en hausse pour l'année 2012 (Malvezzi et al., 2012). C'est d'ailleurs l'une des raisons pour laquelle le choix du type cellulaire tumoral étudié dans ce travail s'est orienté vers des cellules issues d'un adénocarcinome pulmonaire; car, si pour la majorité des cancers le taux de mortalité diminue au fil des ans grâce à l'augmentation des dépistages précoces ainsi que la plus grande efficacité des traitements, certains cancer restent encore très difficiles à combattre et il est donc nécessaire de continuer la recherche fondamentale sur le sujet. En effet, ce genre de recherches peut déboucher sur le développement de thérapies plus efficaces.

1.2) Caractéristiques du cancer

Le cancer, aussi appelé tumeur maligne, regroupe un grand nombre de maladies ayant toutes des caractéristiques communes. L'une des principales réside en la présence, dans un organe quelconque, de cellules immortelles ayant une croissance anarchique ainsi qu'un potentiel invasif important. L'origine moléculaire des cancers provient de l'accumulation de plusieurs mutations dans le génome de cellules saines qui en conséquence se transforment en cellules tumorales. L'origine de ces mutations est au cœur de la recherche scientifique, car même si certains liens de causalités sont déjà bien établis, les causes exactes ne sont en général pas encore bien définies.

De plus, cette vision du cancer uniquement défini comme un ensemble de cellules n'étant plus régulées dans leur croissance n'est plus aussi réaliste qu'elle le fut par le passé. Nos connaissances sur les cancers n'ont cessé de croître au cours des 10 dernières années. De ce fait, de nouvelles caractéristiques propres à ces maladies ont été découvertes, et à l'heure actuelle, la plupart du monde scientifique s'accorde sur 6 caractéristiques principales qui furent décrites par Douglas Hanahan et Robert Weinberg en 2000 (Hanahan et Weinberg, 2000). Ces 6 caractéristiques sont reprises sous forme de diagramme à la figure I.2.



Figure I.3 : Seconde génération des caractéristiques du cancer. (Hanahan et Weinberg, 2011)

Premièrement, on retrouve une capacité de croissance des cellules indépendante de toutes stimulations externes. Les cellules cancéreuses peuvent par exemple générer leurs propres facteurs de croissance. Les récepteurs aux facteurs de croissance des cellules tumorales peuvent aussi s'activer sans la présence de ligands spécifiques et dès lors envoyer un message de prolifération inadéquat participant à leur caractère prolifératif incontrôlé. Deuxièmement, on retrouve la caractéristique d'insensibilité à des signaux anti-prolifératifs. En effet, les cellules cancéreuses ne répondent pas à l'inhibition de contact, ni aux différents inhibiteurs de croissance pouvant être sécrétés par les cellules voisines.

Une troisième caractéristique de ces cellules consiste à échapper à la mort par apoptose. Les cellules endommagées ne pouvant pas être réparées effectuent normalement l'apoptose, sorte de suicide cellulaire programmé. Cependant, les cellules cancéreuses ont la capacité d'outrepasser cette barrière apoptotique grâce à la présence de mutations dans différents gènes contrôlant le cycle cellulaire, comme le bien connu p53, un des principaux gènes qualifié de suppresseur de tumeur. Différents gènes comme pRB ou encore p21 peuvent aussi, une fois mutés, conférer aux cellules cancéreuses une certaine immortalité qui est la quatrième caractéristique décrite par Hanahan et Weinberg.

Une autre caractéristique des cellules cancéreuses n'est autre que leur capacité à former des métastases. Les métastases résultent du potentiel d'invasion des cellules cancéreuses qui peuvent migrer de leur lieu d'origine vers d'autres organes lorsque leur environnement direct ne suffit plus à leur croissance. Ce phénomène invasif est donc lié au phénomène d'angiogenèse, qui constitue la sixième caractéristique du cancer.

Cette caractéristique décrit les cellules cancéreuses comme capables d'auto-entretenir leur approvisionnement en nutriments et en oxygène via le phénomène d'angiogenèse (Hanahan et Weinberg, 2000).

Etant donné que cette dernière caractéristique occupe une place importante dans la problématique abordée dans le cadre de ce mémoire, elle sera plus largement expliquée dans le point suivant.

Enfin, notons qu'en 2011, Douglas Hanahan et son équipe firent une mise à jour des « Hallmarks of cancer » en ajoutant 4 autres caractéristiques au 6 énoncées ci-dessus, à savoir, l'inflammation chronique, l'instabilité génomique, l'échappement au système immunitaire ainsi que la dérégulation du métabolisme cellulaire. La figure I.3 représente la dernière version mise à jour de ces « hallmarks ».

Bien que cette publication eut un grand impact sur le monde scientifique de par la simplification et la prise de recul qu'elle fournissait à propos du cancer, il ne faut néanmoins pas oublier que beaucoup de choses sur ces maladies restent à l'heure actuelle encore inconnues, notamment les causes, pouvant être multiples et qui ne sont pas toujours identifiables. On sait en effet qu'en dehors des différentes substances carcinogènes, notre mode de vie, notre alimentation ainsi que notre environnement sont autant de facteurs à prendre en compte lorsque l'on recherche l'origine d'un cancer. Cependant, il n'est pas toujours évident de faire un lien entre la maladie et ces différents paramètres. Il est donc nécessaire de continuer à étudier dans les moindres détails chaque aspect du cancer, de la cellule à notre environnement, et ce dans le but ultime qu'un jour nous puissions vaincre cette maladie.



Figure I.4: Diminution des apports en nutriments et oxygène due à la croissance tumorale. (http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/eng/biochemistry.html)



Figure I.5: Bref résumé de l'angiogenèse tumorale. Les cellules cancéreuses envoient des signaux angiogéniques aux capillaires situés à proximité. Ceux-ci vont bourgeonner et croître en direction de la tumeur afin d'accroître la disponibilité en oxygène et en nutriments que sa croissance nécessite. (Siemann, 2003)

2) L'angiogenèse tumorale

De par sa croissance, la tumeur va prendre de plus en plus de place au sein de l'organe d'origine. Cependant, une croissance aussi rapide n'est pas sans conséquences. En effet, pour maintenir son développement, la tumeur doit recevoir un apport suffisant en nutriments ainsi qu'en oxygène. Or, lorsque les cellules tumorales se multiplient et envahissent les espaces alentours, elles s'éloignent peu à peu des vaisseaux sanguins près desquels elles étaient établies initialement. Les cellules se retrouvent alors dans un environnement appauvri en oxygène ainsi qu'en nutriments car la diffusion ne peut se faire sur une si grande distance (figure I.4). Si rien n'est fait pour contrer cela, les cellules tumorales mourront et la tumeur ne pourra jamais prendre plus d'ampleur. Malheureusement, c'était sans compter sur un phénomène d'angiogenèse propre aux tumeurs.

L'angiogenèse est une série d'étapes visant à la formation d'un nouveau vaisseau sanguin à partir du bourgeonnement d'un vaisseau préexistant. Ce procédé peut être utilisé afin de participer à la réparation d'un tissu endommagé mais aussi à des fins bien moins bénéfiques, à savoir, la croissance tumorale.

La base du mécanisme d'angiogenèse peut être résumée comme suit : tout d'abord, il y a réception d'un ou plusieurs signaux angiogéniques par les cellules endothéliales. Ces signaux, dans le cas des tumeurs, sont envoyés par les cellules tumorales ellesmêmes. Une fois les signaux arrivés aux récepteurs des cellules endothéliales, cellesci vont dégrader la matrice extracellulaire se trouvant dans leur entourage, ainsi que leur propre membrane basale dans le but de proliférer et de migrer vers la tumeur. Une fois cette ébauche de vaisseau sanguin réalisée, la matrice extracellulaire est reformée et le vaisseau est stabilisé (figure I.5) (Hillen et Griffoen, 2007).

Cette appellation d'angiogenèse tumorale fut utilisée pour la première fois en 1968 lors d'une étude in vivo sur des hamsters dans laquelle il a été constaté qu'une molécule diffusible venant des cellules tumorales pouvait avoir un effet sur la vascularisation environnante (Greenblatt et Shubi, 1968). Par la suite, en 1971, J. Folkman émis l'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale était dépendante de l'angiogenèse. Selon Folkman, une tumeur peut activer la formation de vaisseaux sanguins lorsque la masse de celle-ci dépasse 1 à 2 mm de diamètre.

Les vaisseaux sanguins nouvellement formés peuvent entourer ou pénétrer la masse tumorale et permettre à la tumeur de continuer sa croissance et lui conférer par la même occasion un potentiel métastatique plus important (Folkmann, 1971). Il aura fallu attendre encore quelques années avant d'identifier les premiers messagers intervenant dans ce processus. Le premier à être identifié fut le bFGF (basic fibroblast growth factor) qui à l'époque fut considéré comme la principale molécule responsable de l'angiogenèse tumorale (Shing et al., 1984). Le VEGF sera quant à lui découvert par Ferrara et Henzel en 1989 (Ferrara et Henzel, 1989).

Ces différentes découvertes ont donc poussé les chercheurs à investiguer de plus en plus le domaine de l'angiogenèse en vue d'y trouver différentes solutions thérapeutiques. En effet, la possibilité d'inhiber l'angiogenèse tumorale avec des inhibiteurs de la production de bFGF ou encore des anticorps monoclonaux anti-VEGF a fourni beaucoup d'espoir pour le développement de nouvelles thérapies (Kerbel, 2008). Cependant, ces solutions ne sont pas faites pour fournir une guérison totale de la maladie. Ces stratégies pourront certes réduire la taille de la tumeur ainsi que le risque de développer des métastases mais certaines tumeurs pouront tout de même se loger dans des endroits déjà vascularisés, voire croître en suivant des

vaisseaux sanguins préexistants (Hillen et Griffoen, 2007). L'angiogenèse tumorale est donc un facteur de plus à prendre en compte dans l'élaboration de thérapies qui se veulent de plus en plus combinatoires, car il est utopiste de croire que la modification d'un seul « paramètre » de la maladie est suffisante pour en guérir. Au contraire, c'est la combinaison d'actions à différents niveaux de la maladie qui pourrait dans un esprit de synergie, contrer son développement.

3) La radiothérapie

3.1) Historique

La radiothérapie peut être définie comme une technique utilisant des radiations ionisantes dans le but d'éliminer des cellules tumorales.

Elle fut le fruit de différentes découvertes ayant eu lieu à la fin du XIX^{ème} siècle, tels que la découverte des rayons X par Wilhelm Röntgen mais aussi la découverte de l'uranium par Marie Curie.

Cependant, la radiothérapie que l'on qualifiera de « moderne » n'a pris son essor qu'à partir de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle car cette nouvelle technique thérapeutique restait tributaire des avancées technologiques de l'époque notamment en matière de physique des rayonnements.

Dans ses débuts, la radiothérapie consistait principalement en l'exposition de surfaces corporelles atteintes à des rayons X de faible énergie. C'est pourquoi, les principales tumeurs pouvant être traitées étaient des tumeurs de surface comme celles de la peau ou du sein. Les tumeurs situées en profondeur ne pouvaient être atteintes de par la limite de l'énergie que pouvait avoir les rayons X à cette époque. De plus, l'irradiation des tissus restait assez imprécise et le volume de tissu sain touché lors des traitements était important.

Un autre moyen de traiter certaines tumeurs de petite taille et facilement accessible fût créé par le couple Curie en 1901. La Curie-thérapie aussi appelée brachythérapie consiste en l'introduction d'une aiguille contenant du radium au niveau du voisinage de la tumeur voire dans la tumeur même afin de l'irradier (Grupta, 1995). Cette technique existe encore de nos jours et a bien entendu évolué au cours du temps, de manière à améliorer l'efficacité du traitement ainsi que la sécurité des personnes le prodiguant mais aussi celle des patients.

A l'heure actuelle, la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont les trois voies thérapeutiques les plus répandues pour traiter les patients atteints d'un cancer. La combinaison de ces trois méthodes thérapeutiques n'est d'ailleurs pas rare, et semble dans certains cas la meilleure solution pour augmenter les chances de survie des patients les plus critiques. Les statistiques actuelles montrent qu'environ un patient sur deux aura recours à une session de radiothérapie au cours de son traitement (Delaney et al., 2005). Bien évidemment, cela dépend du type de cancer dont souffre la personne. Un patient atteint d'un cancer touchant le système nerveux central va recourir dans 9 cas sur 10 à la radiothérapie pour son traitement vu la difficulté d'accès à cette zone, alors qu'une personne souffrant d'un cancer du foie aura plutôt recourt à une ablation ou une greffe voire un traitement chimiothérapeutique mais ne subira pas de sessions de radiothérapie, qui est moins efficace dans ce contexte.

Toutefois, il est intéressant de noter que pour le cancer des poumons, il est estimé que 76% des patients devraient subir une session de radiothérapie au cours de leur



Figure I.6: Graphique représentant le dépôt d'énergie en fonction de la profondeur de pénétration pour différents types de rayonnements ionisants (http://iuhealthprotontherapy.org/what-is-proton-therapy).

traitement (Delaney et al., 2005). C'est donc une deuxième raison pour laquelle la lignée cellulaire tumorale choisie pour ce travail est d'origine pulmonaire.

3.2) Radiothérapie conventionnelle et hadronthérapie : quelques aspects physiques

Lorsque l'on parle de radiothérapie « conventionnelle », il est fait référence à la radiothérapie faisant intervenir des rayons X dans le but de détruire des cellules tumorales. Ce type de radiothérapie est le plus répandu à l'heure actuelle pour le traitement des cancers.

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques au même titre que la lumière visible. Ils sont constitués de photons d'une longueur d'onde allant de 5 picomètres à 10 nanomètres et l'énergie à laquelle ils sont utilisés en radiothérapie varie de 100 KeV à quelques Mev, en fonction de la tumeur à cibler.

Par opposition à cette radiothérapie conventionnelle, on retrouve l'hadronthérapie qui, elle, consiste à envoyer un faisceau de particules chargées (protons, particules alpha, ions carbone, etc.). Ce faisceau est dirigé vers la tumeur de manière à endommager l'ADN des cellules tumorales tout en essayant d'épargner les cellules saines.

Avant toute chose, il faut savoir que la capacité qu'ont les radiations ionisantes de tuer des cellules tumorales dépend de différents paramètres à la fois physiques mais aussi biologiques.

Le principal paramètre physique à prendre en compte est le transfert d'énergie linéique (Linear Energy Transfer ou LET en anglais). Le LET est une propriété physique qui correspond à la quantité d'énergie déposée par des rayonnements ionisants dans la matière en fonction de la distance (exprimée en micromètre). Le LET d'une particule va dépendre de sa nature, de son énergie initiale ainsi que du matériau traversé. On peut donc faire varier le LET d'une particule en faisant varier son énergie initiale.

Or, au plus une particule interagit avec la matière, au plus elle l'ionise. C'est pourquoi, les particules à LET élevé causent des dommages plus nombreux aux cellules que des particules ayant un faible LET.

Les rayons X n'étant pas des particules au sens propre, on ne peut parler de LET. Cependant, leurs effets sont similaires à des particules ayant un faible LET. Dans ce travail, les rayons X seront donc désormais assimilés à des particules de faible LET.

L'énergie d'un rayon X (un photon) est rapidement absorbée lorsqu'il entre en contact avec la matière. En réalité, dès qu'un photon ionise une molécule, il « disparaît ». En fait, toute l'énergie qui le composait est transmisse à un électron secondaire arraché à la molécule ionisée. Le photon n'a donc pas réellement disparu mais aura changé de « forme ». Le profil de dépôt d'énergie d'un faisceau de rayons X peut être visualisé à la figure I.6.

Dès l'entrée en contact avec la matière, un grand nombre de photons constituant le faisceau vont ioniser les molécules qui la constituent. Cette ionisation va ensuite diminuer au fur et à mesure que la distance dans la matière croît.

En effet, il est facile de comprendre que la probabilité de traverser une certaine quantité de matière sans produire d'ionisation est d'autant plus faible que la profondeur de la dite matière est grande. C'est pourquoi seulement un faible



Figure I.7 : Graphique représentant la dose déposée en fonction de la profondeur pour un faisceau de protons comparé à un faisceau de rayons X (10MeV). L'énergie du faisceau est calibrée pour que le pic de Bragg ait lieu dans la tumeur. (Textbook of Radiation Oncology, 2010)

pourcentage des rayons X envoyés pourront ioniser des molécules se situant à une plus grande profondeur, tous les autres photons ayant déjà été arrêtés précédemment, par leur rencontre avec une molécule quelconque. Cela permet d'expliquer qu'il est plus rare qu'un photon dépose son énergie loin dans la matière et cela explique par la même occasion le profil de décroissance observé à la figure I.6.

Dans le cas d'une irradiation conventionnelle en vue de traiter un cancer, le dépôt d'énergie est donc maximal à l'entrée dans le tissu pour ensuite diminuer avec la profondeur. Cela signifie qu'au plus la profondeur de la tumeur augmente, au moins les photons produiront de dégâts dans les cellules.

De plus, s'il faut atteindre une tumeur située en profondeur à l'aide de rayons X, il sera nécessaire d'irradier les différents tissus sains situés en amont de la région où se situe la tumeur. Les tissus sains situés en aval seront eux aussi touchés mais de manière moins importante étant donné la diminution des ionisations qu'engendrent les rayons X en fonction de l'augmentation de la profondeur.

Afin d'éviter ces effets indésirables lors de l'irradiation d'une tumeur située en profondeur, il est intéressant d'envisager l'usage de l'hadronthérapie qui procure différents avantages par rapport à l'usage des rayons X. L'utilisation d'un faisceau de particules chargées tel qu'un faisceau de protons permet de cibler de manière plus précise la tumeur tout en limitant les dommages occasionnés aux tissus sains environnants. Cette plus grande précision dans le ciblage de la tumeur peut être expliquée par le profil de dépôt d'énergie propre aux particules à haut LET (figure I.6).

Contrairement aux photons, au plus des particules ralentissent au contact de la matière, au plus elles lui transfèrent leur énergie. En effet, alors qu'un photon ne pourra ioniser qu'une seule molécule, une particule provoquera toute une série d'ionisations de par la rencontre des différentes molécules situées sur son parcours jusqu'à son arrêt complet.

De plus, juste avant cet arrêt, il se produit un dépôt maximal d'énergie en forme de pic qu'on appelle le pic de Bragg (figure I.7).

En résumé, une faible ionisation a lieu dans les premiers centimètres de pénétration dans la matière car la vitesse de la particule est élevée et lui permet de traverser la matière tout en produisant un faible nombre d'interactions. Or, au plus la particule va en profondeur, au plus sa vitesse ralentit, ce qui se traduit par des ionisations plus fréquentes par unité de distance. Donc, au fur et à mesure que la particule ralentit, son LET augmente, provoquant plus d'ionisations et donc plus de dommages aux cellules. Au final, dans les derniers nanomètres que parcourt la particule, il y aura un très grand nombre d'ionisations car le LET sera maximal. C'est ce phénomène que l'on observe dans le pic de Bragg.

L'avantage de ce pic est que pour une matière de densité à peu près identique, il peut avoir lieu à une profondeur variable en fonction de l'énergie initiale des particules. Avec les différents paramètres cités ci-dessus, il est donc possible de calculer où la particule s'arrêtera et par conséquence le lieu où le nombre de dégâts sera le plus grand.

La figure I.7 présente un schéma de dépôt d'énergie (de couleur grise) assez particulier correspondant à ce qu'on appelle un pic de Bragg étiré ou Spread-out Bragg peak en anglais (SOBP). En effet, lors du traitement de patients par



$$RBE = \frac{D_X}{D_R}$$

Figure I.9: Formule donnant l'efficacité biologique relative (RBE) où Dx représente la dose de radiation de référence et où Dr représente la dose de radiation testée. (ICRP, 1990)

Figure I.8 : Schéma représentant le Spread-Out Bragg peak comparé à un faisceau de photons utilisé en radiothérapie conventionnelle. Les différents pics de Bragg issus de 12 faisceaux de protons sont représentés par les fines lignes bleues. La courbe en pointillé bleu représente la somme des différents pics de Bragg et donc la dose réellement infligée aux tissus. On remarque que cette dose est moins grande pour les tissus sains que celle déposée par des rayons X. De plus, avec le faisceau de protons, aucune dose n'est déposée au-delà de la tumeur contrairement aux rayons X. (Levin, 2005)



Figure I.10 : Efficacité biologique relative (RBE) en fonction du transfert linéique d'énergie (LET). On remarque qu'un trop grand LET peut faire diminuer l'efficacité biologique relative. (Basic Clinical Radiobiology, 2009)

hadrontérapie, majoritairement par protonthérapie, des faisceaux de protons de différentes énergies sont envoyés afin de faire apparaître une multitude de pics de Bragg à différentes profondeurs (figure I.8). Cette technique permet d'irradier des tumeurs sur toute leur profondeur sans irradier les tissus se trouvant au-delà et en irradiant de manière moins forte les tissus en amont de la tumeur que si le traitement avait été réalisé avec des rayons X.

Suite à ce qui vient d'être mentionné dans les paragraphes précédents, on comprend que la dose de radiation nécessaire pour observer un même effet biologique varie en fonction du type de rayonnement utilisé. C'est pourquoi afin de comparer l'efficacité entre deux types de rayonnements ionisants, il est nécessaire de calculer l'efficacité biologique relative (Relative Biological Effectiveness ou RBE en anglais). Le RBE correspond au rapport entre la dose de radiation de référence et la dose de radiation testée. La dose de référence utilisée est souvent celle produite par des rayons X (figure I.9).

Le LET et le RBE sont donc des paramètres liés comme le montre la figure I.10.

Bien que les particules à haut LET soient plus efficaces, de trop hautes valeurs de LET sont inutiles car les particules libèrent alors plus d'énergie que nécessaire pour tuer les cellules et cela entraine une chute de l'efficacité biologique relative. Dans le cadre de ce mémoire, le LET présent au centre de la cellule est de 100 KeV/ μ m, ce qui correspond à l'efficacité biologique relative maximale. Néanmoins, dans le domaine de la radiobiologie, on parlera du LET moyen qui dans notre cas est de 25 KeV/ μ m.

3.3) Les dégâts cellulaires induits par les radiations ionisantes

Les dégâts causés aux cellules par des radiations ionisantes diffèrent suivant le type de radiation utilisé. Comme leur nom le laisse transparaitre, ce genre de radiation a la capacité d'ioniser la matière, c'est-à-dire d'éjecter des électrons à différentes molécules moyennant l'énergie nécessaire à la cassure de la liaison initiale.

Les dégâts induits par une ionisation peuvent être de deux types : directs ou indirects. En effet, lorsqu'une molécule est touchée par un photon ou un proton, l'un de ses électrons va lui être arraché, et par conséquent la molécule se retrouve ionisée de manière directe. Cependant, l'électron éjecté lors de l'ionisation directe peut réagir avec d'autres molécules présentent dans son entourage et les ioniser de manière indirecte.

Les premiers à avoir investigué les dégâts étant à l'origine de la mort cellulaire causés par les radiations ionisantes sont Warters et Hofer en 1977 (Warters et al., 1977). Ces scientifiques ont remarqué qu'une dose de radiation ionisante déposée dans la membrane plasmique ou le cytoplasme n'induisait pas systématiquement la mort cellulaire, alors qu'une même dose déposée au sein du noyau provoquait toujours la mort de la cellule irradiée. Les dommages à l'ADN furent donc soupçonnés d'être les dégâts responsables de la mort cellulaire après exposition des cellules à des radiations ionisantes.

Les radiations ionisantes déposent leur énergie tout au long de leur parcours, elles peuvent donc provoquer des dommages à plusieurs molécules de la cellule telles que des protéines, des ARN messagers, des métabolites, etc... Cependant, la majorité de ces molécules sont présentent en grand nombre dans le cytoplasme et ont un temps de demi-vie assez court. C'est pourquoi leur ionisation n'aura pas de grande incidence



Figure I.11 : Les radiations ionisantes à haut LET provoquent des clusters d'ionisations tandis que les radiations à faible LET créent des dommages plus isolés. (Urushibara et Yokoya, 2006)



Figure I.12: Schéma du déroulement d'une réponse aux dommages à l'ADN (DDR). (Mullenders, 2009)

sur la survie cellulaire. L'ADN quant à lui est une molécule assez spéciale à plusieurs titres : tout d'abord, c'est la plus grande molécule intracellulaire, ce qui la rend plus vulnérable car les particules ont une plus grande probabilité d'interagir avec plutôt qu'avec d'autres molécules plus petites. Ensuite, en dehors de la phase de réplication, cette molécule n'est présente qu'en 2 copies au sein d'une cellule, ce qui en fait une cible critique étant donné qu'une molécule d'ADN ne peut pas être renouvelée à la manière d'une protéine.

Enfin, cette molécule est le pilier central de la cellule et l'endommager engendre souvent de graves conséquences en terme de survie cellulaire.

Le type d'événement à l'origine des principaux dégâts subis par l'ADN et provoquant la mort cellulaire fut élucidé 4 ans plus tard, en 1981, lorsque J.F Ward émit l'hypothèse des clusters d'ionisations (Ward, 1981). Un cluster d'ionisations correspond à un ensemble d'ionisations se produisant dans un espace restreint (quelques nanomètres).

Bien que le dépôt d'énergie au sein de la cellule se fasse tout au long du trajet de la particule, il arrive qu'un ensemble de dommages se produise au même moment dans un endroit bien défini.

Etant donné qu'au plus une particule ralentit, au plus elle ionise un grand nombre de molécules par unité de distance, l'apparition d'un cluster d'ionisations sera plus probable lors de l'utilisation de particules que si des rayons X sont utilisés.

Comme le montre la figure I.11, les rayons X, dont les caractéristiques radiobiologiques peuvent être assimilées à des particules de faible LET, ont plus tendance à former des lésions isolées, avec de temps en temps un cluster d'ionisations. En effet, pour former un cluster d'ionisations en utilisant un faisceau de photons, il faut que plusieurs photons ionisent des molécules au même endroit, or ce phénomène est moins probable que pour des particules qui à elles seules peuvent déjà former un cluster d'ionisations.

Or, les dégâts les plus critiques pouvant altérer l'ADN sont issus de l'apparition de ces clusters au sein de l'ADN. En effet, des clusters d'ionisations ayant lieu dans l'ADN sont souvent synonyme de cassures double brin, et ces cassures constituent le dégât le plus difficile à réparer pour une cellule, et donc le plus mortel. C'est pourquoi, les rayons X qui produisent des dégâts moins sévères tels que des cassures simple brin, des sites abasiques voire des bases oxydées, seront moins efficaces que des particules pour endommager de manière importante l'ADN des cellules (Urushibara et Yokoya, 2006).

Lors d'une cassure simple brin, il est aisé pour la cellule de remplacer la ou les bases manquantes en recopiant le brin matrice situé en face alors que pour une cassure double brin, cela devient plus difficile étant donné l'absence de brin matrice.

Bien que les cassures double brin soient les dommages à l'origine de la mort cellulaire lors d'irradiation, d'autres types de dégâts peuvent contribuer à la mort des cellules. L'ADN peut, comme expliqué auparavant, subir des dommages produits par des ionisations indirectes. Par exemple, un électron secondaire peut rencontrer une molécule d'oxygène et créer un anion superoxyde O_2^- pouvant réagir avec des composants de l'ADN. Ce radical nouvellement formé peut aussi se transformer en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par association avec des atomes d'hydrogène. D'ailleurs, il apparaît que lors de l'irradiation de tumeurs hypoxiques, l'efficacité des radiations ionisantes diminue jusqu'à 2 fois par rapport à des tumeurs en normoxie (Louis et al., 2002). C'est donc une preuve que la formation de radicaux libres de type



Figure I.13: Les 3 voies que peuvent emprunter les cellules après une cassure double brin. (Elshaikh, 2002)





Figure I.15: Marquage des foci de γ-H2AX à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorochrome et visualisés au microscope confocal. L'apparition de ces foci est survenue après une irradiation des cellules par des rayons gamma. Marquage des foci réalisé à l'aide d'un anticorps anti- γ-H2AX couplé à un fluorochrome vert. Noyau marqué au DAPI (http://www.niehs.nih.gov/research/atniehs/labs/lmc/molecular/ index.cfm). Figure I.14 : Schéma de la formation des foci de γ -H2AX. A) H2AX non phosphorylé et H3-K79 masquée dans la chromatine. B) La cassure double brin de l'ADN expose H3-K79. C) le recrutement indépendant de différentes protéines et complexes entraîne la phosphorylation et la dimérisation de la kinase ATM. D) une fois activée, ATM phosphoryle H2AX et 53BP1 ce qui stabilisera l'ADN en vue d'une éventuelle réparation de la cassure par des complexes effecteurs de la DDR. (Stucki et Jackson, 2004)



Figure I.17: Dans la recombinaison homologue, l'extrémité des brins est «rognée» avec l'aide des protéines RAD50, NBS1 et MRE11, de manière à obtenir des extrémité protrudentes. Ensuite, il y invasion des 2 brins d'ADN formant des jonctions de Holiday. Par la suite, des protéines RAD vont aider une polymérase à synthétiser un nouveau brin complémentaire de chaque côté de la jonction. Finalement la liaison des deux brins est rétablie à l'aide d'une ligase. La recombinaison non-homologue ne récupère pas l'information perdue lors de la cassure double brin, des nucléotides peuvent même être retirés durant le procédé de réparation qui se déroule de la manière suivante : tout d'abord, un hétérodimère KU80-KU70 servant probablement d'échafaudage moléculaire permet le recrutement de la sous-unité catalytique d'une protéine kinase dépendante de l'ADN dont le rôle serait de permettre l'accessibilité à l'ADN pour d'autres protéines impliquées dans la recombinaison non homologue. Le complexe Artémis qui peut avoir une activité endo et exonucléase peut aussi être recruté au lieu de cassure. Ensuite une ligase de type IV lie les deux extrémités de l'ADN ensemble avec l'aide de la protéine XRCC4 qui elle même interagit avec la protéine cernunnos. Cependant, le mécanisme par lequel ces différents intervenants agissent n'est pas encore bien connu. (Mullenders, 2009)

Position	Primary signalling proteins	Applies to cells irradiated in	Features
G1	ATM, p53, p21	G1	Prevents entry into S
S	ATM, Chk1/Chk12, CDC25A/ CDC25C, BRCA1, BRCA2	S	Slows progression through S
G2-early	ATM, Chk1/Chk12, CDC25A/ CDC25C, BRCA1, BRCA2	G2	Prevents entry into mitosis
G2-late	ATR, Chk1, CDC25A/CDC25C	All phases	Accumulation of cells in G2

Tableau I.1 : Quelques caractéristiques des checkpoints du cycle cellulaire induits par des dommages à l'ADN. (Basic Clinical Radiobiology, 2009)

superoxyde intervient dans les dommages mortels infligés aux cellules et que les cassures double brin ne sont pas les seuls dommages provoquant la mort cellulaire après irradiation

3.4) La DNA Damage Response

Au cours de l'évolution, les cellules ont développé diverses réponses dans le but de contrer les différents types de dommages occasionnés à leur ADN. L'ensemble des mécanismes qui se mettent en place lorsque des dégâts à l'ADN sont détectés porte le nom de DNA Damage Response ou DDR.

Comme le montre la figure I.12, la DDR est composée de 3 niveaux. Le premier niveau est constitué de senseurs biologiques surveillant le génome en permanence. Le second niveau est constitué par des protéines, souvent de type kinase, qui vont recevoir différents signaux en provenance des senseurs et les transmettre au troisième niveau constitué d'effecteurs.

En fonction de la sévérité des dommages engendrés à l'ADN par les radiations, les effecteurs peuvent provoquer l'arrêt momentané ou permanent du cycle cellulaire ainsi qu'activer des mécanismes de réparation de l'ADN (figure I.13). Il peut aussi en résulter la mort cellulaire si la cellule ne parvient pas à réparer les dommages.

En 2006, Stucki et Jackson ont identifié un des évènements les plus précoces se produisant après une cassure double brin, à savoir la phosphorylation de l'histone H2AX qui une fois phosphorylé se note γ -H2AX.

En effet, dans les 3 minutes suivant l'apparition de cassures double brin, les histones H2AX situées près de la cassure se font phosphoryler sur leur résidu sérine 139 par une kinase nommée ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (figures I.14 et I.15) (Paull et al., 2000). La phosphorylation de ces histones facilite l'accès, au lieu de cassure, de différentes protéines impliquées dans la DDR. Il a été montré qu'environ 700 protéines pouvant être des substrats d'ATM lors d'une cassure double brin sont liées de près ou de loin au mécanisme de DDR (Matsuoka et al., 2007). Parmi ces protéines se retrouvent des effecteurs qui une fois phosphorylés, font entrer la cellule dans une des trois voies énoncées précédemment.

Comme le montre le tableau I.1, il existe des checkpoints pour les différentes phases du cycle cellulaire. Ces checkpoints sont principalement régulés par des cyclinedependent-kinases (CDK) qui une fois associées à des cyclines, engendrent la phosphorylation de diverses protéines permettant à la cellule de passer par les différents stades du cycle cellulaire.

Or, différentes protéines de signalisation activées suite à une DDR (voir tableau I.1 et figure I.16) peuvent inhiber les complexes cycline-CDK et ralentir, voire empêcher, le passage de la cellule dans la phase suivante de son cycle cellulaire. Ces molécules sont appelées cycline-dependent-kinase inhibitors (CDKI).

Ces ralentissements ou arrêts dans le cycle cellulaire permettent à la cellule de mettre en place les mécanismes de réparation de l'ADN. Dans le cas des cassures double brin, qui pour rappel sont les dommages les plus graves que peut subir l'ADN, il existe deux types de mécanismes de réparation, à savoir, la recombinaison homologue et la recombinaison non-homologue. Ces deux mécanismes sont détaillés ci-dessous et illustrés à la figure I.17.

Le choix de l'une ou l'autre voie de réparation dépend principalement de la présence ou non d'un brin de séquence homologue pouvant servir de matrice.



Figure I.18: Contribution de la recombinaison homologue et non-homologue dans la réparation des cassures double brin en fonction des phases du cycle cellulaire. La recombinaison nonhomologue prédomine dans la phase G1 et au début de la phase S tandis que la recombinaison homologue domine en fin de phase S et en phase G2. (Rothkamm, 2003)



Figure I.19: L'activation de p53 peut résulter en l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 via l'action de différents gènes tels que p21 ou à l'apoptose en augmentant l'expression de différents gènes pro-apoptotiques tels que BAX, PUMA et NOXA. (Attardi et DePinho, 2004)

Le mécanisme de recombinaison homologue nécessite un brin de séquence homologue, or, une chromatide sœur n'est disponible qu'en phase S ou G2. Cette voie de réparation n'a donc lieu que dans ces phases et est spécifique aux cellules qui se divisent. La recombinaison non-homologue ne nécessitant, quant à elle, pas de brin matrice pour se faire, toutes les cellules, même ne se divisant pas, peuvent l'effectuer (figure I.18) (Rothkamm et al., 2003). Cependant, ce dernier mécanisme fait perdre l'information nucléotidique car les bases endommagées sont excisées et ne sont pas remplacées, alors que dans la recombinaison homologue, les nucléotides sont remplacés à l'identique grâce à l'information issue de la chromatide sœur.

Si les dommages causés à l'ADN par les radiations sont irréparables, la cellule mourra. La protéine p53 régule le cycle cellulaire mais aussi l'apoptose, or cette protéine peut être phosphorylée par ATM en cas de cassure double brin. Lorsque p53 est phosphorylé, il n'est plus dégradé, s'accumule et agit alors comme facteur de transcription pour augmenter l'expression de gènes cibles pro-apoptotiques tels que BAX, PUMA ou NOXA (PMAIP1), amenant la cellule à effectuer l'apoptose comme indiqué à la figure I.19.

Dans beaucoup de cancers, le gène p53 est muté et n'exerce plus ses différents rôles. Cela a pour conséquence de diminuer l'efficacité des radiations ionisantes et donc la mort des cellules tumorales possédant la mutation.

En effet, il a été montré que la perte de fonction occasionnée par des mutations dans le gène p53 augmentait la radiorésistance des cellules. La mutation de p53 provoque une diminution de l'apoptose mais aussi une tolérance aux dommages à l'ADN. En effet, si p53 n'est plus actif, certains checkpoints du cycle cellulaire permettant d'arrêter la cellule en cas de dommage en vue de réparer l'ADN n'ont plus lieu. En conséquence, la cellule peut continuer son cycle cellulaire et proliférer tout en accumulant des mutations dans son génome, la rendant d'autant plus incontrôlable (Lee et Bernstein, 1993).

3.5) Les types de mort cellulaire induits après irradiation

Comme il fut mentionné dans les paragraphes précédents, lorsque les dommages à l'ADN sont trop importants (accumulation de cassures double brin par exemple), la cellule ne pourra pas réparer tous les dégâts et sera aiguillée vers la mort.

En radiobiologie, la mort cellulaire est définie comme la perte de la capacité proliférative d'une cellule. En effet, les cellules irradiées ne vont pas toutes mourir de la même façon ni au même moment, il est donc difficile de quantifier le taux de mort cellulaire après irradiation. De plus, les cellules qui ont été irradiées peuvent aussi réaliser quelques mitoses avant de mourir. C'est la raison pour laquelle les radiobiologistes utilisent des tests de clonogénicité qui établissent le nombre de cellules ayant encore une capacité proliférative 11 jours après l'irradiation.

Cette période peut sembler longue, néanmoins, si l'irradiation d'une tumeur en radiothérapie n'élimine ne fusse que 90% des cellules cancéreuses, les 10 % restant ayant gardé leur capacité proliférative pourront croître de nouveau, reformer une tumeur et la guérison ne serait jamais possible.

Plusieurs types de mort peuvent survenir dans les cellules composant une tumeur. Dès lors la quantification d'un type de mort cellulaire comme l'apoptose par exemple, ne reflètera pas le nombre exact de cellules mortes car le test ne prendra pas en compte les autres voies par lesquelles d'autres cellules auront pu mourir.



Figure I.20 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Dans la voie extrinsèque, la procaspase 8 est rapidement activée en caspase 8 suite à la liaison d'un facteur pro-apoptotique à un récepteur de mort. Par la suite la caspase 8 active la procaspase 3 en caspase 3 qui dégrade les composants cellulaires. En fonction du type cellulaire, la caspase 8 peut aussi activer Bid, une molécule pro-apoptotique pouvant influencer le relargage de cytochrome c par la mitochondrie et au final activer la voie intrinsèque. Dans la voie intrinsèque, un déséquilibre entre molécules pro-apoptotiques et anti-apoptotiques entraine le relargage de cytochrome c, qui en s'alliant à d'autres protéines telles que Apaf-1 et la pro-caspase 9 forme l'apoptosome. Cet apoptosome active ensuite les caspases effectrices comme la caspase 3. (MacFarlane, 2004)

En général, on considère qu'il existe 5 grandes voies de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose, l'autophagie, la sénescence et la mitose catastrophique. Chacune d'entre elles va être brièvement décrite dans les points suivants.

3.5.1) L'apoptose

L'apoptose, souvent dépeinte comme un suicide cellulaire, est un mécanisme primordial pour l'embryogenèse, la réponse immunitaire ainsi que l'homéostasie cellulaire. L'apoptose peut se déclencher de deux manières différentes, soit de manière extrinsèque suite à un stress externe, soit de manière intrinsèque initiée par un stress interne.

L'activation de l'apoptose de manière extrinsèque résulte de la liaison d'un ligand à des récepteurs de morts tels que FAS-R, TNF-R ou TRAIL-R (figure I.20). Lorsqu'un ligand se lie spécifiquement à un récepteur de mort, une cascade signalétique est enclenchée qui aboutit à l'activation d'enzymes. Ces enzymes à l'état inactif sont appelées pro-caspases ; lorsqu'elles sont actives elles sont nommées caspase. Les premières caspases à être activées sont les caspases 8 et 10 qui sont des caspases initiatrices. Ces caspases activent en cascade des pro-caspases effectrices.

Une fois les caspases effectrices activées (caspase 3 et 7), ces enzymes clivent différents composants de la cellule comme l'actine ou la lamine qui sont des protéines de structure importantes. Elles peuvent aussi cliver des protéines intervenant dans la réparation de l'ADN.

L'activation de la voie intrinsèque a, quant à elle, lieu lorsque l'équilibre fragile entre les molécules pro-apoptotiques (Bax, Bid, NOXA, PUMA) et les molécules anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl- X_L , Mcl1,) est rompu. En effet, en temps normal, Bcl-2 s'associe à Bax pour former des hétérodimères qui ne déclenchent aucun relargage de cytochrome c. Toutefois, lorsqu'il y a plus de Bax que de Bcl-2 suite à l'activation de p53 en réponse à une DDR, Bax sera en surnombre par rapport à Bcl-2 et en plus de s'associer avec ce dernier il formera aussi des homodimères Bax-Bax. Ce déséquilibre entre hétérodimères et homodimères permet le relargage de cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme.

Les molécules de cytochrome c s'associent à la protéine Apaf-1 et activent la pro-caspase 9 en caspase 9. L'association de ces 3 entités en plusieurs exemplaires forme l'apoptosome. Cet apoptosome peut activer par la suite les différentes caspases effectrices comme les caspases 3, 6 et 7 (MacFarlane et Williams, 2004).

Il faut aussi savoir que la sensibilité à déclencher l'apoptose après une irradiation varie en fonction du type cellulaire et de la présence ou non d'un p53 muté dans les cellules tumorales (Afshar et al., 2006).

3.5.2) La nécrose

Au contraire de l'apoptose, la nécrose est souvent considérée comme une mort « accidentelle ». Les causes à l'origine de la nécrose peuvent être multiples mais impliquent souvent un déséquilibre ionique (ions calcium par exemple).

On observe une perte de l'intégrité membranaire avec un relargage des composants cellulaires dans l'espace intercellulaire, ce qui provoque une réaction inflammatoire. Ce type de mort peut survenir après une irradiation, cependant, peu de choses sont connues quant aux mécanismes sous-jacents.

3.5.3) L'autophagie

L'autophagie peut être à la fois considérée comme un mécanisme de survie cellulaire mais aussi comme un mécanisme de mort cellulaire. Ce mécanisme permet en effet de réguler l'homéostasie cellulaire. Lors de différents stress externes ou internes, des voies de signalisation se mettent en place et aboutissent à la formation d'un autophagosome (vésicule à double membrane). L'origine de cet autophagosome n'est pas encore claire, mais on pense qu'il pourrait venir du réticulum endoplasmique voire du Golgi ou de la mitochondrie. Ces autophagosomes internalisent des organites ainsi que des protéines cytoplasmiques puis fusionnent avec des lysosomes. Leur contenu est dégradé par les enzymes lysosomales. Si ce processus est enclenché de façon excessive, la cellule se dégrade elle-même de l'intérieur (Ito et al., 2005). Comme pour toutes les autres formes de mort évoquées auparavant, la proportion de cellules effectuant l'autophagie varie en fonction du type cellulaire étudié.

3.5.4) La sénescence

La sénescence désigne la perte irréversible de la capacité de division d'une cellule. C'est un mécanisme normal de vieillissement qui est causé par le nombre de réplications qu'a subi la cellule lors de sa croissance. Cette sénescence est dite réplicative et est principalement due au raccourcissement des télomères. Cependant, il existe une autre forme de sénescence appelée sénescence prématurée. Ce type de sénescence est engendré par différents stress tels que des stress oxydatifs, l'activation d'oncogènes ainsi que par les Les sénescence radiations ionisantes. cellules en sont toujours métaboliquement actives mais ne peuvent plus participer à la croissance tumorale, c'est pour cela qu'en radiobiologie la sénescence peut être considérée comme une mort cellulaire.

Les voies par lesquelles les radiations ionisantes mènent à la sénescence sont encore peu connues. A l'heure actuelle, il apparaît que les médiateurs des checkpoints du cycle cellulaire qui sont activés lors d'une DDR (p53, les CDK, leurs inhibiteurs et les cyclines) jouent un rôle important dans la sénescence induite par des stress en bloquant de manière permanente les cellules en phase G0 (Sabin et Anderson, 2011). Encore une fois, la capacité des cellules cancéreuses à entrer en sénescence après une irradiation dépend de nombreux paramètres, notamment des paramètres génétiques, propres à chaque tumeur et rendant difficiles des comparaisons entre tumeurs, même celle d'un type identique.



Figure I.21 : Schéma des différents types de mort cellulaire se produisant après une irradiation. La mort peut survenir juste après la production des dommages à l'ADN et se faire via l'apoptose, l'autophagie, la nécrose ou la sénescence. Ces types de mort se déroulant avant la mitose sont qualifiés de pré-mitotiques et ne représentent qu'une faible partie de la mort cellulaire après irradiation. Les cellules ayant subi des dommages peuvent cependant entrer en mitose et subir une mitose catastrophique (parfois après quelques divisions préalables). Ce type de mort est donc dit post-mitotique et c'est le type de mort le plus courant après une irradiation. Une fois les cellules en mitose catastrophique, celles-ci peuvent mourir de la même façon que celles mourant avant la mitose. Enfin, certaines cellules peuvent lors de l'arrêt du cycle cellulaire, réparer leurs dommages à l'ADN de manière complète et continuer leur prolifération. (Basic Clinical Radiobiology, 2009).

3.5.5) La mitose catastrophique

Le terme de mitose catastrophique se rapporte au type de mort cellulaire résultant ou suivant une mitose prématurée ou anormale. En effet, après irradiation, les cellules présentent des dommages à l'ADN qui provoquent une DDR. La DDR entraine un arrêt du cycle cellulaire en vue de réparer les dégâts causés à l'ADN. Si ceux-ci ne sont pas réparables, la cellule pourra entrer dans une voie de mort cellulaire telles que celles décrites précédemment.

Cependant, si les acteurs des checkpoints du cycle cellulaire sont défectueux, comme dans certains cancers, ceux-ci ne vont plus bloquer les cellules en phase G2 afin de réparer l'ADN et la cellule pourra passer en phase M. Toutefois, étant donné les différents dommages chromosomiques (perte de morceaux de chromosomes, incapacité à répliquer l'ADN correctement et à effectuer une cytocinèse normale), la cellule ne pourra finir la mitose et formera une cellule géante multinucléée contenant de l'euchromatine et des micronuclei. Cela peut empêcher la cellule de se diviser à nouveau et la mitose catastrophique peut donc être considérée à juste titre comme une mort cellulaire en soi.

De plus, la mitose catastrophique peut finalement mener à un autre type de mort plus traditionnel comme la nécrose, l'apoptose ou l'autophagie après que la cellule soit devenue géante et multinucléée. Il faut donc faire la distinction entre la mort cellulaire causée par la mitose catastrophique et l'incapacité de la cellule à se diviser, de la mort cellulaire issue des dégâts primaires à l'ADN. Bien que la proportion de cellules subissant une mitose catastrophique après irradiation varie d'une tumeur à l'autre, il est en général admis que c'est la forme principale de mort cellulaire après irradiation, toute tumeur confondue (Chu et al., 2004 ; Vakifahmetoglu et al.,2008).

Les différents types de mort cités dans les points précédents sont tous susceptibles de se produire après une irradiation. A l'heure actuelle, la contribution de chaque mécanisme à la mort cellulaire après une irradiation n'est pas encore clairement définie.

Il faut savoir que plusieurs de ces mécanismes peuvent être activés dans une même cellule, et que celui qui causera la mort effective ne sera non pas celui qui aura été le plus sensible pour son activation mais bien celui qui provoquera la mort la plus rapide. C'est pourquoi à l'heure actuelle, la compréhension de la cause de la mort cellulaire après irradiation prédomine sur la compréhension des mécanismes effecteurs de cette mort.

En résumé, il apparaît donc qu'il y a deux grandes catégories de mort cellulaire : la première reprend les différentes morts se déclenchant avant la mitose, que l'on qualifie de mort pré-mitotique. La deuxième catégorie prend en considération les différents types de mort se produisant après la mitose, ces types de mort sont dès lors qualifiés de post-mitotiques (figure I.21).

Dans les tumeurs solides, le nombre de cellules mourant de manière pré-mitotique ne représente qu'une faible proportion par rapport au nombre total de cellules vouées à la mort après irradiation (Endlich et al., 2000).


Figure I.22 : Modèle de cross-talk entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales. (Kaneko et al., 2007)

3.6) Importance de la communication entre cellules tumorales et endothéliales dans le processus de radiorésistance

Il est important de comprendre qu'une tumeur n'est pas uniquement constituée de cellules tumorales mais bien d'une multitude de types cellulaires différents tels que des fibroblastes, des cellules du système immunitaire, des cellules endothéliales, etc... Une tumeur peut dès lors être considérée comme un tissu à part entière situé dans un microenvironnement particulier. En effet, lors de l'irradiation d'une tumeur, ce n'est pas uniquement les cellules tumorales qui sont irradiées, c'est aussi tout leur entourage. Or, les interactions entre les cellules tumorales et leur environnement peuvent influencer l'efficacité du traitement par radiothérapie.

Dès 1971, lorsque Folkman et son équipe découvrirent que la croissance tumorale était dépendante de l'angiogenèse, il fut émis l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de l'angiogenèse pouvait être un moyen de contrer le développement des tumeurs (Folkmann, 1971). Depuis, il a été mis en évidence l'importance de la vascularisation tumorale dans la réponse des cellules cancéreuses aux irradiations.

En 2003, il a été montré par Garcia-Barros et son équipe que la résistance de la vascularisation tumorale aux radiations pouvait augmenter la croissance tumorale et diminuer la radiosensibilité de la tumeur (Garcia-Barros et al., 2003).

Il a aussi été montré par Gorski et son équipe que les cellules tumorales irradiées pouvaient protéger la vascularisation environnante en secrétant des facteurs de croissance et des cytokines (Gorski et al., 1999). Ils ont en effet démontré que l'inhibition du VEGF sécrété par les cellules tumorales (via un anticorps anti-VEGF) permettait d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie en accentuant la mort des cellules tumorales et des cellules endothéliales faisant partie de leur vascularisation. Cependant, très peu de choses sont connues sur les signaux que les cellules endothéliales envoient aux cellules tumorales. Un modèle élaboré par Kaneko et son équipe peut être visualisé à la figure I.22 (Kaneko et al., 2007). Ils ont montré que les cellules endothéliales qui sont associées aux cellules tumorales d'un cancer épidermoïde présentaient une expression du gène Bcl-2 supérieure aux cellules contrôles. Cette augmentation de Bcl-2 pouvait, via une voie signalétique impliquant le facteur de transcription STAT-3, amener à la production de VEGF par les cellules endothéliales. Selon leur modèle, le VEGF pourrait se fixer sur des récepteurs à VEGF des cellules tumorales, activant la production de différentes chémokines telles que CXCL8 et CXCL1, qui sont des facteurs pro-angiogéniques. Il y aurait donc un mécanisme en forme de boucle menant à l'entretien de la croissance des cellules endothéliales et par la même occasion favorisant la croissance tumorale.

Bien que cette étude ne fût pas réalisée dans le cadre d'une irradiation des tumeurs, on peut supposer que le dialogue entre les deux types cellulaires n'est pas à sens unique, et que les cellules endothéliales irradiées produisent elles aussi des messagers importants pour la radiorésistance des cellules tumorales.

Il est donc primordial de comprendre les mécanismes de communication croisée entre ces deux types cellulaire en vue de tester l'efficacité de la combinaison de différents inhibiteurs des sécrétions paracrines tumorales et endothéliales avec la radiothérapie pour augmenter l'efficacité du traitement.

4) Objectifs

Comme il a déjà été mentionné dans le premier paragraphe de ce chapitre, le cancer est une maladie qui a pris une ampleur considérable dans notre société à partir de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle. Tous les jours de nouveaux cas sont diagnostiqués dans le monde entier.

Heureusement, la recherche sur le sujet ne cesse, elle aussi, de prendre de l'ampleur et nos connaissances sur cette maladie croissent de jour en jour. A l'heure actuelle, tout type de cancer confondu, un patient sur deux échappera à la mort. Cependant, cela dépend essentiellement du type de cancer et du stade auquel celui-ci se trouve lorsque le diagnostic est effectué.

Parmi les cancers les plus dévastateurs, c'est-à-dire, ceux présentant le taux de mortalité le plus élevé, on retrouve le cancer du poumon. Or, pour ce type de cancer, les traitements actuels ne sont pas encore en mesure de contrer de manière efficace la maladie. C'est pourquoi l'amélioration des techniques thérapeutiques est essentielle pour espérer un jour vaincre ce type de cancer.

C'est aussi la raison pour laquelle nous avons abordé le sujet de l'hadronthérapie dans ce travail. L'hadronthérapie se veut être la relève des techniques radiothérapeutiques actuelles qui utilisent des rayons X. En effet, cette technique permettant une distribution de dose plus précise limite l'irradiation inutile des tissus sains environnants, et ainsi les effets secondaires non désirés. De plus, l'hadronthérapie montre aussi une efficacité biologique relative plus élevée que celle des rayons X.

Le cumul de ces différents avantages nous a donc poussé à étudier les effets que pourrait avoir l'irradiation de cellules issues d'un adénocarcinome pulmonaire avec un faisceau de particules constitué de protons. Par ailleurs, la présence d'autres types cellulaires au sein des tumeurs, comme les cellules endothéliales par exemple, influence la sensibilité des cellules tumorales à la radiothérapie, généralement en la diminuant. il est donc essentiel d'en comprendre les mécanismes afin de pouvoir les cibler.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier l'influence d'une irradiation par protons à une dose proche de celle utilisée en radiothérapie conventionnelle sur la viabilité de cellules cancéreuses pulmonaires cultivées en monoculture ou en co-culture en présence de cellules endothéliales. Afin d'identifier d'éventuelles protéines impliquées dans un dialogue entre les deux types cellulaires, nous avons en parallèle effectué une analyse de l'expression de certaines gènes connus pour influencer la viabilité de l'un ou de l'autre type cellulaire. Le but à long terme de ce travail est l'identification de facteurs promouvant une radiorésistance de la tumeur en vue de développer des médicaments pouvant agir de manière à ce que ces facteurs ne puissent plus engendrer de radiorésistance des tumeurs.

En effet, l'identification de tels facteurs pourrait être importante pour la conception de stratégies thérapeutiques au sein desquelles serait proposée la prise de différents inhibiteurs de ces messagers pro-tumoraux en parallèle avec des sessions de radiothérapie afin d'accroître la radiosensibilité des tumeurs et donc plus globalement l'efficacité des traitements anti-cancéreux utilisant des radiations ionisantes.

II. MATERIEL ET METHODES



Figure II.1 : Photographie au microscope à contraste de phase des deux types cellulaires étudiés A. Les cellules endothéliales immortalisées (EAhy926) B. Les cellules tumorales issues d'un adénocarcinome pulmonaire (A549) (http://www.lgcstandards-atcc.org/Attachments/1753.jpg ; http://www.lgcstandards-atcc.org/Attachments/5354.jpg)

1) Culture cellulaire

Deux types cellulaires ont été utilisés durant la réalisation de ce mémoire, à savoir, des cellules A549 ainsi que des cellules EAhy926. Une photographie de ces deux types cellulaires est présentée à la figure II.1.

Les cellules tumorales A549 sont des cellules de l'épithélium basal et qui proviennent d'un adénocarcinome pulmonaire humain. Cette lignée cellulaire fut établie en 1972 par D.J. Giard et son équipe à partir d'une tumeur solide venant d'un homme de 58 ans (Giard al., 1973).

Ces cellules sont cultivées dans des boîtes de culture en polystyrène d'une superficie de 75cm^2 (T75, Costar, Corning, USA) dans du milieu MEM (Gibco, UK) contenant 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, UK). Entre deux repiquages, les cellules sont conservées dans un incubateur à 37° C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Elles sont repiquées tous les lundis (4 jours) et vendredis (3 jours). Le protocole de repiquage est le suivant :

Sous hotte à flux laminaire préalablement nettoyée à l'umonium³⁸ (Hukert's International, BE), le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées deux fois avec 5 ml de PBS stérile (Bio Whittaker, Lonza, Belgium). Par la suite, le PBS est décanté et 1,5 ml de Trypsine-EDTA (Gibco, UK) sont ajoutés pour détacher les cellules. Afin d'optimiser la trypsinisation, les cellules sont placées 2 min à 37°C dans une étuve sèche. Une fois les cellules détachées, 5 ml de milieu complet sont ajoutés afin d'inhiber l'activité de la trypsine. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un tube de 10 ml (Sterilin, UK) pour être centrifugée pendant 5 min à 1000 rpm. Après la centrifugation, le surnageant est décanté afin de ne garder que le culot de cellules qui est resuspendu dans 6 ml de milieu complet en semaine et dans 5 ml le week-end. Cette suspension est ensuite distribuée dans plusieurs T75 de sorte à obtenir environ 8 millions de cellules à confluence pour le prochain repiquage. Ensuite, 17 ml de milieu complet sont ajoutés (15 ml pour le week-end). Finalement, les boîtes sont replacées à l'incubateur jusqu'au prochain repiquage.

Les cellules endothéliales EAhy926 quant à elles sont le résultat d'une fusion entre des cellules A549 résistantes à la thioguanine, un agent cytostatique, et des cellules endothéliales humaines isolées à partir de la veine du cordon ombilical (cellules HUVEC). Cette fusion fut réalisée par C.J. Edgell et son équipe en 1983 (Edgell et al., 1983).

Entre deux repiquages, ces cellules sont conservées dans un incubateur à 37° C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Elles sont repiquées tous les lundis (4 jours) et vendredis (3 jours) et le milieu est changé tous les 2-3 jours.

Les cellules EAhy926 sont repiquées selon le protocole suivant :

Sous hotte à flux laminaire, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées deux fois avec 5 ml de PBS stérile (Bio Whittaker, Lonza, Belgium). Par la suite, le PBS est décanté et 1,5 ml de Trypsine-EDTA (Gibco, UK) sont ajoutés pour détacher les cellules. Afin d'optimiser le détachement, les cellules sont placées 2 min à 37°C dans une étuve sèche. Une fois les cellules détachées, 5 ml de milieu DMEM (ATCC, USA) sont ajoutés afin d'inhiber l'activité de la trypsine. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un tube de 10 ml (Sterilin, UK) pour être centrifugée pendant 5 min à 1000 rpm. Après la centrifugation, le surnageant est décanté afin de ne garder







Figure II.2 : A. schéma d'une chambre d'irradiation avec le couvercle en rouge et le fond en vert. Les cellules A549 sont placées dans le fond tandis que les cellules EAhy926 sont placées dans le couvercle. B. Photo d'une chambre d'irradiation fermée. C. Photo d'un couvercle de chambre recouvert de mylar. D. Photo d'un fond de chambre d'irradiation, sur la photo E le mylar attaché au fond est bien visible. F. Chambre humide constituée d'une boîte de Pétri en plastique contenant 1 ml d'eau stérile ainsi qu'un anneau de caoutchouc sur lequel peuvent reposer les fonds et couvercles des chambres. G. Photo d'une goutte de fibronectine dans le couvercle qui accueillera des cellules EAhy926. H. Photo d'une chambre d'irradiation séparée en deux parties placées dans des chambres humides et prête à être mise à l'incubateur pendant 6 heures afin que les cellules des gouttes adhèrent au mylar. I. Chambre ressortant de l'incubateur et refermée, la goutte composée de cellules EAhy926 tête vers le bas est bien visible. J. Orifice permettant le remplissage des chambres à la seringue. K. Photo montrant le rinçage d'une chambre avec du PBS juste après les 6 heures d'incubation.

que le culot de cellules qui est resuspendu dans 5 ml de milieu complet. Un échantillon de la suspension cellulaire est ensuite compté grâce à un compteur cellulaire (countess automated cell counter, Invitrogen, USA). La suspension est ensuite distribuée dans plusieurs T75 de sorte à obtenir un maximum de 7 millions de cellules à confluence pour le repiquage suivant. Par la suite, 15 ml de milieu complet sont ajoutés. Finalement, les boîtes sont replacées à l'incubateur jusqu'au prochain repiquage.

2) Repiquage en chambre d'irradiation

Afin d'irradier les cellules, il est nécessaire de les ensemencer dans un dispositif adaptable sur l'accélérateur de particules. Ce dispositif est appelé chambre d'irradiation.

Les chambres d'irradiation sont composées de deux parties en acier inoxydable, un fond et un couvercle (figure II.2 A-E). Ces deux parties sont recouvertes par un fin film transparent de polyéthylène téréphtalate d'une épaisseur de 3 microns (Mylar, GoodFellow, UK). Ce film bio-compatible sert de substrat d'attache pour les cellules et est collé sur les chambres à l'aide d'une colle époxy à deux composants (colle EP21LV, Masterbond, USA).

Premièrement, le mélange de colle est pesé de sorte qu'il soit composé de 3 parts du composant A pour une part du composant B. Une fois la colle constituée, chaque fond et chaque couvercle est enduit du mélange et placé sur le film de mylar. La totalité des fonds et couvercles est ensuite placée dans un four à une température de 150°C pendant une heure afin que la colle polymérise de manière optimale. Après ce temps, chaque partie de chambre est grattée avec un cutter pour enlever le surplus de colle et de film qu'il peut y avoir sur le pourtour de ces dernières car l'adaptateur qui accueille les chambre sur l'accélérateur a été conçu au millimètre près pour les recevoir, tout excédant de colle ou film sur le contour des chambres les empêche d'être montées sur l'adaptateur. Les couvercles et les fonds sont ensuite assemblés pour former la chambre proprement dite qui sera fermée à l'aide d'une clé spéciale. Les chambres sont ensuite stérilisées à l'autoclave afin d'éviter une contamination lors de l'ensemencement des cellules.

Les deux types cellulaires sont ensemencés dans les chambres d'irradiation 24 heures avant leur irradiation par le faisceau de protons. Le procédé de repiquage est assez semblable à celui expliqué dans le point précédent.

Sous hotte à flux laminaire, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées deux fois avec 5 ml de PBS stérile (Bio Whittaker, Lonza, Belgium). Par la suite, le PBS est décanté et 1,5 ml de Trypsine-EDTA (Gibco, UK) sont ajoutés pour détacher les cellules. Afin d'optimiser la trypsinisation, les cellules sont placées 2 min à 37°C dans une étuve sèche. Une fois les cellules détachées, 5 ml de milieu complet contenant 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine, Invitrogen, USA) sont ajoutés afin d'inhiber l'activité de la trypsine. Les antibiotiques sont ajoutés aux milieux utilisés dans les chambres d'irradiation qui sont plus enclines aux contaminations compte tenu de leurs nombreuses manipulations en dehors de la hotte tout au long de l'expérimentation.

La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un tube de 10 ml (Sterilin, UK) pour être centrifugée pendant 5 min à 1000 rpm. Après la centrifugation, le surnageant est décanté afin de ne garder que le culot de cellules qui est resuspendu dans du milieu CO₂-indépendant contenant 10% de sérum de veau fœtal ainsi que de la L-glutamine 0,5 mM (Sigma-Aldrich, USA) et 1% d'antibiotiques.

Les cellules EAhy926 sont resuspendues dans 8 ml de ce milieu CO₂-indépendant et les cellules A549 dans 2 ml de ce même milieu. Le nombre de cellules par millilitre est ensuite déterminé via un comptage en chambre de Neubauer.

Après le comptage, une goutte de 33 μ l contenant 100.000 cellules A549 est déposé sur le mylar du fond des chambres tandis qu'une goutte de même volume de cellules EAhy926 mais contenant seulement 50.000 cellules est déposée sur le mylar du couvercle. Le nombre de cellules choisi vise à respecter la proportion de cellules tumorales par rapport aux cellules endothéliales retrouvée dans les tumeurs in vivo. La taille de la goutte (33 μ l) a été calculée pour ne pas dépasser 1 cm², qui est la superficie sur laquelle le faisceau de protons reste homogène, c'est pourquoi il est important que les cellules soient bien centrées sur le mylar et ne s'étale pas sur une trop grande surface. De plus, si les gouttes étaient de plus grande superficie, les cellules risqueraient de sécher.

Une fois les gouttes déposées sur le mylar, les différentes parties de chambres sont mises dans des boites de Pétri contenant un peu d'eau stérile afin d'apporter une atmosphère humide locale pour éviter que la goutte ne sèche pendant l'incubation de 6 h à 37° C sous une atmosphère de 5% en CO₂ (figure II.2 F).

Après l'incubation, les chambres sont fermées et rincées avec 2 ml de PBS stérile introduit dans la chambre à l'aide d'une seringue stérile de 5 ml (Terumo, BE) (figure II.2 J-K).CE rinçage est destiné à éliminer les cellules n'ayant pas adhérer au mylar. Après, les chambres sont remplies avec 2 ml de milieu DMEM complet + antibiotiques. Elles sont ensuite placées à l'incubateur jusqu'au lendemain pour l'irradiation.

Il est à noter que suite à différents problèmes rencontrés lors de l'attachement des cellules EAhy926 au mylar, cette procédure de repiquage fût modifiée à partir du mois de septembre 2012. Dans le procédé final, une goutte de 15 μ l de fibronectine (Fibronectin bovine plasma protein, Gibco, UK) est déposée au centre du mylar recouvrant le couvercle des chambres (figure II.2 G). Après 20 minutes d'incubation à 37°C sous une atmosphère de 5% en CO₂, ces gouttes sont aspirées à la micropipette et les gouttes de 33 μ l de cellules EAhy926 sont directement déposées à l'endroit même où se trouvait les gouttes de fibronectine. Les chambres sont ensuite remises à l'incubateur pendant 6 h (figure II.2 H). Les cellules A549 n'ayant pas besoin de fibronectine pour favoriser leur adhérence, les gouttes sont toujours déposées selon l'ancien procédé. Après ce temps d'incubation, les chambres sont fermées (figure II.2 I) et rincées avec 2 ml de PBS stérile, puis remplies avec 2 ml de milieu DMEM complet + antibiotiques. Elles sont ensuite placées à l'incubateur jusqu'au lendemain pour l'irradiation.

Les différentes configurations de chambre testées lors des expérimentations sont reprises ci-dessous :

- A549 en monoculture irradiées (A549*)
- A549 en monoculture non irradiées (A549)
- EAhy926 en monoculture irradiées (EAhy926*)
- EAhy926 en monoculture non irradiées (EAhy926)
- Co-culture A549/EAhy926 non irradiées (A549/EAhy926)
- Co-culture A549/EAhy926 irradiées (A549*/EAhy926*)
- Co-culture A549/EAhy926 avec uniquement les A549 irradiées (A549*/EAhy926)
- Co-culture A549/EAhy926 avec uniquement les EAhy926 irradiées (A549/EAhy926*)



Figure II.3 A. Photo de la terminaison de la ligne de l'accélérateur de particules avec la fenêtre de sortie de forme carrée et transparente. Le support pour les chambres est placé sur la terminaison de ligne. B. Chambre d'irradiation contenant des cellules A549 en monoculture disposée verticalement sur le support et prête à être irradiée par le faisceau de protons.

24 h après l'ensemencement dans les chambres d'irradiation, un faisceau homogène de protons est formé grâce à un accélérateur de type Tandetron (High Voltage Engineering Europa, NL) installé dans le département de physique de la matière et du rayonnement. L'énergie de ce faisceau est de 1,7 MeV, le débit de dose est fixé à 1 Gy/min et le LET des protons est de 25 keV/µm. La dose testée est de 1,5 Gy.

Les détails relatifs à l'élaboration du faisceau de protons peuvent être consultés dans l'article de Wéra et al. (2011).

Avant l'irradiation, le milieu de chaque chambre est décanté. Les chambres sont ensuite ouvertes une à une et les cellules situées en dehors de la zone homogène d'irradiation sont enlevées à l'aide d'un coton tige stérile (CLASSIQSwabs, Copan, IT). Une fois cette étape réalisée, les chambres sont refermées et rincées avec 2 ml de PBS stérile. Après avoir décanté le PBS, 2 ml de milieu CO₂-indépendant complet + antibiotiques sont ajoutés dans la chambre. Finalement, toutes les chambres sont remises à l'incubateur en attendant leur tour pour l'irradiation.

Les chambres sont sorties une à une de l'incubateur puis placées verticalement sur un adaptateur devant la fenêtre de sortie de l'accélérateur (figure II.3 A-B). Ensuite, le faisceau est envoyé sur la chambre pendant 1 min 30 afin d'obtenir une dose totale de 1,5 Gy. Après ce délai, le faisceau est coupé et la chambre est replacée à l'incubateur en attendant la suite de l'expérimentation. Le faisceau de protons est calibré de sorte qu'il n'atteint pas le type cellulaire situé en face des cellules irradiées. De cette manière, il est possible d'irradier un seul type cellulaire sur les deux présents dans la chambre. Lorsque les deux types cellulaires d'une même chambre doivent être irradiés, il suffit d'irradier un côté de la chambre, la retourner, puis irradier l'autre côté. Après l'irradiation, les chambres sont replacées à l'incubateur.

3) Extraction de l'ARN total

Au temps voulu, les chambres sont sorties de l'incubateur. Les cellules sont rincées avec 2 ml de tampon sucrose-imidazole à 4°C (0,25 M de sucrose et 3 mM d'imidazole, Merck, DE). Ensuite, le tampon est décanté de la chambre et celle-ci est ouverte afin d'ajouter $350 \ \mu$ l de tampon de lyse (buffer RLT, RNeasy microkit, QIAgen, NL) sur les cellules pour récupérer leur contenu. Le film sur lequel se trouvent les cellules est ensuite gratté avec un racloir stérile (cell scraper, TPP, CH) pour récupérer efficacement tout le contenu cellulaire. Une fois rassemblé, l'ensemble de la suspension est transvasé dans une autre chambre de la même condition et la manipulation est répétée. Le rassemblement de plusieurs chambres (en général 4) permet d'obtenir une quantité suffisante d'ARN pour la rétro-transcription. Les lysats sont ensuite placés dans des microtubes (Eppendorf, NL) et stocké à -70 °C en attendant l'extraction d'ARN proprement dite.

Grâce au QIAcube et au RNeasy microkit (QIAgen, NL) l'extraction d'ARN est automatisée. Les lysats sont décongelés et placés dans un shaker (shaker n°2) selon un ordre défini. Ensuite, des adaptateurs pour la centrifugeuse, constituée d'une colonne et d'un tube de récupération pour l'ARN, sont placés dans la centrifugeuse de la machine en suivant le même ordre que les échantillons initiaux placés dans le shaker. Des tips de 200 et 1000 μ l spécialement conçus pour cette machine sont ensuite placés dans des endroits prévus à cet effet. Finalement, un rack contenant de l'eau RNase-free, de l'éthanol 70 % et 80 % (Merck, DE) ainsi que des tampons RW1 et RPE (QIAgen, NL) sont placés dans la machine. Une fois toute cette procédure terminée, la machine est programmée et l'extraction commence. Le volume d'élution

est fixé à 13 μ l. L'extraction dure plus ou moins 40 min, après ce temps, les tubes contenant l'ARN sont récupérés et placés à -70 °C en attendant la détermination de la concentration exacte en ARN des échantillons.

La concentration en ARN de chaque échantillon est déterminée grâce à un spectrophotomètre (Nanodrop 1000, Thermo Fischer scientific, USA). Différentes absorbances sont mesurées, la première se fait à 260 nm et détermine la concentration en ARN. Deux autres mesures d'absorbance sont ensuite réalisées à 280 et 230 nm afin de déterminer la pureté de cet ARN. En effet, un rapport de densité optique 260/280 inférieur à 1,5 signifie que l'échantillon contient une trop grande quantité de protéines. De plus, un rapport de densité optique 260/230 inférieur à 2 signifie que l'échantillon présente une concentration en sels trop élevée. Avant chaque mesure au spectrophotomètre, les échantillons sont vortexés et spinnés. La zone de charge est nettoyée à l'eau RNAse free entre chaque mesure.

Lorsque la concentration en sels au sein de certains échantillons est trop élevée, il est nécessaire d'effectuer une procédure de re-précipitation de l'ARN. Premièrement, le volume des échantillons va être augmenté avec de l'eau RNAse free afin de faciliter la précipitation. Ensuite 0,1 volume d'acétate de sodium (2 M, pH 4, Merck, DE) est ajouté. Les échantillons sont vortexés et spinnés, puis 1 volume d'isopropanol (Merck, DE) leur est ajouté, le tout est suivi d'un mélange par inversion. Les échantillons sont ensuite placés une nuit à -20 °C. Après cette incubation, les échantillons sont centrifugés 15 min à 12.000 rpm à 4°C. Une fois la centrifugation terminée, 1 ml d'éthanol 75 % froid est ajouté à chaque échantillon et le tout est homogénéisé à la micropipette. Il s'en suit une deuxième centrifugation de 15 min à 12.000 rpm à 4 °C. Après cette dernière centrifugation, le surnageant est décanté afin de ne plus retrouver d'éthanol dans les échantillons. Le culot est ensuite resupendu dans 12 μ l d'eau RNAse free. Enfin, les échantillons peuvent être dosés au spectrophotomètre et stockés à -70 °C.

4) Rétrotranscription de l'ARN en ADNc

La rétrotranscription permet de convertir l'ARN en ADN dans le but d'effectuer une PCR par la suite. La rétrotranscription s'effectue au moyen du kit First strand cDNA synthesis (Roche, CH). Premièrement, il faut mélanger 1 μ l d'oligonucléotides T (oligo dT) avec un minimum de 500 ng d'ARN et compléter le mélange avec de l'eau RNAse free pour atteindre un volume total de 12,5 μ l. Par la suite les échantillons sont placés 10 min à 65 °C en vue de réduire les éventuelles structures secondaires de l'ARN. Une fois les 20 min écoulées, les échantillons sont directement replacés sur glace et le mix de réaction leur est ajouté, ce dernier contient 4 μ l de buffer RT (5x), 0,5 μ l de rétro-transcriptase, 0,5 μ l d'inhibiteur de RNAses et 2 μ l d'un mix de désoxynucléotides. Une fois que ces 7 μ l ont été ajoutés aux échantillons, ceux-ci sont incubés 30 min à 55 °C, puis spinnés avant d'être placé 5 min à 85 °C. Finalement, les tubes sont replacés sur glace, vortexés et spinnés avant d'être congelés à -20 °C.



Figure II.4 Exemple d'organisation type d'une plaque 96 puits pour effectuer une PCR. Rappel des différentes conditions :

- A549 en monoculture irradiées (A549*).A549 en monoculture non irradiées (A549)
- EAhy926 en monoculture irradiées (EAhy926*)
- EAhy926 en monoculture non irradiées (EAhy926)
- Co-culture A549/EAhy926 non irradiées (A549/EAhy926)
- Co-culture A549/EAhy926 irradiées (A549*/EAhy926*)

- Co-culture A549/EAhy926 avec uniquement les A549 irradiées (A549*/EAhy926)

- Co-culture A549/EAhy926 avec uniquement les EAhy926 irradiées (A549/EAhy926*)

Pour les co-cultures, le type cellulaire testé est indiqué en rouge entre parenthèses. Les puits de la Ligne H sont les blancs.

5) Analyse de l'expression de gènes (PCR en temps réel)

La PCR en temps réel permet de déterminer le niveau d'expression de différents gènes d'intérêt.

Deux gènes sont testés par plaque 96 puits. Le gène de référence utilisé est GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Chaque échantillon est testé en double et des blancs sont réalisés pour chaque gène, ces puits contiennent le mix de réaction mais pas d'ADNc. Le schéma d'une plaque est présenté à la figure II.4.

Premièrement, afin d'avoir assez de matériel pour étudier plusieurs gènes, l'ADNc est dilué 20 fois. Ensuite, 5 μ l de l'ADNc dilué sont placés dans chacun des puits d'une plaque 96 puits (Applied Biosystem, USA). Au préalable, 20 μ l d'un mix de réaction auront été ajoutés dans chaque puits. Ce mix est composé de 12,5 μ l de SYBR green (Roche, CH), 2,5 μ l d'eau distillée et 2,5 μ l d'amorce reverse ainsi que 2,5 μ l d'amorce forward. La liste des différentes amorces utilisées est présente dans l'annexe 1.

La plaque ainsi remplie est recouverte d'un film protecteur et est centrifugée 1 min à 600 rpm afin de faire chuter les différentes solutions dans le fond des puits. La plaque est ensuite placée dans la machine (7900HT Fast real-time PCR, Applied Biosystem, USA) et le programme est lancé. La quantité relative en ARNm est ensuite analysée grâce à la méthode des Δ Ct. Le Ct (Cycle Threshold ou seuil de cycle) est le cycle d'amplification dans lequel il y a la première détection significative de fluorescence. Le Ct du gène de référence ne change pas entre les différentes conditions et l'abondance de l'ARNm du gène d'intérêt sera inversement proportionnelle à la valeur du Ct.

Afin de déterminer s'il y a induction ou répression de l'expression du gène étudié, il faut donc soustraire le Ct du gène de référence au Ct du gène étudié. Après, il est nécessaire de déterminer le $\Delta\Delta$ Ct qui correspond à la soustraction entre le Δ Ct du gène dans une condition et le Δ Ct de ce même gène dans la condition contrôle. Enfin, il suffit de mettre le terme $-\Delta\Delta$ Ct en exposant du chiffre 2 pour déterminer s'il y a une induction ou une répression de l'expression du gène par rapport à la condition contrôle. Les résultats sont ainsi exprimés en « fold change ».

6) Evaluation de la capacité de prolifération cellulaire (test de clonogénicité)

Le test de clonogénicité est une technique servant à déterminer la capacité de prolifération des cellules après une expérimentation (ici une irradiation) et ce dans les différentes conditions de culture mise en place.

Ce test se déroule comme suit :

24 h après l'irradiation, les chambres sont rincées deux fois avec 2 ml de PBS. Ensuite, 300 μ l de trypsine-EDTA sont ajoutés sur les cellules et ces dernières sont placées 2 min dans l'incubateur à 37 °C (5 % CO₂). Une fois que les cellules sont détachées, celles-ci sont récupérées dans des tubes de 15 ml (Corning, USA) et 500 μ l de milieu DMEM complet + antibiotiques sont ajoutés pour inhiber la trypsine. Les chambres sont ensuite rincées deux fois avec 500 μ l de ce même milieu pour collecter toutes les cellules et puis ces cellules sont centrifugées 5 min à 1000 rpm. Le culot est ensuite resuspendu dans 500 μ l de milieu CO₂-indépendant complet + antibiotiques et les cellules sont comptées à l'aide du compteur cellulaire Moxi Z (Orflo, USA) afin d'ensemencer les cellules de manière précise dans des plaques 6 puits (Corning, USA)



Figure II.5A Schéma des plaques 6 puits utilisé lors des tests de clonogénicité. La plaque de gauche présente les densités cellulaires utilisées pour l'ensemencement des cellules A549 lorsque ce type cellulaire n'est pas irradié tandis que la plaque de droite indique les densités ensemencées lorsque les cellules A549 sont irradiées. Chaque densité est réalisée en triplicats et deux plaques 6 puits sont ensemencées pour une même condition de culture.



Figure II.5B Schéma des plaques 6 puits utilisé lors des tests de clonogénicité. La plaque de gauche présente les densités cellulaires utilisées pour l'ensemencement des cellules EAhy926 lorsque ce type cellulaire n'est pas irradié tandis que la plaque de droite indique les densités ensemencées lorsque les cellules EAhy926 sont irradiées. Chaque densité est réalisée en triplicats et deux plaques 6 puits sont ensemencées pour une même condition de culture.



Figure II.6 : Photographie d'une plaque 6 puits après coloration au cristal violet 11 jours après irradiation. Deux densités différentes ont été utilisées pour ensemencer les cellules A549. La première rangée de puits a été ensemencée à raison de 400 cellules par puits. La seconde rangée a été ensemencée à 600 cellules par puits.

contenant chacun 3 ml de milieu DMEM. Les différentes densités d'ensemencement en fonction des conditions sont représentées à la figure II.5. Etant donné que les cellules EAhy926 ne peuvent pas croître efficacement lorsqu'elles sont ensemencées à basse densité, elles sont ensemencées dans un milieu dit « conditionné » composé à 50 % de milieu DMEM complet et à 50 % de milieu DMEM récupéré lors de la culture de ces cellules et qui est centrifugé afin de ne récupérer que le surnageant qui contient différents facteurs sécrétés par ces cellules.

6 jours plus tard, le milieu est renouvelé et 11 jours après l'ensemencement les cellules sont colorées au cristal violet ($C_{25}H_{30}N_3Cl$, Janssen Chimica, BE). 800 µl de cristal violet sont placé dans chaque puits de la plaque. La solution de cristal violet est composée d'un gramme de cristal violet pour 500 ml d'eau distillée + éthanol 2%.

Après une minute d'incubation, le cristal violet est décanté et les colonies de cellules sont rincées deux fois avec 3 ml d'eau distillée. Finalement, les plaques 6 puits sont laissées sécher pendant minimum 24 h. Une fois que les plaques sont sèches, les colonies de plus de 50 cellules (provenant d'une seule cellule de départ) sont comptées. Un exemple de plaque 6 puits se trouve à la figure II.6.

Il se peut parfois qu'en raison du faible nombre de cellules comptées, l'ensemencement ne soit pas très précis. C'est pourquoi dans le but de minimiser cet effet, deux plaque 6 puits sont spécialement dédiées à compter le nombre exact de cellules ensemencé (un puits par condition). 2 heures après l'ensemencement des différentes plaques, les « plaques de comptage » sont rincées avec 3 ml de PBS non stérile puis les cellules sont fixées pendant 10 min grâce à 800μ 1 de paraformaldéhyde 4 % (Merck, DE). Par la suite, les cellules présentent dans les puits seront comptées afin de normaliser la quantité réelle de cellules ensemencées initialement dans toutes les plaques 6 puits. Une fois ces données récoltées, le plating efficiency peut être calculé. Ce plating efficiency correspond au nombre de colonies de plus de 50 cellules divisé par le nombre initial de cellules ensemencées. A partir de cela, il est possible de calculer le pourcentage de survie des cellules qui ont gardé leur capacité de prolifération après irradiation et ce dans les différentes conditions testées.

7) Analyse du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire s'effectue à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium (Sigma-Aldrich, USA) révélé par une analyse au cytomètre de flux.

8 h après l'irradiation les chambres sont rincées une fois avec 2 ml de PBS à 4°C. 500 μ l de trypsine-EDTA sont ensuite ajoutés pour détacher les cellules. Les chambres sont placées 2 min à 37 °C afin de favoriser le détachement des cellules. Une fois détachées, les cellules sont récupérées dans des tubes de 15 ml (Corning, USA) contenant 500 μ l de milieu DMEM complet + antibiotiques. Par la suite, les chambres sont rincées deux fois avec 500 μ l de milieu pour récolter un maximum de cellules. Une première centrifugation est réalisée durant 5 min à 1300 rpm à 4 °C. Le surnageant est décanté et le culot est rincé avec 1 ml de PBS à 4°C. Une deuxième centrifugation est alors effectuée avec les mêmes paramètres que la précédente. Le culot est ensuite resuspendu dans 300 μ l de PBS froid auxquels sont ajoutés 700 μ l d'éthanol goutte à goutte tout en vortexant. Les échantillons sont ensuite incubés minimum 1 h à -20 °C. Les échantillons peuvent néanmoins rester 72 h à -20 °C. Après l'incubation, une première centrifugation de 10 min à 1800 rpm à 10°C est réalisée. Le culot est ensuite resupendu dans 1 ml de PBS contenant 10 % de sérum, le tout étant à une température de 4 °C. Cette procédure est répétée une deuxième fois.

Ensuite une troisième centrifugation à 1800 rpm et 10 °C est réalisée. Le culot issu de cette dernière centrifugation est resuspendu dans 100 μ 1 de PBS + 0,1 % tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) contenant 50 μ g/ml de RNAse A (ICN biomedicals, USA). Par la suite, les échantillons sont placés 30 min à 37 °C.

Après cette incubation, 800 μ l de PBS contenant 20 μ g/ml d'iodure de propidium à 4 °C sont ajoutés à chaque échantillon. Le tout incube 10 min à 4 °C juste avant la mesure au cytomètre de flux (FACScalibur, BD Biosciences, USA).

Avant la mesure au cytomètre de flux, les échantillons sont transvasés dans des tubes de 5 ml prévu pour un usage au FACS (5 ml round-bottom tubes, BD Biosciences, USA). Avant de placer les échantillons dans le FACS, ceux-ci sont vortexés. Les analyses sont réalisées avec un laser bleu d'une longueur d'onde d'émission de 488 nm sur le canal FL-3. La taille des cellules est aussi mesurée grâce au forward scatter. Le nombre d'évènements comptés est de 20000.

III. RESULTATS



Figure III.1 : Fraction de survie des cellules A549 après une irradiation de 1,5 Gy par un faisceau de protons ayant un LET de 25 keV/µm. Co-c signifie que les cellules mentionnées sont en co-culture. Le symbole « * » placé dans la dénomination des conditions représente les types cellulaires irradiés. Le contrôle (cellules A549 non-irradiées en monoculture) est fixé à 1 (100% de survie cellulaire). Les différentes conditions sont normalisées par rapport aux cellules A549 non-irradiées en monoculture. Les résultats ont été analysés par un test de type t Student.

NS = Non Significatif, * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001.

1) Evaluation de la capacité de prolifération des cellules A549 et EAhy926 après irradiation par un faisceau de protons

Comme Gorski et son équipe l'ont montré, les cellules tumorales irradiées peuvent sécréter différents facteurs signalétiques, notamment des facteurs angiogéniques, dans le but de protéger la vascularisation tumorale qui les entoure (Gorski et al., 1999). De plus, Kaneko et son équipe ont montré que les cellules endothéliales pouvaient elles aussi sécréter des facteurs ayant une influence sur la survie tumorale (Kaneko et al., 2007). Il existe donc un dialogue entre ces deux types cellulaire. Cependant, ces communications et les effets que peut avoir une irradiation sur celles-ci ne sont pas encore bien connus. Or, selon les différentes études citées précédemment, ce dialogue serait à la base du processus de radiorésistance de certaines tumeurs.

C'est pourquoi il est intéressant d'étudier quels sont les effets d'une irradiation par un faisceau de protons sur la capacité proliférative de ces deux types cellulaires dans différentes conditions de culture et surtout en co-culture. Pour ce faire, des tests de clonogénicité ont été réalisés. Ces tests consistent en l'ensemencement des cellules en plaque 6 puits 24 heures après l'irradiation. Après 11 jours d'incubation, les cellules issues des différentes conditions de culture sont colorées avec du cristal violet afin de visualiser plus facilement les colonies cellulaires. Par la suite, les colonies de plus de 50 cellules sont comptées et ce nombre de colonies est comparé à la condition contrôle. Cela permet donc d'étudier l'effet des différentes conditions testées sur la capacité qu'ont les cellules de proliférer après irradiation. Afin d'obtenir des résultats analysables statistiquement; trois expérimentations indépendantes ont été réalisées.

La figure III.1 représente la fraction de survie des cellules A549 onze jours après irradiation. On observe qu'après irradiation, la fraction de survie des cellules A549 en monoculture diminue de manière significative (63 %). Ce premier résultat montre la capacité des radiations ionisantes à endommager les cellules et à provoquer leur mort, et ce pour plus de la moitié de la population cellulaire.

On remarque aussi que la simple mise en co-culture des deux types cellulaires semble augmenter la prolifération cellulaire (112%). Cependant, cette augmentation de prolifération n'est pas statistiquement significative par rapport aux cellules A549 cultivées en monoculture.

Lorsque les deux types cellulaires en co-culture sont irradiés, on constate une diminution de 51 % de la fraction de survie des cellules A549 par rapport aux mêmes cellules en monoculture. Toutefois, le taux de survie des cellules A549 dans cette condition n'est pas significativement différent de celui obtenu pour les cellules A549 irradiées en monoculture.

Dans la condition où les cellules A549 sont irradiées mais où les cellules endothéliales ne le sont pas, la fraction de survie des cellules A549 est de 48 %. Ce résultat ne diffère cependant pas significativement dans les cellules A549 irradiées en monoculture, ni dans les cellules A549 irradiées cultivées en présence de cellules EAhy926 irradiées.



Figure III.2 : Fraction de survie des cellules A549 après une irradiation de 1 Gy par un faisceau de particules alpha. Les monocultures sont représentées en hachuré et les co-cultures en colonnes pleines. Le contrôle (cellules A549 non-irradiées en monoculture) est fixé à 1 (100% de survie cellulaire). Les différentes conditions sont normalisées par rapport aux cellules A549 non-irradiées en monoculture. Résultats issus de 3 expérimentations indépendantes réalisées par Hélène Riquier. Les résultats ont été analysés par une ANOVA unidirectionnelle. Pour les comparaisons avec le contrôle monoculture : \$ p<0,001. Pour les comparaisons avec le contrôle co-culture : ### p<0,001. ns = non significatif.



Figure III.3 : Fraction de survie des cellules EAhy926 après une irradiation de 1,5 Gy par un faisceau de protons ayant un LET de 25 keV/µm. Co-c signifie que les cellules mentionnées sont en co-culture. Le symbole «*» représente les types cellulaires irradiés. Le contrôle (cellules EAhy926 non-irradiées en monoculture) est fixé à 1 (100% de survie cellulaire). Les différentes conditions sont normalisées par rapport aux cellules EAhy926 non-irradiées en monoculture. Résultats issus de deux expérimentations indépendantes.



Figure III.4 : Fraction de survie des cellules EAhy926 après une irradiation de 1 Gy par un faisceau de particules alpha. Les mono cultures sont représentées en hachuré et les co-cultures en colonnes pleines. Le contrôle (cellules EAhy926 non-irradiées en monoculture) est fixé à 1 (100% de survie cellulaire). Les différentes conditions sont normalisées par rapport aux cellules EAhy926 non-irradiées en monoculture. Résultats issus de 3 expérimentations indépendantes réalisées par Hélène Riquier. Les résultats ont été analysés par une ANOVA unidirectionelle. Pour les comparaisons avec le contrôle monoculture : \$\$\$ p<0,001. Pour les comparaisons avec le contrôle co-culture : ### p<0,001. ns = non significatif.

Enfin, dans les cellules A549 non-irradiées cultivées en présence de cellules EAhy926 irradiées, la survie cellulaire des cellules A549 est de 94 %. Ce résultat ne diffère donc pas des autres conditions dans lesquelles ces cellules ne sont pas irradiées. L'irradiation des cellules endothéliales n'augmente pas, ni ne diminue de manière significative la prolifération des cellules A549.

En conclusion, la fraction de survie des cellules A549 diminue fortement lorsque ces cellules sont irradiées et ce peu importe les conditions de culture testées. La présence des cellules endothéliales ne semble donc pas influencer significativement la fraction de survie des cellules A549. A noter que des résultats identiques ont été mis en évidence lors de la thèse d'Hélène Riquier (Figure III.2) lorsque les cellules étaient irradiées avec un faisceau de particules alpha au lieu d'un faisceau de protons. L'unique différence entre ces deux résultats réside dans le pourcentage de fraction de survie qui, pour les particules alpha, est toujours inférieur à celui obtenu avec un faisceau de protons pour des doses équivalentes. Il semblerait donc que cette différence soit due à la nature des particules composant le faisceau utilisé pour irradier les cellules.

La figure III.3 représente la fraction de survie des cellules EAhy926 onze jours après irradiation. On observe qu'après irradiation, la fraction de survie de ces cellules en monoculture diminue pour atteindre 29 %. Les radiations ionisantes ont donc tué (d'un point de vue radiobiologique) 70% de ces cellules.

Lorsque les cellules EAhy926 sont mises en co-culture avec des cellules A549, leur fraction de survie diminue de 18 %. Bien que des tests statistiques ne puissent être menés puisque seulement deux expériences indépendantes ont pu être réalisées sur les cellules EAhy926, les résultats suggèrent que la fraction de survie en co-culture et en monoculture est semblable.

La fraction de survie des cellules EAhy926 irradiées en présence de cellules A549 elles aussi irradiées est de 26 % et ne diffère donc pas fondamentalement de la fraction de survie de ces mêmes cellules irradiées en monoculture.

Lorsque les cellules EAhy926 non-irradiées se situent en face de cellules A549 irradiées, la fraction de survie des cellules EAhy926 est de 95 %, ce qui peut être qualifié d'identique au contrôle (cellules EAhy926 non-irradiées en monoculture).

Enfin, la fraction de survie lorsque les cellules EAhy926 sont irradiées face à des cellules A549 non-irradiées est de 29 %. Cette fraction de survie est donc quasiment identique à la fraction de survie de ces mêmes cellules irradiées en monoculture. En conclusion, la fraction de survie des cellules EAhy926 diminue fortement lorsque ces cellules sont irradiées et ce peu importe les conditions de culture testées. La présence des cellules A549 ne semble donc pas influencer la fraction de survie des cellules alpha concordent avec ces résultats préliminaires réalisés avec un faisceau de particules alpha concordent avec ces résultats (figure III.4). L'unique différence réside encore une fois dans le pourcentage de fraction de survie qui est à nouveau inférieur à celui obtenu avec un faisceau de particules alpha. Il semblerait donc que cette différence soit due à la nature des particules composant le faisceau utilisé pour irradier les cellules.



Figure III.5: Résultats des analyses obtenues en cytomètrie de flux pour des cellules A549 irradiées avec un faisceau de particules alpha à une dose de 1 Gy. L'ADN est marqué à l'iodure de propidium. L'analyse a été réalisée 24h après l'irradiation En abscisse se trouve la quantité relative en ADN. En ordonnée le nombre de cellules. (Résultats réalisés par Hélène Riquier)



Figure III.6: Résultats obtenus lors des analyses en cytomètrie de flux pour des cellules A549 dans les différentes conditions de culture. La dose de protons testée est de 1,5 Gy. L'ADN est marqué à l'iodure de propidium. L'analyse a été réalisée 24 h après l'irradiation. En abscisse se trouve la quantité relative en ADN. En ordonnée le nombre de cellules.

	Sub-G1	G1	S	G2
A549	9.4%	26.3%	35.3%	12.2%
A549*	10.4%	34.6%	30.5%	15.2%
Co-c A549/EA	18.7%	37.3%	30.5%	8.1%
Co-c A549*/EA*	20.5%	36.4%	25.4%	10.0%
Co-c A549*/EA	11.7%	42.0%	27.8%	12.5%
Co-c A549/EA*	6.4%	41.3%	32.6%	11.2%

Tableau III.1 : Pourcentage des cellules A549 dans les différentes phases du cycle cellulaire 24 heures après irradiation par un faisceau de protons. n=1.


Figure III.7: Résultats obtenus lors des analyses en cytomètrie de flux pour des cellules EAhy926 dans les différentes conditions de culture. La dose de protons testée est de 1,5 Gy. L'ADN est marqué à l'iodure de propidium. L'analyse a été réalisée 24 h après l'irradiation. En abscisse se trouve la quantité relative en ADN. En ordonnée le nombre de cellules.

	Sub-G1	G1	S	G2
EA	6.8%	62.8%	18.4%	10.7%
EA*	13.0%	61.0%	14.8%	10.2%
Co-c A549/EA	4.6%	61.4%	20.5%	11.7%
Co-c A549*/EA*	11.1%	60.4%	16.7%	9.3%
Со-с А549*/ЕА	7.4%	59.0%	20.7%	9.7%
Co-c A549/EA*	4.5%	65.6%	15.2%	13.6%

Tableau III.2 : Pourcentage des cellules EAhy926 dans les différentes phases du cycle cellulaire 24 heures après irradiation par un faisceau de protons. n=1.





Figure III.8 : Résultats obtenus lors des analyses en cytométrie de flux pour des cellules A549 en monoculture à différents temps après l'irradiation à l'aide d'un faisceau de protons. L'ADN est marqué à l'iodure de propidium. Les doses et temps testés sont indiqués sur chaque graphique. En abscisse se trouve la quantité relative en ADN. En ordonnée le nombre de cellules.

2) Analyse du cycle cellulaire après irradiation par un faisceau de protons

Après une irradiation, la DDR engendre un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M afin de permettre la réparation de l'ADN. Cet arrêt évite d'effectuer une cytocinèse avec un contenu en ADN endommagé qui pourrait rendre non viables les cellules filles.

Afin d'étudier si l'irradiation par protons engendre cet arrêt dans chacun des deux types cellulaires envisagés et si la présence de l'autre type cellulaire influence cet arrêt, des analyses par cytométrie de flux ont été réalisées. Pour ce faire, l'ADN des cellules est marqué à l'iodure de propidium.

Des résultats antérieurs ont déjà été obtenus dans notre équipe pour des co-cultures de cellules EAhy926 et de cellules A549, irradiées par un faisceau de particules alpha.

Ces résultats montraient un arrêt des cellules A549 en phase G2/M et ce 24 heures après l'irradiation, peu importe la condition testée (figure III.5).

Au vu des ces résultats, la durée de 24 heures fut retenue pour la première expérience concernant l'analyse du cycle cellulaire sur les mono et co-cultures après irradiation par un faisceau de protons. Cependant, aucun pic en phase G2/M n'est observé lorsque les cellules A549 sont irradiées et ce non seulement en monoculture mais aussi dans les différentes conditions de co-culture (figure III.6). Les pourcentages de cellules A549 dans les différentes phases du cycle cellulaire pour cette expérimentation sont repris dans le tableau III.1.

Cette expérience a été aussi réalisée pour les cellules EAhy926 sans qu'aucun arrêt en phase G2/M n'ait été mis en évidence 24h après irradiation avec un faisceau de particules alpha.

En réalisant cette même expérimentation à l'aide d'un faisceau de protons, les mêmes observations furent réalisées. L'arrêt en phase G2/M des cellules endothéliales n'est donc pas visible 24h après irradiation par un faisceau de protons et ce non seulement en monoculture, mais aussi en co-culture (figure III.7). Les pourcentages de cellules EAhy926 dans les différentes phases du cycle cellulaire pour cette expérimentation sont repris dans le tableau III.2.

Afin de trouver l'intervalle de temps nécessaire pour que les cellules A549 s'arrêtent en phase G2/M, une cinétique a été réalisée à différents temps après irradiation (figure III.8). En effet, l'hypothèse la plus plausible pour expliquer l'absence d'arrêt des cellules en phase G2/M 24 heures après l'irradiation, est que ce temps était trop long et que l'arrêt a sans doute eu lieu plus tôt, ce qui explique pourquoi après 24 heures aucun arrêt n'était constaté, les cellules ayant probablement déjà repris leur cycle cellulaire normal.

On observe que le temps de 8 h après l'irradiation présente la plus grande proportion de cellules A549 en phase G2/M. l'hypothèse de départ était donc juste, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M des cellules A549 irradiées se produit plus tôt, à savoir 8 heures. A 8 heures, la proportion de cellules en phase G2 est de 29,4%. Or a 24 h, cette proportion chute à 14 %, soit un taux de cellules en phase G2/M proche de la



Figure III.9: Résultats obtenus lors des analyses en cytométrie de flux pour des cellules A549 dans les différentes conditions de culture. La dose de protons testée est de 1,5 Gy. L'ADN est marqué à l'iodure de propidium. L'analyse a été réalisée 8 h après l'irradiation. En abscisse se trouve la quantité relative en ADN. En ordonnée le nombre de cellules.

	Sub-G1	G1	S	G2/M
A549	4,5%	49,1%	31,9%	12,8%
A549*	1,7%	31.7%	29,5%	32,1%
<u>co-c</u> A549/EA	5,6%	51,2%	29,7%	11,6%
<u>co-c</u> A549*/EA*	1,5%	37,0%	25,7%	32,1%
<u>co-c</u> A549*/EA	2,1%	38,0%	32,0%	24,9%
<u>co-c</u> A549/EA*	1,8%	49,9%	32,4%	13,0%

Tableau III.3 : Pourcentage des cellules A549 dans les différentes phases du cycle cellulaire 8 heures après irradiation par un faisceau de protons. n=1.



Figure III.10 : Résultats obtenus lors des analyses en cytométrie de flux pour des cellules A549 dans les différentes conditions de culture. La dose de protons testée est de 1,5 Gy. L'ADN est marqué à l'iodure de propidium. L'analyse a été réalisée 8 h après l'irradiation. En abscisse se trouve la quantité relative en ADN. En ordonnée le nombre de cellules.

	Sub-G1	G1	S	G2/M
EA	2,9%	69,6%	17,1%	10,7%
EA*	3,7%	62,8%	17,1%	15,7%
<u>co-c</u> A549/EA	3,0%	68,8%	23,3%	9,1%
<u>co-c</u> A549*/EA*	2,2%	57,3%	22,1%	17,3%
<u>co-c</u> A549*/EA	1,7%	63,0%	21,7%	12,5%
<u>co-c</u> A549/EA*	1,8%	57,5%	22,9%	16,3%

Tableau III.4 : Pourcentage des cellules EAhy926 dans les différentes phases du cycle cellulaire 8 heures après irradiation par un faisceau de protons. n=1.

valeur obtenue pour les cellules non irradiées à 0 h (12,7%) et à 24 h (9,4%). Notons aussi que le résultat obtenu à 24 heures est similaire à celui obtenu lors de la première expérience (12,2%).

Lors de cette expérimentation, une dose de radiation supérieure (4 Gy) fut aussi testée afin d'avoir un contrôle positif de cet arrêt en phase G2/M. A cette dose, un arrêt en phase G2/M est bien visible 24 heures après irradiation (figure III.8). Le pourcentage d'arrêt en phase G2/M est de 29,5 %. Cette donnée supplémentaire confirme qu'une dose de radiation ionisante élevée endommage les cellules de manière plus importante et provoque bien un arrêt des cellules en phase G2/M du à l'activation de la DDR. En effet, bien que le pourcentage en phase G2/M après que les cellules aient reçue une dose presque 3 fois supérieure soit identique à celui observé pour une dose de 1,5 Gy, l'arrêt en phase G2/M provoqué par la dose de 4 Gy reste visible sur un laps de temps 3 fois plus long.

En résumé, pour une dose de 1,5 Gy, aucun pic n'est observé 24 h après l'irradiation alors que pour une dose plus élevée un pic est observée 24 heures après l'irradiation. L'absence de pic post-24h à la dose la plus faible s'explique par le fait que les cellules ont déjà réparé leurs dommages à l'ADN et sont déjà reparties dans le cycle cellulaire au moment où l'analyse est réalisée. Par contre, pour une dose plus élevée, comme celle de 4 Gy, le pic observé 24 h après l'irradiation peut s'expliquer de deux manières :

On peut tout d'abord supposer qu'une dose de radiation plus élevée cause des dégâts plus importants aux cellules. Dès lors, celles-ci mettent plus de temps pour réparer les dommages et reprennent leur cycle cellulaire normal plus tardivement, ce qui se traduit par un pic en phase G2/M restant visible plus longtemps. D'un autre côté, il faut savoir qu'une dose de 4 Gy est en général létale pour les cellules. Le pic en phase G2/M représente donc peut-être aussi une grande proportion de cellules qui ne pourront pas réparer leurs dommages à l'ADN, et qui, ne pouvant pas reprendre leur cycle, finiront par mourir plus tard de différentes manières.

Au vu de ces résultats, deux expérimentations concernant l'analyse du cycle cellulaire 8 heures après irradiation furent réalisées. Les différentes conditions de cultures furent testées pour chacun des types cellulaires. Cependant, afin d'alléger la mise en page, tout les graphiques bruts issus de l'analyse au cytomètre de flux ne seront pas présentés. Seul ceux concernant l'une des expériences sur les cellules A549 et sur les cellules EAh926 sont visible à titre d'exemple à la figure III.9 et à la figure III.10 respectivement. Le tableau III.3 reprend le pourcentage de cellules A549 dans les différentes phases du cycle cellulaire pour l'expérimentation illustrée à la figure III.9, tandis que le tableau III.4 reprend le pourcentage de cellules EAhy926 dans les différentes phases du cycle cellulaire pour l'expérimentation illustrée à la figure III.10.

A la figure III.9 on remarque que des pics en phase G2/M sont observés dans les conditions où les cellules A549 sont irradiées que ce soit en monoculture ou en coculture. Dans les conditions où les cellules A549 ne sont pas irradiées, la grandeur du pic en G2/M ne diffère pas de plus de 1,5 % par rapport à la condition contrôle (tableau III.3).

Pour ce qui est des cellules endothéliales, on remarque qu'aucun pic bien défini ne ressort en phase G2/M. En effet, la différence de pourcentage entre les conditions non irradiées et irradiées n'excède jamais les 7% (tableau III.4). L'arrêt des cellules



Figure III.11 : Pourcentage de cellules A549 en phase G2 8 heures après irradiation par un faisceau de protons, dans les différentes conditions de culture. Résultats issus de deux expérimentations indépendantes (moyenne).



Figure III.12 : Pourcentage de cellules EAhy926 en phase G2 8 heures après irradiation par un faisceau de protons, dans les différentes conditions de culture. Résultats issus de deux expérimentations indépendantes (moyenne).

EAhy926 en phase G2/M n'est pas mis en évidence 8 heures après irradiation par un faisceau de protons.

Afin de comparer de manière plus aisée les résultats obtenus dans les différentes expériences, des graphiques reprenant la moyenne des pourcentages de cellules en phase G2/M, et ce dans les différentes conditions de culture, ont été calculés pour les cellules A549 (figure III.11) et pour les cellules EAhy926 (figure III.12).

La figure III.11 présente le pourcentage de cellules A549 en phase G2/M 8 heures après une irradiation par un faisceau de protons. On observe une augmentation de 19 % de la proportion de cellules en phase G2/M entre les cellules A549 non irradiées en monoculture et les cellules A549 irradiées en monoculture. Ces résultats indiquent que l'ADN présent dans les cellules A549 irradiées par un faisceau de protons, à une dose de 1,5 Gy, a subi des dommages et que les cellules subissent un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre une réparation de celui-ci.

On ne remarque quasiment pas de différence en terme de proportion de cellules en phase G2/M entre les différentes conditions où les cellules A549 sont non-irradiées. Les cellules A549 irradiées en face de cellules endothéliales elles aussi irradiées montre aussi un arrêt bien défini en phase G2/M. Cependant, bien qu'aucune analyse statistique ne peut être réalisée sur ces deux expérimentations, il semblerait qu'il y ait une légère tendance à l'augmentation de l'arrêt en phase G2/M pour les cellules A549 irradiées si celles-ci se situent face à des cellules EAhy926 qui elles aussi sont irradiées. Ce résultat est intéressant et nécessite d'être confirmé.

La figure III.12 présente le pourcentage de cellules EAhy926 en phase G2/M 8 heures l'irradiation par un faisceau de protons. Comme il a été observé auparavant, les cellules EAhy926 ne réalise pas un arrêt marqué en phase G2/M 8 heures après l'irradiation. La proportion de cellules en phase G2/M lorsqu'elles ne sont pas irradiées varie entre 8 et 10%. La variation de ce pourcentage entre les cellules non-irradiées et les cellules irradiées est un peu plus marquée, notamment lorsque les deux types cellulaires sont irradiés où une augmentation d'environ 8% des cellules en phase G2/M est constatée par rapport à ces mêmes cellules en co-culture et non irradiées (A549/EA). Il semble donc que l'arrêt des cellules endothéliales en phase G2/M n'ait pas lieu en même temps que les cellules A549.

Afin de déterminer la durée nécessaire à l'arrêt des cellules endothéliales en phase G2/M après irradiation, Anne-Catherine Heuskin, doctorante FNRS du laboratoire PMR des FUNDP a réalisé une cinétique à différents temps post-irradiation (0h ; 30 minutes ; 1 h ; 2 h ; 4 h ; 6 h ; 12 h ; 24 h et 48 h). Il en ressort que les cellules EAhy926 font un arrêt marqué en phase G2/M 12 heures après irradiation. Cela permet donc d'expliquer pourquoi aux temps de 8 et 24 heure aucun pic n'était clairement observé pour les cellules endothéliales. En effet, après 24 heures les cellules étaient, pour la majorité, déjà reparties dans leur cycle cellulaire tandis qu'à 8 heure, seulement une fraction de ces cellules commençait leur arrêt en phase G2/M.

En conclusion, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, qui est caractéristique des cellules irradiées, se produit dans des laps de temps différents en fonction du type cellulaire étudié. Les cellules A549 marquent l'arrêt 8 heures après l'irradiation, soit environ 4 heures plus tôt que les cellules endothéliales. Ce fait est peut-être une













PDGF-β









Figure III.13 : Expression relative en ARNm pour différents gènes en fonction des conditions de culture, pour les cellules A549 24 heures après une irradiation par faisceau de protons. Les résultats sont issus de trois expérimentations indépendantes. Les différentes conditions sont normalisées par rapport aux cellules A549 non-irradiées en monoculture. Les résultats ont été analysés par un test de type t Student. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 et sont présentés en tant que moyenne +/- 1 écart-type.

mise en évidence d'une différence de sensibilité des cellules endothéliales à enclencher une DNA Damage Response par rapport aux cellules A549.

3) Analyse du niveau d'expression de gènes d'intérêt 24 heures après irradiation

Toujours dans le but de mettre en évidence un éventuel dialogue moléculaire ayant lieu entre les deux types cellulaire après une irradiation, une étude de l'expression de différents gènes d'intérêt fut réalisée.

Il a tout d'abord fallu sélectionner des gènes potentiellement intéressants et montrant une variabilité importante de leur expression après irradiation.

Cette étape avait déjà été réalisée dans le cadre de la thèse d'Hélène Riquier.

En effet, dans le but de comparer deux types de radiations ionisantes (rayons X et particules alpha), une analyse de gènes fut effectuée à l'aide d'une plaque 96 puits TaqMan Low-Density Array (TLDA) de type Human immune. Cette plaque reprend toute une série de gènes dont les produits sont impliqués dans différentes fonctions du système immunitaire comme des cytokines, des chémokines, des récepteurs de surface, des facteurs de transduction du signal et donc susceptibles d'influencer la viabilité des cellules tumorales et les capacités angiogéniques des cellules endothéliales.

A partir de ces résultats, des gènes montrant une variation d'expression intéressante ont été sélectionnés pour être analysés par qRT-PCR lors des différentes expérimentations réalisées ultérieurement.

Dans le cadre de ce travail, les gènes ayant été retenus sont les mêmes que ceux ayant été sélectionnés précédemment sur base des résultats du TLDA. Le gène GAPDH fut lui aussi utilisé comme gène de référence.

Au total, les 9 gènes suivants furent retenus :

- IL-1 β : (Interleukine-1 β)
- MCP-1 : (Monocyte Chemoattractant Protein-1)
- CXCL-10 : (CXC Chemokine Ligand 10)
- Fas-R : (Fas Receptor)
- FGF-2 : (Fibroblast Growth Factor-2)
- PDGF-β : (Platelet Derived Growth Factor-β)
- IL-8 : (Interleukine-8)
- CSF-1 : (Colony Stimulating Factor-1)
- GAPDH : (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase)

Les différents graphiques présentant l'analyse de l'expression de ces différents gènes d'intérêt pour les cellules A549 sont repris à la figure III.13. Ces résultats sont issus de trois expérimentations indépendantes réalisées par qRT-PCR.

Une des premières choses que l'on remarque en analysant cette figure n'est autre que l'amplitude assez importante des écarts-types. Les valeurs de « fold change » variant assez bien d'une expérimentation à l'autre pour la même condition. Cela est peut-être dû aux faibles quantités d'ADN engagées pour effectuer les PCR. En effet, le peu de

cellules pouvant être récoltées est une limite pour bons nombres de nos manipulations. Néanmoins, on peut ressortir quelques conclusions de ces analyses PCR.

Tout d'abord, on remarque une augmentation significative de l'expression du facteur pro-angiogénique FGF-2 lorsque les cellules A549 sont irradiées en monoculture et ce par rapport à ces mêmes cellules non-irradiées. Cependant, cette augmentation ne se distingue pas pour les cellules A549 irradiées en co-culture, bien que dans les cellules A549 irradiées situées en face de cellules EAhy926 non-irradiées, l'augmentation semble être du même type qu'en monoculture.

Plus surprenant, cette surexpression de FGF-2 semble aussi être marquée dans les cellules A549 non- irradiées situées en face de cellules EAhy926 irradiées.

Pour le gène CXCL10, une augmentation significative de son expression est observée lorsque les cellules A549 irradiées sont situées en face de cellules EAhy926 non-irradiées.

Dans les autres conditions de culture, l'expression de ce gène après irradiation ne montre aucune tendance vers une augmentation ou vers une diminution clairement définie.

L'expression des gènes CSF-1 et PDGF- β quant à elle, ne semble pas changer quelle que soit la condition testée. Ces résultats sont en concordance avec les résultats obtenus précédemment par H. Riquier lors d'irradiation des cellules A549 avec une dose équivalente de particules alpha.

L'expression du gène MCP-1 semble augmenter lorsque les cellules A549 sont irradiées. Cependant cette surexpression n'est significative que pour les cellules A549 irradiées situées en face de cellules endothéliales non-irradiées. Lorsque les deux types cellulaires sont irradiés en co-culture, une surexpression semble aussi avoir lieu. Toutefois, l'expression de ce gène semble diminuer lorsque les cellules A549 se situent en face de cellules EAhy926 irradiées.

L'expression du récepteur de mort FAS augmente de manière significative lorsque les cellules A549 sont irradiées en monoculture. Bien que ce ne soit pas significatif d'un point de vue statistique, on perçoit assez bien que cette augmentation, bien que moins marquée, a aussi lieu dans les conditions de co-culture où les cellules A549 sont irradiées. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus pour une irradiation de ces cellules dans les mêmes conditions avec une dose équivalente de particules alpha. La surexpression de ce récepteur témoigne des dommages provoqués aux cellules. En effet, ce récepteur fait partie de la voie apoptotique extrinsèque et permet un déclenchement de l'apoptose, qui dans le cas présent, est causée par les radiations ionisantes.

Pour le gène IL-8, on observe une surexpression significative lorsque les cellules A549 sont irradiées face à des cellules endothéliales non-irradiées. De plus, on peut aussi percevoir une légère tendance à la surexpression de l'IL-8 lorsque les cellules A549 sont irradiées, seules ou en co-culture. Cependant cette surexpression est aussi visible lorsque ce sont les cellules EAhy926 qui sont irradiées en face des cellules A549 non-irradiées.

FGF-2



CSF-1

n=1

Ι

corch549/EA*

Expression relative en ARNm

2,5

1,5

2

1

0

£A

0,5



PDGF-β



MCP-1

corchshat left

corch549* HA

corch549/EA

£A*



FAS-R



CXCL10



Figure III.14 : Expression relative en ARNm pour différents gènes en fonction des conditions de culture, pour les cellules EAhy926 24 heures après une irradiation par faisceau de protons. Résultats issus de trois expérimentations excepté pour les gènes CSf-1, MCP-1 et IL-1 β où n=2 et sauf mentions contraires. Les différentes conditions sont normalisées par rapport à la condition EAhy926, les résultats ont été analysés par un test de type t Student (lorsque n = 3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001.

Enfin, l'expression du gène codant pour l'interleukine-1 β semble augmentée lorsque les cellules A549 sont irradiées. Une augmentation est aussi constatée lorsque les cellules A549 sont irradiées face aux cellules EAhy926 non-irradiées. Il en va de même lorsque les deux types cellulaires sont irradiés où, cette fois, la surexpression est significative. Ces résultats sont encore une fois en accord avec les résultats d'expériences précédentes dans lesquelles les cellules furent irradiées à une dose équivalente de particules alpha. On remarquera aussi la surexpression bien que légère mais hautement significative de l'IL-1 dans la condition de co-culture où aucun type cellulaire n'est irradié. Cela signifie donc que la simple mise en co-culture de ces deux types cellulaire provoquerait une légère augmentation de la transcription du gène de l'IL-1 β et/ou une augmentation de la stabilité de l'ARNm. L'irradiation des cellules A549 provoquerait donc une augmentation de la sécrétion de cette molécule pro-inflammatoire.

Après ce tour d'horizon des différentes expressions de gènes dans les cellules A549, abordons maintenant les résultats pour les cellules EAhy926 (figure III.14).

Les résultats suggèrent que l'expression du gène FGF-2 diminue lorsque les cellules EAhy926 sont en co-culture en comparaison avec les cellules EAhy926 en monoculture. L'expression de ce gène lorsque les cellules EAhy926 sont irradiées en monoculture semble légèrement augmenter. Cependant, une fois que les cellules sont mises en co-culture avec les cellules A549, l'expression de FGF2 semble diminuer légèrement. Cette diminution est d'ailleurs significative pour les cellules EAhy926 non-irradiées situées en face de cellules A549 irradiées. Néanmoins, aucune différence apparente n'est observée lorsque l'on compare les conditions de co-culture entre elles.

En ce qui concerne l'expression du gène CXCL-10, les écarts-types trop importants nous empêchent de tirer des conclusions.

L'expression du gène CSF-1 quant à elle ne laisse paraître aucune tendance et ce quelles que soient les conditions testées.

Pour ce qui est de l'expression du gène PDGF- β , une tendance à la surexpression semble se profiler lorsque les cellules endothéliales sont irradiées en monoculture mais ce résultat n'est pas statistiquement significatif. Aucune variation d'expression n'est détectée lorsque les cellules EAhy926 sont en co-culture, qu'elles soient irradiées ou pas.

Le profil d'expression du gène MCP-1 est lui aussi difficile à interpréter. En effet, on remarque une légère tendance à la baisse de l'expression de ce gène lorsque les cellules sont mise en co-culture avec des cellules A549, excepté lorsque les deux types cellulaires sont irradiés en co-culture. Il est cependant important de noter que les résultats de l'expression de MCP-1 qui est représentée pour les cellules EAhy926 irradiées en face de cellules A549 non-irradiées, n'est issu que d'une seule expérience.

Le niveau d'expression de FAS-R dans les cellules EAhy926 irradiées en monoculture montre quant à lui une augmentation significative par rapport aux cellules non-irradiées en monoculture. Lorsqu'aucun type cellulaire n'est irradié dans la co-culture, un taux d'expression comparable à celui des cellules EAhy926 non irradiées en monoculture est observé. Comparées aux cellules EAhy926 en

monoculture et non-irradiées, les co-cultures où les cellules EAhy926 sont irradiées montrent une augmentation de l'expression du récepteur de mort, indice de la capacité des radiations ionisantes à provoquer la mort cellulaire. Cependant cette augmentation est aussi observée lorsque des cellules A549 irradiées se trouvent en face des cellules EAhy926 non-irradiées, ce qui semble difficilement explicable. Suite à la grande variabilité observée, ces résultats devront être confirmés par des expériences ultérieures.

Le profil d'expression du gène de l'interleukine-8 ne montre aucun effet de l'irradiation dans les cellules EAhy926, peu importe les conditions de culture.

Enfin, le gène de l'IL-1 β semble quant à lui surexprimé lorsque les cellules endothéliales sont irradiées en monoculture ainsi qu'en co-culture. Quant aux conditions de co-culture où les cellules EAhy926 ne sont pas irradiées, une diminution de l'expression du gène y est constatée.

IV. DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au fil des années, la radiothérapie s'est imposée comme une technique thérapeutique efficace dans le cadre du traitement des cancers, et ce au même titre que la chirurgie ou la chimiothérapie. Ces diverses formes de traitements sont d'ailleurs souvent associées dans des thérapies « mixtes » avec pour but d'en ressortir un effet synergique et augmenter les chances de succès du traitement.

A l'heure actuelle, la majorité des traitements par radiothérapie dispensés dans les hôpitaux utilisent des radiations ionisantes de type rayons X. Ces rayonnements font partie des premiers rayonnements ionisants découverts par l'homme. Très tôt l'impact des propriétés ionisantes de ces radiations fut étudié sur différents tissus ainsi qu'au niveau cellulaire. Quand la propriété létale de ces rayonnements fut mise en évidence, les scientifiques de l'époque ont tenté de s'en servir à bon escient pour éradiquer la propagation de cellules malignes ne répondant plus à aucun contrôle d'homéostasie cellulaire. La radiothérapie était née.

Cependant, depuis les débuts de cette technique thérapeutique, la radiothérapie a bien évoluée. L'utilisation des rayons X dans le cadre thérapeutique a été rationnalisée de sorte à minimiser les effets indésirables inhérents à l'utilisation de ce type de rayonnement. Toutefois, bien que la technique de radiothérapie par rayons X soit la plus utilisée dans le monde à l'heure actuelle, elle a commencé à montrer ses limites. En effet, la relative simplicité de la mise en place de ce traitement ainsi que son utilisation quotidienne par les radiologues a fait passer la radiothérapie par rayons X au stade de traitement usuel voire routinier.

Les principales limites de ce traitement, déjà évoquées dans ce travail, concernent la précision de la zone à traiter et l'efficacité thérapeutique de la technique en elle-même.

Or, dans le domaine scientifique, l'évolution des techniques est perpétuelle et le domaine de la radiothérapie n'y échappe pas. En effet, un nouveau type de radiothérapie qui a vu le jour il y a de ça 20 ans à peine et qui semble bien parti pour prendre la relève des traitements par radiothérapie dite conventionnelle n'est autre que l'hadronthérapie, qui utilise un faisceau de particules à la place de photons.

Comme il a déjà été mentionné, d'un point de vue thérapeutique, cette technique n'apporte que des avantages par rapport aux rayons X. En effet, grâce à cette technique, les tumeurs sont mieux ciblées et le traitement est plus efficace pour tuer les cellules tumorales. De plus, il permet d'éviter une irradiation trop importante des tissus sains. Il reste cependant d'un coût très élevé.

Cependant, malgré les améliorations amenées par l'hadronthérapie, un problème inhérent à toutes sortes de traitement par radiothérapie subsiste, celui de la radiorésistance des cellules. Bien qu'il fût assez tôt constaté que certains types de tissus ne répondaient pas de la même manière aux traitements par radiothérapie, les recherches dans le domaine de la sensibilité des cellules aux radiations ionisantes n'ont débuté qu'il y a peu. De plus, la mise en évidence de la mixité des types cellulaires présents au sein des tumeurs a relancé le domaine de la recherche sur la radiosensibilité des cellules. Il apparaît maintenant qu'en plus de la radiosensibilité de base propre au type cellulaire en question et au rayonnement utilisé, s'ajoute tout un réseau de communications moléculaires complexes entre les différents types cellulaires composant la tumeur.

C'est dans ce cadre de radiorésistance induite par une communication intercellulaire que se place ce travail et plus précisément la radiorésistance induite par la communication moléculaire entre des cellules endothéliales et tumorales. Le reste de ce chapitre sera donc consacré à la discussion des résultats obtenus au cours de cette étude ainsi qu'aux perspectives qu'ils peuvent entraîner dans le domaine thérapeutique. Enfin, une conclusion générale clôturera ce travail.

<u>1) Discussion et perspectives</u>

1.1 Effets de l'irradiation par un faisceau de protons des cellules A549 et EAhy926 sur la survie des cellules et sur leur cycle cellulaire

La première constatation effectuée fut celle de la capacité qu'a un faisceau de protons (avec un LET calibré à 25 keV/µm) à provoquer des dommages létaux aux cellules et ce indépendamment de toute communication intercellulaire. En effet, la réalisation de tests de clonogénicité sur les cellules A549 ayant reçu une dose de 1,5 Gy nous apprend que 63 % des cellules ont perdu leur capacité proliférative 11 jours après l'irradiation. Cela signifie donc qu'après une seule irradiation, quasiment deux cellules sur trois ne prolifèrent plus et sont donc considérées comme « mortes » d'un point de vue radiobiologique. Cette constatation est aussi vérifiée pour les cellules endothéliales EAhy926. L'utilisation de ce faisceau semble donc opportune pour effectuer des études sur la communication cellulaire menant à une radiorésistance. De plus, la dose de 1,5 Gy à laquelle les études ont été menées est assez proche des doses utilisées en radiothérapie. En effet, à l'heure actuelle, un traitement radiothérapeutique s'étale sur une durée plus ou moins longue suivant le type de cancer à traiter. Cet étalement du traitement permet de fractionner les doses de radiations perçues par le patient. Il semble d'ailleurs évident qu'il soit préférable de recevoir la dose totale pouvant aller de 30 à 90 Gy en plusieurs étapes plutôt qu'en une seule séance. Or, actuellement le schéma préconisé en Amérique du Nord ainsi qu'en Europe consiste en la délivrance d'une dose d'environ 2 Gy par jour et ce 5 jours par semaine (Bernier et al., 2004). La dose testée dans ce travail n'est donc pas très éloignée de la dose réellement absorbée par la tumeur lors d'une séance de radiothérapie conventionnelle.

De plus, les effets sur la survie cellulaire constatés dans ce travail sont semblables à ceux obtenus dans les études réalisées avec des particules alpha au sein de notre laboratoire par H. Riquier. Dans notre étude, la fraction de survie des cellules A549 se situe aux alentours de 40% alors que ce pourcentage tombe à 20 % dans les études réalisées avec des particules alpha.

Quant à l'arrêt des cellules A549 en phase G2/M, arrêt caractéristique effectué par des cellules irradiées, celui-ci est observé 8 heures après l'irradiation lors de l'utilisation d'un faisceau de protons alors que cet arrêt est encore observable 24 heures après l'irradiation lorsque des particules alpha sont utilisées.

Bien que ces résultats diffèrent lorsque l'on analyse les valeurs numériques, la tendance semble être assez identique.

Le taux de survie de 20% associé à un pic en phase G2/M encore visible 24 heures après l'irradiation avec des particules alpha est cohérent avec les données sur la survie cellulaire et l'arrêt en du cycle cellulaire que nous avons obtenues pour les mêmes cellules mais irradiées par un faisceau de protons.

En effet, une fraction de survie plus faible (20%) indique que des dommages plus conséquents ont été produits dans les cellules, or, plus les dégâts cellulaires sont complexes et nombreux, plus le temps d'arrêt en phase G2/M nécessaire à leur réparation est important, ce qui explique dès lors un pic en phase G2/M encore observable 24 heures dans les expériences réalisées avec des particules alpha.

Dès lors, une fraction de survie plus importante comme celle constatée dans ce travail signifie que les dommages cellulaires subis par les cellules sont moins importants, cela se traduit par un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M s'étalant sur une plus courte durée. Ainsi, l'arrêt des cellules A549 en phase G2/M s'observe 8 heures après l'irradiation par un faisceau de protons et n'est plus visible au temps de 24 heure comme c'était le cas pour une irradiation avec des particules alpha. Nos résultats sont donc cohérents et montrent qu'une même dose de protons induit une cytotoxicité moindre que les particules alpha.

1.2) Effets de l'irradiation des cellules A549 et EAhy926 par un faisceau de protons sur l'expression de divers gènes d'intérêt

Comme il a déjà été mentionné précédemment dans ce travail, des gènes spécifiques furent sélectionnés pour leur profil d'expression après irradiation par des particules alpha.

Un des objectifs de ce travail consistait à identifier des molécules sécrétées par les différents types cellulaires et pouvant être impliquées dans la radiorésistance. Cependant, très peu de résultats significatifs sur le sujet ressortent des analyses réalisées.

De plus, les quelques résultats significatifs issus des analyses d'expression de gènes ne sont pas toujours en rapport direct avec un éventuel dialogue radioprotecteur entre les deux types cellulaire. Toutefois, on peut retirer quelques différences d'expression génique entre des cellules irradiées ou non irradiées et ce pour plusieurs gènes et dans les deux types cellulaires.

On observe par exemple une surexpression significative du gène FGF-2, lorsque les cellules A549 sont irradiées. Cette molécule est un facteur de croissance important dans le processus d'angiogenèse. En effet, lorsque des cellules endothéliales sont stimulées avec du FGF-2 elles peuvent sécréter du VEGF de manière autocrine et donc stimuler leur propre croissance (Seghezzi et al., 1998). Les cellules tumorales sécrétant ce facteur de croissance lorsqu'elles sont irradiées peuvent dès lors augmenter la prolifération des cellules endothéliales présentes dans leur environnement direct pour entretenir la vasculature tumorale, ce qui pourrait mener à une radiorésistance des cellules tumorales.

Ce facteur pourrait donc être ajouté à la liste des molécules pro-angiogéniques à cibler par voie chimiothérapeutique au même titre que le VEGF et ce dans le



Figure IV.1: Schéma du mécanisme en forme de boucle représentant les effets de la sécrétion d'IL-8 par les cellules de carcinome pulmonaire sur la sécrétion de différents facteurs de croissance par les neutrophiles. (Luppi et al., 2007)

but de limiter la croissance tumorale par un blocage de son irrigation par les vaisseaux sanguins.

Une autre observation effectuée dans les deux types cellulaires est la surexpression de différentes cytokines pro-angiogéniques et pro-inflammatoires après irradiation.

En effet, il a été constaté une tendance à la surexpression des gènes IL-8 et IL- 1β lorsque les cellules étaient irradiées.

Or, des chercheurs japonais ont montré que la sécrétion d'IL-1 β dans le microenvironnement tumoral par des cellules cancéreuses pouvait induire l'expression de différents facteurs angiogéniques par les cellules tumorales elles-mêmes mais aussi par des fibroblastes et des macrophages présents dans l'environnement tumoral. Ces facteurs angiogéniques auraient donc pour effet de renforcer la croissance tumorale en accélérant la formation de nouveaux vaisseaux (Saijo et al., 2002).

Le rôle de l'IL-8 dans l'angiogenèse tumorale a lui aussi été étudié à plusieurs reprises. Une étude de l'effet de l'IL-8 sur la prolifération des cellules A549 a d'ailleurs été réalisée en 2007 par l'équipe de Fabrizio Luppi (Luppi et al., 2007). Leurs résultats indiquent que la sécrétion d'IL-8 par ces cellules peut entrainer la sécrétion de différents facteurs de croissance, notamment l'Epithelial Growth Factor (EGF) par des cellules environnantes comme des neutrophiles, eux-mêmes recrutés par des sécrétions de chémokines issus des cellules tumorales. Les cellules A549 surexprimant ce récepteur, celles-ci prolifèreront. A noter que le tout forme un mécanisme en forme de boucle de rétroaction positive amplifiant le processus (figure IV.1).

Une augmentation de l'expression du gène MCP-1 semble aussi avoir lieu après irradiation des cellules A549. Or, MCP-1 est lui aussi connu pour ses propriétés pro-angiogéniques et pro-inflammatoires. On peut d'ailleurs citer une expérience réalisée par des chercheurs américains qui en plus de démontrer l'activité pro-angiogénique de ce facteur ont montré que son inhibition améliorait la survie de souris préalablement injectée avec des cellules issues d'un cancer du sein (cellules MDA-MB-231) (Salcedo et al., 2000). Ce facteur pro-angiogénique permet donc, lui aussi, une augmentation de la prolifération tumorale.

On remarque que la plupart des molécules intervenant dans la prolifération des cellules tumorales ont à la fois un effet pro-angiogénique et pro-inflammatoire. D'ailleurs, les cellules tumorales détournent en partie le message d'inflammation à leur avantage. En effet, le recrutement d'acteurs de la réponse inflammatoire permet dans plusieurs cas aux cellules tumorales de percevoir des facteurs de croissance dans leur environnement direct, augmentant de ce fait leur prolifération.

Enfin, l'expression du gène codant pour le récepteur FAS montre une surexpression lorsque les cellules A549 sont irradiées. Cela nous apprend donc qu'il existe une coexistence entre une voie de signalisation ayant pour but la survie des cellules tumorales, exemplifié par l'arrêt du cycle cellulaire

permettant la réparation de l'ADN, et une voie de signalisation enclenchant des processus de mort cellulaire, notamment par la surexpression du récepteur de mort FAS.

En ce qui concerne les cellules endothéliales, le profil d'expression des gènes FAS-R et PDGF- β montrent deux tendances à la surexpression plus ou moins marquée et ce surtout lorsque les cellules sont irradiées en monoculture. En effet, cette surexpression est plus difficilement perceptible quand celles-ci sont irradiées en co-culture.

Le récepteur FAS des cellules endothéliales est surexprimé dans les cellules irradiées en monoculture, témoignant des dommages létaux causés aux cellules par les radiations ionisantes. Ce résultat était lui aussi observé pour les cellules A549, comme mentionné ci-dessus.

La deuxième tendance en matière d'expression génique dans les cellules EAhy926 concerne la surexpression du gène PDGF- β qui est observée lorsque les cellules endothéliales sont irradiées en monoculture. Or, à l'image de beaucoup d'autres gènes déjà cités, ce facteur a lui aussi des caractéristiques pro-angiogéniques.

Toutes ces analyses montrent que l'irradiation des cellules tumorales et endothéliales par un faisceau de protons est capable d'induire des changements d'expression génique impliquant différents facteurs qui au final favorisent la croissance tumorale. Au vu des nombreux facteurs proangiogénique sécrétés par les cellules tumorales, on peut raisonnablement penser qu'un dialogue entre les cellules tumorales et endothéliales existe bel et bien. Ces effets devront être confirmés par des expériences ultérieures.

Cependant, malgré les indices de l'existence d'un dialogue entre ces deux types cellulaires, nous n'avons pas constaté d'effets de radiorésistance au cours de la réalisation de ce travail. Une des hypothèses que nous avons émises est que le faible nombre de cellules utilisé pour les différentes manipulations pouvait être à l'origine de cette non-observation d'effets radioprotecteurs. En effet, il est peut-être nécessaire d'avoir une quantité de cellules plus importante afin qu'un effet soit visible sur l'autre type cellulaire. La distance entre les deux types cellulaire dans la chambre d'irradiation ainsi que le volume total de milieu sont aussi peut-être trop importants pour permettre une diffusion optimale ainsi qu'une concentration suffisante des différents facteurs intervenant dans la radiorésistance.

Dans un premier temps, il serait donc intéressant de réaliser cette expérimentation avec un nombre de cellules beaucoup plus élevé. En effet, ce nombre limité de cellules est issu d'une contrainte technique propre à l'étape d'irradiation car il est impossible avec le dispositif actuel d'irradier une grande surface cellulaire tout en étant certain de la dose qui lui est administrée. Pour ce faire, il faudrait développer une station d'irradiation capable d'irradier une plus grande surface de cellules. Cela permettrait une réduction des écarts-types observés en qRT-PCR, sans doute tributaire d'une trop faible quantité d'ADNc engagée pour cette analyse.

En plus de réduire les écarts-types dans les études d'expression génique, un plus grand nombre de cellules nous permettrait d'investiguer si les changements d'expression des différents gènes étudiés sont aussi observés au niveau protéique. A l'heure actuelle, il difficile voire impossible de réaliser ce genre d'analyse par Western-Blot ou ELISA de par la trop faible concentration en protéines qui peut être extraite des échantillons et du milieu de culture.

Une deuxième hypothèse pouvant expliquer cette absence d'effet radioprotecteur serait que le temps nécessaire pour que cet effet se mette en place nécessite une communication intercellulaire plus longue que les 24 heures actuelles. Afin de répondre à cette question, on pourrait tester la survie cellulaire des co-cultures à différents intervalles de temps post-irradiation.

Il serait aussi intéressant de tester différentes doses de protons afin de déceler une éventuelle relation entre la dose et le phénomène de radiorésistance. Une étude menée sur différents types de particules pourrait aussi être envisagée.

Enfin, dans le but de confirmer un éventuel effet de radiorésistance engendré par différents facteurs, il serait intéressant de réaliser les différents types d'analyse réalisées dans ce mémoire tout en inhibant par le processus d'ARN interférence, l'expression protéique des facteurs d'intérêt tels que le PDGF- β et ou FGF-2 par exemple. Une autre méthode que les siRNA qui est d'ailleurs utilisée en radiothérapie pour augmenter la radiosensibilité des cellules tumorales, consiste en l'utilisation d'anticorps séquestrant des facteurs impliqués dans la radiorésistance, les empêchant d'agir.

2) Conclusion générale

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis de confirmer l'effet des radiations ionisantes sur la survie cellulaire de cellules tumorales et endothéliales. Une diminution de la survie cellulaire a été mise en évidence lors de l'irradiation des ces cellules par un faisceau de protons. Pour les cellules tumorales, cette diminution de la survie cellulaire concorde avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M 8 heures après irradiation. Certains effets significatifs ont été mis en évidence quant à la relation entre l'irradiation des cellules tumorales et endothéliales, et l'expression de certains gènes. Les gènes surexprimés en condition d'irradiation appartiennent pour la plupart à la famille des facteurs pro-angiogéniques et pro-inflammatoires. Or, un maintien de l'angiogenèse et de l'inflammation sont deux caractéristiques propres aux cancers (Hanahan et Weinberg, 2011). C'est pourquoi en vue d'améliorer les traitements anti-cancéreux, la prise d'inhibiteurs de l'angiogenèse et de l'inflammation en parallèle avec des sessions de radiothérapie commencent à se mettre en place.

Tout porte donc à croire que l'évolution des thérapies anti-cancéreuses actuelles passera non seulement par une évolution des techniques de radiothérapie en soi, mais aussi et surtout par la découverte de différentes molécules chimiothérapeutiques pouvant être prises en parallèle et qui, en court-circuitant des processus essentiels à la prolifération tumorale, augmenterait l'efficacité du traitement.
V. BIBLIOGRAPHIE

Afshar G, Jelluma N, Yang X, Basila D, Arvold ND, Karlsson A, Yount GL, Dansen TB, Koller E, Haas-Kogan DA, "Radiation-induced Capsase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells", Cancer research, 2006.

American Cancer Society, "Cancer facts and figures", 2012.

Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G, "Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo", J. Exp. Med., 1995.

Attardi A, DePinho R, "conquering the complexity of p53", Nature genetics, 2004.

Bernier J, Hall EJ, Giaccia A, "Radiation oncology: a century of achievements", Nat. Rev. Cancer, 2004.

Chu K, Teele N, Dewey MW, Albright N, Dewey WC, "Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3sigma and CDKN1A (p21) knockout cell lines" Radiation Research., 2004.

Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M, "The role of radiotherapy in cancer treatment", Cancer, 2005.

Edgell CJS, McDonald CC, Graham JB. "Permanent cell line expressing factor VIII related antigen established by hybridization", Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1983.

Elshaikh MA, Mahmoud-Ahmed AS, Kinney SE, Wood BG, Lee JH, Barnett GH, Suh JH, "Recurrent head-and-neck chemodectomas: a comparison of surgical and radiotherapeutic results", Int J Radiat Oncol Biol Phys., 2002.

Endlich B, Radford IR, Forrester HB, Dewey WC, "Computerized video time-lapse microscopy studies of ionizing radiation-induced rapid-interphase and mitosis-related apoptosis in lymphoid cells", Radiation Research, 2000.

Ferrara N, Henzel WJ, "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells", Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989.

Folkmann J, "Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications", New England Journal of Medicine, 1971.

Fuster JJ, Fernández P, González-Navarro H, Silvestre C, Nabah YN, Andrés V, "Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies", Cardiovasc. Res., 2009.

Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Zvi, Kolesnick R, "Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis", Science, 2003.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP,"In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors", Journal of the National Cancer Institute, 1973.

Globocan 2008, IARC.

Gorski D, Beckett M, Jaskowiak N, Calvin D, Mauceri H, Salloum R, Seetharam S, Koons A, Hari D, Kufe D, Weichselbaum R, "Blockade of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation", cancer research, 1999.

Greenblatt M, Shubi P, "Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique", Journal of the national cancer institute, 1968.

Grupta VK, "Brachytherapy – past, present and future", Journal of Medical Physics, 1995.

Hanahan D, Weinberg R, "The hallmarks of cancer", Cell, 2000.

Hanahan D, Weinberg RA, "Hallmarks of cancer: the next generation", Cell, 2011.

Hillen F, Griffoen A, "Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond", Cancer metastasis, 2007.

Fujimoto H, Sangai T, Ishii G, Ikehara A, Nagashima T, Miyazaki M, Ochiai A, "Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression", Int. J. Cancer., 2009.

ICRP, "Relative Biological Effectiveness (RBE), QualityFactor (Q), and Radiation Weighting Factor", ICRP publication 92, 1990.

Ito H, Daido S, Kanzawa T, Kondo S, Kondo Y, "Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells", International journal of oncology, 2005.

Joiner M, Van der kogel A, "Basic Clinical Radiobiology 4th Edition", A Hodder Arnold Publication, 2009

Kaneko T, Zhang Z, Mantellini MG, Karl E, Zeitlin B, Verhaegen M, Soengas MS, Lingen M, Strieter RM, Nunez G, Nör JE, "Bcl-2 orchestrates a cross-talk between endothelial and tumor cells that promotes tumor growth", Cancer Research, 2007.

Kerbel RS, "Tumor angiogenesis", New England Journal of Medicine, 2008.

Lee J, Bernstein A, "p53 mutations increase resistance to ionizing radiation", PNAS, 1993.

Leibel, Phillips, Text book of radiation oncology 3rd edition, Saunders, 2010.

Levin WP, Kooy H, Loeffler JS, DeLaney TF, "Proton Beam Therapy", British Journal of Cancer, 2005.

Luppi F, Longo AM, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS, « Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation », Lung Cancer, 2007.

Harrisona L, Chadhaa M, Hillb R, Hua K, Shashaa D, "Impact of Tumor Hypoxia and Anemia on Radiation Therapy Outcomes", The oncologist, 2002. Matsuoka S, Ballif B, Smogorzewska A, McDonald E, Hurov K, Luo J, Bakalarski C, MacFarlane M, Williams A, "Apoptosis and disease: a life or death decision", EMBO, 2004.

Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E, "European cancer mortality predictions for the year 2012", Annals of oncology, 2012.

Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi S, Elledge S, "ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage", Science, 2007.

Mullenders L, Atkinson M, Paretzke H, Sabatier L, Bouffler S, "Assessing cancer risks of low-dose radiation", Nature Reviews Cancer, 2009.

Paull T, Rogakoub E, Yamazakic V, Kirchgessnerc C, Gellerta M, Bonnerb W, "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage", Current biology, 2000.

Rothkamm K, Krüger I, Thompson L, Löbrich M, "Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle", Molecular and cellular biology, 2003.

Sabin R, Anderson R, "Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation", Genome integrity, 2011.

Saijo Y, "Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction", J. Immunol., 2002.

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ, "Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1 : direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression", Blood, 2000.

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P, "Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis", J. Cell Biol., 1998.

Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klags-brun M, "Heparinaffinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor", Science, 1984.

Siemann DW, "Vascular targeting agents", Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside", 2002.

Stucki M, Jackson SP, "Tudor domains track down DNA breaks", Nature cell biology, 2004.

Urushibara A, Yokoya A, Shikazono N, Watanabe R, Fujii K, O'Neill P, "DNA Damage Induced by the Direct Effect of He Ion Particles", Radiation Protection Dosimetry, 2006.

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B, "Death through a tragedy: mitotic catastrophe", Cell death and differenciation, 2008.

Ward JF, "Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation produced free radicals", Radiat. Res., 1981.

Warters R, Hofer K, Harris C, Smith J, "Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: Elucidation of the primary site of radiation damage", Current Topics in Radiation Research Quarterly, 1977.

Wéra A-C, Riquier H, Heuskin A-C, Michiels C, Lucas S, "In vitro irradiation station for broad beam radiobiological experiments", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B, 2011.

VI. ANNEXE

.

Name of the gene	Forward sequence	Reverse sequence	Optimal concentration (nM/nM)
Interleukin-1-β	CTTAAAGCCCGCCTGACAGA	AATAGGGAAGCGGTTGCTCAT	300/300
Monocyte Chimoattractant Protein 1	CATTGTGGCCAAGGAGATCTG	AGTGAGTGTTCAAGTCTTCGGAGTT	900/300
Interferon gamma-induced Protein- 10	GCCATCAAGAATTTACTGAAA GCAG	GCCTCTGTGTGGTCCATCCT	300/300
FAS receptor	TTGGAAGGCCTGCATCATG	TGGTTCATCCCCATTGACTGT	300/300
Basic Fibroblast Growth Factor	TTCAAAGTTCATTTAAAGGCT ACTATTCAT	TGGATACGACTAATATTGTTGTTGGAA	300/300
Platelet-Derived Growth Factor - β	AGCTTGGCTCGTGGAAGAAG	TTGCACTCGGCGATCATG	900/300
Interleukin-8	TTGATACTCCCAGTCTTGTCA TTGC	TGACTGTGGAGTTTTGGCTGTTT	300/300
Colony Stimulating Factor-1	GCTCCAGGAGTCTGTCTTCCA	AATCCGCTCTCTGAGGCTCTT	300/300
Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	GTCCACCACCCTGTTGCT GTA	300/300

Annexe 1 : Tableau reprenant les caractéristiques des différentes amorces utilisées pour la réalisation des PCR.